

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008, στο Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική του Πανεπιστημίου Στερεάς Ελλάδας, στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της εργασίας μου, Επίκουρο Καθηγητή (υπό διορισμό) κ. Παντελή Μπάγκο για την συνεχή παρακολούθηση και την βοήθειά του, και τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Αμαλία Καραγκούνη-Κύρτσου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Πλαγιανάκο για τον χρόνο που αφιέρωσαν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αναστάσιο Ιωαννίδη για την προσοχή και την βοήθεια που μου προσέφερε, την κα. Νίκη Δήμου για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σχετικά με το στατιστικό πακέτο Stata, τον κ. Γεώργιο Νικολόπουλο που μας προσέφερε πρόσβαση στο Stata και την κα. Μαρία Αδάμ για την βοήθειά της. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξή της και όλους αυτούς που συντέλεσαν στην υλοποίηση και ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ	4
ABSTRACT.....	5
KEY WORDS	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΠΜΘΩ)	7
1.1.1 Παθογένεια του συνδρόμου ΠΜΘΩ	10
1.1.2 Διάγνωση του συνδρόμου ΠΜΘΩ.....	13
1.1.3 Διαφορική διάγνωση	18
1.1.4 Θεραπεία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών	19
1.2 Η ινσουλίνη και ο υποδοχέας της.....	21
1.2.1 Σχέση των G-πρωτεϊνών στη σηματοδότηση της δράσης της ινσουλίνης και σύνδεσή τους με τις IPGs	23
1.2.2 Θεωρητικό μοντέλο αλληλουχίας γεγονότων της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης.....	25
1.3 Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης.....	27
1.3.1 Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων και το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.....	29
1.3.2 Ετερογένεια μεταξύ μελετών.....	30
1.3.5 Προβλήματα βιβλιογραφίας.....	30
1.3.6 Ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).....	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Συλλογή Δεδομένων.....	34
2.2 Στατιστική Ανάλυση	35

2.2.1 Μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effects)	35
2.2.1 Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects)	36
2.2.3 Το OR ως μέγεθος επίδρασης.....	38
2.2.4 Έλεγχος ετερογένειας μεταξύ μελετών	41
2.2.5 Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης.....	43
2.2.6 Έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).....	44
2.2.7 Διεξαγωγή αθροιστικής ανάλυσης	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1 Ο πολυμορφισμός Gly972Arg του υποστρώματος IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης ...	54
3.2 Ο πολυμορφισμός His1058 C/T στο εξόνιο 17	64
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	82
6.1 Διεξαγωγή μετα-ανάλυσης.....	82
6.2 Έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).....	91
6.3 Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης.....	98
6.4 Διεξαγωγή αθροιστικής ανάλυσης	104

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετα-ανάλυση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα στατιστικό εργαλείο που συνδυάζει τα αποτελέσματα των μελετών. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης (insulin receptor, INSR) είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α, που βρίσκονται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και 2 β, που διατρέχουν τη μεμβράνη και συνδέονται μεταξύ τους με 3 διθειλφιδικούς δεσμούς. Τα υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (insulin receptor substrate, IRS) είναι οι βασικοί μεσολαβητές για την μετάδοση των σημάτων της ινσουλίνης. Τέσσερα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν προσδιοριστεί από τα οποία, στα IRS-1 και IRS-2 εμφανίζονται οι περισσότεροι πολυμορφισμοί. Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι η πιο συχνή ανωμαλία της λειτουργίας των ωοθηκών και η πιο συχνή ενδοκρινολογική παθολογία στις γυναίκες. Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματά του είναι η υπερανδρογοναιμία και η πολυκυστική μορφολογία ωοθηκών. Σε μια προσπάθεια συνεκτίμησης όλων των δεδομένων που έχουν παρουσιαστεί από τις επιμέρους μελέτες που συσχετίζουν τον υποδοχέα ινσουλίνης και τα παράγωγά του με την εμφάνιση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), προχωρήσαμε σε μια μετα-ανάλυση των επιδημιολογικών μελετών. Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 16 έρευνες οι οποίες συγκέντρωναν πληροφορίες για συνολικά 1406 ασθενείς και 1369 υγιή άτομα (μάρτυρες). Οι πολυμορφισμοί που μας απασχόλησαν περισσότερο είναι: ο πολυμορφισμός Gly972Arg του IRS-1 (10 μελέτες), κατά τον οποίο η Γλυκίνη στη θέση 972 αντικαθιστάται από Αργινίνη και ο σιωπηλός γενετικός πολυμορφισμός His1058 C/T (6 μελέτες), ο οποίος βρίσκεται στη περιοχή της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός Gly972Arg συσχετίζεται ισχυρά με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, σε αντίθεση με τον σιωπηλό πολυμορφισμό His1058.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ

Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, Υποδοχέας ινσουλίνης, Μετα-ανάλυση, Πολυμορφισμοί.

ABSTRACT

Meta-analysis can be characterized as a statistical tool, which combines summary information from related but independent studies. The insulin receptor (INSR) is a tetrameric membrane glycoprotein composed of two α and two β subunits, linked together by three disulfide bonds. Insulin receptor substrate (IRS) proteins are critical to signal transduction in insulin target tissues. IRS-1 is the major cytoplasmic substrate of the insulin receptor and is required for several effects of insulin such as glucose transport. When IRS-1 is dysfunctional, IRS-2 is the main docking protein for the intracellular propagation of the insulin signal. Various single nucleotide polymorphisms (SNPs) of INSR and IRSs have been implicated in susceptibility to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). PCOS is one of the most common endocrine disorders affecting women of reproductive age and is characterized by hyperandrogenism and insulin resistance in most patients. In order to quantify the results extracted from previous studies, we conducted a meta-analysis to evaluate the association of PCOS with the insulin receptor and its substrates. We identified 16 eligible studies, which included 1406 PCOS cases and 1369 healthy controls. Two polymorphisms were of major interest in our meta-analysis: the Gly972Arg polymorphism of IRS-1, a Gly to Arg substitution at codon 972 of IRS-1 (10 studies) and the silent C/T single nucleotide polymorphism at His1058 (6 studies), which is located in the tyrosine kinase domain of INSR. The results of the meta-analysis suggest that Arginine at position 972 is strongly associated with genetic susceptibility to PCOS, whereas the T allele of the C/T single nucleotide polymorphism at His1058 is not.

KEY WORDS

Polycystic Ovary Syndrome, Insulin receptor, Meta-analysis, Polymorphisms.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ('polycystic ovary syndrome', PCOS) είναι ένα σύνδρομο της ωοθηκικής δυσλειτουργίας και είναι μία από τις πιο κοινές γυναικολογικές διαταραχές στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα βασικά χαρακτηριστικά γνωρίσματά του είναι η υπερανδρογοναιμία, η πολυκυστική μορφολογία των ωοθηκών, η ανωορρηξία, καθώς και η αντίσταση στην ινσουλίνη [1]. Περίπου το 50-70% όλων των γυναικών, με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, έχει κάποιο βαθμό αντίστασης στην ινσουλίνη η οποία συμβάλλει πιθανώς στην υπερανδρογοναιμία, που είναι αιτιολογικός παράγοντας για τα συμπτώματα του συνδρόμου [2]. Επιπλέον, πολλοί από τους ασθενείς είναι παχύσαρκοι και έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 [3-8]. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, το κατατάσσουν στο μεταβολικό σύνδρομο. Μπορεί να συσχετίζεται δηλαδή με τον διαβήτη τύπου 2, την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη. Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι για τους παραπάνω λόγους, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών συσχετίζεται με τον υποδοχέα ινσουλίνης και τα υποστρώματά του [9,10].

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α, που βρίσκονται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και 2 αλυσίδες β, που διατρέχουν τη μεμβράνη και συνδέονται μεταξύ τους με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δράση της ινσουλίνης εκφράζεται μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων του οργανισμού [11]. Επιπλέον τα υποστρώματα του υποδοχέα ('insulin receptor substrates', IRS) είναι οι βασικοί μεσολαβητές για την μετάδοση των σημάτων της ινσουλίνης. Τα δύο από αυτά, το IRS-1 και το IRS-2, θα μας απασχολήσουν περισσότερο, καθώς πάνω σε αυτά έχουν εμφανιστεί οι περισσότεροι πολυμορφισμοί του υποδοχέα.

Διάφορα είδη πολυμορφισμών έχουν προσδιοριστεί στις κωδικές και στις μη κωδικές περιοχές του υποδοχέα ινσουλίνης ('insulin receptor', IR), στους ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [9,12,13]. Από αυτούς τους πολυμορφισμούς, οι περισσότεροι ήταν πολυμορφισμοί μεμονωμένου νουκλεοτιδίου ('single nucleotide polymorphisms', SNPs) [9,14]. Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι η πιο συνηθισμένη

κατηγορία πολυμορφισμών στο ανθρώπινο γονιδίωμα και χαρακτηρίζονται από αλληλουχίες του γονιδιώματος που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο ανάμεσα σε δύο πληθυσμιακές ομάδες. Είναι υπεύθυνοι για το 90% της ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών ατόμων και συσχετίζονται άμεσα με ασθένειες. Επίσης χρησιμοποιούνται και ως γενετικοί δείκτες. Ανιχνεύονται με διάφορους τρόπους όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που συσχετίζουν πολυμορφισμούς του υποδοχέα ινσουλίνης και των υποστρωμάτων του με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών [7,13,15,16]. Για να διερευνήσουμε αν η συσχέτιση αυτή ισχύει, πραγματοποιήσαμε μία μετα-ανάλυση πάνω σε αυτό το θέμα.

Η μετα-ανάλυση είναι μία μέθοδος, με την οποία συνδυάζονται δεδομένα από διάφορες δημοσιευμένες ή αδημοσίευτες μελέτες ίδιας γενετικής συσχέτισης, με στόχο την εξαγωγή συνολικών αποτελεσμάτων που αφορούν την συσχέτιση.

1.1 Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ΠΜΘΩ)

Η εμφάνιση πολλαπλών θυλακίων μικρού μεγέθους (3-7mm) στις ωοθήκες, συνοδευόμενου από κλινικές και ορμονικές διαταραχές, καλείται σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Το σύνδρομο αυτό είναι η πιο συχνή δυσλειτουργία των ωοθηκών και η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια στις γυναίκες [17]. Είναι μία από τις 5 καταστάσεις στις οποίες, παρατηρείται ανεπαρκής έκκριση οιστρογόνων, τα οποία δεν είναι ικανά να διεγείρουν την ανάπτυξη του ενδομητρίου αλλά προκαλούν ανάπτυξη των μαστών.

Η ονομασία του συνδρόμου είναι αδόκιμη διότι δεν πρόκειται περί κύστεων αλλά περί θυλακίων που δεν ωρίμασαν. Επίσης η ανακοίνωση του συνδρόμου στους ασθενείς, προκαλεί ανησυχία και άγχος. Αυτό συμβαίνει διότι είναι γνωστό ότι κύστεις σε ένα όργανο μπορεί να εγκυμονούν κινδύνους, πολύ περισσότερο όταν είναι πολλαπλές. Για τους λόγους αυτούς υιοθετείται ο όρος πολυμικροθυλακικές ωοθήκες (συντόμευση ΠΜΘΩ).

Η συχνότητα του συνδρόμου πολυμικροθυλακικών ωοθηκών είναι μεγάλη ιδίως στις νέες γυναίκες, διότι δεν έχουν καθορισθεί ακόμα με ακρίβεια τα όρια αυτής της νοσολογικής οντότητας. Η έλλειψη κοινώς αποδεκτών κριτηρίων για το σύνδρομο συντελεί στη σύγχυση που υπάρχει, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές

αντιφατικές μελέτες. Το σύνδρομο αυτό παραμένει επίκαιρο, λόγω της μεγάλης του συχνότητας και των πολλών αδιευκρίνιστων σημείων για την δημιουργία του.

Από διαγνωστικής πλευράς διακρίνουμε τέσσερις φάσεις στην ιστορία του συνδρόμου ΠΜΘΩ [10]:

Η πρώτη διήρκησε για μια 25ετία, από την αρχική περιγραφή του συνδρόμου το 1935. Την περίοδο αυτή το σύνδρομο έφερε την ονομασία των συγγραφέων που το περιέγραψαν και η διάγνωσή του στηριζόταν στην κλινική τριπλέτα: α) της αμηνόρροιας, β) της υπερτρίχωσης και γ) της παχυσαρκίας με την ανεύρεση πολύ διογκωμένων ωοθηκών.

Η δεύτερη φάση σημειώθηκε τις δεκαετίες του '60 και '70 κατά τις οποίες οι ραδιοανοσολογικές μετρήσεις των ορμονών επέτρεψαν την έρευνα και διαπίστωση των ορμονολογικών χαρακτηριστικών του συνδρόμου.

Συγχρόνως η λαπαροσκόπηση και η βιοψία των ωοθηκών διευκρίνισαν τις μορφολογικές τους αλλοιώσεις. Με τις μεθόδους αυτές διαπιστώθηκαν τότε δύο πράγματα:

α) Το σύνδρομο δεν ήταν σπάνιο και

β) Το φάσμα των κλινικών, μορφολογικών και βιολογικών εκδηλώσεων ήταν πολύ πιο ευρύ από ότι αρχικά επιστεύετο.

Συνέπεια των παρατηρήσεων αυτών, η αρχική ονομασία του συνδρόμου εγκαταλείφθηκε και μετονομάστηκε σε σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών βάσει του κυριότερου μορφολογικού στοιχείου που εμφάνιζαν οι ωοθήκες. Η διάγνωση, την εποχή αυτή, κάθε περίπτωσης του συνδρόμου έπρεπε να έχει μακροσκοπικά ή ιστολογικά βεβαιωμένα πολυμικροθυλακικές ωοθήκες με αύξηση του πάχους της θήκης των ωοθυλακίων.

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι κανένα κλινικό ή ορμονικό στοιχείο από όσα θεωρούνται ότι χαρακτηρίζουν το σύνδρομο δεν είναι σταθερό ούτε ως προς την παρουσία του ούτε ως προς την έκταση με την οποία εμφανίζεται. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων που σε ορισμένα άτομα βρίσκεται φυσιολογική. Συγκεκριμένα ο λόγος LH/FSH που για τη διάγνωση του συνδρόμου έπρεπε να υπερβαίνει το 2.5 και κατά άλλους το 3, είναι μικρότερος και ενίοτε φυσιολογικός σε σημαντικό αριθμό ατόμων με χαρακτηριστική μορφολογία των ωοθηκών. Η υπεριοιστρογοναιμία είναι το λιγότερο σταθερό ορμονικό στοιχείο και γι' αυτό έχει εγκαταλειφθεί η μέτρησή της.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της υπερανδρογοναιμίας, η υπερτρίχωση και η ακμή μπορεί να λείπουν σε ποικίλο ποσοστό που φθάνει σε ορισμένες μελέτες το 30%. Ηπιότερες μορφές κλινικής υπερανδρογοναιμίας όπως λιπαρότητα του δέρματος και του τριχωτού της κεφαλής είναι συχνότερες.

Παχυσαρκία ποικίλου βαθμού υπάρχει σε ένα ποσοστό των ατόμων με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι σ' αυτά τα άτομα η παχυσαρκία συμμετέχει στην παθογένεια του συνδρόμου ιδίως αν είναι κεντρικού τύπου. Αυτό συμβαίνει διότι συνοδεύεται από υπερινσουλιναμία η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του συνδρόμου. Αλλά και η ιστολογική εικόνα των ωοθηκών ποικίλει. Μπορεί να υπάρχει τυπική εικόνα του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών στη μία ωοθήκη και φυσιολογικά θυλάκια στην άλλη.

Η τρίτη φάση για την διάγνωση του συνδρόμου άρχισε την δεκαετία του 1980 και χαρακτηρίζεται από την ευρεία χρήση του υπερηχογραφήματος. Η μέθοδος αυτή βοήθησε όσο καμιά άλλη στη διάγνωση και στην παρακολούθηση του συνδρόμου. Με το υπερηχογράφημα σημειώθηκε σημαντική πρόοδος σε τρία σημεία:

α) Αντικαταστάθηκε η λαπαροσκόπηση από μια μη επεμβατική μέθοδο

β) Έγινε δυνατή η μελέτη της μορφολογίας των ωοθηκών σε μεγάλο αριθμό ατόμων ακόμη και σε άτομα στα οποία η λαπαροσκοπία δεν επιτρέπεται όπως υγιείς μάρτυρες ή κορίτσια στην ήβη και

γ) Το κυριότερο, επέτρεψε τη συχνή και εύκολη παρακολούθηση της εξέλιξης του συνδρόμου, πράγμα που ήταν αδύνατον στο παρελθόν.

Το πρώτο εύρημα της υπερηχογραφικής μελέτης των ωοθηκών επιβεβαίωσε τη μεγάλη συχνότητα του συνδρόμου [17]. Η συχνότητα υπολογίστηκε ότι φθάνει το 33% στις γυναίκες με ανωμαλίες του κύκλου και στο 80% σε εκείνες με αραιομηνόρροια. Αυτό σημαίνει ότι οι νεαρές γυναίκες μετά την ήβη και μέχρι την ηλικία των 18 ετών στις οποίες η συχνότητα ανωμαλιών του κύκλου ήταν σε ποσοστό 12-18% ένα ποσοστό 4% ή περισσότερο εμφανίζει υπερηχογραφική εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Το ποσοστό είναι τεράστιο εάν αναλογιστεί κανείς ότι είναι μεγαλύτερο από τη συχνότητα του διαβήτη ή τη βρογχοκίλη στις ηλικίες αυτές, δικαιολογώντας το χαρακτηρισμό του ως τη συχνότερη ενδοκρινοπάθεια στις νεαρές γυναίκες.

Το δεύτερο εύρημα από την υπερηχογραφική μελέτη των ωοθηκών στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών περιέπλεξε τα πράγματα, επιδείνωσε τη σύγχυση

που υπήρχε για το σύνδρομο αυτό και αύξησε τα διαγνωστικά διλήμματα. Η υπερηχογραφική εικόνα του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών θυλακίων στην περιφέρεια της ωοθήκης και από αφθονία του στρώματος συνοδεύεται εκτός από τις κλασικές κλινικές εκδηλώσεις των διαταραχών του κύκλου και της κλινικής υπερανδρογοναιμίας και από άλλες καταστάσεις στις οποίες υπήρχαν ή έλειπαν οι εκδηλώσεις αυτές. Τυπική υπερηχογραφική εικόνα του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών μπορεί να βρεθεί σε άτομα με ωορρηκτικούς κύκλους, ιδίως νεαρά κορίτσια. Η ίδια εικόνα σε μεγάλη συχνότητα παρατηρήθηκε σε άτομα με υπερτρίχωση και κανονικούς κύκλους. Γυναίκες με βεβαιωμένη ωορρηξία (με κυήσεις) μπορεί να εμφανίσουν εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Γυναίκες με εικόνα του συνδρόμου μπορούν να συλλάβουν χωρίς θεραπεία και μετά τη γέννα να επανεμφανίσουν εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Τυπική υπερηχογραφική εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών στη μια ωοθήκη μπορεί να συνυπάρχει με ανάπτυξη ωοθυλακίου στην άλλη. Μη ωοθηκικές ενδοκρινολογικές παθήσεις, όπως η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων και η νόσος του Cushing μπορεί επίσης να συνοδεύονται από ωοθήκες με εικόνα συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών.

Η τέταρτη φάση για την διάγνωση του συνδρόμου άρχισε το 1990 και συνεχίζεται. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από 3 γεγονότα:

α) Τη διαπίστωση της σχέσης της υπερινσουλιναϊμίας με την υπερανδρογοναιμία, ιδιαίτερα στα παχύσαρκα άτομα

β) Τη διευκρίνιση του ρόλου και άλλων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών στην παθογένεια του συνδρόμου, και

γ) Το ενδιαφέρον για τη μελέτη των γενετικών χαρακτηριστικών και τη γονιδιακή ταυτότητα των ασθενών. Γενικά, στην παρούσα φάση η έρευνα για την παθογένεια του συνδρόμου ΠΜΘΩ, στρέφεται στη διαλεύκανση σε μοριακό και γονιδιακό επίπεδο, του είδους και της αιτιολογίας των ανωμαλιών που παρατηρούνται στο σύνδρομο αυτό.

1.1.1 Παθογένεια του συνδρόμου ΠΜΘΩ

Οι θεωρίες που διατυπώθηκαν για τη παθογένεια του συνδρόμου ΠΜΘΩ συμβάδισαν με τις εξελίξεις που σημειώνονταν στη διερεύνηση της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί τέσσερις παθογενετικοί μηχανισμοί:

- α) Ο υποθαλαμικός
- β) Ο ωθητικός,
- γ) Ο επινεφριδιακός και
- δ) Η υπερινσουλιναμία, χωρίς κανέναν να εξηγεί όλες τις εκδηλώσεις του συνδρόμου [10].

Όσον αφορά τον πρώτο παθογενετικό μηχανισμό, η απόδοση των λειτουργικών ανωμαλιών σε υποθαλαμική δυσλειτουργία στηρίχθηκε στη βασική ορμονική ανωμαλία του συνδρόμου που συνίσταται στην υπερέκκριση της LH χωρίς σύγχρονη υπερπαραγωγή της FSH. Η υπερέκκριση της LH διεγείρει τα κύτταρα της θήκης τα οποία υπερπλάσσονται και υπερπαραγάγουν ανδρογόνα. Η έλλειψη αντίστοιχης αύξησης της FSH προκαλεί μειωμένη σύνθεση αρωματοποιητικού ενζύμου και ελαττωμένη παραγωγή οιστρογόνων με αποτέλεσμα αύξηση του λόγου ανδρογόνων/οιστρογόνων η οποία δεν ευνοεί την εξέλιξη του ωοθυλακίου. Τα εκκριτικά κύματα της LH εμφανίζουν στις περισσότερες περιπτώσεις του συνδρόμου μεγαλύτερο ύψος και εύρος και είναι συχνότερα. Η θεωρία αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση ότι εάν χορηγηθεί GnRH σε γυναίκες με υπογοναδοτροφική αμηνόρροια υποθαλαμικής αιτιολογίας, σε συχνότερα διαστήματα από ότι χρειάζεται για να προκληθεί ανάπτυξη ωοθυλακίου και ωορρηξία, δημιουργείται υπερηχογραφική εικόνα ωθητικού τύπου συνδρόμου πολυκυστικών ωθηκών .

Η μειωμένη έκκριση FSH αποδίδεται κι αυτή στο συχνότερο ρυθμό διέγερσης του κυττάρου από την GnRH. Υποστηρίχθηκε επίσης ότι η αυξημένη έκκριση ή τοπική δράση της ανασταλτίνης θα μπορούσε να εξηγήσει τη μειωμένη έκκριση της FSH. Ανεξαρτήτως όμως του μηχανισμού που την προκαλεί, η μικρότερη έκκριση της FSH κατά την κρίσιμη για την εξέλιξη του ωοθυλακίου περιεμμηνορυσιακή περίοδο, μπορεί να εξηγήσει την αναστολή της εξέλιξης στο στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου.

Η ανωμαλία αυτή της FSH θεωρείται από μερικούς ως σημαντικότερη από την υπερέκκριση της LH για την παθογένεια του συνδρόμου πολυκυστικών ωθηκών. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η χορήγηση FSH για την πρόκληση ωορρηξίας σε άτομα με σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών, αναπληρώνει την έλλειψη της FSH και προκαλεί την ανάπτυξη των θυλακίων. Ενισχυτικό επίσης στοιχείο του βασικού ρόλου της FSH στην παθογένεια του συνδρόμου είναι η διαπίστωση ότι και τοπικά, στο ωοθυλάκιο, η δράση της FSH αναστέλλεται στο

σύνδρομο ΠΜΘΩ από την υπερπαραγόμενη πρωτεΐνη που συνδέει τον IGF-I (IGF-BP).

Ο δεύτερος παθογενετικός μηχανισμός που προτάθηκε, υποστηρίζει ότι η ανωμαλία ξεκινάει από την ωοθήκη. Η βλάβη θεωρείται ότι είναι γενετική και αφορά τη στεροειδογενετική ικανότητα του ωοθυλακίου. Επιχειρήματα υπέρ αυτής της άποψης είναι η αυξημένη απάντηση της 17OH-προγεστερόνης στη διέγερση με χοριακή γοναδοτροφίνη και διαταραχές του κυτοχρώματος P450 το οποίο καθορίζει την δραστηριότητα του ενζύμου 17α-υδροξυλάση και 17-20 λυάση [17].

Η τρίτη θεωρία, η επινεφριδιακή, θεωρεί ότι η εμφάνιση του συνδρόμου ΠΜΘΩ αποτελεί παράταση και επέκταση χρονικά της αδρεναρχής προς την ηλικία της ήβης και μετέπειτα. Κατά την αδρεναρχή περί το 6^ο έτος της ηλικίας παρατηρείται αύξηση της παραγωγής ανδρογόνων από τα επινεφρίδια. Η αύξηση αφορά την DHEA, τη DHEA-S και τη Δ₄-ανδροστενδιόνη.

Η παράταση της υπερανδρογοναιμίας κατά την ήβη προκαλεί τις ωοθηκικές ανωμαλίες του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών με δύο μηχανισμούς:

α) Την ανασταλτική επίδραση που έχουν τα ανδρογόνα στην εξέλιξη του ωοθυλακίου και

β) Τη διεγερτική επίδραση που ασκούν στην έκκριση της LH.

Με το διπλό αυτό μηχανισμό δράσης δημιουργούνται οι παθοφυσιολογικές και μορφολογικές ανωμαλίες του συνδρόμου. Ενισχυτικό της θεωρίας αυτής είναι το γεγονός ότι υπερανδρογοναιμία εξωωοθηκικής προέλευσης, όπως στην περίπτωση της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων ή αρρενοποιητικών όγκων, δημιουργεί την εικόνα του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών.

Τέλος, η πιο πρόσφατη υπόθεση θεωρεί ότι η υπερινσουλιναίμια που παρατηρείται σε μεγάλο αριθμό ατόμων με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου. Αυτό είναι βέβαιο ότι ισχύει για άτομα υπέρβαρα-παχύσαρκα στα οποία παρατηρείται αντίσταση στην δράση της ινσουλίνης και υπερινσουλιναίμια. Ιδιαίτερα επιβαρυντικό στοιχείο αποτελεί η ανδροειδής παχυσαρκία, εντοπιζόμενη στο τμήμα κεντρικού τύπου του σώματος.

Η ινσουλίνη αυξάνει την παραγωγή και βιοδιαθεσιμότητα των ανδρογόνων με τρεις μηχανισμούς:

α) Μειώνει την παραγωγή από το ήπαρ της IGF-BP, της πρωτεΐνης που δεσμεύει τον παράγοντα IGF-I, με αποτέλεσμα να παραμένει στο αίμα μεγαλύτερη ποσότητα

IGF-I. Ο IGF-I αυξάνει την δράση της LH στα κύτταρα της θήκης και ευνοεί την υπερπαραγωγή των ωοθηκικών ανδρογόνων.

β) μειώνει την παραγωγή από το ήπαρ της SHBG, της πρωτεΐνης που δεσμεύει την τεστοστερόνη, με αποτέλεσμα να αυξάνει το ποσό της ελεύθερης και δραστηκής τεστοστερόνης στο αίμα.

γ) μειώνει επίσης, τοπικά στο ωοθυλάκιο την έκφραση της IGF-BP και έτσι ελευθερώνει περισσότερο IGF-I για να δράσει στο ορμονοπαραγωγικό σύστημα της θήκης. Η δράση αυτή θεωρείται ουσιώδης διότι η σχέση IGF-BP προς IGF-I παίζει σημαντικό ρόλο στην κανονική ανάπτυξη του ωοθυλακίου δεδομένου ότι τα φυσιολογικά επίπεδα στάθμης της IGF-BP δεσμεύει τον IGF-I και τον εμποδίζει να δημιουργήσει συνθήκες τοπικής υπερανδρογοναιμίας με τη δράση που ασκεί στα κύτταρα της θήκης.

Η θεωρία της υπερινσουλιαιμίας επεκτείνεται και στο φαινόμενο της ήβης. Κατά την ήβη παρατηρείται φυσιολογική αύξηση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης, του IGF-I και της ινσουλίνης. Η παράταση αυτής της σχετικής και φυσιολογικής υπερινσουλιαιμίας πέραν της ήβης θεωρείται ότι καταλήγει στη δημιουργία του συνδρόμου ΠΜΘΩ με τον μηχανισμό που αναφέρθηκε.

1.1.2 Διάγνωση του συνδρόμου ΠΜΘΩ

Η μεγάλη ποικιλία των κλινικών, ορμονολογικών και μορφολογικών αλλοιώσεων του συνδρόμου ΠΜΘΩ μπορεί να εξηγηθεί εάν δεχθούμε ότι η γενεσιουργός αιτία, όποια και αν είναι:

- α) δρα παρατεταμένα ή μόνιμα και έντονα, έχοντας την εκδήλωση του συνδρόμου με την πλήρη και κλασσική του μορφή.
- β) δρα ήπια ή είναι παροδική, δημιουργώντας ποικίλου βαθμού και έντασης εκδηλώσεις [18].

