

Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta

Centrum pro výzkum toxických látek v životním prostředí

**GENETICKÉ FAKTORY U SYSTÉMOVÉHO LUPUS
ERYTHEMATOSUS: REVIEW LITERATURY A
METAANALÝZA**

Lenka Puczoková

Bakalářská práce



Vedoucí práce: prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Institut
biostatistiky
a analýz



Kamenice 126/3, 625 00 Brno, fax : +420 549 49 2840, www.recetox.cz

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno studenta/ky: Lenka Puczoková

UČO: 324474

Studijní program/Obor: Biologie/Matematická biologie

Název práce: Genetické faktory u systémového lupus erythematosus: review literatury a metaanalýza

Název práce anglicky: Genetic factors in systemic lupus erythematosus: literature review and meta-analysis

Vedoucí: prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D.

Konzultant(i):

Datum zadání: 12.11.2010

Datum odevzdání: 23.5.2011

Předpokládaný rozsah: min. 40 stran

Postup a zásady pro vypracování:

Práce je zaměřena na metaanalýzu genetických faktorů u systémového lupus erythematosus (SLE). SLE je chronickým zánětlivým autoimunitním onemocněním, na jehož rozvoji se podílí řada imunopatologických mechanismů. V popředí je nadměrná tvorba autoprotilátek a tvorba imunitních komplexů s následným ukládáním do tkání a indukci zánětlivého procesu. Řadíme ho do skupiny nemocí komplexních, v jejichž etiopatogenezi se uplatňují interakce řady genetických faktorů a vlivů zevního prostředí. Prvním cílem práce je vypracování rešerše recentní literatury studující genetické faktory u tohoto onemocnění. Dalším výstupem bude provedení rozboru genetických dat u SLE ve vztahu k etnickému složení populací a výběr vhodných kandidátních genů pro metaanalýzu. V rámci posledního kroku studentka provede metaanalýzu publikovaných výsledků se zhodnocením rizikovosti uvedené varianty/variant pro rozvoj SLE, příp. i jeho komplikací (např. lupus nefritidy).

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucí bakalářské práce, paní profesorce Lydii Izakovičové Hollé, za cenné rady, připomínky, nápady a čas, který mi i přes svůj pestrý program ochotně věnovala, a také panu doktorovi Ondřeji Májkovi za rady ohledně matematické části – metaanalýzy.

Dále děkuji svým rodičům a svému příteli za ohleduplnost, kterou na mě brali v průběhu psaní práce. Poděkování patří také naší fence Bernského salašnického psa Belle (i když neumí číst), za věrnost a za to, že jsem se měla s kým odreagovat na procházkách.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předkládanou práci jsem vypracovala samostatně a všechny zdroje jsou citovány v seznamu použité literatury.

Datum: 20. 5. 2011

Lenka Puczoková

Obsah

Úvod	12
1 Systémový lupus erythematosus	13
1.1 Autoimunita	13
1.2 Systémový lupus erythematosus	13
1.3 Ostatní formy lupusu	14
1.4 Příčiny vzniku	14
1.5 Příznaky a průběh nemoci	15
1.6 Léčba	17
2 Dědičnost SLE a souvislost s etnikem	18
2.1 Incidence a prevalence	18
2.2 Geny všeobecně spjaté s lupusem	18
2.3 Geny u různých etnik	19
3 Příprava metaanalýzy	23
3.1 Co je metaanalýza?	23
3.2 Homogenita studií	23
3.3 Teorie – Testování homogenity studií Q testem	24
3.4 Teorie – Testování homogenity studií pomocí I^2 indexu	26
3.5 Fixed a random effects modely	28
3.6 Teorie – Odds ratio	29
3.7 Teorie – Mantel-Haenszelova metoda metaanalýzy	31
3.8 Teorie – Metaanalytická metoda DerSimonian-Lairdové	34
3.9 Výběr genu	39
3.10 TLRs – Toll-like receptors	40
3.11 TLR9	40
3.12 Polymorfismy genu TLR9	40

