



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ  
ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**Διερεύνηση της συσχέτισης πολυμορφικών  
γονιδίων με ασθένειες**

**Κάργας Βασίλειος**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
Υπεύθυνος  
Ιωαννίδης Αναστάσιος  
Επισκέπτης Επίκουρος Καθηγητής  
(Π.Δ. 407/80 )**

**Λαμία, 2009**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΠΑΡΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

Αρ. Έκφ. 4924  
Πρωτ./Αρ. 18/5/10



Στους γονείς μου  
και στον αδερφό μου Γαληνό

Στον αγαπημένο μου  
φίλο και καθηγητή, Παγκράτιο

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	2
ABSTRACT .....	3
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>4</b>
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	5
1.1 ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ .....	6
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ .....	9
1.2.1 ΕΝΑΡΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ .....	10
1.2.1.1 ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ .....	10
1.2.1.2 ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ .....	11
1.2.2 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ .....	12
1.2.3 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....	14
1.2.4 ΕΙΔΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ .....	15
1.3 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ .....	17
1.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΚΑΙ CYP1B1 .....	18
1.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs) .....	18
1.4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ VNTR .....	19
1.4.3 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P4501B1 (CYP1B1) .....	20
1.5 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ .....	21
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>23</b>
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....	24
2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	24
2.2.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ .....	26
2.2.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ .....	27
2.2.3 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (OR) .....	28
2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ .....	31
2.4 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ .....	34
2.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ HARDY-WEINBERG (HWE) .....	38
2.6 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ .....	39
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>41</b>
3.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Leu432Val .....	48
3.1.1 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	52
3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Arg48Gly .....	54
3.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Asn453Ser .....	58
3.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Ala119Ser .....	62

3.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ intron 1 (c→t) .....	64
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>66</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>75</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>81</b>
6.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....	82
6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΣΦΑΛΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ .....	95
6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΗΨΕ .....	107
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>	<b>112</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο Στερεάς Ελλάδας Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοιατρική, από τον Σεπτέμβριο του 2007 έως τον Ιούνιο του 2009. Η υλοποίηση της παρούσας εργασίας επιτεύχθηκε χάρις την βοήθεια ορισμένων ανθρώπων που θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Τον επιβλέποντα κ. *Αναστάσιο Ιωαννίδη* επισκέπτη επίκουρο καθηγητή γενετικής ο οποίος με βοήθησε καθόλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας και ήταν κοντά μου πάντα με συμβουλές και παρατηρήσεις. Η προσωπικότητα του και η εμπειρία του στον επιστημονικό χώρο, με βοήθησαν στην διαμόρφωση της επιστημονικής μου αντίληψης.

Τον κ. *Παντελή Μπάγκο* επίκουρο καθηγητή του Πανεπιστημίου Στερεάς Ελλάδας ο οποίος με τις πολύτιμες γνώσεις του στην Βιολογία και στη Βιοπληροφορική με βοήθησε σε όλο το πρακτικό μέρος της εργασίας, διευρύνοντας τους πνευματικούς μου ορίζοντες και δίνοντας μου τις πρώτες γνώσεις στον ερευνητικό τομέα.

Για μένα αποτελεί τιμή που αυτοί οι δύο διακεκριμένοι επιστήμονες αφιέρωσαν μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους για την καθοδήγηση και παρακολούθηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Την τριμελή εξεταστική επιτροπή που απαρτίζεται από τον κ. Ευριπίδη Μάρκου, κ. Παντελή Μπάγκο και κ. Αναστάσιο Ιωαννίδη για το πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Την κ. *Αλεξάνδρα Μίγκου* υπεύθυνη της βιβλιοθήκης του Πανεπιστημίου Στερεάς Ελλάδας που με βοήθησε στην εύρεση χρήσιμων βιβλίων κατά την διάρκεια της εργασίας μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γονίδιο CYP1B1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P450, που εμπλέκεται στην υδροξυλίωση των οιστρογόνων σε 4-OH-οιστρογόνα. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p21-22 και αποτελείται από τρία εξώνια. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του CYP1B1 έχουν κατά καιρούς συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου, μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος του προστάτη. Στην παρούσα μελέτη συγκεντρώσαμε και πραγματοποιήσαμε μετά-ανάλυση όλων των βιβλιογραφικών δεδομένων που συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς του CYP1B1 με τον καρκίνο του προστάτη. Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 8 μελέτες με συνολικά 3886 ασθενείς και 3544 υγιή άτομα (μάρτυρες). Οι πολυμορφισμοί που μας απασχόλησαν ήταν: για το εσώνιο 1 ο 13 (C→T) (3 μελέτες) για το εξώνιο 2 ο 48(C→G) που οδηγεί σε αντικατάσταση Arg→Gly (5 μελέτες) και ο 119(G→T) που οδηγεί στην αντικατάσταση Ala→Ser (3 μελέτες) και για το εξώνιο 3 ο 432(C→G) που οδηγεί στην αντικατάσταση Leu→Val (8 μελέτες) και ο 453(A→G) που οδηγεί στην αντικατάσταση Asn→Ser (5 μελέτες). Ασθενείς συσχετίσεις βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό Asn453Ser.



## ABSTRACT

CYP1B1 encodes for cytochrome P450, which is involved in hydroxylation of estrogens to 4-OH-estrogens. CYP1B1 is located in chromosome 2p21-22 and is composed of 3 exons. Various single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP1B1 gene have been implicated in susceptibility to various forms of cancer, such as prostate. We conducted here, a meta-analysis to evaluate the association of CYP1B1 variants with the prostate cancer. We identified 8 eligible studies, which included 3886 cases and 3544 healthy controls. The polymorphisms of interest were: the 13 (C→T) intron 1 polymorphism (3 studies), the 48 (C→T) exon 2 polymorphism that results in substitution Arg→Gly (5 studies), the 119 (G→T) exon 2 polymorphism that results in substitution Ala→Ser (3 studies), the 432 (C→T) exon 3 polymorphism that results in substitution Leu→Val (8 studies) and 453 (A→G) exon 3 polymorphism that results in substitution Asn→Ser (5 studies). Weak association was found between Asn453Ser polymorphism and prostate cancer.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου του ανδρικού πληθυσμού. Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος η οποία έχει τραβήξει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με σκοπό την συνολική διαχείριση της (πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία). Διάφορες έρευνες έχουν γίνει κατά καιρούς στις οποίες εξετάζονται οι λόγοι και οι τρόποι εμφάνισης της νόσου. Πολλές από αυτές ορίζουν ότι διάφοροι γονιδιακοί πολυμορφισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ασθένειας.

Η εξέλιξη της γενετικής και η συνεργασία της με άλλες επιστήμες όπως η στατιστική και η πληροφορική, έχει δώσει απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα που για χρόνια παρέμεναν αναπάντητα. Σε πολλές ασθένειες και κυρίως σ' αυτές που αναφέρονται στο καρκίνο, οι επιστήμονες προσπαθούν να προσδιορίσουν τις αιτίες που τις προκαλούν, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον τους και στο γενετικό υλικό.

Η κατανόηση και η αποκωδικοποίηση του μεγαλύτερου μέρους του γενετικού μας υλικού (DNA), έστρεψε το ενδιαφέρον στη μελέτη γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με την έναρξη ή και την εξέλιξη μιας ασθένειας.

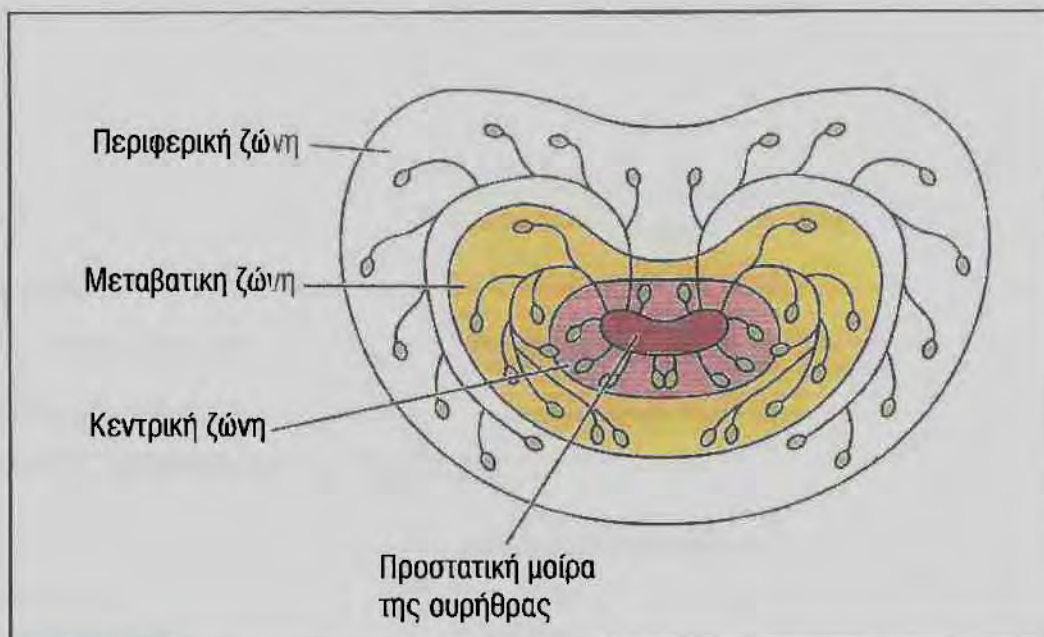
Ο σκοπός της εργασίας είναι η πραγματοποίηση μιας μετα-ανάλυσης των επιδημιολογικών μελετών, έτσι ώστε να εξετάσουμε τη συσχέτιση του γονιδίου CYP1B1 με τον καρκίνο του προστάτη. Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης αποτελεί ένα σχετικά καινούριο στατιστικό εργαλείο το οποίο φέρει αξιόλογα αποτελέσματα. Η μελέτη των έξι πολυμορφισμών του γονιδίου CYP1B1 που θα εξετάσουμε παρακάτω, αντανακλά τη συσχέτιση αυτού με τον καρκίνο του προστάτη.

## 1.1 ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ

Ο προστατικός αδένας αποτελεί μέρος του γενετικού συστήματος του άνδρος και κατέχει σημαντικό ρόλο στην ομαλή εξέλιξη της αναπαραγωγικής διαδικασίας. Η ακριβής τοποθεσία του είναι εκατέρωθεν της ουροδόχου κύστης, 1-2 εκ πίσω από την ηβική σύμφυση και μπροστά από το ορθό μέσω του οποίου ψηλαφάτε. Το σχήμα του αδένος έχει τη μορφή κάστανου και οι διαστάσεις αυτού (σε έναν ηλικιωμένο άνθρωπο) είναι 2-5.3 εκ. μήκος, 4-4.5 εκ πλάτος και 15-20 γρ. βάρος (1). Ο προστάτης περιβάλλεται από μια ινοελαστική κάψα πλούσια σε λείες μυϊκές ίνες. Διαφράγματα από τη κάψα εισέρχονται μέσα στον αδένος και το διαιρούν σε τέσσερις λοβούς, οι οποίοι στους ενήλικες άνδρες δεν διαχωρίζονται πλήρως. Ακόμη, διασχίζεται από την προστατική μοίρα της ουρήθρας και τους δύο εκσπερματικούς πόρους που εκβάλλουν σε αυτήν (2).

Η αγγείωση του πραγματοποιείται από τη κάτω κυστική και μέση αιμορροϊδική αρτηρία και νευρώνεται από το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό σύστημα (1).

Ο προστάτης διακρίνεται από 3 ζώνες: Τη *κεντρική ζώνη* η οποία καταλαμβάνει το 25% του όγκου του αδένος. Τη *περιφερική ζώνη* η οποία καταλαμβάνει το 70% του αδένος και είναι η θέση ανάπτυξης του προστατικού καρκίνου και τέλος τη *μεταβατική ζώνη* η οποία καταλαμβάνει το 5% του αδένος και είναι η θέση ανάπτυξης της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (Εικόνα 1.1.1).



Εικόνα 1.1.1. Τομή του προστάτη που δείχνει την κατανομή των αδένων του σε τρεις ζώνες. Οι πόροι του αδένα εκβάλλουν στην ουρήθρα (Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro Βασική Ιστολογία II 5η Ελληνική Έκδοση Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης).

Ο προστάτης αποτελείται από ένα σύνολο 30-50 διακλαδιζόμενους σωληνοκυψελοειδείς αδένες οι οποίοι αφού συνενωθούν σε 15 περίπου κοινούς πόρους εκβάλλουν από αντίστοιχα τρήματα στην προστατική μοίρα της ουρήθρας.

Οι σωληνοκυψελοειδείς αδένες του προστάτη σχηματίζονται από κυβοειδές ή κυλινδρικό ψευδοπολύστιβο επιθήλιο. Ένα εξαιρετικά πλούσιο ινολειομυώδες στρώμα περιβάλλει τους αδένες. Οι αδένες παράγουν προστατικό υγρό το οποίο αναμειγνύεται με το σπέρμα κατά τη διαδικασία της εκσπερμάτισης (2). Τα αλκαλικά αυτά υγρά δίνουν στα σπερματοζωάρια χαρακτηριστική οσμή και προστατεύουν το σπέρμα από το όξινο ΡΗ του κόλπου της γυναίκας (1). Συχνά, μέσα στους αυλούς των προστατικών αδένων παρατηρούνται μικρά σφαιρικά σωμάτια από γλυκοπρωτεΐνες, 0,2-2mm σε διάμετρο, τα οποία συχνά είναι ασβεστοποιημένα. Αυτά ονομάζονται προστατικά συγκρίμματα ή αμυλοειδή σωμάτια (2).

Η δομή και η λειτουργία του προστάτη εξαρτώνται από μια κατηγορία ορμονών που ονομάζονται στεροειδείς ορμόνες. Οι ορμόνες αυτές διακρίνονται σε ανδρογόνα και οιστρογόνα. Η τεστοστερόνη είναι η κυριότερη ανδρογόνος ορμόνη, η οποία εκκρίνεται από τους όρχεις και είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του προστάτη και τις επιδιδυμίδας, αλλά και για τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του άρρενος φύλου όπως της τριχοφυΐας, της βαθιάς φωνής και του χαρακτηριστικού μυϊκού συστήματος.

Ο σχηματισμός των ορμονών στους όρχεις ρυθμίζεται από την υπόφυση. Από της δυο γοναδοτρόπους ορμόνες, τη θηλακιοτρόπο ορμόνη η οποία είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση των ωοθυλακίων και την ωχρινοποιητική η οποία διεγείρει την παραγωγή των ορμονών στα κύτταρα του Leydig των όρχεων (3).

Η βιοσύνθεση της τεστοστερόνης γίνεται στα κύτταρα του Leydig. Αρχίζει από τη χοληστερίνη η οποία αποικοδομείται σε πρεγνενολόνη. Στη συνέχεια υπάρχουν δυο δυνατότητες μεταβολικής κατευθύνσεως οι οποίες οδηγούν στο άμεσο πρόδρομο της τεστοστερόνης, την ανδροστενδιόνη. Τέλος, η αποικοδόμηση της ανδροστενδιόνης μας δίνει τη τεστοστερόνη (3,4).

Η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη (κύρια στεροειδής ορμόνη των θηλέων) κυκλοφορούν στο πλάσμα το πλείστον ενωμένες με πρωτεΐνες του πλάσματος και ιδιαίτερα τη σφαιρίνη που συνδέει τις ορμόνες του φύλου. Η οιστραδιόλη διεγείρει τη σύνθεση της σφαιρίνης από το ήπαρ και η τεστοστερόνη τη μειώνει. Η συγκέντρωση της σφαιρίνης στα θήλεα είναι διπλάσια από τα άρρενα. Η αύξηση της σφαιρίνης ενισχύει τις επιδράσεις που σχετίζονται με την οιστραδιόλη, ενώ η μείωση της αυξάνει τις ανδρογόνες επιδράσεις (4).

## 1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Τα κύτταρα που υφίστανται μεταλλάξεις οι οποίες διαταράσσουν τη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, αρχίζουν να διαιρούνται χωρίς να λαμβάνουν υπόψη τις συνολικές ανάγκες του οργανισμού και αυτός ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός εκδηλώνεται ως όγκος ή νεόπλασμα. Όσο χρονικό διάστημα τα νεοπλασματικά κύτταρα παραμένουν με τη μορφή ενός ακέραιου όγκου με σαφή όρια, χαρακτηρίζονται ως καλοήγη και ο όγκος μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά. Ωστόσο, αν συμβούν και άλλες μεταλλάξεις που καθιστούν αυτά τα νεοπλασματικά κύτταρα ικανά να διεισδύουν σε άλλους ιστούς και να σχηματίζουν “αποικίες”, σχηματίζοντας έτσι εκτεταμένους δευτερογενείς όγκους ή μεταστάσεις, ο αρχικός όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήγη και ταξινομείται στους καρκίνους (13). Έτσι ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί κακοήγη όγκο, ενώ η υπερπλασία αποτελεί καλοήγη όγκο.

Στις μέρες μας ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί μία από τις συχνότερες ασθένειες στο ανδρικό φύλο συνιστώντας ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες και στη δυτική Ευρώπη εκτιμάται ότι βρίσκεται στην πρώτη θέση από άποψη συχνότητας και στη δεύτερη όσον αφορά τις θανατηφόρες μορφές καρκίνου στον ανδρικό πληθυσμό (11).

Ο καρκίνος του προστάτη σπάνια εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 45 ετών. Η συχνότητα και η θνησιμότητα της νόσου αυξάνουν με τη πάροδο της ηλικίας και το μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάζεται γύρω στα 70, ενώ μειώνεται μετά την ηλικία των 80 ετών. Αντίθετα η θνησιμότητα των ασθενών, στους οποίους η νόσος διαγνώστηκε πριν την ηλικία των 55 ετών είναι μεγάλη. Τούτο πιθανόν να οφείλεται στην επιθετικότερη μορφή των καρκίνων σε νεαρά άτομα, ή στη μη έγκαιρη διάγνωση. Τα περισσότερα προβλήματα για τη διερεύνηση της αιτιολογίας προκύπτουν από την ετερογένεια και την ποικιλία του καρκίνου του προστάτη (10).

## 1.2.1 ΕΝΑΡΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

Τα ανδρογόνα δίνουν το αρχικό σήμα για τη σύνθεση του DNA και την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης μέσα στον προστάτη. Αυτό προκαλείται μέσω ενός σύνθετου μηχανισμού και συμβαίνει όχι μόνο στο φυσιολογικό προστάτη, αλλά στην κεντρική υπερπλασία (ΚΥΠ) και στον καρκίνο. Το σήμα δίνεται μέσω διαφόρων αυξητικών παραγόντων που ρυθμίζουν την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι εξωκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και πυροδοτούν τις ενδοκυττάρια οδούς μεταβίβασης σήματος. Οι ενδοκυττάρια οδοί καταλήγουν στην αναίρεση των ρυθμιστικών εκείνων μηχανισμών, που αναστέλλουν τη κυτταρική αύξηση και εμποδίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς, μια διαταραχή αυτών των μηχανισμών μπορεί να αποτελέσει το πρώτο βήμα στη γένεση του καρκίνου του προστάτη (10).

### 1.2.1.1 ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΟ-ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ.

Τα πρώτο-ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της αύξησης και τις διαφοροποίησης των κυττάρων. Αυτή η φυσιολογική δραστηριότητα επηρεάζεται κυρίως από τους αυξητικούς παράγοντες και από τους γειτονικούς ιστούς. Τα γειτονικά φυσιολογικά κύτταρα εξασκούν περιοριστική δράση στην ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων στον προστάτη (10).

Η επανενεργοποίηση ορισμένων πρώτο-ογκογονιδίων με σημειακή μετάλλαξη 'point mutation' (αλλαγή σε μία βάση), με ενίσχυση 'amplification' (πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου), με διαμετάθεση 'translocation' (επαναδιάταξη χρωμοσωμάτων ή τμήματός τους που έχει σαν αποτέλεσμα ένα γονίδιο να τοποθετείται κάτω από διαφορετική ρυθμιστική ακολουθία από την



φυσιολογική) και με εισαγωγή DNA ιών, μπορεί να μεταβάλλει την έκφραση τους ή να αυξήσει την πιθανότητα μετάλλαξης, εκτρέποντας τα κύτταρα από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι επανενεργοποιημένες μορφές αυτών των γονιδίων ονομάζονται ογκογονίδια (*c\*-onc*, **cellular-oncogene**) και η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή των μηχανισμών που ελέγχουν την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση οδηγώντας στην έκφραση κακοήθους φαινότυπου (12).

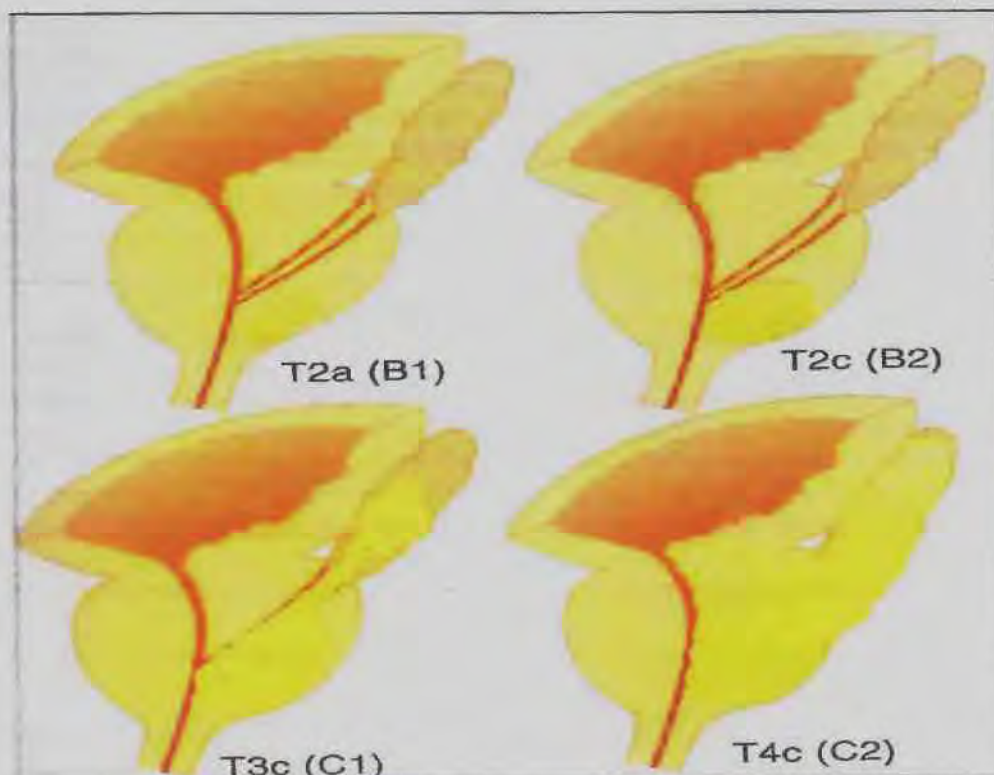
Για την έκφραση κάποιας κακοήθειας συνήθως απαιτείτε η συνύπαρξη περισσότερων από ένα ογκογονίδια, για παράδειγμα *C-ras* και *C-myc*. Η σύγχρονη δραστηριότητα αυτών των ογκογονιδίων μπορεί να ακυρώσει την ανασταλτική ιδιότητα των γειτονικών κυττάρων και να επιτρέψει την ανάπτυξη όγκου (10).

### **1.2.1.2 ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ.**

Το 1970 διαπιστώθηκε ότι η συγχώνευση κακοήθων με μη κακοήθη κύτταρα οδηγούσε σε καταστολή του κακοήθους φαινότυπου. Έτσι μετά από έρευνες διαπιστώθηκε ότι τα φυσιολογικά κύτταρα περιέχουν γονίδια που προφυλάσσουν το άτομο από το καρκίνο. Τα γονίδια αυτά λέγονται ογκοκατασταλτικά γονίδια (*p53*, *Rb*) και λειτουργούν ως ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου ελέγχοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η απώλεια αυτών των γονιδίων μπορεί να προκαλέσει καρκίνο και φαίνεται πως στο καρκίνο του προστάτη που εμφανίζεται σε νεώτερα άτομα, πιθανόν να υπάρχει απώλεια της λειτουργίας των ειδικών αυτών γονιδίων (10).

### 1.2.2 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΚΤΑΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ένα σημαντικό στοιχείο που επηρεάζει την τοπική εξάπλωση του καρκίνου του προστάτη είναι η ανατομική εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας. Τα νεοπλάσματα που πρωτοεμφανίζονται στην κορυφή ή στη βάση του προστατικού αδένου έχουν περισσότερες πιθανότητες να επεκταθούν έξω από την κάψα του προστάτη. Αυτό συμβαίνει επειδή σε αυτές τις ανατομικές θέσεις η κάψα του προστάτη παρουσιάζει “αδύνατα” σημεία. Ακόμη, αδύνατα σημεία της κάψας αποτελούν οι περιοχές όπου ο προστάτης έρχεται σε επαφή με άλλα παρακείμενα όργανα και τα σημεία εκείνα όπου τα αγγεία και τα νεύρα εισέρχονται μέσα στον προστατικό αδένου. Τέτοιες περιοχές είναι, η προστατοουρηθρική αναστόμωση και τα σημεία κατά τα οποία οι εκσπερματιστικοί πόροι εισέρχονται μέσα στον προστάτη (Εικόνα 1.2.2.1, C1, C2).



Εικόνα 1.2.2.1. Τοπική σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη (Α.Ν Κωσταντόπουλος Ουρολογία II Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης).

Η τοπική σταδιοποίηση της νόσου μπορεί να περιγραφεί από τέσσερα στάδια (Εικόνα 1.2.2.1). Στο πρώτο στάδιο παρατηρούμε ότι ο όγκος βρίσκεται στο κάτω μέρος του αδένου (T2a) και έχει πολύ μικρό μέγεθος. Μόνο με τον παράγοντα της τύχης μπορεί να προσδιοριστεί σε αυτό το στάδιο ο όγκος, διότι δεν ψηλαφάτε με δακτυλική εξέταση και δεν φαίνεται στους υπερήχους. Στο δεύτερο στάδιο βλέπουμε ότι ο όγκος περιορίζεται μέσα στον προστάτη, αλλά αυξάνεται το μέγεθος του έτσι ώστε να καταλαμβάνει το μισό λοβό (T2c).

Στη συνέχεια ο όγκος επεκτείνεται έξω από τη κάψα του προστάτη και διηθεί στις σπερματοδόχους κύστες (T3c). Τέλος, ο όγκος εφάπτεται ή έχει διηθήσει σε παρακείμενους ιστούς (T4c), όπως τον αυχένα της κύστης ή τον έξω σφιγκτήρα.

Η επέκταση του προστατικού καρκίνου προς το ορθό είναι σπάνια, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ανάμεσα στον προστάτη και στο ορθό υπάρχει η ισχυρή περιτονία του Denovilliers. Επίσης σπάνια είναι και η διήθηση του προστατικού καρκίνου στο τρίγωνο της κύστης και των ουρητηρικών στομιών, αυτό παρατηρείται σε πολύ προχωρημένα στάδια της νόσου.

Εκτός από την τοπική εξάπλωση της νόσου υπάρχει και η αιματογενής διασπορά του προστατικού καρκίνου, η οποία γίνεται προς τον οστίτη ιστό. Το 85% των ασθενών που πεθαίνουν από το καρκίνο του προστάτη έχουν ταυτόχρονα και οστικές μεταστάσεις. Οι συνήθεις εστίες που προσβάλλονται είναι τα οστά της λεκάνης, η σπονδυλική στήλη, οι πλευρές και το κρανίο (15).

Σήμερα στην Ευρώπη για τη σταδιοποίηση του προστατικού καρκίνου, χρησιμοποιείται το σύστημα TNM, το οποίο έγινε αποδεκτό το 1992. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει 3 μεγάλα στάδια της νόσου:

- **Τοπική νόσος (T).** Γίνεται εκτίμηση του όγκου και εξετάζεται η τοπική σταδιοποίηση του.
- **Περιοχικοί λεμφαδένες (N).** Εξετάζεται αν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.

- **Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M).** Αναζητείται η ύπαρξη τους αλλά και η τοποθεσία τους.

Τέλος, στις Ηνωμένες πολιτείες χρησιμοποιούν ένα δικό τους σύστημα σταδιοποίησης της νόσου το οποίο με τη σειρά του περιλαμβάνει τα εξής στάδια (15):

- **Στάδιο Α.** Ο όγκος δεν ψηλαφάτε με δακτυλική εξέταση και ανακαλύπτεται τυχαία.
- **Στάδιο Β.** Ο όγκος ψηλαφάτε με δακτυλική εξέταση, αλλά δεν διασπά τη κάψα.
- **Στάδιο Γ.** Ο όγκος διασπά τη κάψα και προσβάλλει της σπερματοδόχους κύστεις.
- **Στάδιο Δ.** Παρατηρούνται μεταστάσεις του όγκου σε λεμφαδένες και σε απομακρυσμένα όργανα.

### 1.2.3 ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι καρκινικοί δείκτες ορίζονται από τη κλινική βιοχημεία ως κάθε ουσία που βρίσκεται στα καρκινικά κύτταρα ή παράγεται από αυτά και εκκρίνεται στα βιολογικά υγρά. Η ιατρική επιστήμη έχει σήμερα στη διάθεσή της πάνω από 100 διαφορετικούς καρκινικούς δείκτες (14). Στη παρούσα εργασία θα αναφερθούμε σε δύο καρκινικούς δείκτες που μας βοηθούν να εντοπίσουμε το καρκίνο του προστάτη.

Το 1938 έγινε η πρώτη παρατήρηση ότι η όξινη φωσφατάση αυξάνεται στον ορό του αίματος σε ασθενείς με προστατικό καρκίνο. Η όξινη φωσφατάση σπάνια αυξάνεται στον ορό του αίματος, όταν το νεόπλασμα είναι εντοπισμένο μέσα στον προστάτη. Η ανεύρεση υψηλής τιμής όξινης φωσφατάσης σημαίνει την ύπαρξη μεταστατικής νόσου.

Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βοηθά στη ρευστοποίηση του σπέρματος. Το PSA παράγεται αποκλειστικά

από το επιθήλιο του προστάτη και εντοπίζεται στο σπέρμα και στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων του προστάτη. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 240 αμινοξέων και έχει μοριακό βάρος 34.000 daltons. Οι φυσιολογικές τιμές του PSA σε νέους άνδρες είναι από 0-4 ng/ml. Οι τιμές αυτές δεν επηρεάζονται μόνο στο καρκίνο του προστάτη αλλά και στην καλοήγη υπερπλασία του. Τελευταία, βρέθηκε πως το PSA κυκλοφορεί στον ορό του αίματος σε δυο μοριακές μορφές, μια ελεύθερη και μια δεσμευμένη. Στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι το δεσμευμένο PSA είναι σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη από ότι στους ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία. Επίσης η αναλογία του ελεύθερου προς το ολικό PSA (PSA ratio) είναι υψηλότερη στην καλοήγη υπερπλασία. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην καλύτερη ερμηνεία του καρκινικού δείκτη.

Οι καρκινικοί δείκτες δεν μας βοηθούν μόνο πριν την διάγνωση της νόσου αλλά και μετά τη θεραπεία αυτής. Αν μετά από μια θεραπεία παρατηρηθεί αύξηση της τιμής του PSA, συμπεραίνουμε ότι η νόσος δεν ανταποκρίθηκε στη θεραπεία. Η αύξηση αυτή μπορεί να προηγείται 2-6 μήνες από την επιδείνωση της νόσου. Συνεπώς μπορούμε να αντιληφθούμε πόσο σημαντικές πληροφορίες μπορεί να μας παρέχει η εξέταση του PSA.

Σε όσες μελέτες έγινε σύγκριση του PSA με την προστατική όξινη φωσφατάση, βρέθηκε ότι το PSA ως δείκτης του προστατικού καρκίνου έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από αυτή της όξινης φωσφατάσης και οι τιμές του PSA αντανακλούν πολύ πιστότερα την κλινική εικόνα των ασθενών (15).

#### **1.2.4 ΕΙΔΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

Κατά καιρούς έχουν διαπιστωθεί διάφορες ιστοπαθολογικές μορφές του καρκίνου του προστάτη. Στο 95% των περιπτώσεων είναι αδenoκαρκίνωμα που προέρχεται από τα προστατικά επιθηλιακά κύτταρα. Το 75% των

αδενοκαρκινωμάτων αυτών προέρχονται από τη περιφερική ζώνη του προστάτη, το 15-20% από τη κεντρική και το 10-15% από τη μεταβατική.

Τα είδη προστατικών νεοπλασμάτων διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

A) προερχόμενα από το επιθήλιο νεοπλάσματα, B) προερχόμενα από το στρώμα νεοπλάσματα και Γ) τα δευτεροπαθή νεοπλάσματα.

Τα νεοπλάσματα προερχόμενα από το επιθήλιο περιλαμβάνουν το αδενοκαρκίνωμα, το καρκίνωμα από μεταβατικό επιθήλιο και το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα. Τα νεοπλάσματα προερχόμενα από το στρώμα, περιλαμβάνουν το ραβδομυοσάρκωμα και το λειομυοσάρκωμα. Τέλος τα δευτεροπαθή νεοπλάσματα περιλαμβάνουν τις διηθήσεις προς την ουροδόχο κύστη και το ορθό αλλά και τις μεταστατικές καταστάσεις.

Ο βαθμός διαφοροποίησης του προστατικού αδενοκαρκινώματος είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη πρόγνωση και τη θεραπεία του. Σήμερα υπάρχουν πολλά συστήματα με τα οποία μπορεί να αξιολογηθεί ο βαθμός διαφοροποίησης του αδενοκαρκινώματος. Το πλέον διαδεδομένο είναι το Gleason score. Με βάση αυτό το σύστημα, όταν το Gleason score είναι 2-4 παρατηρείται ένα νεόπλασμα υψηλής διαφοροποίησης (έχουν καλή ανταπόκριση σε κάθε μορφή θεραπείας), όταν είναι 5-7 έχουμε ένα νεόπλασμα μέσης διαφοροποίησης και όταν το Gleason score είναι 8-10 παρατηρείται ένα νεόπλασμα χαμηλής διαφοροποίησης (έχουν κακή πρόγνωση ανεξαρτήτως θεραπείας). Η βαθμολογία στο σύστημα Gleason score υπολογίζεται με βάση τη μορφολογία και αρχιτεκτονική διάταξη των αδενίων του προστάτη (15).

Μια πιθανή αιτιολογία γενετικής βάσης για την ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη είναι η δυσλειτουργία του κυτοχρώματος P450. Ακολούθως θα διερευνήσουμε τη συσχέτιση των πολυμορφισμών του κυτοχρώματος P4501B1 με τον καρκίνο του προστάτη.

