



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

«ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

**Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ IRS-1 ΜΕ ΤΗ
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.**

ΑΝΘΗ ΚΟΚΚΙΝΟΥ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπων
ΠΑΝΤΕΛΗΣ ΜΠΑΓΚΟΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Λαμία, 2017

«Υπεύθυνη Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης»

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

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Ημερομηνία

Υπογραφή

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 <i>ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ</i>	12
1.2 <i>ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ</i>	13
1.3 <i>ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ, ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ</i>	14
1.3.1 <i>ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ</i>	14
1.3.2 <i>ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ</i>	16
1.3.3 <i>ΑΠΛΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (SNPs)-single nucleotide polymorphism</i>	17
1.4 <i>ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1 ΚΑΙ ΤΙ Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ G972</i>	18
1.4.1 <i>ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1 (Insulin Reseptor Substrate-1)</i>	18
1.4.2 <i>ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ G972(rs1801278) στο ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1</i>	19
1.5 <i>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</i>	20
1.5.1 <i>ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ (meta-analysis)</i>	20
1.5.2 <i>Η ΔΥΝΑΜΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ</i>	21
1.5.3 <i>ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ(cumulative meta-analysis)</i>	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1 <i>ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	23
2.2 <i>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA</i>	23
2.3 <i>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</i>	25
2.3.1 <i>ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (Fixed Effect Model)</i>	25

2.3.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (Random Effect Model).....	26
2.3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	28
2.4 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (Odds Ratio-OR)-Standard Error(SE).....	30
2.5 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	34
2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ Hardy-Weinberg (HWE).....	36
2.7 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	40
2.8 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	42
2.8.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
2.8.2 ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43
2.8.3 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑ.....	44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΡΘΡΩΝ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ PubMed.....	48
3.2. ΥΠΑΡΞΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.....	53
3.3 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΟΣ STATA10.....	55
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is the most common type of heart disease and is caused by plaque buildup in the walls of the arteries that supply blood to the heart. CAD is a complex phenotype influenced by both genetic and environmental factors. In this work we investigated the potential association of the G972 (rs1801278) polymorphism of IRS-1 gene, with the risk of developing CAD. Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) is a signaling adapter protein that in humans is encoded by the IRS-1 gene. The Insulin Receptor Substrate (IRS) proteins are cytoplasmic proteins that function as essential signaling intermediates downstream of activated cell surface receptors, many of which have been implicated in cancer. IRS-1, as a signaling adapter protein, is able to integrate different signaling cascades.

Polymorphisms of IRS-1 have been shown to contribute to the risk of various diseases including Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), metabolic disorders and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). A comprehensive literature search was performed in the PubMed database. In order to assess the variety of alleles and genotypes between patients and controls, we calculated the odds ratio (OR) along with the 95% confidence interval (CI). The random effects model for meta-analysis was used with the STATA statistical package. Publication bias and cumulative meta-analyses were also performed. In all cases statistical significance was declared for p -values < 0.05 .

The literature search retrieved 9 studies comprising in total 2,874 cases and 3,504 controls. The random-effects meta-analysis using STATA led us to a conclusion that there is no statistically significant association of the Arg972 (rs1801278) polymorphism with the risk for developing CAD. Under the recessive model of inheritance, GG VS. GR+RR the OR was found equal to 0.95 (95% CI: 0.48, 1.87). Further analyses revealed no publication bias, but the cumulative meta-analysis indicated a possible time-trend of the estimates.

The results of the meta-analysis suggest that Arg972 (rs1801278) polymorphism is not likely to contribute significantly to the development of CAD. Even though the polymorphism has been shown to be associated with other components of the metabolic syndrome (such as T2DM, and PCOS), the particular risk that confers to the development of CAD seems to be negligible (if any). However, an important finding of

the particular work is that the cumulative metaanalysis identified a time-trend of the estimates, suggesting that the first published studies over-estimated the possible risk conferred by the polymorphism, a fact that triggered the subsequent publications.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η στεφανιαία νόσος (CAD) είναι ο πιο κοινός τύπος καρδιακής νόσου και προκαλείται από τη συσσώρευση πλάκας στα τοιχώματα των αρτηριών που προμηθεύουν αίμα στην καρδιά. Η στεφανιαία νόσος (CAD) είναι ένας πολύπλοκος φαινότυπος που επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σε αυτή την εργασία ερευνήσαμε την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού G972 (rs1801278) του γονιδίου IRS-1, με κίνδυνο ανάπτυξης CAD. Το υπόστρωμα υποδοχέα ινσουλίνης 1 (IRS-1) είναι μια πρωτεΐνη-προσαρμογέας σηματοδότησης που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το Γονίδιο IRS-1. Οι πρωτεΐνες υποστρώματος υποδοχέα ινσουλίνης (IRS) είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως βασικά σηματοδοτικά ενδιάμεσα των ενεργοποιημένων υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, πολλές από τις οποίες εμπλέκονται στον καρκίνο. Το IRS-1, ως πρωτεΐνη προσαρμογέας σηματοδότησης, είναι ικανό να ενσωματώνει διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης.

Οι πολυμορφισμοί του IRS-1 έχουν αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στον κίνδυνο διάφορων παθήσεων συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη τύπου 2 διαβήτη (T2DM), των μεταβολικών διαταραχών και του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Μια εκτεταμένη βιβλιογραφική αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων του PubMed. Προκειμένου να εκτιμηθεί η ποικιλία αλληλόμορφων και των γονότυπων μεταξύ των ασθενών και των υγιών, υπολογίσαμε τον λόγο πιθανότητας (OR) μαζί με το διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI). Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων για την μετά-ανάλυση χρησιμοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο STATA. Πραγματοποιήθηκαν επίσης έλεγχοι για το σφάλμα την δημοσίευσης και την αθροιστική μετά-ανάλυση. Σε όλες τις περιπτώσεις η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε για τιμές $p\text{-value} < 0,05$.

Από την έρευνα στη βιβλιογραφία προέκυψαν 9 μελέτες που περιλάμβαναν συνολικά 2.874 ασθενείς και 3.504 υγιείς. Η μετά-ανάλυση του μοντέλου τυχαίων αποτελεσμάτων με χρήση του STATA μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού Arg972 (rs1801278) με τον κίνδυνο ανάπτυξης CAD. Με βάση το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας, το GG VS. GR + RR το OR βρέθηκε ίσο με 0,95 (95% CI: 0,48,1,87). Η διεξαγωγή περαιτέρω αναλύσεων αποκάλυψαν ότι δεν υπάρχει σφάλμα δημοσίευσης, αλλά η σωρευτική μετά-ανάλυση υποδεικνύει μια πιθανή χρονική τάση μεταξύ των εκτιμήσεων.

Τα αποτελέσματα της μετά-ανάλυσης υποδηλώνουν ότι ο πολυμορφισμός Arg972 (rs1801278) δεν συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη της στεφανιαίας νόσου (CAD). Παρόλο που ο πολυμορφισμός έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με άλλες διαταραχές του μεταβολικού συνδρόμου (όπως το T2DM, και PCOS), ο ιδιαίτερος κίνδυνος που συμβάλει στην ανάπτυξη CAD φαίνεται να είναι αμελητέος (αν υπάρχει). Ωστόσο, ένα σημαντικό εύρημα της συγκεκριμένης εργασίας είναι ότι η σωρευτική μετά-ανάλυση εντόπισε μια χρονική τάση μεταξύ των εκτιμήσεων, υποδηλώνοντας ότι οι πρώτες δημοσιευμένες μελέτες υπερεκτιμούν τον πιθανό κίνδυνο που προσδίδεται από τον πολυμορφισμό, γεγονός που οδήγησε σε μεταγενέστερες δημοσιεύσεις.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αλματώδης ανάπτυξη της επιστήμης αλλά και η συνεχής εξέλιξή της έχει οδηγήσει την διάγνωση, την πρόγνωση αλλά και την θεραπεία μιας ασθένειας σε σημεία πολύ ικανοποιητικά δίνοντας ελπίδα σε εκατομμύρια ανθρώπους.

Σε πάρα πολλές περιπτώσεις οι ασθένειες που ταλαιπωρούν τους ανθρώπους έχουν κατά κύριο λόγο γενετική βάση. Παραδείγματα τέτοιων είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, παχυσαρκία, τα καρδιαγγειακά νοσήματα όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και πολλά άλλα.

Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε την στεφανιαία νόσο (Coronary Artery Disease) δηλαδή τη νόσος των στεφανιαίων αρτηριών λόγω δημιουργίας αθηροματικών πλακών στο εσωτερικό των τοιχωμάτων τους. Η βασικότερη ένδειξη της νόσου είναι η στηθάγχη, δηλαδή ο πόνος που εμφανίζεται στο στήθος λόγω της στένωσης. Βέβαια η στηθάγχη δεν είναι πάντα ένδειξη της στεφανιαίας νόσου καθώς μπορεί να οφείλεται και σε άλλα αίτια όπως παθήσεις του θώρακα, του οισοφάγου κ.α.

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση της νόσου σε ευρεία κλίμακα είναι το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα ή αλλιώς υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης, οι διατροφικές συνήθειες που περιλαμβάνουν κατανάλωση σε καθημερινή βάση κορεσμένων λιπαρών που αφθονούν στο κόκκινο κρέας, στο βούτυρο, στις μαργαρίνες αλλά και κατανάλωση της ζάχαρης των έτοιμων βιομηχανοποιημένων προϊόντων. Η φυσική κατάσταση που μπορεί να χαρακτηριστεί από έλλειψη άσκησης λόγω καθιστικής ζωής είναι ένας ακόμα βασικός λόγος που πυροδοτεί την έξαρση της νόσου.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοιατρική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Φεβρουάριο του 2017 έως τον Ιούλιο του 2017. Η υλοποίησης της πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια των υπευθύνων καθηγητών.

Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τον επιβέποντα καθηγητή κ. Παντελή Μπάγκο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος με την συνεχόμενη διδασκαλία του καθόλη την

διάρκεια της εκπόνησης αυτής της πτυχιακής και με τις χρήσιμες πληροφορίες και συμβουλές που μου παρείχε τελειοποίησα το κείμενο της διπλωματικής μου.

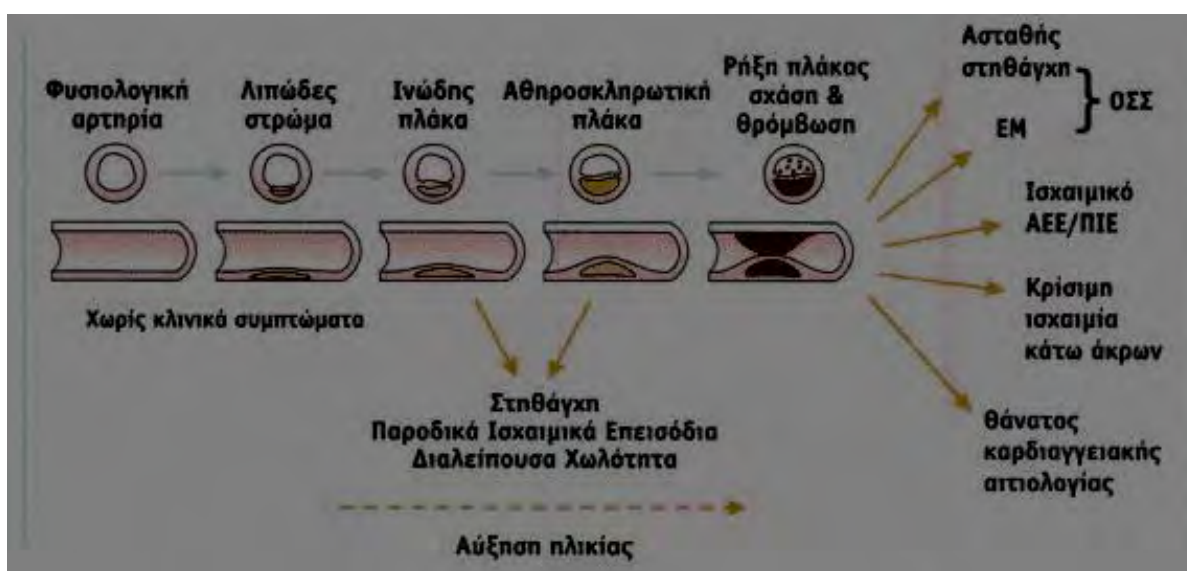
- Την κα Παναγιώτα Κοντού, μετάδιδάκτορα του Τμήματος που με βοήθησε να αποπερατώσω το πρακτικό τμήμα που αφορούσε την επεξεργασία και την στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

- Την τριμελή εξεταστική επιτροπή που απαρτίζεται από την Αναπλ. Καθηγήτρια κα Μαρία Αδάμ και τον Επ. Καθηγητή κ. Κων/Δελημπαση για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσαν.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΙ ΕΙΝΑΙ Η ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.

Ως στεφανιαία καρδιακή νόσος ορίζεται η σταδιακή και συστηματική εναπόθεση ποσοτήτων λιπαρών και ινωδών στοιχείων αλλά και ποσοτήτων ασβεστίου στα τοιχώματα των επικαρδιακών στεφανιαίων αρτηριών με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηροματικών πλακών (εικόνα 1) πλούσιων σε χοληστερόλη. Με τη στένωση του αυλού τους παρεμποδίζεται ή και σταματά η ομαλή ροή του αίματος μέσα από αυτές και έτσι το αίμα δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες οξυγόνωσης της καρδιάς. Αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος είναι να εμφανίζεται καρδιακή ισχαιμία και πόνος, γνωστός ως στηθάγχη. Η ενόχληση αυτή μπορεί να μην εντοπίζεται μόνο στο στήθος αλλά να ανακλάται και σε σημεία όπως η πλάτη, το σαγόني, το επάνω μέρος του στομάχου και να αποπροσανατολίσει τον ασθενή από την κύρια πηγή του προβλήματος [1].



Εικόνα 1.1. Σχηματική Αναπαράσταση στένωσης των στεφανιαίων αρτηριών.

Η νέκρωση του μυοκαρδίου γνωστή και ως έμφραγμα προκαλείται μετά από παντελή και παρατεταμένη έλλειψη οξυγόνου στο μυοκάρδιο. Έτσι συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η στεφανιαία νόσος είναι μια φλεγμονώδης κατάσταση στην οποία εμπλέκεται η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL-χοληστερόλη) και οι βλάβες του ενδοθηλίου

δηλ. της εσωτερικής στοιβάδας του αρτηριακού τοιχώματος που οδηγούν σε δύο κύριες καταστάσεις, την αθηροσκλήρωση και την θρόμβωση.

Με την αύξηση της ηλικίας αυξάνεται και ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου. Έτσι στους άνδρες αυξάνεται μετά την ηλικία των 45 ετών χωρίς να σημαίνει ότι είναι αδύνατο να εμφανιστεί και πιο νωρίς. Στις γυναίκες ο κίνδυνος αυξάνεται μετά την ηλικία 55 ή και νωρίτερα αν εμφανίσουν πρόωρη εμμηνόπαυση χωρίς να υποβληθούν σε θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα.

1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.

Η στεφανιαία νόσος παραμένει η βασικότερη αιτία θνησιμότητας στις ανεπτυγμένες χώρες. Πλήθος επιδημιολογικών ερευνών στην Ευρώπη και στη Αμερική μελετούν τις επιπτώσεις της νόσου σε διάφορους πληθυσμούς ανά τον κόσμο. Όμως τα πιο αξιόπιστα στοιχεία προκύπτουν από τα δεδομένα θνησιμότητας καθώς μόνο οι θάνατοι καταγράφονται αξιόπιστα και υποχρεωτικά. Η διαφοροποίηση στους πληθυσμούς και στις χώρες μπορούν να μεταβάλλουν και τα στοιχεία της θνησιμότητας [2]. Στις ΗΠΑ το 2002 η συχνότητα της νόσου στο γενικό πληθυσμό έφτανε στο 6,9% και η διακύμανση μεταξύ ανδρών και γυναικών 5,6% και 8,4% αντίστοιχα, ενώ η επίπτωση της νόσου το 2001 ήταν 442,5 ανά 100.000 άτομα. Ένα χρόνο μετά το 2002 η θνησιμότητα από τη νόσο ήταν 170,8 ανά 100.000 [3, 4]. Στην Ελλάδα με μελέτη που προκύπτει από το GREECS από τον Οκτώβριο του 2003 μέχρι τον Σεπτέμβριο του 2004 συγκεντρώθηκαν 2172 ασθενείς με διάγνωση εξόδου, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Η ετήσια επίπτωση του συνδρόμου ήταν 22,6 ανά 10.000 άτομα. Από μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη νότιο-δυτική Ελλάδα προκύπτει ότι η στεφανιαία νόσος είναι 39 ανά 10.000 άτομα. Σύμφωνα με στοιχεία του παγκόσμιου οργανισμού υγείας στους άνδρες η θνησιμότητα στη Λευκορωσία ήταν 802 ανά 100.000 άτομα, στην Ιαπωνία 57 ανά 100.000 άτομα και στην Ελλάδα 175 ανά 100.000 [5]. Ενώ στις γυναίκες ήταν 359 ανά 100.000 άτομα στην Ουκρανία, στην Ιαπωνία ήταν 19 ανά 100.000 και στην Ελλάδα ήταν 49 ανά 100.000 άτομα. Το 2002 στην ηλικία των 60 ετών και άνω ο θάνατος από στεφανιαία νόσο και στα 2 φύλα ήταν 5.825 ανά 100.000 άτομα [6]. Στην Ελλάδα το 2001 οι θάνατοι στην ηλικία των 65 ετών και άνω ήταν 663,4 ανά 100.000 άτομα για τους άνδρες και 393,7 ανά 100.000 άτομα για τις γυναίκες [7]. Από το 1992-2002 ο ρυθμός θανάτου από Στεφανιαία νόσο μειώθηκε κατά 26,5%. Σύμφωνα με πιο

πρόσφατα στοιχεία για τις ΗΠΑ το 2004 οι άντρες και οι γυναίκες με Στεφανιαία νόσο ανέρχονταν περίπου στα 8.500.000 και 7.200.000 αντίστοιχα, ενώ η επιδημιολογία στην Ευρώπη κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα μόνο που υπήρχε διαφορά μεταξύ των χωρών. Από τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν το 50% των ανδρών και το 64% των γυναικών που απεβίωσαν αιφνιδίως δεν εμφάνιζαν συμπτώματα της νόσου. Στην Ευρώπη το 22% του συνόλου των θανάτων στις γυναίκες και το 21% του συνόλου των θανάτων στους άντρες οφείλεται σε αυτή, ενώ κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση σημειώνονται 774.000 θάνατοι και πιο συγκεκριμένα το 17% των θανάτων αφορά στους άνδρες και το 15% αφορά στις γυναίκες [8]. Αν πάμε λίγο πιο παλιά στην περίοδο από το 1956 έως και το 1981 η ισχαιμική καρδιοπάθεια αποτελούσε την κυριότερη αιτία θανάτου μεταξύ των ηλικιών 35-45. Ενώ το λίγο πιο μετά το 1986 ο δείκτης θνησιμότητας για την Ελλάδα ήταν 671 ανά 100.000, συγκριτικά μικρότερος από αυτόν της Σουηδίας και των ΗΠΑ που ήταν 710 ανά 100.000 άτομα και 907 ανά 100.000 άτομα αντίστοιχα.

1.3 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ, ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.

1.3.1 ΤΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ.

Η στεφανιαία νόσος η οποία αποτελεί πλέον την πρωταρχική αιτία θανάτου στις Δυτικές κοινωνίες μπορεί να εκδηλωθεί με τις εξής κλινικές μορφές:

- 1) Η περίοδος χωρίς συμπτώματα
- 2) Σταθερή στηθάγχη
- 3) Ασταθής στηθάγχη
- 4) Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου
- 5) Αιφνίδιος θάνατος

1) Κατά την περίοδο χωρίς συμπτώματα εξασφαλίζεται η απαραίτητη ποσότητα οξυγόνου για την παροχή στο μυοκάρδιο, καθώς η στένωση των αρτηριών είναι σε μικρό βαθμό που δεν επηρεάζει αρκετά την διέλευση του αίματος. Για αυτόν το λόγο και ο ασθενής δεν αντιλαμβάνεται το πρόβλημα και συνεχίζει τις καθημερινές του δραστηριότητες φυσιολογικά.

2) Τα άτομα με σταθερή στηθάγχη εμφανίζουν πόνο σε τακτά χρονικά διαστήματα και συνήθως εμφανίζονται όταν πραγματοποιούν συγκεκριμένες δραστηριότητες όπως το ανέβασμα μιας σκάλας ή κάλυψη μεγάλων αποστάσεων με τα πόδια. Το χρονικό διάστημα που λαμβάνει χώρα είναι πολύ μικρό, συνήθως λίγα λεπτά όμως με την λήψη φαρμακευτικής αγωγής ή με ξεκούραση τα συμπτώματα γίνονται πιο ήπια.