3.13	ACR kritéria pro diagnostiku SLE	43
4	Metaanalýza I: polymorfismus rs352139 genu TLR9	44
4.1	Metody získávání dat	44
4.2	Výpočet pro jednotlivé genotypy AA, AG a GG	45
4.3	Výpočet pro jednotlivé alely A, G	50
5	Metaanalýza II: polymorfismus rs187084 genu TLR9	53
5.1	Data	53
5.2	Výpočet pro jednotlivé genotypy TT, TC a CC	53
5.3	Výpočet pro jednotlivé alely T, C	58
	Závěr	61
	Seznam zkratk	62
	Seznam použité literatury	63

Seznam tabulek

2.1	Geny zkoumané u SLE pacientů obecně	20
2.2	Geny zkoumané u Asiatů	21
2.3	Geny zkoumané u bělochů	22
2.4	Geny zkoumané u černochů	22
2.5	Geny zkoumané u Hispánců	22
3.1	Data genotypu AA polymorfismu rs352139 ze 4 studií	25
3.2	Mezivýpočty pro test homogenity studií AA rs352139	25
3.3	Rozdílné hodnoty odds ratio při použití fixed a random effects modelu	29
3.4	Příklad kontingenční tabulky pro výpočet OR	30
3.5	Kontingenční tabulka pro genotyp AA (rs352139) ze studie PDF2	31
3.6	Přichypané hodnoty P_i , Q_i , R_i a S_i pro výpočet IS OR genotypu AA (rs352139)	34
3.7	Data pro TT rs187084 pro ukázkou výpočtu odhadu OR podle DerSimonian-Lairdové	37
3.8	Mezivýpočty TT rs187084 pro ukázkou výpočtu odhadu OR podle DerSimonian-Lairdové	37
3.9	Dosud publikované metaanalýzy	39
4.1	Polymorfismy zkoumané ve studiích PDF1 – PDF6	44
4.2	Data ze studií o TLR9 polymorfismu rs352139	45
4.3	Test homogenity pro polymorfismus rs352139	46
4.4	Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp AA (rs352139)	47
4.5	Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp AG (rs352139)	48
4.6	Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp GG (rs352139)	49
4.7	Rozdělení alel A a G ve studiích polymorfismu rs352139	50
4.8	Test homogenity pro alely A a G (rs352139)	50
4.9	Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro alelu A (rs352139)	51
4.10	Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro alelu G (rs352139)	52
5.1	Data ze studií o TLR9 polymorfismu rs187084	54
5.2	Test homogenity pro polymorfismus rs187084	54

5.3	Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp TT (rs187084)	55
5.4	Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp TC (rs187084)	56
5.5	Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp CC (rs187084)	57
5.6	Rozdělení alel T a C ve studiích polymorfismu rs187084	58
5.7	Test homogenity pro alely T a C (rs187084)	58
5.8	Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro alelu T (rs187084)	59
5.9	Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro alelu C (rs187084)	60

Seznam obrázků

1.1	Náčrt a fotografie motýlovité vyrážky typické pro lupus	16
	(a) Náčrt vyrážky	16
	(b) Reálná vyrážka	16
3.1	Grafická ukázka rozdílu v použití fixed a random effects modelu	29
	(a) Fixed effects model	29
	(b) Random effects model	29
3.2	Ukázka jednonukleotidového polymorfismu	41
3.3	Polymorfismy u genu TLR9	42
4.1	Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp AA (rs352139)	47
4.2	Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp AG (rs352139)	48
4.3	Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp GG (rs352139)	49
4.4	Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro alelu A (rs352139)	51
4.5	Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro alelu G (rs352139)	52
5.1	Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp TT (rs187084)	55
5.2	Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp TC (rs187084)	56
5.3	Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp CC (rs187084)	57
5.4	Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro alelu T (rs187084)	59
5.5	Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro alelu C (rs187084)	60