Διακρίνουμε συνεπώς δύο μορφές του συνδρόμου:

- α) Την κλασσική μορφή στην οποία όλα τα χαρακτηριστικά κλινικά και ορμονικά στοιχεία του συνδρόμου υπάρχουν, είναι μόνιμα και συνοδεύονται από την επίσης χαρακτηριστική υπερηχογραφική εικόνα των ωοθηκών και

β) Τις ενδιάμεσες ή ηπιότερες μορφές στις οποίες η συμπτωματολογία δεν είναι πλήρης και δεν υπάρχουν όλα τα ορμονολογικά χαρακτηριστικά ούτε η υπερηχογραφική εικόνα των ωοθηκών είναι μόνιμη.

Η κλασική μορφή του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών χαρακτηρίζεται από τα εξής στοιχεία:

α) Κλινικώς, από τις ανωμαλίες του κύκλου, την έλλειψη ωορρηξίας και τα σημεία υπερανδρογοναιμίας.

β) Ορμονολογικά, από την υπερέκκριση της LH, την υπερβολική απάντησή της στη GnRH, τη φυσιολογική έκκριση της FSH και την αύξηση των ανδρογόνων του αίματος, και

γ) Παθολογοανατομικά, που προκαλούνται από τα πολλαπλά μικρά θυλάκια τα οποία έχουν κοκκιώδη στοιβάδα μικρού πάχους και υπερπλασία της θήκης. Επιπλέον είναι διατεταγμένα στην περιφέρεια της ωοθήκης, η οποία έχει άφθονο στρώμα. Οι παθολογοανατομικές αυτές αλλοιώσεις δίνουν χαρακτηριστική εικόνα στο υπερηχογράφημα των ωοθηκών.

Η συνηθέστερη κλινική εκδήλωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών είναι η αραιομηνόρροια, που εγκαθίσταται τις περισσότερες φορές μετά την εμμηναρχή (πρωτοπαθής αραιομηνόρροια) και μπορεί να μεταπέσει παροδικά ή μόνιμα σε δευτεροπαθή αραιομηνόρροια (διάρκεια χωρίς εμμηνορρυσία άνω των 6 μηνών). Συγχρόνως εμφανίζεται και η υπερτρίχωση που η έντασή της ποικίλλει. Στις περισσότερες φορές έχει μορφή μέτριας υπερτρίχωσης αλλά μπορεί να είναι σημαντική και σπάνια πολύ έντονη, όπως εκείνη που παρατηρείται στο σύνδρομο της υπερθήκωσης ή των αρρενοποιητικών όγκων. Από τα λοιπά υπερανδρογοναιμικά σημεία, η ακμή και η σημηγματόρροια που προκαλεί λιπαρότητα του δέρματος και του τριχωτού της κεφαλής συνήθως συνοδεύουν την υπερτρίχωση. Η παχυσαρκία δεν θεωρείται κλασικό κλινικό στοιχείο. Όταν όμως είναι κεντρικού τύπου, αποτελεί επιβαρυντικό στοιχείο διότι συνοδεύεται από αντοχή στην ινσουλίνη και υπερινσουλιναίμια.

Τα ορμονικά χαρακτηριστικά της κλασικής μορφής του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών είναι η υπερέκκριση της LH, η φυσιολογική και ίσως μειωμένη έκκριση της FSH και η υπερέκκριση των ανδρογόνων. Η αύξηση της έκκρισης της LH, η οποία οφείλεται σε συχνότερα ή μεγαλύτερα εκκριτικά κύματα της ορμόνης και θεωρείται δεδομένη διότι αποτελεί βασικό στοιχείο της

παθοφυσιολογίας του συνδρόμου, εκφράζεται στο αίμα με την υψηλή συγκέντρωση της ορμόνης. Οι αιμοληψίες όμως μπορεί να γίνουν στα μεσοδιαστήματα μεταξύ δύο εκκριντικών αιχμών της LH και να δώσουν χαμηλές τιμές και ψευδή εικόνα της εκκριντικής ικανότητας της ορμόνης. Για το λόγο αυτό προτιμάται η δοκιμασία της χορήγησης GnRH η οποία δείχνει υπερβολική απάντηση της LH με φυσιολογική διέγερση της FSH που αποκαλύπτει την αυξημένη ευαισθησία του γοναδοτρόφου κυττάρου στην GnRH. Η ασύμμετρη αυτή απάντηση των γοναδοτροφινών στην GnRH είναι χαρακτηριστική του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών.

Η υπερανδρογοναιμία στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών χαρακτηρίζεται από μικρή ή μεγάλη αύξηση όλων σχεδόν των ανδρογόνων. Αυξημένα κυρίως, βρίσκονται η ελεύθερη τεστοστερόνη, η Δ₄-ανδροστενδιόνη και η διϋδροτεστοστερόνη και τα Δ₅-ανδρογόνα. Όσον αφορά την ολική τεστοστερόνη είναι και αυτή αυξημένη, αλλά λόγω της χαμηλής στάθμης της SHBG και της αυξημένης κάθαρσης, οι τιμές στο αίμα δεν αντιπροσωπεύουν επακριβώς την παραγωγή της ορμόνης.

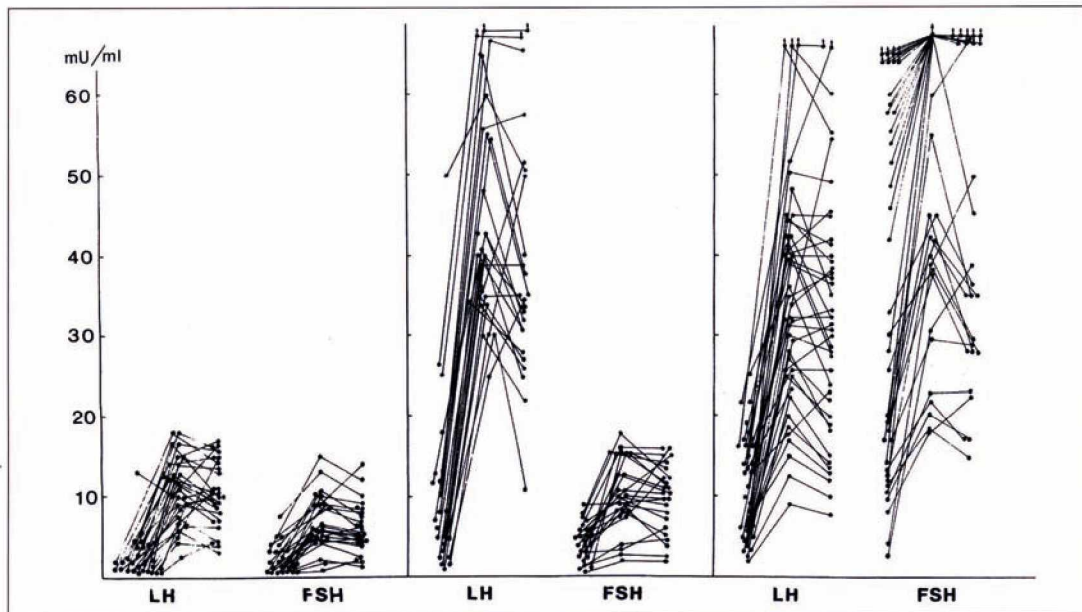
Η προέλευση των ανδρογόνων κοινής προέλευσης όπως η Δ₄-ανδροστενδιόνη, η DHEA και η τεστοστερόνη είναι κυρίως ωοθηκική αλλά η διακρίβωση της προέλευσης που έχει σημασία για την θεραπεία γίνεται με διάφορους τρόπους. Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχει και επινεφριδιακή συμμετοχή που σε ορισμένες περιπτώσεις είναι έντονη και έχει δώσει λαβή στη θεωρία περί επινεφριδιακής παθογένειας του συνδρόμου. Μερικοί τρόποι είναι η διαδοχική αναστολή της λειτουργίας των επινεφριδίων με χορήγηση δεξαμεθαζόνης και των ωοθηκών με χορήγηση αντισυλληπτικών ή ανάλογου του GnRH, καθώς και μέτρηση σε κάθε περίπτωση των ανδρογόνων που προέρχονται από τον αδένα που δεν έχει κατασταλεί. Τα αυξημένα ανδρογόνα στην κυκλοφορία ευθύνονται για την υπερτρίχωση και τις λοιπές αρρενοποιητικές εκδηλώσεις του συνδρόμου [18].

Η αύξηση των ανδρογόνων έχει σα συνέπεια και την αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων στην περιφέρεια από μετατροπή των ανδρογόνων. Επειδή οι ποσότητες της Δ₄-ανδροστενδιόνης είναι μεγαλύτερες και η μετατροπή της γίνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι η τεστοστερόνη, το οιστρογόνο που παράγεται σε αφθονία στην περιφέρεια είναι η οιστρόνη.

Τα παθολογοανατομικά ευρήματα στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών χαρακτηρίζονται μακροσκοπικά από την εικόνα των ωοθηκών. Αυτή είναι συνήθως

μεγαλύτερων διαστάσεων και έχει λεία, λευκή και στιλπνή επιφάνεια. Στη διατομή των ωοθηκών παρατηρείται πάχυνση του ινώδη χιτώνα, στην οποία οφείλεται και η εμφάνιση των ωοθηκών. Η εσωτερική θήκη που περιβάλλει τα κυστικά ωοθυλάκια εμφανίζει υπερπλασία των κυττάρων και αυτό αποτελεί το σταθερότερο και χαρακτηριστικότερο παθολογοανατομικό εύρημα του συνδρόμου. Η υπερπλασία οφείλεται στη διέγερση της LH και συνοδεύεται από υπερέκκριση των ανδρογόνων. Το πάχος της κοκκιώδους στιβάδας είναι συνήθως μικρό. Τα ωοθυλάκια εξελίσσονται άτρητα, ενσωματώνονται στο συνδετικό ιστό του στρώματος το οποίο για το λόγο αυτό είναι άφθονο. Σε σπάνιες περιπτώσεις υπάρχει εξέλιξη του ωοθυλακίου μέχρι την ώριμη μορφή και ωοθυλακιορρηξία.

Η διάγνωση συνεπώς της κλασικής μορφής του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών βασίζεται στην κλινική εικόνα που περιγράφηκε, δηλαδή στην αραιομηνόρροια ή τις άλλες ανωμαλίες του κύκλου, την υπερτρίχωση, τα αυξημένα ανδρογόνα του αίματος, την υψηλή LH και φυσιολογική FSH (Εικόνα 1) και τέλος τη χαρακτηριστική αύξηση της πρώτης στη διέγερση της GnRH, ενώ η FSH απαντά φυσιολογικά. Το κλινικο-ορμονολογικό αυτό σύνολο συνοδεύεται από την τυπική υπερηχογραφική εικόνα των ωοθηκών με τα πολλαπλά μικρά ωοθυλάκια που βρίσκονται στην περιφέρεια των ωοθηκών. Η χαρακτηριστική αυτή εικόνα των ωοθηκών μπορεί να θέσει τη διάγνωση ακόμα και αν δεν υπάρχει το σύνολο των κλινικών εκδηλώσεων και των ορμονικών ανωμαλιών [18]. Αυτό θα συμβεί όταν οι ωοθήκες βρίσκονται σταθερά και μόνιμα σε μια περίοδο αμηνόρροιας ή κατά τη διάρκεια κύκλων με κανονική διάρκεια χωρίς ένδειξη ανάπτυξης των ωοθυλακίων.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστική ασύμμετρη απάντηση των γοναδοτροφινών στην GnRH στο σύνδρομο συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (κέντρο) με υπερβολική αύξηση της LH και φυσιολογική απάντηση της FSH σε σύγκριση με την απάντηση φυσιολογικών γυναικών (αριστερά) και γυναικών με πρωτοπαθή ανεπάρκεια ωοθηκών (δεξιά), στις οποίες παρατηρείται μεγάλη απάντηση της FSH.

Η διάγνωση των μη κλασικών μορφών του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών, που είναι και οι συχνότερες, εμφανίζει δυσκολίες. Οι μορφές αυτές εκδηλώνονται με μεγάλη ποικιλία και ένταση των ευρημάτων και είναι εκείνες που δημιουργούν τη σύγχυση και την ασυμφωνία ως προς τον ορισμό και την εξέλιξη του συνδρόμου. Είναι επίσης υπεύθυνες, λόγω της ανομοιογένειας των περιπτώσεων για τα αντιφατικά ευρήματα των διαφόρων μελετών που δημοσιεύτηκαν σχετικά με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Στις μορφές αυτές ανήκουν περιπτώσεις με μικρές ανωμαλίες κύκλου ή με σπάνιες ωορρηξίες ή με παρουσία σε κάποια φάση της εξέλιξης του ωοθυλακίου σε ωριμότερο εξελικτικό στάδιο, με ποικίλου βαθμού κλινική και βιοχημική υπερανδρογοναιμία. Σταθερό στοιχείο των περιπτώσεων αυτών όπως είναι φυσικό είναι η υπερηχογραφική εικόνα των πολυμικροθυλακικών ωοθηκών, διότι αλλιώς δεν θα ετίθετο η διάγνωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών. Η εικόνα όμως αυτή δεν διατηρείται πάντοτε, μπορεί να εμφανίσει εξελικτικά στάδια ωοθυλακίων αλλά και να μεταπέσει στην αρχική τυπική εικόνα [17].

Η διάγνωση των περιπτώσεων αυτών, βασίζεται στην υπερηχογραφική εικόνα των ωοθηκών έστω και εάν αυτή κατά καιρούς μπορεί να μην είναι τυπική. Εάν όμως επί μεγάλο χρονικό διάστημα εμφανίζει τα τυπικά στοιχεία του συνδρόμου δικαιολογείται να τεθεί η διάγνωσή του με το σκεπτικό ότι υπάρχει το χαρακτηριστικό του στοιχείο, δηλαδή η μη ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Ενισχυτικό της διάγνωσης είναι η υπερβολική απάντηση της LH στην GnRH διότι αποκαλύπτει μεγάλη διέγερση των κυττάρων της θήκης η οποία αργά ή γρήγορα θα προκαλέσει σε ποικίλο βαθμό τις κλινικοεργαστηριακές διαταραχές του συνδρόμου.

1.1.3 Διαφορική διάγνωση

Το σύνδρομο ΠΜΘΩ πρέπει να διαχωριστεί από άλλες καταστάσεις υπερανδρογοναιμίας, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν τις ίδιες παθολογοφυσιολογικές ανωμαλίες και τις ίδιες κλινικές εκδηλώσεις με αυτό. Συγκεκριμένα η διαφορική διάγνωση θα γίνει από:

α) Την συγγενή υπερπλασία των επινεφριδίων όψιμης εμφάνισης.

Η χαρακτηριστική ορμονική έκκριση της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων και η πλήρης αναστολή της με δεξαμεθαζόνη τη διαχωρίζει από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

β) Την υπερθήκωση.

Υποψία για την παρουσία υπερθήκωσης θα εγερθεί στην περίπτωση της εμφάνισης όψιμης και έντονης υπερτρίχωσης με μεγάλες τιμές τεστοστερόνης και χωρίς αύξηση της LH ή της απάντησής της στην GnRH. Το υπερηχογράφημα δείχνει διογκωμένες ωοθήκες συμπαγείς σε σύσταση χωρίς ή με ελάχιστα θυλάκια. Η επιβεβαίωση της διάγνωσης, απαιτεί βιοψία των ωοθηκών.

γ) Τους αρρενοποιητικούς όγκους των ωοθηκών και των επινεφριδίων [17].

Οι αρρενοποιητικοί όγκοι των ωοθηκών και των επινεφριδίων χαρακτηρίζονται από έντονα υπερανδρογονικά κλινικά στοιχεία τα οποία εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται ραγδαίως. Χαρακτηριστικό ορμονικό γνώρισμα των ωοθηκικών αρρενοποιητικών όγκων είναι η μεγάλη έκκριση τεστοστερόνης (>2 ng/ml στο αίμα) και των επινεφριδιακών όγκων η υψηλή στάθμη της DHEA και DHEA-S. Το μέγεθος των νεοπλασμάτων αυτών είναι ήδη μεγάλο όταν εμφανισθούν οι κλινικές

εκδηλώσεις και αυτό βοηθάει στην εντόπισή τους με το υπερηχογράφημα και τις άλλες απεικονιστικές μεθόδους.

Η τυπική εικόνα στην υπερηχογραφία είναι ο αυξημένος όγκος των ωοθηκών με αυξημένο το πάχος του στρώματος. Οι ωοθήκες ανευρίσκονται στρογγυλές και τα ωοθυλάκια και οι κύστες περιφερικά σε μέγεθος 0,5-0,8εκ. τουλάχιστον 5 σε κάθε ωοθήκη. Τα τυπικά ευρήματα εμφανίζονται σε λιγότερο του 50% των ασθενών ενώ σε 30% των ασθενών οι όγκοι των ωοθηκών είναι φυσιολογικοί.

1.1.4 Θεραπεία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών

Η θεραπεία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών έχει δύο διαφορετικούς στόχους:

α) Τη θεραπεία των διαταραχών του κύκλου και των υπερανδρογοναιμικών εκδηλώσεων, η οποία είναι χρόνια, διότι αρχίζει κατά την εποχή της διαπίστωσης του συνδρόμου την περίοδο της ήβης και συνεχίζεται και στην ώριμη ηλικία.

β) Τη θεραπεία της ανωορρηξίας η οποία γίνεται μόνο όταν η τεκνοποίηση είναι επιθυμητή, δηλαδή μία ή περισσότερες φορές στη ζωή μιας γυναίκας.

Η θεραπεία των διαταραχών του κύκλου επιβάλλεται λόγω της ανωορρηξίας και της έλλειψης έκκρισης προγεστερόνης η οποία επιτρέπει την ανεμπόδιστη δράση της οιστραδιόλης στο ενδομήτριο. Συγχρόνως υπάρχει το πρόβλημα της υπερανδρογοναιμίας και της υπερτρίχωσης. Η θεραπεία συνεπώς σ'αυτές τις περιπτώσεις γίνεται με τη χορήγηση αντισυλληπτικών, η οποία αναστέλλει την έκκριση των ωοθηκικών ανδρογόνων και με προσθήκη αντιανδρογόνων όταν η υπερτρίχωση είναι έντονη. Στις περιπτώσεις που δεν εμφανίζουν κλινικές εκδηλώσεις υπερανδρογοναιμίας (υπερτρίχωση, ακμή) μπορεί να χορηγηθούν μόνο προγεστερονοειδή φάρμακα. Παράλληλα συνίσταται η μείωση του σωματικού βάρους η οποία βοηθάει, πρώτον διότι βελτιώνει την υπερινσουλιαιμία των παχύσαρκων και δεύτερον διότι ελαττώνει τον όγκο του λίπους το οποίο είναι πηγή περιφερικής παραγωγής ανδρογόνων. Η χορήγηση κλομιφαίνης σε άτομα με σύνδρομο ΠΜΘΩ για θεραπευτικούς λόγους που συνίσταται από μερικούς, είναι άσκοπη όταν δεν υπάρχει θέμα τεκνοποίησης διότι η πρόκληση ωορρηξίας, αφορά

μόνο τον κύκλο που χορηγείται το φάρμακο και δεν διορθώνει τις φυσιολογικές ανωμαλίες του συνδρόμου [19].

Η πρόκληση ωορρηξίας στο σύνδρομο ΠΜΘΩ γίνεται με μεγάλο ποσοστό επιτυχίας με τη χορήγηση της κλομιφαίνης. Ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με σύνδρομο ΠΜΘΩ που ανέρχεται στο 70-80% των περιπτώσεων απαντά με ωορρηκτικό κύκλο στη διέγερση με κλομιφαίνη. Το φάρμακο δρα κυρίως στον υποθάλαμο καταλαμβάνοντας τους υποδοχείς της οιστραδιόλης και δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ψευδή εντύπωση έλλειψης οιστραδιόλης στα νευροεκκριτικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη διέγερση της έκκρισής τους. Η κλομιφαίνη χορηγείται την 4^η μέρα από την εμφάνιση της περιόδου και επί 5 μέρες σε δόση αρχικά 50-100 mg. Το αποτέλεσμα από τη χορήγηση αυτή ελέγχεται με τον απλό τρόπο της πρωινής θερμοκρασίας και επιβεβαιώνεται με την μέτρηση της προγεστερόνης όταν σημειωθεί άνοδος της θερμοκρασίας. Τις περισσότερες φορές, τα δύο αυτά μέτρα είναι αρκετά για την διαπίστωση της ωορρηξίας και δεν χρειάζονται οι δαπανηρές κατά σειρά υπερηχογραφικές εξετάσεις εκτός από μία. Αυτή θα γίνει 5-7 μέρες μετά το πέρας της θεραπείας, προς διαπίστωση της ανάπτυξης ωριμάζοντος ωοθυλακίου και της παρουσίας και άλλων μεγάλων ωοθυλακίων. Στο χρονικό αυτό διάστημα παρατηρούνται συνήθως τα εκκριτικά κύτταρα της LH που προκαλούν την ωορρηξία και είναι η περίοδος που το ζεύγος πρέπει να φροντίσει να έχει επαφές.

Η θεραπεία με κλομιφαίνη στη δόση που αναφέρθηκε μπορεί να συνεχιστεί επί 5-6 κύκλους. Εάν δεν επιτευχθεί ωορρηξία η δόση αυξάνεται μέχρι 200 mg ημερησίως πάντοτε επί 5 μέρες επί 2-3 κύκλους ακόμη. Οι παρενέργειες της χορήγησης κλομιφαίνης είναι ελαφρές και παροδικές και δεν έχουν σχέση με τη δόση που χορηγείται. Συνίσταται κυρίως στην εμφάνιση εξάψεων και στην διάταση των μαστών και της κοιλίας (σε ποσοστό <5%).

Διόγκωση των ωοθηκών που προκαλούν συμπτώματα είναι σπάνια κατά την θεραπεία. Τα συμπτώματα παρουσιάζονται συνήθως μια βδομάδα μετά τη λήψη της θεραπείας, την εποχή που παρατηρείται η υπερέκκριση των γοναδοτροφινών και παρέρχονται ταχέως. Σε περίπτωση αποτυχίας της πρόκλησης ωορρηξίας με κλομιφαίνη σε ασθενείς με σύνδρομο ΠΜΘΩ γίνεται θεραπεία με γοναδοτροφίνες. Η θεραπεία αρχίζει με μικρές δόσεις FSH. Το αποτέλεσμα της θεραπείας ελέγχεται με τη μέτρηση της οιστραδιόλης και τον υπερηχογραφικό έλεγχο. Στην συνέχεια

χορηγείται χοριακή γοναδοτροφίνη (hCG) εφόσον η στάθμη της οιστραδιόλης και το μέγεθος του ωοθυλακίου φθάσουν τα προωρρηκτικά επίπεδα.

1.2 Η ινσουλίνη και ο υποδοχέας της

Είναι πλέον τεκμηρωμένο ότι η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, με τη συνοδό υπερινσουλιναιμία, διαδραματίζει έναν πρωταρχικό παθοφυσιολογικό ρόλο στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που μπορεί να χαρακτηρηστεί ως το κυριότερο μέσο που χρησιμοποιεί ο οργανισμός για να διατηρήσει υπό έλεγχο τις τιμές σακχάρου στο αίμα. Η ινσουλίνη παράγεται από ειδικά κύτταρα (τα ονομαζόμενα β-κύτταρα) στο πάγκρεας. Φυσιολογικά όταν ένα άτομο τρώει κάτι, ο οργανισμός απελευθερώνει ινσουλίνη από το πάγκρεας, ως μέρος της διεργασίας που μετατρέπει την τροφή σε ενέργεια. Η ινσουλίνη βοηθά τα κύτταρα σε διάφορα όργανα να προσλάβουν τη γλυκόζη (σάκχαρο) που χρειάζονται ως ενέργεια, και επίσης βοηθά στην απομάκρυνση του πλεονάσματος γλυκόζης από την κυκλοφορία. Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι ακραίες υψηλές τιμές γλυκόζης στο αίμα μετά από ένα γεύμα εκπίπτουν σε φυσιολογικές τιμές σακχάρου. Όταν ο οργανισμός ενός ασθενούς δεν παράγει ινσουλίνη ή δεν κάνει σωστή και αποτελεσματική χρήση της ινσουλίνης που παράγει, τα κύτταρα στερούνται την ινσουλίνη και τότε οι τιμές σακχάρου στο αίμα παραμένουν υψηλές. Η ανεπάρκεια της ινσουλίνης προκαλεί επίσης και την νόσο του σακχαρώδη διαβήτη (τύπου 1 ή τύπου 2). Η ορμόνη αυτή παρασκευάζεται συνθετικά από το 1921 και χορηγείται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη.

Όσον αφορά τώρα τους υποδοχείς, μπορούμε να αναφέρουμε, ότι είναι ειδικά κυτταρικά μόρια που «ανιχνεύουν» τα εξωκυτταρικά χημικά σήματα και μετά εκλύουν κυτταρικές αντιδράσεις σε αυτά τα σήματα [20]. Επομένως όταν η ινσουλίνη δεσμεύεται από τον υποδοχέα της, ο υποδοχέας δίνει σήμα στο κύτταρο να επιτρέψει την είσοδο της γλυκόζης. Εάν ο υποδοχέας δυσλειτουργεί ή δεν είναι σε επαρκή ποσότητα, δεν είναι σε θέση να εκπέμψει αυτό το σήμα. Ο διαβήτης τύπου 2 συχνά προκαλείται από μια τέτοια δυσλειτουργία.

Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α, που βρίσκονται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης και 2 β, που διατρέχουν τη μεμβράνη και συνδέονται μεταξύ

τους με 3 δισουλφιδικούς δεσμούς [11]. Επιπλέον ο υποδοχέας της ινσουλίνης αλληλεπιδρά με πρωτεϊνικά υποστρώματα (IRS) τα οποία είναι βασικοί μεσολαβητές στη μεταγωγή σημάτων ινσουλίνης [21]. Τέσσερα μέλη (IRS-1, IRS-2, IRS-3, και IRS-4) αυτής της οικογένειας έχουν προσδιοριστεί. Η φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων IRS-1 και IRS-2 προκαλείται από τη σύνδεση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα της [22].

Το πρώτο βήμα μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα ινσουλίνης είναι η φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης IRS-1. Το IRS-1 είναι μία πρωτεΐνη που πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να ενεργοποιήσει το ένζυμο P13K, απαραίτητο βήμα για διάφορες λειτουργίες της ινσουλίνης, όπως η μεταφορά της γλυκόζης. Όταν το IRS-1 δυσλειτουργεί, το IRS-2 είναι ο κύριος μεσολαβητής για την ενδοκυττάρια μεταφορά της γλυκόζης.

Η βιολογική απάντηση των IRS-1 και IRS-2 στις πρωτεϊνικές κινήσεις της τυροσίνης εξαρτάται από την ιδιομορφία και τη συγγένεια της δέσμευσης των περιοχών όπου έχει γίνει η φωσφορυλίωση της τυροσίνης μέσα στα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Κατά συνέπεια, πολλές γενετικές παραλλαγές μέσα στην περιοχή αυτή της τυροσίνης μπορούν να αλλάξουν αυτές τις ιδιότητες [23].

Η δέσμευση της ινσουλίνης με τον υποδοχέα γίνεται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Ακολούθως, ο δεσμευμένος υποδοχέας της ινσουλίνης συμπεριφέρεται ως μια τυροσινική κινάση, η οποία αυτοφωσφορυλιώνεται και καταλύει την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους. Η αυτοφωσφορυλίωση αυξάνει την ικανότητα φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης και σε άλλες πρωτεΐνες-στόχους. Οι περιοχές με δράση τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα βρίσκονται στις αλυσίδες β, στην ενδοκυττάρια περιοχή [24].

Η πολυπλοκότητα όμως της ενδοκυττάριας δράσης της ινσουλίνης στους διάφορους ιστούς οδήγησε αρχικά τους Larner et al, το 1979 [25], στην υπόθεση της ύπαρξης διαφορετικών μεσολαβητών, οι οποίοι συμμετέχουν στη μετάδοση του ενδοκυττάρια μηνύματος της ινσουλίνης. Ο επόμενος στόχος ήταν να καθοριστεί η χημική δομή των μεσολαβητών. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι άνηκαν στην οικογένεια των κυκλικών νουκλεοτιδίων. Μεταγενέστερες μελέτες τους κατέταξαν στην κατηγορία των ολιγοπεπτιδίων που περιέχουν ένα αμινοσάκχαρο [26]. Τα τελευταία ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ανήκουν στην κατηγορία των ινοσιτολικών φωσφογλυκανών (inositol phosphoglycans, IPGs), οι οποίες αποτελούν υδατοδιαλυτά

προϊόντα υδρόλυσης αρχικών μεγαλομοριακών ενώσεων, των γλυκοζυλοφωσφατιδυλο-ινοσιτολικών λιπιδίων (glycosyl-phosphatidyl-inositol lipids, GPIs) υπό την επίδραση της ινσουλίνης. Τα GPIs βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή αποτελούν τμήματα άλλων εξωκυττάρων πρωτεϊνών αγκυροβολημένων στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες όπως η πρωτεΐνη Blast-1 των ανθρώπινων λεμφοκυττάρων και η CD-14 των ανθρώπινων μονοκυττάρων [22]. Οι IPGs αποτελούνται από ινοσιτόλες συνδεδεμένες γλυκοζιδιλικά με τις πεντόζες μαννόζη και γαλακτόζη και με αμινοεξόζες, οι οποίες χαρακτηριστικά περιέχουν αμινομάδες που δεν παράγονται από σουλφιδυλική ή ακετυλική ομάδα. Οι σημαντικότερες ενδείξεις που σηματοδοτούν υπέρ της άποψης ότι οι IPGs λειτουργούν ως δευτεροί μεταβιβαστές του ενδοκυττάρου μηνύματος της ινσουλίνης, μπορεί να συνοψιστούν ως ακολούθως:

α) Μιμούνται, απουσία της ινσουλίνης, ένα σημαντικό μέρος των μεταβολικών δράσεων της *in vivo* και *in vitro*.