3) Η βασική διαφορά της ασταθούς στηθάγχης από τη σταθερή είναι ότι τα συμπτώματα μπορεί να παρουσιαστούν αιφνίδια και όχι σε προκαθορισμένους χρόνους και καταστάσεις. Η ασταθής στηθάγχη δεν προκαλεί μόνιμη βλάβη στην καρδιά όμως μπορεί να είναι προάγγελος μιας προ εμφραγματικής κατάστασης που ενέχει τεράστιο κίνδυνο να εξελιχτεί σε έμφραγμα. Και σε αυτήν την περίπτωση το βασικότερο σύμπτωμα είναι ο πόνος που προέρχεται από τις μυικές ίνες της καρδιάς λόγω της απότομης μείωσης του εύρους του αυλού των αγγειακών αρτηριών σε αντίθεση με την σταδιακή και ελεγχόμενη απόφραξη που συμβαίνει στην σταθερή στηθάγχη. Συνήθως η κατάσταση αυτή απαιτεί νοσηλεία και χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής στον ασθενή με αντιπηκτικά φάρμακα.

4) Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χαρακτηρίζεται από απότομη διακοπή της παροχής οξυγόνου στον καρδιακό μυ με άμεση συνέπεια την νέκρωση αυτού. Το βασικό αίτιο είναι η ολική απόφραξη μιας από τις στεφανιαίες αρτηρίες λόγω της ανάπτυξης θρόμβου πάνω σε μια αρτηριοσκληρωτική πλάκα. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου εκδηλώνεται με την τυπική στηθάγχη που διαρκεί πολύ περισσότερο χρόνο σε σχέση τις άλλες περιπτώσεις. Μετά από ένα έμφραγμα ο ασθενής θα πρέπει να μεταβεί αμέσως σε νοσοκομείο καθώς ακόμα και αν επιβιώσει μετά από αυτό συνήθως παρουσιάζονται σοβαρές επιπλοκές όπως καρδιακή ανεπάρκεια.

5) Το 80% περίπου των αιφνίδιων θανάτων οφείλονται στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Συνήθως ο θάνατος επέρχεται περίπου μια ώρα μετά την εμφάνιση των οξέων συμπτωμάτων. Σε ένα μεγάλο ποσοστό ο αιφνίδιος θάνατος δυστυχώς αποτελεί το μοναδικό σύμπτωμα-προάγγελο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου [9].

1.3.2 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.

Το βασικότερο μέτρο πρόληψης για την αντιμετώπιση της νόσου είναι η μείωση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης σε ποσοστό κάτω από 100mg% για τα άτομα με στεφανιαία νόσο, περιφερειακή αγγειοπάθεια, σακχαρώδη διαβήτη και φυσικά με προδιαθεσικούς παράγοντες. Σε αυτήν την προσπάθεια συνεισφέρει η σωστή διατροφή ακολουθώντας δίαιτα με μειωμένα ποσοστά κεκορεσμένων λιπαρών και αντικατάσταση αυτών των τροφών με αντίστοιχες πλούσιες σε λίπη που προέρχονται από φυτικά λιπαρά. Το ελαιόλαδο είναι μια πολύ καλή πηγή φυτικών λιπαρών αυξάνοντας τα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης. Αν ο έλεγχος του σωματικού βάρους δεν οδηγήσει στο επιθυμητό αποτέλεσμα τότε χορηγούνται υπολιπιδαιμικά φάρμακα που συνδυάζονται με καλή διατροφή. Επόμενο βήμα στην αντιμετώπιση αν πρόκειται για ασθενή -καπνιστή είναι η επιβεβλημένη διακοπή του καπνίσματος, καθώς έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους προδιαθεσικούς παράγοντες εμφάνισης της νόσου. Έτσι το κάπνισμα μπορεί να αυξήσει την αρτηριακή πίεση και την καρδιακή συχνότητα. Το μονοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από την καύση δυσχεραίνει την μεταφορά του οξυγόνου στην καρδιά και παράλληλα προκαλεί ανωμαλίες στα επίπεδα των λιπιδίων στο αίμα με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η σταθεροποίηση των επιπέδων της HDL και LDL χοληστερόλης. Η ρύθμιση των επιπέδων της διαστολικής και συστολικής αρτηριακής πίεσης αποτελεί επίσης βασικό παράγοντα στην αντιμετώπιση καθώς έχει βρεθεί ότι τα υπέρτασικά άτομα εμφανίζουν 3 έως 6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν την νόσο. Αυτό επιτυγχάνεται με απώλεια σωματικού βάρους, μειωμένη λήψη άλατος από τις τροφές και αύξηση της σωματικής δραστηριότητας. Σε αρκετές περιπτώσεις βέβαια ο θεράπων ιατρός χορηγεί τη λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων για αυτό τον σκοπό. Ένα άλλο θέμα μείζονος σημασίας είναι ο σακχαρώδης διαβήτης καθώς έχει αποδειχτεί ότι ο κίνδυνος θανάτου από στεφανιαία νόσο είναι πολύ μεγαλύτερος στους διαβητικούς. Στα διαβητικά άτομα συνυπάρχουν αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες όπως η αρτηριακή πίεση, τα μειωμένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης, η παχυσαρκία και η υπέρ πηκτικότητα του αίματος με δημιουργία θρομβώσεων. Βέβαια αν και δεν έχει αποδειχθεί ξεκάθαρα ότι η μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα αποτρέπει τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου, είναι βέβαιο ότι η ρύθμισή του προστατεύει από άλλες επιπλοκές που μπορούν να αποβούν μοιραίες για τον ασθενή. Τέλος η κληρονομικότητα παίζει σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση

της νόσου για αυτό και άτομα με οικογενειακό ιστορικό σε συγγενικά πρόσωπα θα πρέπει να ελέγχονται επιμελώς όσον αφορά στους παράγοντες κινδύνου που ίσως συνυπάρχουν, όπως η υπερλιπιδαιμία, ο διαβήτης, αρτηριακή πίεση και το κάπνισμα [10, 11].

1.3.3 ΑΠΛΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ (SNPs)-single nucleotide polymorphism.

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί είναι σημειακές μεταλλάξεις στην αλληλουχία του DNA, δηλαδή σε ένα συγκεκριμένο τμήμα της αλυσίδας του DNA μια βάση υποκαθίσταται με μια άλλη. Ένας πολυμορφισμός μπορεί να προκληθεί από την πρόσθεση ενός νουκλεοτιδίου, την διαγραφή ή την αντικατάσταση. Τα SNPs υπάρχουν φυσιολογικά στο γενετικό υλικό του κάθε ατόμου και υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος. Ένας ή περισσότεροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μπορούν να καθορίσουν μια σειρά από χαρακτηριστικά, όπως τις πιθανότητες εκδήλωσης διαφόρων ασθενειών, την ανταπόκριση σε μια φαρμακευτική αγωγή, την επιρρέπεια μας σε μολύνσεις. Παράλληλα μελέτες σε παγκόσμια κλίμακα εξετάζουν το ενδεχόμενο της συσχέτισης πολλαπλών SNPs με την εκδήλωση πολυπαραγοντικών παθήσεων όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και κάποιοι τύποι καρκίνου[12]. Η ανάλυση των πολυμορφικών αλληλόμορφων σε επίπεδο πληθυσμών χρησιμεύει για:

- 1) Την τυποποίηση των ιστών π.χ για την εύρεση συμβατού δότη σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων.
- 2) Για την εύρεση γονιδίων που προκαλούν ασθένειες.
- 3) Σε πληθυσμιακές μελέτες π.χ για την διαπίστωση γενετικής απόκλισης σε διάφορους πληθυσμούς.
- 4) Σε επίπεδο πληθυσμών για την διαπίστωση ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ ομάδων και ειδών.
- 5) Για την παρακολούθηση της μετανάστευσης πληθυσμών-ατόμων από μια περιοχή σε άλλη [13].

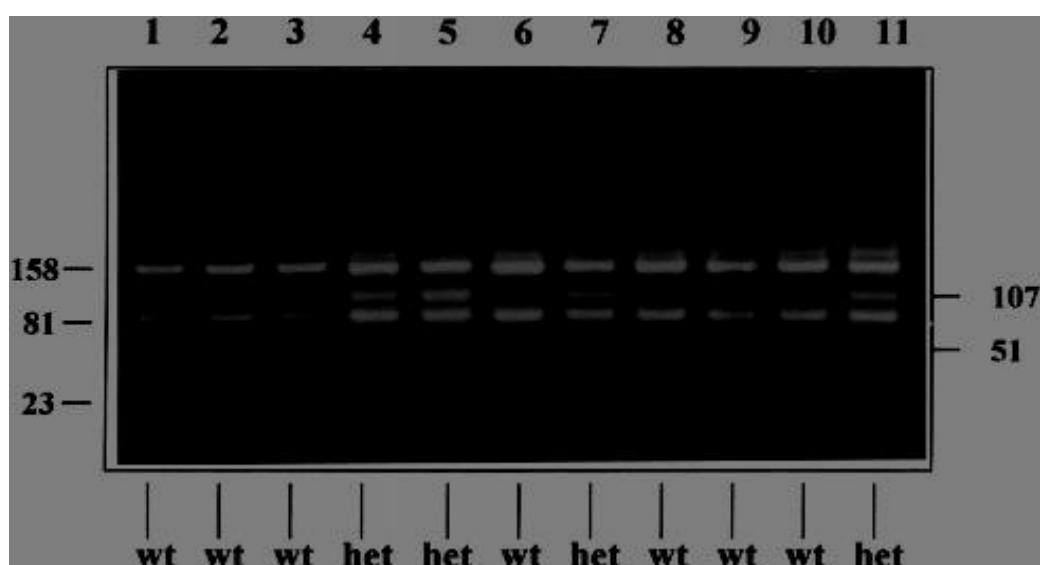
1.4 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1 ΚΑΙ ΤΙ Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ G972.

1.4.1 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1 (*Insulin Reseptor Substrate-1*).

Ο υποδοχέας υποστρώματος ινσουλίνης (IRS-1) είναι μια πρωτεΐνη-υποδοχέας σηματοδότησης που κωδικοποιείται από το γονίδιο IRS-1. Έχει μέγεθος 131kDa και αλληλουχία αμινοξέων περίπου 1242 υπολειμάτων[14]. Περιέχει έναν ενιαίο τομέα ομολογίας πλεκστρίνης (PH) στο N-τελικό άκρο και έναν τομέα πρόσδεσης φωσφοτυροσίνης περίπου 40 υπολείματα κάτω από αυτόν ακολουθούμενο από μια κακώς συντηρημένη ουρά στο C-άκρο. Το IRS-1 παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη μετάδοση σημάτων από την ινσουλίνη και τον σχετικό με την ινσουλίνη αυξητικό παράγοντα (IGF-1) στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι PI3K/Akt και στο μονοπάτι κινάσης Erk MAP. Η φωσφορυλίωση τυροσίνης της IRS-1 από την υποδοχέα ινσουλίνης (IR) εισαγάγει πολλαπλές θέσεις δέσμευσης για πρωτεΐνες που φέρουν τομέα ομολογίας SH2, όπως η PI3K, το σύμπλοκο Grb-2/Sos και SHP2. Η PI3K πρωτεΐνη σε αλληλεπίδραση με το IRS-1 παράγει PIP3 η οποία με τη σειρά της προσλαμβάνει την κινάση Akt. Περαιτέρω, η την κινάση Akt ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης και καταλοίπου T308 και αναλόγων θέσεων στην PKC από την PDK1. Αυτή η φωσφορυλίωση δεν πραγματοποιείται σε ιστούς που λείπει η IRS-1. Όλη αυτή η διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα την πρόσληψη γλυκόζης. Το σύμπλοκο Grb-2/Sos γνωστό και ως RAS σηματοδοτεί τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης της ERK1/2. Η μεταγωγή του σήματος της IRS-1 μπορεί να παρεμποδίζεται σε μερικούς ιστούς από την SHP2 [15]. Από έναν μικρό αριθμό μελετών που πραγματοποιήθηκαν επιτυχώς προέκυψαν περιοχές γονιδίων που σχετίζονται με την σταφαιαία νόσο. Ετσι από την συνολική ανάλυση του γονιδιώματος οι περιοχές αυτές είναι οι εξής: Η περιοχή του χρωμοσώματος 2q21-22 και Xq23-26 σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε φυλή Φινλανδών [16]. Η περιοχή 15q26 του γονιδίου MEF2 που διεξήχθει σε φυλές Αμερικανών [17], και τέλος οι περιοχές 13q12-13 και 17q22 των γονιδίων ALOX₅AP και LTA₄H αντίστοιχα που πραγματοποιήθηκαν σε φυλές Ισλανδών.

1.4.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ G972(rs1801278) στο ΓΟΝΙΔΙΟ IRS-1.

Η γενετική ανάλυση του γονιδίου IRS-1 αποκάλυψε αρκετές αλλαγές στα ζεύγη βάσεων με αποτέλεσμα τις υποκαταστάσεις των αμινοξέων. Η πιο κοινή υποκατάσταση αμινοξέος είναι η γλυκίνη σε αργινίνη στο κωδικόνιο 972 (G972R), η οποία έχει συνολική συχνότητα 6% στον γενικό πληθυσμό. Αυτή η μετάλλαξη έχει αναφερθεί ότι μειώνει σημαντικά τη λειτουργία του IRS-1 σε πειραματικά μοντέλα και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η γενετική παραλλαγή σχετίζεται με μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Επιπλέον παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο IRS-1 σχετίζεται με την δυσλιπιδαιμία υποδηλώνοντας ότι αυτή η παραλλαγή του γονιδίου μπορεί να έχει σημαντική επίδραση σε διάφορους παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (CAD). Η ανίχνευση της μετάλλαξης G972R του IRS-1 γονιδίου με τις μεθόδους PCR και BstNI φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [18].



Εικόνα 1.2 Από την ανάλυση γονιδιώματος σε αίμα που συλλέχθηκε σε σωλήνες με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την απομόνωση του DNA. Ο πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου ανιχνεύτηκε με ανάλυση αλληλικής διάρκειας χρησιμοποιώντας χημεία εφαρμοσμένων βιοσυστημάτων Taqman σε όργανα τεχνικής PCR. [19]

IRS-1 G972R (rs1801278). Primer IRS-1 F 5'-GGTCGAGATGGGCAGACT-

3', primer IRS-1 R 5'-GGGTAGGCCTGCAAATGCTA-

3', G-probe R 5'-VIC-CAGCCCCGGGAGGT-

3', A-probe R 5'-FAM-CAGCCCTGGGAGGT-

1.5 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.

1.5.1 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ (*meta-analysis*).

Η Μέτα-Ανάλυση είναι ένας στατιστικός συνδυασμός πληροφοριών ανεξαρτήτων μελετών που επιτρέπουν την εκτίμηση της μιας γενετικής επίδρασης καθώς επίσης και την εξερεύνηση της ετερογένειας μεταξύ αυτών των μελετών. Σε γενικές γραμμές η μετά-ανάλυση είναι μια ποσοτική προσέγγιση για την συστηματική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προηγούμενης έρευνας, με στόχο να φτάσει σε συμπεράσματα για το σύνολο της έρευνας [20]. Η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων έλαβε χώρα με την βοήθεια των εντολών που περιείχε το στατιστικό πακέτο STATA10. Ο όρος μετά-ανάλυση εισήχθη το 1976 στον τομέα της ψυχολογίας αργότερα όμως καθιερώθηκε ως ερευνητικός κλάδος με πολλές εφαρμογές στις κλινικές δοκιμές. Σήμερα εφαρμόζεται κατά κόρον στον τομέα της γενετικής επιδημιολογίας για την συσχέτιση γονιδίων και ασθενειών. Για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία εξετάστηκαν ασθενείς και μάρτυρες από διάφορες μελέτες (Case-Controls studies) και σαν μέγεθος επίδρασης χρησιμοποιήθηκε το OR (Odds Ratio). Για τα συνεχή δεδομένα χρησιμοποιήσαμε τη μέση τιμή και τη διακύμανση. Κατά την αναζήτηση στην βιβλιογραφία όλων των διαθέσιμων και δημοσιευμένων μελετών θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν κάποιοι παράγοντες που αν τους παραβλέψουμε θα οδηγηθούμε σε εσφαλμένο αποτέλεσμα. Τέτοιοι παράγοντες είναι η **γκρίζα βιβλιογραφία**, η **ξενόγλωσση βιβλιογραφία** και **το φαινόμενο του Πρωτέα** καλούμενα όλα μαζί και ως προβλήματα στη βιβλιογραφία. Επιπλέον υπάρχουν δυο βασικά σημεία στη μετά-ανάλυση που πρέπει να ληφθούν υπόψιν και είναι:

•**Ο έλεγχος της ετερογένειας μεταξύ των μελετών**

•**Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg**

Ο νόμος του Hardy-Weinberg υποστηρίζει ότι οι γονότυποι κατανέμονται ανάλογα με τις συχνότητες των ατομικών αλληλόμορφων στον πληθυσμό και παραμένουν σταθεροί

απο γενιά σε γενιά. Ένας πληθυσμός που διέπεται απο τα βασικά χαρακτηριστικά του νόμου Hardy-Weinberg λέμε οτι βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [21].

1.5.2 Η ΔΥΝΑΜΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.

Η δύναμη της μέτα-ανάλυσης εξαρτάται απο τον αριθμό των μελετών και των δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων. Δηλαδή για τα διακριτά δεδομένα ο αριθμός των ασθενών και των μαρτύρων θα πρέπει να είναι πολύ μεγάλος και για την ανάλυση και τον συνδυασμό μεμονωμένων εκτιμήσεων που προέρχονται απο τις αρχικές μελέτες χρησιμοποιούνται δυο μοντέλα στην στατιστική ανάλυση:

- Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων(fixed effect model)
- Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων(random effect model)

Στο πρώτο μοντέλο ο πληθυσμός στον οποίο γίνονται οι γενικεύσεις περιορίζεται στο σύνολο των μελετών που έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τις εξεταζόμενες μελέτες, ενώ στο δεύτερο μοντέλο τα αποτελέσματα γενικεύονται σε έναν υπερπληθυσμό παρόμοιων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί ή πρόκειται να πραγματοποιηθούν [22].

1.5.3 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ(cumulative meta-analysis).