### 1.3 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ

Οι φορείς των ηλεκτρονίων μεταξύ συνένζυμου Q (CoQ) και  $O_2$  είναι τα κυτοχρώματα τα οποία περιέχουν ως προσθετική ομάδα την αίμη. Ο κεντρικός ρόλος των φορέων αυτών ανακαλύφθηκε το 1925 από τον D.Keilin. Ο σίδηρος της αίμης μεταξύ των κυτοχρωμάτων εναλλάσσεται από την δισθενή ( $Fe^{2+}$ ) στην τρισθενή ( $Fe^{3+}$ ) μορφή του σιδήρου. Η αναγωγή του  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$  γίνεται με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Δηλαδή τα κυτοχρώματα μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε αντίθεση με το NAD, FAD και CoQ που μπορούν να δεχτούν δυο ηλεκτρόνια. Τα πρότυπα οξειδοαναγωγικών δυναμικών των διαφόρων κυτοχρωμάτων διαφέρουν μεταξύ τους, αυτό οφείλεται στις διαφορές των πεπτιδικών τους αλυσών καθώς και στον τρόπο σύνδεσης της αίμης με αυτές. Βρίσκονται είτε ως μονομερείς πρωτεΐνες (όπως το κυτόχρωμα c) είτε ως υπομονάδες μεγαλύτερων ενζυματικών συγκροτημάτων που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Εντοπίζονται στη μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων, στους χλωροπλάστες των φυτών, στους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς, και στα βακτήρια.

Έρευνες των τελευταίων δεκαετιών έδειξαν ότι πολλές υδροξυλιώσεις ενδογενών και εξωγενών ουσιών εξυπηρετούνται από τα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα συστήματα αυτά των μικροσωματίων περιέχουν κυτοχρώματα P450. Τα κυτοχρώματα αυτά αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, με μοριακό βάρος 40000-44000 daltons. Ονομάστηκαν έτσι διότι τα παράγωγα που προκύπτουν από αυτά με αντίδραση με μονοξείδιο του άνθρακα απορροφούν ισχυρά στα 450nm. Το πρόθεμα 'P' προκύπτει από τη λέξη pigment = χρωστική. Έχει πιστοποιηθεί η ύπαρξη τουλάχιστον 8 διαφορετικών ειδών κυτοχρωμάτων P450, που το κάθε ένα έχει κάποιο βαθμό εξειδίκευσης σε σχέση με την ουσία – υπόστρωμα που υδροξυλιώνεται (16).

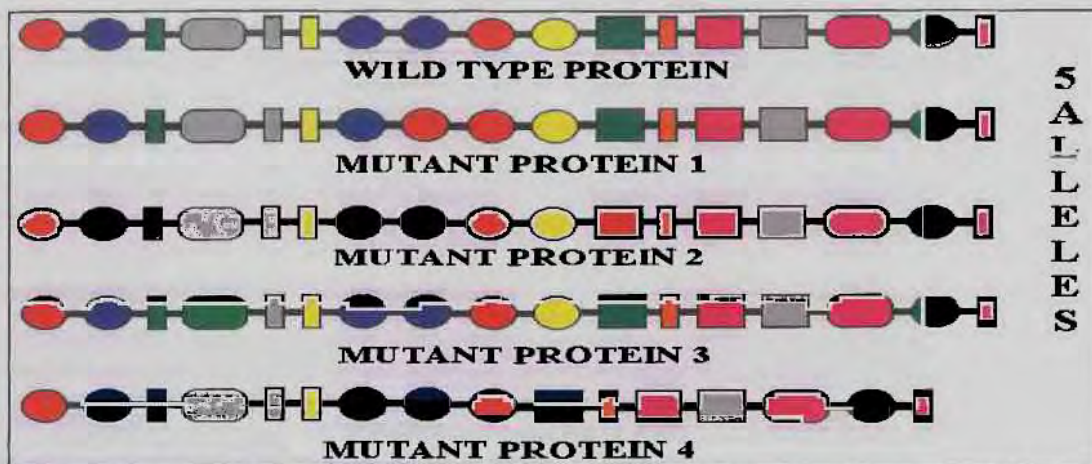
## 1.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ ΚΑΙ CYP1B1

Ως πολυμορφισμός ορίζεται η ύπαρξη πολλαπλών αλληλόμορφων σε έναν γενετικό τόπο, όπου τουλάχιστον δυο αλληλόμορφα εμφανίζονται με συχνότητες μεγαλύτερες του 1%. Μελέτες γονιδιακής σύστασης διαφόρων πληθυσμών δείχνουν την εμφάνιση διαφόρων πολυμορφισμών. Οι πολυμορφισμοί προκύπτουν από σημειακές μεταλλάξεις (SNPs) ή σπανιότερα λόγω απώλειας ή προσθήκης τμήματος του γενετικού υλικού. Ωστόσο, δεν διατηρούνται πάντα στον πληθυσμό. Πολλές φορές ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα χάνονται, ή εξαπλώνονται σε ευρύτερα στρώματα του πληθυσμού.

### 1.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΕΝΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ (SNPs)

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου είναι η πιο συνηθισμένη κατηγορία πολυμορφισμών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Τα γονίδια αποτελούνται από κωδικοποιούμενες (εξώνια) και μη κωδικοποιούμενες (εσώνια) περιοχές. Μια σημειακή μετάλλαξη σε μια βάση, μπορεί να οδηγήσει στην παραλλαγή ενός αμινοξέος σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αν η πολύμορφη αυτή θέση εντοπίζεται σε περιοχή που δεν κωδικοποιείται κάποιο αμινοξύ, δεν γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Αντίθετα, αν η σημειακή μετάλλαξη πραγματοποιείται σε μια περιοχή ενός εξονίου, τότε θα υπάρχει παραλλαγή σε ένα αμινοξύ και συνεπώς στην παραγόμενη πρωτεΐνη (Εικόνα 1.4.1).



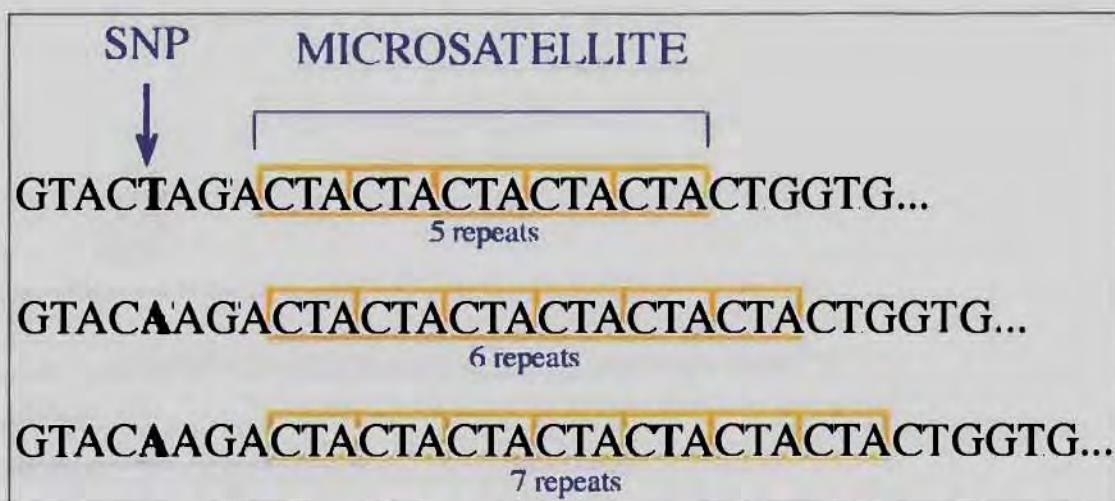


Εικόνα 1.4.1. Παρατηρούνται τέσσερις παραλλαγές μιας πρωτεΐνης που ευθύνονται σε σημειακές μεταλλάξεις.

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου εμφανίζονται μια κάθε περίπου 100-1000bp (ζεύγη βάσεων), και ευθύνονται για το 90% της ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών ατόμων.

#### 1.4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ VNTR

Οι VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) ή Microsatellite (επαναληπτικές ακολουθίες) πολυμορφισμοί περιγράφηκαν από τους Wyman και White γύρω στο 1980 (Εικόνα 1.4.2). Αποτελούν μια σειρά αλληλόμορφων τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους λόγω του ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων των αλληλουχιών DNA, στην περιοχή μεταξύ δυο θέσεων αναγνώρισης ενός περιοριστικού ενζύμου.

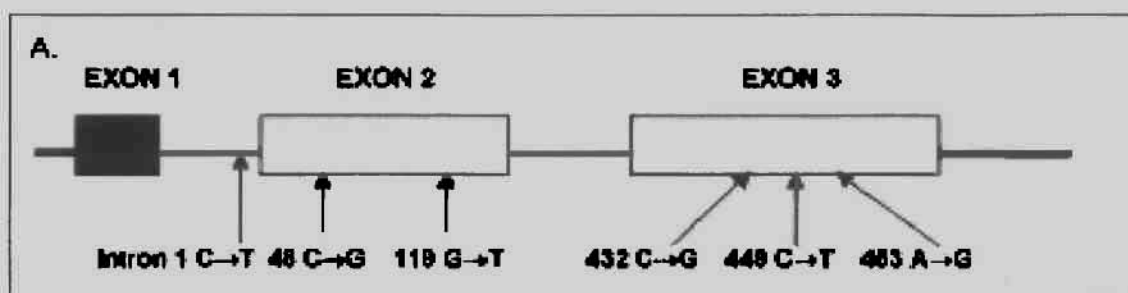


Εικόνα 1.4.2. Πολυμορφισμοί SNPs και Microsatellite.

Οι γενετικοί δείκτες που μας δίνουν τις περισσότερες πληροφορίες διαθέτουν μερικές δεκάδες ή και περισσότερα αλληλόμορφα, με συνέπεια να μην υπάρχει πιθανότητα μη συγγενικά άτομα να φέρουν τα ίδια αλληλόμορφα. Οι γενετικοί δείκτες VNTR αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση προσώπων.

### 1.4.3 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P4501B1 (CYP1B1)

Το γονίδιο CYP1B1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P450, που εμπλέκεται στην υδροξυλίωση των οιστρογόνων σε 4-OH-οιστρογόνα (9). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p21-22 και αποτελείται από τρία εξόνια και δυο εσώνια (εικόνα 1.4.3). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ξεκινά από το δεύτερο εξώνιο και έχει μήκος 1629 ζεύγη βάσεων, κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη από 543 αμινοξέα. Το εσώνιο 1 περιέχει μια πολυμορφική θέση στο νουκλεοτίδιο 13, το εξώνιο 2 περιέχει 2 πολυμορφικές θέσεις στα κωδικόνια 48 και 119 και το εξώνιο 3 περιέχει 3 πολυμορφικές θέσεις στα κωδικόνια 432, 449 και 453. Τέσσερις πολυμορφισμοί από τους παραπάνω οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέων, στα κωδικόνια 48 (Arg→Gly), 119 (Ala→Ser), 432 (Leu→Val) και 453 (Asn→Ser). Οι υπόλοιποι δύο πολυμορφισμοί είναι σιωπηλοί και οδηγούν σε αντικατάσταση νουκλεοτιδίων (εσώνιο 1: C→T και κωδικόνιο 449: C→T) (27).



Εικόνα 1.4.3. Σχηματική απεικόνιση της γενετικής δομής και των πολυμορφικών θέσεων του CYP1B1 (27).

## 1.5 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης (meta-analysis) αναπτύχθηκε από τον Eugene Glass. Ο ίδιος την χαρακτήρισε ως τη στατιστική ανάλυση των στατιστικών αναλύσεων (25). Ο Eugene Glass τη χρησιμοποίησε για να περιγράψει τη στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων προερχόμενα από ανεξάρτητες μελέτες, με σκοπό την ενσωμάτωση των συμπερασμάτων που προέρχονταν από κάθε μελέτη (26). Ο όρος λοιπόν μετα-ανάλυση αναφέρεται στη σύνθεση ανόμοιων συνόλων δεδομένων για την εξακρίβωση ενός συνοπτικού συμπεράσματος που προέρχεται από το σφαιρικό σώμα των στοιχείων (22). Μια αναζήτηση στη MEDLINE για άρθρα που αναφέρονται στη μετα-ανάλυση είναι αρκετή να μας πείσει για τη δύναμη της. Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο δημοσιεύονται περίπου 8000 άρθρα κλινικών δοκιμών που χρησιμοποιούν τη μέθοδο της μετα-ανάλυσης.

Η μετα-ανάλυση που πραγματοποιήσαμε στην μελέτη μας είναι βασισμένη σε διχοτομικές εκβάσεις, δηλαδή σε μελέτες που εξετάζουν ασθενείς και μάρτυρες (Case-Controls studies). Ως μέγεθος επίδρασης χρησιμοποιήσαμε το OR (Odds Ratio) που αντιπροσωπεύει τη πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός προς τη πιθανότητα να μην συμβεί. Η “δύναμη” μιας μετα-ανάλυσης εξαρτάται από τον αριθμό των μελετών που συμπεριλαμβάνουμε σε

αυτή. Συγκεκριμένα πρέπει να εξετάζονται χιλιάδες ασθενείς και μάρτυρες για να μπορούμε να αποδεχτούμε το αποτέλεσμα που θα προκύψει. Η δύναμη της μετα-ανάλυσης δε προέρχεται μόνο από το πλήθος των μελετών και των δειγμάτων, αλλά και από το πώς συνδυάζονται τα στοιχεία για να οδηγηθούμε στο αποτέλεσμα. Δύο μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συνδυάσουν τις μεμονωμένες εκτιμήσεις που προέρχονται από τις αρχικές μελέτες: το μοντέλο *καθορισμένων-επιδράσεων* (fixed effect model) και το μοντέλο *τυχαίων επιδράσεων* (random effect model) (22).

Η διεξαγωγή μιας σωστής μετα-ανάλυσης προϋποθέτει όσο το δυνατόν καλύτερη και εκτενέστερη αναζήτηση στη βιβλιογραφία, να βρεθούν δηλαδή όλες οι διαθέσιμες μελέτες. Κατά καιρούς έχουν εμφανισθεί διάφορα προβλήματα βιβλιογραφίας (γκρίζα βιβλιογραφία, ξενόγλωσση βιβλιογραφία, συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης, φαινόμενο του πρωτέα) τα οποία αν δεν τα λάβουμε υπόψη, μπορούμε να οδηγηθούμε σε υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων μας (5,6,7). Ακόμη, ένα κρίσιμο στάδιο κατά την διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης είναι η εξέταση του βαθμού ετερογένειας μεταξύ των μεμονωμένων μελετών. Η ανομοιογένεια μεταξύ των δειγμάτων που εξετάζουμε μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης. Τέλος, πρέπει να ελέγχουμε αν κάθε μελέτη που εισάγουμε στη μετα-ανάλυση μας βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg (βλέπε υλικά και μέθοδοι).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για την αναζήτηση των δεδομένων, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στη βάση δεδομένων της pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Οι μελέτες που αναζητήθηκαν είχαν ως επίκεντρο τη συσχέτιση των διαφόρων πολυμορφισμών του γονιδίου CYP1B1 με τον καρκίνο του προστάτη. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήσαμε κατά την αναζήτηση αυτών των μελετών ήταν: 'Cytochrome P4501B1', 'human CYP1B1', 'Prostate Cancer', 'tumor', 'Mutations', 'genetic Polymorphisms' και 'SNPs'. Ύστερα λοιπόν από μια εκτενή αναζήτηση και αφού συγκεντρώσαμε τις μελέτες που μας ενδιέφεραν, δημιουργήσαμε ένα excel όπου καταγράψαμε όλα τα γενικά στοιχεία κάθε μελέτης όπου περιελάμβαναν: το κωδικό του άρθρου (PMID), το συγγραφέα (author), τη χρονολογία έκδοσης (year), τη χώρα (country), την καταγωγή προέλευσης (racial descent), τα χαρακτηριστικά των ασθενών και μαρτύρων (case-controls characteristics), τον αριθμό των ασθενών (cases), τον αριθμό των μαρτύρων (controls) καθώς και ποιους πολυμορφισμούς εξετάζει κάθε μελέτη. Τέλος, δημιουργήσαμε ένα excel όπου καταχωρήσαμε τα δεδομένα που θα χρησιμοποιούσαμε στην ανάλυση μας μέσω του προγράμματος Stata9. Τα δεδομένα αυτά αφορούσαν τους γονότυπους τον αριθμό ασθενών και μαρτύρων, τον αριθμό των αλληλομόρφων και τις συχνότητες των αλληλομόρφων τις οποίες τις υπολογίσαμε.

## 2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όπως αναφέραμε και στη παράγραφο 1.5 για τη στατιστική ανάλυση υπάρχουν 2 είδη μοντέλων, το μοντέλο σταθερών επιδράσεων και το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι όλα τα δείγματα της μελέτης προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό με ένα κοινό μέγεθος επίδρασης. Επομένως, σε ένα μοντέλο σταθερών-επιδράσεων, μόνο το

σφάλμα δειγματοληψίας (θεωρητικά) συμβάλλει στις διαφορές μεταξύ των παρατηρηθείσων εκτιμήσεων επίδρασης-μεγέθους στις μεμονωμένες μελέτες.

Αντίθετα το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι τα δείγματα μελέτης που περιλαμβάνονται σε μια μετα-ανάλυση μπορούν να προέλθουν από μια διανομή των πληθυσμών (έτσι ώστε να υπάρξουν υποσύνολα πληθυσμού για τα οποία δεν υπάρχει καμία επίδραση και άλλοι για τους οποίους υπάρχει μια ουσιαστική επίδραση). Σε ένα μοντέλο τυχαίων-επιδράσεων, δύο πηγές υπάρχουν που συμβάλλουν στις παρατηρηθείσες διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων επίδρασης-μεγέθους:

1. το σφάλμα δειγματοληψίας και
2. η ετερογένεια μεταξύ-μελέτης.

Το σφάλμα δειγματοληψίας μπορεί να προκύψει από την επιλογή λανθασμένου δείγματος. Ενώ η ετερογένεια μπορεί να οφείλεται στους πληθυσμούς από τους οποίους προέρχονται τα δείγματα της μελέτης μας.

Στην ανάλυση καθορισμένων-επιδράσεων, η αύξηση του αριθμού των μελετών συμβάλλει στην ανάλυση και οδηγεί σε μια αύξηση της δύναμής της, επειδή οι επιπρόσθετες μελέτες θα οδηγήσουν σε ένα στένεμα των διαστημάτων εμπιστοσύνης γύρω από την εκτίμηση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εάν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας μπορούμε να οδηγηθούμε σε σφάλμα τύπου I (κάποιος να βρει μια συσχέτιση όταν αυτή δεν υπάρχει). Αντίθετα, η αύξηση του αριθμού των μελετών που συμβάλλουν σε μια ανάλυση τυχαίων-επιδράσεων δεν θα οδηγήσει απαραίτητως σε αύξηση της δύναμης της ανάλυσης. Αυτό συμβαίνει διότι οι επιπρόσθετες μελέτες μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της συνολικής ετερογένειας της μελέτης μας.

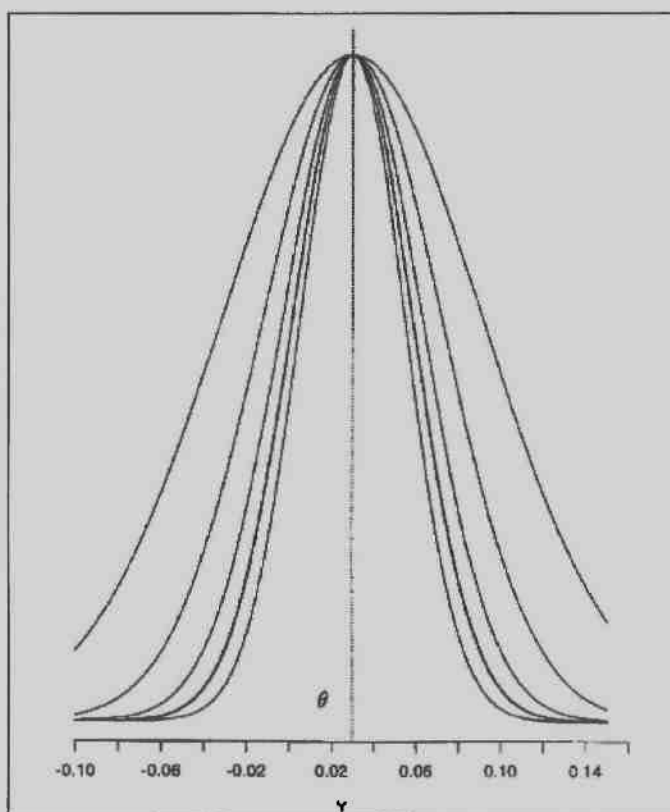
Πριν προχωρήσουμε στην ανάλυση μέσω του προγράμματος stata9, επιλέξαμε το μοντέλο που θα χρησιμοποιήσουμε για να κάνουμε τη μετα-ανάλυση. Προτιμήσαμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων γιατί τα δείγματα των

μελετών που χρησιμοποιήσαμε προέρχονταν από διαφορετικούς πληθυσμούς. Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη μαθηματική περιγραφή των δυο μοντέλων.

### 2.2.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων υποθέτει ότι όλα τα δείγματα προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό που έχουν ένα κοινό μέγεθος επίδρασης  $\theta$  (Εικόνα 2.1). Το  $\theta$  είναι η παράμετρος ενδιαφέροντος και το  $s_i$  η διακύμανση της κάθε μελέτης. Ο τύπος του μοντέλου εκφράζεται ως εξής (24):

$$Y_i \sim N(\theta, s_i^2) \text{ για } i=1, 2, 3, \dots, k$$



Εικόνα 2.1. Μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Η κατανομή 5 υποθετικών επιδράσεων χρησιμοποιώντας το μοντέλο. Κάθε δείγμα  $Y_i$  έχει ένα κοινό μέγεθος επίδρασης  $\theta$ . Η διαφορά ανάμεσα στις 5 μελέτες είναι η διαφορετική διακύμανση κάθε μελέτης  $s_i^2$ , δηλαδή πόσο καλά υπολογίζει κάθε μελέτη το  $\theta$ .



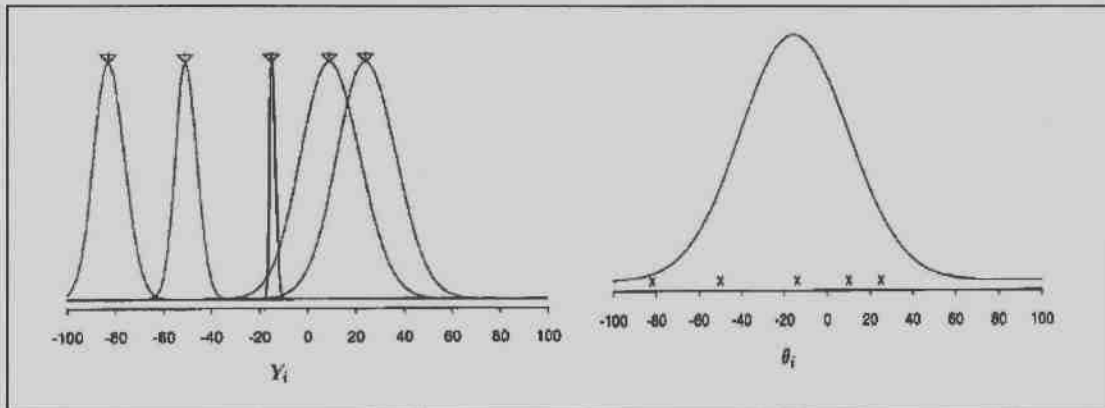
## 2.2.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι τα δείγματα της μελέτης που περιλαμβάνονται σε μια μετα-ανάλυση μπορούν να προέλθουν από μια διανομή των πληθυσμών. Κάθε μελέτη έχει και ένα διαφορετικό μέγεθος επίδρασης  $\theta_i$  και διακύμανση  $s_i$  με τύπο  $Y_i | \theta_i, s_i^2 \sim N(\theta_i, s_i^2)$  (Εικόνα 2.2). Κάθε δείγμα του υπερπληθυσμού έχει μέγεθος επίδρασης που κατανέμεται με μέση τιμή  $\theta$  και διακύμανση  $\tau^2$  με τύπο  $\theta_i \sim N(\theta, \tau^2)$  όπου  $\theta$  και  $\tau^2$  οι υπερπαραμέτροι που αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και τη διακύμανση αντίστοιχα. Η ανάλυση του υπερπληθυσμού δίδεται από τον τύπο:

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

Όπου:

$y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$  και  $B_i = s_i^2 / (s_i^2 + \tau^2)$ . Όταν το  $\tau^2 = 0$  τότε τα δύο μοντέλα είναι ισοδύναμα (24).



Εικόνα 2.2. Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Κατανομή 5 υποθετικών δειγμάτων κάνοντας χρήση μοντέλου τυχαίων επιδράσεων. Κάθε μέγεθος επίδρασης  $\theta_i$  προέρχεται από τον υπερπληθυσμό με μέγεθος επίδρασης  $\theta$  και διακύμανση  $\tau^2$ . Στο παράδειγμα κάθε ένα από τα μεγέθη επίδρασης δημιούργησαν τα 5 αποτελέσματα των μοντέλων.

### 2.2.3 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (OR)

Ως μέγεθος επίδρασης στη μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε το Odds Ratio (αναλογία πιθανοτήτων). Το OR (Odds Ratio) είναι ένας εκτιμητής που εξετάζει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ δυο μεταβλητών (17) ή καλύτερα τη πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός προς τη πιθανότητα να μην συμβεί. Στη περίπτωση μας, το OR μας βοήθησε να υπολογίσουμε τη πιθανότητα των γονοτύπων και των αλληλόμορφων γονιδίων. Ο παρακάτω πίνακας (πίνακας 2.1) θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε ποιες μεταβλητές συνδυάζει το OR και με ποιο τρόπο.

	tallele	Notallele
Ασθενείς	α	β
Μάρτυρες	γ	δ

Πίνακας 2.1. Αριθμός ασθενών και υγιών ατόμων που φέρουν ή όχι το *t* αλληλόμορφο. Όπου *tallele*: το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια.

Ο υπολογισμός του OR δίνεται από τον τύπο

$$OR = (\alpha \cdot \delta / \beta \cdot \gamma)$$

και εκφράζει την συσχέτιση του αλληλόμορφου *t* με την ασθένεια.

Η ύπαρξη 2 αλληλομόρφων και συνάμα 3 γονοτύπων οδηγεί στην ύπαρξη ενός πίνακα 3x2 (Πίνακας 2.2)

	Γονότυποι		
	AA	AB	BB
Ασθενείς	α	β	γ
Μάρτυρες	δ	ε	ζ

Πίνακας 2.2. Αριθμός ετερόζυγων και ομόζυγων γονοτύπων σε ασθενείς και μάρτυρες.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι απαραίτητο να γίνει σύμπτυξη του πίνακα 3x2 σε έναν 2x2, για να μην αντιμετωπίσουμε δυσκολίες κατά τον υπολογισμό του OR. Η σύμπτυξη επιτυγχάνεται ενώνοντας τους γονότυπους AA+AB ή AB+BB, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο υπολειπόμενης κληρονομικότητας. Συγκεκριμένα, βρήκαμε ποιο αλληλόμορφο ευθύνεται για την ασθένεια και έπειτα πραγματοποιήσαμε την σύμπτυξη των υπολοίπων. Για παράδειγμα αν το A αλληλόμορφο ευθύνεται για την ασθένεια, ενώνουμε τους γονότυπους AB και BB και τους συσχετίζουμε με τον AA (Πίνακας 1.3).

	Γονότυποι	
	AA	AB+BB
Ασθενείς	α	β+γ
Μάρτυρες	δ	ε+ζ

Πίνακας 2.3. Σύμπτυξη του πίνακα 2 χρησιμοποιώντας το μοντέλο υπολειπόμενης κληρονομικότητας.

Έτσι η συσχέτιση του AA γονότυπου με την ασθένεια θα μας δώσει

$$OR = \alpha * (\epsilon + \zeta) / \delta * (\beta + \gamma)$$

Το διάστημα εμπιστοσύνης που χρησιμοποιήσαμε ήταν 95%. Η αναλογία πιθανοτήτων (OR) των δειγμάτων περιορίζεται στο κατώτερο όριο, δεδομένου ότι δεν μπορεί να είναι αρνητική, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με το ανώτερο όριο. Το OR λοιπόν ακολουθεί «λοξή» κατανομή. Ο λογάριθμος του OR ( $\log OR$ ) μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή και έχει σχεδόν κανονική κατανομή. Το διάστημα εμπιστοσύνης (CI, Coefficient Interval) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$CI_L = \log OR - 1,96 * SE_{(\log OR)}$$

$$CI_U = \log OR + 1,96 * SE_{(\log OR)}$$

Όπου  $SE_{(\log OR)}$  το Standard Error,

$CI_L$  κατώτερο όριο,

$CI_U$  ανώτερο όριο

Το  $SE_{(\log OR)}$  το υπολογίσαμε από το τύπο:

$$SE_{(\log OR)} = \text{sqrt} (1/\alpha + 1/\beta + 1/\gamma + 1/\delta)$$

Όπου sqrt η τετραγωνική ρίζα.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της μετα-ανάλυσης ήταν το stata9. Αρχικά, υπολογίσαμε το OR χρησιμοποιώντας την εντολή:

- `gen odst =  
log((tallele1*notallele0)/(tallele0*notallele1))`

όπου t το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια, τα 0 και 1 αντιπροσωπεύουν τα υγιή άτομα-μάρτυρες και τους ασθενείς, αντίστοιχα.

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε την εντολή `replace` όπου αντικαθιστά τις (τυχόν) μηδενικές τιμές των αλληλομόρφων με 0,5. Ένα παράδειγμα για το `tallele` φαίνεται παρακάτω

- `Replace odst =  
log((0,5+tallele1)*(0,5+notallele0)/(0,5+tallele0)*  
0,5+notallele1)) If tallele1==0 |  
notallele1==0 | tallele0==0 | notallele0==0`

Στη συνέχεια υπολογίσαμε το SE το οποίο δίνεται από την εντολή

- `gen stdodst =  
sqrt(1/tallele1+1/tallele0+1/notallele1+1/notallele0)`

Όπως στο OR έτσι και στο SE χρησιμοποιήσαμε την εντολή `replace`

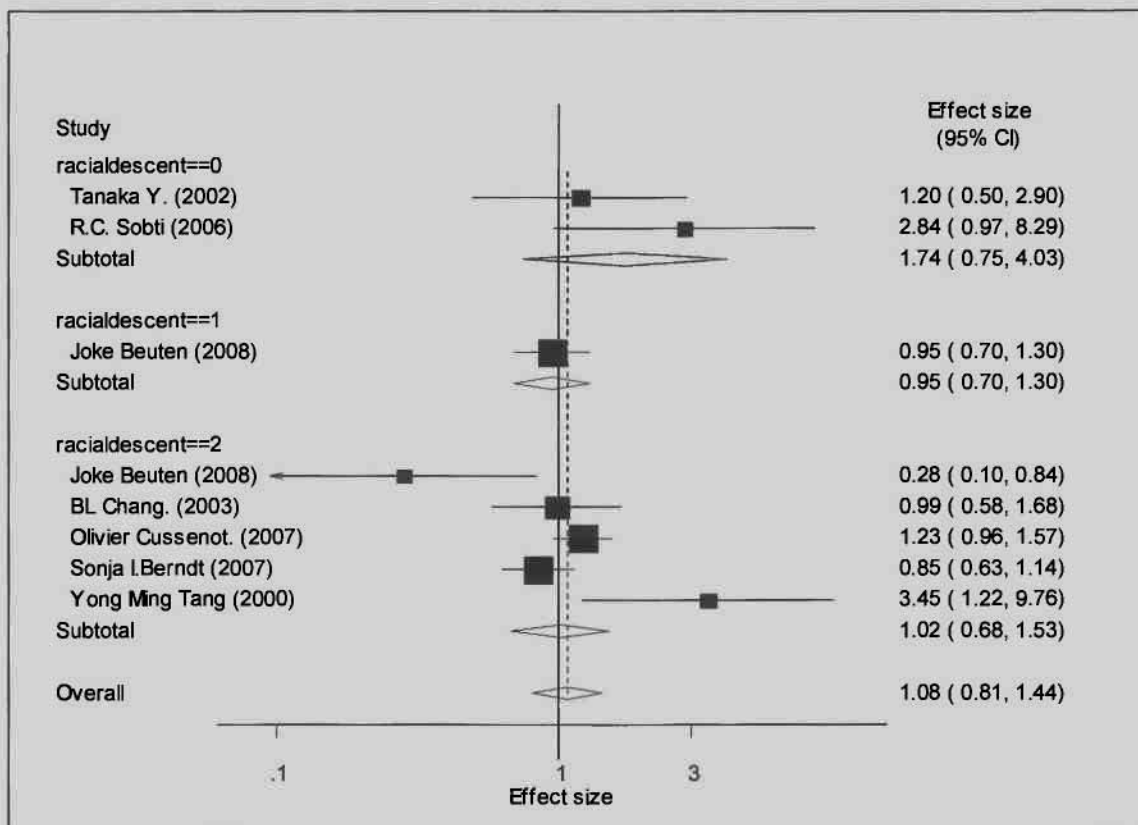
- `Replace stdodst = sqrt  
(1/(0,5+tallele1)+1/(0,5+notallele1)+1/(0,5+tallele0)+  
1/(notallele0))`

Τέλος, χρησιμοποιώντας την εντολή

- `metan odst stdodst, eform random by(racialdescent)  
label(namevar= author, yearvar= year) xlab(0.1,1,3)`

πραγματοποιήσαμε τη μετα-ανάλυση για το t αλληλόμορφο ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού. Ένα παράδειγμα δίνεται στο παρακάτω forest plot το οποίο αποτελεί γραφική αναπαράσταση των παραπάνω εντολών (εικόνα 2.2.1). Κοιτώντας το συνολικό OR (overall) μπορούμε να συμπεραίνουμε αν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια στο συγκεκριμένο contrast

(σύμπτυξη γονοτύπων). Δηλαδή, αν το forest plot αναφέρεται στο contrast “gg έναντι cg +cc” και το συνολικό OR έχει την τιμή 2, συμπεραίνουμε ότι αυτοί που φέρουν τον gg γονότυπο έχουν διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν την ασθένεια σε σχέση με αυτούς που δεν φέρουν το συγκεκριμένο γονότυπο. Αν το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 τότε δεν υπάρχει συσχέτιση.



Εικόνα 2.2.1. Αριστερά, φαίνονται οι μελέτες ανάλογα με τη χώρα προέλευσης. Δεξιά, φαίνονται τα OR με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους και στο κέντρο παρουσιάζονται διαγραμματικά. Το overall μας δίνει το τελικό αποτέλεσμα.

### 2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ

Ένα κρίσιμο στάδιο κατά την διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης είναι η εξέταση του βαθμού ετερογένειας μεταξύ των μεμονωμένων μελετών. Όταν χρησιμοποιούμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υπάρχει κίνδυνος να υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας, επειδή τα δείγματα μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς πληθυσμούς. Η ετερογένεια μπορεί να προσδιοριστεί από το Q test του Cochran, το οποίο δίνει καλά αποτελέσματα όταν έχουμε μεγάλο

πλήθος δειγμάτων, και από το  $I^2$  test που εμφανίζει το ποσοστό της ετερογένειας ακόμη και αν το δείγμα είναι μικρό. Είναι ενδεδειγμένο, επομένως, να χρησιμοποιηθεί ένας συνδυασμός επίσημων στατιστικών και γραφικών μεθόδων για να αξιολογήσει το βαθμό και τις πηγές ετερογένειας της μελέτης. Ένας αποτελεσματικότερος τρόπος να χειριστούμε την ετερογένεια είναι να προσδιορίσουμε τις αιτίες της και να τις ενσωματώσουμε έπειτα στο στατιστικό μοντέλο με το οποίο κάνουμε δοκιμές για τις γενετικές συσχετίσεις (22).