β) Τα αντι-IPG αντισώματα εξασθενούν *in vivo* τη δράση της ινσουλίνης.

γ) Τα συνθετικά παράγωγα των IPGs παρουσιάζουν *in vivo* και *in vitro* ινσουλινική δραστηριότητα [27].

Στην συνέχεια θα παρουσιαστεί μια άλλη εναλλακτική οδός σηματοδότησης της ενδοκυττάριας δράσης της ινσουλίνης μέσω της ινοσιτολικής γλυκάνης και των G-πρωτεϊνών ως πιθανών δευτέρων μεσολαβητών. Αυτή η εναλλακτική οδός μετάδοσης του ενδοκυττάρου μηνύματος της ινσουλίνης είναι ιδιαίτερα σημαντική και φαίνεται να δημιουργεί νέες προοπτικές στη θεραπευτική αντιμετώπιση των συνδρόμων αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης.

1.2.1 Σχέση των G-πρωτεϊνών στη σηματοδότηση της δράσης της ινσουλίνης και σύνδεσή τους με τις IPGs

Η παρουσία του καταρράκτη φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, ως αποκλειστικού μηχανισμού μετάδοσης του μηνύματος της ινσουλίνης, είναι ανεπαρκής για να εξηγήσει την αντιφατικότητα των δράσεων της στους διάφορους ιστούς. Οι Moule και Denton [28] απέδειξαν ότι η ενεργοποίηση της πυροσταφυλικής δευδρογονάσης από την ινσουλίνη δεν μπορεί να εξηγηθεί αποκλειστικά με τη θεωρία της αυτοφωσφορυλίωσης των καταλοίπων τυροσίνης του

υποδοχέα της ινσουλίνης. Αυτό στηρίχθηκε στην παρατήρηση ότι η πυροσταφυλική δευδρογονάση δεν ανεστάλει με τη χρησιμοποίηση της βορτμαμίνης (wortmannin), ενός αναστολέα της φωσφατιδυλοϊνοσιτολικής-3-κινάσης (PI3K). Η PI3K είναι ένα από τα ένζυμα-κλειδιά στη μετάδοση του μηνύματος της ινσουλίνης διά της τυροσινικής οδού, υπογραμμίζοντας έτσι την παρουσία ενός εναλλακτικού πρόσθετου μηχανισμού μετάδοσης του σήματος της ινσουλίνης. Οι Goren et al [29] απέδειξαν ότι η προεπεξεργασία λιποκυττάρων με τοξίνη κοκκύτη, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει τις G-πρωτεΐνες, αναστέλλει τη μετάδοση του ενδοκυττάρου μηνύματος της ινσουλίνης και υποδεικνύει την αλληλεπίδραση του ινσουλινικού υποδοχέα με τις G-πρωτεΐνες. Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί από τους Luttrell et al, η κατεργασία με τοξίνη κοκκύτη μυοκυττάρων εμπόδισε την ινσουλινο-διεγερόμενη παραγωγή των IPGs και της διακυλογλυκερόλης (DAG) [30], αλλά δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση της τυροσινικής κινάσης σε διάφορες πρωτεΐνες-κλειδιά, όπως την IRS (insulin receptor substrate, υπόστρωμα ινσουλινικού υποδοχέα) και τη β-υπομονάδα του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Τα δύο συστήματα σηματοδότησης συνυπάρχουν και στον IGF-1 υποδοχέα, ο οποίος είναι ένας κλασικός υποδοχέας με ενεργότητα της κινάσης της τυροσίνης. Τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι για την ενδοκυττάρια μετάδοση του μηνύματος της πολυδύναμης ινσουλίνης χρησιμοποιούνται δύο ή και περισσότεροι μηχανισμοί, είτε μέσω της αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσίνης των β-αλυσίδων του υποδοχέα της, είτε μέσω της ενεργοποίησης των βγ-υπομονάδων των τριμερών G-πρωτεϊνών και της κινητοποίησης της απελευθέρωσης των IPGs [31]. Οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, που αποτελούνται από τις α, β και γ υπομονάδες, χαρακτηρίζονται ως μεγάλες G-πρωτεΐνες και οι μικρού μοριακού βάρους G-πρωτεΐνες, όπως η ARF, η RHO και Ras, χαρακτηρίζονται ως μικρές G-πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι τα συστήματα μετάδοσης του μηνύματος της ινσουλίνης λειτουργούν ενδεχομένως ξεχωριστά, συντονισμένα όμως με κοινό στόχο τη διατήρηση της μεταβολικής ισορροπίας (ενδοκυττάρια ομοιόσταση) του κυττάρου.

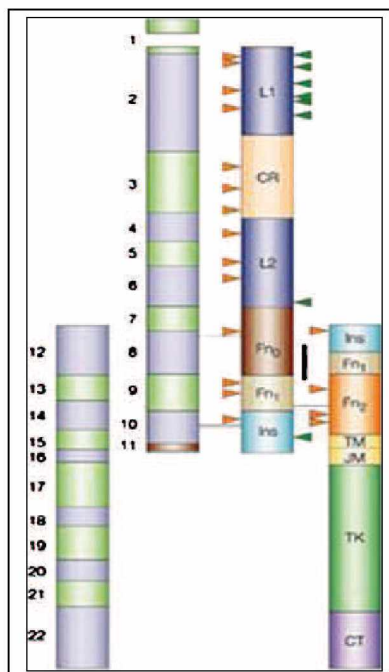
1.2.2 Θεωρητικό μοντέλο αλληλουχίας γεγονότων της ενδοκυττάριας σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης

Σε μελέτη των Okamoto et al [32], έχουν ταυτοποιηθεί περιοχές των φωσφορυλιωμένων τυροσινών της β-αλυσίδας του υποδοχέα της ινσουλίνης, που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Φαίνεται έτσι ότι όταν η ινσουλίνη ενώνεται με τον υποδοχέα της ενεργοποιεί τόσο την κινάση της τυροσίνης όσο και τις τριμερείς G-πρωτεΐνες. Πρόκειται για δύο διαφορετικά αλλά αλληλεπιδρώντα συστήματα σηματοδότησης του ενδοκυττάριου μηνύματος. Ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης της τυροσινικής κινάσης, για την ευόδωση της ινσουλινικής δράσης αλλά και της φωσφορυλίωσης της σερίνης/θρεονίνης για την αναστολή της δράσης της, έχει επαρκώς εξακριβωθεί. Ο μηχανισμός όμως της δράσης της ινσουλίνης μέσω G-πρωτεϊνών, της ενεργοποίησης των φωσφολιπασών και της αλληλεπίδρασης με το μηχανισμό της αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσίνης παραμένει ένα νέο αντικείμενο μελετών.

Περίληπτικά, παρουσιάζεται στην συνέχεια ένα θεωρητικό μοντέλο της σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης (insulin receptor, IR) διαμέσου της κινάσης της τυροσίνης και των G-πρωτεϊνών. Η β-υπομονάδα του υποδοχέα ινσουλίνης συνδέεται με διάφορες πρωτεΐνες αγκυροβόλησης μέσω των SH2 περιοχών, ενώ ταυτόχρονα οι μεγάλες G-πρωτεΐνες ενεργοποιούν τις μικρές G-πρωτεΐνες (με έως τώρα άγνωστους μηχανισμούς), οι οποίες με τη σειρά τους, ενεργοποιούν τις μεμβρανικές φωσφολιπάσες C ή και D, για να διασπάσουν GPIs σε υδατοδιαλυτές IPGs στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης.

Οι IPGs εισέρχονται στο κύτταρο προέλευσης ή σε γειτονικά κύτταρα με έναν αυτοκρινικό-παρακρινικό μηχανισμό και ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS) με τη βοήθεια μιας κυτταρικής κινάσης της τυροσίνης, μέλους της οικογένειας των Src τυροσινικών κινασών. Η φωσφορυλίωση των IRS, με τη μεσολάβηση των IPGs, αποτελεί ένα μηχανισμό διασταυρούμενης επικοινωνίας με τον καταρράκτη της φωσφορυλίωσης του ινσουλινο-υποδοχέα. Οι IPGs διαδραματίζουν ένα ρόλο τόσο στο διαμεμβρανικό επίπεδο της ενεργοποίησης της τυροσινικής κινάσης, όσο και σε ενδοκυττάριο επίπεδο μετάδοσης του μηνύματος. Εντός του κυττάρου, οι IPGs ενεργοποιούν τις

ενδοκυττάριας φωσφοπρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 και 2C, οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τη συνθετάση του γλυκογόνου (glycogen synthase, GS), καθώς επίσης και της μιτοχονδριακής φωσφατάσης, η οποία προκαλεί την ενεργοποίηση της γλυκόλυσης [33].



Εικόνα 2. Δομή του υποδοχέα ινσουλίνης. Στο αριστερό μισό του υποδοχέα, εκτείνονται οι κωδικοποιημένες ακολουθίες των 22 εξόνων. Στο δεξί μισό, εκτείνονται τα πρωτεϊνικά τμήματα. INS: Εισαγωγή. TM: διαμεμβρανική περιοχή. JM: περιοχή κοντά στην μεμβράνη. TK: περιοχή τυροσινικών κινάσεων.

Η Εικόνα 2 δείχνει την δομή του υποδοχέα ινσουλίνης. Ο υποδοχέας ινσουλίνης φαίνεται να κωδικοποιείται από ένα γονίδιο με 22 εξόνια και 21 εσώνια. Το μικρό εξόνιο 11 υφίσταται εναλλακτική συρραφή, καταλήγωντας σε δύο ισομορφές (A και B) που διαφέρουν ελάχιστα στη συγγένεια με την ινσουλίνη. Η B ισομορφή δεσμεύει τα IGFs με τουλάχιστον 100 φορές χαμηλότερη συγγένεια από την ινσουλίνη, ενώ η A ισομορφή έχει ιδιαίτερη υψηλότερη συγγένεια από το B ισόμορφο για το IGF-I και ειδικά για το IGF-II. Ο υποδοχέας IGF-I δεσμεύει τον IGF-II με χαμηλότερη συγγένεια από ότι ο IGF-I και η ινσουλίνη με 500 φορές χαμηλότερη συγγένεια.

1.3 Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως στόχο να διερευνήσει, αν οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα ινσουλίνης και των υποστρωμάτων του συσχετίζονται με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η μέθοδος της μετα-ανάλυσης.

Η μετα-ανάλυση μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα στατιστικό εργαλείο που συνδυάζει και επεξεργάζεται αποτελέσματα ερευνών που μελετούν την ίδια γενετική συσχέτιση. Είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση των επιδράσεων των υποψήφιων γονιδίων στους σύνθετους φαινότυπους. Η ανάπτυξη αυτής της μεθοδολογίας ξεκινάει από την εποχή του Fisher, το 1920. Σαν όρος εμφανίστηκε στο χώρο της ψυχολογίας στα τέλη της δεκαετίας του 70, αλλά χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην Επιδημιολογία και στις κλινικές δοκιμές [34]. Τελευταία γίνεται δημοφιλής ως μέθοδος για την επίλυση προβλημάτων σε μελέτες γενετικού περιεχομένου.

Η Γενετική Επιδημιολογία ορίζεται ως η περιοχή επαφής της κλασικής Γενετικής με την Επιδημιολογία. Ασχολείται με την καταγραφή και την μελέτη των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνιση ασθενειών, όσο και με την αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων σε μεγάλους πληθυσμούς [35].

Το αντικείμενο που πρόκειται να ερευνηθεί είναι αυτό που πρέπει να καθορίζεται αρχικά σε μια μετα-ανάλυση. Στην συνέχεια, θα πρέπει να γίνεται μια όσο το δυνατόν εκτενής αναζήτηση στη βιβλιογραφία από διάφορες βάσεις δεδομένων όπως είναι η PubMed και η Scopus, για να βρεθούν όλες οι διαθέσιμες μελέτες που να αναφέρονται στο θέμα που εξετάζεται. Μόλις συγκεντρωθεί ένας αριθμός μελετών, που συνήθως πρέπει να είναι τουλάχιστον μεγαλύτερος από 4, εξάγονται τα δεδομένα που θα χρησιμοποιηθούν στην μετα-ανάλυση. Η αξιοπιστία της μετα-ανάλυσης επηρεάζεται από την αξιοπιστία των συμπεριλαμβανόμενων στοιχείων, οπότε απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά την ανάκτηση και επεξεργασία τους.

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης μελετούν συνήθως 2 ομάδες ατόμων, τους ασθενείς (case) και τους μάρτυρες (control). Οι ασθενείς είναι τα άτομα που πάσχουν από την ασθένεια και οι μάρτυρες είναι άτομα, συνήθως υγιή, που επιλέγονται από τους ερευνητές. Οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων χωρίζονται και αυτές σε 2 κατηγορίες [36]:

α) Σε πληθυσμούς (population-based).

β) Σε οικογένειες (family-based).

Οι μελέτες αυτές διαφοροποιούνται ως προς την ανάλυση αλλά και τις άλλες στατιστικές ιδιότητες (ισχύς, μέθοδος δειγματοληψίας). Επιπλέον υπάρχουν και άλλοι σχεδιασμοί και συνδυασμοί τους κυρίως προερχόμενοι από την Επιδημιολογία.

Στις μελέτες ασθενών-μαρτύρων σε οικογένειες (family-based) συγκρίνονται τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα των ασθενών που έχουν μεταδοθεί από τους γονείς τους με τα αλληλόμορφα που δεν έχουν μεταδοθεί από τους γονείς τους [37]. Το πλεονεκτήμα σε αυτές τις μελέτες είναι η εξάλειψη συγχυτικών παραγόντων (confounding), αλλά η μικρή στατιστική τους ισχύς και η δύσκολη εύρεση μεγάλου δείγματος είναι μερικά από τα μειονεκτήματα που εμποδίζουν την πραγματοποίηση αυτών των μελετών.

Όσον αφορά τις μελέτες ασθενών-μαρτύρων σε πληθυσμούς (population-based), συγκρίνεται η συχνότητα του αλληλόμορφου γονιδίου ή και των γονότυπων μεταξύ ασθενών ατόμων και υγιών, ασυσχέτιστων μαρτύρων επιλεγμένων από τον πληθυσμό. Αυτή η μεθοδολογία είναι κλασική στην Επιδημιολογία. Η εύκολη εύρεση μεγάλου δείγματος είναι μερικά από τα πλεονεκτήματά της, ενώ απαιτείται εξομοίωση ασθενών και μαρτύρων (matching) για την εξάλειψη των συγχυτικών παραγόντων (confounding). Συνηθίζεται να προτιμούνται κυρίως μελέτες ασθενών-μαρτύρων (case-control association studies) που αναφέρονται σε πληθυσμούς (population-based) καθώς το δείγμα σε αυτήν την περίπτωση είναι πιο μεγάλο [36].

Δύο πρότυπα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συνδυάσουν τις μεμονωμένες εκτιμήσεις του μεγέθους επίδρασης (π.χ. η εκτίμηση της συμβολής ενός αλληλόμορφου γονιδίου στο φαινότυπο) που παρέχονται από τις αρχικές μελέτες:

α) Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (Fixed effects model)

β) Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (Random effects model)

1.3.1 Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων και το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων

Η ανάλυση σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι όλα τα δείγματα των μελετών, προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό και εκφράζονται ένα κοινό μέγεθος επίδρασης. Σε αυτή τη περίπτωση, μόνο το σφάλμα λόγω της δειγματοληψίας (θεωρητικά) είναι αυτό που συμβάλλει στις διαφορές μεταξύ των παρατηρηθέντων εκτιμήσεων του μεγέθους επίδρασης στις μεμονωμένες μελέτες.

Σε αντίθεση με την ανάλυση σταθερών επιδράσεων, η ανάλυση τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι τα δείγματα μελέτης που περιλαμβάνονται σε μια μετα-ανάλυση προέρχονται από μια κατανομή πληθυσμών (έτσι ώστε είναι δυνατόν να υπάρξουν υποσύνολα πληθυσμών για τα οποία δεν υπάρχει καμία επίδραση και άλλα για τα οποία υπάρχει μια ουσιαστική επίδραση). Σε ένα μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, υπάρχουν δύο πηγές μεταβλητότητας που συμβάλλουν στις διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων του μεγέθους επίδρασης:

- α) Το σφάλμα δειγματοληψίας.
- β) Η ετερογένεια μεταξύ μελετών.

Στην ανάλυση σταθερών επιδράσεων, αυξάνοντας τον αριθμό μελετών που συμβάλλουν στην ανάλυση θα οδηγήσει στην παραγωγή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων επειδή οι πρόσθετες μελέτες θα οδηγήσουν σε ένα περιορισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης γύρω από την εκτίμηση του μεγέθους επίδρασης. Υπάρχει ένας χαρακτηριστικός κίνδυνος για σφάλμα τύπου I (κάποιος να βρει μια συσχέτιση όταν αυτή δεν υπάρχει), εάν υπάρχει ουσιαστική ετερογένεια μεταξύ μελετών. Σε αντίθεση, αυξάνοντας τον αριθμό μελετών που συμβάλλουν σε μια ανάλυση τυχαίων επιδράσεων δεν θα οδηγήσει απαραίτητα στην παραγωγή πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων λόγω της πιθανότητας ότι η προσθήκη των μελετών θα οδηγήσει επίσης στην προσθήκη των μεγαλύτερων εκτιμήσεων του μεγέθους επίδρασης, εάν η προσθήκη των μελετών αυξήσει τη συνολική ετερογένεια μεταξύ των μελετών [38].

1.3.2 Ετερογένεια μεταξύ μελετών

Μία κρίσιμη ερώτηση για οποιαδήποτε μετα-ανάλυση, είναι ο βαθμός ετερογένειας που υπάρχει μεταξύ των μεμονωμένων μελετών. Η ετερογένεια χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει πόσο διαφορετικά είναι τα αποτελέσματα μελετών που ερευνούν την ίδια γενετική συσχέτιση. Μπορεί να οφείλεται σε οποιοσδήποτε, ενδεχομένως, σχετικές διαφορές μεταξύ των μελετών και των μεθοδολογιών τους, όπως οι πληθυσμοί από τους οποίους προέρχονται τα δείγματα μελέτης [34]. Για παράδειγμα, στις μελέτες με αντικείμενο την γενετική συσχέτιση, η ετερογένεια μεταξύ των μελετών μπορεί να προκαλείται από τους εξής παράγοντες:

α) Την πιθανότητα μια συσχέτιση να υπάρχει σε έναν πληθυσμό αλλά να μην υπάρχει σε άλλον.

β) Την πιθανότητα ότι οι διαφορετικές μελέτες δεν χρησιμοποίησαν ίδια μέτρα εκτίμησης του μεγέθους επίδρασης.

γ) Την πιθανότητα ότι οι αλληλόμορφες κατανομές παρέκκλιναν από την ισορροπία των Hardy-Weinberg σε μερικές μελέτες [39].

Σε μια μετα-ανάλυση, αν υπάρχει ετερογένεια, τα μοντέλα σταθερών επιδράσεων δεν είναι αποδεκτά. Ακόμα και με μοντέλα τυχαίων επιδράσεων τα οποία ενσωματώνουν την ετερογένεια, η προέλευσή της πρέπει να διερευνάται. Πολλές φορές πραγματοποιούνται διαφορετικές αναλύσεις ανάλογα με την καταγωγή των πληθυσμών που μελετούνται για να μειωθεί η ετερογένεια. Αυτό μπορεί να είναι παραπλανητικό γιατί υπονοεί ότι οι διαφορές οφείλονται σε άλλους, μη μετρήσιμους γενετικούς παράγοντες.

1.3.5 Προβλήματα βιβλιογραφίας

Εκτός από το πρόβλημα της ετερογένειας υπάρχει και ο κίνδυνος να προκύψει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης ή αλλιώς ‘publication bias’. Το πρόβλημα αυτό προέκυψε από το γεγονός, ότι μελέτες που καταφέρνουν να βρουν μια συσχέτιση δημοσιεύονται πιο γρήγορα και πιο εύκολα από άλλες που δεν βρίσκουν.

Υπάρχουν και άλλα προβλήματα της βιβλιογραφίας, όπως το φαινόμενο «γκρίζας» βιβλιογραφίας (grey literature bias), το φαινόμενο «ξενόγλωσσης»

βιβλιογραφίας (local literature bias) και το φαινόμενο του «Πρωτέα» (Proteus phenomenon) ή molecular bias.

Όσον αφορά το φαινόμενο «γκρίζας» βιβλιογραφίας (grey literature bias), μελέτες έχουν δείξει ότι σε μια μετα-ανάλυση, πρέπει να καταβληθεί κάθε προσπάθεια για ανεύρεση πρωταρχικών μελετών, ακόμα και αν αυτές δεν έχουν δημοσιευθεί σε περιοδικά. Ο λόγος είναι ότι αυτές οι μελέτες έχουν συνήθως πιο «μετριοπαθή», αν όχι αρνητικά αποτελέσματα και κατά συνέπεια αν δεν συμπεριληφθούν, υπάρχει κίνδυνος να υπερ-εκτιμηθεί το τελικό αποτέλεσμα [40-42].

Ειδικό ενδιαφέρον έχει αποκτήσει τα τελευταία χρόνια στη Γενετική Επιδημιολογία και η αύξηση δημοσιεύσεων σε περιοδικά (στη MEDLINE ή όχι) στα οποία η γλώσσα δημοσίευσης είναι τα κινέζικα. Έχει βρεθεί ότι αν αγνοηθούν αυτές οι δημοσιεύσεις (οι οποίες βέβαια μπορεί να μην είναι υψηλής ποιότητας) υπάρχει κίνδυνος να υπάρξει συστηματικό σφάλμα, που είναι γνωστό ως το φαινόμενο «ξενόγλωσσης» βιβλιογραφίας (local literature bias). Προτείνεται οι μελέτες αυτές να αναζητούνται και να χρησιμοποιούνται στις μετα-αναλύσεις [43].

Τα δύο παραπάνω φαινόμενα είναι ειδικές περιπτώσεις του συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης (publication bias). Το σφάλμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι μελέτες με «θετικά» ευρήματα, δημοσιεύονται πιο γρήγορα και πιο εύκολα από ότι μελέτες οι οποίες «απέτυχαν» να δείξουν μια συσχέτιση (αρνητικές μελέτες). Αν υπάρχει τέτοιο συστηματικό σφάλμα, κάθε αποτέλεσμα μπορεί να είναι επισφαλές.

Το τελευταίο φαινόμενο ονομάζεται φαινόμενο του «Πρωτέα» (Proteus phenomenon) και πήρε το όνομα του από τον αρχαίο θεό Πρωτέα. Στη μοριακή εποχή οι «παράγοντες κινδύνου» είναι χιλιάδες (γονίδια και πολυμορφισμοί) σε σχέση με την προ-μοριακή εποχή (κάπνισμα, φάρμακα κλπ). Αν επιστήμονες σε διάφορα μέρη του κόσμου ελέγχουν ταυτόχρονα πολλές εναλλακτικές υποθέσεις (γονίδια) για την αιτιολογία μιας ασθένειας, υπάρχει ο κίνδυνος για σφάλμα τύπου I (κάποιος να βρει μια συσχέτιση όταν αυτή δεν υπάρχει). Αν ένας από όλους «πετύχει» ένα «δυνατό» εύρημα, αυτό δημοσιεύεται αμέσως σε περιοδικό με κύρος (Nature, Lancet κλπ). Στη συνέχεια οι υπόλοιποι προσπαθούν να το επιβεβαιώσουν ή να το διαψεύσουν. Το συνολικό αποτέλεσμα από μια μετα-ανάλυση αλλάζει με το χρόνο (cumulative meta-analysis). Τέλος, μπορούμε να προσθέσουμε ότι το φαινόμενο αυτό είναι υπαρκτό στη Γενετική αλλά όχι στις Κλινικές Δοκιμές [44].

1.3.6 Ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE)

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως η ετερογένεια μπορεί να προκληθεί από την πιθανότητα ότι οι αλληλόμορφες κατανομές παρεκκλίνουν από την ισορροπία των Hardy-Weinberg. Καλό θα ήταν επομένως, να γίνεται έλεγχος στους πληθυσμούς που μελετώνται για το αν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Ο όρος «ισορροπία Hardy-Weinberg» προέκυψε από την κοινή διαπίστωση των G.H. Hardy και W.Weinberg, σύμφωνα με την οποία οι σχετικές συχνότητες των αλληλομόρφων (και υπό προϋποθέσεις, γονοτυπικές συχνότητες) παραμένουν σταθερές από γενιά σε γενιά, αν δεν διαταραχθεί κανένας παράγοντας από όσους μπορούν να επηρεάσουν την όλη διαδικασία.

Η ισορροπία Hardy-Weinberg επιβεβαιώνεται πειραματικά σε πολλές περιπτώσεις, με την προϋπόθεση βέβαια ότι αναφερόμαστε σε σχετικά λίγες διαδοχικές γενιές, δηλαδή σε μικρό εύρος του εξελικτικού χρόνου, οπότε λογικά δεν προφταίνουν να αλλάξουν οι περιβαλλοντικοί ή άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν αυτήν την ισορροπία.

Συνοπτικά οι προϋποθέσεις εξασφάλισης της ισορροπίας είναι οι εξής [45]:

α) Το πλήθος των ατόμων στον πληθυσμό είναι πρακτικά άπειρο. Η προϋπόθεση αυτή ελαχιστοποιεί αποκλίσεις σε θεωρητικά αναμενόμενες συχνότητες, οι οποίες παρατηρούνται σε μικρούς πληθυσμούς. Για παράδειγμα όσο το μέγεθος του πληθυσμού αυξάνει, τόσο η αναλογία ανδρών-γυναικών αναμένεται να πλησιάζει το 1:1.

β) Οι δυνατές συζεύξεις μεταξύ των ατόμων είναι ελεύθερες και τυχαίες.

γ) Όλα τα αλληλόμορφα έχουν την ίδια πιθανότητα να περάσουν στους γαμέτες και έτσι συνεισφέρουν στον ίδιο βαθμό στην συγκρότηση της γονιδιακής δεξαμενής.

δ) Στη γονιδιακή δεξαμενή δεν προστίθεται και δεν απομακρύνεται οποιοδήποτε αλληλόμορφο, όπως επίσης δεν δημιουργείται κάποιο νέο.

Από πρακτική άποψη ένα επακόλουθο της ισορροπίας Hardy-Weinberg είναι ότι έστω κι αν είναι πολύ μικρή η συχνότητα εμφάνισης ενός αλληλομόρφου, αυτό δεν πρόκειται να εξαφανιστεί από τον πληθυσμό.

Τελειώνοντας μπορούμε να προσθέσουμε πως ακόμα και αν αποδειχθεί η συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια, ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός πρέπει να διαλευκανθεί με πειραματικά μέσα. Μπορεί λ.χ. η συσχέτιση να είναι δευτερογενής, δηλαδή ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός να βρίσκεται απλά σε ισορροπία σύνδεσης (linkage equilibrium) με κάποιον άλλο γενετικό παράγοντα ο οποίος και να προκαλεί τελικά τις φαινοτυπικές εκδηλώσεις.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπως αναφέραμε και στην αρχή, το θέμα της μελέτης μας είναι αν το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) συσχετίζεται με τον υποδοχέα ινσουλίνης και τους πολυμορφισμούς του. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της μετα-ανάλυσης.

Ξεκινώντας, προσπαθήσαμε να αναζητήσουμε βιβλιογραφία, δημοσιευμένη και μη, σε διάφορες βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο, όπως η Pubmed και η Scopus, που αναφέρονταν στα θέματα που μας απασχολούν. Οι λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιήσαμε ήταν διάφοροι συνδυασμοί των εννοιών “PCOS”, “insulin receptor”, “polycystic ovary syndrome”, “INSR”, “polymorphisms”, “mutations” και “SNPs”. Όλο το σύνολο των άρθρων που ανακτήθηκε, μελετήθηκε πλήρως με στόχο να γίνει μια λίστα από μελέτες που αναφέρονταν στους ίδιους πολυμορφισμούς και περιείχαν ομάδες ασθενών-μαρτύρων (cases-controls). Συνεπώς άρθρα που περιείχαν μόνο υγιείς ή μόνο ασθενείς απορρίφθηκαν. Επιπλέον συμπεριλήφθηκαν άρθρα που είχαν γραφεί και σε άλλη γλώσσα εκτός της Αγγλικής, όπως για παράδειγμα τα Κινέζικα, με σκοπό να αποφύγουμε το φαινόμενο της «ξενόγλωσσης» βιβλιογραφίας (local literature bias) [43].