Στην αθροιστική μέτα-ανάλυση το συνολικό αποτέλεσμα υπολογίζεται με την διαδοχική προσθήκη νέων δεδομένων σύμφωνα με μια σειρά, συνήθως χρονολογία εμφάνισης των δεδομένων. Η αθροιστική μέτα-ανάλυση παρέχει ενημερωμένη αθροιστική εκτίμηση μαζί με το διάστημα εμπιστοσύνης(CI) όταν ένα νέο κομμάτι των στοιχείων προκύπτει [23].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων της Pubmed του NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) για σχετικά άρθρα με τον πολυμορφισμό G972 για το γονίδιο IRS-1 και τη συσχέτιση του με τη στεφανιαία νόσο (CAD). Για τον εντοπισμό αυτών των άρθρων χρησιμοποιήθηκαν λέξεις-κλειδιά τα λεγόμενα “queries” που είναι τα εξής:

(IRS1 OR "insulin receptor substrate-1" OR 972Arg) and (CAD OR CHD OR "coronary artery disease" OR "coronary heart disease" OR stroke OR "myocardial infarction") and (variant OR SNP or mutation or polymorphism

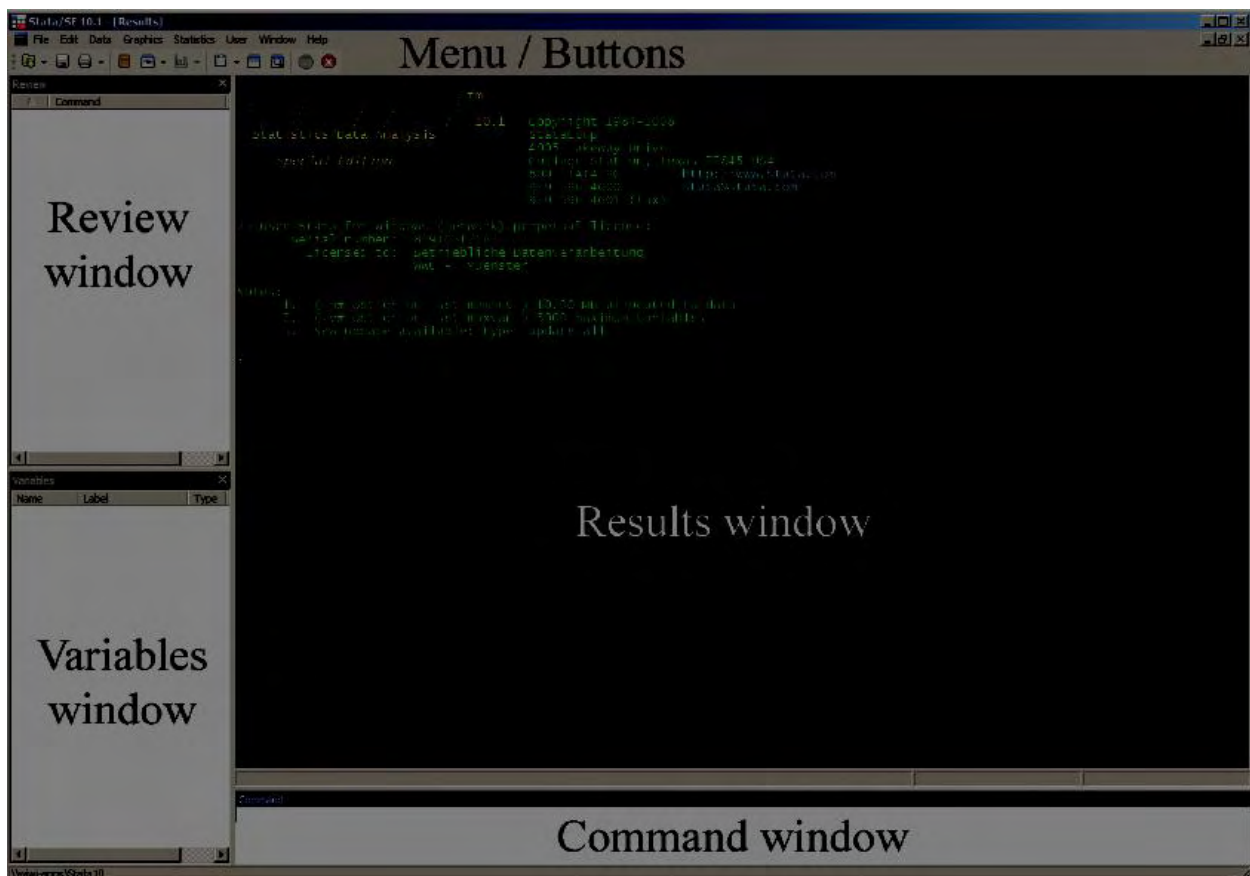
(IRS1 OR IRS-1 OR "insulin receptor substrate-1" OR G972 OR 972Arg) and (CAD OR CHD OR "coronary artery disease" OR "coronary heart disease" OR stroke OR "myocardial infarction") and (variant OR SNP or mutation or polymorphism)

Από τις μελέτες που συγκεντρώθηκαν επιλέχθηκαν αυτές που μας ήταν χρήσιμες και οι υπόλοιπες απορρίφθηκαν για ξεχωριστούς λόγους η καθεμία. Επόμενο βήμα ήταν η καταχώρηση των δεδομένων που εξαγάγαμε σε αρχεία excel. Τα στοιχεία που καταχωρήθηκαν ήταν: ο κωδικός αριθμός της κάθε μελέτης στη βάση (**PMID**), ο συγγραφέας του κάθε άρθρου (**AUTHOR**), το έτος (**YEAR**), η χώρα (**COUNTRY**), η φυλή (**RACE**), και ο αριθμός των γονοτύπων των ασθενών (**cases**) και των μαρτύρων (**controls**). Τα αρχεία αυτά δημιουργήθηκαν με σκοπό τη χρήση της μέτα-ανάλυσης που παρέχει το στατιστικό πακέτο του STATA10.

2.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA.

Το STATA είναι ένα πακέτο στατιστικού λογισμικού γενικής χρήσης που δημιουργήθηκε το 1985 από την StataCorp. Η χρήση του είναι ευρεία σε πολλούς τομείς έρευνας, ειδικά στα πεδία των οικονομικών, της πολιτικής επιστήμης, της βιοϊατρικής και της επιδημιολογίας. Οι δυνατότητες του STATA περιλαμβάνουν, την διαχείριση δεδομένων, τη στατιστική ανάλυση, γραφικά, προσομοιώσεις, στατιστική παλινδρόμηση. Ο όρος STATA προέρχεται από την σύντμηση των λέξεων statistics και data. Περιέχει ένα ευρύ φάσμα ενημερωμένων στατιστικών τεχνικών και ένα εξαιρετικό σύστημα για την παραγωγή ποιοτικών γραφημάτων. Το STATA είναι εύκολο και γρήγορο στη χρήση και είναι διαθέσιμο για Windows, Unix και Mac computers. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται

το γραφικό περιβάλλον του STATA10(interface). Όπως μπορούμε να διακρίνουμε υπάρχουν 4 παράθυρα στην επιφάνεια του. Το παράθυρο που ονομάζεται Εντολή(Command) είναι εκεί όπου πληκτρολογούμε και εισάγουμε τις εντολές. Το STATA έπειτα δείχνει τα αποτελέσματα σε μεγαλύτερο παράθυρο ακριβώς από πάνω που ονομάζεται Αποτελέσματα(Results). Οι εντολές που έχουμε θέσει προστίθενται σε μια λίστα στο παράθυρο που ονομάζεται Review και βρίσκεται επάνω αριστερά, έτσι μπορούμε να διατηρούμε το αρχείο των εντολών που έχουμε χρησιμοποιήσει. Τέλος το παράθυρο Μεταβλητές(Variables) κάτω αριστερά απεικονίζει τις μεταβλητές στο σύνολο των δεδομένων μας [24] .



Εικόνα 2.1 Το interface του STATA.

2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.

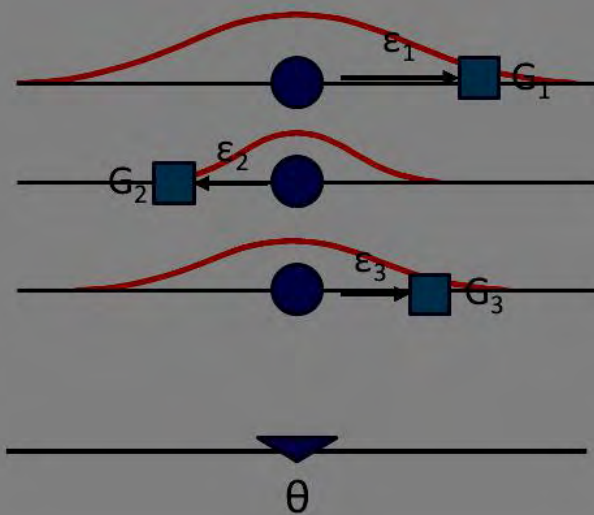
Η στατιστική ανάλυση μιας μεγάλης συλλογής αποτελεσμάτων που προέρχονται από διάφορες ανεξάρτητες μελέτες, οι οποίες είχαν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν, έπαιξε σπουδαίο ρόλο στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο επίδρασης μιας θεραπείας ή στον τρόπο με τον οποίο ένα γονίδιο επηρεάζει μια ασθένεια. Αυτή η συλλογή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων που ονομάστηκε μετά-ανάλυση, πραγματοποιείται εφαρμόζοντας είτε το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effect model) είτε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effect model). Στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων όλα τα δείγματα προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό με ένα κοινό μέγεθος επίδρασης. Το μέγεθος που συμβάλει στις διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων επίδρασης-μεγέθους είναι το σφάλμα δειγματοληψίας (sample error). Στο μοντέλο τυχαίων επιδράσεων τα δείγματα της μελέτης μπορούν να προέλθουν από μια διανομή πληθυσμών. Οι παράγοντες που συμβάλουν στις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων επίδρασης είναι το σφάλμα της δειγματοληψίας και η ετερογένεια μεταξύ των μελετών.

2.3.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (Fixed Effect Model).

Στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων όλα τα δείγματα προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό με κοινό μέγεθος επίδρασης θ . Δηλαδή υποθέτει ότι υπάρχει μια ενιαία κοινή δράση των διαφορετικών μελετών που εξετάζονται. Η λογική του μοντέλου σταθερών επιδράσεων φαίνεται γραφικά στην παρακάτω εικόνα. (βλέπε Εικόνα 2.3). Έστω ότι τα δείγματα είναι Y_i , θ είναι η κεντρική παράμετρος και S_i^2 η διακύμανση όπου $i=1,2,3,\dots,k$ ανεξάρτητες μελέτες (βλέπε εικόνα 2.3), τότε το μοντέλο αυτό εκφράζεται από την εξής σχέση:

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

The Fixed-Effect Model



While the error for any given study is random, we can estimate the sampling distribution of errors (red curves).

The width of these curves is based on the standard error, a function of the variability and sample size in each study.

Εικόνα 2.3: Το μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Οι μπλέ κύκλοι συμβολίζουν τις ανεξάρτητες μελέτες και το μπλέ τρίγωνο συμβολίζει το κοινό μέγεθος επίδρασης όλων των μεταβλητών. Το μέγεθος ϵ_1 είναι το σφάλμα του δείγματος και οι τιμές G_i είναι οι εκτιμήσεις επίδρασης. Το εύρος των καμπυλών εξαρτάται από το τυπικό σφάλμα, τη λειτουργία της μεταβλητότητας και το μέγεθος του δείγματος της κάθε μελέτης [25].

2.3.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (Random Effect Model).

Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι τα δείγματα της μελέτης μπορούν να προέλθουν από μια διανομή πληθυσμών, δηλαδή δεν μας απασχολεί αν όλα τα δείγματα

Y_i προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό. Κάθε μελέτη έχει διαφορετικό μέγεθος επίδρασης θ_i και διακύμανση s_i^2 . Ο τύπος που εκφράζει το μοντέλο αυτό είναι:

$\theta_i, s_i^2 \sim N(\theta_i, s_i^2)$ όπου θ_i = μέγεθος επίδρασης και s_i^2 = διακύμανση

Κάθε δείγμα του πληθυσμού έχει μέγεθος επίδρασης που κατανέμεται με μέση τιμή θ και διακύμανση τ^2 τότε η σχέση που το περιγράφει είναι η εξής:

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

όπου θ, τ^2 είναι υπέρ παράμετροι που αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και την διακύμανση αντίστοιχα.

Η ανάλυση του υπερπληθυσμού δίνεται 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: $Y = (Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_k)$ και $\tau^2 = \left(\frac{Q - (n-1)}{\sum_{i=2}^n w_i - \frac{\sum_{i=1}^n w_i^2}{\sum_{i=1}^n w_i}} \right)$

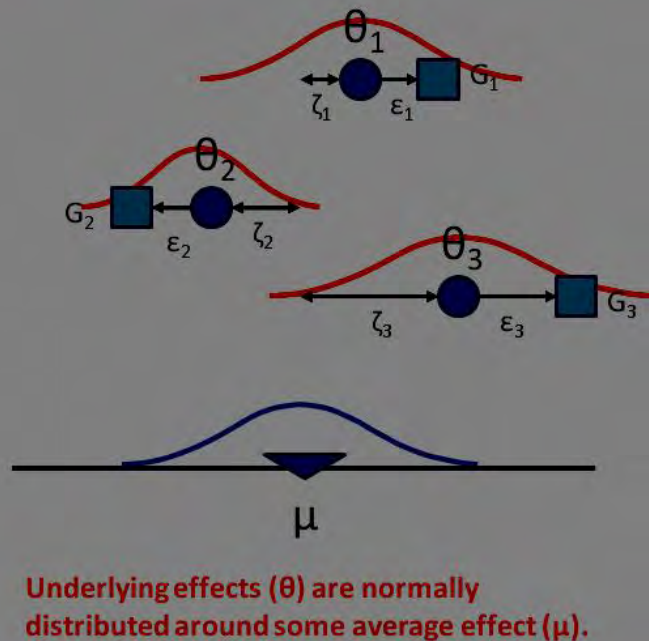
$$\text{και } B_i = \frac{s_i^2}{s_i^2 + \tau^2}$$

Όπως μπορούμε να δούμε στην εικόνα 2.4 κάθε παρατηρήσιμο μέγεθος-επίδραση (G) υποτίθεται ότι είναι ένα άθροισμα σφαλμάτων δειγματοληψίας (ϵ) και ενός κοινού μεγέθους επίδρασης (θ). Στο μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτουμε ότι οι παρατηρήσιμες επιδράσεις προέρχονται από παρόμοιες βασικές επιδράσεις, αλλά όχι από μια και μοναδική επίδραση (single effect). Οι βασικές επιδράσεις θ της κάθε μελέτης κατανέμονται γύρω από μια μέση κοινή επίδραση (μ) [26].

The Random-Effects Model

The distance of each underlying effect (θ_i) to the summary effect (μ) depends on the **distribution of true effects**. This distribution is described by the variance between effects (τ^2 ; or simply τ when referring to the standard deviation).

This distance of the observed effects (G_i) to the underlying effect (θ_i) depends on the **sampling distribution for each study**. This distribution is described by the variance of the observed effect (V_{G_i}).



Εικόνα 2.4. Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων. Οι βασικές επιδράσεις θ κατανέμονται κανονικά γύρω από την μέση τιμή της επίδρασης μ . Η απόσταση της παρατηρούμενης επίδρασης (G_i) από την βασική επίδραση (θ_i) εξαρτάται από την διανομή των δειγμάτων της κάθε μελέτης. Αυτή η διανομή περιγράφεται από τη διακύμανση της παρατηρούμενης επίδρασης (V_{G_i}).

2.3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ.

Όταν η μετά-ανάλυση πραγματοποιείται με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effect model) υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης ετερογένειας στη μελέτη καθώς τα δείγματα προέρχονται από διαφορετικούς πληθυσμούς. Έτσι είναι απαραίτητος ο έλεγχος της ετερογένειας μεταξύ των μεμονομένων μελετών [27]. Ο έλεγχος της ετερογένειας γίνεται με δύο τεστ:

- Q test του Cochran, το οποίο είναι κατάλληλο όταν έχουμε μεγάλο πλήθος δειγμάτων και δίνει πολύ αξιόπιστα αποτελέσματα. Η στατιστικά σημαντική ετερογένεια είναι όταν η

τιμή του p-value είναι μεγαλύτερη από 0,1. Ο δείκτης Q ακολουθεί την κατανομή χ^2 με $k - 1$ βαθμούς ελευθερίας όπου k ο αριθμός των μελετών. Το Q δίνεται από τον τύπο:

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

Όπου : y_i = η εκτίμηση του αποτελέσματος κάθε μελέτης

y_w = η συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος

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

Όπου w_i = το αντίστροφο της διακύμανσης (s^2) με $i = 1 \dots k$

■ I^2 test το οποίο χρησιμοποιείται ακόμα και για πολύ μικρά δείγματα και δίνει επίσης πολύ αξιόπιστα αποτελέσματα. Ο έλεγχος της ετερογένειας γίνεται στο STATA10 με την εντολή metan. Ο δείκτης I^2 εκφράζει το ποσοστό της ετερογένειας και δίνεται από τον τύπο:

$$I^2 = \frac{Q - (k-1)}{Q} * 100 \quad \text{όπου } k - 1 = \text{βαθμοί ελευθερίας}$$

Q = κατανομή

Οι τιμές των αποτελεσμάτων του I^2 κυμαίνονται από 0 έως 100% και αντιπροσωπεύουν το ποσοστό της παραλλαγής (variation) μεταξύ των μελετών που προκλήθηκε από ετερογένεια.

■ τ^2 test το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και πρέπει πάντα να υπολογίζεται. Η παράμετρος αυτή παίρνει τιμές μεγαλύτερες ή ίσες με το 0. Το τ^2 το οποίο προτάθηκε από τους DerSimonian και Laird, είναι ένας μη επαναληπτικός εκτιμητής που υπολογίζει τη μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών. Η ετερογένεια υπολογίζεται ως εξής:

$$\tau^2 = \frac{Q - df}{C}$$

Όπου: $Q = \sum w_i (y_i - y_w)^2$

$$df = k - 1$$

$$C = \sum w_i - \frac{\sum_{i=1}^n w_i^2}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

2.4 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (Odds Ratio-OR)- Standard Error(SE).

ΟΡΙΣΜΟΣ

Το odds εκφράζει την πιθανότητα να συμβεί το νόσημα σε σχέση με την πιθανότητα να μην συμβεί. Δηλαδή αν η πιθανότητα ενός συμβάντος ή μιας κατάστασης είναι p τότε ισχύει:

$$\text{Odds} = \frac{p}{1-p}$$

Στην επιδημιολογική έρευνα ο λόγος των σχετικών πιθανοτήτων της νόσου για τους εκτεθειμένους(ασθενείς) έναντι των μη εκτεθειμένων(μάρτυρες) στον παράγοντα κινδύνου είναι ο λόγος των Odds (Odds Ratio) ο οποίος ισούται με:

$$\text{Odds Ratio (OR)} = \frac{\frac{c}{1-c}}{\frac{m}{1-m}}$$

Όπου με c συμβολίζονται οι ασθενείς και με m συμβολίζονται οι μάρτυρες.

Στη συγκεκριμένη εργασία που είναι μελέτη ασθενών-μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε ως μέγεθος επίδρασης η αναλογία πιθανοτήτων (odds ratio-OR) για τα διακριτά δεδομένα. Το OR ορίζεται ως η πιθανότητα να συμβεί ένα γεγονός προς την πιθανότητα να μην

συμβεί. Είναι ένας εκτιμητής που εξετάζει αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ δυο μεταβλητών [28].

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

Πίνακας 2.1: Αριθμός ετερόζυγων και ομόζυγων ατόμων των ασθενών-μαρτύρων

Για τον υπολογισμό του OR συμπύσσουμε τα δεδομένα βασιζόμενοι σε ένα μοντέλο κληρονομικότητας:

GG έναντι GR+RR

RR έναντι GG+GR

GG έναντι RR

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

Πίνακας 2.2: Συμπυγμένος πίνακας απο την ένωση γονοτύπων

Στην περίπτωση αυτή το OR είναι:

$$OR = \frac{\varepsilon + \zeta}{\delta * (\beta + \gamma)}$$

και ελέγχει τη συσχέτιση του G αλληλόμορφου με την ασθένεια. Στην περίπτωση που το γονίδιο είναι RR έναντι GG+GR ο πίνακας θα έχει την εξής μορφή:

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

Πίνακας 2.3: Συμπτυγμένος πίνακας από την ένωση γονοτύπων

Ενώ το OR θα δίνεται από τον τύπο:

$$OR = \gamma * \left(\frac{\varepsilon + \delta}{\zeta * (\beta + \alpha)} \right)$$

και ελέγχει τη συσχέτιση του R αλληλόμορφου με την ασθένεια. Η τιμή που θα βρεθεί για το OR καθορίζει και την πιθανότητα να αποκτήσουν την ασθένεια τα άτομα που έχουν τον πολυμορφισμό σε σχέση με τα άτομα που δεν έχουν τον πολυμορφισμό. Αν το OR βρεθεί ίσο με τη μονάδα τότε υπάρχει πιθανότητα και οι δύο ομάδες να αποκτήσουν την ίδια νόσο. Αν βρεθεί μεγαλύτερος της μονάδας τότε συμπεραίνουμε ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου, ενώ αν προκύψει μικρότερος της μονάδας τότε πιθανότατα δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα εμφάνισης της ασθένειας. Βέβαια για την ακριβέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να υπολογιστεί το διάστημα εμπιστοσύνης(CI) και το

τυπικό σφάλμα(SE). Το διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval) είναι ένα διάστημα που βασίζεται σε παρατηρήσεις ενός δείγματος και είναι καθορισμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει μια συγκεκριμένη πιθανότητα ότι θα εμπεριέχει την άγνωστη πραγματική τιμή μιας παραμέτρου. Ο πιο συνηθισμένος βαθμός εμπιστοσύνης είναι να έχει 95% πιθανότητα να περιέχει την πραγματική τιμή (95%CI). Συνεπώς αν η μονάδα εμπεριέχεται σε αυτό το διάστημα τότε τα αποτελέσματά μας δεν είναι στατιστικώς σημαντικά. Οι τύποι που περιγράφουν τα δύο αυτά μεγέθη είναι:

$$SE_{\log OR} = \text{sqrt} \left(\frac{1}{\alpha+\beta} \right) + \frac{1}{\gamma} + \frac{1}{\delta+\varepsilon} + \left(\frac{1}{\zeta} \right) \text{ όπου } SE = \text{τυπικό σφάλμα (Standard Error)}$$

Όπου sqrt=τετραγωνική ρίζα

95%CI= $\log OR \pm 1,96 \times SE_{\log OR}$ όπου CI=διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval)

Ο παραπάνω ορισμός μας δείχνει την πιθανότητα η τυπική κανονική τυχαία μεταβλητή να βρίσκεται μεταξύ του 0 και του 1,96 συνεπώς υπάρχει 95% πιθανότητα να είναι μεταξύ των -1,96 και +1,96 αν λάβουμε και τις συμμετρικές αρνητικές τιμές [29].

Ο υπολογισμός του OR και του Standard Error γίνεται με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Stata 10. Αρχικά πρέπει να δημιουργήσουμε την μεταβλητή odp που αντιπροσωπεύει το odds ratio σε λογαριθμική κλίμακα. Η εντολή που χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό είναι η generate.

•generate odp= log((pa1*nopa2)/(pa2*nopa1))

Έπειτα προσθέτουμε τον αριθμό 0.5 για αντικατάσταση τυχόν μηδενικών τιμών αλληλόμορφων που μπορεί να προκύψουν. Αυτό γίνεται με την εντολή replace.