Abstrakt

Systémový lupus erythematosus je prototypem autoimunitního onemocnění, u něhož jsou imunitními reakcemi poškozovány vlastní tkáně organismu, zejména pojivo. Jako systémový je označován proto, že jsou napadány různé orgánové systémy v těle, nejčastěji pohybový aparát, zejména klouby, ledviny, kůže, plíce a nervová soustava, příznaky onemocnění tedy mohou být velmi různorodé. Přes výrazný pokrok v medicíně a výzkumu tohoto onemocnění se stále jedná o závažnou a život ohrožující chorobu. Prvním z cílů práce bylo dostatečně se seznámit s daným onemocněním – s jeho příznaky, průběhem a léčbou. Dalším úkolem bylo zjistit, co je dnes již známo o dědičnosti tohoto onemocnění. Zjištěná fakta jsou uvedena ve druhé kapitole. Posledním úkolem bylo vypracovat metaanalýzu studií, které se zabývaly asociací určitého genu s rozvojem SLE. V kapitole 3 je uvedena obecná teorie metaanalýzy; dvě vlastní metaanalýzy genu TLR9, konkrétně jeho dvou polymorfismů – rs352139 a rs187084 – jsou prezentovány v kapitolách 4 a 5. Studie prvního z uvedených polymorfismů splňovaly předpoklad homogenity, proto jsem k výpočtům použila „fixed effects“ model metaanalýzy, konkrétně Mantel-Haenszelovu metodu, která se doporučuje zejména pro slučování menšího počtu studií. Přestože se mi nepodařilo prokázat statisticky významný efekt uvedené varianty pro vznik/rozvoj SLE, z grafického vyjádření je patrné, že jednotlivé genotypy pravděpodobně mají rozdílný efekt na manifestaci klinického fenotypu (genotyp AA spíše „protektivní“, kdežto genotyp GG spíše „rizikový“). Studie druhého polymorfismu (rs187084) podmínku homogenity nespĺňovaly, proto jsem k výpočtům použila „random effects“ metodu metaanalýzy, konkrétně model DerSimonian-Lairdové. Ani ve druhém případě se mi nepodařilo prokázat statisticky významný efekt některého z genotypů u SLE. Stejně jako u předchozího polymorfismu však jednotlivé genotypy měly pravděpodobně odlišný efekt na manifestaci SLE (genotyp TT byl spíše „rizikový“, genotyp CC spíše „protektivní“). Závěrem lze říci, že dosud publikovaná data neumožňují s jistotou říci, že se TLR9 gen uplatňuje v etiopatogenezi SLE; pro finální potvrzení příp. vyloučení vlivu variability v tomto genu na rozvoj SLE je zapotřebí mnohem vyšší počet prací (se zahrnutím většího počtu nemocných i zdravých osob) a jejich metaanalýza.

Klíčová slova:

Systémový lupus erythematosus, polymorfismus, TLR9, metaanalýza, Mantel-Haenszelova metoda, metoda DerSimonian-Lairdové

Abstract

Systemic lupus erythematosus is a prototype of autoimmune disease in which the immune system reactions damage tissues of its own organism. It is described as systemic because various organ systems in the body are attacked, most commonly the musculoskeletal system, especially joints, kidneys, skin, lungs and the nervous system; symptoms may therefore be very diverse. Despite significant advances in medicine and research, SLE still remains a serious and life threatening disease. The first objective of this thesis was to study this disease sufficiently – its symptoms, course and treatment. Another challenge was to summarize already known facts about the inheritance of the disease. These facts are set out in the second chapter. The final task was to realize a meta-analysis of studies that investigated the association of a certain gene with the development of SLE. Chapter 3 gives a general theory of meta-analyses, two meta-analyses of the TLR9 gene, namely its two polymorphisms – rs352139 and rs187084 – are presented in chapters 4 and 5. Studies of the first polymorphism met the test of homogeneity therefore the „fixed effects model“ of meta-analysis was used for calculation, specifically the Mantel-Haenszel method, which is recommended for merging smaller studies. Although I did not prove a statistically significant effect of this polymorphism on the SLE development, it is apparent from the graphical expression that different genotypes may have a different effect on the manifestation of clinical phenotype („protective“ AA genotype and „risky“ GG genotype). Studies of the rs187084 polymorphism did not meet the homogeneity condition, for this reason a so-called „random effects“ meta-analysis method (the DerSimonian-Laird model) was used for calculation. Again it was not possible to demonstrate any statistically significant effect of genotype on SLE. However, similarly as in the previous polymorphism, individual genotypes may have different effect on the manifestation of SLE (TT genotype was more „risky“, CC genotype more „protective“). In conclusion, data published to date do not with certainty say that the TLR9 gene plays a role in the etiopathogenesis of SLE. Much more research data (with a larger number of patients and healthy subjects) and their meta-analyses will be necessary for final confirmation or exclusion of the effect of variation in the gene on the SLE development.