Σύμφωνα λοιπόν με τα άρθρα που συγκεντρώσαμε, δημιουργήσαμε ένα έγγραφο excel, στο οποίο αποθηκεύσαμε τα δεδομένα που μας ενδιέφεραν. Χρησιμοποιήσαμε μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects model), καθώς τα δείγματα από τις μελέτες που περιλήφθηκαν στην μετα-ανάλυσή μας προήλθαν από διάφορους πληθυσμούς. Ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήσαμε το OR (odds ratio) και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence interval). Στην συνέχεια κάναμε την μετα-ανάλυση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Stata9.

2.1 Συλλογή Δεδομένων

Έχοντας συλλέξει, λοιπόν τα άρθρα από την βιβλιογραφία, καταλήξαμε σε συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, από τους οποίους απορρίφθηκαν όσοι είχαν αριθμό μελετών μικρότερο του 4, δηλαδή όσες μελέτες αναφέρονται στον ίδιο πολυμορφισμό και ήταν λιγότερες από 4 διαγράφηκαν από την λίστα μας. Από τα

άρθρα που απομείνανε, δημιουργήσαμε στο excel μία λίστα που περιέχει τους πολυμορφισμούς και τον αριθμό μελετών που αντιστοιχεί στο καθένα.

Στην συνέχεια, κάναμε εξαγωγή των δεδομένων τα οποία μας ήταν απαραίτητα για την μετα-ανάλυση και τα αποθηκεύσαμε σε ένα έγγραφο excel. Τα δεδομένα που αποθηκεύσαμε για κάθε μελέτη είναι τα ακόλουθα: PMID, συγγραφέας (author), χρονιά έκδοσης (year), χώρα (country), καταγωγή προέλευσης (racial descent), χαρακτηριστικά ασθενών (case characteristics), χαρακτηριστικά μαρτύρων (control characteristics), αριθμός ασθενών (cases), αριθμός μαρτύρων (controls) και η μέση ηλικία των 2 ομάδων (mean age) αντίστοιχα. Επίσης συμπεριλήφθηκαν και οι γονότυποι των πολυμορφισμών των ασθενών και των μαρτύρων, ο αριθμός των αλληλομόρφων τους και τέλος οι συχνότητες των αλληλομόρφων τους, που υπολογίστηκαν στην συνέχεια.

Σε άλλο έγγραφο excel καταχωρήσαμε τα δεδομένα που θα χρησιμοποιούσαμε στο Stata για να κάνουμε την μετα-ανάλυση. Αυτά είναι τα εξής: ο αριθμός των ασθενών και των μαρτύρων, οι γονότυποι των πολυμορφισμών των ασθενών και των μαρτύρων, ο αριθμός των αλληλομόρφων τους και τέλος οι συχνότητες των αλληλομόρφων τους. Επιπλέον ξεχωρίσαμε τις μελέτες που δεν είχαν μάρτυρες (controls) και τις αποθηκεύσαμε σε ένα άλλο έγγραφο excel.

2.2 Στατιστική Ανάλυση

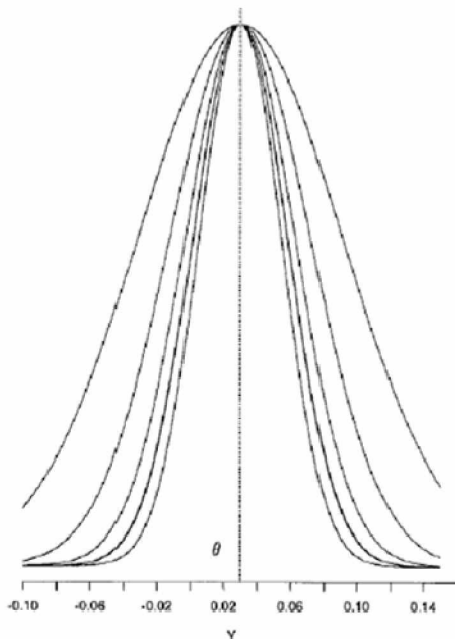
Πριν ξεκινήσουμε την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα του Stata επιλέξαμε το είδος του μοντέλου που θα χρησιμοποιήσουμε για να κάνουμε την μετα-ανάλυση. Όπως είπαμε και στην αρχή υπάρχουν δύο είδη μοντέλων, το μοντέλο σταθερών επιδράσεων και το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων τα οποία συζητούνται εκτενέστερα πιο κάτω.

2.2.1 Μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effects)

Η ανάλυση σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι όλα τα δείγματα των μελετών, προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό που έχουν ένα κοινό μέγεθος επίδρασης θ [46] (Εικόνα 3). Τότε το θ είναι η παράμετρος που μας ενδιαφέρει για $i=1,2,3,\dots,k$

ανεξάρτητες μελέτες και το s_i^2 η διακύμανση της κάθε μελέτης. Επομένως, ο τύπος του μοντέλου σταθερών επιδράσεων εκφράζεται ως εξής:

$$Y_i \sim N(\theta, s_i^2) \text{ για } i=1,2,3,\dots,k \text{ και το } s_i^2 \text{ θεωρείται γνωστό [46].}$$



Εικόνα 3: Μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Η κατανομή πέντε υποθετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Κάθε δείγμα Y_i έχει ένα κοινό μέγεθος επίδρασης θ . Η διαφορά ανάμεσα στις πέντε μελέτες είναι η διαφορετική διακύμανση της κάθε μελέτης s_i^2 , δηλαδή ποσό καλά υπολογίζει η κάθε μελέτη το θ .

2.2.1 Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects)

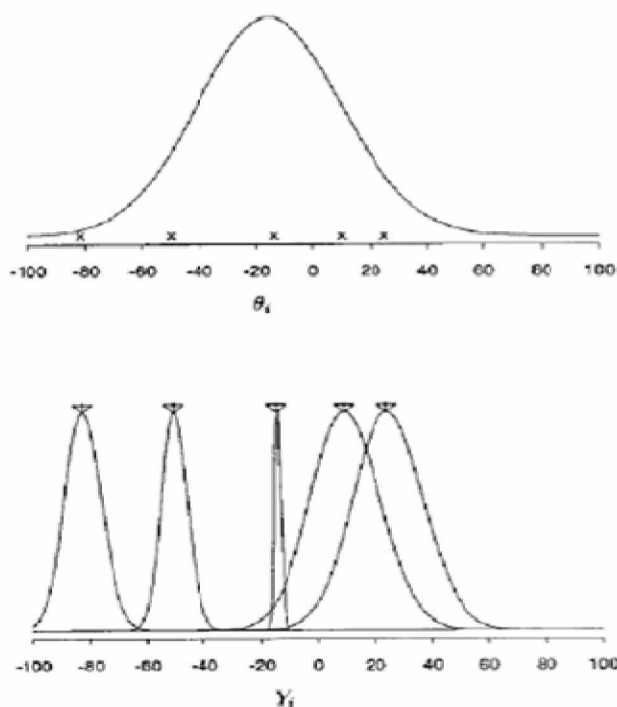
Σε αντίθεση με την ανάλυση σταθερών επιδράσεων, η ανάλυση τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι τα δείγματα μελέτης που περιλαμβάνονται σε μια μετα-ανάλυση μπορούν να προέλθουν από μια κατανομή πληθυσμών (έτσι ώστε να υπάρξουν υποσύνολα πληθυσμού για τα οποία δεν υπάρχει καμία επίδραση και άλλα για τα οποία υπάρχει μια ουσιαστική επίδραση - Εικόνα 4).

Κάθε μελέτη χρησιμοποιεί διαφορετικό μέγεθος επίδρασης, θ_i και διακύμανση s_i^2 με τύπο $Y_i \sim N(\theta_i, s_i^2)$. Κάθε δείγμα του υπερπληθυσμού, έχει μέγεθος επίδρασης που κατανέμεται με μέση τιμή θ και διακύμανση τ^2 , με τύπο $\theta_i \sim N(\theta, \tau^2)$ όπου θ

και τ^2 αναφέρονται ως υπερπαράμετροι και αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και την διακύμανση των μελετών αντίστοιχα. Η ανάλυση του υπερπληθυσμού, που περιλαμβάνει όλους τους πληθυσμούς που συμμετέχουν στην ανάλυση, δίνεται από τον τύπο:

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

όπου $y=(Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$ και το B_i ορίζεται ως $\frac{s_i^2}{s_i^2 + \tau^2}$. Όταν το $\tau^2 = 0$, τότε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων είναι ίσοδυναμο με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων [46].



Εικόνα 4: Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Η κατανομή πέντε υποθετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Κάθε μέγεθος επίδρασης θ_i προέρχεται από τον υπερπληθυσμό με μέγεθος επίδρασης θ και διακύμανση τ^2 . Στο παράδειγμα κάθε ένα από τα μεγέθη επίδρασης δημιούργησαν τα πέντε αποτελέσματα των μελετών.

Επιλέξαμε την μέθοδο τυχαίων επιδράσεων καθώς τα δείγματα των μελετών που χρησιμοποιήσαμε δεν προέρχονται από ενιαίο πληθυσμό αλλά από διαφορετικούς πληθυσμούς [34]. Επιπλέον λάβαμε υπόψη το γεγονός ότι σε περίπτωση ετερογένειας θα αναγκαζόμασταν να χρησιμοποιήσουμε ανάλυση τυχαίων επιδράσεων, ενώ αν δεν υπάρξει ετερογένεια τότε τα δύο μοντέλα θα δώσουν ίσα αποτελέσματα. Οπότε θεωρήσαμε σωστό να χρησιμοποιήσουμε ανάλυση τυχαίων επιδράσεων.

2.2.3 Το OR ως μέγεθος επίδρασης

Ως μέγεθος επίδρασης επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε το Odds Ratio (OR), το οποίο υπολογίζει την πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός προς την πιθανότητα να μην συμβεί. Στην περίπτωση των μελετών που ερευνούν μία γενετική συσχέτιση, όπως και στην δική μας περίπτωση, το OR υπολογίζει πιθανότητες γονοτύπων και αλληλόμορφων γονιδίων. Για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο να γίνεται ένας πίνακας 3x2 που προκύπτει από την ύπαρξη 2 αλληλομόρφων και συνεπώς 3 γονοτύπων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ο αριθμός των ομόζυγων και ετερόζυγων γονοτύπων που αντιστοιχούν στους ασθενείς και στους μάρτυρες.

	Γονότυποι		
	RR	GR	GG
Ασθενείς	α	β	γ
Μάρτυρες	δ	ε	ζ

Στην συνέχεια, κάναμε σύμπτυξη του πίνακα σε έναν 2x2, ενώνοντας 2 γονοτύπους, δημιουργώντας έτσι το αθροισμά τους. Αυτό προϋποθέτει ένα μοντέλο κληρονομικότητας. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για να γίνει η μετα-ανάλυση. Έτσι ο πίνακας 1 παίρνει για παράδειγμα την παρακάτω μορφή:

Πίνακας 2: Σύμπτυξη του πίνακα 1, σύμφωνα με ένα μοντέλο υπολειπόμενης κληρονομικότητας

	Γονότυποι	
	RR	GR+GG
Ασθενείς	α	β
Μάρτυρες	γ	δ

Όταν ο πίνακας 2 είναι έτοιμος, υπολογίζεται το OR το οποίο αποδίδεται από κάθε μελέτη στο γενετικό παράγοντα, και σταθμίζεται σύμφωνα με το μέγεθος της μελέτης το οποίο εκφράζεται το standard error (se) του log-odds ratio και τα

διάστημα εμπιστοσύνης. Οι μικρές μελέτες συμβάλλουν λιγότερο στο μέγεθος επίδρασης από τις μεγάλες μελέτες, επειδή είναι πιθανό να δώσουν λιγότερο ακριβείς εκτιμήσεις για το μέγεθος της επίδρασης (Όσα είναι γραμμένα σε γραμματοσειρά Courier new σημαίνει ότι είναι εντολές στο πρόγραμμα του Stata.)

Στην συνέχεια, για να υπολογίσουμε το OR χρησιμοποιήσαμε την εντολή:

- `gen odsr=log((r1*nor0)/(r0*nor1)),`

όπου $r1$ και $r0$ είναι τα αλληλόμορφα γονίδια των ασθενών και των μαρτύρων αντίστοιχα.

Η εντολή αυτή υλοποιεί τον τύπο του OR που είναι ο εξής:

$$Y_i = \log OR = \log\left(\frac{\alpha\delta}{\beta\gamma}\right), \text{ σύμφωνα με τον πίνακα 3.}$$

Μετά χρησιμοποιήσαμε την εντολή:

- `replace`
`odsr=log(((0.5+r1)*(0.5+nor0))/((0.5+r0)*(0.5+nor1))) if r1==0|nor1==0|r0==0|nor0==0,`

η οποία αντικαθιστά όσα δεδομένα είναι 0 με 0.5.

Στην συνέχεια υπολογίσαμε το standard error, χρησιμοποιώντας την εντολή:

- `gen stdodsr=sqrt(1/r1+1/nor1+1/r0+1/nor0).`

Το standard error δίνεται από τον τύπο:

$$se(\log OR) = \sqrt{\frac{1}{\alpha} + \frac{1}{\beta} + \frac{1}{\gamma} + \frac{1}{\delta}}$$

Μετά, χρησιμοποιήσαμε την εντολή:

- `replace stdodsr =`
`sqrt(1/(r1+0.5)+1/(nor1+0.5)+1/(r0+0.5)+1/(nor0+0.5)) if r1==0|nor1==0|r0==0|nor0==0,`

η οποία αντικαθιστά όσα δεδομένα είναι 0 με 0.5.

Το 95% διάστημα εμπιστοσύνης του OR αντιστοιχεί σε 1.96 standard error περισσότερα ή λιγότερα από το OR και δίνεται από τον τύπο:

$$\log OR \pm 1.96 * se$$

Ένα OR ίσο με 1 δηλώνει ότι το γεγονός ή η κατάσταση που εξετάζεται είναι δυνατό να συμβεί με την ίδια πιθανότητα σε ασθενείς και μάρτυρες. Ένα OR μεγαλύτερο από 1 δηλώνει ότι το γεγονός είναι πιο πιθανό να συμβεί στους ασθενείς

από ότι στους μάρτυρες, ενώ ένα OR μικρότερο της μονάδας δείχνει ότι το γεγονός είναι λιγότερο πιθανό να συμβεί στους ασθενείς από ότι στους μάρτυρες. Οι τιμές που παίρνει το OR πρέπει να είναι μη αρνητικές. Μπορεί η τιμή του OR να είναι μεν θετική, ωστόσο να μην κρίνεται απαραίτητα ως στατιστικά σημαντική και αυτό κρίνεται από το 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Οι τιμές του OR που είναι γύρω στο 1,5 κρίνονται μικρού μεγέθους, ενώ τιμές κοντά στο 2,5 θεωρούνται μέτριες και κοντά στο 4,3 αρκετά μεγάλες [47].

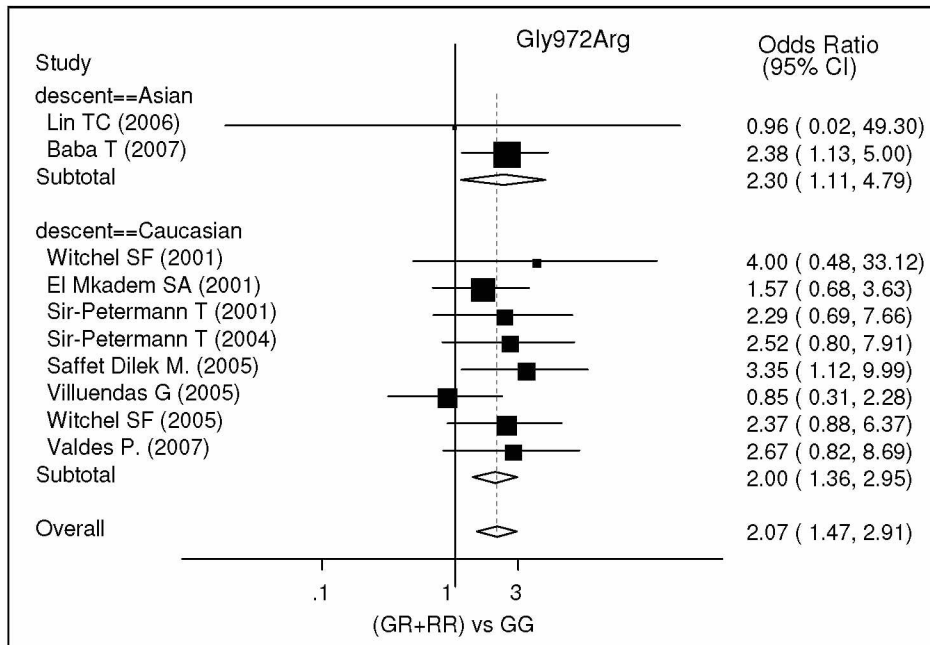
Συμπεραίνουμε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων όταν το διάστημα εμπιστοσύνης δεν περιέχει το 1. Σε αντίθετη περίπτωση, δηλαδή στην περίπτωση που εμπεριέχεται το 1 στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης, τότε δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων που εξετάζονται.

Τέλος, χρησιμοποιήσαμε την εντολή `metan`, η οποία πραγματοποιεί την μετα-ανάλυση και ορίζεται ως εξής:

- `metan odsr stdodsr, eform random by(descent)`
`label(namevar=author,yearvar=year)`
`xlab(0.1,1,3)`

όπου το `odsr` και το `stdodsr` είναι τα OR το standard error του κάθε R αλληλόμορφου ή γονότυπου, αντίστοιχα. Επιπλέον με την πρόσθεση του `eform random` στην εντολή δηλώνουμε ότι θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε μοντέλο τυχαίων επιδράσεων και να πάρουμε αποτελέσματα στη εκθετική μορφή (Odds Ratio αντί του λογαρίθμου του)

Οι παραπάνω εντολές δίνουν ως αποτέλεσμα τα odds ratio, τα οποία κατατάσσονται σύμφωνα με τη φυλετική προέλευση των πληθυσμών (χωριστές αναλύσεις για τους Καυκάσιους και τους Ασιάτες). Επιπλέον υπολογίζονται τα διαστήματα εμπιστοσύνης και οι δείκτες για την ετερογένεια. Παράλληλα με τα στατιστικά αποτελέσματα, εμφανίζονται τα γραφήματα και συγκεκριμένα τα `forest plot`, τα οποία δείχνουν αν συσχετίζονται οι γονότυποι ή τα αλληλόμορφα που εξετάζονται (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Ένα παράδειγμα forest plot. Στα αριστερά παρουσιάζονται τα ονόματα των ερευνητών της κάθε μελέτης, η κάτω κλίμακα απεικονίζει τις τιμές που παίρνει το OR, στα δεξιά παρουσιάζονται τα OR και τα διαστήματα εμπιστοσύνης της κάθε μελέτης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων που εξετάζονται επειδή το τελικό διάστημα εμπιστοσύνης δεν περιέχει το 1.

2.2.4 Έλεγχος ετερογένειας μεταξύ μελετών

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω η εντολή `metan` υπολογίζει και τους δείκτες της ετερογένειας οι οποίοι μας δείχνουν αν υπάρχει ή όχι ετερογένεια.

Έστω ότι έχουμε δύο υποθέσεις:

- H_0 : Τα δείγματα είναι ομοιογενή
- H_1 : Τα δείγματα δεν είναι ομοιογενή

Χρησιμοποιώντας το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, η εντολή `metan` υλοποιεί τον τύπο:

$$\theta(\tau)_{MLE} = \frac{\sum_{i=1}^k W_i(\tau) Y_i}{\sum_{i=1}^k W_i(\tau)},$$

$$\text{όπου } W_i(\tau) = \frac{1}{s_i^2 + \tau^2}$$

Το αποτέλεσμα της εντολής `metan` θα δείξει αν ικανοποιείται ή όχι η μηδενική υπόθεση (H_0). Αν η H_0 απορριφθεί σημαίνει ότι υπάρχει ετερογένεια.

Η παρουσία ετερογένειας μεταξύ-μελετών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το χ^2 βασισμένο στην στατιστική συνάρτηση του Cochran's Q [46]. Το στατιστικό μέτρο Q δίνεται από τον τύπο:

$$Q_w = \sum_i^k W_i (\theta_i - \theta_{MLE})^2 \sim \chi_{k-1}^2$$

που όπως βλέπουμε ακολουθεί την χ^2 -κατανομή με k-1 βαθμούς ελευθερίας, όπου k ο αριθμός των μελετών που επεξεργαζόμαστε. Επομένως η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, αν $Q > \chi_{k-1}^2$.

Ο έλεγχος του χ^2 μπορεί ενδεχομένως να μην είναι τόσο καλός επειδή ένας σημαντικός έλεγχος του χ^2 πρέπει να ληφθεί σε ένα μεγάλο δείγμα και όχι σε ένα μικρό δείγμα, ακόμα κι αν ο βαθμός ετερογένειας σε κάθε περίπτωση είναι ο ίδιος. Είναι καλύτερο, επομένως, να χρησιμοποιηθεί ένας συνδυασμός επίσημων στατιστικών και γραφικών μεθόδων για να αξιολογήσει το βαθμό και τις πηγές ετερογένειας μεταξύ των μελετών [34].

Συνήθως χρησιμοποιούμε και άλλα μέτρα για να ελέγξουμε την ετερογένεια όπως ο δείκτης ασυνέπειας I^2 (Inconsistency index), ο οποίος δίνεται από τον τύπο:

$$I^2 = \max\left(0, \frac{Q - (k-1)}{Q}\right)$$

και παίρνει τιμές από 0 ως 100% και ο δείκτης τ^2 , ο οποίος δίνεται από τον τύπο:

$$\tau_{DL}^2 = \max\left\{0, \frac{Q_w - (k-1)}{\sum W_i - \frac{\sum W_i^2}{\sum W_i}}\right\}$$

Ο συγκεκριμένος τύπος του τ^2 ορίστηκε αρχικά από τους DerSimonian and Laird [48].

Οι υψηλές τιμές των δεικτών της ετερογένειας δείχνουν την ύπαρξη της ετερογένειας [49], ενώ όταν είναι ίσοι με μηδέν συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

2.2.5 Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης

Για να ελέγξουμε αν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης χρησιμοποιήσαμε τον έλεγχο του Begg και του Egger μέσω της εντολής `metabias`, η οποία ορίζεται ως εξής:

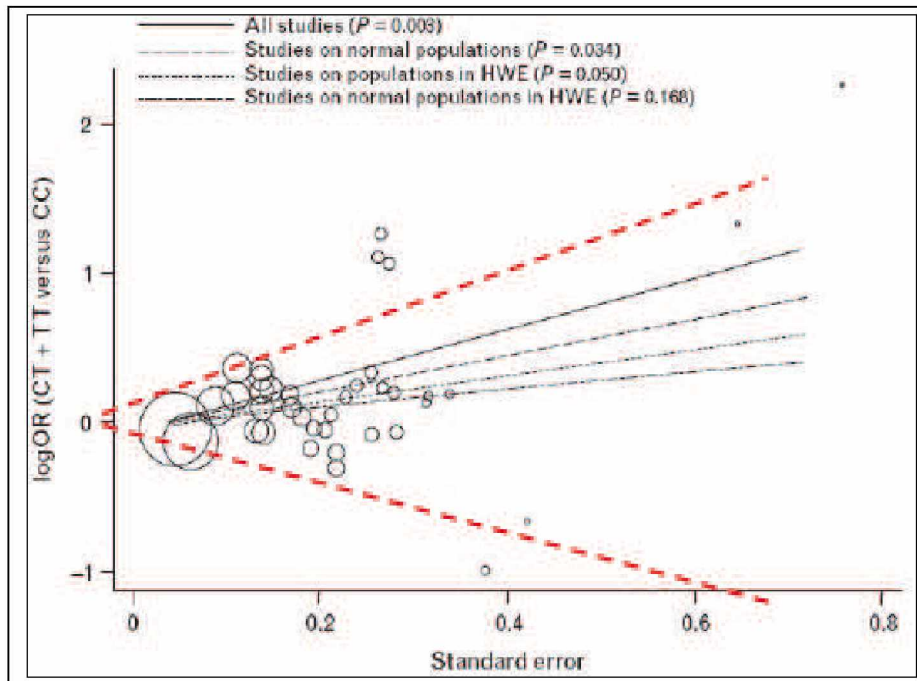
- `metabias odsr stdodsr, gr(b)`

Εδώ ζητάμε να εμφανιστεί το γράφημα του Begg.

- `metabias odsr stdodsr, gr(e)`

Εδώ ζητάμε να εμφανιστεί το γράφημα του Egger.

Εκτός από τα στατιστικά αποτελέσματα η εντολή `metabias` δίνει και τα σχετικά γραφήματα και συγκεκριμένα το funnel plot. Το funnel plot είναι μια γραφική δοκιμή που αξιολογεί το συστηματικό σφάλμα δημοσιεύσεων στα μετα-αναλυτικά σύνολα δεδομένων [50]. Στο διάγραμμα αυτό παριστάνεται η κατανομή του μεγέθους επίδρασης των μελετών, όπως π.χ. το OR ή ο λογάριθμός του, συναρτήσει κάποιου μέτρου μεταβλητότητας όπως η τυπική απόκλιση. Το γράφημα ονομάζεται έτσι καθώς το διάγραμμα που θα προκύψει αν δεν υφίσταται σφάλμα δημοσίευσης θα πρέπει να είναι σε σχήμα χωνιού (funnel) (Εικόνα 6). Γενικά με το γράφημα αυτό αναμένονται οι μικρού και μεγάλου μεγέθους μελέτες (και άρα λιγότερο ή περισσότερο ακριβείς αντίστοιχα) να κατανέμονται συμμετρικά γύρω από τον συνοπτικό εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης. Οι εκτιμητές του μεγέθους επίδρασης από τις μεγάλες, πιο ακριβείς μελέτες, θα βρίσκονται κοντά στον συνοπτικό εκτιμητή, ενώ οι εκτιμητές του μεγέθους επίδρασης από μικρές και λιγότερο ακριβείς μελέτες θα είναι πιο απομακρυσμένες. Αν δεν περικλύονται στην μετά-ανάλυση μελέτες με μικρό μέγεθος επίδρασης το κάτω αριστερό μέρος του γραφήματος θα είναι συνήθως κενό, δημιουργώντας έτσι ένα βαθμό ασυμμετρίας στο σχήμα. Έτσι συμπεραίνουμε πως η απουσία συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης παράγει συμμετρικά funnel plots, ενώ η παρουσία της ασύμμετρα. Ένα παράδειγμα funnel plot φαίνεται παρακάτω [51] στον Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Παράδειγμα ενός funnel plot. Βλέπουμε εδώ ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης, καθώς το διάγραμμα που προκύπτει είναι σε σχήμα χωνιού, δηλαδή οι μελέτες κατανέμονται συμμετρικά γύρω από τον συνοπτικό εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης.

2.2.6 Έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE)

Αφού λοιπόν έχει γίνει ο έλεγχος της ετερογένειας και του συστηματικού σφάλματος δημοσιεύσεων μένει ένας ακόμη έλεγχος να γίνει, που αφορά την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).

Ένας κλειστός πληθυσμός λέμε ότι βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg αν οι οι συχνότητες των αλληλομόρφων ($p=P_A$, $q=P_a$) αρκούν για να περιγράψουν τις συχνότητες των γονοτύπων ($F_{AA}=P_A^2$, $F_{Aa}= 2 P_A P_a$ και $F_{aa}= P_{aa}^2$) [39]. Στις μελέτες γενετικής συσχέτισης προτείνεται να ελέγχουμε την ισορροπία στους πληθυσμούς των μαρτύρων (αν υπάρχει συσχέτιση, η ασθένεια είναι παράγοντας επιλογής, άρα στους ασθενείς αναμένουμε να μην ισχύει). Αποκλίσεις από την ισορροπία μπορεί να είναι απλά ενδείξεις λαθών στην αλληλουχία ή μπορεί να σημαίνουν κάτι παραπάνω.

Για να διαπιστώσουμε αν οι μάρτυρες των πληθυσμών είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg χρησιμοποιήσαμε την εντολή `genhwi`, η οποία ορίζεται ως εξής:

- `genhwi 362 17 1`

Η εντολή αυτή είναι *immediate*, δηλαδή άμεση. Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα που παίρνει είναι συγκεκριμένοι αριθμοί και όχι μεταβλητές.