Για να εξετάσουμε την ετερογένεια θεωρούμε δύο υποθέσεις:

- $H_0$  : Τα δείγματα μας είναι ομοιογενή
- $H_1$  : Τα δείγματα μας είναι ανομοιογενή

Η απόρριψη μια εκ των δυο θα μας γνωστοποιήσει την ύπαρξη της ετερογένειας. Ο υπολογισμός της ετερογένειας στη μελέτη μας έγινε αυτόματα από το stata9 μέσω της εντολής metan. Δεδομένου ότι χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, η εντολή metan υλοποιεί του παρακάτω τύπους για τον υπολογισμό της ετερογένειας :

$$\theta(\tau)_{MLE} = \frac{\sum_i w_i(\tau) Y_i}{\sum_k w_i(\tau)} \quad \text{με} \quad w_i(\tau) = \frac{1}{s_i^2 + \tau^2}$$

Το στατιστικό Q test του Cochran μας εξασφαλίζει μια μέτρηση της ετερογένειας. Το Q ορίζεται από τον παρακάτω τύπο (24):

$$Q = \sum_{i=1}^n w_i \left( \hat{\theta}_i - \hat{\theta} \right)^2 \quad \text{όπου:}$$

$$\hat{\theta} = \ln \hat{OR} = \left( \frac{\sum_{i=1}^n w_i \ln OR_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \right)$$

$$\hat{\theta}_i = \ln \hat{OR}_i = \ln \left( \frac{n_{11i} n_{20i}}{n_{10i} n_{21i}} \right)$$

$$w_i = \frac{1}{\text{var}(\ln \hat{OR}_i)} \quad \text{με} \quad \text{var}(\ln \hat{OR}_i) = \frac{1}{n_{11i}} + \frac{1}{n_{10i}} + \frac{1}{n_{21i}} + \frac{1}{n_{20i}}$$

Η κατανομή του Q είναι περίπου ίδια με την κατανομή του  $\chi^2$  και έχει k-1 βαθμούς ελευθερίας (19). Όταν το Q είναι περίπου ίσο με τον αριθμό των μελετών σε μια μετα-ανάλυση, υπάρχει μια μικρή ένδειξη ετερογένειας, ενώ όταν είναι πολύ μεγαλύτερο έχουμε μια σημαντική ένδειξη ετερογένειας (23). Το Q-test του Cochran αποδίδει καλύτερα όταν η μετα-ανάλυση περιλαμβάνει πολλές μελέτες.

Μια παρόμοια στατιστική μέθοδος υπολογισμού της ετερογένειας, η οποία βασίζεται στο Q test, είναι το  $I^2$  test. Το  $I^2$  test υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$I^2 = \frac{Q - (k-1)}{Q} \times 100\%$$

Οι τιμές των αποτελεσμάτων του I-squared κυμαίνονται από 0 μέχρι 100%. Η τιμή αυτή αντιπροσωπεύει το ποσοστό της παραλλαγής (variation) μεταξύ των μελετών που προκλήθηκε από ετερογένεια. Τιμές κάτω από 25% φανερώνουν μια μικρή ή αμελητέα ετερογένεια, ενώ τιμές που υπερβαίνουν το 50% υποδηλώνουν ότι η ετερογένεια αποτελεί σοβαρό πρόβλημα (23).

Τέλος, από την εντολή `metan` προκύπτει ένας τρίτος εκτιμητής, το  $\tau^2$ , το οποίο υπολογίζει τη μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών. Από την εξίσωση του Q με τις αντίστοιχες αναμενόμενες τιμές, οι DerSimonian και Laird προτείνουν ένα μη επαναληπτικό εκτιμητή του  $\tau^2$  που ορίζεται ως (24):

$$\tau^2 = \frac{Q - (n-1)}{\sum_{i=1}^n w_i - \frac{\sum_{i=1}^n w_i^2}{\sum_{i=1}^n w_i}}$$

Στο παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα των εκτιμητών που προαναφέραμε χρησιμοποιώντας την εντολή `metan`.

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)	1.334	0.896	1.987	10.10
R.C. Sobti (2006)	1.952	1.219	3.126	8.52
Sub-total				
D+L pooled ES	1.580	1.090	2.289	18.62
-----				
racialdescent==1				
Joke Beuten (2008)	0.791	0.660	0.950	16.07
Sub-total				
D+L pooled ES	0.791	0.660	0.950	16.07
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	0.762	0.540	1.077	11.44
BL Chang. (2003)	1.050	0.791	1.394	13.16
Olivier Cussenot. (2	1.158	1.016	1.320	17.39
Sonja I. Berndt (2007	0.847	0.715	1.003	16.42
Yong Ming Tang (2000	1.444	0.823	2.532	6.90
Sub-total				
D+L pooled ES	0.996	0.821	1.209	65.30
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.049	0.872	1.262	100.00
-----				

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	1.47	1	0.226	31.8%	0.0230
racialdescent==1	0.00	0	-	.%	0.0000
racialdescent==2	12.48	4	0.014	67.9%	0.0291
Overall	28.75	7	0.000	75.7%	0.0467

Πίνακας 2.4. Αριστερά εμφανίζονται οι μελέτες ανάλογα με τη καταγωγή προέλευσης των πληθυσμών, στο κέντρο φαίνονται οι εκτιμητές  $\log(\text{OR})$  (ES) και το διάστημα εμπιστοσύνης (CI) και δεξιά εμφανίζεται το ποσοστό συμβολής κάθε μελέτης. Από κάτω παρατηρούμε τα αποτελέσματα των μεταβλητών  $P$  ( $Q$ -Cochran),  $I^2$ ,  $\tau^2$ .

## 2.4 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η διεξαγωγή μιας σωστής μετα-ανάλυσης προϋποθέτει όσο το δυνατόν καλύτερη και εκτενέστερη αναζήτηση στη βιβλιογραφία, να βρεθούν δηλαδή όλες οι διαθέσιμες μελέτες. Κατά καιρούς έχουν εμφανισθεί διάφορα προβλήματα βιβλιογραφίας τα οποία αν δεν τα λάβουμε υπόψη, μπορούμε να οδηγηθούμε σε υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων μας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε μια μετα-ανάλυση, πρέπει να καταβάλουμε κάθε προσπάθεια για ανεύρεση πρωταρχικών μελετών, ακόμα και αν αυτές δεν



έχουν δημοσιευθεί σε περιοδικά με το σύστημα των κριτών. Οι μελέτες οι οποίες δεν έχουν δημοσιευθεί σε κάποιο περιοδικό εντάσσονται στη «γκρίζα» βιβλιογραφία (grey literature). Η μη δημοσίευση αυτών των μελετών οφείλεται συνήθως στο ότι παρέχουν πιο «μετριοπαθή» ή ακόμη και αρνητικά αποτελέσματα (5).

Οι έρευνες που πραγματοποιούνται σε μη αγγλόφωνες χώρες μπορούν να δημοσιευθούν σε περιοδικά που εντάσσονται σε διεθνείς βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων ή σε εκχώρια περιοδικά που δεν ανήκουν σε διεθνείς βάσεις. Η απόφαση να δημοσιευθεί μια μελέτη σε διεθνή ή τοπικά περιοδικά μπορεί να επηρεαστεί από τη φύση των αποτελεσμάτων. Τα σημαντικά αποτελέσματα συνήθως δημοσιεύονται στα διεθνή περιοδικά, ενώ τα ασήμαντα αποτελέσματα εμφανίζονται στην βιβλιογραφία, με συνέπεια τη γλωσσική πόλωση. Η κινεζική βιβλιογραφία αποτελεί ένα σημαντικό παράδειγμα της πιθανής πόλωσης, επειδή ένας μεγάλος αριθμός τοπικών επιστημονικών περιοδικών δεν είναι καταχωρημένος στις διεθνείς βάσεις δεδομένων. Η Κίνα αποτελεί το ένα πέμπτο του παγκόσμιου πληθυσμού, και αυτή η έρευνα είναι σημαντικής σπουδαιότητας όχι μόνο για την Κίνα, αλλά και διεθνώς (6).

Τα φαινόμενα της «γκρίζας» και της «ξενόγλωσσης» βιβλιογραφίας που αναφέραμε παραπάνω, αποτελούν 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. Η χρήση ενός funnel plot μας βοηθά να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη ενός τέτοιου σφάλματος. Το funnel plot αποτελεί γραφική αναπαράσταση των μελετών που εξετάζουμε για σφάλμα δημοσίευσης απεικονίζοντας αυτές με την μορφή σημείων. Για τη περαιτέρω κατανόηση των παραπάνω φαινομένων αναφέρουμε το παρακάτω παράδειγμα. Υπάρχουν εκατομμύρια πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, και ένας εκθετικά αυξανόμενος αριθμός μελετών προσπαθεί να συνδέσει τους γενετικούς πολυμορφισμούς με τον κίνδυνο

ασθενειών ή εκβάσεων θεραπείας. Ο κίνδυνος που παρέχεται από κάθε έναν από αυτούς τους γενετικούς δείκτες είναι συνήθως μικρός, με αναλογίες πιθανοτήτων (Odds Ratio) μεταξύ 1.1 και 1.4. Επομένως, η εκλεκτική δημοσίευση των μελετών, μπορεί ενδεχομένως να ακυρώσει τη γενική εικόνα για τους γενετικούς παράγοντες κινδύνου (6).

Το συνολικό αποτέλεσμα μιας μετα-ανάλυσης αλλάζει με τη πάροδο του χρόνου. Το φαινόμενο του «Πρωτέα» (Proteus Phenomenon) ή *molecular bias* είναι υπαρκτό στη γενετική αλλά όχι στις κλινικές δοκιμές και πήρε το όνομα του από τον αρχαίο θεό Πρωτέα ο οποίος άλλαζε μορφές. Ο ρυθμός κατά τον οποίο δημοσιεύονται τα επιστημονικά άρθρα σήμερα έχει αυξηθεί ραγδαία. Αν ένας ερευνητής “πετύχει” ένα δυνατό “εύρημα”, αυτό δημοσιεύεται αμέσως σε ένα περιοδικό με κύρος (π.χ. Science, Nature). Στη συνέχεια οι υπόλοιποι προσπαθούν να το επιβεβαιώσουν ή να το διαψεύσουν. Έτσι το τελικό αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης πιθανόν να διαφοροποιηθεί από το αρχικό λόγο επιπρόσθετων μελετών (7).

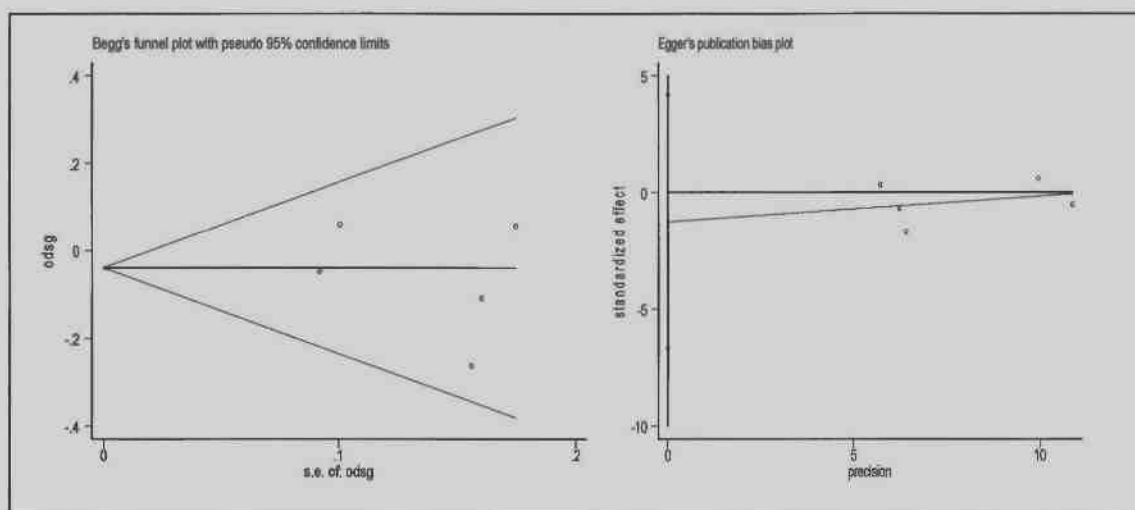
Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων στη μελέτη μας ελέγξαμε το σφάλμα δημοσίευσης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα `stata9` και τις παρακάτω εντολές:

- `metabias odst stdodst, gr(b)`
- `metabias odst stdodst, gr(e)`
- `metareg odst stdodst, wsse (stdodst)`
- `metainf odst stdodst, random eform (label = author)`

Όπου `t` το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο γονίδιο.

Η εντολή `Metabias` χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε αν υπάρχει ασυμμετρία σε ένα `funnel-plot` εξαιτίας του σφάλματος δημοσίευσης. Η εντολή αυτή χρησιμοποιεί τη μέθοδο του `Begg and Mazumdar's` και το `test` του `Egger`. Τοποθετώντας στην γραμμή εντολών τα “`gr(b)`” και “`gr(e)`” παίρνουμε τα γραφήματα (`plots`) του `Begg` και `Egger` αντίστοιχα. Το `test` του `Egger` δίνει καλύτερα αποτελέσματα από του `Begg` όταν υπάρχει έλλειψη σφάλματος ή μικρός αριθμός μελετών. Αν υπάρχει ένδειξη ετερογένειας στο μέγεθος

επίδρασης μεταξύ των μελετών, χρησιμοποιούμε την εντολή `Metareg` για να αναλύσουμε τη συσχέτιση ανάμεσα στο μέγεθος επίδρασης και στα χαρακτηριστικά της μελέτης. Για να χρησιμοποιήσουμε τη `Metareg` ορίζουμε ένα κατάλογο μεταβλητών. Ο πρώτος περιλαμβάνει το μέγεθος επίδρασης και ο δεύτερος τα χαρακτηριστικά της μελέτης. Ακόμη, στην γραμμή εντολής της `Metareg` χρησιμοποιούμε το `wsse` που υπολογίζει το Standard Error. Τέλος, η επίδραση των μεμονωμένων μελετών στη συνολική εκτίμηση μπορεί να αναπαρασταθεί χρησιμοποιώντας την εντολή `Metainf`. Η εντολή αυτή εκτελεί μια ανάλυση επίδρασης, στην οποία οι εκτιμήσεις της μετα-ανάλυσης υπολογίζονται παραλείποντας μια μελέτη κάθε φορά. Η σύνταξη της `Metainf` είναι ίδια με την σύνταξη της εντολής `metan`.



Εικόνα 2.4.1. Αριστερά. *Funnel plot* του Begg: όταν οι μελέτες είναι συμμετρικές γύρω από τον εκτιμητή ( $\log OR$ ) τότε δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης. Δεξιά. *Funnel plot* του Egger: όταν το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 0 δεν υπάρχει σφάλμα.

## 2.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ HARDY-WEINBERG (HWE)

Η ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) δηλώνει ότι εάν 2 αλληλόμορφα γονίδια, A και α, με συχνότητες p και q, αντίστοιχα, είναι σε ισορροπία σε έναν πληθυσμό, οι συχνότητες εμφάνισης των γονοτύπων AA, Aα, και αα θα είναι  $p^2$ ,  $2pq$ , και  $q^2$ , αντίστοιχα. Η απόκλιση από αυτές τις αναλογίες μπορεί να οφείλεται αφενός σε γενετικούς λόγους όπως: α) Τα αλληλόμορφα γονίδια δεν διαχωρίζονται ανεξάρτητα, β) Η ταξινόμηση ζευγαρώματος (μη-τυχαίο ζευγάρισμα), γ) Η γενετική κλίση (μια διαδικασία με την οποία οι συσσωρευμένες αλλαγές εμφανίζονται στη συχνότητα γονιδίων λόγω μικρών πληθυσμών), δ) Η διασταύρωση των πληθυσμών (π.χ. μεταξύ βόρειου και νότιου πληθυσμού της Ασίας), και αφετέρου σε μεθοδολογικούς λόγους όπως: α) Η στρωματοποίηση των πληθυσμών (αποτελεί ένα φαινόμενο όπου η συχνότητα αλληλόμορφων γονιδίων και η έκβαση ασθενειών ποικίλλουν μεταξύ των υποσυνόλων των πληθυσμών (π.χ. εθνικότητα) και των αναλογιών τους στις ομάδες περιπτώσεων-ελέγχου), β) Το γονιδιακό σφάλμα (genotyping error) και γ) Η επιλογή μη αντιπροσωπευτικών ατόμων προς εξέταση.

Ο έλεγχος για ισορροπία HWE εφαρμόζεται ανάλογα με το είδος των μελετών που εξετάζουμε. Αν τα δείγματα που θέλουμε να εξετάσουμε αναφέρονται ως μια ομάδα ή ως ένα σύνολο μελετών τότε η ισορροπία HWE πρέπει να ελεγχθεί θεωρώντας τα δείγματα ως μια μεγάλη ομάδα. Ενώ, αν οι μελέτες εξετάζουν ασθενείς και μάρτυρες, η ισορροπία HWE πρέπει να αξιολογηθεί μόνο στους μάρτυρες, διότι οι ασθενείς μπορεί να μην είναι σε ισορροπία HWE εάν υπάρχει πράγματι μια ένωση μεταξύ του γονότυπου και της ασθένειας. Η  $\chi^2$  δοκιμή χρησιμοποιείται για να εξεταστεί η απόκλιση από την ισορροπία HWE. Εντούτοις, η  $\chi^2$  δοκιμή δεν ισχύει εάν το μέγεθος των δειγμάτων είναι μικρό. Αυτές οι αναλύσεις για το προσδιορισμό ισορροπίας η μη, μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα stata9.

Η εντολή που χρησιμοποιήσαμε για να ελέγξουμε την ισορροπία HWE με το stata9 ήταν:

- `genhwi 35 42 97`

Η ισορροπία ελέγχθηκε σε κάθε μελέτη (paper) ξεχωριστά. Οι αριθμοί 35 42 και 97 αναφέρονται στους γονότυπους των μαρτύρων της εξεταζόμενης μελέτης. Ο έλεγχος HWE πραγματοποιήθηκε μόνο στους μάρτυρες, διότι οι μελέτες που συμπεριλάβαμε στη μετα-ανάλυση μας αναφέρονταν σε ασθενείς και μάρτυρες.

## 2.6 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Η αθροιστική μετα-ανάλυση πραγματοποιεί μετα-ανάλυση για κάθε χρονική στιγμή που προστίθεται μια μελέτη. Έτσι μπορούμε να καταλάβουμε πόσο έχουν διαφοροποιηθεί τα αποτελέσματα των μελετών από τότε που πραγματοποιήθηκε η πρώτη μελέτη για ένα συγκεκριμένο πολυμορφισμό (19). Αθροιστική μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εντολή (40):

- `metacum odsg stdodsg, effect(r) eform graph`

όπου:

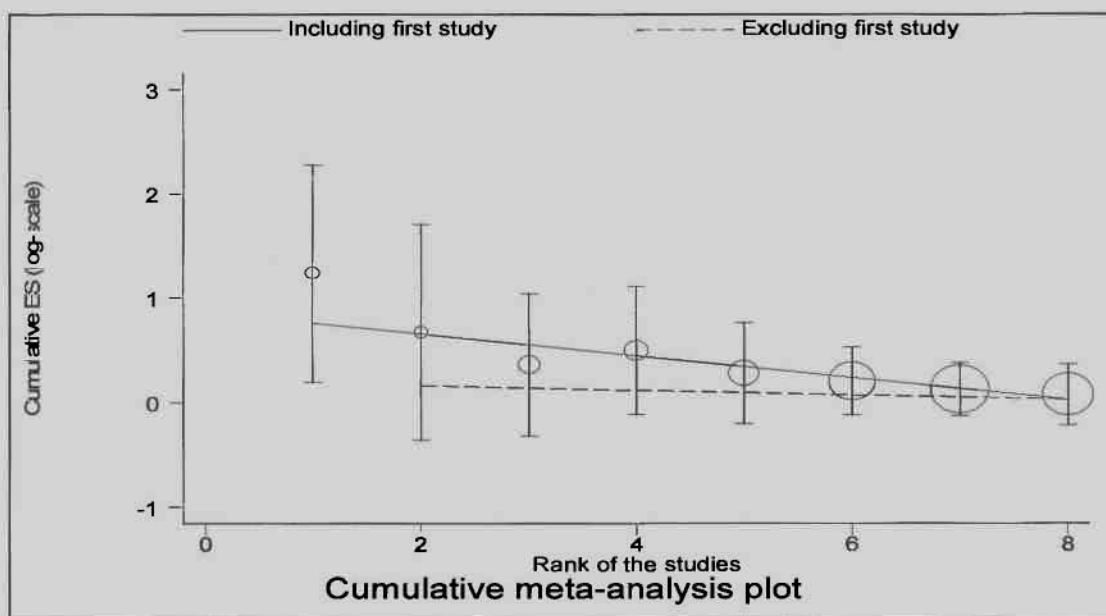
`odsg`, ο  $\log(\text{OR})$  των αλληλομόρφων,  
`stdodsg`, το SE των αλληλομόρφων,  
`effect(r)`, χρήση μοντέλο τυχαίων επιδράσεων

Επέκταση της αθροιστικής μετα-ανάλυσης αποτελεί η διεξαγωγή της με την εντολή (41):

- `metatrend odsg stdodsg`

η χρήση της εντολής αυτής μας δίνει επιπλέον τη δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης και όχι μόνο το γράφημα της αθροιστικής μετα-ανάλυσης. Η

στατιστική ανάλυση μας δίνει στοιχεία για την ύπαρξη διαχρονικής τάσης (trend) στους εκτιμητές. Αυτό επιτυγχάνεται από την τιμή του p-value η οποία αν είναι κάτω από 0,05 τότε υπάρχει trend στις μελέτες. Η ύπαρξη αυτής της διαχρονικής τάσης αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι κάποιος βρήκε τυχαία μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ ενός πολυμορφισμού και μιας ασθένειας. Αυτό οδήγησε μέρος της επιστημονικής κοινότητας να το διερευνήσει περισσότερο δημοσιεύοντας κι' άλλες μελέτες οι οποίες όμως δε επιβεβαίωσαν την αρχική, έτσι προκύπτει η διαχρονική τάση στους εκτιμητές η οποία αποδίδεται γραφικά όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα (εικόνα 2.6.1):



Εικόνα 2.6.1. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της αθροιστικής μετα-ανάλυσης

Οι μελέτες είναι ταξινομημένες κατά αύξουσα χρονολογική σειρά, ο άξονας y απεικονίζει το διάστημα εμπιστοσύνης και τα OR. Η κλίση της ευθείας αντιπροσωπεύει τη διαχρονική τάση.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Η αρχική αναζήτηση στη βάση δεδομένων της pubmed ανέδειξε 12 (8, 9, 20, 21, 26-33) μελέτες που αναφέρονταν στη συσχέτιση του γονιδίου CYP1B1 με το καρκίνο του προστάτη. Μετά από προσεκτική μελέτη και των 12 δημοσιευμένων μελετών, αναγκαστήκαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο τις 8. Τις υπόλοιπες δεν τις λάβαμε υπόψη για τους εξής λόγους:

- Οι δυο μελέτες περιείχαν στοιχεία που ήταν βασισμένα σε οικογένειες (8,9)
- Οι υπόλοιπες δυο δεν περιείχαν επαρκεί στοιχεία για να μπορέσουμε να τις συμπεριλάβουμε (20,21) .

Στη συνέχεια συγκεντρώσαμε όλους τους κοινούς πολυμορφισμούς μεταξύ των μελετών που κρατήσαμε (πίνακας 3.1).

<b>Πολυμορφισμοί</b>	<b>Αριθμός μελετών</b>
Leu432Val (c->g) at exon 3	8 (26-33)
Arg48Gly (c->g) at exon 2	5 (26, 27, 28, 32, 33)
Ala119Ser (g->t) at exon 2	3 (26, 27, 32)
Asn453Ser (a->g) at exon 3	5 (26, 27, 28, 32, 33)
intron 1 (c->t) (silent) at intron 1	3 (27, 28, 32)
Codon 449 (c->t) (silent) at exon 3	2 (27,32)

*Πίνακας 3.1. Αριστερά αναφέρονται οι πολυμορφισμοί και δεξιά ο αριθμός μελετών που τους αναφέρουν.*

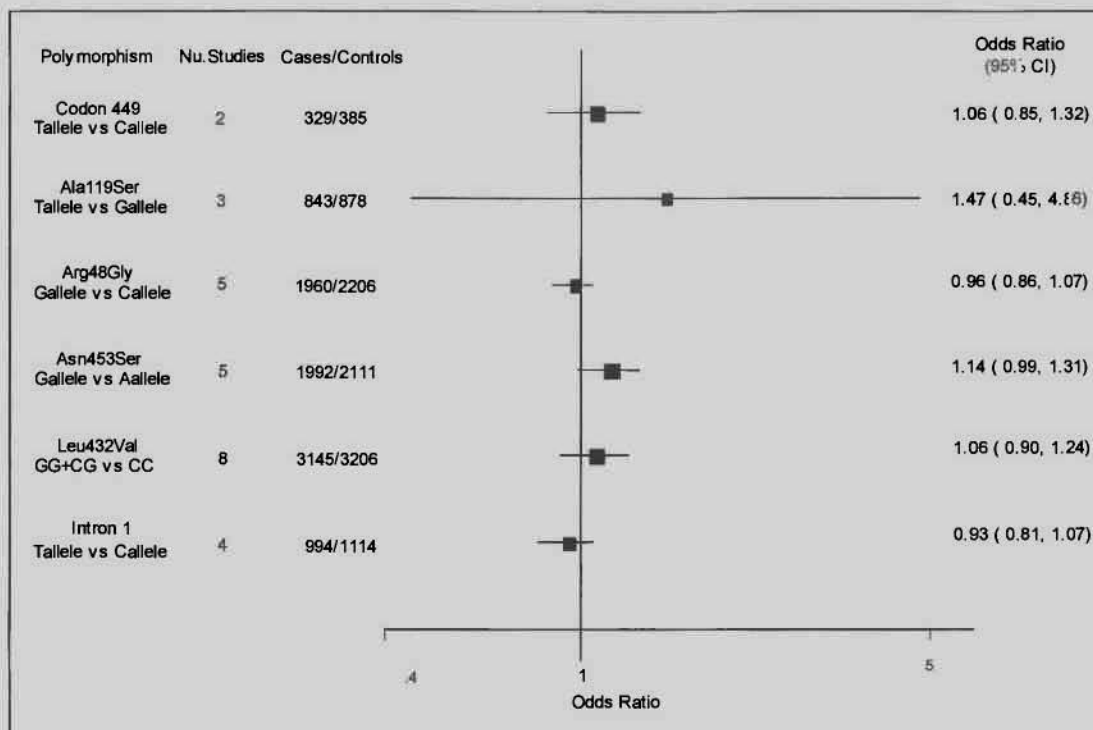
Η μέθοδος της μετα-ανάλυσης πραγματοποιήθηκε μόνο στους πολυμορφισμούς που αναφέρονταν σε περισσότερες από 2 μελέτες. Έτσι οι πολυμορφισμοί που πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση είναι οι εξής:

- **Leu432Val (rs1056836)**, ο οποίος συμβάλει στη μετατροπή της λευκίνης σε βαλίνη στην θέση 432 και στην αντικατάσταση του c σε g. Η ακριβής τοποθεσία του παρατηρείται στο 3<sup>ο</sup> εξώνιο. Για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό συγκεντρώσαμε στοιχεία από 8 μελέτες (26-33).



- **Arg48Gly (rs10012)**, ο οποίος συμβάλει στη μετατροπή της αργινίνης σε γλυκίνη στη θέση 48 και στην αντικατάσταση του c σε g. Ο πολυμορφισμός αυτός παρατηρείται στο 2<sup>ο</sup> εξώνιο και βρέθηκε σε 5 μελέτες (26, 27, 28, 32, 33).
- **Ala119Ser (rs105827)**, όπου οδηγεί στην μετατροπή της αλανίνης σε σερίνη στη θέση 119, καθώς και στην αντικατάσταση του g σε t. Ο πολυμορφισμός αυτός τοποθετείται στο 2<sup>ο</sup> εξώνιο και αναφέρεται σε 3 μελέτες (26, 27, 32).
- **Asn453Ser (rs1800440)**, ο οποίος συμβάλει στην μετατροπή της ασπαραγίνης σε σερίνη στη θέση 453 και οδηγεί στην αντικατάσταση του a σε g. Ο πολυμορφισμός αυτός αναφέρεται σε 5 μελέτες (26, 27, 28, 32, 33) και η τοποθεσία του παρατηρείται στο 3<sup>ο</sup> εξώνιο.
- **intron 1**, ο οποίος είναι σιωπηλός πολυμορφισμός και οδηγεί στην αντικατάσταση του c σε t. Η τοποθεσία του παρατηρείται στο 1<sup>ο</sup> εσώνιο και αναφέρεται σε 3 μελέτες (27, 28, 32).

Πριν αναφερθούμε σε κάθε έναν πολυμορφισμό ξεχωριστά θα θέλαμε να παραθέσουμε ένα συνολικό γράφημα (forest plot) που παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα contrast κάθε πολυμορφισμού (εικόνα 3.1). Παρατηρούμε ότι κατά την εξέταση των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού Asn453Ser υπάρχει μια ασθενής συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Η λεπτομερής ανάλυση των αποτελεσμάτων από όλα τα contrast των πολυμορφισμών αναφέρονται στη συνέχεια του κεφαλαίου 3 καθώς και στο παράρτημα του κεφαλαίου 6.



Εικόνα 3.1. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων για κάθε πολυμορφισμό.

Τέλος, για το σιωπηλό πολυμορφισμό που παρατηρήθηκε στο κωδικόνιο 449 στο εξώνιο 3, πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση χωρίς όμως να κάνουμε ανάλυση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων επειδή δεν ικανοποιούσε τον απαιτούμενο αριθμό μελετών (27,32). Ένα ενδεικτικό αποτέλεσμα που αναφέρεται στο contrast των αλληλομόρφων φαίνεται στη παραπάνω εικόνα. Τα χαρακτηριστικά κάθε μελέτης φαίνονται στο παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Παρακάτω αναφέρονται τα χαρακτηριστικά κάθε μελέτης που συνέβαλε στη μετα-ανάλυση.

PMID	Author	Year	Country	Racial Descent	Control Characteristics	Cases Characteristics	Controls	Cases	Polymorphisms
12200121	Tanaka Y.	2002	USA	Asian	Control blood samples were obtained from male Japanese volunteers for genotyping. These volunteers were unrelated and selected at random during the same period as the collection of prostate cancer samples. Volunteers were healthy and confirmed to be free of cancer.	Prostate cancer samples were obtained from the Department of Urology at the Hospital of Shimane Medical University, Izumo, Japan. These samples were collected by radical prostatectomy on patients and all specimens were collected during the period from 1997 to 2000.	200	117	intron 1(silent), Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val, 449(silent), Asn453Ser
17507624	Julie M. Cunningham	2007	USA	Caucasian	Men free of prostate cancer randomly selected for clinical urologic examination. This examination included digital rectal examination, transrectal ultrasound of the prostate, post-void residual urine volume, serum prostate-specific antigen and creatinine measurement, focused urologic physical examination, and cryopreservation of serum for subsequent sex hormone assays. Of these men, 490 reported non-Hispanic Caucasian ancestry and 3 report Hispanic ancestry.	From a sampling frame of the local population provided by the Rochester Epidemiology Project, 475 men were randomly selected for a clinical urologic examination. This examination included digital rectal examination, transrectal ultrasound of the prostate, post-void residual urine volume, serum prostate-specific antigen and creatinine measurement, focused urologic physical examination, and cryopreservation of serum for subsequent sex hormone assays.	493	499	Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val, Asn453Ser

17220347	Sonja I. Berndt	2007	USA	Non-Hispanic Caucasian, African-American	Controls were randomly selected from among men without evidence of prostate cancer at the time of case selection and were frequency matched to cases on age (+5 years), fiscal year at randomization, study year of trial, and race.	Cases included non-Hispanic whites (n = 1,154) and blacks (n = 103) diagnosed with prostate cancer from 1993 through 2001. A total of 453 cases were diagnosed within 1 year of the baseline screen and 867 were diagnosed on longer follow-up.	617	488	Arg48Gly, Leu432Val, Asn453Ser
14562027	BL Chang.	2003	USA	Caucasian, African-American	Controls were selected from men participating in screening programmes for CaP (prostate cancer). By excluding subjects with abnormal PSA levels (i.e., $\geq 4$ ng/ml), 217 were eligible for the study. The mean age at examination was 58 years, 118 of the eligible controls were caucasian and 15 were African American. Based on interviews with the controls, about 5,5% of the eligible controls had brothers or a father affected with CaP.	Sporadic CaP cases were from patients who underwent treatment for CaP at the jonh Hopkins Hospital and agreed to participate in the prostate cancer genetic study. The diagnosis of CaP for all these subjects was confirmed by pathology reports. The mean age at diagnosis for these cases was 58,7 years; 229 were Caucasian and 8 were African American.	222	245	intron 1(silent), Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val, 449(silent), Asn453Ser
17704407	Olivier Cussenot	2007	USA	Caucasian, Asian	Controls were selected from men invited to a systematic health screening performed in the same geographic areas as the hospitals where the sample patients where enrolled. Controls were defined by a blood test for PSA less than 4ng/mL, no prostatic symptoms, and normal digital rectal examination.	Patients were recruited in the department of urology from three hospitals located in Nancy, Brest and Paris. The patients have incident disease with a histologically confirmed adenocarcinoma of the prostate. The aggressiveness of the cancer was defined using an aggressiveness scale based on the clinical patterns of Gleason score, TNM classification, and prostate-specific antigen (PSA) level.	882	1101	Leu432Val

16716118	R.C Sobti	2006	India	Asian	The control group consisted of 100 male healthy controls with no evidence of neoplastic disease. Blood samples were collected in EDTA-coated vials and tissues in normal saline. The samples were preserved at -80oC until analysis. Subjects belonged to same ethnic group and were asked to fill out a questionnaire regarding age, smoking, and alcohol consumption along with their dietary habits	A study group consisted of 100 patients with prostate cancer who visited the Department of urology, Government Medical College and Hospital (GMCH), Chandigarth, india, for their ailments during the period 2002-2004. Blood samples were collected in EDTA-coated vials and tissues in normal saline. The samples were preserved at -80oC until analysis. Subjects belonged to same ethnic group and were asked to fill out a questionnaire regarding age, smoking, and alcohol consumption along with their dietary habits	100	100	Leu432Val
11221602	Yong Ming Tang	2000	USA	Caucasian , African- American , Asian	To evaluate the CYP1B1 Leu432Val genetic polymorphism and its frequency in different ethnic populations, DNA was obtained from tissues or blood from US Caucasian, African American and Chinese men without Cancer.	Cases were Caucasian men aged 44-48 years who were diagnosed within the last 12 months at the Jonh L. McClellan Memorial Veterans' Administration Medical Center or at the Arkansas Cancer Reserch Center.	50	50	Leu432Val
18544568	Joke Beuten	2008	USA	Caucasian (Non- Hispanic)	Controls consisted of male volunteers of at least 45 years old who had normal digital rectal examinations an prostate-specific antigen levels <2,5 ng /mL on at least two and up to six study visits.	Cases samples had a median time period of 3 years between disease diagnosis and enrollment into the study, also had biopsy-confirmed Pca.	240	153	intron 1(silent), Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val, Asn453Ser
18544568	Joke Beuten	2008	USA	Caucasian	Controls consisted of male volunteers of at least 45 years old who had normal digital rectal examinations an prostate-specific antigen levels <2,5 ng /mL on at least two and up to six study visits.	Cases samples had a median time period of 3 years between disease diagnosis and enrollment into the study, also had biopsy-confirmed Pca.	496	496	intron 1(silent), Arg48Gly, Ala119Ser, Leu432Val, Asn453Ser

### 3.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Leu432Val

Ο πολυμορφισμός Leu432Val όπως προαναφέραμε οδηγεί στη μετατροπή της λευκίνης σε βαλίνη στη θέση 432 και στην αντικατάσταση του c σε g. Η ακριβής τοποθεσία του είναι στο 3<sup>ο</sup> εξώνιο. Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού ήταν πολύ μεγάλη μιας και απασχολούσε σχεδόν όλες τις μελέτες που συγκεντρώσαμε. Κάθε μελέτη που εξετάσαμε ανέφερε το πλήθος των ατόμων (Cases-Controls) που φέρουν τους γονότυπους cc, cg και gg (πίνακας 3.1.1). Συνολικά ο πολυμορφισμός Leu432Val περιελάμβανε 3206 υγιή άτομα και 3145 ασθενείς.