Keywords:

Systemic lupus erythematosus, polymorphism, TLR9, meta-analysis, Mantel-Haenszel method, DerSimonian-Laird method

Úvod

Do úvodu patří v první řadě vysvětlení, proč jsem si vybrala zrovna téma systémového lupusu. Toto téma nebylo ústavem vypsáno, ale vymyslela jsem si jej sama. Chtěla jsem se zabývat imunitou a jejími poruchami – autoimunitními chorobami, a to právě konkrétně systémovým lupusem. Nakonec se mě ujala paní profesorka z lékařské fakulty, která mi toto téma vypsala. Systémový lupus mě zajímá nejen proto, že problematika autoimunitních onemocnění mi sama o sobě připadá velmi zajímavá, ale i proto, že se týká mě osobně, resp. mé rodiny. Na tuto nemoc před 4 lety zemřela moje teta, matčina sestra. Bylo jí teprve 47 let. Proto mě toto téma začalo ještě více zajímat. Zejména se chci dozvědět to, zda a jak je onemocnění dědičné, nebo lépe řečeno, co jej způsobuje.

V první fázi jsem o tomto onemocnění vše pečlivě nastudovala. Dověděla jsem se, co přesně znamená pojem autoimunitní choroba. Jde obecně o to, že se imunita „zblázní“ a začne poškozovat sobě vlastní struktury. Konkrétně při systémovém lupusu přehnaná imunita může poškozovat prakticky všechny tkáně a orgány v těle. Každý pacient s lupusem může mít úplně jiné příznaky, protože vznikající zánět může napadat různé orgány. Proto se onemocnění také přezdívá „magna simulatrix“ – simulující nemoc, nebo také nemoc mnoha tváří. Základní fakta jsou popsána v kapitole 1.

Systémový lupus patří mezi nemoci s výraznou hereditární dispozicí. V posledních letech zažíváme ve vědeckém zkoumání příčin a tedy i možností léčby tohoto onemocnění doslova „boom“. Vycházejí stále nové a nové články o tom, co lupus způsobuje a které geny s jeho rozvojem souvisí. Prevalence nemoci se liší v různých populacích. Nemoc je mnohem čtenější u Asiatů a černochů než u bělochů. Proč tomu tak je, to se dozvíte v kapitole 2.

Jelikož studuji obor Matematická biologie, musela jsem kromě teoretické části vypracovat i část praktickou. Mým úkolem tedy bylo provést metaanalýzu publikovaných výsledků u vybraného genu se zhodnocením rizikovosti příslušných variant genu pro rozvoj SLE. Po důkladném zvážení byly vybrány dva polymorfismy genu TLR9, a to rs352139 a rs187084. Vše o genu TLR9 a jeho polymorfismech najdete v kapitole 3. Obě metaanalýzy jsou popsány v kapitole 4 a 5.

Kapitola 1

Systemový lupus erythematosus

1.1 Autoimunita

Jako autoimunitní choroby označujeme ty, při kterých se imunitní systém obrací proti vlastnímu tělu. Normální imunita je namířena proti různým patogenům, které se dostaly do těla z vnějšího prostředí. Nejčastěji to bývají různé viry a bakterie, ale také paraziti, prvoci, houby nebo priony. Při autoimunitním onemocnění se však imunitní systém zaměří proti tkáním, které jsou tělu vlastní, a ty poškozují.

1.2 Systemový lupus erythematosus

Název této nemoci je odvozen od latinských slov lupus – vlk a erythema – červená vyrážka, zarudnutí. Slovo lupus se od dávných dob v medicíně používá pro označení kožních nemocí. Název se odvíjí právě od faktu, že nejznámější formou lupusu je lupus kožní. Typická motýlovitá vyrážka na nosu a tvářích v dávných dobách lidem připomínala kousnutí vlkem, příp. vlčí tváře.