•replace odp=log(((0.5+pa1)*(0.5+nopa2))/((0.5+pa2)*(0.5+nopa1)))

if pa2== 0 | nopa1== 0 | pa1== 0 | nopa2== 0

Σε όλες τις εντολές η μεταβλητή *pa1* είναι ο αριθμός των ασθενών με γονότυπο GG, η μεταβλητή *pa2* είναι ο αριθμός των ασθενών με γονότυπο GR+RR, η μεταβλητή *nopa1* είναι ο αριθμός των υγιών ατόμων με γονότυπο GG και η μεταβλητή *nopa2* είναι ο αριθμός των υγιών με γονότυπο GR+RR.

Η εντολή `generate` δημιουργεί τη μεταβλητή `stdp` που αντιπροσωπεύει το standard error

```
generate stdp=sqrt(1/pa1+1/pa2+1/nopa1+1/nopa2)
```

Επίσης προσθέτουμε το 0.5 για τυχόν μηδενικές τιμές αλληλόμορφων που μπορούν να προκύψουν. Αυτό γίνεται με την εντολή `replace`.

•**replace**

```
stdp=log(1/(pa1+0.5)+1/(pa2+0.5)+1/(nopa1+0.5)+1/(nopa2+0.5))  
if pa2==0| nopa1==0| pa1==0| nopa2==0
```

Σε όλες τις εντολές η μεταβλητή *pa2* είναι ο αριθμός των ασθενών με γονότυπο GR+RR, η μεταβλητή *pa1* είναι ο αριθμός των ασθενών με γονότυπο GG, η μεταβλητή *nopa2* είναι ο αριθμός των υγιών ατόμων με γονότυπο GR+RR και η μεταβλητή *nopa1* είναι ο αριθμός των υγιών με γονότυπο GG [30].

2.5 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.

Μετά τον υπολογισμό του Odds Ratio και του τυπικού σφάλματος(SE) προχωράμε στην διαδικασία της μετά-ανάλυσης για το επικρατές γονίδιο (GG vs GR+RR) για την διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού G972 του γονιδίου IRS-1 με την στεφανιαία νόσο. Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιήθηκε με την παρακάτω εντολή:

```
metan odp stdp, random sortby(year)  
label(namevar=author,datevar=year) xlab(-2.0,0,2.0) eform
```

Όπου:

`random` : δηλώνει ότι θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.

`sortby(date)` : ταξινομεί τις μελέτες με βάση το χρόνο δημοσίευσης.

`Label(namevar=author,yearvar=date)` δηλώνει ότι στο διάγραμμα `forest plot` που προκύπτει, θα απεικονίζεται ο συγγραφέας και η χρονιά δημοσίευσης.

`Xlab(0.1,1,1.3)` ορίζει τις τιμές που απεικονίζονται στον άξονα x'x του `forest plot`.

`by(year)`: ομαδοποιεί τις μελέτες και πραγματοποιεί μεταanalύσεις ανάλογα με την χρονιά της δημοσίευσης [31].

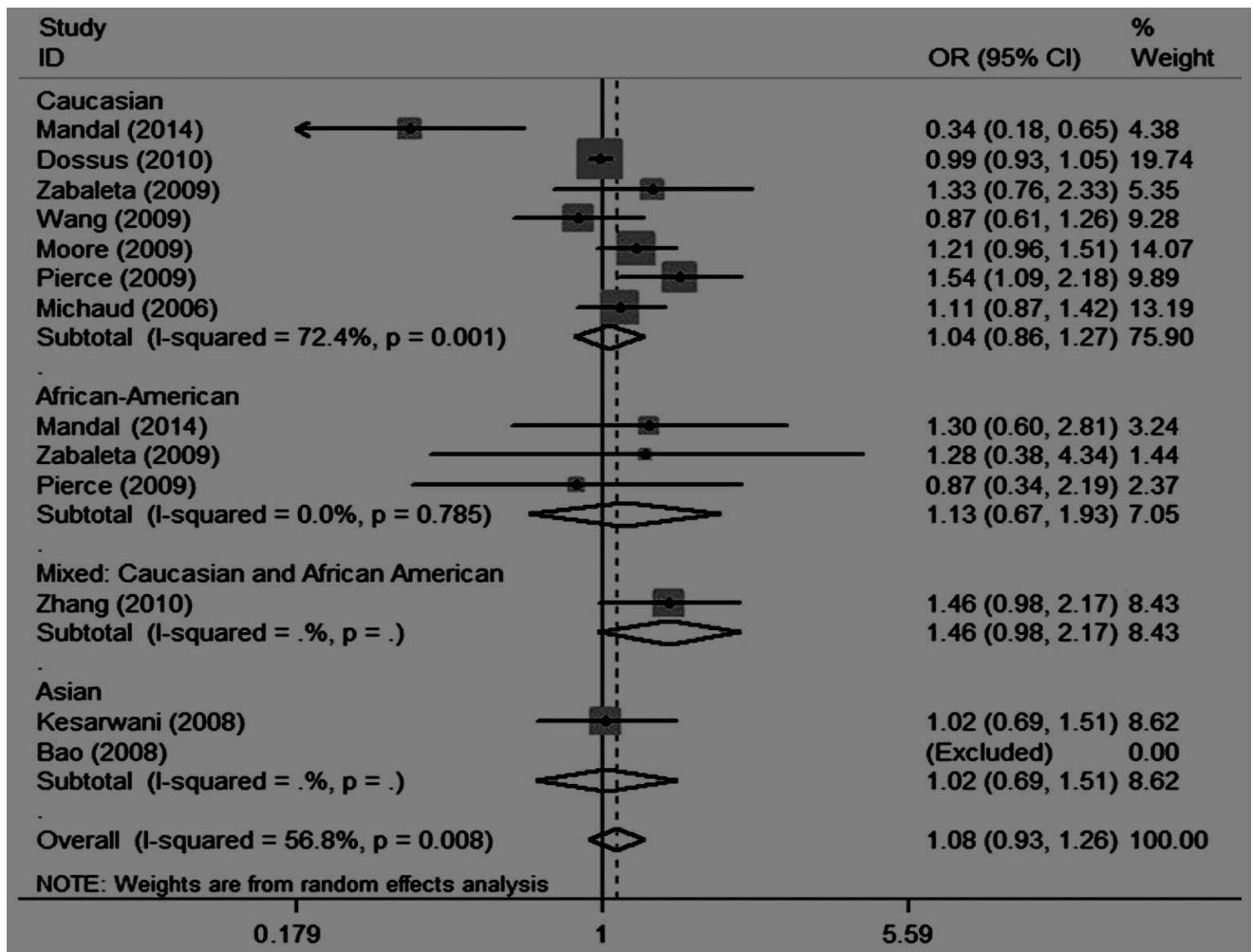
όπου `pa1`: ο αριθμός των ασθενών με το αλληλόμορφο G

`nopa1`: ο αριθμός των υγιών με το αλληλόμορφο G

`pa2`: ο αριθμός των ασθενών με το αλληλόμορφο R

`nopa2`: ο αριθμός των υγιών με το αλληλόμορφο R

Η παραπάνω εντολή μας δίνει τη γραφική απεικόνιση(`forest plot`) των μελετών με τις αντίστοιχες τιμές των OR και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης. Από το διάγραμμα αυτό μπορούμε να δούμε όλες τις μελέτες συγκεντρωτικά, αλλά και το μέγεθος επίδρασης(ES) της κάθε μελέτης με τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης(CI). Στο κέντρο εμφανίζεται διαγραμματικά το OR(95%CI) και στο κατώτατο άκρο του γραφήματος εμφανίζεται το συνολικό(overall) OR βάση του οποίου μπορούμε να συμπεράνουμε αν τελικά σχετίζεται ο πολυμορφισμός του γονιδίου με την νόσο που μελετάμε.



Εικόνα 2.3 : forest plot της εντολής metan. Στα αριστερά βλέπουμε το πλήθος των μελετών ταξινομημένες με βάση την φυλή-καταγωγή και την ημερομηνία δημοσίευσής τους. Στο κέντρο παρουσιάζονται γραφικά τα OR της κάθε μελέτης και στο τέλος το συνολικό OR. Δεξιά απεικονίζονται οι τιμές των OR και τα διαστήματα εμπιστοσύνης CI.

2.6 ΕΛΕΧΓΟΣ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ Hardy-Weinberg (HWE).

Η αρχή των Hardy-Weinberg γνωστή και ως ισορροπία Hardy-Weinberg ορίζει ότι τα αλληλόμορφα και οι γονοτυπικές συχνότητες σε έναν πληθυσμό θα παραμείνουν σταθερές από γενιά σε γενιά απουσία άλλων εξελικτικών επιρροών. Στις επιρροές αυτές περιλαμβάνονται: μεταλλάξεις, γενετικές παρεκκλίσεις, ροή γονιδίων, τυχαίο ζευγάρωμα. Επειδή όμως αυτές οι γενετικές επιρροές υπάρχουν στους πραγματικούς πληθυσμούς, η αρχή των Hardy-Weinberg περιγράφει μια ιδανική κατάσταση κατά την οποία μπορούν

να αναλυθούν τα αποτελέσματα αυτών των επιδράσεων. Στην απλή περίπτωση αυτοσωμικής κληρονομικότητας με δυο αλληλόμορφα που συμβολίζονται με A και a αντίστοιχα και συχνότητες $f(A)=p$ και $f(a)=q$, οι αναμενόμενες γονοτυπικές συχνότητες είναι $f(AA)=p^2$ για τους ομοζυγώτες AA, $f(aa)=q^2$ για τους ομοζυγώτες aa και $f(Aa)=2pq$ για τους ετερόζυγους. Οι γονοτυπικές αναλογίες p^2, q^2 και $2pq$ ονομάζονται αναλογίες Hardy-Weinberg. Το άθροισμα των γονοτυπικών συχνοτήτων είναι η διωνυμική έκφραση του τετραγώνου του αθροίσματος των p και q και πρέπει να είναι ίσο με τη μονάδα καθώς αντιπροσωπεύει το σύνολο των πιθανοτήτων.

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad \text{και} \quad p+q=1$$

Όπου p= η συχνότητα του επικρατούς αλληλόμορφου στον πληθυσμό και q= η συχνότητα του υπολειπόμενου αλληλόμορφου στον πληθυσμό. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι μητρικοί και πατρικοί γονότυποι και οι αντίστοιχες συχνότητες συζευκτικών τύπων.[21] Έστω ότι αναφερόμαστε σε έναν πληθυσμό με μέγεθος N ατόμων και μελετάμε έναν αυτοσωμικό γενετικό τόπο A, με αλληλόμορφα A και a [ο τόπος με τα αλληλόμορφα του συμβολίζεται για λόγους ευκολίας ως A (A, a)]. Οι πιθανοί γονότυποι στον πληθυσμό είναι AA, Aa και aa. Έστω ότι n_{AA} άτομα στον πληθυσμό έχουν γονότυπο AA, n_{Aa} άτομα έχουν γονότυπο Aa και n_{aa} άτομα έχουν γονότυπο aa. Προφανώς ισχύει: $n_{AA} + n_{Aa} + n_{aa} = N$. Η συχνότητα των ατόμων με γονότυπο AA θα συμβολίζεται D και θα είναι: $D = \frac{n_{AA}}{N}$. Η συχνότητα των ατόμων με γονότυπο Aa θα συμβολίζεται H και θα είναι $H = \frac{n_{Aa}}{N}$, ενώ η συχνότητα των ατόμων με γονότυπο aa θα συμβολίζεται R και θα είναι $R = \frac{n_{aa}}{N}$. Οι ποσότητες D, H και R είναι γονοτυπικές συχνότητες και ισχύει: $D+H+R=1$. Επειδή τα άτομα του πληθυσμού είναι διπλοειδή, το καθένα έχει δύο αντίγραφα από το κάθε αλληλόμορφο. Αν πούμε p τη συχνότητα του αλληλόμορφου A και q τη συχνότητα του αλληλόμορφου a, τότε θα ισχύει: $p = \frac{2n_{AA} + n_{Aa}}{2N}$ και $q = \frac{2n_{aa} + n_{Aa}}{2N}$. Αυτό ισχύει διότι το κάθε άτομο με γονότυπο AA έχει δύο αλληλόμορφα A, ενώ το κάθε ετερόζυγο άτομο έχει ένα αλληλόμορφο A. Το σύνολο των αλληλόμορφων στον πληθυσμό των N ατόμων, θα είναι 2N.

$$p = D + \frac{H}{2} \text{ και } q = R + \frac{H}{2}$$

Παρακάτω θα αποδείξουμε ότι όταν οι συζεύξεις σε έναν μεγάλο πληθυσμό είναι τυχαίες, οδηγούμαστε στις αναλογίες Hardy-Weinberg. Έστω ότι έχουμε έναν αυτοσωμικό τόπο A με αλληλόμορφα A_1 και A_2 . Κι έστω ότι οι γονοτυπικές συχνότητες είναι D για τον γονότυπο A_1A_1 , H για τον γονότυπο A_1A_2 και R για τον γονότυπο A_2A_2 . Όπως είναι γνωστό οι αλληλικές συχνότητες p και q για τα αλληλόμορφα A_1 και A_2 , αντίστοιχα, θα είναι $p = D + \frac{H}{2}$ και $q = R + \frac{H}{2}$. Έστω ακόμα ότι έχουμε έναν μεγάλο πληθυσμό, στον οποίο οι συζεύξεις είναι τυχαίες. Τότε θα έχουμε τις συζεύξεις με τις αντίστοιχες συχνότητες που φαίνονται στον πίνακα 2.4

Αρσενικό/Θηλυκό	$A_1A_1(D)$	$A_1A_2(H)$	$A_2A_2(R)$
$A_1A_1(D)$	D^2	DH	DR
$A_1A_2(H)$	DH	H^2	RH
$A_2A_2(R)$	DR	RH	R^2

Πίνακας 2.2 : Τυχαίες συζεύξεις μέσα στον πληθυσμό και οι συχνότητές τους.

Για να γίνει κατανοητό πώς βγαίνει η συχνότητα των ζυγωτών ας δούμε τα άτομα της διασταύρωσης $A_1A_1 \times A_1A_2$. Από τις διασταυρώσεις τύπου 2 στον πληθυσμό οι μισοί απόγονοι θα έχουν γονότυπο A_1A_1 και οι άλλοι μισοί θα έχουν γονότυπο A_1A_2 ενώ δεν θα παραχθούν άτομα με γονότυπο A_2A_2 . Επομένως, με βάση αυτά τα δεδομένα στην επόμενη γενιά η γονοτυπική συχνότητα των ατόμων A_1A_1 συμβολίζεται D' και υπολογίζεται από όλες τις διασταυρώσεις που δίνουν άτομα A_1A_1 με την αντίστοιχη συχνότητα. Δηλαδή: $D' = D^2 \times 1 + 2DH \times \frac{1}{2} + H^2 \times \frac{1}{4} = (D + \frac{H}{2})^2 = p^2$.

Με παρόμοιο τρόπο:

$$H' = (2DH) \times \frac{1}{2} + 2DR \times 1 + 2(RH) \times \frac{1}{2} + (H^2) \times \frac{1}{2} \Rightarrow$$

$$H' = 2DR + DH + RH + \frac{H^2}{2} \Rightarrow$$

$$H' = 2\left(D + \frac{H}{2}\right) \left(R + \frac{H}{2}\right) = 2pq$$

Ομοίως: $R' = q^2$

Αν ανακεφαλαιώσουμε, βρίσκουμε ότι οι γονοτυπικές συχνότητες είναι:

$$D' = p^2, H' = 2pq, R' = q^2$$

Οι συχνότητες αυτές θα ισχύουν μετά από μια και μόνο γενιά τυχαίων συζεύξεων, ανεξάρτητα αν πριν από αυτή τη γενιά οι συζεύξεις δεν ήταν τυχαίες. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε πως ανεξάρτητα από τις αρχικές γονοτυπικές συχνότητες, αρκεί μια γενιά τυχαίων συζεύξεων, για να πάρουμε τις συχνότητες της ισορροπίας Hardy-Weinberg.

Table 46.1. Types of random mating combinations and their relative frequencies in a population containing p^2 AA, $2pq$ Aa and q^2 aa genotypes.

		Males			Genotypes and frequencies		Types of matings	Frequencies
		AA (p^2)	Aa ($2pq$)	aa (q^2)	AA (p^2)	Aa ($2pq$)		
Females	AA (p^2)	AA p^4	$\frac{1}{2} AA + \frac{1}{2} Aa$ $2p^3q$	Aa p^2q^2	(1) AA×AA (2) AA×Aa×2* (3) AA×aa×2* (4) Aa×Aa (5) Aa×aa×2* (6) aa×aa	$= p^4$ $= 4p^3q$ $= 2p^2q^2$ $= 4p^2q^2$ $= 4pq^3$ $= q^4$		
	Aa ($2pq$)	$\frac{1}{2} AA + \frac{1}{2} Aa$ $2p^3q$	$\frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Aa + \frac{1}{4} aa$ $4p^2q^2$	$\frac{1}{2} Aa + \frac{1}{2} aa$ $2pq^3$				
	aa (q^2)	Aa p^2q^2	$\frac{1}{2} Aa + \frac{1}{2} aa$ $2pq^3$	aa q^4			Total	1.00

*These matings can occur in two ways e.g. ♀AA×♂Aa and ♀Aa×♂AA.

Εικόνα 2.4 Τύποι τυχαίου ζευγαρώματος και συχνότητες γονοτύπων στον πληθυσμό. Το ζευγάρι(*) μπορεί να επιτευχθεί με 2 τρόπους. ♀AA×♂Aa και ♀Aa×♂AA.

Ο έλεγχος για την ισορροπία HWE γίνεται με την βοήθεια της εντολής `genwhi` στο στατιστικό πακέτο STATA και συντάσσεται ως εξής:

- `genwhi gg0 ga0 aa0`

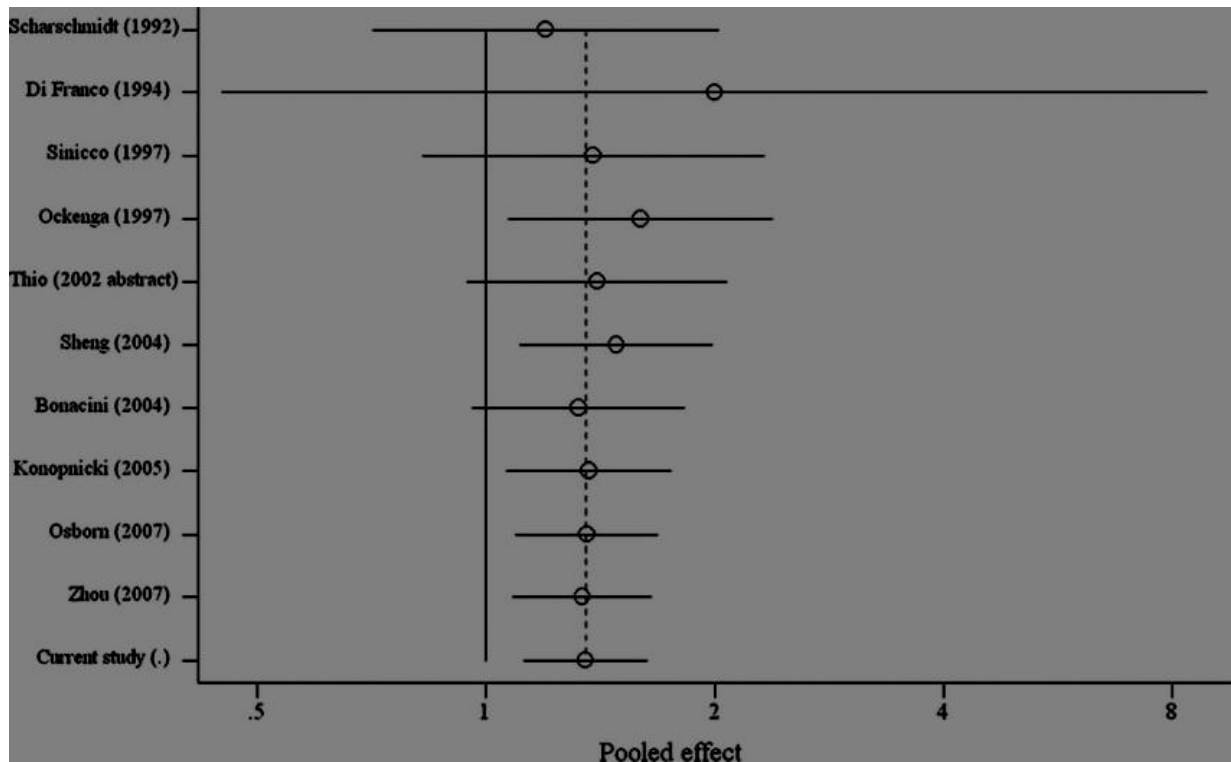
Όπου `gg0` `ga0` και `aa0` αντιπροσωπεύουν τους γονοτύπους των υγιών ατόμων που πήραν μέρος στη μελέτη.