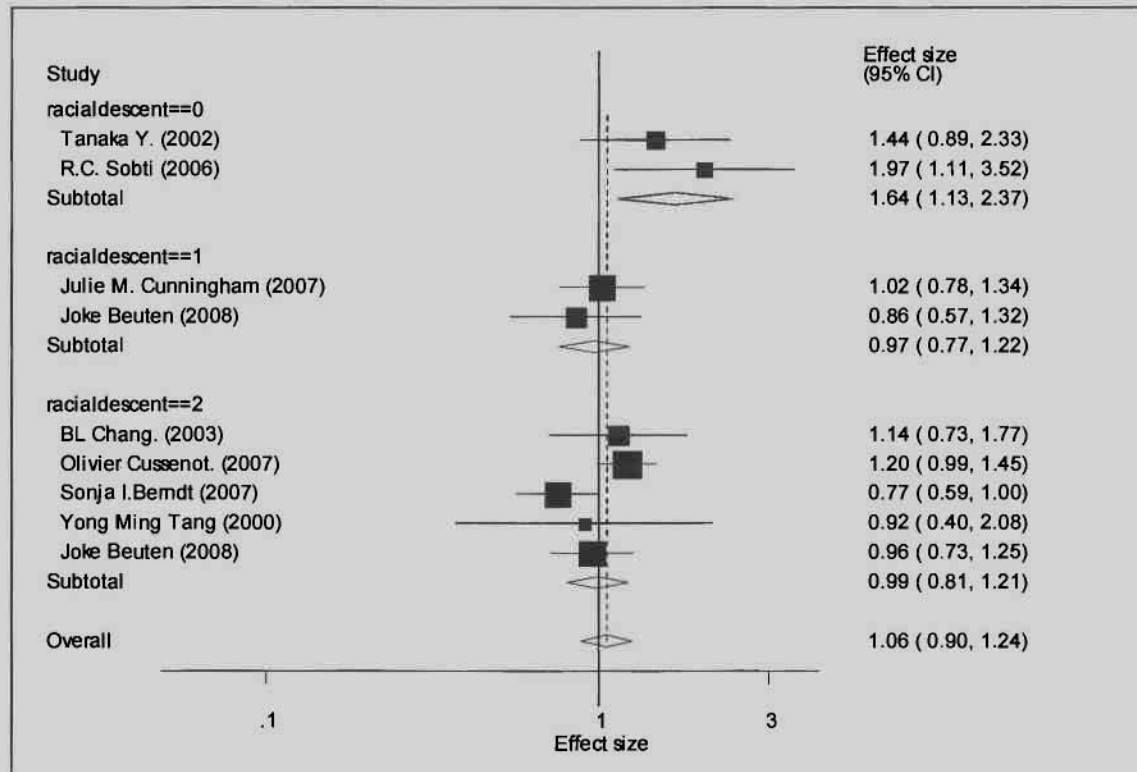
Πίνακας 3.1.1. Παρακάτω φαίνονται οι συσχετιστές των γονοτύπων που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση του Leu432Val.

Author	Year	Racial descent	cc genotypes		cg genotypes		gg genotypes		g Allele Frequency	
			Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
Tanaka Y.	2002	0	141	73	46	35	13	9	0,18	0,226495726
BL Chang.	2003	2	53	55	98	117	31	35	0,43956044	0,451690821
Olivier Cussenot.	2007	2	315	352	395	511	127	190	0,387694146	0,423076923
R.C. Sobti	2006	0	69	53	26	34	5	13	0,18	0,3
Sonja I.Berndt	2007	2	166	159	313	235	132	92	0,472176759	0,431069959
Yong Ming Tang	2000	2	17	18	27	16	6	16	0,39	0,48
Julie M. Cunningham*	2007	1								
Joke Beuten	2008	1	130	83	85	55	22	4	0,272151899	0,221830986
Joke Beuten	2008	2	161	164	234	231	101	96	0,439516129	0,430753564

\* Τα OR της συγκεκριμένης μελέτης υπολογίστηκαν χειρόγραφα από εμάς (μόνο σε ένα contrast) με τη βοήθεια ενός πίνακα στο συγκεκριμένο paper. Αυτό ισχύει για όλους τους πολυμορφισμούς που αναφέρετε η παρούσα μελέτη.

Η σύμπτυξη των γονοτύπων με ένα μοντέλο κληρονομικότητας επιτεύχθηκε εντοπίζοντας το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το αλληλόμορφο g είναι αυτό που προκαλεί την ασθένεια και το c είναι το φυσιολογικό. Έτσι προκύπτουν 2 είδη σύγκρισης των γονοτύπων, αφενός ο γονότυπος που ευθύνεται για την ασθένεια (gg) έναντι των υπολοίπων

(φυσιολογικό (cc) + υπολειπόμενο (cg)) και αφετέρου η ένωση του υπολειπόμενου (cg) με αυτό που προκαλεί την ασθένεια (gg) έναντι του φυσιολογικού (cc). Μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των γονοτύπων: α) gg έναντι cc+cg, β) cg+gg έναντι cc (εικόνα 3.1.1) καθώς και μεταξύ των αλληλομόρφων gallele έναντι callele.



Εικόνα 3.1.1. Παραπάνω βλέπουμε ένα forest plot μετα-ανάλυσης μεταξύ των γονοτύπων cg+gg vs cc του πολυμορφισμού *Leu432Val*.

Το παραπάνω forest plot απεικονίζει τη μετα-ανάλυση μεταξύ των γονοτύπων cg+gg vs cc. Αριστερά, φαίνονται οι μελέτες ανάλογα με τη χώρα προέλευσης των δειγμάτων καθώς και η χρονολογία που διεξήχθη η κάθε μελέτη. Δεξιά, διακρίνουμε τα OR (Effect size) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης (95% CI). Το αποτέλεσμα δεν μας εμφανίζει κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της ασθένειας, διότι το τελικό διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1. Επίσης για τις υπόλοιπες συγκρίσεις (gg vs cc+cg, gallele vs callele) δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση.

Η εξέταση της ετερογένειας έδειξε ότι υπάρχει σε μεγάλο βαθμό ετερογένεια (πίνακας 3.1.2). Ορισμένες μελέτες εξέταζαν δείγματα που προέρχονταν από διάφορες εθνικότητες. Αυτές τις μελέτες τις τοποθετήσαμε σαν μια ομάδα στη μελέτη μας. Συνεπώς η ύπαρξη ετερογένειας είναι αναμενόμενη λόγω διαφορετικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων.

Πίνακας 3.1.2. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού *Leu432Val*.

Contrast	Race	Number of studies	OR	95% CI	Between study variance ( $\tau^2$ )	P-value of heterogeneity	Q-Cochran	Inconsistency index (I <sup>2</sup> )
gallele vs callele	0	2	1,58	(1,090 2,289)	0,023	0,226	1,47	31,80%
	1	1	0,791	(0,660 0,950)	0		0	
	2	5	0,996	(0,821 1,209)	0,0291	0,014	12,48	67,90%
	All	8	1,049	(0,872 1,262)	0,0467	0	28,75	75,70%
gg vs cc+cg	0	2	1,745	(0,755 4,032)	0,1209	0,223	1,48	32,50%
	1	1	0,95	(0,696 1,299)	0		0	
	2	5	1,019	(0,678 1,532)	0,1295	0,006	14,26	72%
	All	8	1,08	(0,809 1,441)	0,0843	0,012	18,05	61,20%
gg+cg vs cc	0	2	1,639	(1,132 2,373)	0	0,412	0,67	0%
	1	2	0,99	(0,818 1,197)	0	0,733	0,12	0%
	2	5	0,978	(0,778 1,228)	0,0319	0,079	8,37	52%
	All	9	1,056	(0,899 1,241)	0,0259	0,053	15,32	47,80%

Μετά το test ετερογένειας εξετάσαμε αν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα αποτελέσματα από τα test του Begg και Egger καθώς και τα αντίστοιχα γραφήματα (εικόνα 3.1.2 και 3.1.3) έδειξαν ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης με  $P\text{-value} > 0,05$  (πίνακας 3.1.3).

#### Tests for Publication Bias

##### Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = 10  
 Std. Dev. of Score = 9.59  
 Number of Studies = 9  
 z = 1.04  
 Pr > |z| = 0.298  
 z = 0.94 (continuity corrected)  
 Pr > |z| = 0.348 (continuity corrected)

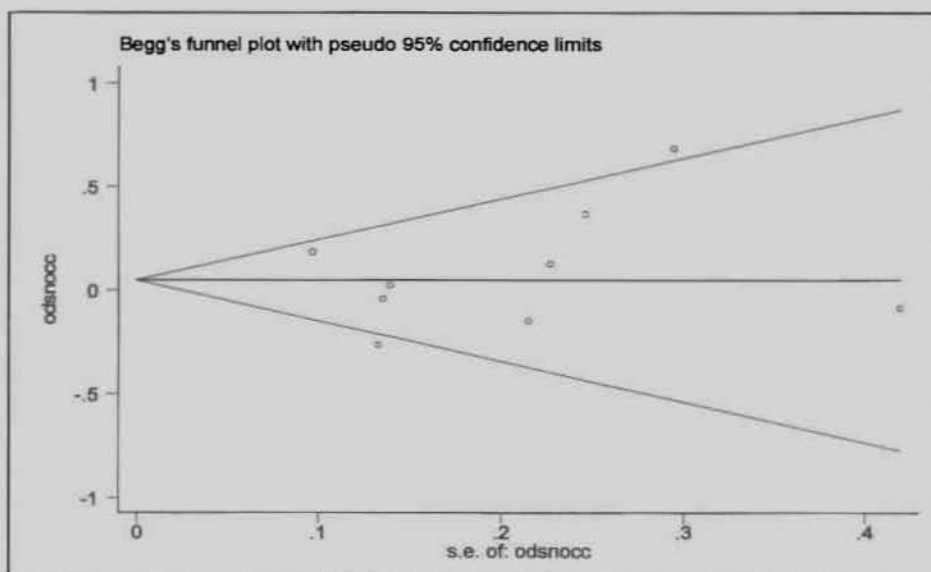
##### Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	-.0428536	.2025036	-0.21	0.838	-.5216985 .4359912
bias	.6019075	1.253376	0.48	<span style="background-color: #008000; color: white;">0.631</span>	-2.361855 3.56567

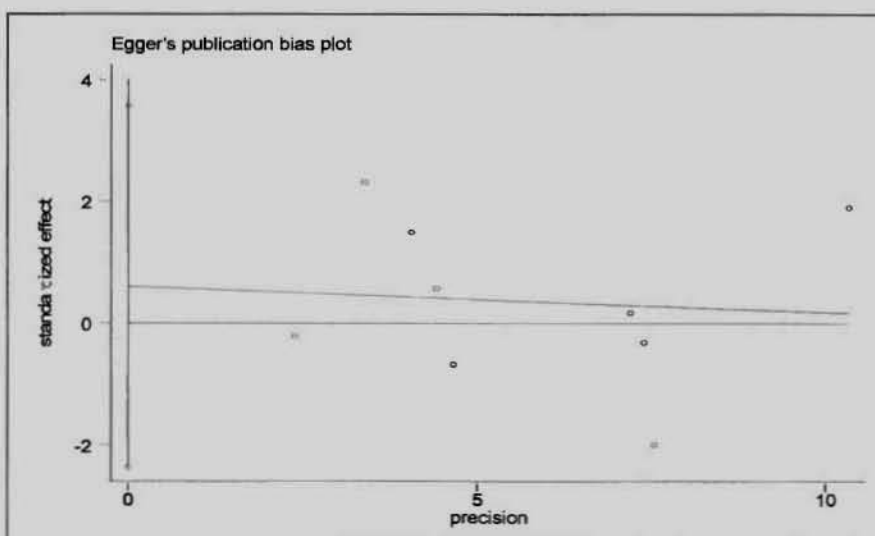
Πίνακας 3.1.3. Αποτελέσματα από τα test του Begg και Egger (cg+gg vs cc), παρατηρούμε ότι τα  $p\text{-value}$  είναι μεγαλύτερα από 0,05, συνεπώς δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Τέλος, ο έλεγχος για ισορροπία HWE έδειξε ότι όλες οι μελέτες ήταν σε ισορροπία με  $p$ -value μεγαλύτερα από 0,05 εκτός τη μελέτη του Tanaka Y η οποία είχε  $p$ -value = 0.003.



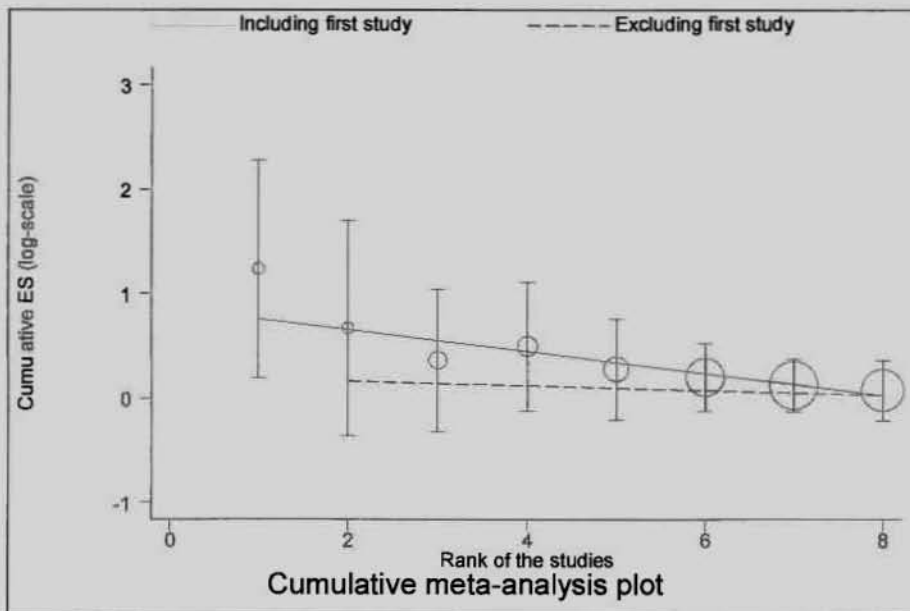
Εικόνα 3.1.2. Funnel plot του Begg ( $cg+gg$  vs  $cc$ ). Ο άξονας των  $y$  αναφέρεται στο  $\log OR$  ( $odsg$ ) και ο άξονας των  $x$  στο  $SE$  του  $\log OR$  ( $s.e$  of  $odsg$ ). Παρατηρούμε ότι οι μελέτες είναι συμμετρικές ως προς τον οριζόντιο άξονα του  $OR$ , αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 3.1.3. Funnel plot του Egger ( $cg+gg$  vs  $cc$ ).

### 3.1.1 ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Ο πολυμορφισμός Leu432Val απασχολούσε το μεγαλύτερο αριθμό μελετών. Χρησιμοποιήσαμε την εντολή metatrend για να πραγματοποιήσουμε αθροιστική μετα-ανάλυση. Η διεξαγωγή αυτής μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια διαχρονική τάση στους εκτιμητές (εικόνα 3.1.1.1).



Εικόνα 3.1.1.1. Γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων αθροιστικής μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού Leu432Val (gg vs. cg+cc).

Τα αποτελέσματα εμφάνισαν την ύπαρξη του φαινομένου του πρωτέα. Δηλαδή, κάποιος πέτυχε τυχαία μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και τις ασθένειας και αφού δημοσιεύθηκε η εργασία του, ώθησε κι' άλλους επιστήμονες να ασχοληθούν με αυτό. Οι υπόλοιποι δεν κατάφεραν να βρουν ισχυρή συσχέτιση και έτσι προκύπτει το φαινόμενο του πρωτέα. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της αθροιστικής μετα-ανάλυσης:

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

---

Number of studies: 8

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	3.4510	0.020	1.2203	9.7592
Subsequent studies	1.0051	0.970	0.7751	1.3033
All Studies	1.0796	0.603	0.8090	1.4407

Test for the equality of the ESs (log-scale)

---

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 2.256

P-value = 0.024

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	-0.10464	0.01767	0.000	-0.13927	-0.07002	-0.053
Excluding first study	-0.02239	0.00539	0.000	-0.03295	-0.01183	-0.708

Παρατηρούμε ότι το p-value είναι μικρότερο από 0,05 συνεπώς υπάρχει διαχρονική τάση στους εκτιμητές (trend).

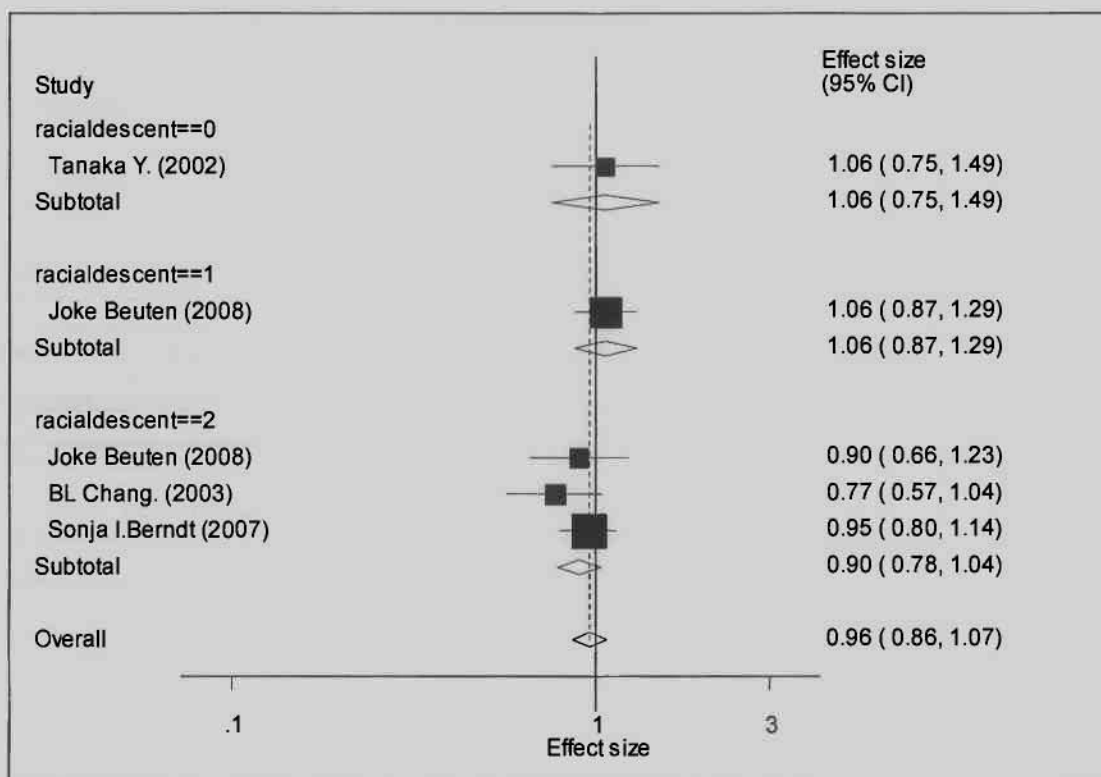
### 3.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Arg48Gly

Ο πολυμορφισμός Arg48Gly οδηγεί στη μετατροπή της αργινίνης σε γλυκίνη στη θέση 432 και στην αντικατάσταση του c σε g. Ο αριθμός των ασθενών και των μαρτύρων που απασχολούσε ο πολυμορφισμός ήταν 1960 και 2206, αντίστοιχα. Κάθε μελέτη που εξετάσαμε ανέφερε το πλήθος των ατόμων (Cases-Controls) που φέρουν τους γονότυπους cc, cg και gg (πίνακας 3.2.1).

Πίνακας 3.2.1. Παρακάτω φαίνονται οι συχνότητες των γονοτύπων που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση του Arg48Gly

Author	Year	Racial descent	cc genotypes		cg genotypes		gg genotypes		g Allele Frequency	
			Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
Tanaka Y.	2002	0	99	53	72	49	29	15	0,325	0,337606838
BL Chang.	2003	2	86	129	82	78	16	19	0,309782609	0,256637168
Sonja I. Berndt	2007	2	262	213	247	194	84	62	0,349915683	0,33901919
Julie M. Cunningham	2007	1								
Joke Beuten	2008	1	113	76	105	66	22	11	0,310416667	0,287581699
Joke Beuten	2008	2	275	262	175	189	46	45	0,269153226	0,28125

Μετά την σύμπτυξη των γονοτύπων σύμφωνα με το μοντέλο κληρονομικότητας που αναφέραμε στο πολυμορφισμό Leu432Val οδηγηθήκαμε στην ένωση των cg+gg και cc+cg (όπου g το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια). Έτσι μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε μεταξύ: gg έναντι cc+cg, gg+cg έναντι cc αλλά και μεταξύ των gallele έναντι callele (εικόνα 3.2.1). Παρατηρούμε ότι το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1, συνεπώς δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού Arg48Gly και του καρκίνου του προστάτη όσον αφορά την εξέταση των αλληλομόρφων. Μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε και μεταξύ των gg έναντι cc+cg και cc+cg έναντι gg, δίχως όμως να αποφέρουν κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 3.2.1. Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης μεταξύ των *gallele vs callele* του πολυμορφισμού *Arg48Gly*.

Ο υπολογισμός της ετερογένειας έδειξε ότι τα δείγματα μας είναι ομοιογενή (πίνακας 3.2.2). Αυτό το συμπεραίνουμε από τα test ετερογένειας. Παρατηρούμε ότι το  $I^2$  είναι 13,3%, το  $\tau^2$  είναι σχεδόν μηδενικό και το p-value μεγαλύτερο από 0,1. Συνεπώς δεν υπάρχει ένδειξη ετερογένειας μεταξύ των μελετών.

Πίνακας 3.2.2. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού *Arg48Gly*.

Contrast	Race	Number of studies	OR	95% CI	Between study variance ( $\tau^2$ )	P-value of heterogeneity	Q-Cochran	Inconsistency index ( $I^2$ )
gallele vs callele	0	1	1,059	(0,752 1,491)	0		0	
	1	1	1,063	(0,872 1,294)	0		0	
	2	3	0,901	(0,784 1,035)	0	0,497	1,4	0%
	All	5	0,962	(0,863 1,071)	0	0,472	3,54	0%
gg vs cc+cg	0	1	0,867	(0,444 1,694)	0		0	
	1	1	0,976	(0,634 1,502)	0		0	
	2	3	0,905	(0,677 1,210)	0	0,893	0,23	0%
	All	5	0,92	(0,733 1,154)	0	0,987	0,34	0%
gg+cg vs cc	0	1	1,184	(0,749 1,870)	0		0	
	1	2	1,028	(0,857 1,233)	0	0,369	0,81	0%
	2	3	0,858	(0,694 1,060)	0,007	0,292	2,46	18,80%
	All	6	0,958	(0,836 1,097)	0,0039	0,33	5,77	13,30%

Μετά το test ετερογένειας εξετάσαμε αν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα αποτελέσματα από τα test του Begg και Egger έδειξαν ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης με  $P\text{-value} > 0,05$  (πίνακας 3.2.3) που σημαίνει ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση (δεν υπάρχει σφάλμα). Τα παρακάτω funnel plots των Begg (εικόνα 3.2.2) και Egger (εικόνα 3.2.3) επιβεβαιώνουν γραφικά την μη ύπαρξη συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης. Ακόμη, απόκλιση από την ισορροπία HWE σημειώθηκε σε 3 μελέτες (27, 33, 28)

#### Tests for Publication Bias

##### Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = 0

Std. Dev. of Score = 4.08

Number of Studies = 5

z = 0.00

Pr > |z| = 1.000

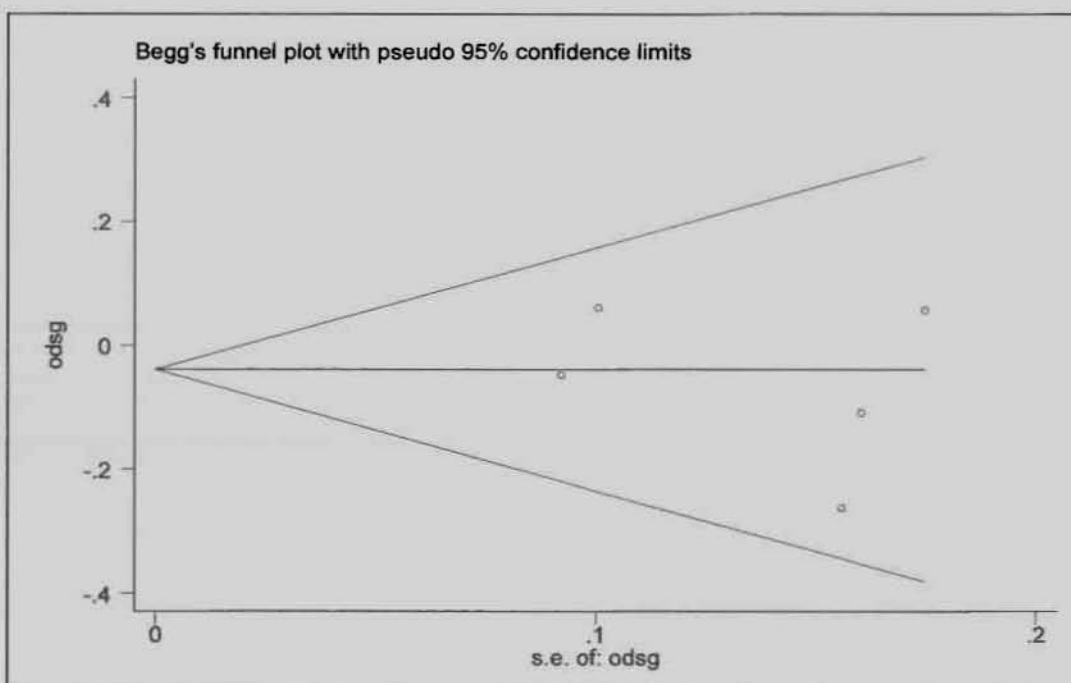
z = -0.24 (continuity corrected)

Pr > |z| = 1.000 (continuity corrected)

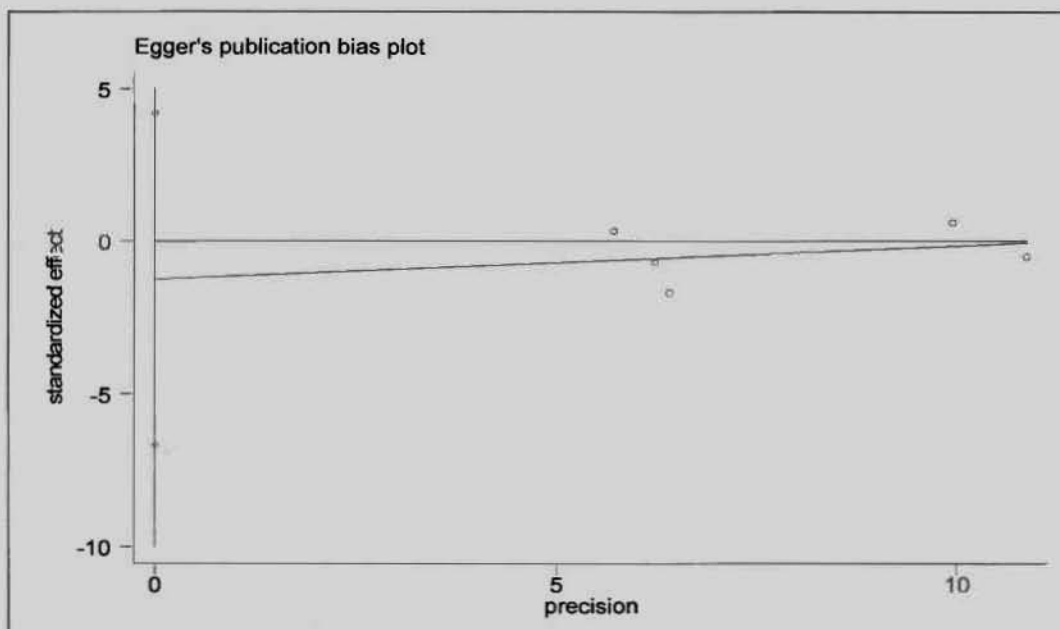
##### Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% CI]	
slope	.1092442	.210098	0.52	0.639	-.5593814	.7778698
bias	-1.248053	1.70659	-0.73	0.518	-6.679183	4.183078

Πίνακας 3.2.3. Αποτελέσματα από τα test του Begg και Egger (*gallele vs callele*)., παρατηρούμε ότι τα  $p\text{-value}$  είναι μεγαλύτερα από 0,05, συνεπώς δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 3.2.2. Funnel plot του Begg (*gallele vs callele*). Ο άξονας των  $y$  αναφέρεται στο  $\log OR$  (*odsg*) και ο άξονας των  $x$  στο  $SE$  του  $\log OR$  (*s.e of odsg*). Παρατηρούμε ότι οι μελέτες είναι συμμετρικές ως προς τον οριζόντιο άξονα του  $\log OR$ , αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 3.2.3. Funnel plot του Egger (*gallele vs. callele*).

### 3.3 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Asn453Ser

Ο πολυμορφισμός Asn453Ser συμβάλλει στην μετατροπή της ασπαραγίνης σε σερίνη στην αμινοξική θέση 453 και οδηγεί στην αντικατάσταση του a σε g. Ο πολυμορφισμός αυτός αναφέρεται σε 5 μελέτες και απασχολεί συνολικά 1992 ασθενείς και 2111 μάρτυρες (Πίνακας 3.3.1).

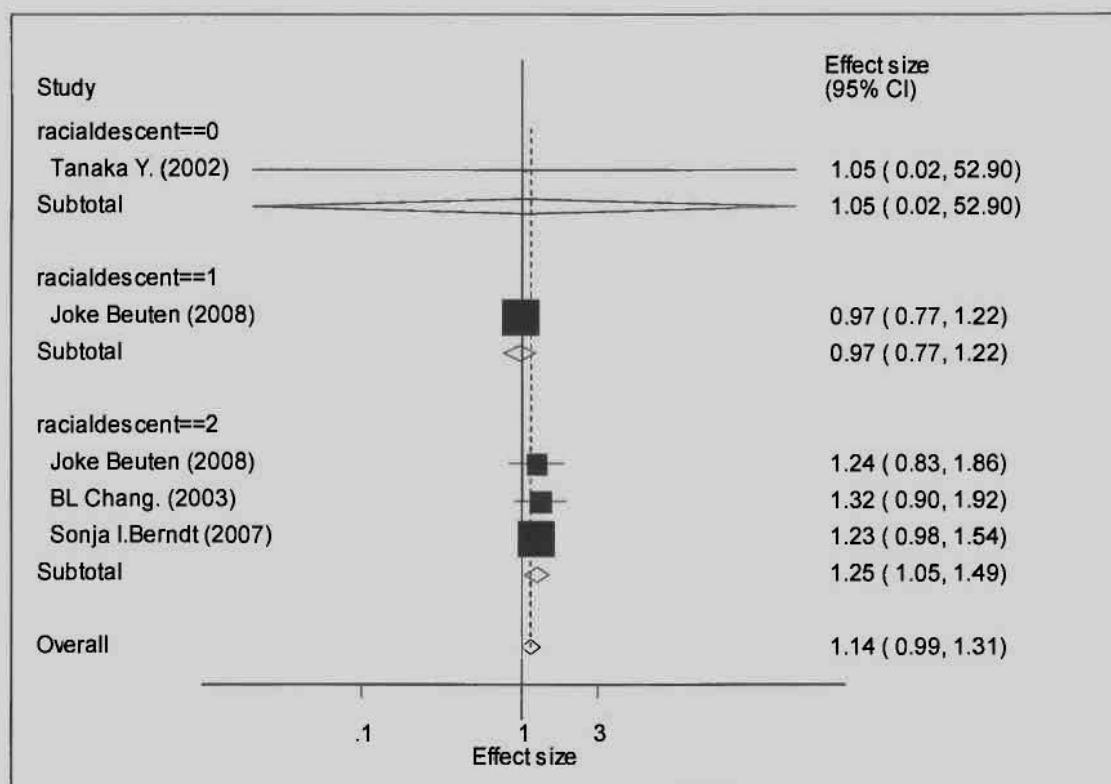
Πίνακας 3.3.1. Παρακάτω φαίνονται οι συννήτες των γονοτύπων που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση του Asn453Ser.

Author	Year	Racial descent	aa genotypes		ag genotypes		gg genotypes		g Allele Frequency	
			Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
Tanaka Y.	2002	0	200	117	0	0	0	0	0	0
BL Chang.	2003	2	132	131	44	64	6	7	0,153846154	0,193069307
Sonja I. Berndt	2007	2	437	324	157	145	14	15	0,152138158	0,180785124
Julie M. Cunningham	2007	1								
Joke Beuten	2008	1	170	104	57	41	3	4	0,211409396	0,106521739
Joke Beuten	2008	2	309	299	148	142	22	19	0,200417537	0,195652174

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της μετα-ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν οι εξής συνδυασμοί γονοτύπων: aa+ag και ag+gg (σύμφωνα με το μοντέλο που προαναφέραμε, όπου g το αλληλόμορφο που ευθύνεται για την ασθένεια). Μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε μεταξύ: gg έναντι aa+ag, ag+gg έναντι aa, καθώς και μεταξύ των gallele έναντι aallele (Εικόνα 3.3.1).

Στο παραπάνω forest plot παρατηρούμε ότι το διάστημα εμπιστοσύνης περιέχει οριακά την τιμή 1, γι'αυτό μπορούμε να ισχυριστούμε ότι υπάρχει ασθενής συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον καρκίνο του προστάτη, κατά τη μετα-ανάλυση που προκύπτει από το συνδυασμό (contrast) των αλληλομόρφων. Μετα-ανάλυση πραγματοποιήθηκε και μεταξύ των gg έναντι aa+ag και ag+gg έναντι aa, δίχως όμως να αποφέρουν κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (βλέπε παράτημα).