Systemový lupus erythematosus je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, při kterém imunitní systém poškozují pojivovou tkáň vlastního těla, zejména pak její jaderný materiál. Jak víme, pojivovou tkáň je obalena většina orgánů. Pojivo najdeme také ve velkém množství ve všech cévách a ty prostupují všemi orgány. Právě proto je lupus systemovým onemocněním, tedy onemocněním, které napadá celé orgánové soustavy nebo častěji více orgánových soustav najednou. Protilátky proti jadernému materiálu (konkrétně nejčastěji anti-ds-DNA – protilátky proti dvouvláknové DNA) se spojují s autoantigeny do malých částic – imunokomplexů, které se ukládají v těle a v daném místě vyvolávají zánět. Ten se může rozšířit cévami v podstatě kamkoli do těla. Nejčastěji je napaden pohybový aparát, zejména klouby, dále centrální nervová soustava, ledviny, kůže, kardiovaskulární systém, plíce aj.

1.3 Ostatní formy lupusu

Vedle SLE – systémového lupusu existují i jiné formy lupusu. Jedná se zejména o lupus kožní, jehož charakteristickým znakem je diskoidní erytém ve tvaru motýla, tedy na kořenu nosu a na tvářích. Kožní změny se vyskytují i na dalších částech těla, zejména na obličeji, hlavě, krku a pohlavních orgánech. Může být přítomno i padání vlasů a změny pigmentace. Většina pacientů se SLE má i kožní problémy, ale naopak asi jen u 10 % pacientů s kožním lupusem se objeví i lupus systémový. Léky indukovaný lupus je vzácnější formou. Nikdy nenapadá ledviny ani CNS (centrální nervovou soustavu) a po skončení podávání příslušných léků jeho příznaky obvykle vymizí. Neonatálním lupusem mohou trpět novorozenci matek se SLE. Jeho projevem je vyrážka, změny krevního obrazu a zvýšení jaterních testů. Většina projevů vymizí i bez léčby během prvních 3 – 6 měsíců života dítěte. Vzácně se mohou projevit poruchy srdečního rytmu – vrozený AV blok – který způsobuje zpomalení srdeční činnosti a může vést až k úmrtí dítěte. U dětí, které tuto poruchu mají, je většinou nutné použít kardiostimulátor.

1.4 Příčiny vzniku

Příčiny vzniku a rozvoje nemoci nejsou stále zcela jasné. V etiopatogenezi choroby se uplatňují kombinace/interakce více faktorů. Jedná se o:

- **Genetické faktory:** jde o tzv. nepřímou dědičnost, kdy jsou přenášeny jen dispozice pro rozvinutí nemoci. Je zřejmé, že náklonnost k chorobě je podmíněna více polymorfismy v různých genech. Více o dědičnosti této choroby v kapitole 3.
- **Rizikové faktory:** též je můžeme nazvat faktory spouštěcí, protože mohou vést k manifestaci nemoci. Jedná se o:
 - **Hormonální změny.** Při lupusu hrají významnou roli hormony pohlavní – zejména estrogeny a také prolaktin. Estrogeny jsou produkovány u obou pohlaví, ale v mnohem větší míře u žen. Zvýšenou produkci zaznamenáváme zejména v období puberty, gravidity nebo klimakteria. Proto se systémový lupus nejčastěji projeví u žen v plodném věku (mezi 15 – 45 lety), poměr ženy : muži = 6 – 10 : 1. Riziko indukce SLE může zvýšit užívání hormonální antikoncepce.
 - **Stres.** A to jak stres psychický (rozvod, úmrtí v rodině, ...), tak fyzický (může se jednat o jakýkoli vážnější úraz, operaci, graviditu, porod, klimakterium, nebo také o dlouhodobé fyzické přepínání – práce na směny, intenzivní sport, nedostatek spánku, ...) Vliv stresu se překrývá s hormonálními změnami.
 - **UV záření.** To způsobuje změny na povrchu buněk a ty jsou pak imunitou vyhodnoceny jako cizorodé a je proti nim zahájena imunitní reakce.
 - **Některé léky.** Jedná se o určitá antibiotika (sulfonamidy, tetracyklin, penicilin, amoxicillin, ampicilin, oxacilin) a diuretika.