2.7 ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Το 1992, μια ομάδα με επικεφαλής των Tom Chalmers και Fred Mosteller εισήγαγε τον όρο «σωρευτική μετά-ανάλυση» για να περιγράψει μια στατιστική διαδικασία για τον υπολογισμό συνοπτικών εκτιμήσεων με βάση τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών, κάθε φορά που τα αποτελέσματα των περαιτέρω δοκιμών γίνονται διαθέσιμα [32]. Καθώς η πληρότητα των στοιχείων είναι ιδιαίτερα επιθυμητή, υπάρχει ανάγκη να προσδιοριστεί ποσοτικά όσο το δυνατόν ακριβέστερα πόσο πολύ η πληροφορία που λείπει ενδέχεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα μιας μετά-ανάλυσης. Τα συγκριτικά οφέλη και τα μειονεκτήματα των ενημερωμένων πληροφοριών είναι από τα πιο αμφιλεγόμενα θέματα και πρέπει να μελετηθεί συστηματικά. Νέα δεδομένα περιλαμβάνονται στους συγκεντρωτικούς υπολογισμούς με τη σειρά με την οποία έχουν παραχθεί, ενώ πιο λεπτομερή, διορθωμένα ή ενημερωμένα δεδομένα αντικαθιστούν τους λιγότερο λεπτομερείς και ανακριβείς συγκεντρωτικούς υπολογισμούς. Η εντολή η οποία χρησιμοποιήθηκε στο στατιστικό πακέτο STATA10 για την αθροιστική μετά-ανάλυση είναι η εξής:

- `metacum odg stdg, eff(r)gr xlab(0.5,1,2.0) id(author) eform`

Όπου `odg` το odds ratio, `stdg` το σφάλμα της δημοσίευσης, `eff(r)gr` η παράμετρος, η οποία καθορίζει το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων και `id(auth)` η παράμετρος η οποία ταξινομεί την κάθε μελέτη σύμφωνα με τον συγγραφέα της στο διάγραμμα.



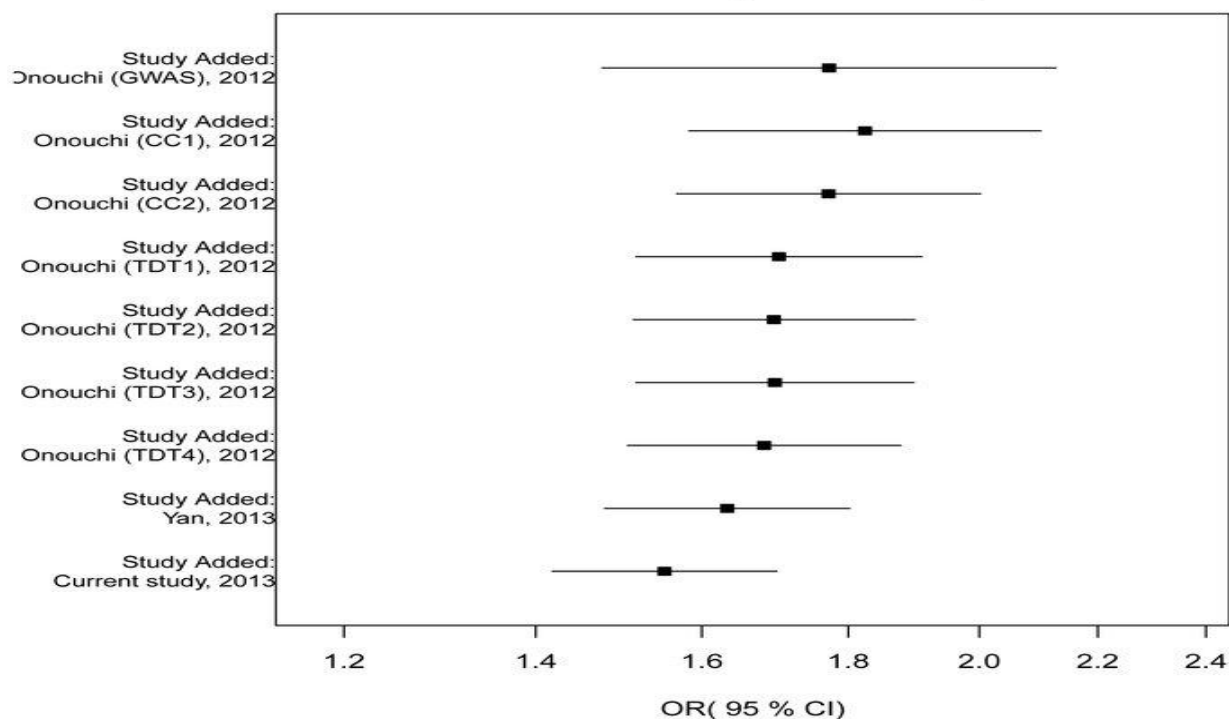
Εικόνα 2.5: Το funnel plot που παράγεται από την εντολή *metacum*. Αθροιστική μετά-ανάλυση για την επίδραση της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β στη συνολική θνησιμότητα μεταξύ των ασθενών θετικών στον ιό της ανθρώπινης ανοσο ανεπάρκειας. Οι συγκεντρωτικές διαδοχικές τυχαίες επιδράσεις υποδεικνύονται με κύκλο και οι οριζόντιες γραμμές απεικονίζουν τα διαστήματα εμπιστοσύνης.

Στην αθροιστική μετά-ανάλυση είναι συνηθισμένο φαινόμενο να αφαιρείται η πρώτη μελέτη, αν φέρει πολύ σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα. Αυτό είναι και το πρόβλημα που δημιουργεί η εντολή *metacum*, διότι στο συνολικό μέγεθος της επίδρασης συνυπολογίζει και τα αποτελέσματα της πρώτης μελέτης. Η εντολή που αφαιρεί την πρώτη μελέτη είναι η εξής:

- `metatrend odp stdp`

Όπου *odT* το Odds ratio και *stdT* το σφάλμα της δημοσίευσης

Cumulative Meta-Analysis: Inverse Variance (Fixed-Effects) ORs



Εικόνα 2.6: Σχεδιάγραμμα συσσωρευτικής μετά-ανάλυσης για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού 8p 22-23 rs2254546 με την ασθένεια Kawasaki[33]. Μία μετά-ανάλυση όπου οι μελέτες τοποθετούνται μια-μια τη φορά σε συγκεκριμένη σειρά (π.χ σύμφωνα με την ημερομηνία της δημοσίευσης) και τα αποτελέσματα συνοψίζονται κάθε φορά που μια καινούρια μελέτη προστίθεται[34]

2.8 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Κατά την διεξαγωγή μιας μετά-ανάλυσης λαμβάνονται υπόψιν και προβλήματα που πιθανότατα υπάρχουν στη βιβλιογραφία, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένες εκτιμήσεις και συμπεράσματα. Είναι ένα μείζον πρόβλημα που συναντάται συχνά σε μια συστηματική ανασκόπηση και είναι γνωστό ως «σφάλμα δημοσίευσης» publication bias [35, 36]. Τα προβλήματα αυτά είναι:

- Η ξενόγλωσση βιβλιογραφία
- Η γκρίζα βιβλιογραφία
- Το φαινόμενο του Πρωτέα

2.8.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Οι περισσότερες μελέτες που διεξάγονται στις Αγγλόφωνες χώρες δημοσιεύονται σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και είναι διαθέσιμες διεθνείς βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων. Υπάρχουν όμως και αρκετές μελέτες που διεξάγονται σε μη-Αγγλόφωνες χώρες όπως η Κίνα και εκδίδονται μόνο σε τοπικά περιοδικά και εγχώριες βάσεις δεδομένων, υποβαθμίζοντας έτσι τη σπουδαιότητα των αποτελεσμάτων της έρευνας. Η Κίνα αποτελεί το ένα πέμπτο του παγκόσμιου πληθυσμού και οι μελέτες σε αυτούς αφορούν ένα τεράστιο κομμάτι του παγκόσμιου πληθυσμού. Συνεπώς οι αδημοσίευτες μελέτες σε όλα τα πεδία της έρευνας αποτελούν τροχοπέδη στην εξέλιξη και στην σωστή διεκπεραίωσή της. Αυτό το είδος σφάλματος στη δημοσίευση είναι γνωστό ως «Πύργος της Βαβέλ».

2.8.2 ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Πολλές από τις μελέτες που διεξάγονται δεν καταλήγουν να δημοσιευτούν διότι δεν έχουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Στις μελέτες αυτές δεν μπορούμε να έχουμε πρόσβαση είτε μέσω των βιβλιογραφικών βάσεων δεδομένων είτε μέσω αναζήτησης σε επιστημονικά περιοδικά [37-39]. Η γκρίζα βιβλιογραφία αφορά ερευνητικό υλικό, δημοσιευμένο ή μη, το οποίο δε διανέμεται εμπορικά. Μερικά παραδείγματα είναι:

- Μεταπτυχιακές εργασίες
- Διδακτορικές διατριβές
- Παραδοτέα χρηματοδοτούμενων έργων
- Τεχνικές αναφορές
- Πρακτικά/Παρουσιάσεις συνεδρίων και άλλων επιστημονικών εκδηλώσεων
- Έρευνες
- Στατιστικά στοιχεία
- Κυβερνητικά έγγραφα

Ο εντοπισμός της γκρίζας βιβλιογραφίας είναι πιο δύσκολος και πολλές φορές αποτελεί την καλύτερη πηγή πληροφόρησης σχετικά με τις τρέχουσες εξελίξεις σε κάποιους τομείς. Ένα σημαντικό κοινό χαρακτηριστικό στα είδη γκρίζας βιβλιογραφίας είναι ότι συχνά περιέχουν πληροφορίες που είναι μοναδικές και σημαντικές, οι οποίες δεν έχουν δημοσιευτεί με τους συμβατικούς τρόπους [40].

2.8.3 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΟΥ ΠΡΩΤΕΑ.

Ένα επιπλέον σφάλμα που επιδρά στην εμφάνιση ακραίων αντιφατικών ευρημάτων από πολύ νωρίς κατά τη διάρκεια συσσώρευσης επιστημονικών αποτελεσμάτων, είναι το λεγόμενο «Φαινόμενο του Πρωτέα». Αυτό το φαινόμενο μπορεί να εμφανιστεί όταν ένα πλήθος πιθανών αναλύσεων είναι διαθέσιμα και πολλά δεδομένα μπορούν να δημιουργηθούν και να διαδοθούν σε περιορισμένο χρόνο. Σε διάφορους ερευνητικούς κλάδους πολλές ομάδες επιστημόνων στοχεύουν σχεδόν ταυτόχρονα σε παρόμοια προβλήματα. Οι σύγχρονες τεχνολογίες έχουν μειώσει δραστικά τον χρόνο που απαιτείται για την δημιουργία πειραματικών δεδομένων και έχουν αναστρέψει τη χρονική σχέση μεταξύ της παραγωγής δεδομένων και της ανάλυσης δεδομένων. Αυτή η πρόοδος παρέχει εντυπωσιακές ευκαιρίες για την ταχεία παραγωγή και διάδοση επιστημονικών πληροφοριών, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των μελετών εκθέτοντας αντιφατικά αποτελέσματα σε σύντομο χρόνο [41]. Αυτή η ταχεία διαδοχή ακραίων ευρημάτων ονομάστηκε «φαινόμενο του Πρωτέα» από τον θεό Πρωτέα της ελληνικής μυθολογίας, ο οποίος είχε την ικανότητα να αλλάζει μορφές πολύ γρήγορα [42]. Αυτό το σφάλμα τονίζει τη σημασία της εκτέλεσης επιπλέον έρευνας και εκτίμησης των εξελισσόμενων στοιχείων που συσσωρεύονται σε κάθε έρευνα. Το φαινόμενο του Πρωτέα μπορεί να είναι αρκετά περιορισμένο σε έρευνες που δεν έχουν ολοκληρωθεί πολύ γρήγορα και σε έρευνες λιγότερο διερευνητικές.

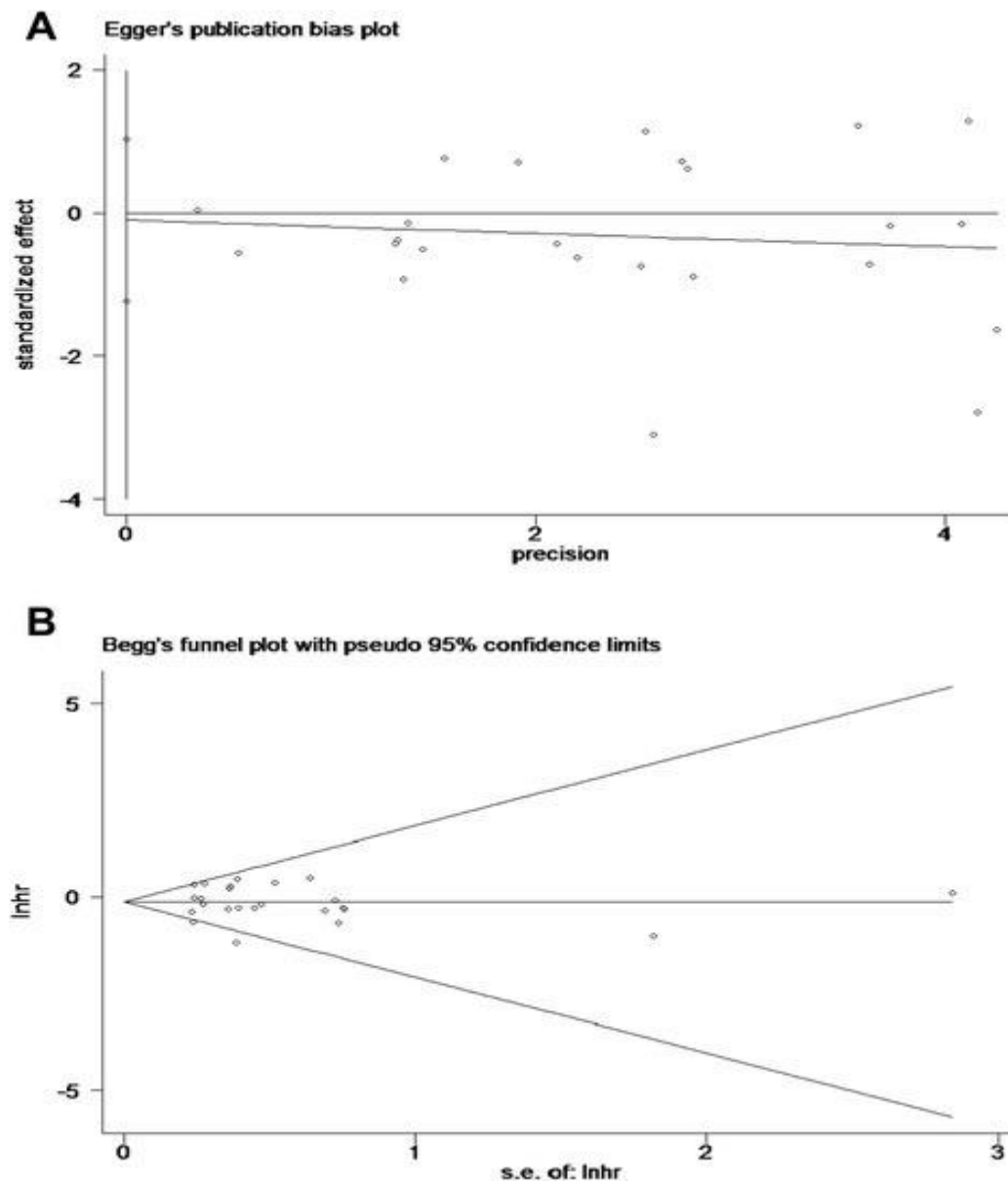
Ο συστηματικός έλεγχος σφάλματος έγινε με την εντολή:

• **metabias** με παράμετρο **gr(b)** για τον έλεγχο **Begg** και παράμετρο **gr(e)** για τον έλεγχο του **Egger**.

Οι εντολές συντάσσονται ως εξής:

- **metabias odp stdp, gr(b)**
- **metabias odp stdp, gr(e)**

Όπου **odX** το Odds ratio, **stdX** το σφάλμα της δημοσίευσης.



Εικόνα 2.7 Το Begg's funnel plot που παράγεται από την εντολή **metabias odT stdT, gr(b)**. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται το **log(odds ratio)** ενώ στον οριζόντιο το **standard error**. Egger's funnel plot που παράγεται από την εντολή **metabias odT stdT, gr(e)**.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΡΘΡΩΝ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ PubMed.

Για την διεξαγωγή της μελέτης μας υλοποιήθηκαν δύο αναζητήσεις στη βάση δεδομένων της PubMed. Για την ακρίβεια χρησιμοποιήσαμε 2 queries για τον εντοπισμό των άρθρων που αφορούσαν στον πολυμορφισμό G972 στο γονίδιο IRS-1. Στην αναζήτηση με το πρώτο query το οποίο είναι το εξής :

(IRS1 OR "insulin receptor substrate-1" OR 972Arg) and (CAD OR CHD OR "coronary artery disease" OR "coronary heart disease" OR stroke OR "myocardial infarction") and (variant OR SNP or mutation or polymorphism)

βρέθηκαν συνολικά 26 άρθρα, ενώ κατά την διεξαγωγή της άλλης αναζήτησης με το δεύτερο query το οποίο είναι το εξής:

(IRS1 OR IRS-1 OR "insulin receptor substrate-1" OR G972 OR 972Arg) and (CAD OR CHD OR "coronary artery disease" OR "coronary heart disease" OR stroke OR "myocardial infarction") and (variant OR SNP or mutation or polymorphism)

βρέθηκαν συνολικά 29 άρθρα.

Ωστόσο από το σύνολο των άρθρων αυτών, στην μετά-ανάλυση για τον πολυμορφισμό G972 στο γονίδιο IRS-1 χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 8, καθώς και 1 επιπλέον το είχε εντοπιστεί με την αρχική αναζήτηση στην PubMed. Επομένως το σύνολο των μελετών που συγκεντρώθηκαν για την εργασία μας είναι 9. Οι υπόλοιπες μελέτες απορρίφθηκαν διότι:

- είτε η έρευνα αναφέρονταν σε ποντίκια
- είτε διότι δεν εξέταζαν τη στεφανιαία νόσο
- είτε διότι αναφέρονταν σε γονίδιο διαφορετικό ή σε άλλο πολυμορφισμό
- είτε διότι δεν περιείχαν καθόλου δεδομένα για γονοτύπους-αριθμούς ασθενών-μαρτύρων ή τα δεδομένα ήταν ελλιπή.

Οι μελέτες που τελικά επιλέχθηκαν για την μελέτη παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1) όπως επίσης και ο κωδικός αριθμός (PMID) με τον οποίο είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων, τον συγγραφέα, την χώρα προέλευσης, το έτος δημοσίευσης, την καταγωγή των πληθυσμιακών δειγμάτων και την ασθένεια που μελετάμε.

Author	Country	Year	Race	Disease	Cases_GG	Cases_GR+RR	Controls_GG	Controls_GR+RR
Zhang D	China	2016	Chinese	CAD	647	27	348	28
Baroni MG	Italy	1999	Caucasian	CAD	257	60	191	14
Liu R	China	2015	Chinese	CAD	108	5	111	2
Ossei-Gerning N	Leeds UK	2016	Caucasian	CAD	292	39	63	58
Strohmer B	Austria	2004	Austrian	CAD	191	24	196	25
Tsai CT	Taiwan	2002	Asian	CAD	300	0	195	0
Liu W	China	2012	Asian	MI	257	94	269	91
Ranjith N	Asian Indian	2008	Asian Indian	MI	439	28	1148	39
CHENG HUANG	China	2015	Han Chinese	CAD	67	39	572	154

Πίνακας 3.1: Οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της μετά ανάλυσης, για τον πολυμορφισμό G972R (rs1801278).