Εικόνα 3.3.1. Το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης μεταξύ των *gallele* έναντι *aallele* του πολυμορφισμού *Asn453Ser*.

Ο υπολογισμός της ετερογένειας έδειξε ότι τα δείγματά μας είναι ομοιογενή. Παρατηρούμε ότι το  $I^2$  και το  $\tau^2$  έχουν μηδενική τιμή καθώς και το  $p$  είναι πολύ μεγαλύτερο από 0,1 (Πίνακας 3.3.2), έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας.

Πίνακας 3.3.2. Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού *Asn453Ser*.

Contrast	Race	Number of studies	OR	95% CI	Between study variance ( $\tau^2$ )	P-value of heterogeneity	Q-Cochran	Inconsistency index ( $I^2$ )
<i>gallele</i> vs <i>aallele</i>	0	1	1,046	(0,021 52,902)	0		0	
	1	1	0,97	(0,773 1,218)	0		0	
	2	3	1,25	(1,049 1,489)	0	0,955	0,09	0%
	All	5	1,137	(0,990 1,306)	0	0,544	3,09	0%
<i>Gg</i> vs <i>aa+ag</i>	0	1	1,082	(0,021 54,870)	0		0	
	1	1	0,895	(0,478 1,676)	0		0	
	2	3	1,349	(0,764 2,384)	0	0,774	0,51	0%
	All	5	1,121	(0,737 1,704)	0	0,842	1,41	0%
<i>gg+ag</i> vs <i>aa</i>	0	1	1,082	(0,021 54,870)	0		0	
	1	2	0,953	(0,789 1,151)	0	0,784	0,07	0%
	2	3	1,289	(1,055 1,574)	0	0,864	0,29	0%
	All	6	1,098	(0,958 1,260)	0	0,417	4,99	0%

Τα test των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης, εμφανίζοντας p-value μεγαλύτερα από 0,05 (πίνακας 3.3.3). Τα γραφήματα των Begg (εικόνα 3.3.2) και Egger (εικόνα 3.3.3) επαληθεύουν και αυτά τη μη ύπαρξη συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης.

#### Tests for Publication Bias

##### Begg's Test

```

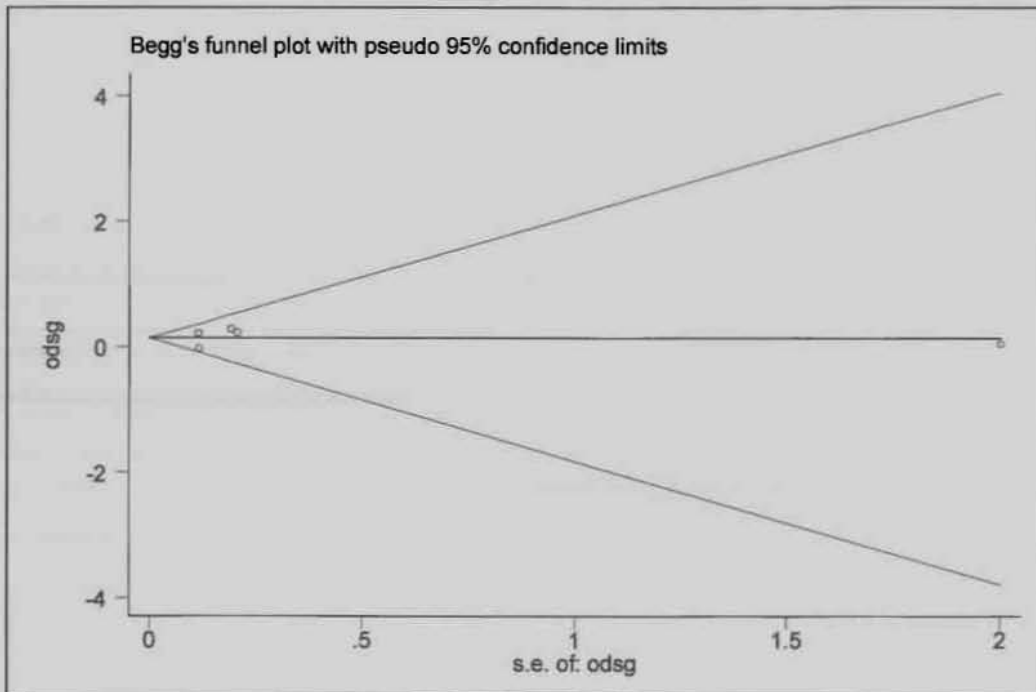
adj. Kendall's Score (P-Q) =      -4
      Std. Dev. of Score =      4.08
      Number of Studies =        5
              z =      -0.98
      Pr > |z| =      0.327
              z =      0.73 (continuity corrected)
      Pr > |z| =      0.462 (continuity corrected)
  
```

##### Egger's test

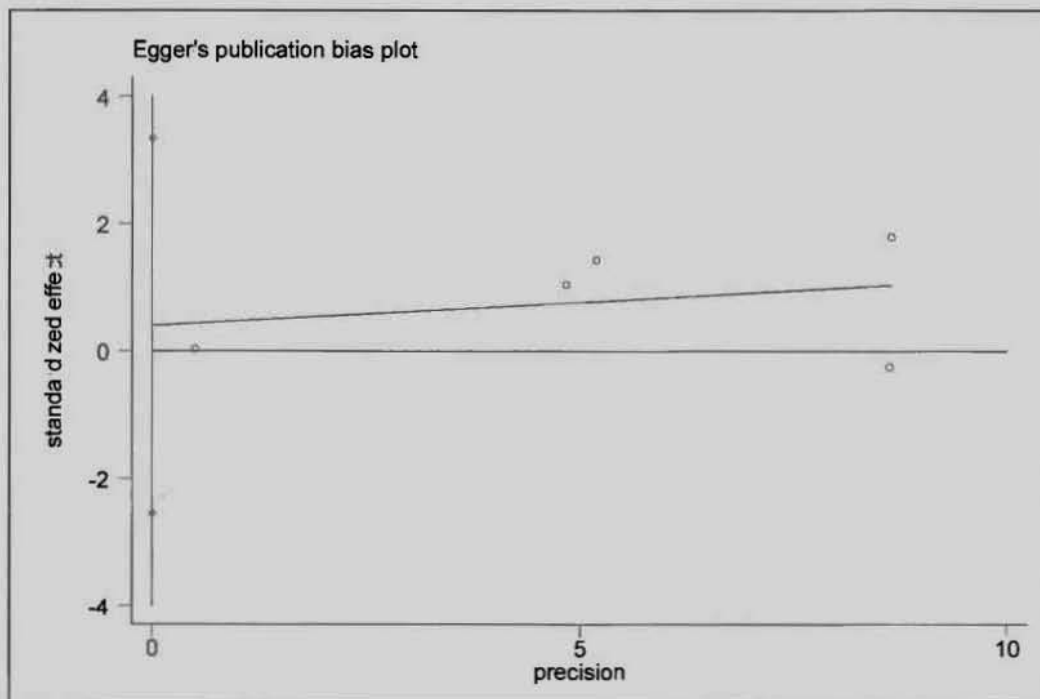
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.0738804	.1463923	0.50	0.649	-.3920052	.539766
bias	.393258	.9259877	0.42	0.700	-2.553648	3.340164

Πίνακας 3.3.3. Αποτελέσματα από τα test του Begg και Egger (*gallele vs aallele*), παρατηρούμε ότι τα p-value είναι μεγαλύτερα από 0,05 συνεπώς δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.

Τέλος, ο έλεγχος για ισορροπία HWE έδειξε ότι όλες οι μελέτες ήταν σε ισορροπία με p-value μεγαλύτερα από 0,05.



Εικόνα 3.3.2. *Funnel plot του Begg (gallele vs aallele). Παρατηρούμε ότι οι μελέτες είναι συμμετρικές ως προς τον οριζόντιο άξονα του logOR, αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.*



Εικόνα 3.3.3. *Funnel plot του Egger (gallele vs. aallele). Δεν υπάρχει σφάλμα διότι το p-value είναι μεγαλύτερο από 0.05 στο test του Egger.*

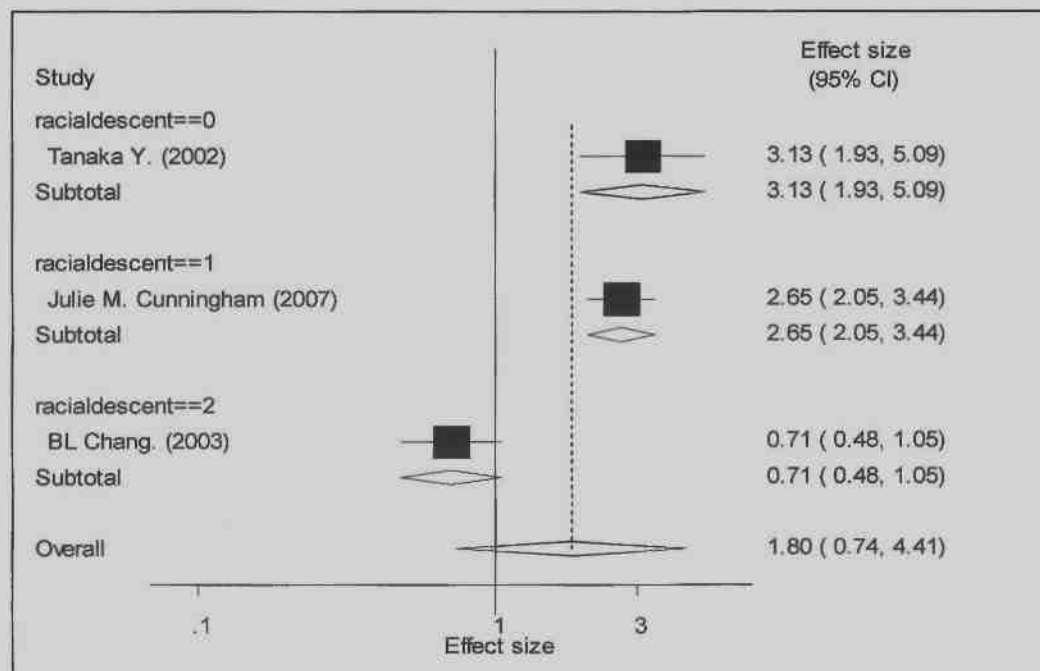
### 3.4 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ Ala119Ser

Ο πολυμορφισμός Ala119Ser συμβάλλει στην μετατροπή της αλανίνης σε σερίνη στην αμινοξική θέση 119 και οδηγεί στην αντικατάσταση του g σε t. Ο πολυμορφισμός αυτός εξετάστηκε συνολικά από 3 μελέτες και απασχολούσε 843 ασθενείς και 878 μάρτυρες (πίνακας 3.4.1).

Πίνακας 3.4.1. Παρακάτω φαίνονται οι συνθέτες των γονοτύπων που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση του Ala119Ser.

Author	Year	Racial descent	gg genotypes		gt genotypes		tt genotypes		t Allele Frequency	
			Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
Tanaka Y.	2002	0	151	58	38	42	11	17	0,15	0,32478632
BL Chang.	2003	2	86	125	83	83	16	19	0,31081081	0,26651982
Julie M. Cunningham	2007	1								

Μετά την ένωση των γονοτύπων gg+gt και gt+tt σύμφωνα με το μοντέλο κληρονομικότητας που αναφέραμε στους προηγούμενους πολυμορφισμούς (όπου t το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια) πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση μεταξύ: tt έναντι gg+gt, gt+tt έναντι gg (εικόνα 3.4.1) καθώς και tallele έναντι gallele.



Εικόνα 3.4.1. Forest plot μετα-ανάλυσης μεταξύ των gt+tt έναντι gg του πολυμορφισμού Ala119Ser.

Στη παραπάνω εικόνα βλέπουμε ότι το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 συνεπώς δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του καρίνου του προστάτη κατά την εξέταση των γονότυπων  $gt+tt$  έναντι  $gg$ . Παρομοίως, η εξέταση των γονότυπων  $tt$  έναντι  $gg+gt$  αλλά και των αλληλομόρφων Tallele έναντι Gallele δεν έδωσαν κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Η εξέταση της ετερογένειας παρατίθεται στο παράρτημα ενδεικτικά διότι 2 μελέτες δεν μπορούν να μας παρέχουν σαφή εικόνα για την ύπαρξη ετερογένειας. Τέλος, ο έλεγχος για την ισορροπία HWE έδειξε να βρίσκεται σε ανισορροπία μόνο η μελέτη του Tanaka Y (27).

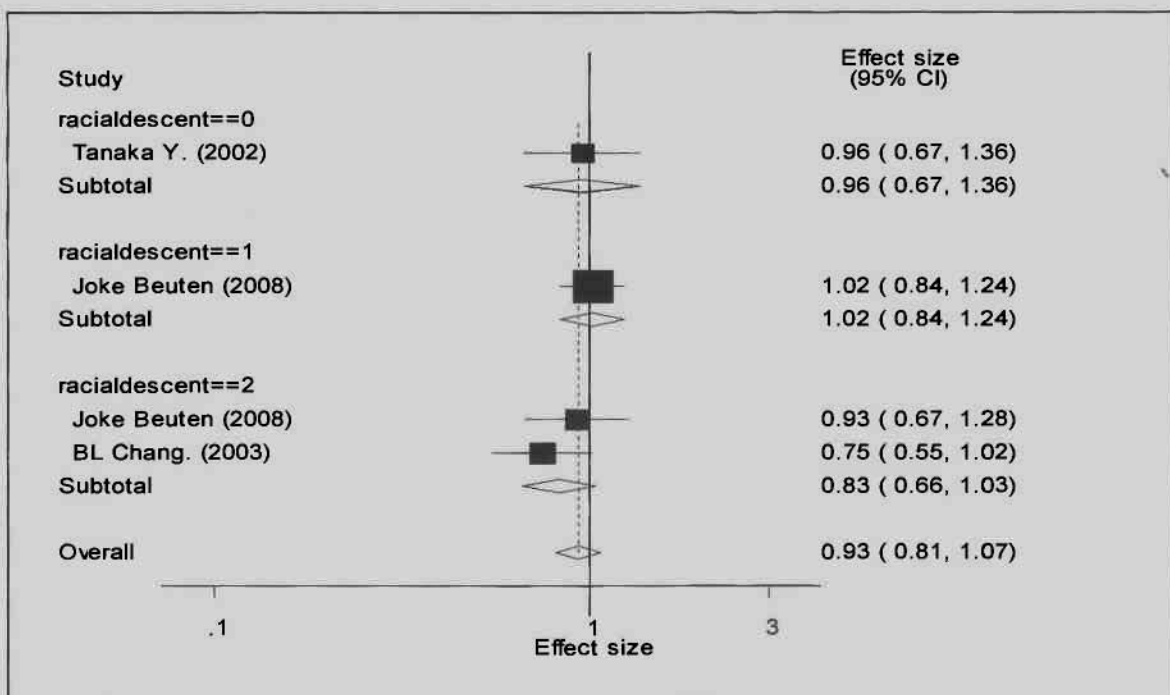
### 3.5 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ intron 1 (c→t)

Ο πολυμορφισμός intron 1 (c→t) τοποθετείτε στο εσώνιο 1 και οδηγεί στην αντικατάσταση του c σε t. Ο πολυμορφισμός αυτός εξετάστηκε συνολικά από 4 μελέτες και απασχολούσε 994 ασθενείς και 1114 μάρτυρες (πίνακας 3.5.1).

Πίνακας 3.5.1. Παρακάτω φαίνονται οι συχνότητες των γονότυπων που συμπεριλήφθηκαν στη μετα-ανάλυση του intron 1 (c→t).

Author	Year	Racial descent	cc genotypes		ct genotypes		tt genotypes		t Allele Frequency	
			Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases	Controls	Cases
Tanaka Y.	2002	0	97	58	86	50	17	9	0,3	0,29059829
BL Chang.	2003	2	87	134	80	75	16	19	0,30601093	0,24780702
Joke Beuten	2008	1	123	80	95	63	21	10	0,28661088	0,27124183
Joke Beuten	2008	2	270	265	176	188	46	43	0,27235772	0,27620968

Μετά την ένωση των γονότυπων cc+ct και ct+tt σύμφωνα με το μοντέλο κληρονομικότητας που αναφέραμε στους προηγούμενους πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση μεταξύ: tt έναντι cc+ct, ct+tt έναντι cc (εικόνα 3.5.1) καθώς και tallele έναντι callele (όπου t το αλληλόμορφο που προκαλεί την ασθένεια).



Εικόνα 3.5.1. Forest plot μετα-ανάλυσης μεταξύ των Tallele έναντι Callele του πολυμορφισμού intron 1 (c→t).

Στο παραπάνω forest plot παρατηρούμε ότι, κατά την εξέταση των αλληλομόρφων, δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού intron 1 (c→t) με τον καρκίνο του προστάτη, επειδή το διάστημα εμπιστοσύνης περιέχει την τιμή 1. Επίσης καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ των tt έναντι cc+ct, ct+tt έναντι cc. Τα αποτελέσματα για το σφάλμα δημοσίευσης και για την ετερογένεια αναφέρονται ενδεικτικά στο παράρτημα επειδή το πλήθος των μελετών είναι πολύ μικρό. Απόκλιση από την ισορροπία HWE εμφάνιση μόνο η μελέτη του Joke Beuten (28).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



Στις μέρες μας ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί μία από τις συχνότερες ασθένειες στο ανδρικό φύλο συνιστώντας ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Ο καρκίνος του προστάτη σπάνια εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 45 ετών. Η συχνότητα και η θνησιμότητα της νόσου αυξάνουν με τη πάροδο της ηλικίας και το μεγαλύτερο ποσοστό παρουσιάζεται γύρω στα 70, ενώ μειώνεται μετά την ηλικία των 80 ετών. Τα αίτια εμφάνισης της νόσου παραμένουν άγνωστα παρόλαυτα πολλοί επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους σε γενετικούς παράγοντες (μεταλλάξεις ορισμένων γονιδίων) που μπορεί να ευθύνονται για τη νόσο. Η παρούσα πτυχιακή εργασία εξέτασε τη συσχέτιση 5 πολυμορφισμών του γονιδίου CYP1B1 με το καρκίνο του προστάτη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μετα-ανάλυσης. Το γονίδιο CYP1B1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 543 αμινοξέων, το κυτόχρωμα P450 1B1. Η λειτουργία του κυτοχρώματος είναι η υδροξυλίωση των οιστρογόνων σε 2-OH οιστρογόνα (9).

Από εξελικτική άποψη, η οικογένεια των κυτοχρωμάτων P4501 αναφέρεται αρχικά ότι αποτελείται από 2 μέλη, το κυτόχρωμα P4501 A1 και το P4501 A2. Το τρίτο και νεότερο μέλος της οικογένειας είναι το CYP1B1 που ανήκει στην 2<sup>η</sup> υποοικογένεια. Αν και τα γονίδια CYP1B1, CYP1A1 και CYP1A2 φαίνεται ότι προέρχονται από κοινό πρόγονο, το CYP1B1 στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 ενώ τα CYP1A1 και CYP1A2 στο 15. Αυτό υποδηλώνει ότι η υποοικογένεια CYP1B1 διαχωρίστηκε από την υποοικογένεια CYP1A πριν από περίπου 300 εκατομμύρια χρόνια (34).

Η αναζήτηση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης σε διεθνείς βάσεις δεδομένων (όπως η PDB) έδειξε ότι η δομή του κυτοχρώματος P450 1B1 δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Το CYP1B1 κατέχει το κωδικό Q16678 στη βάση δεδομένων της UniProt (43). Έπειτα ανατρέξαμε στην ιστοσελίδα της Swiss-model (37) η οποία πραγματοποιεί ομόλογη προτυποποίηση (Homology Modelling) των πρωτεϊνών και χρησιμοποιώντας το κωδικό του γονιδίου CYP1B1 (Q16678) εντοπίσαμε μια παρεμφερή τρισδιάστατη δομή η οποία αναφέρονταν στο γονίδιο CYP1A2 και είχε κωδικό 2hi4. Χρησιμοποιώντας το κωδικό 2hi4

μπορούμε να εντοπίσουμε τη δομή του CYP1A2 και στη βάση δεδομένων της PDB (47). Έπειτα χρησιμοποιήσαμε τον αλγόριθμο BLAST (35) για να συγκρίνουμε την ακολουθία των αμινοξέων της πρωτεΐνης μας με μια βάση δεδομένων. Τα αποτελέσματα του αλγόριθμου έδειξαν ότι το κυτόχρωμα P450 1B1 έχει 39% ομοιότητα με το ανθρώπινο κυτόχρωμα P450 1A2 (36).

Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα του BLAST:

Score = 357 bits (916), Expect = 6e-103, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 194/497 (39%), Positives = 281/497 (56%), Gaps = 13/497 (2%)

```

Query 21  TLLLLLSVLATVHVQQRLLRQRRRQLRSAPPGPFAWPLIGNAAVQAAHLSFARLARR 80
          T LLL ++ V + LR R + +PP P+ WPL+G+ +G+ HL+ +R+++R
Sbjct 12  TELLASAIFFCLVFWVLKGLRPRVPKGLKSPPEPWGWPLLGHVLTGLKGNPHLALSRSQR 71

Query 81  YGDVFQIRLGSCPIVVLNGERAIHQALVQQGSAFADRPFAFASFRVVSNGGRSMAFGHYSEH 140
          YGDV QIR+GS P++VL+ I QALV+QG F RP + +++ G+S+ F S
Sbjct 72  YGDVLQIRIGSTPVLVLSRLDITRQALVRQGDGDFKGRPDLYTSTLITDQSLTFSTDSGP 131

Query 141 -WKVQRRAAHSMMRNFFTRQPRSRQ--VLEGHVLSEARELVALLVVRGSADGAFLDPRPL 196
          W +RR A + + F P S LE HV EA+ L++ L A DP
Sbjct 132 VWAARRRLAQNALNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQELMAGPGHFDPYNO 191

Query 197 TVVAVANVMSAVCFGCRYSRDDPEFRELLSHNEEFGRVTGAGSLVDVMPWLQYFPNPVRT 256
          VV+VANV+ A+CFG + E L+ + EF T +G+ +D P L+Y PNP
Sbjct 192 VVVSVANVIGAMCFGQHFPESSDEMLSLVKNTHEFVETASSGNPLDFFPILRYLPNPALQ 251

Query 257 VFREFEQLNRFNSNFILDKFLRHCESLRPGAAPRDMMDAFILSAEKKAAGDSHGGGARLD 316
          F+ F N+ F F+ H + + RD+ A K + G +
Sbjct 252 RFKAF---NQRFLWFLQKTVQEHYQDFDKNSV-RDITGALF----KHSKKGPRASGNLIP 303

Query 317 LENVPATITDIFGASQDTLSTALQWLLLLFTRYPDVQTRVQAEVDQVGRDRLPCMGDQP 376
          E + + DIFGA DT++TA+ W L+ P++Q ++Q ELD V+GR+R P + D+P
Sbjct 304 QEKIVNLVNDIFGAGFDVTVAISWSLMYLVTKPEIQRKIQKELDTVIGRERRRPLSDRP 363

Query 377 NLPYVLAFLYEAMRFSSFPVPTIPHATTANTSVLGYHIPKDTVVFNQWVSNHNDPLKWP 436
          LPY+ AF+ E R SSF+P TIPH+TT +T++ G++IPK VFNQW VNHDP W +
Sbjct 364 QLPYLEAFILETFRHSSFLPFTIPHSTTRDITLNGFYIPKCCVFNQWQVNHDPPELWED 423

Query 437 PENFDPARFLDKDGL-INKDLTSRVMIFSVGKRRRCIGEELSKMQLFLFISILAHQCFRA 495
          P F P RFL DG INK L+ ++M+F +GKRRRCIGE L+K ++FLF++IL Q +F
Sbjct 424 PSEFRPERFLTADGTAINKPLSEKMMLFGMGKRRRCIGEVLAKEIFLFLAILLQQLFQSV 483

Query 496 NPNEPAKMNFSGYGLTIK 512
          P + YGLT+K
Sbjct 484 PPGVKVDLTPYGLTMK 500

```

Η τρισδιάστατη δομή του γονιδίου CYP1A2 είναι παρεμφερής με τη δομή του CYP1B1 λόγω ομοιότητας των πρωτεϊνικών ακολουθιών. Έτσι η δομή του CYP1A2 αποτελεί τρισδιάστατο μοντέλο για το γονίδιο CYP1B1. Παρακάτω φαίνεται η τρισδιάστατη δομή καθώς και οι θέσεις των πολυμορφισμών που εξετάσαμε:



Εικόνα 4.1. Τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μοντέλου P450 1B1 (CYP1B1). Τα βέλη απεικονίζουν τις θέσεις των πολυμορφισμών που εξετάσαμε.

Ο πολυμορφισμός Arg48Gly δεν απεικονίζεται στην παραπάνω δομή διότι τα κατάλοιπα εκτείνονται από το 49 μέχρι το 515.

Οι πολυμορφισμοί Leu432Val και Ala119Ser εμπλέκονται περισσότερο στην 4-υδροξυλίωση και λιγότερο στην 2-υδροξυλίωση της 17β-εστραδιόλης. Η 4-υδροξυλίωση της 17β-εστραδιόλης ήταν υψηλότερη για τους πολυμορφισμούς Ala119 και Val432 και χαμηλότερη για τους Ala119 και Leu432. Ακόμη ο πολυμορφισμός Leu432Val συμβάλλει στην 6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης η οποία είναι υψηλότερη για το πολυμορφισμό Leu432 απ'ότι για το Val432 καθώς και στην 6β και 16α-υδροξυλίωση της προγεστερόνης η οποία αποδίδεται σε χαμηλότερα επίπεδα στον πολυμορφισμό Leu432 απ'ότι στον Val432 (38).

Το γονίδιο CYP1B1 έχει κατά καιρούς συσχετιστεί με την εμφάνιση διαφόρων προκαρκινικών ουσιών από μελέτες που έγιναν στο *E.coli* και στο *S.typhimurium* με ανασυνδιασμένο DNA. Οι πολυμορφισμοί που συμβάλουν

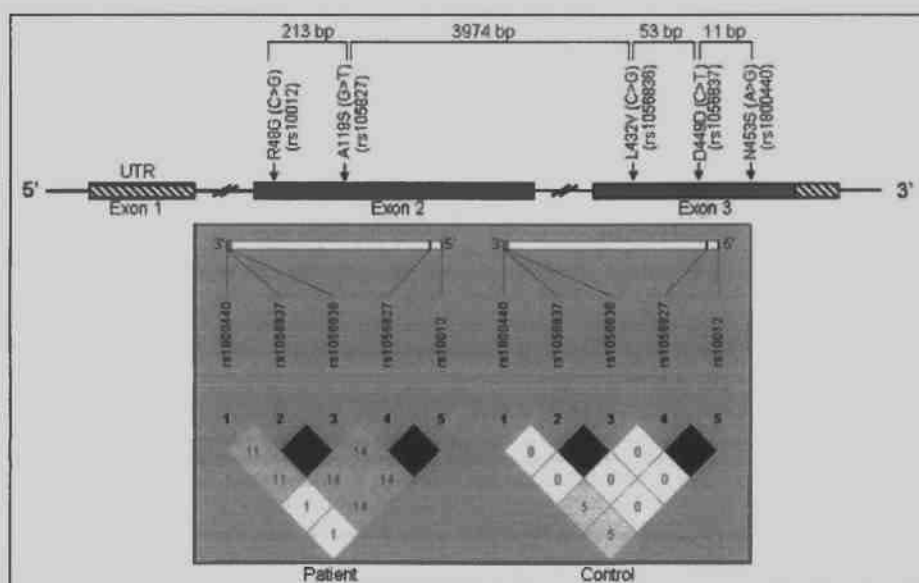
στην ενεργοποίηση αυτών των ουσιών είναι ο Leu432Val και ο Ala119Ser. Από τους 4 συνδυασμούς (διαφορετικά ένζυμα CYP1B1) που προκύπτουν μόνο ένας (Ser119, Leu432) εμφάνισε αύξηση στην ενζυμική ενεργότητα σε ποσοστό 20-50% (38). Εφόσον ένας συγκεκριμένος συνδυασμός αμινοξέων προκαλεί αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας προμηνύει την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης (Linkage Disequilibrium) μεταξύ ορισμένων αμινοξέων. Η αναζήτηση στην διεθνή βιβλιογραφία έδειξε ότι πολλές μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των καταλοίπων του γονιδίου CYP1B1. Η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απόδειξη ανισορροπίας σύνδεσης περιλαμβάνει μια μεταβλητή D η οποία κυμαίνεται από -1 μέχρι 1. Όσο περισσότερο η τιμή πλησιάζει το 1 ή το -1 τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα σύνδεσης έχουμε. Το 0 δείχνει ότι τα κατάλοιπα δεν σχετίζονται. Ισχυρή ανισορροπία σύνδεσης (D=1) βρέθηκε μεταξύ των πολυμορφισμών intron 1(T→C) silent, Arg48Gly και Ala119Ser καθώς και μεταξύ των Val432Leu και Codon 449, εξετάζοντας δείγματα που προήλθαν από ινδικό πληθυσμό (44). Ο παρακάτω πίνακας (πίνακας 4.1) παρουσιάζει τα αποτελέσματα ανισορροπίας σύνδεσης που προήλθαν από την εξέταση δειγμάτων στη νότια Βραζιλία (45).

			CYP1B1 C7431A	CYP1B1 G3457C	CYP1B1 G7644C
CYP1B1 C7431A	rs1056827	2 p22	X	-0.76 (0.17)	0.98 (0.97)
CYP1B1 G3457C	rs1800440	2 p22		X	-0.79 (0.18)
CYP1B1 G7644C	rs10012	2 p22			X

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα ανισορροπίας σύνδεσης προερχόμενα από δείγματα στη νότια Βραζιλία (45).

Παρατηρούμε ότι ο πολυμορφισμός Ala119Ser (rs105827) συνδέεται με τους Asn453Ser (rs1800440) και Arg48Gly (rs10012) με  $D=-0.76$  και  $D=0.98$ , αντίστοιχα. Επίσης υπάρχει σύνδεση του πολυμορφισμού Asn453Ser με τον Arg48Gly με  $D=-0.79$ .

Τα αποτελέσματα της ανισορροπίας σύνδεσης συνήθως απεικονίζονται και σχηματικά όπως φαίνεται παρακάτω (εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων ανισορροπίας σύνδεσης (46).

Τα παραπάνω αποτελέσματα αναφέρονται σε ινδικό πληθυσμό (46). Παρατηρώντας τους υγιείς (controls) βλέπουμε ότι υπάρχει σύνδεση του πολυμορφισμού Asn453Ser (rs1800440) με τους Ala119Ser (rs105827) και Arg48Gly (rs10012). Δεν εξετάζουμε τους ασθενείς γιατί οι πολυμορφισμοί σχετίζονται με τη συγκεκριμένη ασθένεια που διαπραγματεύεται η παρούσα μελέτη.

Όλες οι παραπάνω πληροφορίες για την ανισορροπία σύνδεσης των αμινοξέων μπορούν να φανούν χρήσιμες σε μια μετα-ανάλυση γιατί δεν θα εξετάζεται κάθε πολυμορφισμός ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους. Επίσης αν ξέρουμε πληροφορίες μόνο για έναν πολυμορφισμό μπορούμε να μάθουμε και για άλλους αν ξέρουμε ότι συνδέονται 100% μεταξύ τους. Η υλοποίηση μιας τέτοιας μετα-ανάλυσης δεν είναι εφικτή ακόμη, διότι δεν υπάρχει μέθοδος που να λαμβάνει υπόψη αυτές τις παραμέτρους. Η ανακάλυψη μιας τέτοιας μεθόδου θα αυξήσει την δύναμη της μετα-ανάλυσης.

Ακόμη, είναι αξιοσημείωτο να αναφέρουμε ότι πρόσφατα μελέτες έδειξαν ότι το CYP1B1 καθώς και το CYP1A1 συμβάλουν στην ενεργοποίηση καρκινικών ουσιών που ευθύνονται για το καρκίνο του πνεύμονα (39). Συνεπώς εφόσον το γονίδιο CYP1B1 ευθύνεται για την ενεργοποίηση προκαρκινικών αλλά και

καρκινικών ουσιών, τόσο σε πειραματικά δεδομένα όσο και στον ανθρώπινο πνεύμονα, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε τη πιθανότητα ότι αυτές οι ουσίες μπορεί να ευθύνονται και για τον καρκίνο του προστάτη.

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη πρώτη πλήρης μετα-ανάλυση που ερευνά τη συσχέτιση ορισμένων πολυμορφισμών του γονιδίου CYP1B1 με το καρκίνο του προστάτη. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης που αναφέρονταν στους πολυμορφισμούς Leu432Val, Ala119Ser, Arg48Gly και intron1(C→T) δεν κατάφεραν να δώσουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ακόμη, μια ασθενής συσχέτιση εντοπίσαμε κατά την εξέταση του πολυμορφισμού Asn453Ser με  $OR = 1,14$  και διάστημα εμπιστοσύνης  $CI = (0,99, 1,31)$ . Η αποτυχία στην ένδειξη κάποιας ισχυρής συσχέτισης μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό μελετών που εξέταζαν οι παραπάνω πολυμορφισμοί. Η δημοσίευση περισσότερων μελετών με αντικείμενο αυτούς τους πολυμορφισμούς μπορεί να επιφέρει πολύ σημαντικά αποτελέσματα σε μια μελλοντική μετα-ανάλυση, λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν συναντήσαμε ετερογένεια κατά την διάρκεια της μετα-ανάλυσης (εκτός από το πολυμορφισμό Leu432Val) και οι περισσότερες μελέτες ήταν σε ισορροπία HWE.

Ο πολυμορφισμός Leu432Val απασχολούσε το μεγαλύτερο αριθμό μελετών. Ακόμη και να υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια θα ήταν δύσκολο να την αποδεχθούμε διότι συναντήσαμε πολύ μεγάλο ποσοστό ετερογένειας. Τα αίτια της ετερογένειας δεν είναι γνωστά, πιθανόν να οφείλονται στα δείγματα των πληθυσμών που εξέταζαν οι πρωταρχικές μελέτες. Επίσης εντοπίσαμε και το φαινόμενο του Πρωτέα δηλαδή κάποιος κατά τύχη βρήκε μια ισχυρή συσχέτιση και ώθησε και τους υπόλοιπους ερευνητές να εξετάσουν το πολυμορφισμό, με συνέπεια την αμφισβήτηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού με την ασθένεια.

Την πιθανή ύπαρξη του φαινομένου του Πρωτέα την εξετάσαμε και στους υπόλοιπους πολυμορφισμούς. Όπως είχαμε προαναφέρει στο υποκεφάλαιο 3.1.1 η διεξαγωγή της αθροιστικής μετα-ανάλυσης (κάνοντας χρήση της εντολής *metatrend* και όχι *metacum*) μας βοήθησε να υπολογίσουμε σε στατιστικό

επίπεδο αν υπάρχει κλίση (trend) στις μελέτες μας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά κάθε πολυμορφισμού καθώς και η ύπαρξη ή μη κλίσης σε κάθε contrast που εξετάσαμε (πίνακας 4.2).