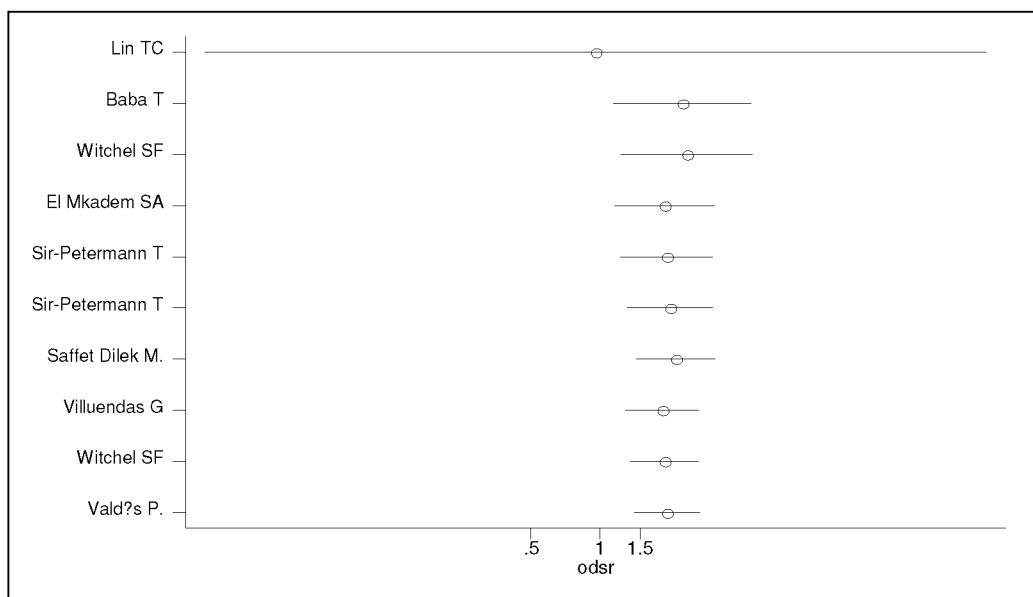
2.2.7 Διεξαγωγή αθροιστικής ανάλυσης

Τέλος χρησιμοποιήθηκε και η εντολή *metacum*, η οποία ορίζεται ως εξής:

- `metacum odsr stdodsr, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5)
id(author) eform,`

για να προσδιορίσουμε την επιρροή της πρώτης δημοσιευμένης μελέτης πάνω στις επόμενες δημοσιεύσεις [44], καθώς και την εξέλιξη των συνδυασμένων εκτιμήσεων κατά τη διάρκεια του χρόνου. Μέσω αυτής της εντολής μπορέσαμε να παρατηρήσουμε πόσο έχουν αλλάξει τα αποτελέσματα ερευνών κατά την διάρκεια του χρόνου.

Σε συνδυασμό με τα στατιστικά αποτελέσματα η εντολή αυτή δίνει και τα αντίστοιχα γραφήματα (Εικόνα 7), τα οποία μας διευκολύνουν στην εύρεση αποκλίσεων μεταξύ των μελετών.



Εικόνα 7: Παράδειγμα μιας αθροιστικής ανάλυσης. Αριστερά παρουσιάζονται οι συγγραφείς των μελετών και δεξιά τα OR της κάθε μελέτης και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης.

Για όλες τις αναλύσεις που διεξάχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Stata 9 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Εκεί αποθηκεύσαμε αρχικά τα δεδομένα του excel και έπειτα βάλαμε τις παραπάνω

εντολές για να υπολογίσουμε τα ORs της κάθε μελέτης, τα standard error και τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Τέλος αποθηκευσαμε και τα αποτελέσματα που είχαμε από τον έλεγχο για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE). Σε όλες τις αναλύσεις τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα που δηλώθηκαν είχαν $P_{value} < 0.05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αρχική αναζήτηση στην βιβλιογραφία είχε αποτέλεσμα 31 δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρονταν στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και στους πολυμορφισμούς του υποδοχέα ινσουλίνης και των υποστρωμάτων του. Αναγκαστήκαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο τις 16 για την μετα-ανάλυση. Οι υπόλοιπες μελέτες απορρίφθηκαν για τους εξής λόγους:

α) Οι 7 από τις μελέτες δεν ήταν μελέτες ασθενών-μαρτύρων [6,9,10,52-54],

β) Οι υπόλοιπες μελέτες αφορούσαν πολυμορφισμούς, που δεν συμπλήρωναν αριθμό μελετών παραπάνω από 4.

Οι πολυμορφισμοί στους οποίους καταλήξαμε είναι 34, από τους οποίους οι 8 είχαν τουλάχιστον 2 μελέτες που τους ανέφεραν (Πίνακας 3) και οι υπόλοιποι 26 είχαν λιγότερες από 2.

Πίνακας 3: Αριστερά παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί και δεξιά ο αριθμός των μελετών που τους αναφέρουν. Αναφέρονται μόνο οι πολυμορφισμοί που έχουν αριθμό μελετών ≥ 2 .

Πολυμορφισμοί	# Μελετών
Gly972Arg of IRS-1	10
His1058 of IR (C/T at exon 17)	6
Gly1057Asp of IRS-2	2
Cys1008 of IR (Cys /Arg at exon 17)	2
Tyr984 of IR (C/T at exon 17)	2
Ala513Pro of IRS-1	2
Ala523 of IR (G/A at exon 8)	2
Asp519 of IR (C/T at exon 8)	2

Οι πολυμορφισμοί στους οποίους έγινε μετα-ανάλυση είναι οι ακόλουθοι:

- Ο σιωπηλός πολυμορφισμός μεμονωμένου νουκλεοτιδίου His1058 C/T, που βρέθηκε στο εξόνιο 17 του υποδοχέα ινσουλίνης. Βρέθηκαν 6

μελέτες [7,14,15,30,55,56] που αναφέρουν αν ο πολυμορφισμός αυτός συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

- Ο πολυμορφισμός Gly972Arg του υποστρώματος IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης. Βρέθηκαν 12 μελέτες που αναφέρονται στο αν συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Αναγκαστήκαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο τις 10 [16,57-65], καθώς οι υπόλοιπες 2 δεν περιείχαν ομάδες μαρτύρων (control) [6,66].

Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί που βρήκαμε δεν χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση, διότι δεν είχαν πάνω από 4 μελέτες να τους αναφέρουν.

Τα λεπτομερή χαρακτηριστικά της κάθε μελέτης (η χώρα που διεξάχθηκε η μελέτη, η φυλετική προέλευση των πληθυσμών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, χαρακτηριστικά των ασθενών (cases) και των μαρτύρων (controls), μέγεθος των δειγμάτων, πολυμορφισμός που μελετάται και ούτω καθ'εξής) συνοψίζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τα χαρακτηριστικά των μελετών που περιλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση

Author	Year	Country	Racial descent	Control characteristics	Cases characteristics	Controls	Cases	Polymorphisms
Lin TC	2006	Taiwan	Asian	Healthy Hoklo and Hakka women	Taiwanese Hoklo and Hakka women with PCOS and higher body weight and body mass index than the normal population.	45	47	(972)G/R IRS-1
Dilek S	2005	Turkey	Caucasian	Randomly selected health women from an age-matched patient cohort. All of the control women had a Ferriman-Gallwey score under 8.	Randomly selected patients with PCOS. This cohort consisted of women attending their outpatient clinics for reasons other than endocrinopathies including infertility, infectious diseases, general control, dysmenorrhea and abdominal pelvic pain and abnormal Papanicolaou smears.	60	60	(972)G/R IRS-1
Sir-Petermann T	2004	Chile	Caucasian	Healthy women with normal cycles with the antecedent of a normal term pregnancy without receiving oral contraceptives or any drug therapy for at least 6 mo before starting the study	Unrelated women with PCOS who had chronic anovulation, presented hyperandrogenism without other specific causes of adrenal or pituitary disease, and met the diagnostic criteria for PCOS according to the National Institutes of Health	97	143	(972)G/R IRS-1

Συνέχεια πίνακα 4

Baba T	2007	Japan	Asian	Healthy Japanese controls	Non-diabetic Japanese PCOS patients who had fulfilled 2 of the 3 Rotterdam 2003 criteria which are as follows: (i) oligo- and/or anovulation; (ii) clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism; and (iii) polycystic ovarian morphology.. All patients had a history of menstrual irregularity and/or infertility, and polycystic ovarian morphology.	380	123	(972)G/R IRS-1
Villuendas G	2005	Spain	Caucasian	Healthy female volunteers and consecutive patients attending the clinical practice of one of the authors (H.F.E.-M.) for dietary treatment of obesity. None of the controls had signs or symptoms of hyperandrogenism, menstrual dysfunction or history of infertility.	Consecutive PCOS patients. PCOS was defined by oligo-ovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism and exclusion of hyperprolactinaemia, non-classic congenital adrenal hyperplasia and androgen-secreting tumours	48	103	(972)G/R IRS-1
Sir-Petermann T	2001	Chile	Caucasian	Normal women	PCOS patients	70	82	(972)G/R IRS-1

Συνέχεια πίνακα 4

Valdés P	2007	Chile	Caucasian	<p>Healthy women with normal menstrual cycles (< 32 days) without hirsutism, acne, or male-type alopecia, and not taking hormonal medications. were recruited from the Obstetrics and Gynaecology Service of the Hernán Henríquez Hospital</p> <p>The control population was recruited based on: the absence of medication for at least 3 months before DNA sampling, no personal history of diabetes (fasting blood glucose, no cardiovascular complications and no family history of hypertension or type 1 or type 2 diabetes.</p>	<p>Southern Chilean patients with PCOS, who were recruited from the Obstetrics and Gynaecology Service of the Hernán Henríquez Hospital</p> <p>Case subjects were consecutively included for the genetic study, based on the absence of medication before DNA sampling. They were recruited into 2 groups according to the type of the insulin</p>	75	50	(972)G/R IRS-1
El Mkaem SA	2001	France	Caucasian	<p>Healthy, nonhirsute women with regular menstrual cycles and not taking hormonal medications were recruited as controls.</p>	<p>Patients seeking treatment for PCOS were recruited from the reproductive endocrinology clinic at the University of Alabama at Birmingham (UAB)</p>	95	109	(972)G/R IRS-1

Συνέχεια πίνακα 4

Witchel SF	2001	Pennsylvania	Caucasian	Forty children with premature pubarche (PP) and 29 adolescent girls with hyperandrogenism (HA) were referred to the Children's Hospital of Pittsburgh by their primary carephysicians The adolescent girls had been referred for evaluation of oligomenorrhea/amenorrhea and/or hirsutism (HA). All were documented to have elevated androstenedione and/or testosterone concentrations.	The control subjects consisted of healthy white adult women	15	63	(972)G/R IRS-1
Siegel S	2002	USA	Caucasian	Healthy white women age-matched	Women with PCOS,who had a history of oligomenorrhea and evidence of hyperandrogenism and also had polycystic ovaries on ultrasonography	136	99	(1058) C/T IR
Conway GS	1994	UK	Caucasian	Control volunteers were not hyperinsulinaemic and had normal ovaries on ultrasound.	Patients with PCOS were selected for the presence of fasting hyperinsulinaemia	8	22	(1058) C/T IR

Συνέχεια πίνακα 4

Lee EJ	2006	Korea	Asian	Healthy Korean women selected as blood donors	Patients with PCOS who have completed the revised diagnostic criteria announced in the 2003 ASRM/ESHRE Rotterdam consensus	93	174	(1058) C/T IR
Chen ZJ	2004	China	Asian	Normal females	PCOS patients	40	120	(1058) C/T IR
Talbot JA	1996	UK	Caucasian	Normal subjects	PCOS subjects were selected on the basis of at least two of the following: insulin sensitivity, fasting insulin and area under the curve following oral glucose tolerance test	5	24	(1058) C/T IR
Lee EJ	2007	Korea	Asian	Healthy Korean women	PCOS patients	100	134	(1058) C/T IR

3.1 Ο πολυμορφισμός Gly972Arg του υποστρώματος IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης

Είναι ο πιο συχνός πολυμορφισμός που έχει παρατηρηθεί στον διαβήτη τύπου 2 και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η Γλυκίνη (Gly) αντικαθιστάται από Αργινίνη (Arg) στη θέση 972. Ο πολυμορφισμός αυτός είναι πιο συχνός σε άτομα που έχουν ως χαρακτηριστικό την αντίσταση στην ινσουλίνη. Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα ότι ο πολυμορφισμός Gly972Arg μπορεί να συντελεί στην αντίσταση στη ινσουλίνη, στα άτομα με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Επίσης τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του πολυμορφισμού όπως η υπερανδρογοναιμία, είναι ίδια με αυτά του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών.

Όπως είπαμε και προηγουμένως, βρήκαμε 12 άρθρα που αναφέρονται στον πολυμορφισμό Gly972Arg του υποστρώματος IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης, αλλά χρησιμοποιήσαμε τα 10 από αυτά στην μετα-ανάλυση. Οι μελέτες που αναφέρονται στον πολυμορφισμό Gly972Arg, περιέχουν συνολικά 833 περιπτώσεις ασθενών και 987 περιπτώσεις μαρτύρων (Πίνακας 6).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Gly972Arg με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ανεξάρτητα από την φυλετική προέλευση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα μπορούμε να επισημάνουμε ότι τρία από τα OR εμφανίζουν συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια των πολυκυστικών ωοθηκών (GR εναντίον GG+RR, GR+RR εναντίον GG, R αλληλόμορφο εναντίον G αλληλόμορφο - Πίνακας 7). Το OR του RR γονότυπου εναντίον του αθροίσματος των GR+GG γονότυπων (0.93), έδειξε ότι δεν υπήρχε συσχέτιση του γονότυπου αυτού με την ασθένεια (Εικόνα 8.3). Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός, ότι σε όλες σχεδόν τις μελέτες βρέθηκε μηδενική ποσότητα Αργινίνης (άτομα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο).

Επιπλέον, βρήκαμε ότι σε όλες τις μελέτες οι ομάδες μαρτύρων ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), όπως έδειξε ο έλεγχος του χ^2 (βλ. παράρτημα). Στον πίνακα 5 φαίνεται ένα παραδειγμα ενός τέτοιου ελέγχου.

Πίνακας 5: Το αποτέλεσμα ενός ελέγχου για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), σε μία μελέτη.

Genotype	Observed	Expected
AA	362	361.24
Aa	17	18.53
aa	1	0.24
total	380	380.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	741	0.9750	0.0059
a	19	0.0250	0.0059
total	760	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0020

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) =	2.575	Pr= 0.1086
likelihood-ratio chi2 (1) =	1.481	Pr= 0.2236
Exact significance prob =		0.2060

Όταν το εκτιμώμενο disequilibrium coefficient είναι μικρό με P-value>0.05, τότε συμπεραίνουμε ότι τα άτομα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE).

Πίνακας 6: Οι συχνότητες των γονοτύπων των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση του πολυμορφισμού Gly972Arg με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

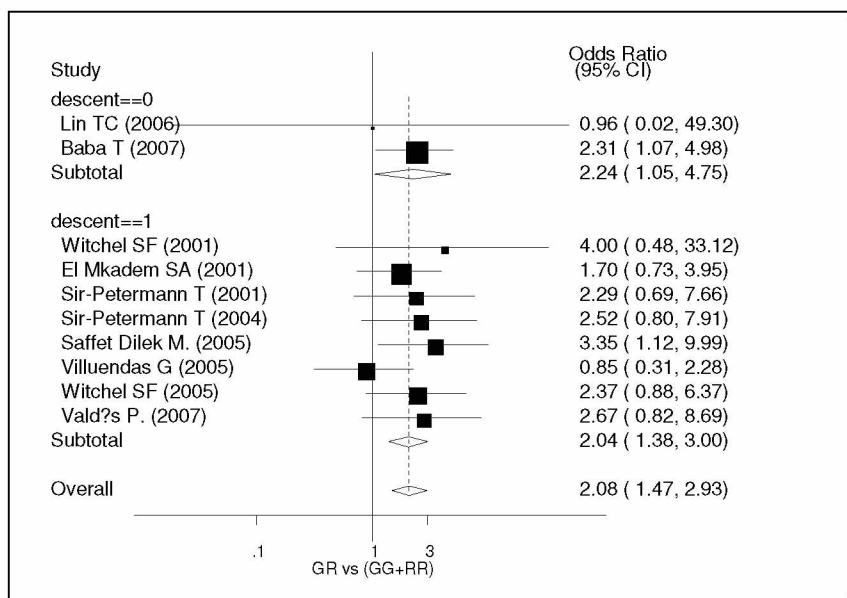
Author	Year	Country	Racial descent	GG Genotype		GR Genotype		RR Genotype		Rallele frequency%	
				Control	Cases	Control	Cases	Control	Cases	Control	Cases
Lin TC	2006	Taiwan	Asian	45	47	0	0	0	0	0	0
Dilek S	2005	Turkey	Caucasian	55	46	5	14	0	0	4.2	11.7
Sir-Petermann T	2004	Chile	Caucasian	93	129	4	14	0	0	2.1	4.9
Baba T	2007	Japan	Asian	362	110	17	12	1	1	2.5	5.7
Villuendas G Sir-Petermann	2005	Spain	Caucasian	41	90	7	13	0	0	7.3	6.3
T	2001	Chile	Caucasian	66	72	4	10	0	0	2.9	6.1
El MkaDEM SA	2001	France	Caucasian	86	41	15	12	1	0	6.9	14.2
Valdés P	2007	Chile	Caucasian	70	42	5	8	0	0	5.3	5.0
Witchel SF	2004	Pennsylvania	Caucasian	89	94	6	15	0	0	7.9	2.8
Witchel SF	2001	Pennsylvania	Caucasian	14	49	1	14	0	0	46.7	0.8
Total				921	720	64	112	2	1	80.5	52.5

Στην συνέχεια, βρήκαμε ότι δεν υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών διότι σύμφωνα με τον έλεγχο του Cochran's Q, το P-value>0.10. Ακόμα οι δείκτες της ετερογένειας, δηλαδή το Inconsistency Index (I^2) και το τ^2 βρέθηκαν ίσα με το μηδέν ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών φυλών στους πληθυσμούς (Πίνακας 7).

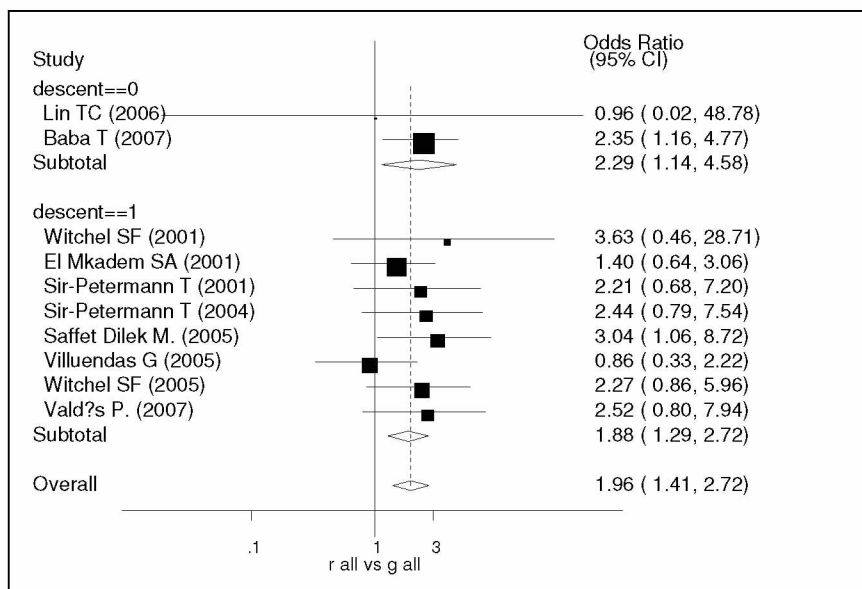
Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού Gly972Arg με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Contrast	Race	Number of studies	Odds Ratio (Random effects)	95% Confidence Interval	Between studies variance (τ^2)	p-value for heterogeneity	Cochran's Q	Inconsistency Index (I^2)
Rallele versus Gallele	All	10	1.96	1.412 2.722	0.0000	0.793	5.45	0.0%
	Caucasians	8	1.88	1.292 2.722	0.0000	0.658	5.01	0.0%
	Asians	2	2.29	1.142 4.584	0.0000	0.659	0.19	0.0%
GR genotype versus other (GG+RR) genotypes	All	10	2.08	1.473 2.933	0.0000	0.828	5.08	0.0%
	Caucasians	8	2.04	1.384 3.003	0.0000	0.679	4.85	0.0%
	Asians	2	2.24	1.051 4.754	0.0000	0.668	0.18	0.0%
RR genotype versus other (GG+GR) genotypes	All	10	0.93	0.290 2.955	0.0000	0.998	1.42	0.0%
	Caucasians	8	0.69	0.179 2.673	0.0000	0.999	0.51	0.0%
	Asians	2	2.10	0.217 20.369	0.0000	0.633	0.23	0.0%
Other (RR+GR) genotypes versus GG genotype	All	10	2.07	2.07 2.907	0.0000	0.804	5.33	0.0%
	Caucasians	8	2	1.362 1.231	0.0000	0.656	5.03	0.0%
	Asians	2	2.3	1.108 4.788	0.0000	0.657	0.20	0.0%

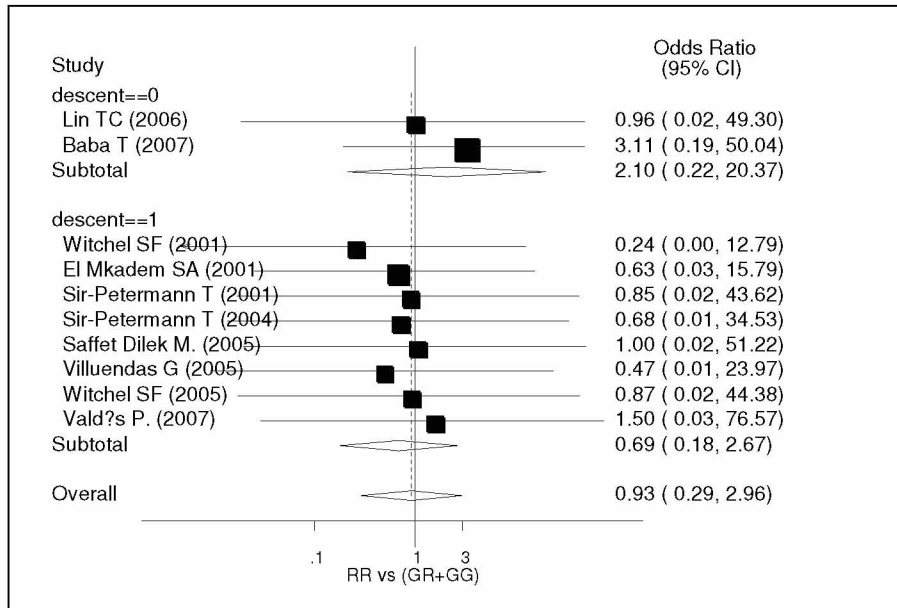
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού Gly972Arg με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών σε forest plot. Οι μελέτες των Ασιατών και των Καυκάσιων έχουν γίνει ξεχωριστά και σε συνδυασμό. Επίσης φαίνεται η τιμή του OR, η οποία όταν είναι μεγαλύτερη του 1 συμπεραίνουμε ότι υπάρχει συσχέτιση.



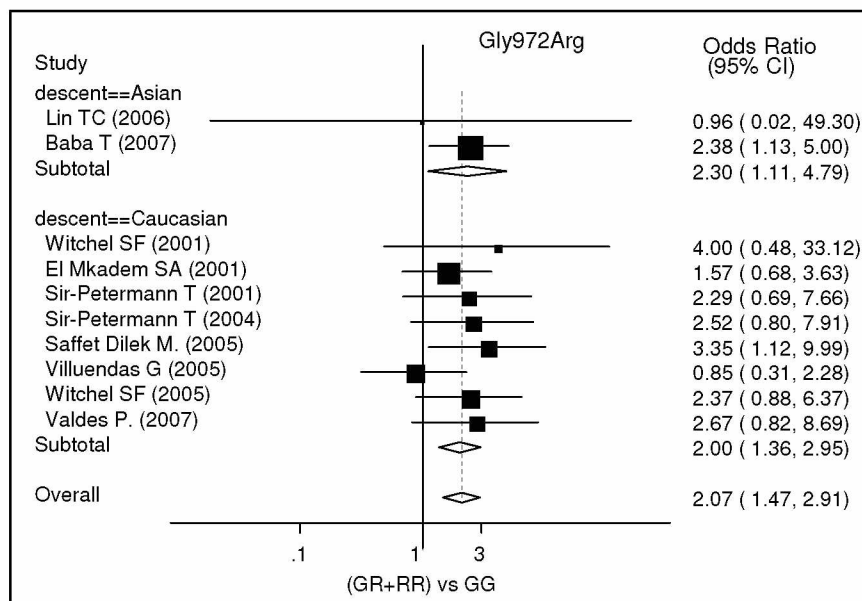
Εικόνα 8.1: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου GR προς το άθροισμα των γονοτύπων (GG+RR), το οποίο δείχνει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 8.2: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του υπολειπόμενου αλληλόμορφου R προς το αλληλόμορφο G, το οποίο δείχνει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 8.3: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου RR προς το άθροισμα των γονοτύπων (GG+GR), το οποίο δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 8.4: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου GG προς το άθροισμα των γονοτύπων (GR+RR), το οποίο δείχνει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους.

Ακόμα, διενεργήσαμε τον έλεγχο του Begg και του Egger στο Stata και βρήκαμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Όταν τα P-values στο

Egger's test και στο Begg's Test είναι >0.05 , τότε η μηδενική υπόθεση (H_0) δεν απορρίπτεται και δεν υπάρχει δηλαδή συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα ενός ελέγχου για το συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (βλ. παράρτημα) και τα αντίστοιχα γραφήματα (Εικόνα 9-10).

Πίνακας 8: Έλεγχος του Begg και του Egger για το συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα P-values είναι >0.05 .

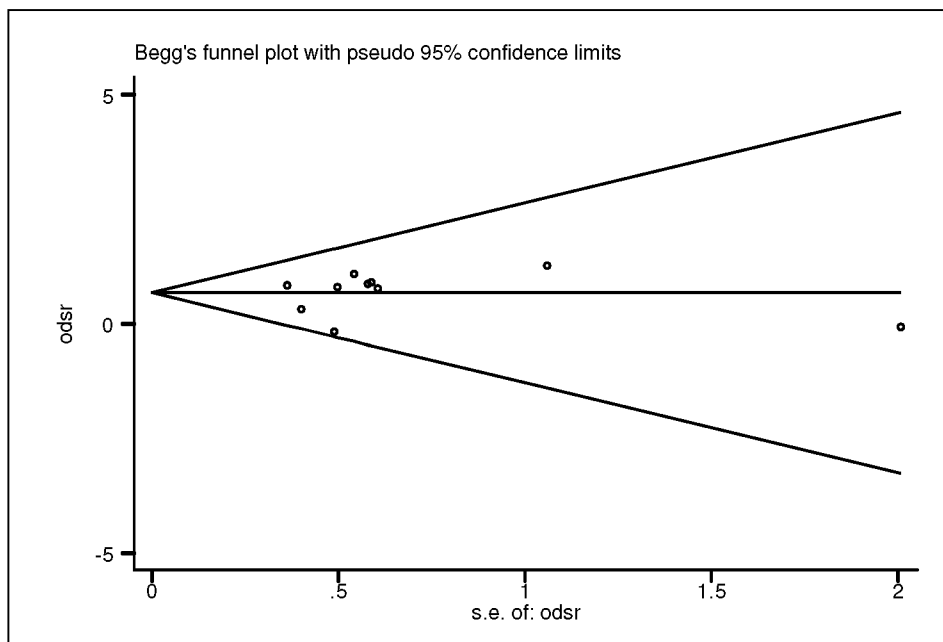
Begg's Test

```

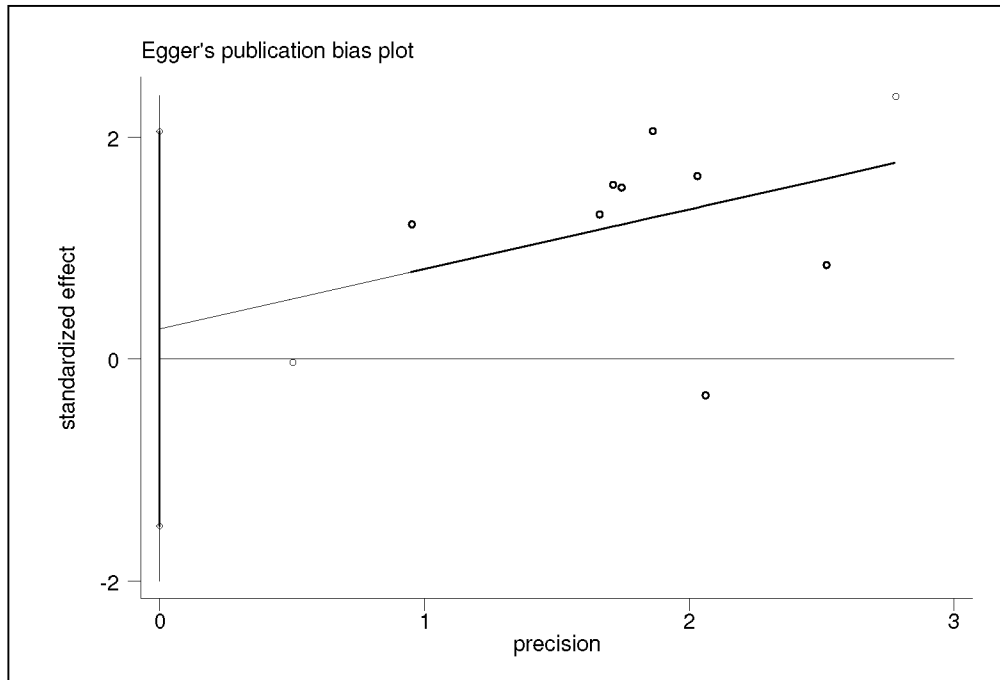
adj. Kendall's Score (P-Q) =    -5
  Std. Dev. of Score =    11.18
  Number of Studies =      10
           z =    -0.45
  Pr > |z| =    0.655
           z =    0.36 (continuity corrected)
  Pr > |z| =    0.721 (continuity corrected)
  
```

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	3.514458	1.50969	2.33	0.048	.0331064	6.995809
bias	-1.933136	.8060748	-2.40	0.043	-3.791948	-.0743243



Εικόνα 9: Το γράφημα του Begg για το OR του υπολειπόμενου αλληλόμορφου R, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες κατανέμονται συμμετρικά γύρω από τον συνολικό OR.