Οι μελέτες με τους γονότυπους και τον αριθμό ασθενών-μαρτύρων που εξέταζαν την ασθένεια αλλά σε διαφορετικό πολυμορφισμό (rs2943641) στο γονίδιο IRS-1, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 3.2)

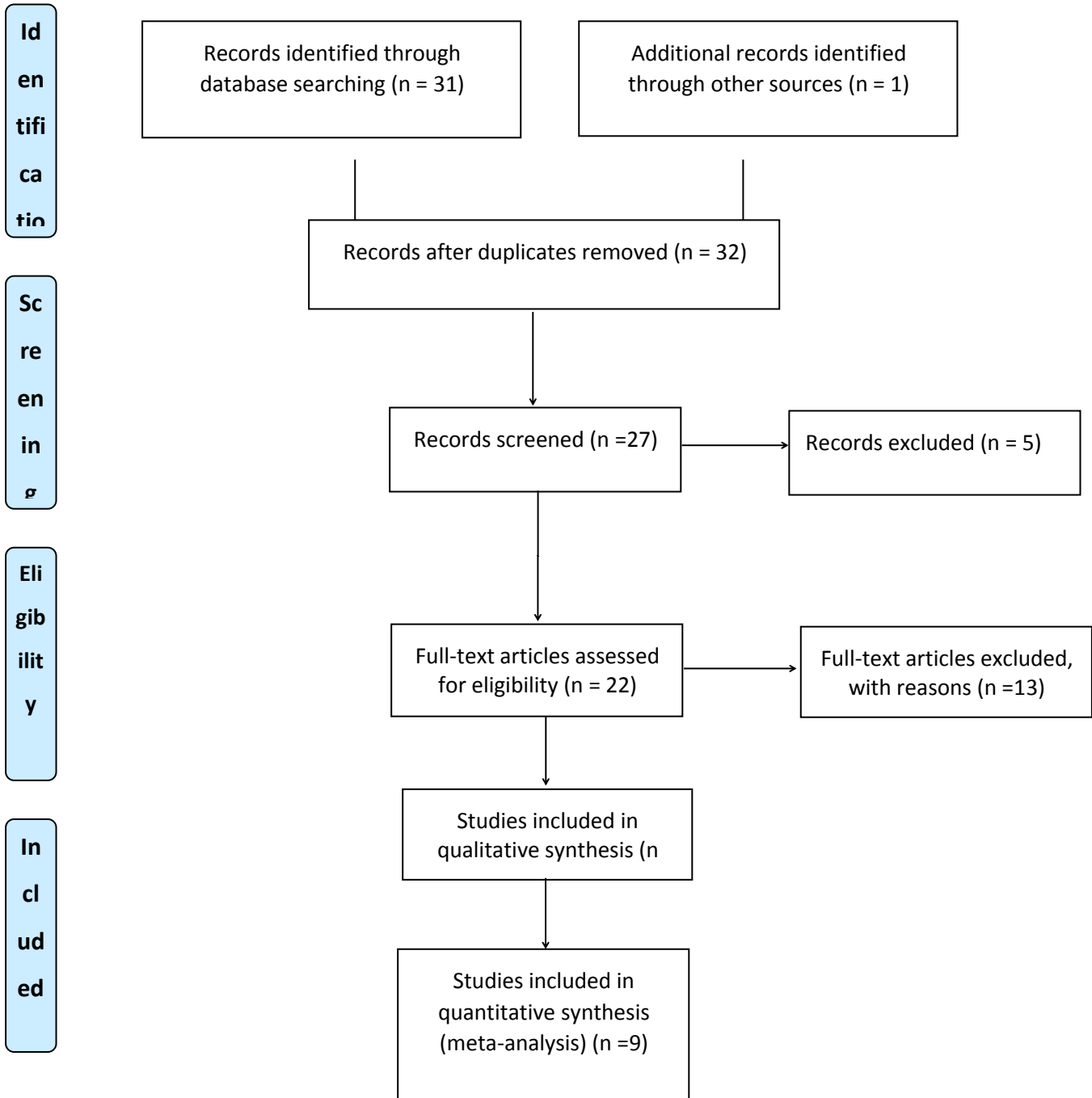
PubMedID	Author	Country	Year	Race	Disease					Polymorphism
						GG	GR+RR	GG	GR+RR	
21353221	Sharma R	Italy	2011	European /US	CAD	188	243	202	239	SNP rs2943641
21353221	Sharma R	Italy	2011	European /US	CAD	132	210	162	248	SNP rs2943641
21353221	Sharma R	Italy	2011	European /US	CAD	67	83	123	140	SNP rs2943641

Πίνακας 3.2: Πίνακας με μελέτες για τον πολυμορφισμό rs2943641 στο γονίδιο IRS-1. Οι μελέτες που δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη λόγω έλλειψης δεδομένων ή επειδή αναφέρονταν σε άσχετα γονίδια και ασθένειες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

PMID	Author	Country	Year	Race	Disease
27033451	Talukder MA	Maine, US	2016	mice	
25463099	Menzaghi C,	Italy	2014	European	MI
12843189	Marini MA1,	Italy	2003	Caucasian	T2DM
10669621	Delafontaine P.	Switzerland	1999		
22797928	Yoshiuchi I	Japan	2014	Eur/Nig/Ch/Jap	
26587547	Khodaeian M	Iran	2017	Iranian	T2DM
22994406	Haghani	Iran	2018	Iranian	T2DM
26334876	Binh TQ	Vietnam	2019	Asian	T2DM
24589556	Wang W	China	2010		
23395167	Singh R	USA	2013		
21706003	Tuomas O Kilpeläinen		2011		
23216712	Chan SH	Taiwan	2012		
20112301	Qin B	USA	2010		
18506362	Hägg DA	Sweden	2008		
18436806		Italy	2008		
16225464	Federici M	Italy	2005		
15636429	Baroni MG	Italy	2004	Caucasian	Ins/Sens
24135527	Chou SH	Boston, USA	2021		Isch/Str
23659870	Soo Lima	Boston	2013		IMT
12588284	Hözl B	Austria	2003	Caucasian	IMT

Πίνακας 3.3: Πίνακας με τις μελέτες που δεν συμπεριλήφθηκαν στην μετά ανάλυση λόγω ελλιπών στοιχείων και μελέτης σε γονίδια και ασθένειες που δεν σχετίζονται με την δική μας έρευνα.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα διάγραμμα (flow diagram) που δείχνει τη ροή των πληροφοριών μέσα από τις διαφορετικές φάσεις μιας συστηματικής έρευνας. Απεικονίζει τον αριθμό των μελετών που προσδιορίστηκαν αρχικά, που συμπεριλήφθηκαν και αποκλείστηκαν καθώς επίσης και τους λόγους αποκλεισμού [43].



3.2. ΥΠΑΡΞΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ.

Όπως ήδη έγινε γνωστό το βασικό αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο πολυμορφισμός G972(rs1801278) του γονιδίου IRS-1 και η συσχέτισή του με τη στεφανιαία νόσο.

Κατά την διάρκεια της μελέτης του γονιδίου IRS-1 προέκυψαν και άλλοι πολυμορφισμοί που παρουσίασαν συσχέτιση με τη στεφανιαία νόσο. Οι περιβαλλοντικές και γενετικές διαταραχές στον μεταβολισμό των λιπιδίων είναι αναπόφευκτοι παράγοντες παθογένειας του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επιπλέον λιποπρωτεΐνες υψηλού επιπέδου όπως η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) ή χοληστερόλη, το γλυκοζυλιωμένο επίπεδο παραοξανάσης (Paraoxanase 1/163T/A) διαδραματίζει επίσης βασικό ρόλο σε αυτήν την παθογένεση. Οι γενετικά ελεγχόμενοι παράγοντες του μεταβολισμού και της μεταβλητότητας των λιποπρωτεϊνών αναφέρεται ως επί το πλείστον στους διαβητικούς ασθενείς. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παθογένεση καρδιοεργηριακών παθήσεων εξαρτάται από το γονίδιο της παραοξανάσης που κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 7. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του γονιδίου με την ασθένεια [44]. Η παραοξανάση είναι ένα ένζυμο που σχετίζεται με την HDL χοληστερόλη και εμπλέκεται στις παθογένειες της αρτηριοσκλήρυνσης με την προστασία των λιποπρωτεϊνών από την υπεροξειδωση. Ο πολυμορφισμός (Q192R) έχει συσχετιστεί με τη νόσο της στεφανιαίας αρτηρίας και για αυτό μελετήθηκε ο ρόλος του για τις καρδιαγγειακές ασθένειες σε διαβητικούς ασθενείς. Συμπερασματικά ο η επικράτηση του αλληλόμορφου RR στους διαβητικούς ασθενείς έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση και με το αθηροσκληρωτικό πρόβλημα. (L55M Paraoxanase 1/575G>AQ 192R) [45]. Ένα άλλο αξιοσημείωτο πεδίο έρευνας είναι η σχέση μεταξύ των γενετικών παραλλαγών στο γονίδιο ADIPOQ και του κινδύνου που μπορεί να επιφέρει στο καρδιαγγειακό σύστημα. Εκτός από τη ρύθμιση της αθηρογένεσης μέσω των ενεργειών ευαισθητοποίησης της ινσουλίνης, η αδιπονεκτίνη έχει άμεσες αντι-αθηρογόνες επιδράσεις στο αρτηριακό τοίχωμα αναστέλλοντας την προσκόλληση μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, προκαλώντας τον ομαλό πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων. Άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο T στο g+976 διατρέχουν περίπου κατά το ήμισυ καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σχέση με τους φορείς του G αλληλόμορφου. (Adiponectin/+45T/G και Adiponectin/+276G/T) [46]. Ισχυρή

αλληλεπίδραση μεταξύ του αλληλόμορφου T της συνθετάσης ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου με το αλληλόμορφο B1 της πρωτεΐνης μεταφοράς χοληστερυλεστέρα TaqIB αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. (Enos/G894T CETP/B1) [47]. Έχουν υπάρξει μελέτες που διερεύνησαν τη σχέση του πολυμορφισμού AT1R/A1166C και της παρουσίας διαβήτη και μεταβολικού συνδρόμου. Οι συμμετέχοντες στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν ασθενείς με τεκμηριωμένη καρδιαγγειακή νόσο, στους οποίους η συνύπαρξη διαβήτη θα μπορούσε να προδιαθέσει σοβαρή στεφανιαία νόσο και σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ERSD). Τα ευρήματα υπέδειξαν ότι το αλληλόμορφο 1166C μπορεί να συσχετιστεί με την παρουσία διαβήτη σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο και να αποτελέσει και παράγοντα πρόγνωσης για την ανάπτυξη διαβήτη σε αυτούς τους ασθενείς[48]. Ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι παίζει ρόλο στην παθογένεση στένωσης της στεφανιαίας αρτηρίας (CAS) είναι η μεταλλοπρωτεΐνωση 3 του

Γονιδίου MMP3 (MMP-3/-1612 5A/6A)[49]. Επιπλέον βρέθηκε μια αρκετά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού AChE και της καρδιακής νόσου CAD, σε τέτοιο βαθμό όπου το A αλληλόμορφο του AChE ήταν σημαντικά πιο συχνότερο στους ασθενείς παρά στους υγιείς. Ο πολυμορφισμός rs2571598 του AChE που μελετάται εδώ βρίσκεται στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου [50]. Τέλος έχει προταθεί ότι υπάρχει σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού της απολιποπρωτεΐνης E και της σοβαρότητας της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (T2DM). Το κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι οι ασθενείς με T2DM που φέρουν αλληλόμορφα APOE-ε2 και ε4 έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης CAD από τους ασθενείς που δεν ήταν διαβητικοί στον δυτικό πληθυσμό του Ιράν και με το APOE-ε4 να συνδέεται στενότερα με το CAD από ότι το αλληλόμορφο APOE-ε2. (Apolipoprotein/E2,E3,E4) [51].

Κατά την διεξαγωγή της μελέτης μας όμως εντοπίστηκαν και διαφορετικοί πολυμορφισμοί στο ίδιο ή σε διαφορετικά γονίδια που μπορεί να σχετίζονται με την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου. Έτσι βρέθηκαν το SNP(rs2943641) να εμφανίζει συσχέτιση με την ασθένεια και υψηλό ρίσκο εμφάνισής της [52].Ο πολυμορφισμός Gly1057Asp στο γονίδιο IRS-2 ο οποίος σε συνδυασμό με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τον σακχαρώδη διαβήτη έδειξε να συνεισφέρει στην παθογένεια της νόσου [53]. Επίσης έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs12936584 των γονιδίων KRTAP2-1, KRTAP2-2

και τον rs46522 του γονιδίου UBE2Z, όπως επίσης και ο πολυμορφισμός rs2389207, που έδειξε να σχετίζεται με το έμφραγμα του μυοκαρδίου(MI).

3.3 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΟΣ STATA10.

Η σύμπτυξη των γονοτύπων έγινε με βάση το γονίδιο που προκαλεί την ασθένεια. Στην περίπτωση μας το αλληλόμορφο που την προκαλεί είναι το R ενώ το αλληλόμορφο G είναι το φυσιολογικό. Οι δυνατοί γονότυποι από τον συνδυασμό αυτών των δύο είναι τρεις (GG,GR,RR) και οι δυνατοί φαινότυποι είναι δύο(G,R). Ο φαινότυπος G εκφράζεται σε περιπτώσεις για γονότυπο GG και για γονότυπο GR αφού το G είναι το επικρατές. Αντίθετα ο φαινότυπος R εκφράζεται μόνο όταν έχουμε γονότυπο RR, αφού το R είναι το υπολειπόμενο. Επειδή όμως στις μελέτες μας οι ασθενείς με γονότυπο RR είναι λίγοι του προσθέσαμε με αυτούς που έχουν γονότυπο GR για να γίνει η σύγκριση. Στη μελέτη του Zhang D που μελετούσε ασθενείς από έναν πληθυσμό (Chinese) δεν χρησιμοποιούσε στη μελέτη υγιή δείγματα πληθυσμού. Γι' αυτό το λόγο ψάξαμε και βρήκαμε υγιείς(control group) από μελέτη σε πληθυσμό που βρίσκεται σε κοντινή γεωγραφική περιοχή (Han Chinese), με βάση τη μελέτη του Fengyuan Che με τίτλο «Assosiation of insulin receptor H1085H C>T insulin receptor substrate 1 G972R and insulin receptor substrate 2 1057 G/A polymorphisms with refractory temporal lobe epilepsy in Han Chinese» και PMID: 25458098. Στην μελέτη του Ranjith N που μελετούσε ασθενείς με καταγωγή (Indians) επίσης δεν υπήρχε πληθυσμός υγιών ατόμων, γι' αυτό επιλέξαμε υγιή άτομα από κοντινή γεωγραφική περιοχή που εντοπίσαμε στη μελέτη του Dhanasekaran Bodhini με τίτλο « Association study of IRS-1 Gene Polymorphisms with type 2 Diabetes in South Indians και PMID: 21612394.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.4) φαίνονται οι μελέτες και οι συγκρίσεις των αλληλόμορφων, οι γονότυποι και οι αριθμοί που εισήχθησαν στο στατιστικό πακέτο STATA10 για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων.

PubMedID	Author	Country	Year	Race	Disease				
						Cases_GG	Cases_GR+RR	Controls_GG	Controls_GR+RR
27005817	Zhang D	China	2016	Chinese	CAD	647	27	348	28
10591678	Baroni MG	Italy	1999	Caucasian	CAD	257	60	191	14
12910680	Liu R	China	2015	Chinese	CAD	108	5	111	2
9218152	Ossei-Gerning N	Leeds UK	2016	Caucasian	CAD	292	39	63	58
14687252	Strohmer B	Austria	2004	Austrian	CAD	191	24	196	25
11788483	Tsai CT	Taiwan	2002	Asian	CAD	300	0	195	0
24134599	Liu W	China	2013	Asian	MI	257	94	269	91
18710329	Ranjith N	Asian Indian	2008	Asian Indian	MI	439	28	1148	39
DOI	CHENG HUANG	China	2015	Han Chinese	CAD	67	39	572	154

Πίνακας 3.4: Συνοπτική παράθεση των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν για την μετά-ανάλυση, με τους γονότυπους των ασθενών (cases) και των υγιών (controls). Όπου MI(myocardial infraction).

Στο παράθυρο (data editor) του STATA εισάγουμε τα δεδομένα που έχουμε συλλέξει και με την εκτέλεση της εντολής **generate odp** αυτομάτως εμφανίζεται το odds ratio και με την εκτέλεση της εντολής **replace odp** γίνεται ταυτόχρονη διόρθωσή του σε κάθε μελέτη. Έπειτα με την εντολή **generate stdp** πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του **standard error** και η παράλληλη διόρθωσή του με την εντολή **replace stdp**. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

pubmedid	author	year	country	race	disease	pa1	pa2	nopa1	nopa2	odp	stdp
10591678	Baroni MG	1999	Italy	Caucasian	CAD	257	60	191	14	1.158.485	.3118043
11788483	Tsai CT	2002	Taiwan	Asian	CAD	300	0	195	0	.4298874	1.388.403
14687252	Strohmer B	2004	Austria	Austrian	CAD	191	24	196	25	.0149808	.3033221
18710329	Ranjith N	2008	China	Asian Indian	MI	439	28	1148	39	-.62992	.253977
24134599	Liu W	2013	China	Asian	MI	257	94	269	91	-.0780706	.1709849
DOI	CHENG HUANG	2015	China	Han Chinese	CAD	67	39	572	154	-.7710554	.2209257
12910680	Liu R	2015	China	Chinese	CAD	108	5	111	2	-.9436897	.8475071
9218152	Ossei- Gerning N	2016	Leeds UK	Caucasian	CAD	292	39	63	58	19.305	.2493593
27005817	Zhang D	2016	China	Chinese	CAD	647	27	348	28	.6565115	.2777958

Πίνακας 3.4: Συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων με τις διορθωμένες τιμές των OR και Std δίπλα από κάθε μελέτη.

Πραγματοποιήθηκε μετά-ανάλυση και υπολογίστηκαν οι εκτιμητές για τις συγκρίσεις. Για την ανάλυση χρησιμοποιήσαμε ως εκτιμητή το odds ratio και το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, σύμφωνα με το οποίο τα δείγματα της μελέτης που περιλαμβάνονται στη μετά-ανάλυση προέρχονται από μια κατανομή πληθυσμών (Παράρτημα Α). Για αυτό στις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων επίδρασης-μεγέθους είναι α) η ετερογένεια μεταξύ των μελετών και β) το σφάλμα της δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα όπως προέκυψαν στο παράθυρο αποτελεσμάτων του STATA και στον Data editor καθώς και το γράφημα forest plot παρατίθενται ακριβώς από κάτω:

Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
Baroni MG	0.314	0.170	0.578	12.21
Tsai CT	1.537	0.101	23.362	4.29
Strohmer B	1.015	0.560	1.839	12.28
Ranjith N	0.533	0.324	0.876	12.63
Liu W	0.925	0.662	1.293	13.11
CHENG HUANG	0.463	0.300	0.713	12.84
Liu R	0.389	0.074	2.049	7.51
Ossei-Gerning N	6.893	4.228	11.237	12.66
Zhang D	1.928	1.119	3.323	12.47
D+L pooled ES	0.947	0.479	1.873	100.00

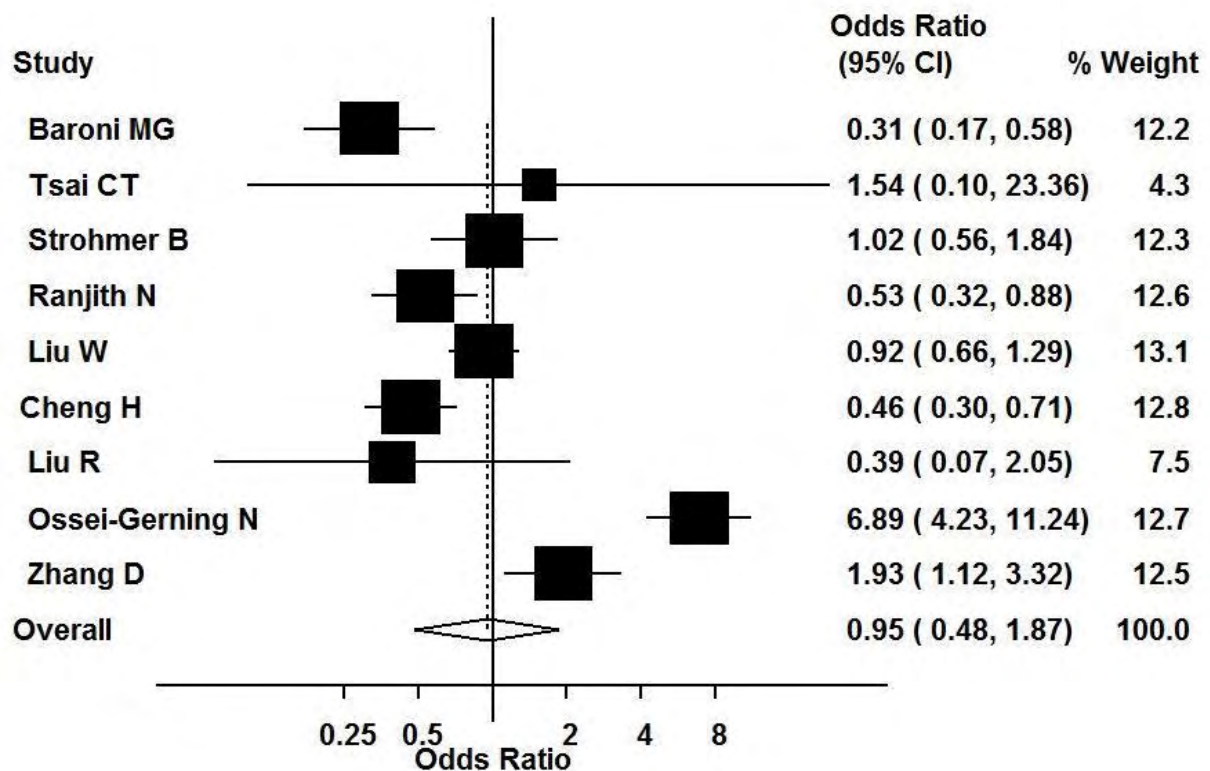
Heterogeneity chi-squared = 99.19 (d.f. = 8) p = 0.000

I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 91.9%

Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.8940

Test of ES=1 : z= 0.16 p = 0.875

Πίνακας 3.5: Results από την εντολή metan στην επιφάνεια εργασίας του STATA.