Πολυμορφισμός	Σύγκριση	Αριθμός Μελετών	Ασθενείς-Μάρτυρες	OR	Διάστημα Εμπιστοσύνης (CI)	Κλίση	Αριθμός μελετών που απαιτούνται
Leu432Val			3145/3206				
	gallele vs callele	7		1.05	(0.87, 1.26)	NAI	-
	gg vs cc+cg	7		1.08	(0.81, 1.44)	NAI	-
Arg48Gly	gg+cg vs cc	8		1.06	(0.90, 1.24)	NAI	-
			1960/2206				
	gallele vs callele	4		0.96	(0.86, 1.07)	OXI	26
Asn453Ser	gg vs cc+cg	4		0.92	(0.73, 1.15)	OXI	26
	gg+cg vs cc	5		0.96	(0.84, 1.10)	OXI	45
			1192/2111				
Intron 1 (silent)	gallele vs aallele	4		1.14	(0.99, 1.31)	NAI	-
	gg vs aa+ag	4		1.12	(0.74, 1.70)	OXI	50
	gg+ag vs aa	5		1.1	(0.96, 1.26)	NAI	-
			994/1114				
	tallele vs callele	3		0.93	(0.81, 1.07)	OXI	9
	tt vs cc+ct	3		0.89	(0.65, 1.21)	NAI	-
	tt+ct vs cc	3		0.91	(0.72, 1.14)	OXI	14

Πίνακας 4.2. Αναλυτική παρουσίαση για την ύπαρξη trend στους παραπάνω πολυμορφισμούς.

Αν δεν υπάρχει κλίση στις μελέτες μας και δεν έχουμε βγάλει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, μπορούμε να υπολογίσουμε πόσες μελέτες χρειάζονται ακόμη για να πάρουμε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Ο παρακάτω τύπος μας παρέχει αυτή τη δυνατότητα (42):

$$n = N \left( \frac{z_c^2}{z^2} - 1 \right)$$

Όπου:

$N$ , ο αριθμός των μελετών που έχουμε για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό,

$z_c = 1.96$

$z$ , το  $z$ -overall από το αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης

Όπως παρατηρούμε ο αριθμός των μελετών που απαιτούνται για να πάρουμε μια σημαντική συσχέτιση είναι πολύ μεγάλος σε όλους τους πολυμορφισμούς που

εξετάσαμε. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση των πολυμορφισμών με την ασθένεια και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που βγάλαμε με λιγότερες μελέτες. Ο πολυμορφισμός όμως Asn453Ser έδειξε μια ασθενή συσχέτιση με την ασθένεια, κάτι που μπορεί να είναι αμφισβητούμενο σήμερα λόγω ύπαρξης του φαινομένου του πρωτέα. Πρέπει για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό να δημοσιευτούν και άλλες μελέτες έτσι ώστε να υπάρξει μια καθαρή εικόνα για την συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Επίσης το ίδιο ισχύει και για το πολυμορφισμό Leu432Val. Μπορεί να μην έδειξε κάποια συσχέτιση αλλά εξέταζε αρκετές μελέτες και η ύπαρξη κλίσης εμποδίζει την εκτίμηση μιας μελλοντικής συσχέτισης. Έτσι είναι σκόπιμο να αυξηθεί ο αριθμός μελετών και γι' αυτόν το πολυμορφισμό.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Μομφερράτου Ε, Παράσχος ΑΛ., *Συνοπτική Περιγραφική Ανατομική*. 2001, Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
2. Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro, *Βασική Ιστολογία ΙΙ*. 4η Ελληνική Έκδοση ed. 2004, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
3. Peter Karlson, Wolfgang Gerok, Werner Grob, *Κλινική Παθολογική Βιοχημεία*. 1993, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
4. Allan Gaw, Robert A. Cowan, Denis St. J. O'Reilly, Michael J. Stewart, James Shepherd, *Κλινική Βιοχημεία*. 2003, Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιάνου Α.Ε.
5. 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. **18**(2).
6. Pan Z, Trikalinos TA, Kavvoura FK, Lau J, Ioannidis JP, *Local bias in genetic epidemiology : an empirical evaluation of the Chinese literature*. . PLoS Med, 2005. **2**: p. 334.
7. Ioannidis JP, Trikalinos TA, *Early extreme contradictory estimates may appear in published research: the Proteus phenomenon in molecular genetics research and randomized trials*. J Clin Epidemiol 2005. **58**: p. 543-549.
8. Mine S. Cicek, Xin Liu, Graham Casey, John S. Witte, *Role of androgen metabolism genes CYP1B1, PSA/KLK3, and CYP11a in prostate cancer risk and aggressiveness*. Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 2005. **14**(9): p. 2173-7.
9. Nock NL, Cicek MS, Li L, Liu X, Rybicki BA, Moreira A, Plummer SJ, Casey G, Witte JS., *Polymorphisms in estrogen bioactivation, detoxification and oxidative DNA base excision repair genes and prostate cancer risk*. Oxford Journals 2006. **27**(9): p. 1842-8.
10. Κωσταντόπουλος Α.Ν., *Ουρολογία ΙΙ*. 2003, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
11. <http://www.mead.upatras.gr/others/Panteliu/prostatescope/cap.htm>.
12. <http://medlab.cs.uoi.gr/erga/urology/ogkonidia.htm>.
13. Margaret W.Thompson, McInnes R.R., Huntington F.Willard, *Ιατρική Γενετική*. 2001, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

14. [http://www.klinikiagiouloukas.gr/mgz:n05\\_karkinikoi.php](http://www.klinikiagiouloukas.gr/mgz:n05_karkinikoi.php).
15. Δημόπουλος ΑΚ, *Ουρολογία*. Πέμπτη Έκδοση ed. 1998, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
16. Τρακατέλλης Α., *Βιοχημεία*. 2η Έκδοση 1996, Θεσσαλονίκη: Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη.
17. J Martin Bland, Douglas G Altman, *The odds ratio*. *BMJ*, 2000. **320**: p. 1468.
18. Jonathan A C Sterne, Michael J Bradburn, Matthias Egger. *Meta-analysis in Stata*. *Systematic Reviews*., 2001. Chapter 18: p. 347-369.
19. Monroe J., *Meta-Analysis for Observational Studies: Statistical Methods for Heterogeneity, Publication Bias and Combining Studies*. 2007, University of California: Los Angeles.
20. Fukatsu T, Hirokawa Y., Araki T, Hioki T, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Tsukino H, Qiu D, Katoh T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M., *Prostate Tumor Growth and Recurrence Can Be Modulated by the N-6:N-3 Ratio in Diet: Athymic Mouse Xenograft Model Simulating Radical Prostatectomy*. *Anticancer Res.*, 2004. **24**(4): p. 2431-7.
21. Sara Lindstrom, Fredrik Wiklund, Hans-Olov Adami, Katarina Augustsson Balter, Jan Adolfsson, and Henrik Gronberg, *Germ-Line Genetic Variation in the Key Androgen-Regulating Genes Androgen Receptor, Cytochrome P450, and Steroid-5-a-Reductase type 2 Is Important for Prostate Cancer Development*. *Cancer Res.*, 2006. **66**(22): p. 11077-83.
22. Munafò MR, Flint J., *Meta-analysis of genetic association studies*. *Trends in Genetics* 2004. **20**(9): p. 439-44.
23. Simon S.d., *Statistical evidence in medical trials*. Oxford Statistics, 2006.
24. Sharon-Lise T. Normand, *Meta-Analysis: Formulating, Evaluating, Combining and Reporting*. *Statistics in Medicine*, 1999. **18**: p. 321-59.
25. Robert M. Hamer, Pippa M. Simpson, *SAS® Tools for Meta-Analysis*. *Statistics and Data Analysis*: p. Paper 250-27.
26. Cunningham JM, Hebring SJ, McDonnell SK, Cicek MS, Christensen GB, Wang L, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau

- SN., *Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*, 2007. **16**(5): p. 969-78.
27. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R., *Polymorphisms of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer*. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2002. **296**(4): p. 820-6.
  28. Beuten J, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Price DK, Leach RJ., *CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians*. *Oxford Journals*, 2008. **29**(9): p. 1751-7.
  29. Tang YM, Green BL, Chen GF, Thompson PA, Lang NP, Shinde A, Lin DX, Tan W, Lyn-Cook BD, Hammons GJ, Kadlubar FF., *Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls*. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2000. **10**(9): p. 761-6.
  30. Sobti RC, Onsory K, Al-Badran AI, Kaur P, Watanabe M, Krishan A, Mohan H., *CYP17, SRD5A2, CYP1B1, and CYP2D6 Gene Polymorphisms with Prostate Cancer Risk in North Indian Population*. *DNA and Cell Biology*, 2006. **25**(5): p. 287-294.
  31. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, Fromont G, Mangin P, Cormier L, Fournier G, Valeri A, Larre S, Thibault F, Giordanella JP, Pouchard M, Zheng Y, Hamdy FC, Cox A, Cancel-Tassin G., *Combination of polymorphisms from genes related to estrogen metabolism and risk of prostate cancers: the hidden face of estrogens*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(24): p. 3596-602.
  32. Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Turner A, Hawkins GA, Wiley KE, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J., *Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer*. *British Journal of Cancer*, 2003. **89**(8): p. 1524-9.
  33. Sonja I. Berndt, Nilanjan Chatterjee, Wen-Yi Huang, Stephen J. Chanock, Robert Welch, E. David Crawford, Richard B. Hayes, *Variant in sex Hormone-Binding Globulin Gene and the Risk of Prostate Cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*, 2007. **16**(1): p. 165-8.
  34. Tang YM, Yu-Yuan P. Wo, Jane Stewart, Anita L. Hawkins, Constance A. Griffin, Thomas R. Sutter, William F. Greenlee, *Isolation and*

- characterization of the Human Cytochrome P450 CYP1B1 Gene\**. The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(45): p. 28324-28330.
35. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W., *A greedy algorithm for aligning DNA sequences*. Mary Ann Liebert, 2000. **7**(1-2): p. 203-14.
  36. Sansen S., Yano J.K., Reynald R.L., Schoch G.A., Griffin K.J., Stout C.D., Johnson E.F., *Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2*. J.Biol.Chem, 2007. **282**: p. 14348-14355.
  37. Jürgen K., Torsten S., *The SWISS-MODEL Repository: new features and functionalities*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**: p. D315-D318.
  38. Shimada T., Watanabe J., Kawajiri K., Sutter R.T., Guengerich F.P., Gillam M.J. Elizabeth, Inoue K., *Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants*. Carcinogenesis, 1999. **20**(8): p. 1607-1613.
  39. Shimada T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P., Sutter T.R., *Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1*. Cancer Res, 1996. **56**: p. 2979-2984.
  40. Lau J., Antman E.M., Jimenez-Silva J. et al., *Cumulative meta-analysis of therapeutic trials for myocardial infarction*. New England Journal of Medicine, 1992. **327**: p. 248-54.
  41. Bagos PG, Nikolopoulos GK., *Generalized least squares for assessing trends in cumulative meta-analysis: applications in genetic epidemiology*. Journal of Clinical Epidemiology, 2009.
  42. Barrowman JN., Fang M., Sampson M., Moher D., *Identifying null meta-analyses that are ripe for updating*. BMC Medical Research Methodology, 2003. **3**(13).
  43. Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M.J., Natale D.A., O'Donovan C., Redaschi N., Yeh L.S., *UniProt: the Universal Protein knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**: p. 115-119.
  44. Chakrabarti S., Koilkonda R.D., Komatireddy S., Kaur K., Parikh R.S., Mandal A.K., Chandrasekhar G., Ravi T., *Glaucoma-Associated CYP1B1 Mutations Share Similar Haplotype Backgrounds in POAG and PACG Phenotypes*. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2007. **48**: p. 5439-5444.

45. Abnet C.C., Fagundes R.B., Strickland P.T., Kamangar F., Roth J.M., Taylor R.P., Dawsey M.S., *The influence of genetic polymorphisms in Ahr, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST M1, GST T1 and UGT1A1 on urine 1-hydroxypyrene glucuronide concentrations in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil.* Carcinogenesis, 2007. **28**(1): p. 112-7.
46. Bhattacharjee A., Banerjee D., Mookherjee S., Acharya M., Banerjee A., Ray A., Sen A., Ray K., *Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primary open-angle glaucoma.* Mol Vis, 2008. **14**: p. 841-850.
47. Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer Jr E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M., *The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures.* J. Mol. Biol., 1977. **112** p. 535-542.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## 6.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα αυτών για το πολυμορφισμό Leu432Val:

Για τη σύγκριση gallele vs callele:

```
gen odsg= log(( gallele1* nogallele0)/( gallele0* nogallele1))
replace odsg= log((0.5+ gallele1)*(0.5+ nogallele0))/((0.5+ gallele0)*
(0.5+ nogallele1)) if gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0| nogallele0==0
gen stdodsg= sqrt(1/ gallele1+1/ nogallele1+1/ gallele0+1/ nogallele0)
replace stdodsg= sqrt(1/(0.5+ gallele1)+1/(0.5+ nogallele1)+
1/(0.5+ gallele0)+1/(0.5+ nogallele0)) if gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0|
nogallele0==0
metan odsg stdodsg, eform random by (racialdescent)
label(namevar= author, yearvar= year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)	1.334	0.896	1.987	10.10
R.C. Sobti (2006)	1.952	1.219	3.126	8.52
Sub-total				
D+L pooled ES	1.580	1.090	2.289	18.62
-----				
racialdescent==1				
Joke Beuten (2008)	0.791	0.660	0.950	16.07
Sub-total				
D+L pooled ES	0.791	0.660	0.950	16.07
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	0.762	0.540	1.077	11.44
BL Chang. (2003)	1.050	0.791	1.394	13.16
Olivier Cussenot. (2	1.158	1.016	1.320	17.39
Sonja I.Berndt (2007	0.847	0.715	1.003	16.42
Yong Ming Tang (2000	1.444	0.823	2.532	6.90
Sub-total				
D+L pooled ES	0.996	0.821	1.209	65.30
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.049	0.872	1.262	100.00
-----				

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	1.47	1	0.226	31.8%	0.0230
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	12.48	4	0.014	67.9%	0.0291
Overall	28.75	7	0.000	75.7%	0.0467

Παρατηρώντας το συνολικό OR=1,049 βλέπουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση διότι το διάστημα εμπιστοσύνης (0,872 1,262) εμπεριέχει τη τιμή 1 (εικόνα 6.1.1). Ακόμη, σημαντική ένδειξη ετερογένειας φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των μελετών. Αυτό το διακρίνουμε από το P-value που είναι μικρότερο από 0,1 αλλά και από τους δείκτες  $I^2$  (>50%) και  $\tau^2$  που αποδεικνύουν την ύπαρξη ετερογένειας.



### Για τη σύγκριση gg vs. cc+cg:

```
gen odsogg= log(( ggl* nogg0)/( gg0* nogg1))
replace odsogg= log((0.5+ ggl)*(0.5+ nogg0))/((0.5+ gg0)*
(0.5+ nogg1)) if ggl==0| nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
gen stdodsgg= sqrt(1/ ggl+1/ nogg1+1/ gg0+1/ nogg0)
replace stdodsgg= sqrt(1/(0.5+ ggl)+1/(0.5+ nogg1)+
1/(0.5+ gg0)+1/(0.5+ nogg0)) if ggl==0| nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
metan odsogg stdodsgg, eform random by( racialdescent)
label(namevar= author, yearvar= year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----			
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	1.199	0.496 2.897	7.55
R.C. Sobti (2006)	2.839	0.972 8.290	5.65
Sub-total			
D+L pooled ES	1.745	0.755 4.032	13.21
-----			
racialdescent==1			
Joke Beuten (2008)	0.950	0.696 1.299	19.75
Sub-total			
D+L pooled ES	0.950	0.696 1.299	19.75
-----			
racialdescent==2			
Joke Beuten (2008)	0.283	0.096 0.840	5.53
BL Chang. (2003)	0.991	0.583 1.685	13.75
Olivier Cussenot. (2	1.231	0.963 1.574	21.66
Sonja I.Berndt (2007	0.847	0.629 1.141	20.17
Yong Ming Tang (2000	3.451	1.220 9.759	5.93
Sub-total			
D+L pooled ES	1.019	0.678 1.532	67.04
-----			
Overall			
D+L pooled ES	1.080	0.809 1.441	100.00
-----			

#### Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	1.48	1	0.223	32.5%	0.1209
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	14.26	4	0.006	72.0%	0.1295
Overall	18.05	7	0.012	61.2%	0.0843

Παρατηρώντας το συνολικό OR=1,080 βλέπουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση διότι το διάστημα εμπιστοσύνης (0,809 1,441) περιέχει τη τιμή 1 (εικόνα 6.1.2). Ακόμη, υπάρχει ένδειξη ετερογένειας μεταξύ των μελετών. Αυτό το διακρίνουμε από το P-value που είναι μικρότερο από 0,1 αλλά και από τους δείκτες  $I^2$  (>50%) και  $\tau^2$  που αποδεικνύουν την ύπαρξη ετερογένειας.

### Για τη σύγκριση gg+cg vs. cc:

```
gen odsnocc= log(( noccl* cc0)/( noccl* cc1))
replace odsnocc= log((0.5+ noccl)*(0.5+ cc0))/((0.5+ noccl)*
(0.5+ cc1)) if ccl==0| noccl==0| cc0==0| noccl==0
gen stdodsnocc= sqrt(1/ ccl+1/ noccl+1/ cc0+1/ noccl)
replace stdodsnocc= sqrt(1/(0.5+ ccl)+1/(0.5+ noccl)+
1/(0.5+ cc0)+1/(0.5+ noccl)) if ccl==0| noccl==0| cc0==0| noccl==0
metan odsnocc stdodsnocc, eform random by( racialdescent)
label(namevar= author, yearvar= year) xlab(0.1,1,3)
```

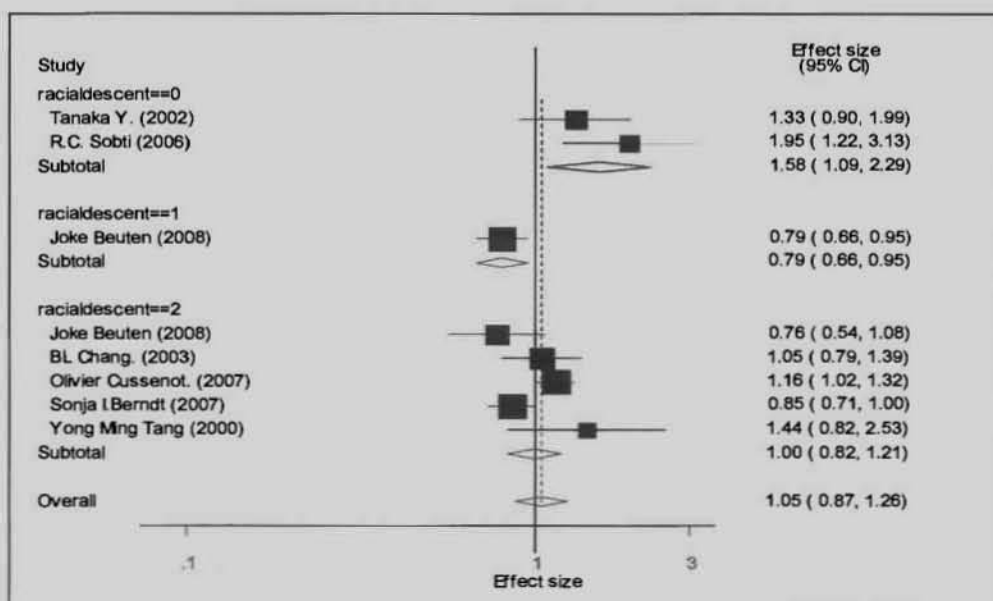
Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----			
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	1.440	0.890 2.332	7.81

R.C. Sobti (2006)	1.974	1.108	3.517	5.98
Sub-total				
D+L pooled ES	1.639	1.132	2.373	13.79
-----				
racialdescent==1				
Julie M. Cunningham	1.024	0.780	1.344	14.91
Joke Beuten (2008)	0.958	0.735	1.250	15.24
Sub-total				
D+L pooled ES	0.990	0.818	1.197	30.15
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	0.864	0.567	1.315	9.38
BL Chang. (2003)	1.135	0.728	1.771	8.73
Olivier Cussenot. (2007)	1.202	0.994	1.453	19.12
Sonja I.Berndt (2007)	0.767	0.591	0.995	15.49
Yong Ming Tang (2000)	0.916	0.403	2.084	3.34
Sub-total				
D+L pooled ES	0.978	0.778	1.228	56.06
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.056	0.899	1.241	100.00
-----				

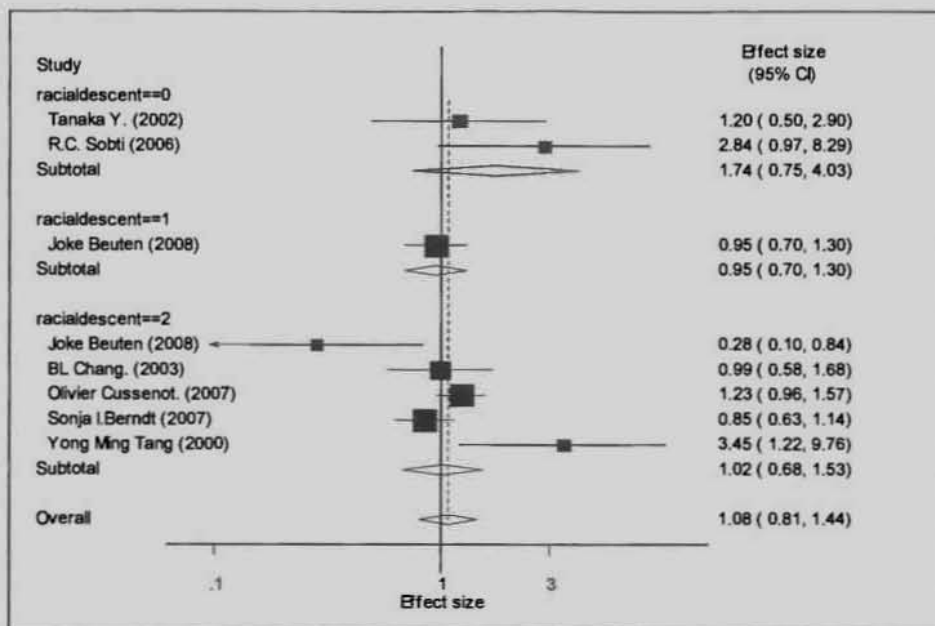
## Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.67	1	0.412	0.0%	0.0000
racialdescent==1	0.12	1	0.733	0.0%	0.0000
racialdescent==2	8.37	4	0.079	52.2%	0.0319
Overall	15.32	8	0.053	47.8%	0.0259

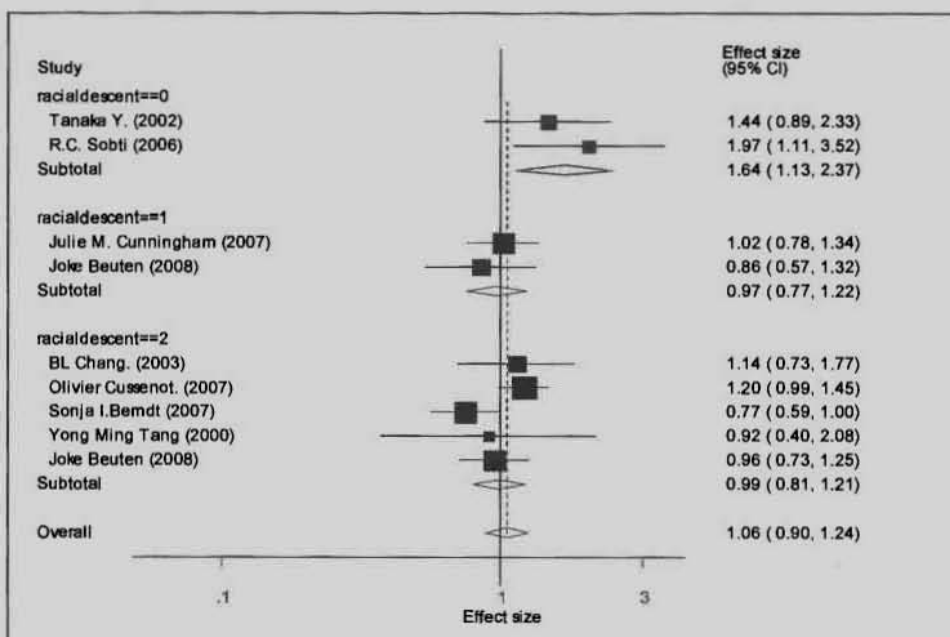
Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR είναι 1,056 με διάστημα εμπιστοσύνης (0,899 1,241). Το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 συνεπώς δε υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια (εικόνα 6.1.3). Ακόμη βλέπουμε ότι υπάρχει ασθενής ετερογένεια, η οποία φαίνεται από τους δείκτες:  $P < 0,1$ ,  $I^2 = 47.8\%$  και  $\tau^2$ .



Εικόνα 6.1.1. Forest plot των αλληλομόρφων (gallele vs callele) του πολυμορφισμού Leu432Val.



Εικόνα 6.1.2. Forest plot των  $gg$  vs  $cg+cc$  του πολυμορφισμού *Leu432Val*.



Εικόνα 6.1.3. Forest plot των  $gg+cg$  vs  $cc$  του πολυμορφισμού *Leu432Val*.

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού Arg48Gly:

Για τη σύγκριση *gallele* vs *callele*:

```
gen odsq= log(( gallele1* nogallele0)/( gallele0* nogallele1))
replace odsq=log((0.5+ gallele1)*(0.5+ nogallele0))/((0.5+ gallele0)*(0.5+ nogallele1)): if
gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0| nogallele0==0
gen stdodsq= sqrt(1/ gallele1+1/ nogallele1+1/ gallele0+1/ nogallele0)
replace stdodsq= sqrt(1/(0.5+ gallele1)+1/(0.5+ nogallele1)+
1/(0.5+ gallele0)+1/(0.5+ nogallele0)) if gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0|
nogallele0==0
```

```
metan odsg stdodsg, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar= year)
xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	1.059	0.752 1.491	9.94
Sub-total			
D+L pooled ES	1.059	0.752 1.491	9.94
racialdescent==1			
Joke Beuten (2008)	1.063	0.872 1.294	29.98
Sub-total			
D+L pooled ES	1.063	0.872 1.294	29.98
racialdescent==2			
Joke Beuten (2008)	0.897	0.655 1.228	11.80
BL Chang. (2003)	0.769	0.567 1.044	12.47
Sonja I.Berndt (2007)	0.953	0.796 1.141	35.81
Sub-total			
D+L pooled ES	0.901	0.784 1.035	60.09
Overall			
D+L pooled ES	0.962	0.863 1.071	100.00

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	1.40	2	0.497	0.0%	0.0000
Overall	3.54	4	0.472	0.0%	0.0000

Το συνολικό OR = 0,962 με διάστημα εμπιστοσύνης CI = (0,863 1,071) δείχνει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού και της ασθένειας (εικόνα 6.1.4). Επιπλέον το συνολικό p-value είναι μεγαλύτερο από 0,1 και δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας. Επίσης οι δείκτες  $I^2$  και  $\tau^2$  που αντιπροσωπεύουν την ύπαρξη ή όχι ετερογένειας, υποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

#### Για τη σύγκριση gg vs cc+cg:

```
gen odsgg= log(( gg1* nogg0)/( gg0* nogg1))
replace odsgg= log((0.5+ gg1)*(0.5+ nogg0)/((0.5+ gg0)*(0.5+ nogg1)) if gg1==0|
nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
gen stdodsgg= sqrt(1/ gg1+1/ nogg1+1/ gg0+1/ nogg0)
replace stdodsgg= sqrt(1/(0.5+ gg1)+1/(0.5+ nogg1)+1/(0.5+ gg0)+1/(0.5+ nogg0)) if
gg1==0| nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
metan odsgg stdodsgg, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar= year)
xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	0.867	0.444 1.694	11.46
Sub-total			
D+L pooled ES	0.867	0.444 1.694	11.46
racialdescent==1			
Joke Beuten (2008)	0.976	0.634 1.502	27.65
Sub-total			
D+L pooled ES	0.976	0.634 1.502	27.65
racialdescent==2			
Joke Beuten (2008)	0.768	0.361 1.632	9.04
BL Chang. (2003)	0.964	0.481 1.932	10.63
Sonja I.Berndt (2007)	0.923	0.648 1.314	41.23

Sub-total					
D+L pooled ES		0.905	0.677	1.210	60.90
-----					
Overall					
D+L pooled ES		0.920	0.733	1.154	100.00
-----					

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	0.23	2	0.893	0.0%	0.0000
Overall	0.34	4	0.987	0.0%	0.0000

Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR=0,920 με διάστημα εμπιστοσύνης CI=(0,733 1,154), συνεπώς μπορούμε να ισχυριστούμε ότι δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση (εικόνα 6.1.5). Ακόμη η τιμή του P-value είναι 0,987, πολύ μεγαλύτερη από 0,1, υποδεικνύοντας τη μη ύπαρξη ετερογένειας. Τόσο από το P-value όσο και από τους δείκτες ετερογένειας  $I^2$  και  $\tau^2$  οι οποίοι είναι μηδενικοί.

#### Για τη σύγκριση gg+cg vs cc:

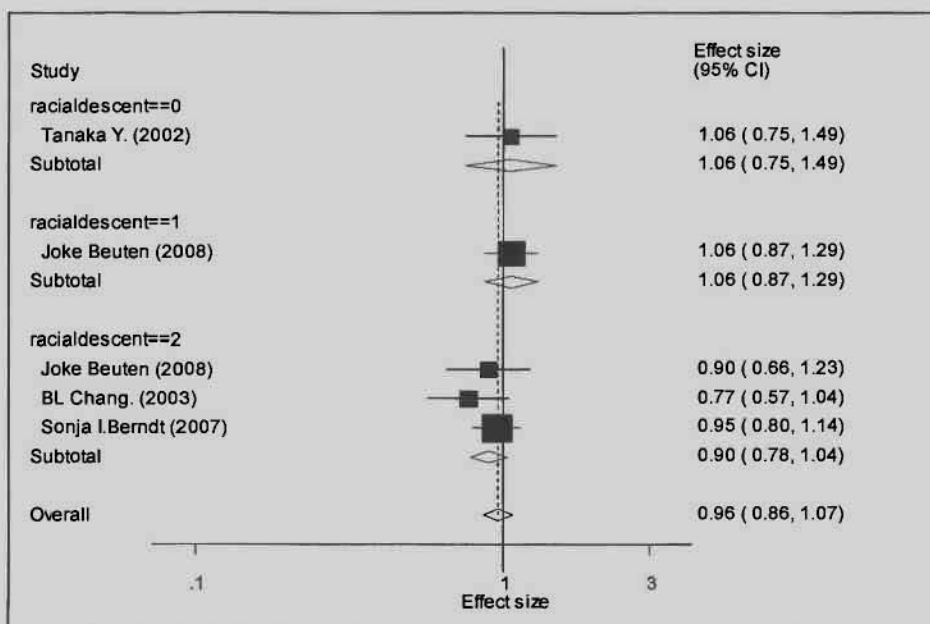
```
gen odsnoc = log(( noccl* cc0)/( noccl* cc1))
replace odsnoc = log((0.5+ noccl)*(0.5+ cc0))/((0.5+ noccl0)*(0.5+ cc1)) if cc1==0|
noccl==0| cc0==0| noccl0==0
gen stdodsnoc = sqrt(1/ cc1+1/ noccl+1/ cc0+1/ noccl0)
replace stdodsnoc = sqrt(1/(0.5+ cc1)+1/(0.5+ noccl)+1/(0.5+ cc0)+1/(0.5+ noccl0)) if
cc1==0| noccl==0| cc0==0| noccl0==0
metan odsnoc stdodsnoc, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar=
year) xlab(0.1,1,3)
```

Study		ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)		1.184	0.749 1.870	8.24
Sub-total				
D+L pooled ES		1.184	0.749 1.870	8.24
-----				
racialdescent==1				
Julie M. Cunningham		0.940	0.721 1.226	21.66
Joke Beuten (2008)		1.111	0.866 1.427	23.90
Sub-total				
D+L pooled ES		1.028	0.857 1.233	45.56
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)		0.901	0.601 1.353	10.30
BL Chang. (2003)		0.660	0.446 0.976	10.99
Sonja I. Berndt (2007)		0.951	0.746 1.214	24.91
Sub-total				
D+L pooled ES		0.858	0.694 1.060	46.19
-----				
Overall				
D+L pooled ES		0.958	0.836 1.097	100.00
-----				

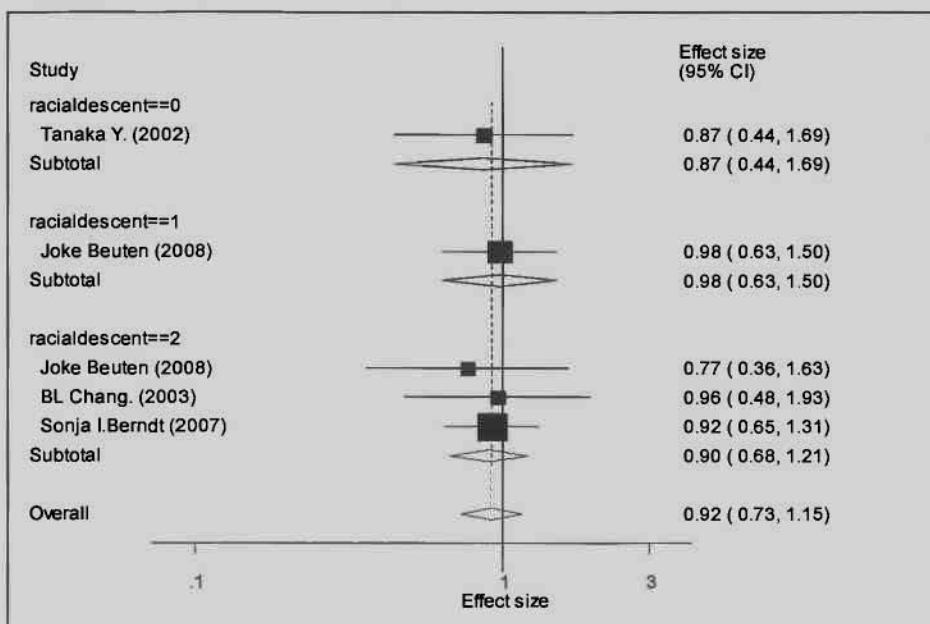
Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.81	1	0.369	0.0%	0.0000
racialdescent==2	2.46	2	0.292	18.8%	0.0070
Overall	5.77	5	0.330	13.3%	0.0039

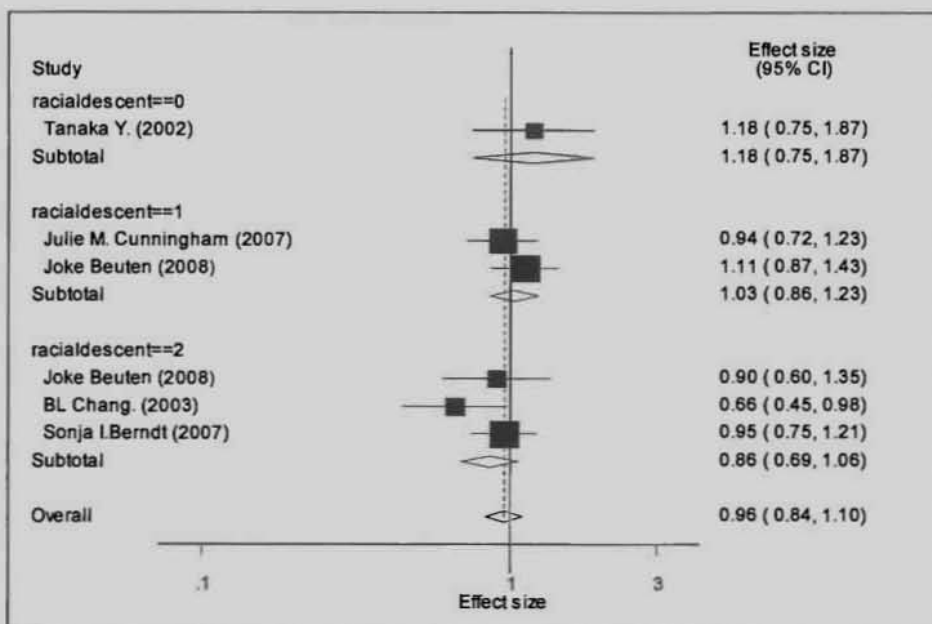
Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR παίρνει την τιμή 0,958 με διάστημα εμπιστοσύνης (0,836 1,097). Το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 συνεπώς δε υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια (εικόνα 6.1.6). Επιπλέον το συνολικό p-value είναι μεγαλύτερο από 0,1 και δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας. Επίσης οι δείκτες  $I^2$  και  $\tau^2$  που αντιπροσωπεύουν την ύπαρξη ή όχι ετερογένειας υποδεικνύουν και αυτοί ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.