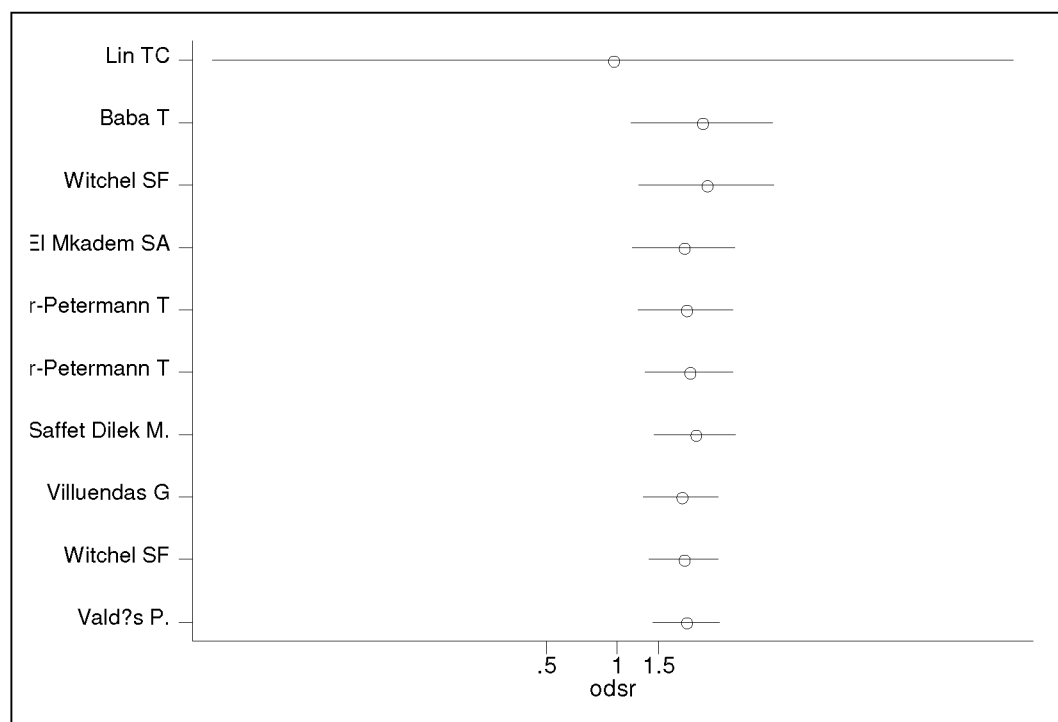


Εικόνα 10: Το γράφημα του Egger για το OR του υπολειπόμενου αλληλόμορφου R, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες κατανέμονται από το 0 και πάνω.

Τέλος κάναμε έλεγχο για την αθροιστική ανάλυση για να διαπιστώσουμε κατά πόσο έχουν αλλάξει τα αποτελέσματα των μελετών από τότε που έγινε η πρώτη δημοσίευση σχετικά με τον πολυμορφισμό Gly972Arg και τον συσχετισμό του με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και βρήκαμε ότι δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ των μελετών, καθώς και ότι δεν υπάρχει μελέτη που αν εξαχθεί θα επηρεάσει σημαντικά το αποτέλεσμα. Ένα παράδειγμα τέτοιου ελέγχου φαίνεται στον πίνακα 9 (βλ.παράρτημα). Παράλληλα με τα στατιστικά αποτελέσματα εμφανίζονται και τα γραφήματα τα οποία δίνουν μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για τα αποτελέσματα των μελετών.

Πίνακας 9: Έλεγχος για την αθροιστική ανάλυση. Στα αριστερά παρουσιάζονται οι εκτιμητές του μέγεθους επίδρασης και το διάστημα εμπιστοσύνης του καθενός. Παρατηρούμε πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών.

Cumulative estimate	95% CI		z	P value
	Lower	Upper		
0.958	0.019	48.777	-0.022	0.983
2.288	1.142	4.584	2.335	0.020
2.397	1.241	4.632	2.602	0.009
1.919	1.160	3.173	2.538	0.011
1.960	1.234	3.114	2.850	0.004
2.024	1.319	3.105	3.227	0.001
2.144	1.442	3.187	3.767	0.000
1.872	1.298	2.700	3.355	0.001
1.917	1.361	2.700	3.724	0.000
1.961	1.412	2.722	4.020	0.000



Εικόνα 10: Παραπάνω παρουσιάζονται τα OR του υπολειπόμενου αλληλόμορφου R για κάθε μελέτη. Με εξαίρεση την πρώτη μελέτη, τα αποτελέσματα των υπόλοιπων μελετών δεν εμφανίζουν σημαντικές αποκλίσεις

3.2 Ο πολυμορφισμός His1058 C/T στο εξόνιο 17

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης περιέχει 22 εξόνια. Ο πολυμορφισμός His1058 C/T έχει βρεθεί στην περιοχή της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα ινσουλίνης, στο εξόνιο 17 του γονιδίου. Το εξόνιο 17 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19p13.3, ένα γονίδιο που θεωρείται υπεύθυνο για το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Η περιοχή με τα εξόνια 17-21 κωδικοποιεί την κινάση της τυροσίνης του υποδοχέα ινσουλίνης, περιοχή που παίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του γονιδίου, όπως είναι η μεταφορά της γλυκόζης. Μεταλλαγές σε αυτά τα εξόνια έχουν προκαλέσει την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και την υπερινσουλιναίμια. Ο πολυμορφισμός His1058 C/T φαίνεται ότι συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών από τις επιδράσεις του στην λειτουργία της αυτοφωσφορυλίωσης της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα ινσουλίνης σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Έχουν βρεθεί 6 μελέτες που αναφέρονται στον συσχετισμό του με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Χαρακτηρίζεται σιωπηλός, καθώς δεν οδηγεί σε αντικατάσταση του αμινοξέος, αλλά σε αντικατάσταση του C αλληλόμορφου από το μεταλλαγμένο T αλληλόμορφο.

Τα άρθρα που το αναφέρουν, περιλαμβάνουν 573 περιπτώσεις ασθενών και 382 περιπτώσεις μαρτύρων (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Οι συχνότητες των γονοτύπων των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση του πολυμορφισμού His1058 C/T με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών . Όπου υπάρχουν κενό, σημαίνει ότι ο αριθμός των γονιδίων είναι άγνωστος.

Author	Year	Country	Racial descent	CC Genotype		CT Genotype		TT Genotype		Tallele frequency%	
				Control	Cases	Control	Cases	Control	Cases	Control	Cases
Siegel S	2002	USA	Caucasian	93	62					0	0
Conway GS	1994	UK	Caucasian	4	11	4	11	0	0	25	25
Lee EJ	2006	Korea	Asian	31	69	49	80	13	25	40,3	37,4
Chen ZJ	2004	China	Asian	35	71					0	0
Talbot J	1996	UK	Caucasian	0	13	0	1	0	10	0	25
Lee EJ	2007	Korea	Asian	46	63	40	59	14	10	34	29,5
Total				209	289	93	151	27	45	99,3	116,9

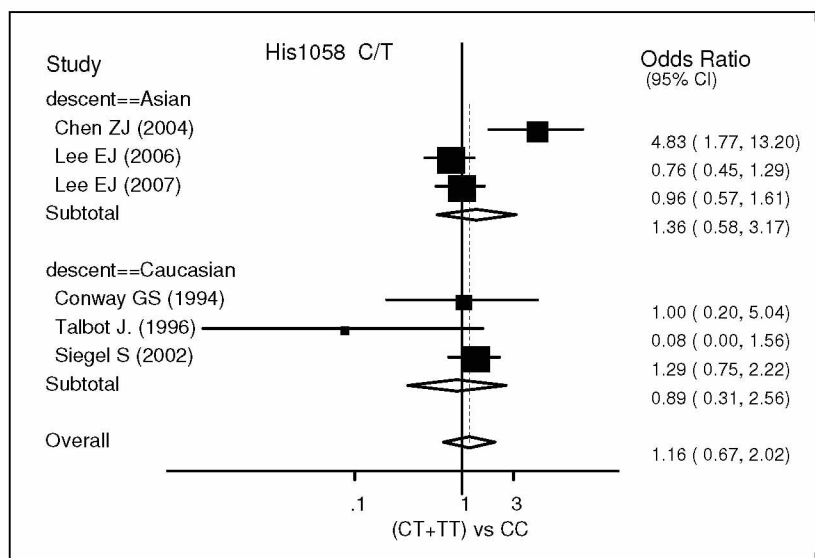
Ο πολυμορφισμός His1058 C/T στο εξόνιο 17 του υποδοχέα ινσουλίνης βρέθηκε ότι δεν συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ανεξάρτητα από την φυλετική προέλευση των δειγμάτων. Αν και σε μερικές μελέτες αντιμετωπίσαμε πρόβλημα, καθώς δεν είχαμε όλους τους γονότυπους, εντούτοις ολοκληρώνοντας την μετα-ανάλυση, υπολογίσαμε τα OR (odds ratio) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους (Πίνακας 11), τα οποία μας βοήθησαν να καταλήξουμε στο προηγούμενο συμπέρασμα, ότι δεν υπάρχει δηλαδή συσχέτιση. Όλα τα OR των γονοτύπων και των αλληλόμορφων έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Εικόνα 11.1-11.4). Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των δεδομένων που υπάρχουν μέχρι τώρα προκαλεί την επακόλουθη μελέτη, ώστε να καταλήξουμε σε ένα συνολικό αποτέλεσμα.

Βρήκαμε επίσης ότι υπάρχει δεν υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών καθώς ο έλεγχος έδειξε ότι το P-value>0.10 και το Inconsistency Index (I^2) και το τ^2 να είναι ίσα με το μηδέν. Αυτό ίσχυσε για όλες τις φυλές στους πληθυσμούς των δειγμάτων (Πίνακας 11).

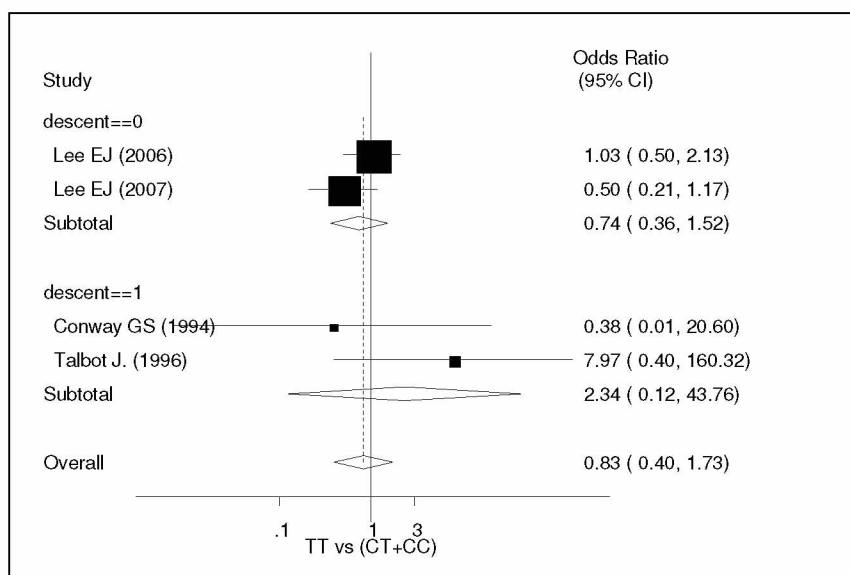
Πίνακας 11: Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού His1058 C/T με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Contrast	Race	Number of studies	Odds Ratio (Random effects)	95% Confidence Interval	Between studies variance (I^2)	p-value for heterogeneity	Cochran's Q	Inconsistency Index (I^2)	
Tallele versus Callele	All	4	0.86	0.664	1.120	0.0000	0.991	0.10	0.0%
	Caucasians	2	0.98	0.279	3.417	0.0000	0.908	0.01	0.0%
	Asians	2	0.86	0.656	1.120	0.0000	0.819	0.05	0.0%
CT genotype versus other (CC+TT) genotypes	All	4	0.94	0.661	1.339	0.0000	0.705	1.40	0.0%
	Caucasians	2	0.94	0.218	4.008	0.0000	0.852	0.04	0.0%
	Asians	2	0.94	0.616	1.444	0.0252	0.243	1.37	26.8%
TT genotype versus other (CC+CT) genotypes	All	4	0.83	0.395	1.730	0.1503	0.255	4.06	26.2%
	Caucasians	2	2.34	0.125	43.757	1.3928	0.232	1.43	30.0%
	Asians	2	0.74	0.363	1.519	0.1061	0.199	1.65	39.3%
Other (TT+CT) genotypes versus CC genotype	All	6	1.16	0.666	2.021	0.2565	0.017	13.81	63.8%
	Caucasians	3	0.89	0.312	2.564	0.3857	0.191	3.31	39.5%
	Asians	3	1.36	0.580	3.173	0.4412	0.006	10.40	80.8%

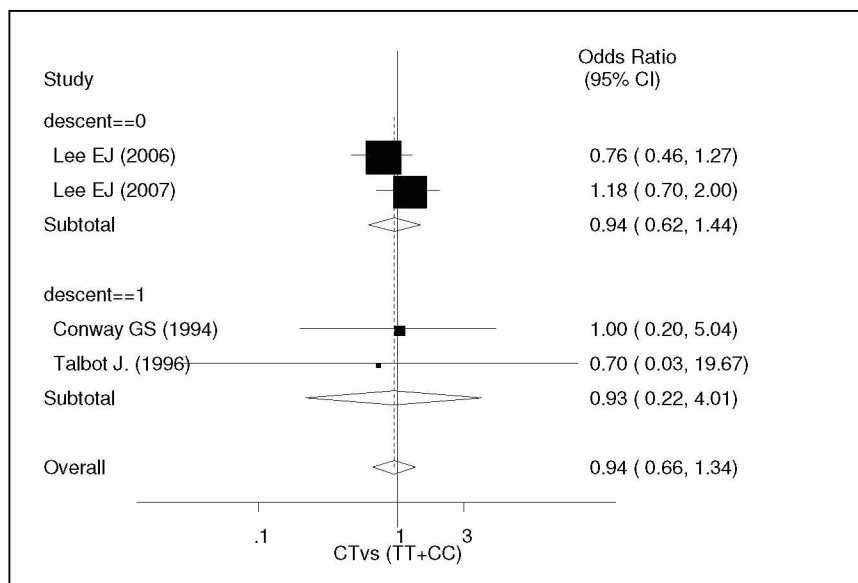
Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού His1058 C/T με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών σε forest plots. Οι μελέτες στους Ασιάτες και στους Καυκάσιους έχουν γίνει ξεχωριστά και σε συνδυασμό. Επίσης φαίνεται η τιμή του OR, η οποία όταν είναι >1 σημαίνει ότι υπάρχει συσχέτιση.



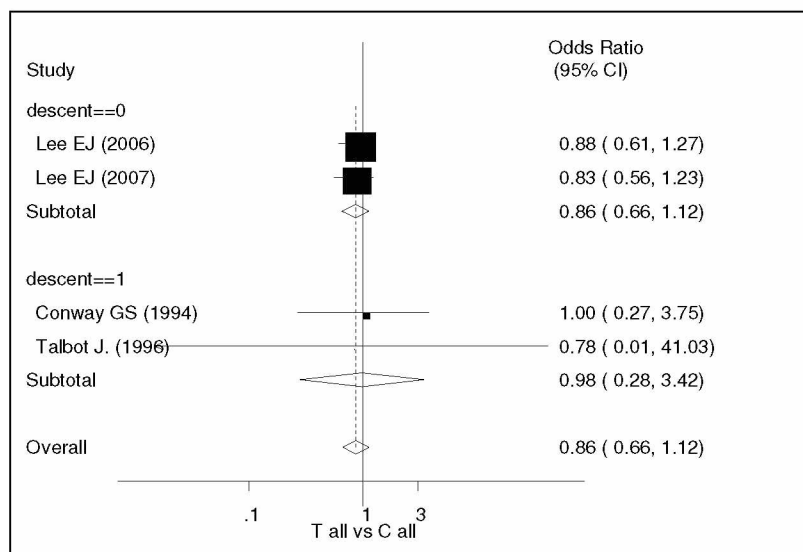
Εικόνα 11.1: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου CC προς το άθροισμα των γονοτύπων (CT+TT), το οποίο δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 11.2: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου TT προς το άθροισμα των γονοτύπων (CT+CC), το οποίο δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 11.3: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του γονότυπου CT προς το άθροισμα των γονοτύπων (CC+TT), το οποίο δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους.



Εικόνα 11.4: Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης του υπολειπόμενου αλληλόμορφου γονιδίου T προς το αλληλόμορφο γονίδιο C, το οποίο δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ τους.

Στη συνέχεια κάναμε τον έλεγχο για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) στις ομάδες μαρτύρων των μελετών. Μόνο σε 4 από τις μελέτες μπορέσαμε ελέγξουμε τους μάρτυρες και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι σε ισορροπία HWE, σύμφωνα με το χ^2 τεστ. Για τις υπόλοιπες 2 μελέτες δεν μπορέσαμε να βγάλουμε συμπέρασμα διότι, τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή σε δύο από τους τρεις γονότυπους (βλ.παράρτημα).

Επιπλέον κάνοντας τον έλεγχο του Begg και του Egger στο Stata, βρήκαμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test ήταν >0.05 , οπότε δεν απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση (H_0), δεν υπάρχει δηλαδή συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.

Τέλος κάνοντας τον έλεγχο της αθροιστικής μετα-ανάλυσης, παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μελετών, καθώς και ότι δεν υπάρχει μελέτη που αν εξαχθεί, θα επηρεάσει σημαντικά το αποτέλεσμα.

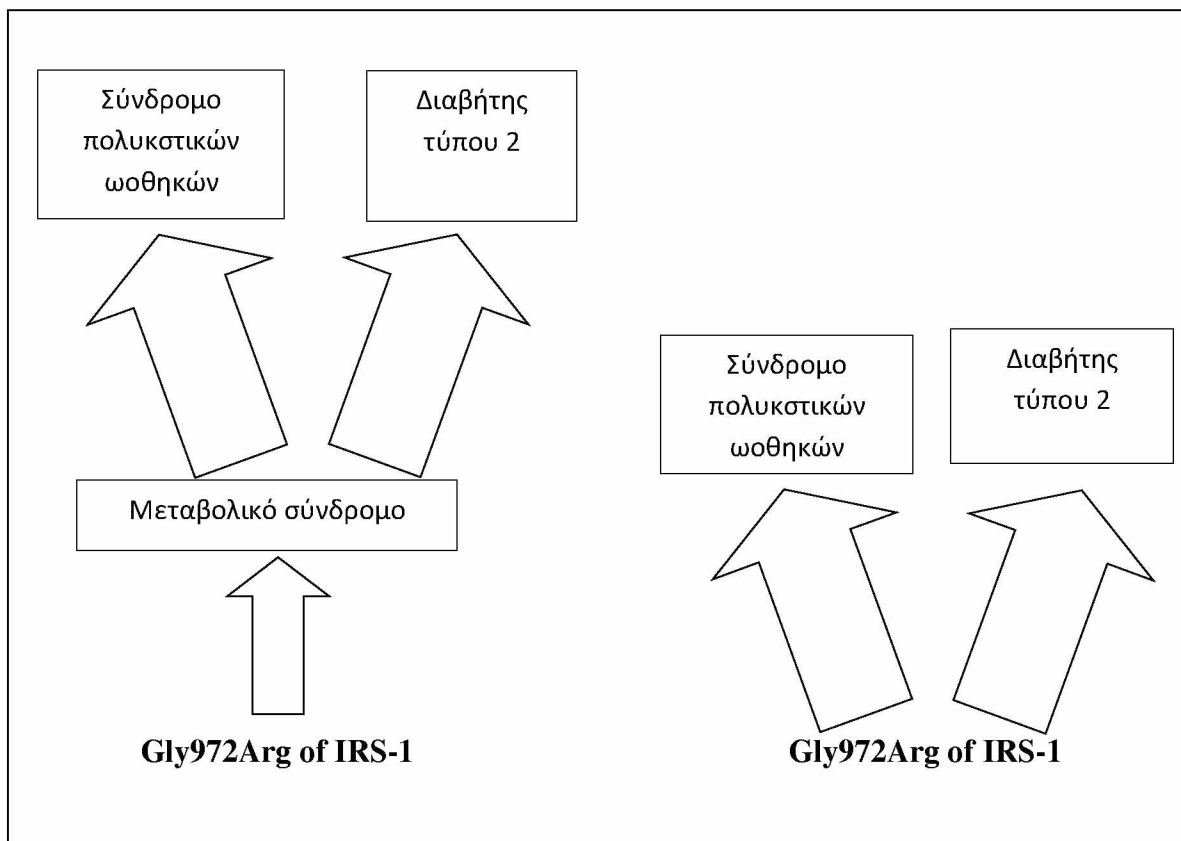
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών είναι μία από τις πιο συχνές ενδοκρινικές διαταραχές που προσβάλλει το 5-10% των γυναικών παγκοσμίως. Η αιτία του συνδρόμου είναι ακόμα άγνωστη. Εντούτοις, διάφορες μελέτες έχουν προτείνει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου. Συνέπεια της αντίστασης στην ινσουλίνη είναι οι γυναίκες που έχουν το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, να εμφανίζουν συχνά ανωμαλίες στον μεταβολισμό της γλυκόζης και να έχουν έναν αυξανόμενο κίνδυνο ανάπτυξης του διαβήτη τύπου 2. Εκτός από την αντίσταση στην ινσουλίνη, έχει αποδειχθεί ότι μερικές από αυτές τις γυναίκες εμφανίζουν και αλλαγές στην λειτουργία των β-κυττάρων. Και οι δύο διαταραχές (αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσλειτουργία των β-κυττάρων) αναγνωρίζονται ως σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 [67]. Επιπλέον, άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως η παχυσαρκία και η υπερανδρογοναιμία μπορούν να συμβάλλουν επίσης στην αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 σε άτομα με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Τα παραπάνω ενισχύουν την άποψη ότι το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών αποτελεί ένα μέρος του μεταβολικού συνδρόμου.

Επιπλέον, ορισμένοι πολυμορφισμοί του υποδοχέα ινσουλίνης και των υποστρωμάτων του έχουν κατά καιρούς συσχετιστεί με ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου 2 και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Συγκεκριμένα, έχει ήδη πραγματοποιηθεί μετα-ανάλυση η οποία ερευνά αν ο πολυμορφισμός Gly972Arg του υποστρώματος IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης συσχετίζεται με τον διαβήτη τύπου 2 [68]. Σύμφωνα με αυτήν την έρευνα, τα άτομα που εμφανίζουν αυτόν τον πολυμορφισμό στο υπόστρωμα IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης εμφανίζουν 25% μεγαλύτερη πιθανότητα, για ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2.

Ο πολυμορφισμός Gly972Arg είναι ο συχνότερος πολυμορφισμός που έχει εμφανιστεί στο υπόστρωμα IRS-1 του υποδοχέα ινσουλίνης. Έχει κατά καιρούς συσχετιστεί με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και τον διαβήτη τύπου 2. Μελέτες έχουν δείξει ότι επηρεάζει την μεταγωγή των σημάτων της ινσουλίνης στους σκελετικούς μυς και την αντίσταση στην ινσουλίνη στα β-κύτταρα του παγκρέατος [69]. Στα άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ο

πολυμορφισμός Gly972Arg έχει συσχετιστεί με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της αντίστασης στην ινσουλίνη.



Εικόνα 12: Αριστερά φαίνεται υποθετικό αιτιολογικό μοντέλο στο οποίο ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με το μεταβολικό σύνδρομο. Δεξιά φαίνεται υποθετικό αιτιολογικό μοντέλο στο οποίο ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με τις 2 ασθένειες ανεξάρτητα.

Στη δική μας μελέτη, διερευνήσαμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και αποδείξαμε ότι όντως συσχετίζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Αυτό που δεν γνωρίζουμε είναι η μορφή της αιτιολογικής σχέσης, δηλαδή το αν υπάρχει ένας κοινός παράγοντας με τον οποίο να συσχετίζεται ο πολυμορφισμός και ο οποίος να συμβάλλει στην συνέχεια στην εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου, ή αν ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και τον διαβήτη τύπου 2 ανεξάρτητα (Εικόνα 12). Αυτό μπορεί να διερευνηθεί με την πραγματοποίηση μελετών σε άτομα που πάσχουν μόνο από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών χωρίς να έχουν συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 και ξεχωριστές μελέτες σε γυναίκες

που πάσχουν μόνο από τον διαβήτη τύπου 2 χωρίς να εμφανίζουν σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Από ό,τι ξέρουμε, αυτή είναι η πρώτη πλήρης μετα-ανάλυση που ερευνά την συσχέτιση των πολυμορφισμών του υποδοχέα ινσουλίνης και των υποστρωμάτων του με τα σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Η μετα-ανάλυση που διενεργήθηκε εδώ, περιλαμβάνει συνολικά 16 μελέτες με 1406 ασθενείς και 1369 μάρτυρες και είναι μέχρι στιγμής η μοναδική μετα-ανάλυση που έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με πολυμορφισμούς που ενδέχεται να εμπλέκονται στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Επίσης, στην μετα-ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, φροντίσαμε να ληφθούν υπόψη διάφορες παραμέτροι, η επιρροή των οποίων υποτιμάται συχνά. Συμπεριλήφθηκαν δηλαδή, η αναζήτηση της «γκρίζας» βιβλιογραφίας [40-42], ο συνυπολογισμός των μη-αγγλικών ερευνητικών εργασιών [43] και ο έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) σε συγκεκριμένες ομάδες στις μελέτες [39].

Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης, έδειξαν ότι τα odds ratio είχαν τιμή κοντά στο 2. Αυτό σημαίνει ότι οι φορείς του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου (Αργινίνη) έχουν διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξουν το σύνδρομο. Συγκεκριμένα, η ανάλυση του αθροίσματος των γονότυπων GR+RR έναντι του γονότυπου GG, παρέχει μια συνολικά πιο σαφή εικόνα της συσχέτισης, καθώς είναι η μόνη που περιλαμβάνει όλες τις μελέτες που αφορούν το πολυμορφισμό. Επιπλέον, η διαφορά αυτή μεταξύ των γονότυπων έδωσε ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, καθώς το OR που προέκυψε είχε τιμή 2.08 και το διάστημα εμπιστοσύνης περιλάμβανε τιμές από το 1.473 έως το 2.933 [47]. Συγχρόνως, οι υπόλοιπες αναλύσεις έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση, καθώς η τιμές των OR που προέκυψαν ήταν κοντά στο 2. Μόνο η ανάλυση του γονότυπου RR εναντίον του αθροίσματος των γονότυπων GG+GR έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση, καθώς το OR είχε τιμή 0.93 και το διάστημα εμπιστοσύνης περιλάμβανε την τιμή 1 (0.290-2.955). Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι τα δεδομένα για τον γονότυπο RR ήταν ελλιπή στις περισσότερες μελέτες.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου για την ετερογένεια έδειξαν ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Αυτό σημαίνει ότι τα αποτελέσματα των μελετών δεν διέφεραν μεταξύ τους ούτε υπήρχαν σχετικές διαφορές μεταξύ των μελετών και των μεθοδολογιών τους. Η μη ύπαρξη ετερογένειας επομένως ενισχύει την εγκυρότητα του

αποτελέσματος στο οποίο καταλήξαμε. Ακόμη, βρήκαμε ότι οι ομάδες των μαρτύρων σε όλες τις μελέτες ήταν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν τυχόν λάθη στην αλληλουχία και είναι ένα ακόμη αποτέλεσμα που δηλώνει ότι το αποτέλεσμα που βρήκαμε είναι σημαντικό και έγκυρο [39]. Επιπρόσθετα, έγινε έλεγχος του Begg και του Egger για το συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει τέτοιο σφάλμα. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όλες οι μελέτες δημοσιεύτηκαν και αυτές που έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της ασθένειας και οι υπόλοιπες που είχαν ως αποτέλεσμα το αντίθετο. Η μη εύρεση συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης δείχνει ότι τα αποτελέσματα που βρήκαμε είναι αρκετά αξιόπιστα.