Εικόνα 3.1: forest plot της εντολής metan. Εδώ, στην αριστερή πλευρά παρουσιάζονται οι μελέτες με τον συγγραφέα τους, ενώ στην δεξιά πλευρά παρουσιάζονται τα αντίστοιχα OR και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της κάθε μελέτης. Στο κέντρο εμφανίζεται διαγραμματικά το OR (95% coefficient interval). Ο ρόμβος απεικονίζει το συνολικό αποτέλεσμα που προκύπτει από την διεξαγωγή της μετά-ανάλυσης, το τετράγωνο απεικονίζει το OR δηλαδή το μέτρο της επίδρασης που προκύπτει από την κάθε μελέτη, ενώ με την οριζόντια γραμμή απεικονίζουμε το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Με τη χρήση του παραπάνω διαγράμματος οδηγηθήκαμε στο εξής συμπέρασμα: Ελέγχοντας μόνο το συνολικό (overall) OR, συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του γονιδίου IRS-1 με την στεφανιαία νόσο, καθώς στο διάστημα εμπιστοσύνης (0.48,1.87) εμπεριέχεται η τιμή 1. Έτσι τα άτομα που φέρουν αυτόν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό δεν παρουσιάζουν επιπλέον πιθανότητα να εμφανίσουν κάποια καρδιαγγειακή ασθένεια. Η ανίχνευση της ετερογένειας στατιστικά ελέγχεται με το στατιστικό Q του Cochran σύμφωνα με το οποίο αν το μέγεθος επίδρασης της κάθε μελέτης απέχει πολύ από το μέγεθος επίδρασης της συνολικής μελέτης τόσο μεγαλώνει ο δείκτης Q του Cochran. Άρα όσο πιο διεσπαρμένα είναι τα επιμέρους odds ratio που έχω βρει σε σχέση με το κοινό πληθυσμιακό μέσο τότε το Q θα αυξάνεται. Ο δείκτης Q ακολουθεί την κατανομή χ^2 (chi-squared), και στη δική μας μελέτη

η τιμή του είναι 99.19% όπως επίσης και το p-value της ετερογένειας είναι 0. Συνεπώς αντιλαμβανόμαστε ότι υπάρχει μεγάλη ετερογένεια, δηλαδή διασπορά εκτιμητών από κάθε μελέτη ξεχωριστά. Ένας άλλος δείκτης που έχει προταθεί για την εκτίμηση της ετερογένειας είναι το I^2 το οποίο προτιμάται έναντι του Q του Qochran διότι δεν εξαρτάται από τον αριθμό των μελετών. Το I^2 υπολογίστηκε σε ποσοστό 91.9%, επομένως και από αυτόν τον εκτιμητή συμπεραίνουμε την ύπαρξη σημαντικής ετερογένειας. Η ύπαρξη ετερογένειας φαίνεται επίσης και από την τιμή του T^2 που λέγεται μεταξύ των μελετών μεταβλητότητα, η οποία βρέθηκε ίση με 0.8940, τιμή αρκετά μεγάλη ώστε να αποτελέσει ένδειξη μεγάλης διαφοροποίησης μεταξύ των μελετών. Επιπλέον η τιμή p-value της συνολικής μελέτης βρέθηκε ίση με $p=0.875$, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας ($p<0.05$). Άρα συμπεραίνουμε ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα στην επίδραση του πολυμορφισμού με την ασθένεια.

Μετά την εκτέλεση της μετά-ανάλυσης ακολούθησε η διαδικασία ελέγχου συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης, δηλαδή της γκρίζας και ξενόγλωσσης βιβλιογραφίας αλλά και του φαινομένου του Πρωτέα. Τα σφάλματα που προκύπτουν από μελέτες που δεν δημοσιεύονται διότι δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ή από μελέτες που είναι γραμμένες σε γλώσσες εκτός της αγγλικής μπορούν να εντοπιστούν με συστηματική έρευνα όλων των διαθέσιμων πηγών, αλλά και με τα test του Begg και του Egger μέσω της εντολής **metabias** στο STATA. Τα αποτελέσματα είναι τα ακόλουθα γραφήματα.

Note: default data input format (theta, se_theta) assumed.

Tests for Publication Bias

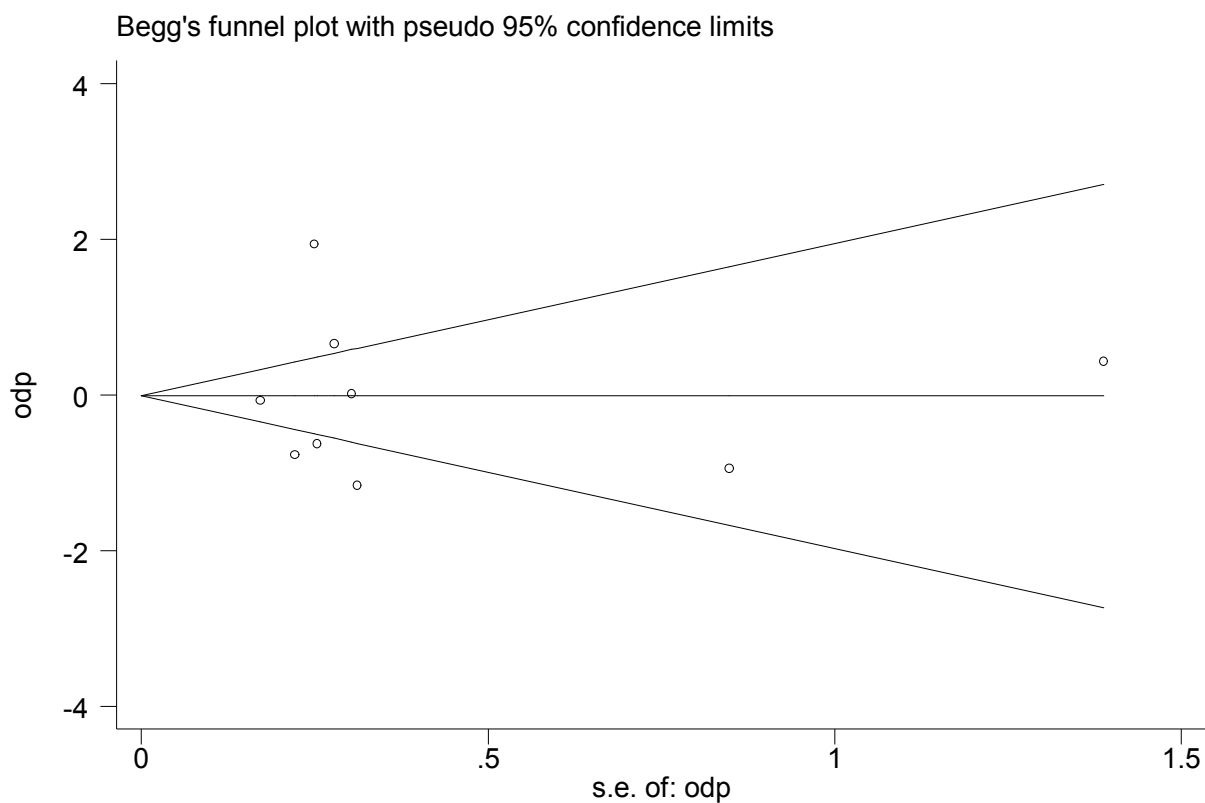
Begg's Test

adj. Kendall's Score (P-Q) = 0
Std. Dev. of Score = 9.59
Number of Studies = 9
z = 0.00
Pr > |z| = 1.000
z = -0.10 (continuity corrected)
Pr > |z| = 1.000 (continuity corrected)

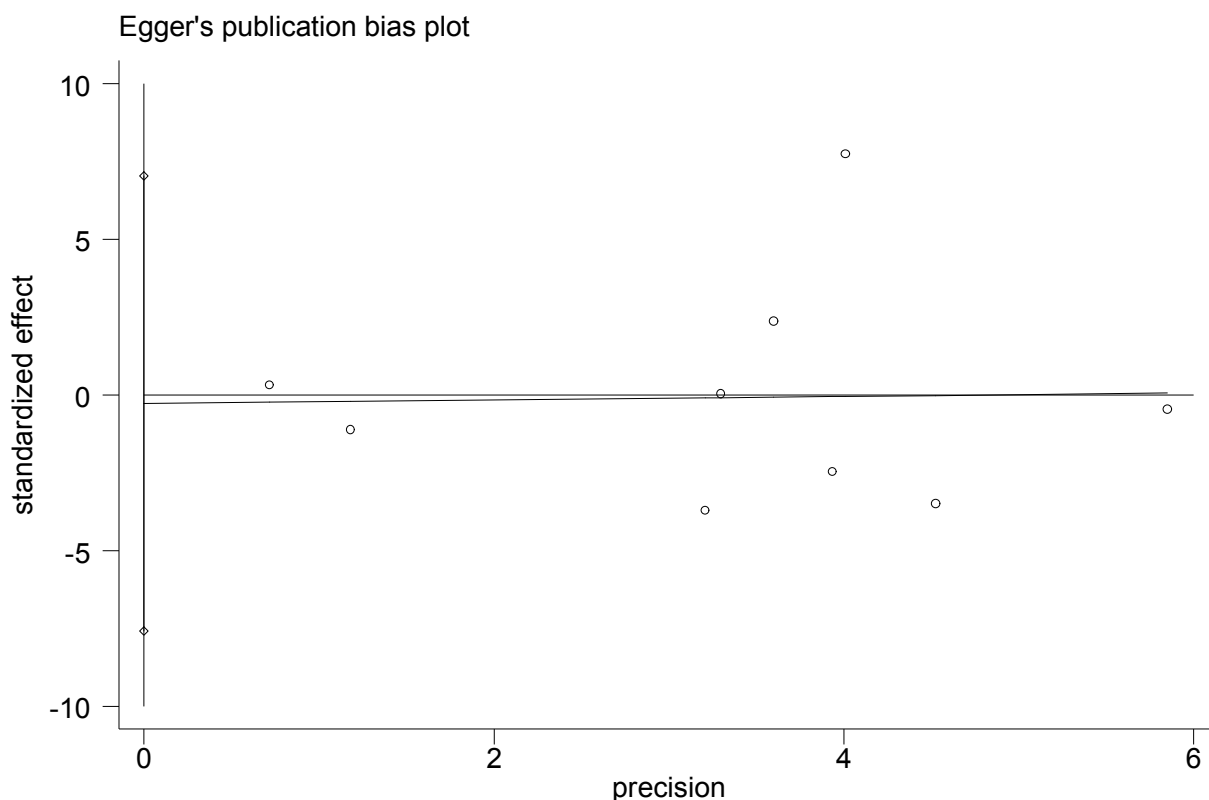
Egger's test

Std_Eff	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
slope	.0568969	.8388235	0.07	0.948	-1.926605	2.040399
bias	-.2796861	3.092193	-0.09	0.930	-7.59156	7.032188

Πίνακας 3.7: Αποτελέσματα του ελέγχου των test του Begg και του Egger για τον εντοπισμό του συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης.



Γράφημα 3.2: Funnel plot του test του Begg. Η οριζόντια γραμμή είναι η γραμμή του OR. Ο άξονας των y αναφέρεται στον λογάριθμο του OR($\log OR$) και ο άξονας των x στο τυπικό σφάλμα του OR. Παρατηρούμε ότι οι μελέτες δεν είναι συμμετρικές ως προς τον οριζόντιο άξονα των OR.



Γράφημα 3.3: Funnel plot του τεστ του Egger.

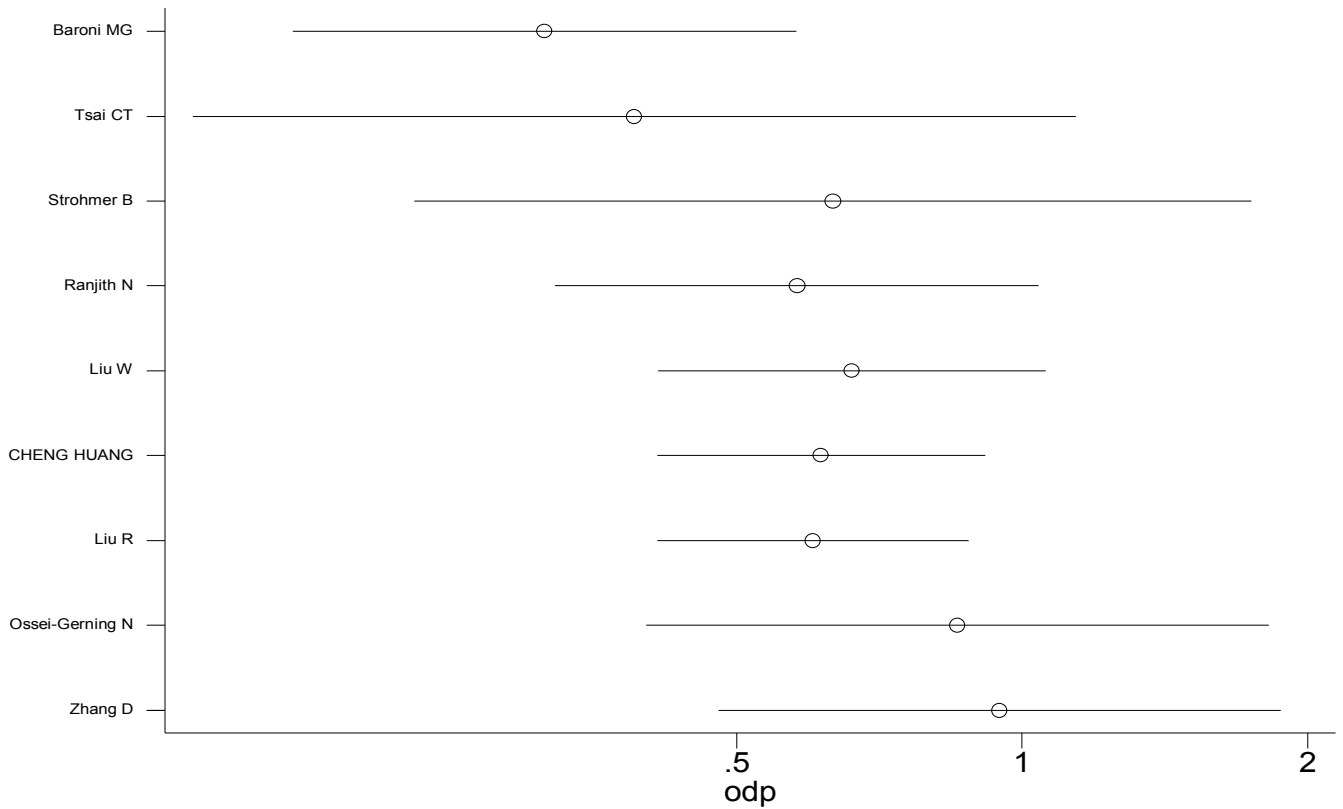
Στα γραφήματα τόσο του Begg όσο και του Egger ο κατακόρυφος άξονας αναφέρεται στο (logOR) και ο οριζόντιος άξονας στο τυπικό σφάλμα του (logOR). Η ύπαρξη του τυπικού σφάλματος δημοσίευσης αποδεικνύεται τόσο στο διάγραμμα του Egger όσο και στο διάγραμμα του Begg στα οποία οι μελέτες δεν βρίσκονται συμμετρικά στη γραμμή του OR. Τέλος για την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας απομένει ο έλεγχος για το φαινόμενο του «Πρωτέα». Ο εντοπισμός του φαινομένου αυτού, κατά το οποίο οι μελέτες έχουν την τάση να αλλάζουν σε βάθος χρόνου με την ολοένα και αυξανόμενη παραγωγή επιστημονικών μελετών, γίνεται με την διεξαγωγή της αθροιστικής μετά-ανάλυσης. Σε πρώτο βήμα ταξινομούμε τις μελέτες ανάλογα με τον χρόνο που έχουν δημοσιευτεί με την βοήθεια της εντολής `sort year`. Στο διάγραμμα της αθροιστικής μετά-ανάλυσης βλέπουμε την αλλαγή του συνολικού εκτιμητή όσο περνάνε τα χρόνια δηλαδή όσο προστίθενται καινούριες μελέτες. Στην περίπτωσή μας η πρώτη μελέτη που δημοσιεύτηκε έβγαζε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, αλλά με την πάροδο του χρόνου και με τις μελέτες που

ακολούθησαν αυτό αναίρεθηκε. Η εντολή με την οποία πραγματοποιήσαμε την αθροιστική μετά-ανάλυσης είναι η **metacum** και τα αποτελέσματα της εκτέλεσής της φαίνονται ακριβώς παρακάτω:

Cumulative random-effects meta-analysis of 9 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Baroni MG	0.314	0.170	0.578	-3.715	0.000
Tsai CT	0.390	0.134	1.140	-1.721	0.085
Strohmer B	0.632	0.229	1.745	-0.886	0.376
Ranjith N	0.579	0.322	1.041	-1.825	0.068
Liu W	0.662	0.413	1.059	-1.720	0.085
CHENG HUANG	0.614	0.412	0.914	-2.401	0.016
Liu R	0.602	0.413	0.878	-2.633	0.008
Ossei-Gerning N	0.855	0.401	1.821	-0.406	0.684
Zhang D	0.947	0.479	1.873	-0.157	0.875

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα της εντολής **metacum**, στα οποία φαίνεται η συνολική αθροιστική εκτίμηση των μελετών, τα διαστήματα εμπιστοσύνης και οι τιμές σημαντικής στατιστικής συσχέτισης.



Γράφημα 3.4: Το funnel plot της αθροιστικής μετά-ανάλυσης της εντολής **metacum**. Οι κουκίδες αναπαριστούν τα odds ratio και οι γραμμές τα διαστήματα εμπιστοσύνης.

Το πρόβλημα είναι ότι στον υπολογισμό του συνολικού μεγέθους επίδρασης της αθροιστικής μετά-ανάλυσης συνυπολογίζονται και τα δεδομένα της πρώτης μελέτης, η οποία αν φέρει πολύ σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα επηρεάζονται και οι μετέπειτα μελέτες. Η ύπαρξή της οφείλεται στο γεγονός ότι κάποια στιγμή στο παρελθόν κάποιος μελετητής είχε αποδείξει ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της ασθένειας. Η συσχέτιση αυτή μελετήθηκε εκτενέστερα στο μέλλον με αποτέλεσμα να καταλήξει σε διαφορετικά αποτελέσματα από τα αρχικά. Για αυτόν τον λόγο, για να μπορέσουμε να αποφύγουμε το φαινόμενο του Πρωτέα, πρέπει να αφαιρέσουμε την πρώτη μελέτη από τις συνολικές μελέτες και να υπολογίσουμε το συνολικό αποτέλεσμα χωρίς αυτή. Η εντολή που εκτελείται για τον σκοπό αυτό είναι η **metatrend**.