- **Infekce.** Nejčastěji se v tomto směru hovoří o herpetických virech způsobujících opary, viru Epstein-Barrové (EBV – Epstein-Barr Virus) zapříčiňujícím mononukleózu a řadě dalších.
- **Nezdravý životní styl** (kouření, konzumace alkoholu, kávy, . . .).
- **Extrakt z jetele a vojtěšky.** Přípravky z nich obsahují látku L-canavanin, která může lupus aktivovat již při nízkých dávkách (Biologická léčba [online]).

Systémový lupus je však, jak již bylo řečeno, onemocnění multifaktoriální, tzn., že jeho rozvoj je podmíněn působením faktorů vnějšího i vnitřního prostředí současně s určitými genetickými dispozicemi jedince (Anamneza [online]; Bartůňková, 2002; Slámová, 2010).

1.5 Příznaky a průběh nemoci

Projevy nemoci se velmi liší podle toho, který orgán je postižen. Jeden pacient může mít problémy s dýcháním, jiný s ledvinami a další se srdcem. Pro většinu jsou však typickými projevy kožní vyrážky a postižení kloubů. Obecně je pro SLE typické kolísání příznaků, tzv. období vzplanutí (relaps, ataka, angl. flare) a remise (ústup nemoci) (Valenová, 2007). Období vzplanutí znamená skutečný atak nemoci. Varovnými signály bývají únava, bolesti kloubů a svalů, kožní vyrážky, poruchy trávení, horečka, bolesti hlavy, závratě, padání vlasů, úbytek tělesné hmotnosti, ale také psychické obtíže, deprese (LUPUS [online], 2009). Po propuknutí nemoci mají pacienti různé problémy (Dostál a Tegzová, 2009; Vitalion [online], 2011):

Nespecifické příznaky

Vysoké horečky a třes, úbytek na váze, únava, nechutenství, křeče, zduření mízních uzlin.

Kůže

Pacienti si nejčastěji stěžují na nesnášenlivost slunečního záření, vypadávání vlasů a zvýšené pocení. Kromě typické vyrážky na obličeji ve tvaru motýla (na nose a tvářích, viz obrázek 1.1 – převzato z www.majalahkesehatan.com a www.stefajir.cz) se, tak jako u kožního lupusu, vyskytují i další kožní změny po celém těle. Projevují se nejčastěji na místech nekrytých oděvem a vystavovaných slunečnímu záření. Nemocní by se měli proti slunci dobře chránit, a to buď oblečením, nebo opalovacími krémy s vysokým ochranným faktorem.

Pohybový aparát

Revmatické potíže se vyskytují téměř u všech pacientů. Právě kvůli bolestem kloubů 90 % pacientů poprvé vyhledá lékaře a ten pak může diagnostikovat skutečnou příčinu obtíží. Vzácně dochází k zánětu svalů.



(a) Náčrt vyrážky



(b) Reálná vyrážka

Obr. 1.1. Náčrt a fotografie motýlovité vyrážky typické pro lupus

Ledviny

Postižení ledvin lze diagnostikovat jednoduchým vyšetřením moči na přítomnost červených krvinek a bílkovin. Pravidelným vyšetřením moči lze lupusovou nefritidu včas rozpoznat a léčit. V pozdním stadiu postižení ledvin pacienti vyžadují dialýzu (umělou ledvinu). Stav ledvin bývá limitujícím faktorem „quod vitam“.

Srdce

Problémy se srdcem má asi 30 – 50 % pacientů se SLE. Jde zejména o záněty osrdečníku (perikarditidu). Vzácněji se vyskytují záněty srdečního svalu (myokarditida) nebo zánět vnitřní výstelky srdce a chlopní (endokarditida). Pacienti se SLE častěji trpí ischemickou chorobou srdeční, proto jsou také náchylnější k rozvoji infarktu myokardu.