Τέλος, κάνοντας τον έλεγχο της αθροιστικής ανάλυσης, παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των εκτιμητών του μεγέθους επίδρασης. Επιπλέον μπορούμε να προσθέσουμε ότι παρατηρώντας τις διαφορές μεταξύ των OR που προέκυψαν, βλέπουμε ότι η τιμή του OR του γονότυπου GR εναντίον των άλλων γοντύπων (2.08) είναι μεγαλύτερη από αυτή του γονότυπου RR εναντίον των άλλων γονοτύπων (0.93). Γι' αυτό το λόγο συμπεραίνουμε ότι το αλληλόμορφο R είναι το υπολοιπόμορφο αλληλόμορφο γονίδιο.

Ακόμα, μπορούμε να επισημάνουμε ότι οι περισσότερες μελέτες έγιναν σε πληθυσμούς καυκάσιας προέλευσης (Ευρωπαίοι), οπότε δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα αν τα αποτελέσματα διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών. Αυτό συνιστά την περαιτέρω έρευνα για την συσχέτιση του πολυμορφισμού με το σύνδρομο ιδιαίτερα σε πληθυσμούς Ασιατικής προέλευσης.

Τα αποτελέσματα στα οποία καταλήξαμε σχετικά με τον δεύτερο μελετημένο πολυμορφισμό, His1058 C/T του υποδοχέα ινσουλίνης, δείχνουν μια ασήμαντη μη συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του συνδρόμου, αποτέλεσμα που δικαιολογείται από τον μικρό αριθμό μελετών που βρήκαμε.

Επιπλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν βρέθηκε ετερογένεια μεταξύ των μελετών ούτε συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Επιπρόσθετα οι ομάδες μαρτύρων των μελετών βρέθηκαν σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) [39]. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός των δεδομένων που υπάρχουν μέχρι τώρα προκαλεί την επακόλουθη μελέτη, ώστε να καταλήξουμε σε ένα συνολικό αποτέλεσμα. Αν όντως και αυτός ο πολυμορφισμός συσχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου, ενδέχεται ο σχετικός

κίνδυνος που επιφέρει στους φορείς του να είναι αρκετά μικρός με συνέπεια να χρειάζεται ιδιαίτερα μεγάλο δείγμα για να εντοπιστεί (έλλειψη στατιστικής ισχύος).

Η εργασία αυτή παρουσιάστηκε στο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) τον Μάιο το 2008 και έχει ξεκινήσει ήδη η διαδικασία συγγραφής επιστημονικού άρθρου το οποίο θα αποσταλεί για δημοσίευση σε διεθνές περιοδικό.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv* 2002;57(11):755–767.
- [2] Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59(2):141–154.
- [3] Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocrin Rev.* 1995; 16(3):322–353.
- [4] Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(1):165–9.
- [5] Calvo RM, Telleria D, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. *Fertil Steril* 2002; 77(4): 666–668.
- [6] Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI. Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(9):4297–4300.
- [7] Siegel S, Futterweit W, Davies TF, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Tomer Y. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome genes. *Fertil Steril* 2002;78(6):1240–1243.
- [8] San Millan JL, Corton M, Villuendas G, Sancho J, Peral B, Escobar-Morreale HF. Association of polycystic ovary syndrome with genomic variants related to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2640–2646.
- [9] Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O’Rahilly S and Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(5):1979–1983.
- [10] Jakubowski L. Genetic aspects of polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol* 2005; 56(3):285-293.

- [11] Διαμάντη-Κανδαράκη Ε, Αντωνογεώργος Γ. Η διαπλεκόμενη μεταβίβαση του ενδοκυττάριου μηνύματος της ινσουλίνης και ο ρόλος της στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2002;19(1):51-55.
- [12] Panz VR, Ruff P, Joffe BI, Kedda MA and Seftel HC. SSCP analysis of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene: polymorphisms detected in South African black and white subjects. *Hum Genet* 1996;97(4):438–440.
- [13] Siegel S, Futterweit W, Davies TF, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R and Tomer Y. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002;78(6):1240–1243.
- [14] Moller DE, Cohen O, Yamaguchi Y, Assiz R, Grigorescu F, Eberle A, Morrow LA, Moses AC and Flier JS. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 1994;43(2): 247–255.
- [15] Chen ZJ, Shi YH, Zhao YR, Li Y, Tang R, Zhao LH, Chang ZH. Correlation between single nucleotide polymorphism of insulin receptor gene with polycystic ovary syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004 ;39(9):582-585.
- [16] Sir-Petermann T. Gly972Arg polymorphism of IRS-1 in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 2001;44(9):1200-1201.
- [17] Μπατρίνος Μ. Σύγχρονη Ενδοκρινολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη 1999;441-453.
- [18] Setji TL, Brown AJ. Polycystic ovary syndrome: diagnosis and treatment. *Am J Med* 2007;120(2):128-132.
- [19] Ajossa S, Guerriero S, Paoletti AM, Orru M, Melis GB. The treatment of polycystic ovary syndrome. *Minerba Ginecol* 2004;56(1):15-26.
- [20] Bruce A. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας 2^η έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη 2006;1021.
- [21] Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb J* 2001; 15:2099–2111.
- [22] Ogihara T, Isobe T, and Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* 1997;272(40):25267–25274.

- [23] Garcia P, Shoelson SE, George ST, Hinds DA, Goldberg AR and Miller WT. Phosphorylation of synthetic peptides containing Tyr–Met–X–Met motifs by nonreceptor tyrosine kinases in vitro. *J Biol Chem* 1993; 268(33):25146–25151.
- [24] Stryer L. Βιοχημεία. 2^η έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης 1997:1097-1098.
- [25] Larner J, Galasko G, Cheng K, Depaoli-Roach AA, Huang L, Daggy P, Kellogg J. Generation by insulin of a chemical mediator that controls Protein phosphorylation and dephosphorylation. *Science* 1979;206(4425):1408-1410.
- [26] Azziz R. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and molecular defects of insulin signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4085–4087.
- [27] Jones D, Varela-Nieto I. The role of glycosyl-phosphoinositol in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:313-326
- [28] Moule SK, Denton RM. Multiple signalling pathways involved in the metabolic effects of insulin. *Am J Cardiol* 1997;80(3A):41A-49A.
- [29] Conway GS, Avey C and Rumsby G. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 1994;9(9):1681–1683.
- [30] Luttrell L, Kilgour E, Larner J, Romero G. A pertussis toxin-sensitive G-protein mediates some aspects of insulin action in BC3H-1 murine myocytes. *J Biol Chem* 1990;265(28):16873-16879.
- [31] Luttrell LM, Van biensen T, Hawes BE, Koch WJ, Touchara K, Lefkowitz RJ. G Subunits Mediate Mitogen-activated Protein Kinase Activation by the Tyrosine Kinase Insulin-like Growth Factor 1 Receptor 1999;270(28):16495-16498.
- [32] Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Ogata E, Nishimoto I. GTP-binding protein-activator sequences in the Insulin receptor. *FEBS* 1995;334:1343-148.
- [33] Huang L, Larner J. Identification of a novel inositol glycan signaling pathway with significant therapeutic relevance to insulin resistance: an insulin signaling model using both tyrosine kinase and G-proteins. *Diabetes Rev* 1999;7:217-231.
- [34] Munafo MR, Flint J. Meta-analysis of genetic association studies. *TRENDS in Genetics* 2004;20(9):439-444.
- [35] Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Genetic Epidemiology 1-Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005; 366: 941–951.
- [36] Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4(2):45–61.
- [37] Coordell HJ, Clayton DG. Genetic Epidemiology 3- Genetic association studies. *Lancet* 2005;366:1121-1131.

- [38] Cohn LD, Becker BJ. How meta-analysis increase statistical power. *Psychol. Methods* 2003;8:243–253.
- [39] Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. Impact of Violations and Deviations in Hardy-Weinberg Equilibrium on Postulated Gene-Disease Associations. *American Journal of Epidemiology* 2006;163(4):300-309.
- [40] Hopewell S, McDonald S, Clarke M, Egger M. Grey literature in meta-analyses of randomized trials of health care interventions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Apr 18;(2):MR000010.
- [41] Conn VS, Valentine JC, Cooper HM, Rantz MJ. Grey literature in meta-analyses. *NursRes.*2003;52(4):256-61.
- [42] McAuley L, Pham B, Tugwell P, Moher D. Does the inclusion of grey literature influence estimates of intervention effectiveness reported in meta-analyses? *Lancet.* 2000;356(9237):1228-31.
- [43] Pan Z, Trikalinos TA, Kavvoura FK, Ioannidis JP. Local Literature Bias in Genetic Epidemiology: An Empirical Evaluation of the Chinese Literature. *PLOS Medicine* 2005;2(12):334.
- [44] Ioannidis JP, Trikalinos TA. Early extreme contradictory estimates may appear in published research: The Proteus phenomenon in molecular genetics research and randomized trials. *Journal of Clinical Epidemiology* 2005;58(6):543–549.
- [45] Ροδάκης ΓΚ. Εισαγωγή στην εξελικτική Βιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας 2001.
- [46] Normand S-LT. Tutorial In Biostatistics Meta-Analysis: Formulating, Evaluating, Combining And Reporting. *Statistics in Medicine* 1999; 18(2): 321-359.
- [47] Bland JM, Douglas GA. The odds ratio. *BMJ* 2000;320(7247);1468.
- [48] DerSimonian R, Laird N. ‘Meta-Analysis in Clinical Trials’. *Controlled Clinical Trials* 1986;7(3):177-188.
- [49] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003; 327(7414):557–560.
- [50] Egger M, Davey-Smith G, Shneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;315: 629–634.
- [51] Bagos PG, Elefsinioti AL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ. The GNB3 C825T polymorphism and Essential Hypertension: a meta-analysis of 34 studies including 14094 cases and 17760 controls. *Journal of Hypertension* 2007;25(3):487-500.
- [52] Qin KN, Rosenfield RL. Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome. 1998;145(1-2):111-121.

- [53] Krook A, Kumar S, Laing I, Boulton AJ, Wass JA, O'Rahilly S. Molecular scanning of the insulin receptor gene in syndromes of insulin resistance. *Diabetes* 1994;43(3):357-368.
- [54] Ertunc D, Tok EC, Aktas A, Erdal EM, Dilek S. The importance of IRS-1 Gly972Arg polymorphism in evaluating the response to metformin treatment in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005;20(5):1207–1212.
- [55] Jin L, Huang HF, Jin F, Qian YL. Polymorphism in insulin receptor gene exon 17 in women with polycystic ovary syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zh*, 2005; 40(5):323-326.
- [56] Witchel SF, Kahsar-Miller M, Aston CE. Prevalence of CYP21 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess. *Fertility and Sterility* 2005;83(2):371-375.
- [57] Dilek S, Ertunc D, Tok EC, Erdal M.. Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2005;84(2):407-412.
- [58] Sir-Petermann T, Angel B, Maliqueo M. Insulin Secretion in Women Who Have Polycystic Ovary Syndrome and Carry the Gly972Arg Variant of Insulin Receptor Substrate-1in Response to a High-Glycemic or Low-Glycemic Carbohydrate Load. *Diabetologia* 2004;20(10):905-910.
- [69] Baba T, Endo T, Sata F, Honmma H. Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene IRS-1 but not ENPP1 in a Japanese population. *Life Sciences* 2007;81(10): 850–854.
- [60] Villuendas G, Botella-Carretero J, Roldan B, Sancho J. Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls. *Human Reproduction* 2005;20(11):3184–3191.
- [61] EL MkaDEM SA, Lautier C, Makari F, Molinari N. Role of Allelic Variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in Moderate-to-Severe Insulin Resistance of Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Diabetes* 2001;50(9):2164–2168.
- [62] Valdés P, Cerda A, Barrenchea C, Kerh M. No association between common Gly972Arg variant of the insulin receptor substrate-1 and polycystic ovary syndrome in Southern Chilean women. *Clin Chim Acta* 2008;390(1-2):63-66.

- [63] Lin TC, Yen JM, Gong KB, Kuo TC, Ku DC. Abnormal glucose tolerance and insulin resistance in polycystic ovary syndrome amongst the Taiwanese population-not correlated with insulin receptor substrate-1 Gly972Arg/Ala513Pro polymorphism. *BMC Med Genet.* 2006;7:36.
- [64] Witchel SF, Smith R, Tomboc M, Aston CE. Candidate gene analysis in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism. *Fertility And Sterility* 2001;75(4):724-730.
- [65] Pelusi B, Gambineri A, Pasquali R. Type 2 diabetes and the polycystic ovary syndrome. *Minerba Gincol* 2004;56(1):41-51.
- [66] Lee EJ, Yoo KJ, Kim SJ, Lee SH, Cha KY, Baek KH . Single nucleotide polymorphism in exon 17 of the insulin receptor gene is not associated with polycystic ovary syndrome in a Korean population. *Fertil Steril* 2006;86(2):380-384.
- [67] Jellema A, Zeegers MP, Feskens EJ, Dangelie PC, Mensink RP. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia.* 2003;46(7):990-995.
- [68] Stumvoll M, Fritsche A, Volk A, Stefan N, Madaus A, Maerker E. The Gly972Arg polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene contributes to variation in insulin secretion in normal glucose-tolerant humans. *Diabetes* 2001;50:882-5.
- [69] Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lauro D. The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. *Faseb J* 2001;15:22-4.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρακάτω παρουσιάζονται οι εντολές και τα αποτελέσματά τους, όπως φαίνονται στο πρόγραμμα του Stata.

6.1 Διεξαγωγή μετα-ανάλυσης

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα αυτών για τον πολυμορφισμό Gly972Arg (για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο R):

```
.gen odsr=log((r1*nor0)/(r0*nor1))
.replace odsr=log(((0.5+r1)*(0.5+nor0))/((0.5+r0)*(0.5+nor1))) if
r1==0|nor1==0|r0==0|nor0==0
.gen stdodsr=sqrt(1/r1+1/nor1+1/r0+1/nor0)
.replace
stdodsr=sqrt(1/(r1+0.5)+1/(nor1+0.5)+1/(r0+0.5)+1/(nor0+0.5)) if
r1==0|nor1==0|r0==0|nor0==0
.metan odsr stdodsr, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight	

descent==0					
Lin TC (2006)	0.958	0.019	48.777	0.70	
Baba T (2007)	2.353	1.162	4.767	21.62	
Sub-total					
D+L pooled ES	2.288	1.142	4.584	22.31	

descent==1					
Witchel SF (2001)	3.625	0.458	28.712	2.52	
El MkaDEM SA (2001)	1.404	0.644	3.062	17.73	
Sir-Petermann T (200	2.208	0.677	7.201	7.71	
Sir-Petermann T (200	2.445	0.793	7.542	8.49	
Saffet Dilek M (200	3.038	1.058	8.721	9.68	
Villuendas G (2005)	0.856	0.330	2.220	11.87	
Witchel SF (2005)	2.266	0.861	5.963	11.51	
Valdes P (2007)	2.522	0.800	7.944	8.18	
Sub-total					
D+L pooled ES	1.875	1.292	2.722	77.69	

Overall					
D+L pooled ES	1.961	1.412	2.722	100.00	

Test(s) of heterogeneity:					
	Heterogeneity	degrees of	P	I-squared**	Tau-squared
	statistic	freedom			
descent==0	0.19	1	0.659	0.0%	0.0000
descent==1	5.01	7	0.658	0.0%	0.0000
Overall	5.45	9	0.793	0.0%	0.0000
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :					
	0.24	1	0.621		
Significance test(s) of ES=1					
descent==0	z= 2.34	p = 0.020			
descent==1	z= 3.31	p = 0.001			
Overall	z= 4.02	p = 0.000			

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 1.961 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης δεν περιέχεται το 1 (1.412 2.722), οπότε συμπεραίνουμε ότι υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από τον έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή <0,0001 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε είναι στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.793 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Για τον γονότυπο RR:

```
.gen odsrr=log((rr1*norr0)/(rr0*norr1))
.replace odsrr=log(((0.5+rr1)*(0.5+norr0))/((0.5+rr0)*(0.5+norr1)))
if rr1==0|norr1==0|rr0==0|norr0==0
.gen stdodsrr=sqrt(1/rr1+1/norr1+1/rr0+1/norr0)
.replace
stdodsrr=sqrt(1/(rr1+0.5)+1/(norr1+0.5)+1/(rr0+0.5)+1/(norr0+0.5)) if
rr1==0|norr1==0|rr0==0|norr0==0
.metan odsrr stdodsrr, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight	

descent==0					
Lin TC (2006)	0.958	0.019	49.301	8.68	
Baba T (2007)	3.107	0.193	50.040	17.44	
Sub-total					
D+L pooled ES	2.102	0.217	20.369	26.12	

descent==1					
Witchel SF (2001)	0.244	0.005	12.793	8.60	
El MkaDEM SA (2001)	0.632	0.025	15.791	13.01	
Sir-Petermann T (200)	0.855	0.017	43.624	8.71	
Sir-Petermann T (200)	0.679	0.013	34.532	8.73	
Saffet Dilek M (200)	1.000	0.020	51.218	8.70	
Villuendas G (2005)	0.469	0.009	23.968	8.70	
Witchel SF (2005)	0.872	0.017	44.377	8.73	
Valdes P (2007)	1.495	0.029	76.573	8.70	
Sub-total					
D+L pooled ES	0.693	0.179	2.673	73.88	

Overall					
D+L pooled ES	0.926	0.290	2.955	100.00	

Test(s) of heterogeneity:					
	Heterogeneity	degrees of			
	statistic	freedom	P	I-squared**	Tau-squared
descent==0	0.23	1	0.633	0.0%	0.0000
descent==1	0.51	7	0.999	0.0%	0.0000
Overall	1.42	9	0.998	0.0%	0.0000
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :					
	0.68	1	0.410		
Significance test(s) of ES=1					
descent==0	z= 0.64	p = 0.522			

descent==1	z= 0.53	p = 0.594
Overall	z= 0.13	p = 0.896

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 0.926 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης περιέχεται το 1 (0.290 2.955), οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή 0.896 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν είναι αρκετά στατιστικά σημαντικό γιατί δεν είναι κοντά στο 0. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.998 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Για τον γονότυπο GR:

```
.gen odsgr=log((gr1*nogr0)/(gr0*nogr1))
.replace odsgr=log(((0.5+gr1)*(0.5+nogr0))/((0.5+gr0)*(0.5+nogr1)))
if gr1==0|nogr1==0|gr0==0|nogr0==0
.gen stdodsgr=sqrt(1/gr1+1/nogr1+1/gr0+1/nogr0)
.replace
stdodsgr=sqrt(1/(gr1+0.5)+1/(nogr1+0.5)+1/(gr0+0.5)+1/(nogr0+0.5)) if
gr1==0|nogr1==0|gr0==0|nogr0==0
.metan odsgr stdodsgr, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight

descent==0				
Lin TC (2006)	0.958	0.019	49.301	0.76
Baba T (2007)	2.308	1.070	4.980	20.07
Sub-total				
D+L pooled ES	2.235	1.051	4.754	20.84

descent==1				
Witchel SF (2001)	4.000	0.483	33.122	2.66
El Mkadem SA (2001)	1.698	0.729	3.952	16.62
Sir-Petermann T (200	2.292	0.686	7.660	8.15
Sir-Petermann T (200	2.523	0.805	7.911	9.09
Saffet Dilek M (200	3.348	1.122	9.994	9.92
Villuendas G (2005)	0.846	0.314	2.278	12.10
Witchel SF (2005)	2.367	0.879	6.371	12.11
Valdes P (2007)	2.667	0.819	8.687	8.51
Sub-total				
D+L pooled ES	2.039	1.384	3.003	79.16

Overall				
D+L pooled ES	2.078	1.473	2.933	100.00

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
descent==0	0.18	1	0.668	0.0%	0.0000

descent==1	4.85	7	0.679	0.0%	0.0000
Overall	5.08	9	0.828	0.0%	0.0000
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :					
	0.05	1	0.832		
Significance test(s) of ES=1					
descent==0	z= 2.09		p = 0.037		
descent==1	z= 3.61		p = 0.000		
Overall	z= 4.16		p = 0.000		

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 2.078 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης δεν περιέχεται το 1 (1.473 2.933), οπότε συμπεραίνουμε ότι υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή <0,0001 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε είναι στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.828 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Για το άθροισμα των γονότυπων (GR+RR):

```
.gen odsnogg=log((nogg1*nonogg0)/(nogg0*nonogg1))
.replace
odsnogg=log(((0.5+nogg1)*(0.5+nonogg0))/((0.5+nogg0)*(0.5+nonogg1)))
if nogg1==0|nonogg1==0|nogg0==0|nonogg0==0
.gen stdodsnogg=sqrt(1/nogg1+1/nonogg1+1/nogg0+1/nonogg0)
.replace
stdodsnogg=sqrt(1/(nogg1+0.5)+1/(nonogg1+0.5)+1/(nogg0+0.5)+1/(nonogg0+0.5)) if nogg1==0|nonogg1==0|nogg0==0|nonogg0==0
.metan odsnogg stdodsnogg, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight

descent==0				
Lin TC (2006)	0.958	0.019	49.301	0.75
Baba T (2007)	2.377	1.129	5.005	21.05
Sub-total				
D+L pooled ES	2.303	1.108	4.788	21.80

descent==1				
Witchel SF (2001)	4.000	0.483	33.122	2.61
El Mkadem SA (2001)	1.573	0.682	3.629	16.71
Sir-Petermann T (200)	2.292	0.686	7.660	8.02
Sir-Petermann T (200)	2.523	0.805	7.911	8.94
Saffet Dilek M (200)	3.348	1.122	9.994	9.76
Villuendas G (2005)	0.846	0.314	2.278	11.90
Witchel SF (2005)	2.367	0.879	6.371	11.90
Valdes P (2007)	2.667	0.819	8.687	8.37
Sub-total				
D+L pooled ES	2.004	1.362	2.949	78.20

Overall				

D+L pooled ES	2.066	1.468	2.907	100.00

Test(s) of heterogeneity:				
	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**
descent==0	0.20	1	0.657	0.0%
descent==1	5.03	7	0.656	0.0%
Overall	5.33	9	0.804	0.0%
Overall Test for heterogeneity between sub-groups:				
	0.11	1	0.742	

Significance test(s) of ES=1				
descent==0	z= 2.24	p = 0.025		
descent==1	z= 3.53	p = 0.000		
Overall	z= 4.16	p = 0.000		

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 2.066 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης δεν περιέχεται το 1 (1.468 2.907), οπότε συμπεραίνουμε ότι υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή <0,0001 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε είναι στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.804 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I² και το τ² που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Οι εντολές και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό His1058 C/T φαίνονται παρακάτω (για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο T):

```

.gen odst=log((t1*not0)/(t0*not1))
.replace odst=log(((0.5+t1)*(0.5+not0))/((0.5+t0)*(0.5+not1))) if
t1==0|not1==0|t0==0|not0==0
.gen stdodst=sqrt(1/t1+1/not1+1/t0+1/not0)
.replace
stdodst=sqrt(1/(t1+0.5)+1/(not1+0.5)+1/(t0+0.5)+1/(not0+0.5)) if
t1==0|not1==0|t0==0|not0==0
.metan odst stdodst, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight

descent==0			
Lee EJ (2006)	0.883	0.613 1.271	51.47
Lee EJ (2007)	0.829	0.559 1.229	44.17
Sub-total			
D+L pooled ES	0.857	0.656 1.120	95.64

descent==1			
Conway GS (1994)	1.000	0.267 3.749	3.92
Talbot J (1996)	0.782	0.015 41.026	0.44
Sub-total			
D+L pooled ES	0.976	0.279 3.417	4.36

Overall					
D+L pooled ES	0.862	0.664	1.120	100.00	

Test(s) of heterogeneity:					
	Heterogeneity	degrees of			
	statistic	freedom	P	I-squared**	Tau-squared
descent==0	0.05	1	0.819	0.0%	0.0000
descent==1	0.01	1	0.908	0.0%	0.0000
Overall	0.10	3	0.991	0.0%	0.0000
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :					
	0.04	1	0.843		

Significance test(s) of ES=1					
descent==0	z= 1.13	p = 0.260			
descent==1	z= 0.04	p = 0.969			
Overall	z= 1.11	p = 0.267			

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 0.862 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχεται το 1 (0.664 1.120), οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή 0.267 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί είναι >0.05. Επιπλέον στο heterogeneity test το τελικό P-value έχει τιμή 0.991 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Για τον γονότυπο TT:

```

.gen odstt=log((tt1*nott0)/(tt0*nott1))
.replace odstt=log(((0.5+tt1)*(0.5+nott0))/((0.5+tt0)*(0.5+nott1)))
if tt1==0|nott1==0|tt0==0|nott0==0
.gen stdodstt=sqrt(1/tt1+1/nott1+1/tt0+1/nott0)
.replace
stdodstt=sqrt(1/(tt1+0.5)+1/(nott1+0.5)+1/(tt0+0.5)+1/(nott0+0.5)) if
tt1==0|nott1==0|tt0==0|nott0==0
.metan odstt stdodstt, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight

descent==0				
Lee EJ (2006)	1.033	0.501	2.128	49.50
Lee EJ (2007)	0.495	0.210	1.167	41.53
Sub-total				
D+L pooled ES	0.742	0.363	1.519	91.03

descent==1				
Conway GS (1994)	0.378	0.007	20.596	3.29
Talbot J (1996)	7.966	0.396	160.316	5.68
Sub-total				
D+L pooled ES	2.337	0.125	43.757	8.97

Overall				

D+L pooled ES	0.827	0.395	1.730	100.00

Test(s) of heterogeneity:				
	Heterogeneity	degrees of		
	statistic	freedom	P	I-squared**
descent==0	1.65	1	0.199	39.3%
descent==1	1.43	1	0.232	30.0%
Overall	4.06	3	0.255	26.2%
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :				
	0.99	1	0.320	
Significance test(s) of ES=1				
descent==0	z= 0.82	p = 0.415		
descent==1	z= 0.57	p = 0.570		
Overall	z= 0.50	p = 0.614		

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 0.827 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνεται το 1 (0.395 1.730), οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή 0.614 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί είναι >0.05. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας το τελικό P-value έχει τιμή 0.255 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 26.2% και 0.1503 αντίστοιχα, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια επειδή οι τιμές τους είναι κοντά στο 0.