Εικόνα 6.1.4. Forest plot των αλληλομόρφων (*gallele vs callele*) του πολυμορφισμού *Arg48Gly*.



Εικόνα 6.1.5. Forest plot των *gg vs cg+cc* του πολυμορφισμού *Arg48Gly*.



Εικόνα 6.1.6. Forest plot των  $gg+cg$  vs  $cc$  του πολυμορφισμού  $Arg48Gly$ .

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού **Asn453Ser**:

Για τη σύγκριση  $galle$  vs  $aallele$ :

```
gen odsq= log(( gallele1* nogallele0)/( gallele0* nogallele1))
replace odsq=log((0.5+ gallele1)*(0.5+ nogallele0))/((0.5+ gallele0)*(0.5+ nogallele1)) if
gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0| nogallele0==0
gen stdodsg= sqrt(1/ gallele1+1/ nogallele1+1/ gallele0+1/ nogallele0)
replace stdodsg=sqrt(1/(0.5+ gallele1)+1/(0.5+ nogallele1)+1/(0.5+ gallele0)+1/(0.5+
nogallele0)) if gallele1==0| nogallele1==0| gallele0==0| nogallele0==0
metan odsq stdodsg, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar= year)
xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)	1.046	0.021	52.902	0.12
Sub-total				
D+L pooled ES	1.046	0.021	52.902	0.12
-----				
racialdescent==1				
Joke Beuten (2008)	0.970	0.773	1.218	37.25
Sub-total				
D+L pooled ES	0.970	0.773	1.218	37.25
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	1.240	0.827	1.860	11.67
BL Chang. (2003)	1.316	0.903	1.918	13.51
Sonja I.Berndt (2007)	1.230	0.981	1.542	37.44
Sub-total				
D+L pooled ES	1.250	1.049	1.489	62.63
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.137	0.990	1.306	100.00
-----				

Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	0.09	2	0.955	0.0%	0.0000
Overall	3.09	4	0.544	0.0%	0.0000

Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR παίρνει την τιμή 1.137 με διάστημα εμπιστοσύνης (0,990 1,306). Το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει οριακά την τιμή 1 συνεπώς μπορούμε να ισχυριστούμε ότι υπάρχει ασθενής συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια (εικόνα 6.1.7). Ακόμη, το συνολικό p-value είναι μεγαλύτερο από 0,1 και δηλώνει ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας. Επίσης οι δείκτες  $I^2$  και  $\tau^2$  που αντιπροσωπεύουν την ύπαρξη ή όχι ετερογένειας υποδεικνύουν και αυτοί ότι δεν υπάρχει ετερογένεια.

#### Για τη σύγκριση gg vs aa+ag:

```
gen odsgg= log(( gg1* nogg0)/( gg0* nogg1))
replace odsgg= log((0.5+ gg1)*(0.5+ nogg0)/((0.5+ gg0)*(0.5+ nogg1)) if gg1==0|
noggl==0| gg0==0| nogg0==0
gen stdodsgg= sqrt(1/ gg1+1/ noggl+1/ gg0+1/ nogg0)
replace stdodsgg= sqrt(1/(0.5+ gg1)+1/(0.5+ noggl)+1/(0.5+ gg0)+1/(0.5+ nogg0)) if
gg1==0| noggl==0| gg0==0| nogg0==0
metan odsgg stdodsgg, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar= year)
xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)	1.082	0.021	54.870	1.14
Sub-total				
D+L pooled ES	1.082	0.021	54.870	1.14
-----				
racialdescent==1				
Joke Beuten (2008)	0.895	0.478	1.676	44.63
Sub-total				
D+L pooled ES	0.895	0.478	1.676	44.63
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	2.087	0.460	9.462	7.70
BL Chang. (2003)	1.053	0.347	3.193	14.29
Sonja I.Berndt (2007)	1.357	0.649	2.839	32.25
Sub-total				
D+L pooled ES	1.349	0.764	2.384	54.23
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.121	0.737	1.704	100.00
-----				

#### Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==2	0.51	2	0.774	0.0%	0.0000
Overall	1.41	4	0.842	0.0%	0.0000

Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR παίρνει την τιμή 1.121 με διάστημα εμπιστοσύνης (0,737 1,704). Το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 συνεπώς μπορούμε να ισχυριστούμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια (εικόνα 6.1.8). Ακόμη, το συνολικό p-value το  $I^2$  και το  $\tau^2$  δηλώνουν ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας.



### Για τη σύγκριση gg+ag vs aa:

```

gen odsnoaa= log(( noaa1* aa0)/( noaa0* aal))
replace odsnoaa= log((0.5+ noaa1)*(0.5+ aa0))/((0.5+ noaa0)*(0.5+ aal)) if aal==0|
noaa1==0| aa0==0| noaa0==0
gen stdodsnoaa= sqrt(1/ aal+1/ noaa1+1/ aa0+1/ noaa0)
replace stdodsnoaa= sqrt(1/(0.5+ aal)+1/(0.5+ noaa1)+1/(0.5+ aa0)+1/(0.5+ noaa0)) if
aal==0| noaa1==0| aa0==0| noaa0==0
metan odsnoaa stdodsnoaa, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar=
year) xlab(0.1,1,3)

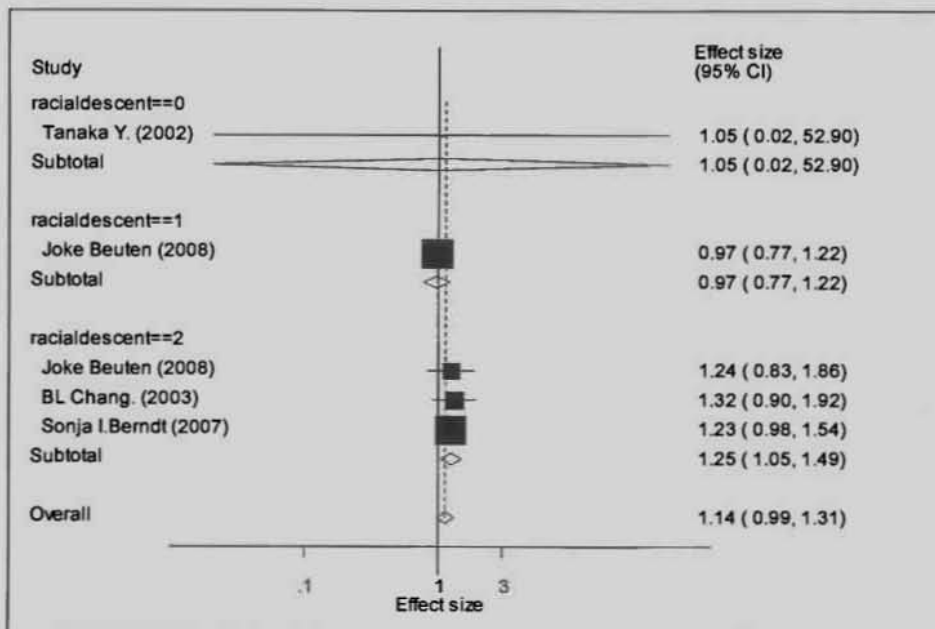
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
-----				
racialdescent==0				
Tanaka Y. (2002)	1.082	0.021	54.870	0.12
Sub-total				
D+L pooled ES	1.082	0.021	54.870	0.12
-----				
racialdescent==1				
Julie M. Cunningham	0.929	0.712	1.211	26.70
Joke Beuten (2008)	0.979	0.749	1.279	26.22
Sub-total				
D+L pooled ES	0.953	0.789	1.151	52.92
-----				
racialdescent==2				
Joke Beuten (2008)	1.226	0.776	1.936	9.00
BL Chang. (2003)	1.431	0.926	2.211	9.93
Sonja I.Berndt (2007)	1.262	0.974	1.635	28.02
Sub-total				
D+L pooled ES	1.289	1.055	1.574	46.96
-----				
Overall				
D+L pooled ES	1.098	0.958	1.260	100.00
-----				

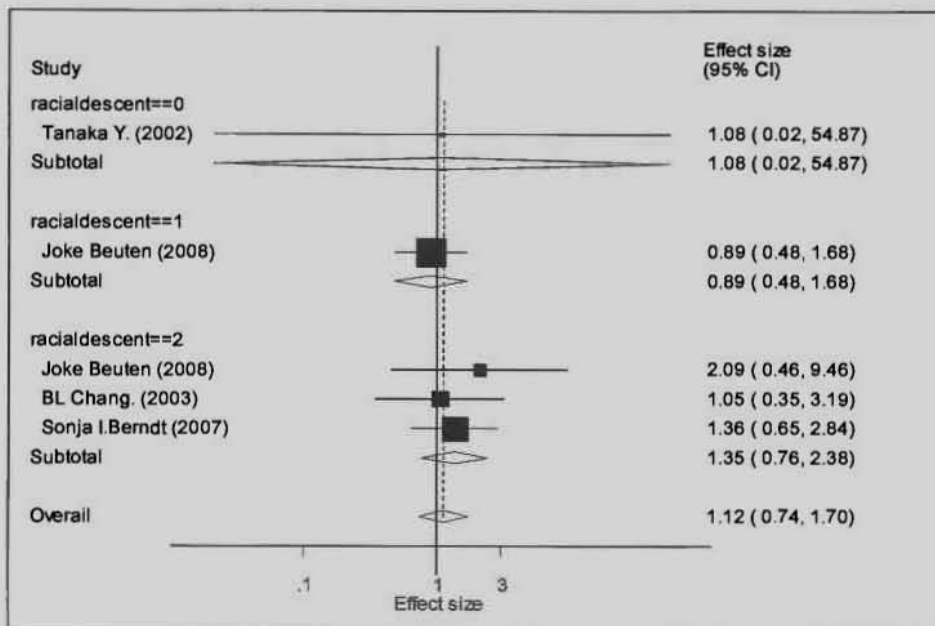
#### Test(s) of heterogeneity:

	Heterogeneity statistic	degrees of freedom	P	I-squared**	Tau-squared
racialdescent==0	0.00	0	.	.%	0.0000
racialdescent==1	0.07	1	0.784	0.0%	0.0000
racialdescent==2	0.29	2	0.864	0.0%	0.0000
Overall	4.99	5	0.417	0.0%	0.0000

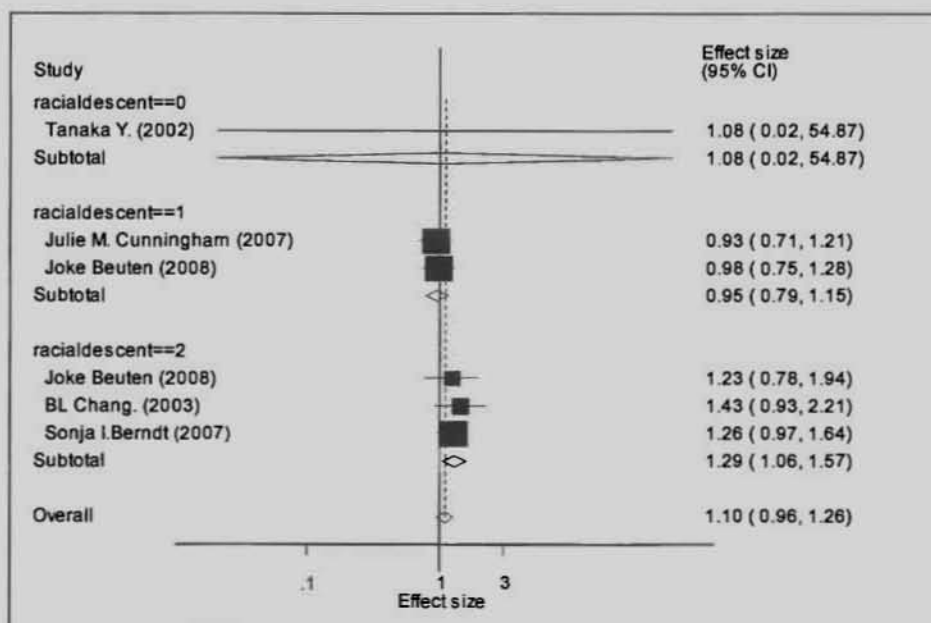
Παραπάνω βλέπουμε ότι το συνολικό OR παίρνει την τιμή 1.098 με διάστημα εμπιστοσύνης (0,958 1,260). Το διάστημα εμπιστοσύνης εμπεριέχει την τιμή 1 συνεπώς μπορούμε να ισχυριστούμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια (εικόνα 6.1.9). Ακόμη, το συνολικό p-value, το  $I^2$  και το  $\tau^2$  δηλώνουν ότι δεν υπάρχει ετερογένεια στη μελέτη μας.



Εικόνα 6.1.7. Forest plot των αλληλομόρφων (*gallele vs aallele*) του πολυμορφισμού *Asn453Ser*.



Εικόνα 6.1.8. Forest plot των *gg vs ag+aa* του πολυμορφισμού *Asn453Ser*.



Εικόνα 6.1.9. Forest plot των  $ag+gg$  vs  $aa$  του πολυμορφισμού  $Asn453Ser$ .

Παρακάτω φαίνονται οι εντολές και τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης του πολυμορφισμού **Ala119Ser**:

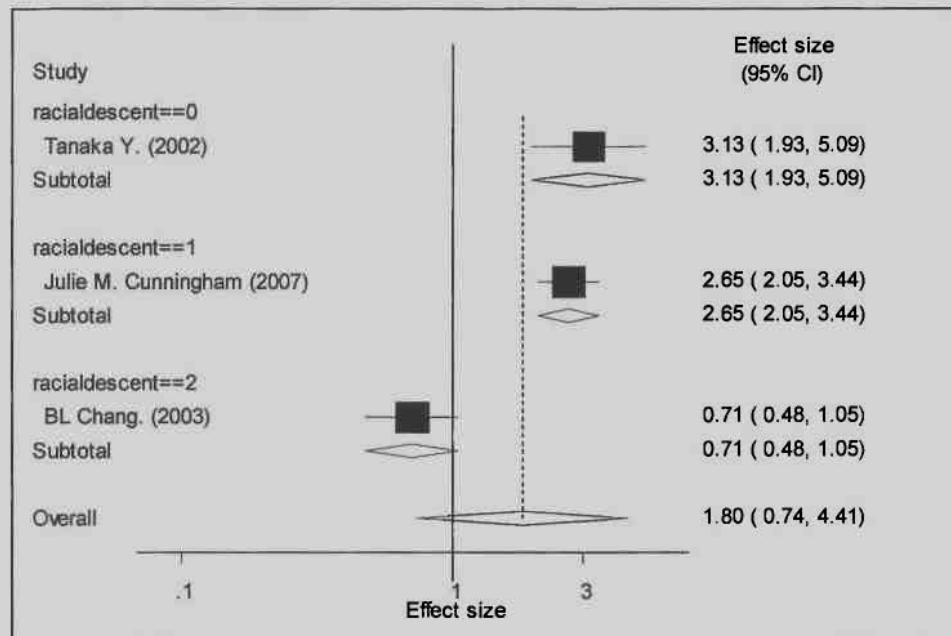
Για τη σύγκριση  $gt+tt$  vs  $gg$ :

```
gen odsnogg= log(( nogg1* gg0)/( nogg0* gg1))
replace odsgg= log((0.5+ nogg1)*(0.5+ gg0))/((0.5+ nogg0)*(0.5+ gg1)) if gg1==0|
nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
gen stdodsgg= sqrt(1/ gg1+1/ nogg1+1/ gg0+1/ nogg0)
replace stdodsgg= sqrt(1/(0.5+ gg1)+1/(0.5+ nogg1)+1/(0.5+ gg0)+1/(0.5+ nogg0)) if
gg1==0| nogg1==0| gg0==0| nogg0==0
metan odsnogg stdodsgg, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar=
year) xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
-----			
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	3.135	1.930 5.091	32.18
Sub-total			
D+L pooled ES	3.135	1.930 5.091	32.18
-----			
racialdescent==1			
Julie M. Cunningham	2.654	2.049 3.438	34.52
Sub-total			
D+L pooled ES	2.654	2.049 3.438	34.52
-----			
racialdescent==2			
BL Chang. (2003)	0.709	0.480 1.047	33.30
Sub-total			
D+L pooled ES	0.709	0.480 1.047	33.30
-----			
Overall			
D+L pooled ES	1.804	0.739 4.406	100.00
-----			

Παραπάνω βλέπουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια επειδή το διάστημα εμπιστοσύνης (0,739 4,406) εμπεριέχει την τιμή 1. Η εξέταση της ετερογένειας καθώς και οι δοκιμές για σφάλμα δημοσίευσης δεν μπορούν να μας δώσουν σαφή εικόνα, διότι εξετάζουμε μόνο τρεις μελέτες. Τα

υπόλοιπα contrast (tt vs gt+gg και tallele vs gallele) δεν θα τα αναφέρουμε διότι εξετάζουν μόνο 2 μελέτες (όπως αναφέραμε και παραπάνω στη μελέτη του *Julie M. Cunningham* βρήκαμε χειρόγραφα το OR μόνο σε ένα contrast). Το αντίστοιχο γράφημα (forest plot) των αποτελεσμάτων του πολυμορφισμού *Ala119Ser* φαίνεται παρακάτω (εικόνα 6.1.10).



Εικόνα 6.1.10. Forest plot των *gt+tt vs gg* του πολυμορφισμού *Ala119Ser*.

Τέλος, θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα του πολυμορφισμού **intron 1 (silent)**. Ομοίως με το πολυμορφισμό *Ala119Ser* που εξετάσαμε προηγουμένως, ο πολυμορφισμός *intron 1 silent* απασχολούσε μικρό αριθμό μελετών (τέσσερις), γ'αυτό θα αναφέρουμε ενδεικτικά ένα output από το stata μαζί με το αντίστοιχο γράφημα (εικόνα 6.1.11).

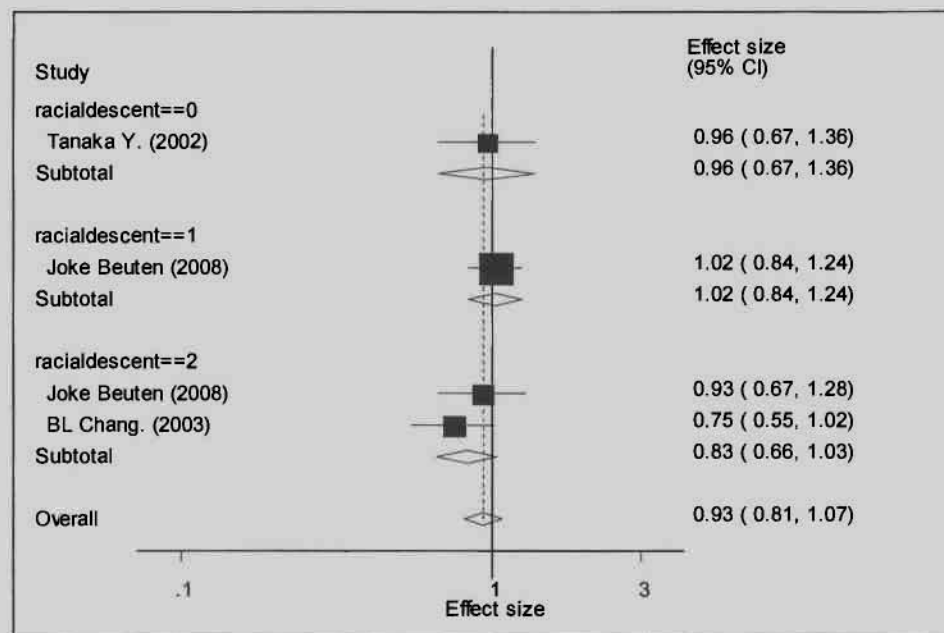
Για τη σύγκριση tallele vs callele:

```
gen odst= log(( tallele1* notallele0)/( tallele0* notallele1))
replace odst=log((0.5+ tallele1)*(0.5+ notallele0)/((0.5+ tallele0)*
(0.5+ notallele1)) if tallele1==0| notallele1==0| tallele0==0| notallele0==0
gen stdodst= sqrt(1/ tallele1+1/ notallele1+1/ tallele0+1/ notallele0)
replace stdodst=sqrt(1/(0.5+ tallele1)+1/(0.5+ notallele1)+1/(0.5+ tallele0)+1/(0.5+
notallele0)) if tallele1==0| notallele1==0|
tallele0==0| notallele0==0
metan odst stdodst, eform random by( racialdescent)label(namevar= author, yearvar= year)
xlab(0.1,1,3)
```

Study	ES	[95% Conf. Interval]	% Weight
racialdescent==0			
Tanaka Y. (2002)	0.956	0.671 1.362	14.81
Sub-total			
D+L pooled ES	0.956	0.671 1.362	14.81
racialdescent==1			
Joke Beuten (2008)	0.926	0.672 1.277	18.06
Sub-total			
D+L pooled ES	0.926	0.672 1.277	18.06

racialdescent==2				
BL Chang. (2003)	0.747	0.549	1.016	19.62
Joke Beuten (2008)	1.020	0.837	1.242	47.52
Sub-total				
D+L pooled ES	0.893	0.661	1.207	67.14
Overall				
D+L pooled ES	0.934	0.815	1.070	100.00

Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Όσον αφορά την εξέταση της ετερογένειας δεν τη συμπεριλάβαμε διότι ο πολυμορφισμός εξέταζε μικρό αριθμό μελετών.



Εικόνα 6.1.11. Forest plot των *tallele* vs *callele* του πολυμορφισμού *intron1* (C→T).

## 6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΣΦΑΛΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ

Τα αποτελέσματα της εξέτασης για σφάλμα δημοσίευσης του πολυμορφισμού **Leu432Val** φαίνονται παρακάτω:

- *gallele* vs *callele*

- metabias odsg stdodsg, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

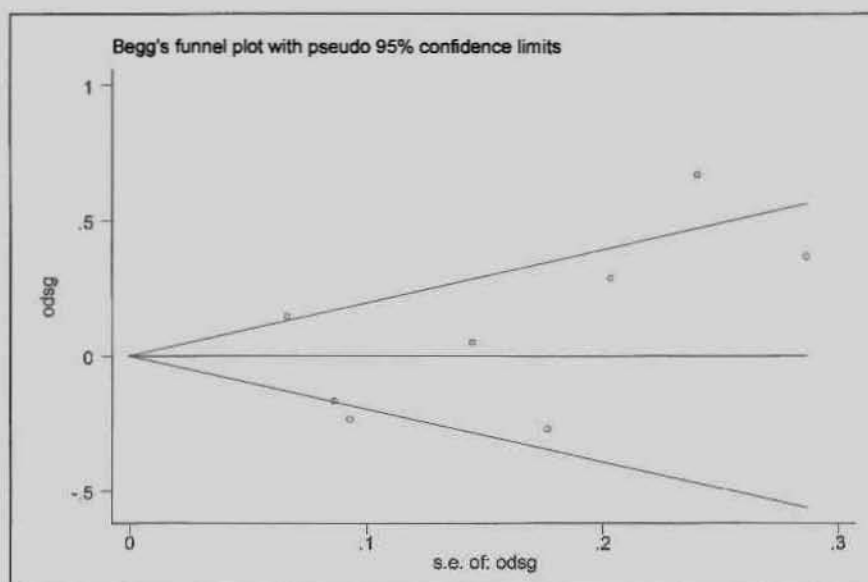
adj. Kendall's Score (P-Q) = 8  
 Std. Dev. of Score = 8.08  
 Number of Studies = 8  
 z = 0.99

Pr > |z| = 0.322  
 z = 0.87 (continuity corrected)  
 Pr > |z| = 0.386 (continuity corrected)

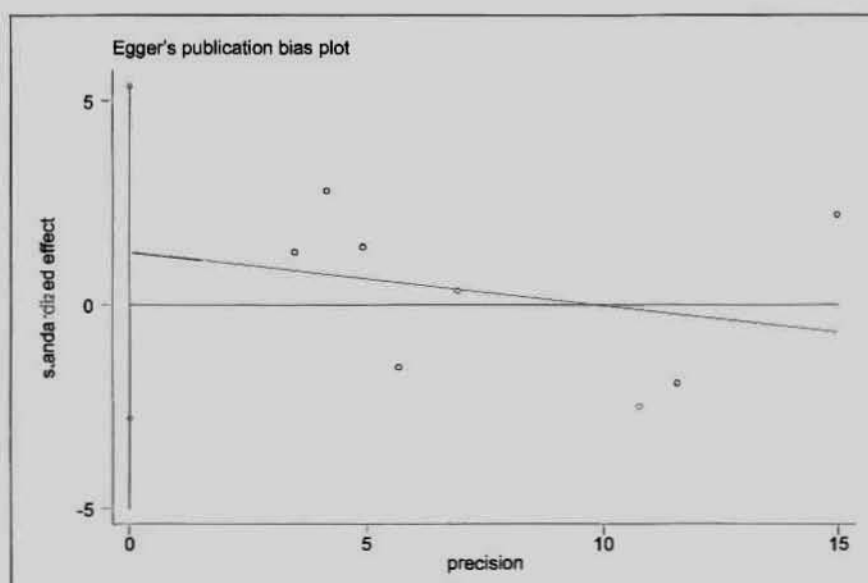
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.1310341	.1908779	-0.69	0.518	-.5980955	.3360272
bias	1.278771	1.663136	0.77	0.471	-2.790776	5.348318

Βλέπουμε ότι τα  $p$  είναι μεγαλύτερα από 0,05 συνεπώς δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης. Παρακάτω παρατηρούμε τα αντίστοιχα γραφήματα του Begg (εικόνα 6.2.1) και Egger (εικόνα 6.2.2).



Εικόνα 6.2.1. Γράφημα του Begg. Ο κάθετος άξονας απεικονίζει το  $\log OR$  και ο οριζόντιος το  $SE$  του  $\log OR$ .



Εικόνα 6.2.2. Γράφημα του Egger. Ομοίως.

- gg vs cg+cc

- metabias odsgg stdodsgg, gr(b)

## Tests for Publication Bias

## Begg's Test

```

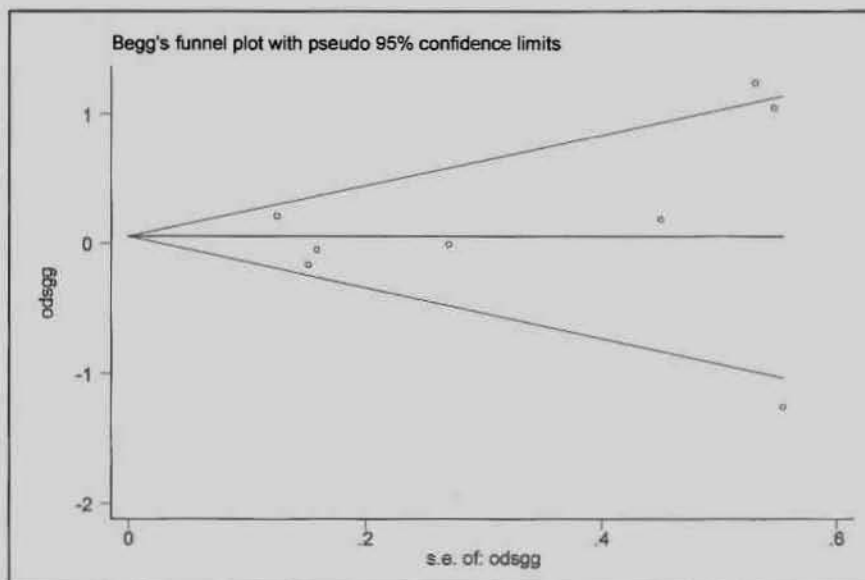
adj. Kendall's Score (P-Q) =      4
  Std. Dev. of Score =      8.08
  Number of Studies =         8
      z =      0.49
  Pr > |z| =      0.621
      z =      0.37 (continuity corrected)
  Pr > |z| =      0.711 (continuity corrected)

```

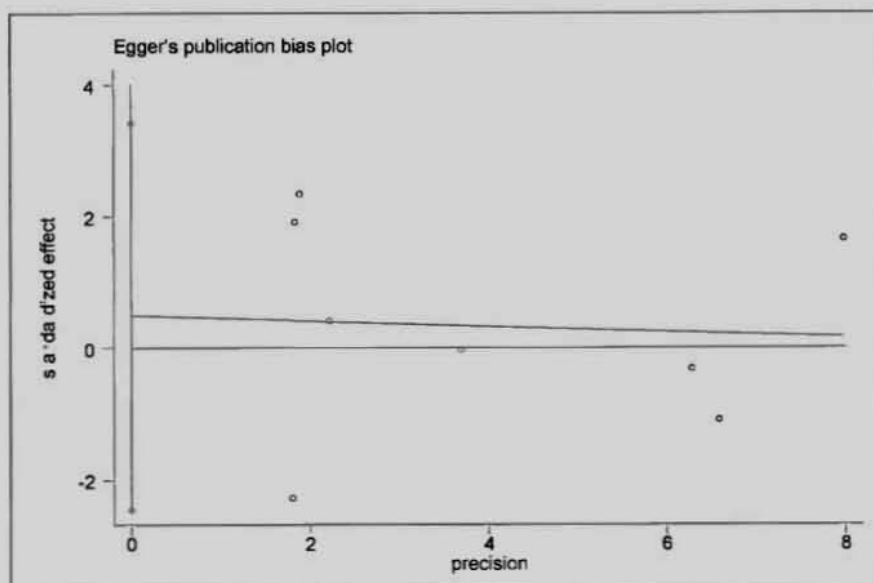
## Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.0406561	.2551805	-0.16	0.879	-.6650603	.5837481
bias	.4873366	1.194035	0.41	0.697	-2.434363	3.409036

Ομοίως βλέπουμε ότι τα  $p$  είναι μεγαλύτερα από 0,05 συνεπώς δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης. Παρακάτω βλέπουμε τα αντίστοιχα γραφήματα του Begg (εικόνα 6.2.3) και Egger (εικόνα 6.2.4).



Εικόνα 6.2.3. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.4. Γράφημα του Egger.

- cg+gg vs cc

- metabias odsnooc stdodsnocc, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

```

adj. Kendall's Score (P-Q) =      10
Std. Dev. of Score =          9.59
Number of Studies =           9
z =                            1.04
Pr > |z| =                      0.297
z =                            0.94 (continuity corrected)
Pr > |z| =                      0.348 (continuity corrected)

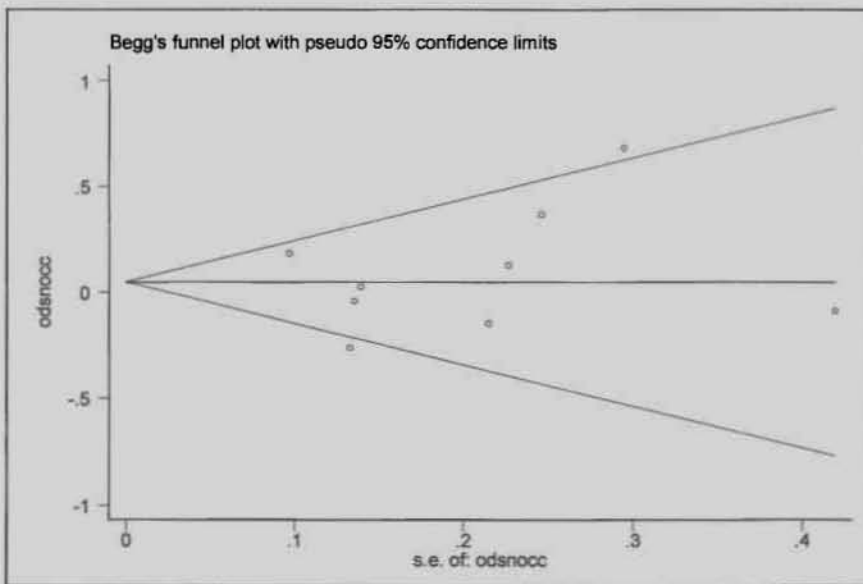
```

Egger's test

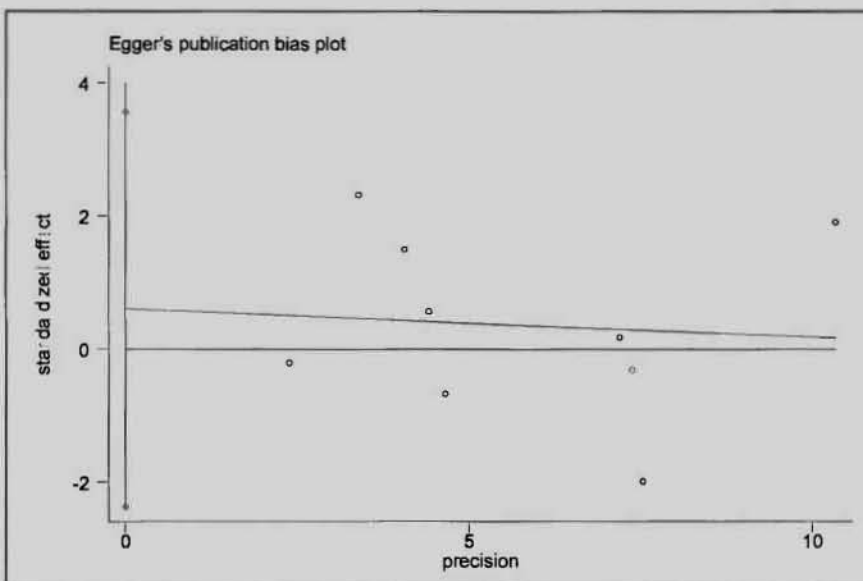
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	-.0428536	.2025036	-0.21	0.838	-.5216985 .4359912
bias	.6019075	1.253376	0.48	0.646	-2.361855 3.56567

Ομοίως.