Mozek a nervová soustava

Příznaky postižení nervové soustavy se projevují u 60 – 70 % pacientů, projevy jsou velmi proměnlivé (Dostál, 2001). Velmi častou poruchou při zasažení nervové soustavy bývá tzv. kognitivní dysfunkce, kdy pacienti mají problémy s myšlením, řečí, pamětí, rozpoznáním svých blízkých apod. Objevují se bolesti hlavy, někdy migrenózního typu, méně často se vyskytují epileptické záchvaty, poruchy vidění a mozková mrtvice. Při větším poškození se může rozvinout demence.

Plíce

Nejčastěji pacienti trpí zánětem pohrudnice (pleuritida), to se projevuje bolestivostí při dýchání. Méně často se jedná přímo o zánět plicní tkáně, který způsobuje postupně se rozvíjející dušnost.

Krev

V krevním obraze jde zejména o úbytek červených i bílých krvinek a krevních destiček. Snížení počtu leukocytů vede k poklesu obranyschopnosti organismu.

1.6 Léčba

V období remise by se měl pacient vyhýbat faktorům, které mohou nemoc spouštět. Měl by přiměřeně sportovat, aby udržel svalovou kondici a pohyblivost kloubů. Samozřejmostí je ochrana proti slunečnímu záření, tedy použití krémů s vysokým ochranným faktorem. Dále by se měl vyhýbat i dalším spouštěčům nemoci, tedy vyvarovat se stresu, pobytu v infekčním prostředí a nezdravé životosprávě. Velmi důležité jsou pravidelné lékařské prohlídky.

Léčba lupusu se liší podle závažnosti postižení orgánů. Ve fázi ataky nemoci se podávají imunosupresivně působící léky, např.

- Kortikosteroidy (Prednison, Medrol), které mají protizánětlivé účinky. Jsou podávány zpočátku ve velkých dávkách a častěji, později se dávky zmenšují na nejnižší účinnou dávku.
- Imunosupresiva (Azathiopin, Methotrexát, Cyklofosfamid, Cyklosporin atd.).
- Antimalarika (Hydroxychloroquin, Chloroquin), a to zejména při kožních a kloubních obtížích.
- Antirevmatika a nesteroidní protizánětlivé léky (jako jsou Ibuprofen, Diclofenac, Nimesulid), které potlačují bolesti kloubů.

Určit správnou dávku jednotlivých léčiv je velmi komplikované. Každému pacientovi se lékaři snaží ušít léčbu na míru. Léky však mají hodně vedlejších účinků. V současné době probíhá mnoho klinických studií, které se snaží co nejvíce zvýšit účinnost a bezpečnost léčby, zmírnit nežádoucí účinky a nalézt tak optimální způsob léčení (Czech kidney foundation [online], 2008).

Kapitola 2

Dědičnost SLE a souvislost s etnikem

2.1 Incidence a prevalence

Incidence nemoci se liší v jednotlivých populacích – evropský průměr je 20 – 30 nemocných na 100 000 obyvatel, zatímco například u obyvatel afrokaribského původu činí průměr 206 nových pacientů na stejný počet obyvatel.

Prevalence nemoci v České republice je cca 500 nemocných na 100 000 obyvatel s roční incidencí 10 nově nemocných na 100 000 obyvatel (Dostál a Tegzová, 2009; Turek, 2005).

2.2 Geny všeobecně spjaté s lupusem

Genetická podstata SLE byla poprvé prokázána v roce 1970 v souvislosti s HLA komplexem. Dnes, o více než čtyři desetiletí později a za pomoci stále se rozvíjejících možností genetického výzkumu, je již známo více než 30 genů, které ovlivňují dispozici jednotlivce k lupusu. Více než polovina z těchto genů byla objevena v posledních 3 letech, což podtrhuje mimořádný úspěch v oblasti výzkumu genetiky SLE. Relativně dobře prostudovanými rizikovými faktory jsou zejména alely genů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC – více genů), dále IRF5, ITGAM, STAT4, BLK, BANK1, PDCD1, PTPN22, TNFSF4, TNFAIP3, SPP1, některé z receptorů Fc- γ , geny regulující apoptózu (Fas, FasL) a geny pro některé složky komplementu (např. C1q, C4 a C2).