Για τον γονότυπο CT:

```

.gen odsct=log((ct1*noct0)/(ct0*noct1))
.replace odsct=log(((0.5+ct1)*(0.5+noct0))/((0.5+ct0)*(0.5+noct1)))
if ct1==0|noct1==0|ct0==0|noct0==0
.gen stdodsct=sqrt(1/ct1+1/noct1+1/ct0+1/noct0)
.replace
stdodsct=sqrt(1/(ct1+0.5)+1/(noct1+0.5)+1/(ct0+0.5)+1/(noct0+0.5)) if
ct1==0|noct1==0|ct0==0|noct0==0
.metan odsct stdodsct, eform random by(descnt)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight

descent==0			
Lee EJ (2006)	0.764	0.461 1.266	48.99
Lee EJ (2007)	1.180	0.698 1.996	45.13
Sub-total			
D+L pooled ES	0.943	0.616 1.444	94.12

descent==1			
Conway GS (1994)	1.000	0.198 5.045	4.76
Talbot J (1996)	0.702	0.025 19.666	1.12
Sub-total			
D+L pooled ES	0.935	0.218 4.008	5.88

Overall			
D+L pooled ES	0.941	0.661 1.339	100.00

```

-----+-----
Test(s) of heterogeneity:
              Heterogeneity  degrees of
              statistic      freedom      P      I-squared**      Tau-squared
descent==0      1.37          1      0.243      26.8%      0.0252
descent==1      0.04          1      0.852      0.0%      0.0000
Overall         1.40          3      0.705      0.0%      0.0000
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :
              0.00          1      0.993

Significance test(s) of ES=1
descent==0      z= 0.27      p = 0.789
descent==1      z= 0.09      p = 0.928
Overall         z= 0.34      p = 0.735
-----+-----

```

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 0.941 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχεται το 1 (0.661 1.339), οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή 0.735 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί είναι >0.05. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.705 το οποίο είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 0, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηκνεί ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

Για το άθροισμα των γονοτύπων (CT+TT):

```

.gen odsnott=log((nott1*nonott0)/(nott0*nonott1))
.replace
odsnott=log(((0.5+nott1)*(0.5+nonott0))/((0.5+nott0)*(0.5+nonott1)))
if nott1==0|nonott1==0|nott0==0|nonott0==0
.gen stdodsnott=sqrt(1/nott1+1/nonott1+1/nott0+1/nonott0)
.replace
stdodsnott=sqrt(1/(nott1+0.5)+1/(nonott1+0.5)+1/(nott0+0.5)+1/(notnot
0+0.5)) if nott1==0|nonott1==0|nott0==0|nonott0==0
.metan odsnott stdodsnott, eform random by(descent)
label(namevar=author,yearvar=year) xlab(0.1,1,3)

```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----+-----				
descent==0				
Chen ZJ (2004)	4.831	1.768	13.201	15.43
Lee EJ (2006)	0.761	0.449	1.289	24.37
Lee EJ (2007)	0.960	0.571	1.614	24.54
Sub-total				
D+L pooled ES	1.357	0.580	3.173	64.34
-----+-----				
descent==1				
Conway GS (1994)	1.000	0.198	5.045	8.54
Talbot J (1996)	0.077	0.004	1.555	3.08
Siegel S (2002)	1.291	0.749	2.225	24.03
Sub-total				

D+L pooled ES	0.894	0.312	2.564	35.66
Overall				
D+L pooled ES	1.160	0.666	2.021	100.00
Test(s) of heterogeneity:				
	Heterogeneity	degrees of		
	statistic	freedom	P	I-squared**
descent==0	10.40	2	0.006	80.8%
descent==1	3.31	2	0.191	39.5%
Overall	13.81	5	0.017	63.8%
Overall Test for heterogeneity between sub-groups :				
	0.10	1	0.755	
Significance test(s) of ES=1				
descent==0	z= 0.70	p = 0.481		
descent==1	z= 0.21	p = 0.836		
Overall	z= 0.53	p = 0.599		

Παραπάνω φαίνονται τα OR, τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και το τεστ της ετερογένειας. Το τελικό OR έχει τιμή 1.160 και στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνεται το 1 (0.666 2.021), οπότε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση. Επίσης βλέπουμε από το έλεγχο σημαντικότητας του εκτιμητή του μεγέθους επίδρασης δηλαδή του OR, ότι το τελικό P-value έχει τιμή 0.599 το οποίο μας δείχνει ότι το αποτέλεσμα που προέκυψε δεν είναι στατιστικά σημαντικό γιατί είναι >0.05. Επιπλέον στον έλεγχο ετερογένειας, το τελικό P-value έχει τιμή 0.017 το οποίο δεν είναι >0.10 και το οποίο δηλώνει ότι υπάρχει ετερογένεια. Επιπλέον οι δείκτες I^2 και το τ^2 που είναι δύο ακόμη μέτρα της ετερογένειας είναι ίσοι με 63.8% και 0.2565 αντίστοιχα, ένα ακόμη αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι υπάρχει ετερογένεια επειδή δεν είναι κοντά στο 0.

6.2 Έλεγχος για την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE)

Αρχικά φτιάξαμε μια λίστα, χρησιμοποιώντας την εντολή `list` με τους γονότυπους και τα αλληλόμορφα των μαρτύρων η οποία φαίνεται παρακάτω για τον πολυμορφισμό Gly972Arg:

list			
	GG0	GR0	RR0
1.	45	0	0
2.	362	17	1
3.	14	1	0
4.	86	15	1
5.	66	4	0
6.	93	4	0
7.	55	5	0
8.	41	7	0
9.	89	6	0
10.	70	5	0

Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε την εντολή `genhwi` για να δούμε αν τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) και έτσι έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

genhwi	362	17	1
Genotype	Observed	Expected	
AA	362	361.24	
Aa	17	18.53	
aa	1	0.24	
total	380	380.00	
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	741	0.9750	0.0059
a	19	0.0250	0.0059
total	760	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0020			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
Pearson chi2 (1) = 2.575 Pr= 0.1086			
likelihood-ratio chi2 (1) = 1.481 Pr= 0.2236			
Exact significance prob = 0.2060			

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή 0.0020.

genhwi	86	15	1
Genotype	Observed		Expected
AA	86		85.71
Aa	15		15.58
aa	1		0.71
total	102		102.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	187	0.9167	0.0197
a	17	0.0833	0.0197
total	204	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0029			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
Pearson chi2 (1) = 0.143 Pr= 0.7054			
likelihood-ratio chi2 (1) = 0.129 Pr= 0.7190			
Exact significance prob = 0.5163			

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05, και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή 0.0029

genhwi	66	4	0
Genotype	Observed		Expected
AA	66		66.06
Aa	4		3.89
aa	0		0.06
total	70		70.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	136	0.9714	0.0139
a	4	0.0286	0.0139
total	140	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0008			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
Pearson chi2 (1) = 0.061 Pr= 0.8056			
likelihood-ratio chi2 (1) = . Pr= .			
Exact significance prob = 1.0000			

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0008 .

genhwi			
	55	5	0
Genotype	Observed		Expected
AA	55		55.10
Aa	5		4.79
aa	0		0.10
total	60		60.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	115	0.9583	0.0178
a	5	0.0417	0.0178
total	120	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0017			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
Pearson chi2 (1) = 0.113 Pr= 0.7363			
likelihood-ratio chi2 (1) = . Pr= .			
Exact significance prob = 1.0000			

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0017 .

genhwi			
	41	7	0
Genotype	Observed		Expected
AA	41		41.26
Aa	7		6.49
aa	0		0.26
total	48		48.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	89	0.9271	0.0255
a	7	0.0729	0.0255
total	96	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0053			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
Pearson chi2 (1) = 0.297 Pr= 0.5858			
likelihood-ratio chi2 (1) = . Pr= .			
Exact significance prob = 1.0000			

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0053 .

genhwi	89	6	0
Genotype	Observed		Expected
AA	89		89.09
Aa	6		5.81
aa	0		0.09
total	95		95.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	184	0.9684	0.0125
a	6	0.0316	0.0125
total	190	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0010			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
	Pearson chi2 (1) =	0.101	Pr= 0.7506
	likelihood-ratio chi2 (1) =	.	Pr= .
	Exact significance prob =		1.0000

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0010 .

genhwi	70	5	0
Genotype	Observed		Expected
AA	70		70.08
Aa	5		4.83
aa	0		0.08
total	75		75.00
Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	145	0.9667	0.0144
a	5	0.0333	0.0144
total	150	1.0000	
Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0011			
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:			
	Pearson chi2 (1) =	0.089	Pr= 0.7652
	likelihood-ratio chi2 (1) =	.	Pr= .
	Exact significance prob =		1.0000

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0011 .

Χρησιμοποιώντας την εντολή `list` για τον πολυμορφισμό His1058 έχουμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

```
list
```

	CC0	CT0	TT0
1.	35	.	.
2.	31	49	13
3.	46	40	14
4.	4	4	0
5.	0	0	0
6.	93	.	.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε την εντολή `genhwi` για να δούμε αν τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) και έτσι έχουμε τα παρακάτω:

```
genhwi 4 4 0
```

Genotype	Observed	Expected
AA	4	4.50
Aa	4	3.00
aa	0	0.50
total	8	8.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	12	0.7500	0.0884
a	4	0.2500	0.0884
total	16	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0625
Hardy-Weinberg Equilibrium Test:
Pearson chi2 (1) = 0.889 Pr= 0.3458
likelihood-ratio chi2 (1) = . Pr= .
Exact significance prob = 1.0000

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0625 .

genhwi 31 49 13

Genotype	Observed	Expected
AA	31	33.12
Aa	49	44.76
aa	13	15.12
total	93	93.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	111	0.5968	0.0342
a	75	0.4032	0.0342
total	186	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0228

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 0.835 Pr= 0.3607
likelihood-ratio chi2 (1) = 0.841 Pr= 0.3591
Exact significance prob = 0.5170

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή -0.0228.

genhwi 46 40 14

Genotype	Observed	Expected
AA	46	43.56
Aa	40	44.88
aa	14	11.56
total	100	100.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
A	132	0.6600	0.0353
a	68	0.3400	0.0353
total	200	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0244

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 1.182 Pr= 0.2769
likelihood-ratio chi2 (1) = 1.167 Pr= 0.2799
Exact significance prob = 0.2715

Το παραπάνω τεστ δείχνει ότι τα δεδομένα είναι σε ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE), καθώς το P-value είναι >0.05 , και το Estimated disequilibrium coefficient έχει τιμή 0.0244.

6.3 Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης

Για να βρούμε αν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης χρησιμοποιήσαμε τον έλεγχο του Begg και του Egger μέσω της εντολής `metabias`.

Οι εντολές που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα του πολυμορφισμού `Gly972Arg` φαίνονται παρακάτω:

Για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο R:

```
metabias odsr stdodsr gr(b)
```

```
metabias odsr stdodsr gr(e)
```

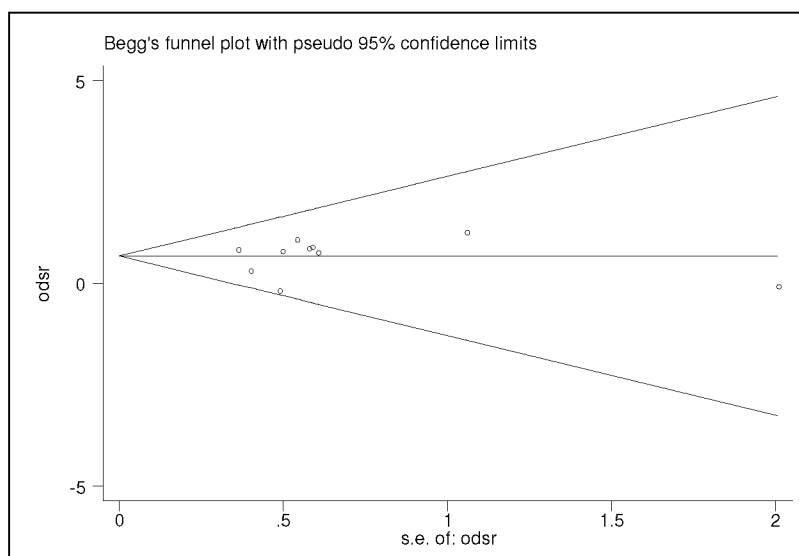
Begg's Test

```
adj. Kendall's Score (P-Q) = 3
Std. Dev. of Score = 11.18
Number of Studies = 10
z = 0.27
Pr > |z| = 0.788
z = 0.18 (continuity corrected)
Pr > |z| = 0.858 (continuity corrected)
```

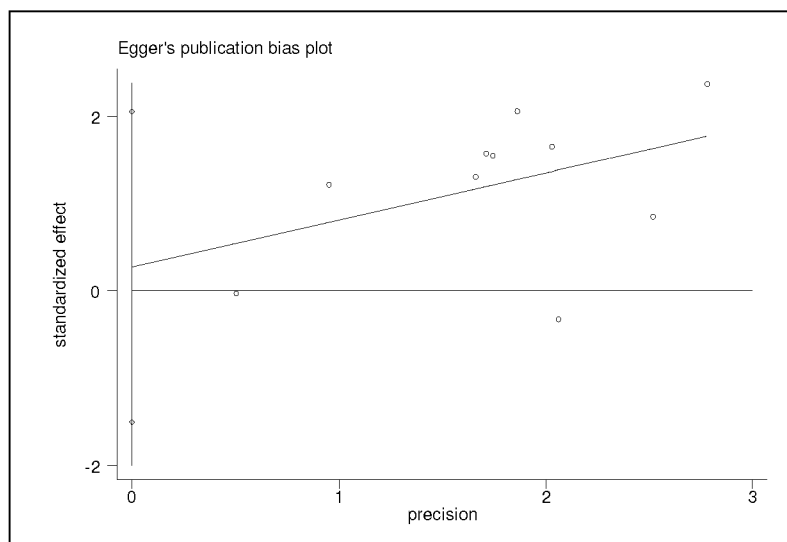
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.5380149	.4078827	1.32	0.224	-.4025642	1.478594
bias	.271123	.7702561	0.35	0.734	-1.505091	2.047337

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.734 και 0.788 αντίστοιχα δηλαδή >0.05 , όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Παραπάνω φαίνεται το funnel plot του Begg, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες κατανέμονται γύρω από τον συνοπτικό εκτιμητή.



Παραπάνω φαίνεται το funnel plot του Egger, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες βρίσκονται πάτω από το 0.

Για τον γονότυπο RR:

```
metabias odsrr stdodsrr gr(b)
metabias odsrr stdodsrr gr(e)
Begg's Test
  adj. Kendall's Score (P-Q) =    -5
    Std. Dev. of Score =   11.18
    Number of Studies =     10
      z =   -0.45
    Pr > |z| =   0.655
      z =    0.36 (continuity corrected)
    Pr > |z| =   0.721 (continuity corrected)
Egger's test
-----
      Std_Eff |      Coef.   Std. Err.    t    P>|t|    [95% Conf. Interval]
-----+-----
      slope |  3.514458   1.50969    2.33  0.048   .0331064   6.995809
      bias  | -1.933136   .8060748   -2.40  0.043  -3.791948  -.0743243
-----+-----
```

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι το P-value στον έλεγχο του Egger είναι 0.043, το οποίο είναι <0.05, ενώ και στον έλεγχο του Begg είναι 0.655 το οποίο είναι >0.05 όποτε συμπεραίνουμε ότι πρέπει να υπάρχει ένα μικρό σφάλμα δημοσίευσης.

Για το άθροισμα των γονότυπων GR+RR:

```
metabias odsnogg stdodsnogg gr(b)
```

metabias odsnogg stdodsnogg gr(e)

Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = 3
Std. Dev. of Score = 11.18
Number of Studies = 10
z = 0.27
Pr > |z| = 0.788
z = 0.18 (continuity corrected)
Pr > |z| = 0.858 (continuity corrected)

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.5972531	.4339244	1.38	0.206	-.4033783	1.597885
bias	.2463769	.7872589	0.31	0.762	-1.569045	2.061799

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.762 και 0.788 αντίστοιχα δηλαδή >0.05, όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.

Για τον γονότυπο GR:

metabias odsgr stdodsgr gr(b)

metabias odsgr stdodsgr gr(e)

Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = 5
Std. Dev. of Score = 11.18
Number of Studies = 10
z = 0.45
Pr > |z| = 0.655
z = 0.36 (continuity corrected)
Pr > |z| = 0.721 (continuity corrected)

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.598983	.4343787	1.38	0.205	-.4026961	1.600662
bias	.2517749	.78146	0.32	0.756	-1.550275	2.053825

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.756 και 0.655 αντίστοιχα δηλαδή >0.05, όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης

Για τον πολυμορφισμό His1058 C/T οι εντολές και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

Για τον γονότυπο TT :

metabias odstt stdodstt gr(b)

metabias odstt stdodstt gr(e)

```

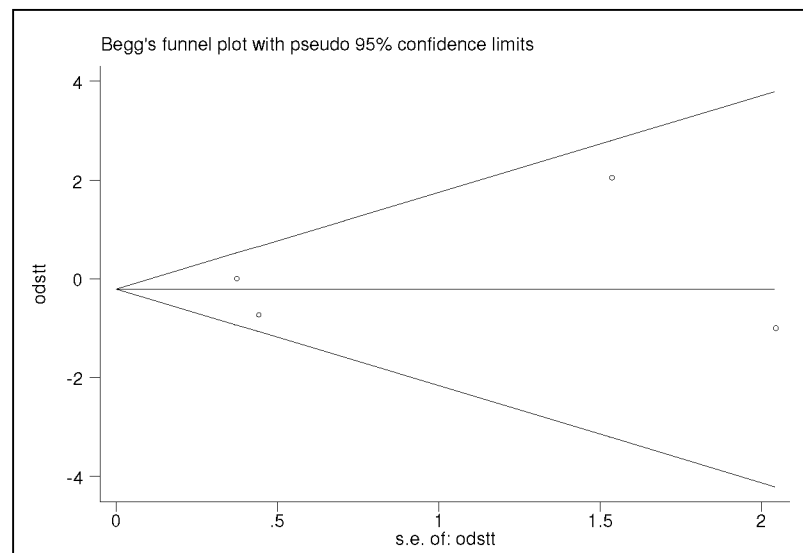
Begg's Test
  adj. Kendall's Score (P-Q) =      0
    Std. Dev. of Score =      2.94
    Number of Studies =      4
      z =      0.00
    Pr > |z| =      1.000
      z =     -0.34 (continuity corrected)
    Pr > |z| =      1.000 (continuity corrected)

```

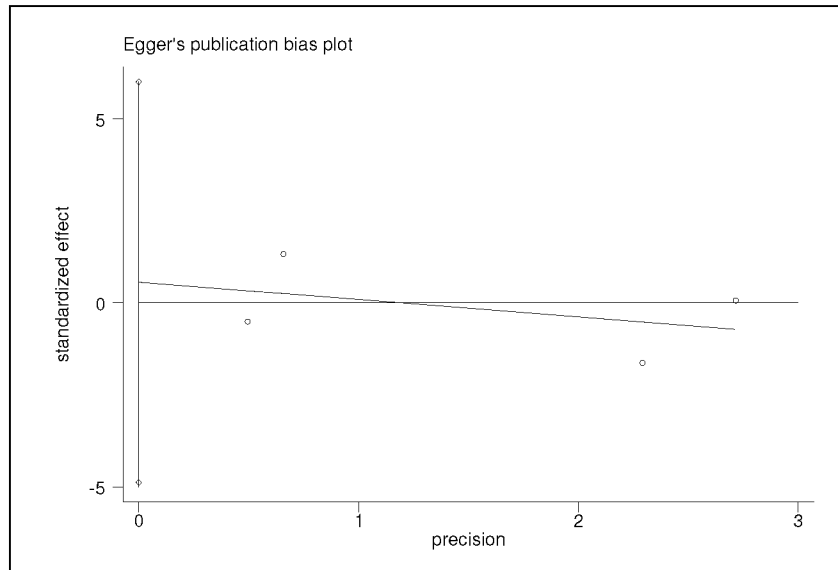
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.4724318	.6958861	-0.68	0.567	-3.466588	2.521725
bias	.5646984	1.266268	0.45	0.699	-4.883614	6.01301

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.699 και 1 αντίστοιχα δηλαδή >0.05 , όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Παραπάνω φαίνεται το funnel plot του Begg, όπου φαίνεται ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες κατανέμονται γύρω από τον συνοπτικό εκτιμητή.



Παραπάνω φαίνεται το funnel plot του Egger, όπου φαίνεται ότι υπάρχει ένα μικρό σφάλμα δημοσίευσης καθώς οι μελέτες βρίσκονται κάτω από το 0.

Για το άθροισμα των γονοτύπων CT+TT:

```
metabias odsnocc stdodsnocc gr(b)
```

```
metabias odsnocc stdodsnocc gr(e)
```

Begg's Test

```
adj. Kendall's Score (P-Q) = -1
Std. Dev. of Score = 5.32
Number of Studies = 6
z = -0.19
Pr > |z| = 0.851
z = 0.00 (continuity corrected)
Pr > |z| = 1.000 (continuity corrected)
```

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.1026085	.5968685	0.17	0.872	-1.554564	1.759781
bias	-.06346	1.665316	-0.04	0.971	-4.687119	4.560199

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.971 και 0.851 αντίστοιχα δηλαδή >0.05, όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης

Για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο γονίδιο T:

```
metabias odst stdodst gr(b)
```

```
metabias odst stdodst gr(e)
```

```

Begg's Test
  adj. Kendall's Score (P-Q) =      0
    Std. Dev. of Score =      2.94
    Number of Studies =      4
      z =      0.00
    Pr > |z| =      1.000
      z =     -0.34 (continuity corrected)
    Pr > |z| =      1.000 (continuity corrected)

```

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.1654062	.0517515	-3.20	0.086	-.3880751	.0572627
bias	.0781045	.1938344	0.40	0.726	-.7558977	.9121066

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.726 και 1 αντίστοιχα δηλαδή >0.05, όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης

Για τον γονότυπο CT:

```
metabias odsct stdodsct gr(b)
```

```
metabias odsct stdodsct gr(e)
```

```

Begg's Test
  adj. Kendall's Score (P-Q) =      0
    Std. Dev. of Score =      2.94
    Number of Studies =      4
      z =      0.00
    Pr > |z| =      1.000
      z =     -0.34 (continuity corrected)
    Pr > |z| =      1.000 (continuity corrected)

```

Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.0443787	.2840903	-0.16	0.890	-1.266721	1.177963
bias	-.0544439	.7883212	-0.07	0.951	-3.446316	3.337428

Στον πάνω έλεγχο βλέπουμε ότι τα P-values στο Egger's test και στο Begg's Test είναι 0.951 και 1 αντίστοιχα δηλαδή >0.05, όποτε συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης

6.4 Διεξαγωγή αθροιστικής ανάλυσης

Χρησιμοποιήσαμε την εντολή `metacum` για να δούμε αν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ των μελετών.

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό Gly972Arg:

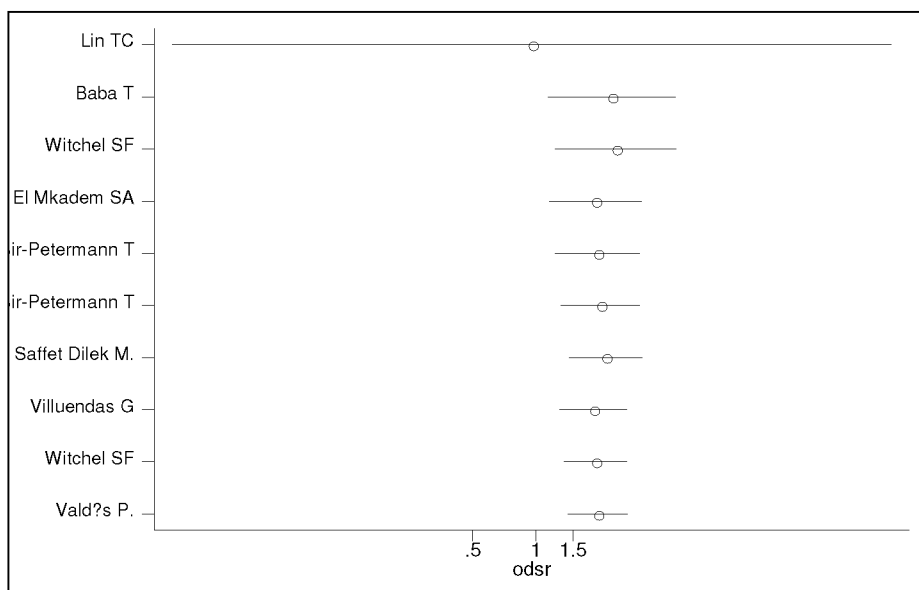
Για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο R:

```
metacum odsr stdodsr, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
```

Cumulative random-effects meta-analysis of 10 studies (exponential form)

Cumulative estimate	95% CI		z	P value
	Lower	Upper		
0.958	0.019	48.777	-0.022	0.983
2.288	1.142	4.584	2.335	0.020
2.397	1.241	4.632	2.602	0.009
1.919	1.160	3.173	2.538	0.011
1.960	1.234	3.114	2.850	0.004
2.024	1.319	3.105	3.227	0.001
2.144	1.442	3.187	3.767	0.000
1.872	1.298	2.700	3.355	0.001
1.917	1.361	2.700	3.724	0.000
1.961	1.412	2.722	4.020	0.000

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες. Πιο κάτω φαίνεται και το αντίστοιχο διάγραμμα για το αλληλόμορφο γονίδιο R.



Για τον γονότυπο RR:

```
metacum odsrr stdodsrr, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform

Cumulative random-effects meta-analysis of 10 studies (exponential
form)
-----
Cumulative      95% CI
estimate    Lower  Upper      z      P value
0.958      0.019 49.301   -0.021  0.983
2.102      0.217 20.369    0.641   0.522
1.233      0.172  8.844    0.209   0.835
1.028      0.192  5.516    0.032   0.974
0.999      0.213  4.684   -0.001   0.999
0.949      0.225  3.996   -0.072   0.943
0.955      0.247  3.684   -0.067   0.946
0.886      0.247  3.177   -0.186   0.852
0.884      0.262  2.980   -0.198   0.843
0.926      0.290  2.955   -0.130   0.896
```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα δεν έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.

Για τον γονότυπο GR:

```
metacum odsgr stdodsgr, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author)
eform

Cumulative random-effects meta-analysis of 10 studies (exponential
form)
-----
Cumulative      95% CI
estimate    Lower  Upper      z      P value
0.958      0.019 49.301   -0.021  0.983
2.235      1.051  4.754    2.089   0.037
2.387      1.173  4.859    2.399   0.016
2.073      1.203  3.571    2.626   0.009
2.108      1.284  3.461    2.948   0.003
2.169      1.376  3.418    3.336   0.001
2.312      1.519  3.520    3.912   0.000
1.984      1.348  2.920    3.472   0.001
2.031      1.417  2.911    3.855   0.000
2.078      1.473  2.933    4.162   0.000
```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.

Για το άθροισμα των γονότυπων GR+RR:

```

metacum odsnogg stdodsnogg, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform

Cumulative random-effects meta-analysis of 10 studies (exponential
form)
-----
Cumulative      95% CI
estimate      Lower Upper      z      P value
0.958         0.019 49.301   -0.021  0.983
2.303         1.108  4.788    2.235   0.025
2.444         1.224  4.879    2.533   0.011
2.043         1.199  3.481    2.629   0.009
2.082         1.279  3.389    2.949   0.003
2.144         1.370  3.357    3.335   0.001
2.286         1.510  3.462    3.907   0.000
1.971         1.344  2.890    3.476   0.001
2.018         1.413  2.884    3.857   0.000
2.066         1.468  2.907    4.163   0.000

```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.

Για τον πολυμορφισμό His1058 C/T τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:

Για το υπολειπόμενο αλληλόμορφο γονίδιο T:

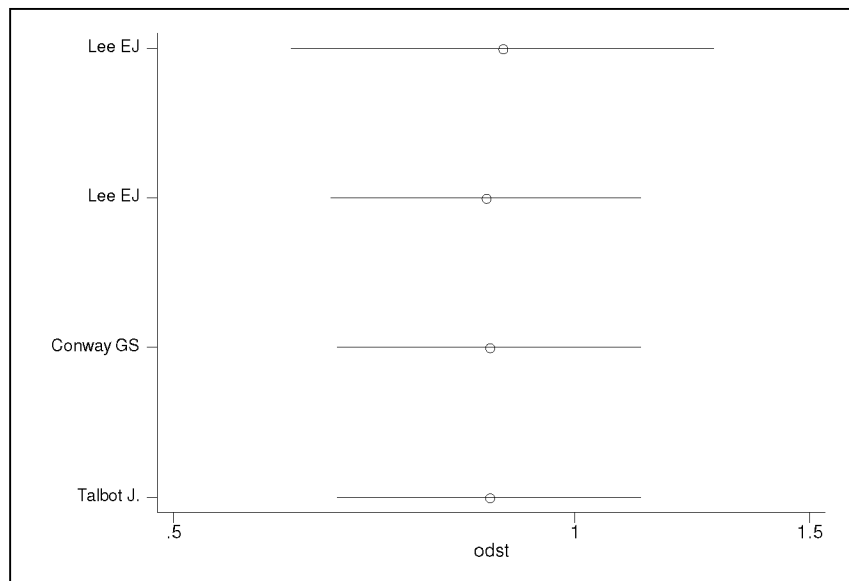
```

metacum odst stdodst, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform

Cumulative random-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)
-----
Cumulative      95% CI
estimate      Lower Upper      z      P value
0.883         0.613  1.271   -0.671  0.502
0.857         0.656  1.120   -1.127  0.260
0.863         0.664  1.121   -1.105  0.269
0.862         0.664  1.120   -1.110  0.267

```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Πιο κάτω φαίνεται και το αντίστοιχο διάγραμμα για το αλληλόμορφο γονίδιο T.



Για τον γονότυπο TT:

```
metacum odstt stdodstt, eff(r)gr xlabel(0.5,1,1.5) id(author) eform
```

Cumulative random-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)

```
-----
Cumulative   95% CI
estimate Lower Upper    z  P value
  1.033  0.501  2.128  0.087  0.931
  0.742  0.363  1.519 -0.815  0.415
  0.751  0.434  1.298 -1.026  0.305
  0.827  0.395  1.730 -0.505  0.614
```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.

Για τον γονότυπο CT:

```
metacum odsct stdodsct, eff(r)gr xlabel(0.5,1,1.5) id(author) eform
```

Cumulative random-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)

```
-----
Cumulative           95% CI
estimate Lower Upper      z  P value
  0.764  0.461  1.266  -1.045  0.296
  0.943  0.616  1.444  -0.268  0.789
  0.944  0.662  1.346  -0.318  0.750
  0.941  0.661  1.339  -0.339  0.735
```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα δεν έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.

Για το άθροισμα των γονότυπων CT+TT:

```
metacum odsnoc stdodsnoc, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
```

```
Cumulative random-effects meta-analysis of 6 studies (exponential form)
```

```
-----  
Cumulative      95% CI  
estimate      Lower Upper      z      P value  
4.831         1.768 13.201     3.071    0.002  
1.821         0.298 11.110     0.649    0.516  
1.357         0.580  3.173     0.704    0.481  
1.283         0.621  2.648     0.673    0.501  
1.114         0.523  2.376     0.280    0.779  
1.160         0.666  2.021     0.526    0.599
```

Στον πάνω πίνακα παρατηρούμε τα OR (Cumulative estimate) τα οποία δεν έχουν σημαντική απόκλιση το ένα από το άλλο. Βλέπουμε επίσης ότι η πρώτη έρευνα έχει σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες έρευνες.