Εικόνα 6.2.5. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.6. Γράφημα του Egger.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για σφάλμα δημοσίευσης του πολυμορφισμού **Asn453Ser**:

- gallele vs aallele

- metabias odsg stdodsg, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

```

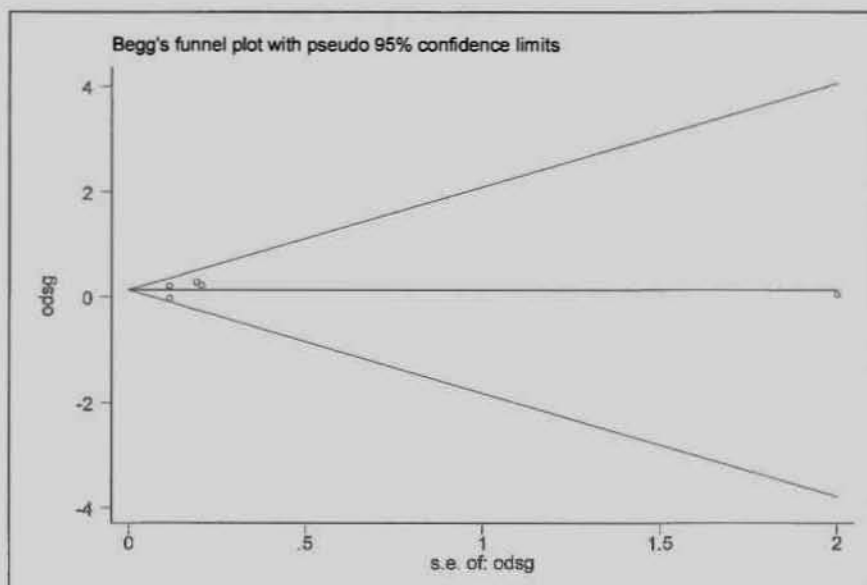
adj. Kendall's Score (P-Q) =    -4
  Std. Dev. of Score =    4.08
  Number of Studies =     5
          z =    -0.98
  Pr > |z| =    0.327
  
```

z = 0.73 (continuity corrected)  
 Pr > |z| = 0.462 (continuity corrected)

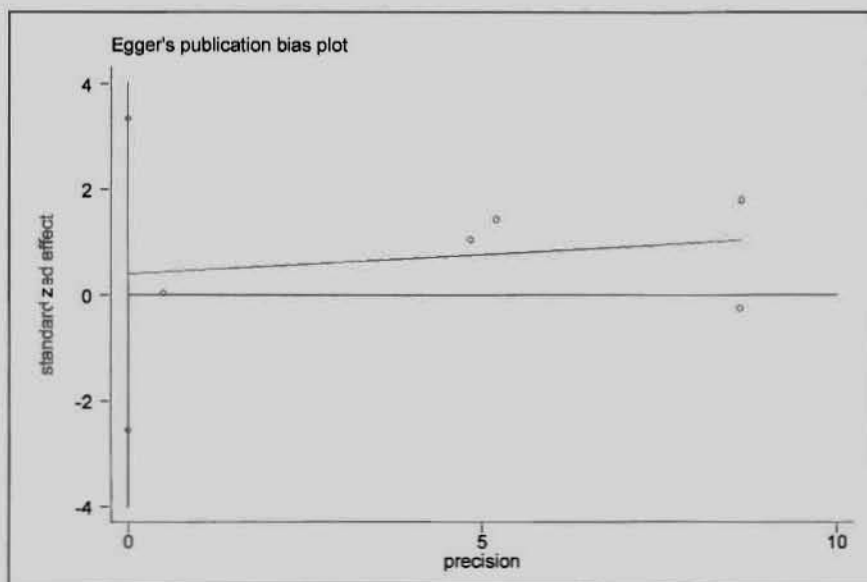
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	.0738804	.1463923	0.50	0.649	-.3920052 .539766
bias	.393258	.9259877	0.42	0.700	-2.553648 3.340164

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 6.2.7. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.8. Γράφημα του Egger.

- gg vs ga+aa

- metabias odsgg stdodsgg, gr(b)

## Tests for Publication Bias

## Begg's Test

```

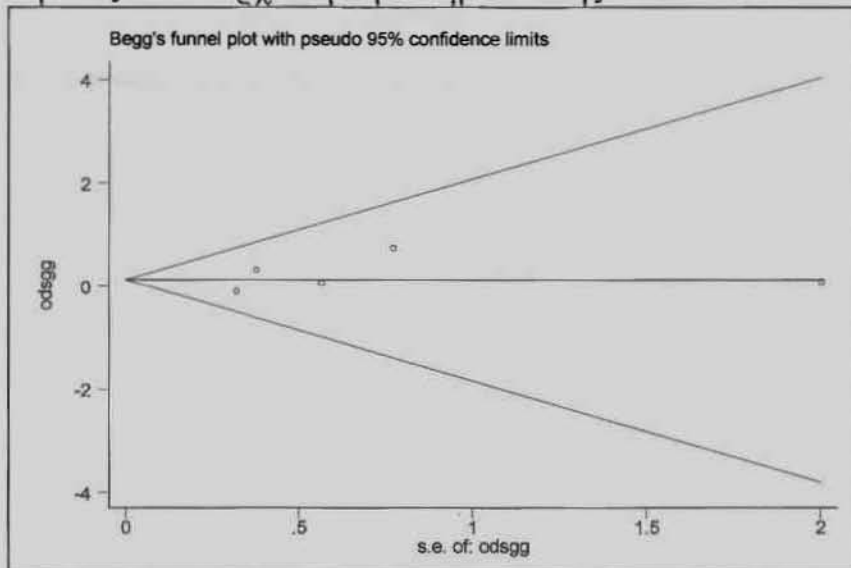
adj. Kendall's Score (P-Q) =      4
  Std. Dev. of Score =      4.08
  Number of Studies =         5
          z =         0.98
  Pr > |z| =         0.327
          z =         0.73 (continuity corrected)
  Pr > |z| =         0.462 (continuity corrected)

```

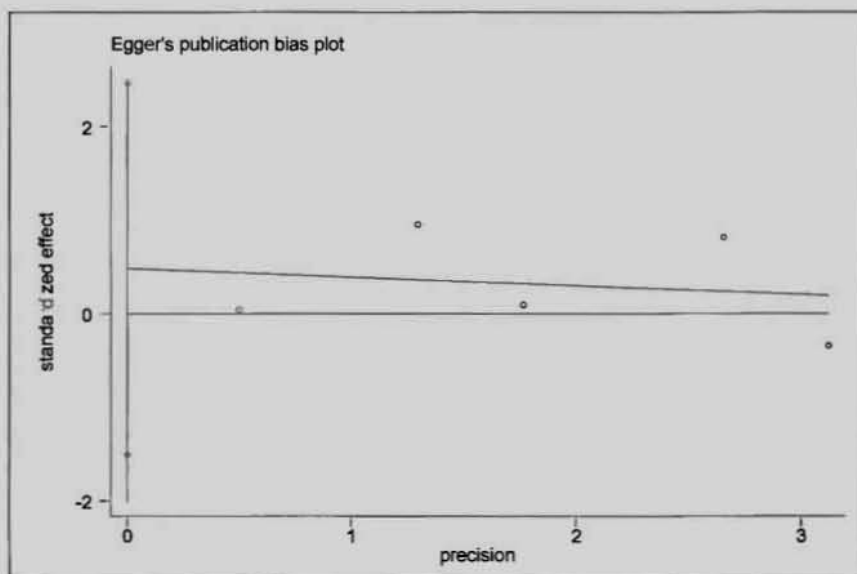
## Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	-.0920681	.298922	-0.31	0.778	-1.043371	.859235
bias	.481692	.6249026	0.77	0.497	-1.507027	2.470411

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 6.2.9. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.10. Γράφημα του Egger.

- ga+gg vs aa
- metabias odsnoaa stdodsnoaa, gr(b)

#### Tests for Publication Bias

##### Begg's Test

```

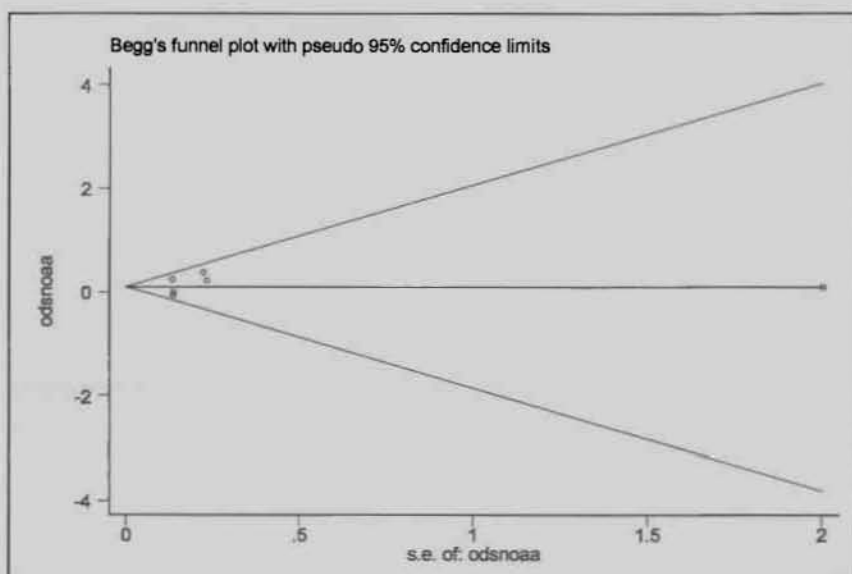
adj. Kendall's Score (P-Q) =      1
  Std. Dev. of Score =      5.32
  Number of Studies =         6
      z =          0.19
  Pr > |z| =       0.851
      z =          0.00 (continuity corrected)
  Pr > |z| =       1.000 (continuity corrected)

```

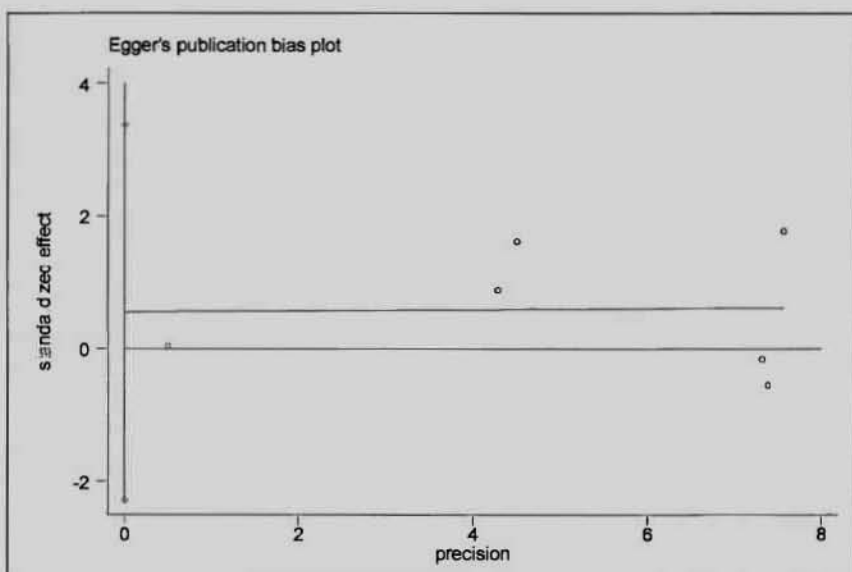
##### Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.008272	.1743513	0.05	0.964	-.4758049	.4923489
bias	.5535186	1.017245	0.54	0.615	-2.270808	3.377845

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 6.2.11. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.12. Γράφημα του Egger.

Τέλος, θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα για το σφάλμα δημοσίευσης για τον πολυμορφισμό **Arg48Gly**. Στους υπόλοιπους πολυμορφισμούς (intron 1(silent), Ala119Ser) δεν θα αναφερθούμε διότι ο αριθμός μελετών που εξετάζουν δεν μπορεί να μας δώσει μια σαφή εικόνα για το σφάλμα δημοσίευσης.

- gallele vs callele

- metabias odsg stdodsg, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

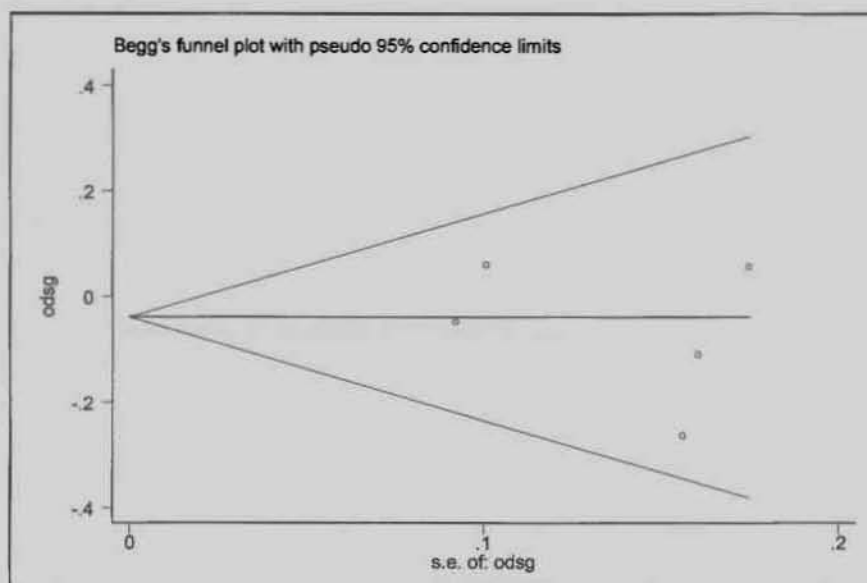
adj. Kendall's Score (P-Q) = 0  
Std. Dev. of Score = 4.08

Number of Studies = 5  
 z = 0.00  
 Pr > |z| = 1.000  
 z = -0.24 (continuity corrected)  
 Pr > |z| = 1.000 (continuity corrected)

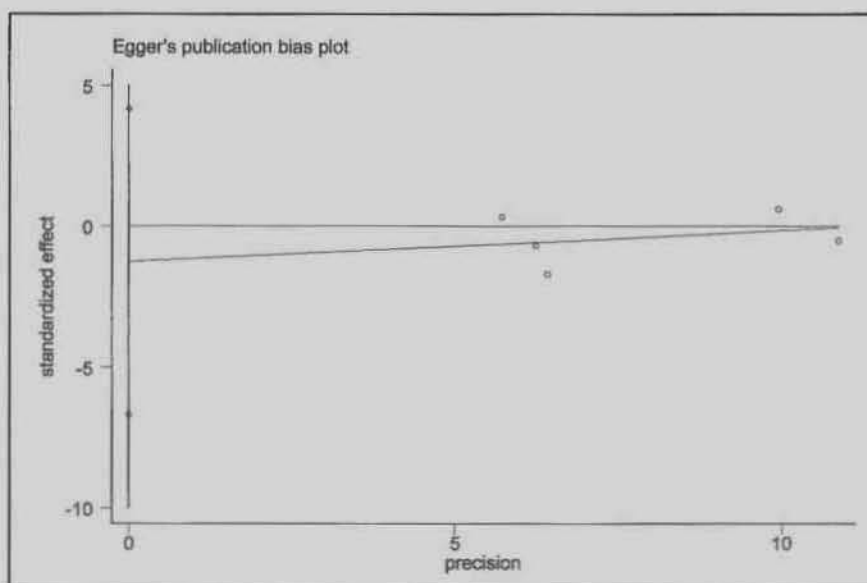
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
slope	.1092442	.210098	0.52	0.639	-.5593814 .7778698
bias	-1.248053	1.70659	-0.73	0.518	-6.679183 4.183078

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 6.2.13. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.14. Γράφημα του Egger.

- gg vs gc+cc

- metabias odsgg stdodsgg, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

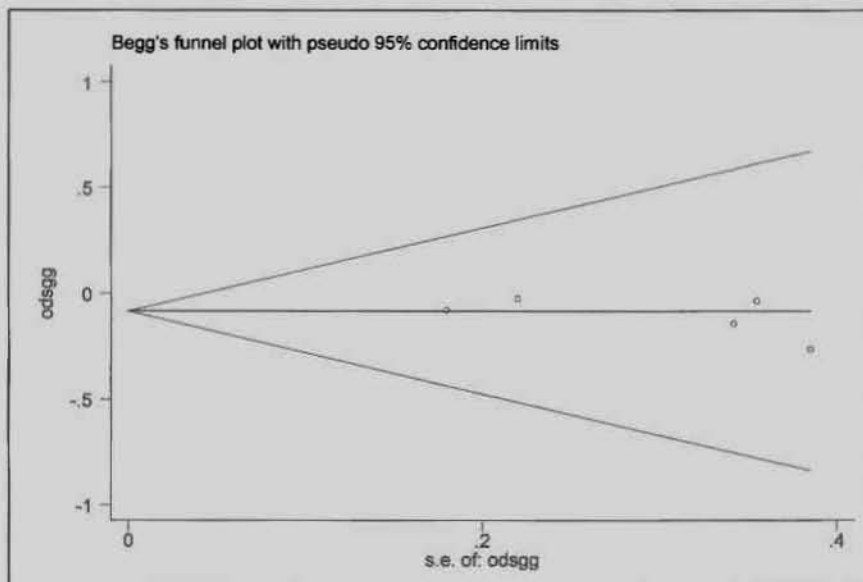
```

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

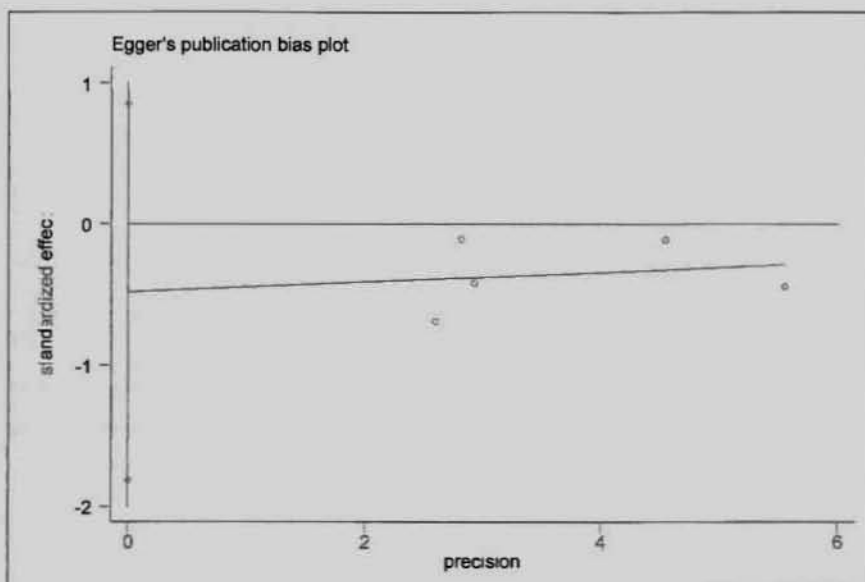
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.0348737	.1084126	0.32	0.769	-.3101437	.379891
bias	-.4812004	.4191316	-1.15	0.334	-1.815064	.8526633

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα.



Εικόνα 6.2.15. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.16. Γράφημα του Egger.

- gg+gc vs cc

- metabias odsnooc stdodsnocc, gr(b)

Tests for Publication Bias

Begg's Test

```

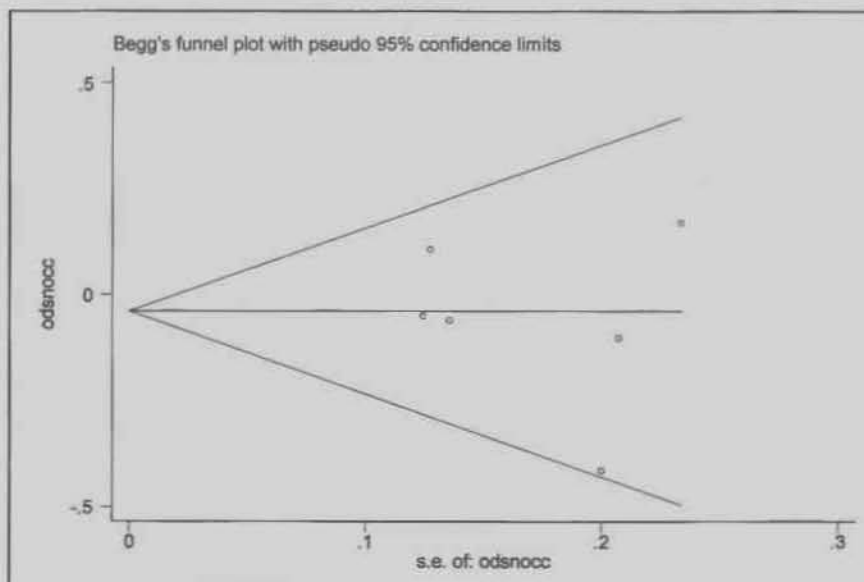
adj. Kendall's Score (P-Q) =    -3
  Std. Dev. of Score =    5.32
  Number of Studies =     6
      z =    -0.56
  Pr > |z| =    0.573
      z =    0.38 (continuity corrected)
  Pr > |z| =    0.707 (continuity corrected)
  
```

Egger's test

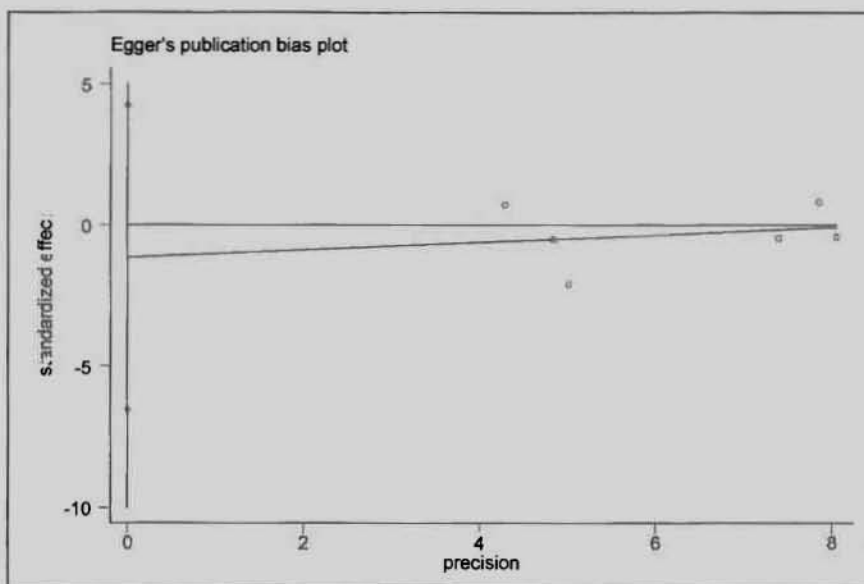
Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.1332688	.3025804	0.44	0.682	-.706829	.9733666
bias	-1.145103	1.943707	-0.59	0.587	-6.541698	4.251493

Ομοίως δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης.





Εικόνα 6.2.17. Γράφημα του Begg.



Εικόνα 6.2.18. Γράφημα του Egger.

### 6.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΓΙΑ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΗWE

Παρακάτω φαίνονται οι πίνακες των αποτελεσμάτων για την ύπαρξη ή όχι ισορροπίας ΗWE για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά. Υπενθυμίζουμε ότι για να υπάρχει ισορροπία πρέπει το Estimated disequilibrium coefficient να είναι μικρό και το  $p > 0,05$ .

Κατά την εξέταση της ισορροπίας ΗWE στον πολυμορφισμό **Leu432Val** εμφάνισε απόκλιση μόνο μια μελέτη (27). Παρακάτω φαίνεται το συγκεκριμένο output:

genhwi 141 46 13

Genotype	Observed	Expected
cc	141	134.48
cg	46	59.04
gg	13	6.48
total	200	200.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
c	328	0.8200	0.0212
g	72	0.1800	0.0212
total	400	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0326

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 9.756 Pr= 0.0018  
 likelihood-ratio chi2 (1) = 8.492 Pr= 0.0036  
 Exact significance prob = 0.0032

Παρατηρούμε ότι το  $p$  είναι μικρότερο από 0.05, συνεπώς υπάρχει ανισορροπία στη παρούσα μελέτη. Όλες οι υπόλοιπες μελέτες (26, 28-34) είναι σε ισορροπία παρακάτω φαίνεται ένα παράδειγμα:

genhwi 53 98 31

Genotype	Observed	Expected
cc	53	57.16
cg	98	89.67
gg	31	35.16
total	182	182.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
c	204	0.5604	0.0248
g	160	0.4396	0.0248
total	364	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0229

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 1.570 Pr= 0.2101  
 likelihood-ratio chi2 (1) = 1.576 Pr= 0.2093  
 Exact significance prob = 0.2325

Παρατηρούμε ότι το Estimated disequilibrium coefficient (D) είναι πολύ μικρό και το  $p=0.2325>0.05$ .

Οι μελέτες του πολυμορφισμού **Asn453Ser** (26, 27, 28, 32, 33) ήταν όλες σε ισορροπία HWE.

Ο πολυμορφισμός **Arg48Gly** περιείχε 3 μελέτες (27, 28, 33) οι οποίες αποκλίνανε από την ισορροπία HWE. Ένα παράδειγμα φαίνεται παρακάτω:

genhwi 275 175 46

Genotype	Observed	Expected
cc	275	264.93
cg	175	195.14
gg	46	35.93
total	496	496.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
c	725	0.7308	0.0148
g	267	0.2692	0.0148
total	992	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0203

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 5.281 Pr= 0.0216  
 likelihood-ratio chi2 (1) = 5.120 Pr= 0.0236  
 Exact significance prob = 0.0226

Παρατηρούμε ότι το  $p=0.0226<0.05$ . Οι υπόλοιπες 2 μελέτες (32) τηρούν την ισορροπία. Για τη μελέτη του Julie M. Cunningham (26) δεν μπορούμε να αποφανθούμε, διότι δεν είχαμε τον αριθμό των μαρτύρων κάθε γονότυπου. Παρακάτω φαίνεται ένα παράδειγμα ισορροπίας HWE της μελέτης του BL Chang (32) του πολυμορφισμού **Arg48Gly**:

genhwi 86 82 16

Genotype	Observed	Expected
cc	86	87.66
cg	82	78.68
gg	16	17.66
total	184	184.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
c	254	0.6902	0.0236
g	114	0.3098	0.0236

```
-----+-----
total |      368      1.0000
```

Estimated disequilibrium coefficient (D) = -0.0090

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

```
      Pearson chi2 (1) =    0.327  Pr= 0.5676
likelihood-ratio chi2 (1) =    0.330  Pr= 0.5656
Exact significance prob =                      0.7299
```

Ο πολυμορφισμός **Ala119Ser** περιείχε μια μελέτη (27) που βρισκόταν σε ανισορροπία. Παρακάτω φαίνεται το συγκεκριμένο output:

```
genhwi 151 38 11
```

```
      Genotype |      Observed      Expected
-----+-----
      gg |          151          144.50
      gt |           38           51.00
      tt |           11            4.50
-----+-----
total |          200          200.00
```

```
      Allele | Observed      Frequency      Std. Err.
-----+-----
      g |          340          0.8500          0.0200
      t |           60          0.1500          0.0200
-----+-----
total |          400          1.0000
```

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0325

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

```
      Pearson chi2 (1) =   12.995  Pr= 0.0003
likelihood-ratio chi2 (1) =   10.590  Pr= 0.0011
Exact significance prob =                      0.0010
```

Τέλος, στο πολυμορφισμό **intron 1 (c→t) silent** μια μελέτη (28) ήταν σε ανισορροπία HWE. Τα αποτελέσματα αυτής δίδονται στο παρακάτω output:

```
genhwi 270 176 46
```

```
      Genotype |      Observed      Expected
-----+-----
      cc |          270          260.50
      ct |          176          195.01
      tt |           46           36.50
-----+-----
total |          492          492.00
```

```
      Allele | Observed      Frequency      Std. Err.
-----+-----
      c |          716          0.7276          0.0149
      t |          268          0.2724          0.0149
-----+-----
total |          984          1.0000
```

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0193

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 4.675 Pr= 0.0306  
 likelihood-ratio chi2 (1) = 4.543 Pr= 0.0331  
 Exact significance prob = 0.0310

Οι υπόλοιπες μελέτες (27, 32) τηρούσαν την ισορροπία HWE. Ακολούθως αναφέρουμε ενδεικτικά ένα παράδειγμα:

genhwi 123 95 21

Genotype	Observed	Expected
cc	123	121.63
ct	95	97.73
tt	21	19.63
total	239	239.00

Allele	Observed	Frequency	Std. Err.
c	341	0.7134	0.0210
t	137	0.2866	0.0210
total	478	1.0000	

Estimated disequilibrium coefficient (D) = 0.0057

Hardy-Weinberg Equilibrium Test:

Pearson chi2 (1) = 0.187 Pr= 0.6654  
 likelihood-ratio chi2 (1) = 0.186 Pr= 0.6666  
 Exact significance prob = 0.6380

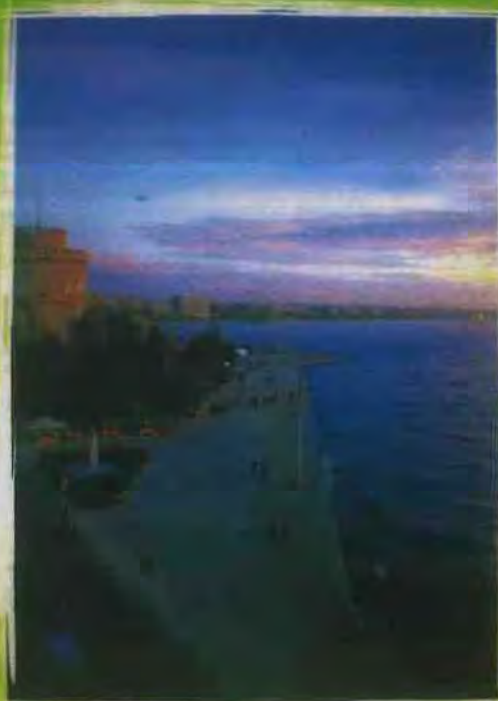
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Π

**Ανακοίνωση της εργασίας στο συνέδριο της ΕΕΒΕ.**

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**30<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο**  
**30<sup>th</sup> Scientific Conference**

**ΠΡΑΚΤΙΚΑ - PROCEEDINGS**



**Θεσσαλονίκη 22-24 Μαΐου 2008**  
**Thessaloniki, May 22-24, 2008**

ΥΠΟ ΤΗΝ ΑΙΓΙΔΑ ΤΩΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΩΝ ΑΘΗΝΩΝ ΚΑΙ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

## ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΟΥ CYP1B1 ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ, ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

**Τριβήλου, Ε., Κάργας, Β., Ιωαννίδης, Α. και Μπάγκος, Π.Γ.**

*Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοιατρική, Πανεπιστήμιο Στερεάς Ελλάδας, Παπασιοπούλου 2-4, Λαμία 35100 E-Mail: [pbagos@ucg.gr](mailto:pbagos@ucg.gr)*

Το γονίδιο CYP1B1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P450, που εμπλέκεται στην υδροξυλίωση των οιστρογόνων σε 2-OH-οιστρογόνα. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2p21-22 και αποτελείται από τρία εξόνια. Ορισμένοι πολυμορφισμοί του CYP1B1 έχουν κατά καιρούς συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου, μεταξύ των οποίων είναι ο καρκίνος του προστάτη, του ενδομητρίου και των ωοθηκών. Στην παρούσα μελέτη συγκεντρώσαμε και πραγματοποιήσαμε μετά-ανάλυση όλων των βιβλιογραφικών δεδομένων που συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς του CYP1B1 με τους παραπάνω καρκίνους. Στη μελέτη μας συμπεριλήφθηκαν 8 μελέτες για το καρκίνο του προστάτη με συνολικά 3237 ασθενείς και 2808 υγιή άτομα (μάρτυρες), 6 μελέτες για τον καρκίνο του ενδομητρίου με συνολικά 2734 ασθενείς και 4099 υγιή άτομα (μάρτυρες) και 4 μελέτες για τον καρκίνο των ωοθηκών με συνολικά 1165 ασθενείς και 1618 υγιή άτομα (μάρτυρες). Οι πολυμορφισμοί που μας απασχόλησαν ήταν: για το εσόνιο 1 ο 13 (C→T) (2 μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη) για το εξόνιο 2 ο 48(C→G) που οδηγεί σε αντικατάσταση Arg→Gly (4 μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη, 3 για το ενδομήτριο, και 2 για τις ωοθήκες αντίστοιχα) και ο 119(G→T) που οδηγεί στην αντικατάσταση Ala→Ser (4 μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη, 3 για το ενδομήτριο και 2 για τις ωοθήκες αντίστοιχα) και για το εξόνιο 3 ο 432(C→G) που οδηγεί στην αντικατάσταση Leu→Val (8 μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη, 6 για το ενδομήτριο, και 4 για τις ωοθήκες αντίστοιχα), ο 453(A→G) που οδηγεί στην αντικατάσταση Asn→Ser (4 μελέτες για τον καρκίνο του προστάτη και 2 για τον καρκίνο του ενδομητρίου) και ο 449(C→T) που δεν οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος (2 μελέτες για τον καρκίνο του ενδομητρίου). Ασθενείς συσχετίσεις βρέθηκαν για τον πολυμορφισμό Asn453Ser και Leu432Arg με τον καρκίνο του ενδομητρίου καθώς και για τον Arg48Gly και Asn453Ser με τον καρκίνο του προστάτη.



## **CORRELATION BETWEEN CYP1B1 POLYMORPHISMS AND THE RISK OF PROSTATE, ENDOMETRIAL AND OVARIAN CANCER**

**Trivilou, E., Kargas, V., Ioannidis, A. and Bagos, P.G.**

*Department of Informatics with Applications in Biomedicine,*

*University of Central Greece,*

*Papasiopoulou 2-4, Lamia, 35100 E-Mail: [pbagos@ucg.gr](mailto:pbagos@ucg.gr)*

CYP1B1 encodes for cytochrome P450, which is involved in hydroxylation of estrogens to 2-OH-estrogens. CYP1B1 is located in chromosome 2p21-22 and is composed of 3 exons. Various single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP1B1 gene have been implicated in susceptibility to various forms of cancer, such as prostate, endometrial and ovarian cancer. We conducted here, a meta-analysis to evaluate the association of CYP1B1 variants with the above-mentioned forms of cancer. We identified 8 eligible studies for prostate cancer, 6 for endometrial and 4 for ovarian, which included 3237 cases and 2808 healthy controls, 2734 cases and 4099 healthy controls and 1122 cases and 1607 healthy controls respectively. The polymorphisms of interest were: the 13(C→T) intron 1 polymorphism (2 studies for prostate cancer), the 48(C→G) polymorphism that results in substitution Arg→Gly (4 studies for prostate, 3 for endometrial and 2 for ovarian cancer), the 119(G→T) polymorphism that results in substitution Ala→Ser (4 studies for prostate, 3 for endometrial and 2 for ovarian cancer), the 432(C→G) polymorphism that results in substitution Leu→Val (8 studies for prostate, 6 for endometrial and 4 for ovarian cancer), the 453(A→G) polymorphism that results in substitution Asn→Ser (4 studies for prostate and 2 for endometrial cancer) and the 449(C→T) polymorphism that does not result in amino acid substitution (2 studies for prostate and 2 for endometrial cancer). Weak associations were found between the Asn453Ser and Leu432Val polymorphisms with endometrial cancer and between the Arg48Gly and Asn453Ser polymorphisms with prostate cancer.