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 9

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	0.3140	0.000	0.1704	0.5785
Subsequent studies	1.1051	0.784	0.5417	2.2547
All Studies	0.9469	0.875	0.4788	1.8726

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

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

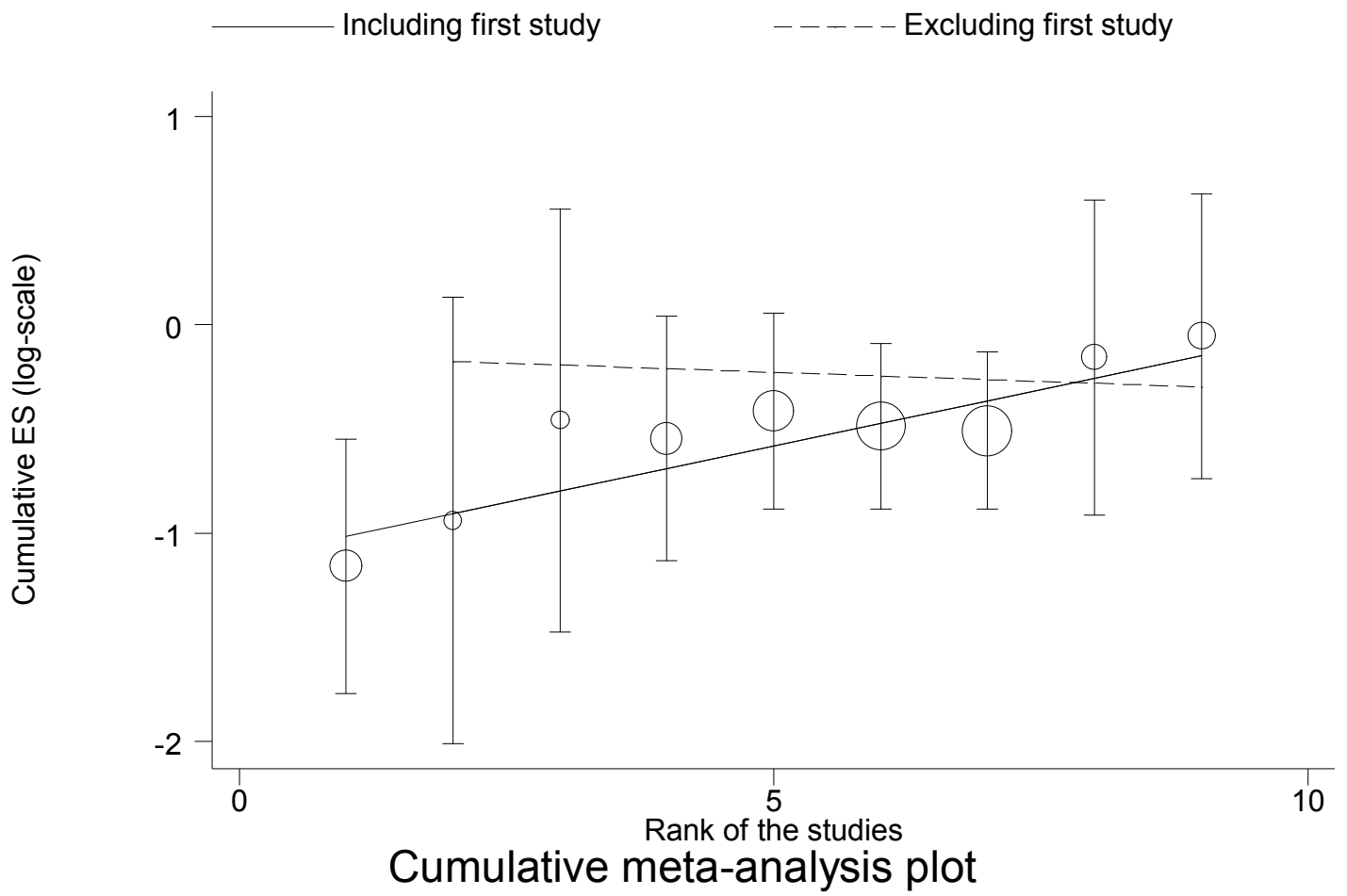
z-value = -2.626

P-value = 0.009

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	0.10808	0.02307	0.000	0.06287	0.15330	0.209
Excluding first study	-0.01748	0.04230	0.680	-0.10039	0.06544	0.274

Πίνακας 3.9: Αποτελέσματα μετά την εκτέλεση της εντολής **metatrend**



Γράφημα 3.5: 'plot' της αθροιστικής μετά-ανάλυσης για το φαινόμενο του Πρωτέα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί έναν από τους βασικότερους λόγους θνησιμότητας σε παγκόσμιο επίπεδο. Η καρδιά είναι το όργανο που με την κυκλοφορία του αίματος μέσω των αρτηριών στέλνει οξυγονωμένο αίμα και θρεπτικές ουσίες σε όλα τα όργανα του σώματος. Για να γίνει όμως αυτή η διαδικασία πρέπει να αιματωθεί και η ίδια. Η αιμάτωσή της γίνεται μέσω των στεφανιαίων αρτηριών. Αν όμως οι στεφανιαίες αρτηρίες προσβληθούν από αθηρωμάτωση μιλάμε για στεφανιαία νόσο. Η πάθηση αν διαγνωστεί έγκαιρα επιτρέπει την πλήρη θεραπεία είτε μέσω επεμβατικών-χειρουργικών μεθόδων είτε μέσω χορήγησης ειδικής φαρμακευτικής αγωγής είτε με συνδυασμό και των δύο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάσαμε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού Arg972 του γονιδίου IRS-1 με την στεφανιαία νόσο. Το IRS-1 είναι ο υποδοχέας υποστρώματος ινσουλίνης, δηλαδή μια πρωτεΐνη-υποδοχέας σηματοδότησης που κωδικοποιείται από το γονίδιο IRS-1.

Το IRS-1 το οποίο ευθύνεται για την ρύθμιση και την έκφραση της ινσουλίνης παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και των αθηροματικών καρδιαγγειακών ασθενειών. Το IRS-1 είναι ένα σπουδαίο υπόστρωμα για τον υποδοχέα ινσουλίνης σε ιστούς-στόχους στους οποίους δρα η ινσουλίνη και αυτοί είναι οι μύς, το λίπος και τα αγγεία[54-56]. Μοριακή σάρωση του IRS-1 σε υγιείς και ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 αποκάλυψαν διάφορους αμινοξικούς πολυμορφισμούς με τον πιο κοινό από αυτούς να είναι ο *Gly⁹⁷²* Arg. Αυτή η αμινοξική υποκατάσταση έχει λειτουργικές συνέπειες προκαλώντας βλάβη στην δραστηριότητα της PI3 κινάσης που σχετίζεται με το IRS-1 εξαιτίας της ελαττωματικής αλληλεπίδρασής τους[57-59].

Επιπλέον μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκε ένα σχετικά μεγάλο δείγμα από πληθυσμό Κινέζων Χαν με νόσο Alzheimer και ένα επίσης μεγάλο δείγμα υγιών ως μέτρο σύγκρισης οι οποίοι σχετίστηκαν με πολλαπλούς παράγοντες που μπορεί να επιδρούν στο ρίσκο εμφάνισης της νόσου όπως η ηλικία, το φύλο, ο μεταβολισμός, η περιοχή διαμονής και το εκπαιδευτικό τους επίπεδο, έδειξε ότι ο πολυμορφισμός συνδέεται σημαντικά με τη νόσο [60]. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το A αλληλόμορφο έχει σημαντική επίδραση στην εμφάνιση της ασθένειας και οι ομοζυγότες AA εμφανίζουν πιο σοβαρά συμπτώματα σε σχέση με τους ετεροζυγότες AG. Επίσης ο πολυμορφισμός μπορεί να αποτελεί και προγνωστικό παράγοντα σε γηραιότερους φορείς του AA αλληλόμορφου [61].

Σε άλλη μελέτη η μετάλλαξη στο γονίδιο IRS-1 έδειξε ότι σχετίζεται σημαντικά και με χαμηλές τιμές πάχους του ενδιάμεσου χιτώνα των καρωτιδικών αρτηριών(IMT-Intima Media Thickness). Αυτή η σύνδεση ήταν πιο σαφής στα θηλυκά δείγματα του πληθυσμού τα οποία τύγχανε να είναι και ηλικιακά ωριμότερα από τα αρσενικά [62]. Οι τιμές του IMT ήταν σχεδόν 30 μm χαμηλότερες στους

φορείς σε σχέση με αυτούς που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό. Η απόφραξη των καρωτιδικών αρτηριών είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος που προβλεπει το ρίσκο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικού επεισοδίου[63-66]. Θεωρώντας την αρτηριακή πίεση ως σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την πάχυνση του καρωτιδικού τοιχώματος [67], η προστατευτική επίδραση της μετάλλαξης στο IRS-1 μπορεί να είναι ιδιαίτερα ισχυρή σε υπερτασικούς φορείς [68].

Τα αποτελέσματα της μετά-ανάλυσης που αναφέρονται στη στεφανιαία νόσο δεν κατάφεραν να δώσουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον πολυμορφισμό από το γονίδιο. Από το συνολικό Odds Ratio της μετά-ανάλυσης που προέκυψε 0.95 συμπεράναμε ότι για το επικρατές αλληλόμορφο G στο οποίο οφείλεται η ασθένεια, δεν υπάρχει συσχέτιση καθώς στο διάστημα εμπιστοσύνης (0.48,1.87) εμπεριέχεται η τιμή 1 και το p-value είναι πολύ μεγαλύτερο από το 5% που θεωρείται επιτρεπτό όριο. Με τη χρήση του στατιστικού πακέτου STATA καταφέραμε να συλλέξουμε όλα αυτά τα αποτελέσματα και να βγάλουμε πολύτιμα συμπεράσματα για την μελέτη μας.

Σε επόμενη φάση πραγματοποιήσαμε τον έλεγχο του συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης για τους γονοτύπους GG και GR+RR. Τα τεστ των Begg και Egger φανερώνουν την ύπαρξη σφάλματος (publication bias), για την ξενόγλωσση και γκρίζα βιβλιογραφία. Τα αντίστοιχα γραφήματα υποστηρίζουν εξίσου την παρατήρηση αυτή, καθώς οι τιμές δεν βρίσκονται συμμετρικά κατανομημένες γύρω από την οριζόντια γραμμή. Το κύριο και βασικό μας εύρημα είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του γονιδίου με την ασθένεια ενώ εντοπίσαμε τι ακριβώς συμβαίνει με το γονίδιο με τη βοήθεια της διαδικασίας της μετά-ανάλυσης. Το φαινόμενο του Πρωτέα είναι η μεγαλύτερη τάση στην επιστήμη όσον αφορά σε πρώιμες αναπαραγωγές μιας μελέτης που έρχεται σε αντίθεση με τα αρχικά ευρήματα, ως αποτέλεσμα του σφάλματος δημοσίευσης(publication bias). Έτσι αθροιστική μετά-ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την εντολή metatrend που εξαιρούσε αυτήν την αρχική μελέτη, η οποία έφερε σημαντικά στατιστικά αποτελέσματα.

Για την επιβεβαίωση και τεκμηρίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων που αφορούν στη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την καρδιαγγειακή ασθένεια, θα συνιστούσαμε την διεξαγωγή και άλλων μελετών με ίδιο αντικείμενο έρευνας για να ελεγχθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Η ραγδαία ανάπτυξη της επιστήμης της καρδιολογίας όσον αφορά στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου αλλά και στην πρόληψή της, έχει μειώσει κατά πολύ το ποσοστό θνησιμότητας λόγω αυτής. Τέλος αυτό που πρέπει να επισημανθεί είναι ότι η επίγνωση της κατάστασης από την πλευρά του ατόμου που νοσεί, ώστε να μπορέσει να λάβει θεραπεία έγκαιρα

είναι ένα πολύ σημαντικό σημείο στην αντιμετώπιση της, όμως το βασικότερο όλων είναι η πρόληψη από τα ίδια τα άτομα ανεξαρτήτου ηλικίας, φύλου και κληρονομικών παραγόντων. Ένας υγιεινός τρόπος ζωής που συμπεριλαμβάνει σωστή διατροφή, αποφυγή καπνίσματος και συστηματικής άθλησης μπορεί να προστατεύσει τον οργανισμό από τις δυσάρεστες συνέπειες που προκαλούν τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peach, G., et al., *Diagnosis and management of peripheral arterial disease*. Bmj, 2012. **345**: p. e5208.
2. Syed, M. and M. Lesch, *Coronary artery aneurysm: a review*. Progress in cardiovascular diseases, 1997. **40**(1): p. 77-84.
3. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2996-3007.
4. Peterson, J., et al., *Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece*. British journal of cancer, 2003. **89**(7): p. 1255-1259.
5. Lethbridge-Cejku, M., D. Rose, and J. Vickerie, *Summary health statistics for u.s. Adults: national health interview survey, 2004*. Vital Health Stat 10, 2006(228): p. 1-164.
6. Mackay, J., et al., *The atlas of heart disease and stroke*. 2004: World Health Organization.
7. Woodward, M., et al., *Contribution of contemporaneous risk factors to social inequality in coronary heart disease and all causes mortality*. Prev Med, 2003. **36**(5): p. 561-8.
8. Fox, K.A., et al., *5-year outcome of an interventional strategy in non-ST-elevation acute coronary syndrome: the British Heart Foundation RITA 3 randomised trial*. Lancet, 2005. **366**(9489): p. 914-20.
9. Ransom, J. and D. Srivastava, *The genetics of cardiac birth defects*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(1): p. 132-9.
10. Genest, J., et al., *2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult-2009 recommendations*. Canadian Journal of Cardiology, 2009. **25**(10): p. 567-579.
11. Thompson, P.D., et al., *Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **107**(24): p. 3109-3116.
12. Dearth, R.K., et al., *Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2*. Cell cycle, 2007. **6**(6): p. 705-713.
13. Nachman, M.W., *Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans*. Trends Genet, 2001. **17**(9): p. 481-5.
14. Sun, X.J. and P. Rothenberg, *Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein*. Nature, 1991. **352**(6330): p. 73.
15. Alsalman, H.A. and Y.A. Kaabi, *Lack of association between the insulin receptor substrates-1 Gly972Arg polymorphism and type-2 diabetes mellitus among Saudis from Eastern Saudi Arabia*. Saudi Med J, 2015. **36**(12): p. 1420-4.
16. Pajukanta, P., et al., *Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(6): p. 1481-93.
17. Wang, L., et al., *Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1578-81.

18. Helgadottir, A., et al., *The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke*. *Nature genetics*, 2004. **36**(3): p. 233-239.
19. Baroni, M.G., et al., *A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999. **19**(12): p. 2975-2980.
20. Uman, L.S., *Systematic reviews and meta-analyses*. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2011. **20**(1): p. 57.
21. Edwards, A., *GH Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium*. *Genetics*, 2008. **179**(3): p. 1143-1150.
22. King, W.R. and J. He, *A meta-analysis of the technology acceptance model*. *Information & management*, 2006. **43**(6): p. 740-755.
23. Lau, J., C.H. Schmid, and T.C. Chalmers, *Cumulative meta-analysis of clinical trials builds evidence for exemplary medical care*. *J Clin Epidemiol*, 1995. **48**(1): p. 45-57; discussion 59-60.
24. StataCorp, L., *Stata data analysis and statistical Software*. Special Edition Release, 2007. **10**: p. 733.
25. Sutton, A.J., et al., *Methods for meta-analysis in medical research*. 2000.
26. DerSimonian, R. and R. Kacker, *Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: an update*. *Contemp Clin Trials*, 2007. **28**(2): p. 105-14.
27. Higgins, J.P. and S.G. Thompson, *Quantifying heterogeneity in a meta-analysis*. *Stat Med*, 2002. **21**(11): p. 1539-58.
28. Mosteller, F., *Association and estimation in contingency tables*. *Journal of the American Statistical Association*, 1968. **63**(321): p. 1-28.
29. Eric Fombonne, M., S.L.-R. MA, and B.H. MA, *Previously suicidal adolescents: predictors of six-month outcome*. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2008. **17**(4): p. 197.
30. Newson, R., *Stata tip 13: generate and replace use the current sort order*. 2004.
31. Kontopantelis, E. and D. Reeves, *metaan: Random-effects meta-analysis*. *Stata Journal*, 2010. **10**(3): p. 395.
32. Lau, J., et al., *Cumulative meta-analysis of therapeutic trials for myocardial infarction*. *New England Journal of Medicine*, 1992. **327**(4): p. 248-254.
33. Wang, W., et al., *8p22–23-rs2254546 as a Susceptibility Locus for Kawasaki Disease: a Case-control Study and a Meta-analysis*. *Scientific reports*, 2014. **4**.
34. Bagos, P.G. and G.K. Nikolopoulos, *Generalized least squares for assessing trends in cumulative meta-analysis with applications in genetic epidemiology*. *Journal of clinical epidemiology*, 2009. **62**(10): p. 1037-1044.
35. Tang, J.L., *Selection bias in meta-analyses of gene-disease associations*. *PLoS medicine*, 2005. **2**(12): p. e409.
36. Rothstein, H.R., A.J. Sutton, and M. Borenstein, *Publication bias in meta-analysis: Prevention, assessment and adjustments*. 2006: John Wiley & Sons.
37. Schöpfel, J., *Towards a Prague Definition of Grey Literature*. *Grey Journal (TGJ)*, 2011. **7**(1).
38. Schöpfel, J. *Towards a Prague definition of grey literature*. in *Twelfth International Conference on Grey Literature: Transparency in Grey Literature*. *Grey Tech Approaches to High Tech Issues*. Prague, 6-7 December 2010. 2010.
39. Auger, C.P., *Use of reports literature*. 1975.

40. Pejřov, P. and M. Vaska. *An analysis of current grey literature document typology*. in *Twelfth International Conference on Grey Literature: Transparency in Grey Literature, 6-7 December 2010*. 2010.
41. Pfeiffer, T., L. Bertram, and J.P. Ioannidis, *Quantifying selective reporting and the Proteus phenomenon for multiple datasets with similar bias*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18362.
42. Ioannidis, J.P. and T.A. Trikalinos, *Early extreme contradictory estimates may appear in published research: the Proteus phenomenon in molecular genetics research and randomized trials*. Journal of clinical epidemiology, 2005. **58**(6): p. 543-549.
43. Moher, D., et al., *Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement*. PLoS med, 2009. **6**(7): p. e1000097.
44. Roshanak, B., M. Haedeh, and M. Amir, *The study of effects common paraoxonase polymorphism (L55M) on atherosclerosis risk in diabetic patients by PCR-RFLP*. European Journal of Experimental Biology, 2013. **3**(3): p. 512-516.
45. Bayatmakoo, R., et al., *Effect of common paraoxonase 1 polymorphism (Q192R) on atherosclerosis risk in referred diabetic patients to Tabriz Shahid Madani heart hospital in 2010*. Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity-Tehran Medical Branch, 2012. **22**(3): p. 191-197.
46. Esteghamati, A., et al., *Association of +45 (T/G) and +276 (G/T) polymorphisms in the adiponectin gene with coronary artery disease in a population of Iranian patients with type 2 diabetes*. Molecular biology reports, 2012. **39**(4): p. 3791-3797.
47. Rahimi, Z., et al., *Strong interaction between T allele of endothelial nitric oxide synthase with B1 allele of cholesteryl ester transfer protein TaqIB highly elevates the risk of coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus*. Human genomics, 2012. **6**(1): p. 20.
48. Assali, A., et al., *Association of angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism with the presence of diabetes mellitus and metabolic syndrome in patients with documented coronary artery disease*. European journal of internal medicine, 2011. **22**(3): p. 254-261.
49. Fallah, S., M. Seifi, and A. Samadikuchaksaraei, *Risk of coronary artery stenosis in Iranian type 2 diabetics: is there a role for matrix metalloproteinase-3 gene (-1612 5A/6A) polymorphism?* Journal of physiology and biochemistry, 2010. **66**(4): p. 359-364.
50. Scacchi, R., M. Ruggeri, and R.M. Corbo, *Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(15): p. 1341-1344.
51. Vaisi-Raygani, A., et al., *The presence of apolipoprotein ϵ 4 and ϵ 2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients*. Clinical biochemistry, 2007. **40**(15): p. 1150-1156.
52. Sharma, R., et al., *The type 2 diabetes and insulin-resistance locus near IRS1 is a determinant of HDL cholesterol and triglycerides levels among diabetic subjects*. Atherosclerosis, 2011. **216**(1): p. 157-160.
53. Chan, S.-H., et al., *Gly1057Asp polymorphism of insulin receptor substrate-2 is associated with coronary artery disease in the Taiwanese population*. Journal of biomedical science, 2012. **19**(1): p. 100.
54. SESTI, G., et al., *Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders*. The FASEB Journal, 2001. **15**(12): p. 2099-2111.

55. Hong, Y., et al., *Genetic and environmental architecture of the features of the insulin-resistance syndrome*. American journal of human genetics, 1997. **60**(1): p. 143.
56. Reaven, G.M., *Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-1607.
57. Federici, M., et al., *The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets*. The FASEB Journal, 2001. **15**(1): p. 22-24.
58. Hribal, M.L., et al., *The Gly → Arg972 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(5): p. 2004-2013.
59. Almind, K., et al., *A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(11): p. 2569.
60. Sesti, G., et al., *The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1394-1398.
61. Hux, M.J., et al., *Relation between severity of Alzheimer's disease and costs of caring*. Canadian Medical Association Journal, 1998. **159**(5): p. 457-465.
62. Kaczmarek, M., *Intra-population age variation at natural menopause and underlying past reproductive events: a case of Polish women*. Acta Med Lituonica, 2005. **12**(1): p. 15-21.
63. Lonn, E., *Use of carotid ultrasound to stratify risk*. The Canadian journal of cardiology, 2001. **17**: p. 22A-5A.
64. Chambless, L.E., et al., *Carotid wall thickness is predictive of incident clinical stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. American journal of epidemiology, 2000. **151**(5): p. 478-487.
65. Ebrahim, S., et al., *Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women*. Stroke, 1999. **30**(4): p. 841-850.
66. O'Leary, D.H., et al., *Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(1): p. 14-22.
67. Liang, Y.-L., et al., *Effects of blood pressure, smoking, and their interaction on carotid artery structure and function*. Hypertension, 2001. **37**(1): p. 6-11.
68. Hölzl, B., et al., *Intima media thickness of carotid arteries is reduced in heterozygous carriers of the Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate - 1 gene*. European journal of clinical investigation, 2003. **33**(2): p. 110-116.