To, že rozvoj SLE je skutečně podložen geneticky, dokazuje familiární agregace. Autoprotilátky se vyskytují i u zdravých členů rodin nemocných s lupusem. Druhým jasným signálem bylo studium sourozenců a dvojčat. U jednovaječných dvojčat je dokázáno, že pokud má jedno SLE, u druhého je riziko vzplanutí nemoci mnohem vyšší než u běžné populace (24 – 58 %). U sourozenců nemocných je relativní riziko také až 20 % (Dostál, 2001; Vencovský a Dostál, 1998; Vitalion [online], 2011). Dalším zajímavým faktem je, že pokud člověk onemocní SLE, aniž by v rodině měl příbuzného přímo s touto

nemocí, mnohem častěji než u běžné populace se v rodině vyskytují jiná autoimunitní onemocnění (např. roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, . . .), což naznačuje, že některé z uvedených genů se mohou podílet i na rozvoji dalších autoimunitních nemocí.

Geny spojené s rozvojem SLE lze rozdělit do 4 skupin (Lee a Bae, 2010) podle funkce jimi kódovaných proteinů v rámci imunitní odpovědi:

- Geny kódující proteiny, které se účastní vrozené imunitní odpovědi
např. IRF5, STAT4, TNFAIP3, TREX1.
- Geny kódující proteiny, které se podílejí na získané imunitě
např. HLA-DR, PTPN22, PDCD1, STAT4, LYN, BLK, BANK1.
- Geny kódující proteiny podílející se na odstraňování imunokomplexů
např. FCGRs, CRP, ITGAM.
- Geny, které nelze zařadit do žádné z předchozích skupin, ale přesto pravděpodobně ovlivňují vznik SLE
např. KIAA1542, PXX, XKR6, ATG5.

2.3 Geny u různých etnik

I když se tato nemoc vyskytuje celosvětově, některá etnika jsou jí postižena více než jiná. Obecně jsou častěji postiženi Afričané, Hispánci, Asiati, Hawaiiané a původní obyvatelé Ameriky. Je to způsobeno jak odlišným genetickým podkladem, tak různými vnějšími faktory, které na ně působí a mohou tak nemoc spustit v případě pozitivního genetického základu.

Geny podezřelé z účasti na rozvoji SLE můžeme rozdělit podle toho, zda se vyskytují u pacientů v různých etnických skupinách:

- Geny, které mají podobnou nebo shodnou frekvenci výskytu u pacientů se SLE bez ohledu na etnickou příslušnost (celosvětově),
např. geny STAT4, TNFAIP3, BANK1, IRAK1/MECP2.
- Souvisí se SLE jen v rámci určitého etnika,
např. BLK, IRF5.
- Byly nalezeny jen v určitých studiích, tj. kandidátní geny pravděpodobně související se SLE,
např. PTPN22, ITGAM, PXX, LYN.

Jedním z výstupů této práce bylo provedení rešerše literatury studující genetické faktory u SLE u různých etnik. Pro vypracování tohoto úkolu jsem na serveru PubMed zadala vyhledávací spojení „association and SLE and gene“. Podle názvů článků a jejich abstraktů (přes 700) jsem si vypsala, které

DĚDIČNOST SLE A SOUVISLOST S ETNIKEM

geny byly zkoumány v souvislosti s lupusem obecně (bez určení etnické příslušnosti vyšetřovaných pacientů) a pro konkrétní etnika. Výsledky jsou následující.

Obecně zkoumaných genů/jejich variant bylo nalezeno celkem 106 a jsou uvedeny v tabulce 2.1.

Tab. 2.1. Geny zkoumané u SLE pacientů obecně

ACE	EGR2	IL8	MBL2	TLR2
APRIL (TNFSF13)	ERCC2/XPD	IL10	MCP1	TLR4
BANK1	Fc- γ	IL12B	MECP2	TLR5
BCMA	FCGR2B	IL12RB1	MICA	TLR7
BLK	FCGR3A	IL16	MHC2TA	TLR9
BLYS	FCGR3B	IL21	NAT2	TNF
C1Q	FCRL3	IL21R	NRF2	TNF308A
C3	FOXP3	IL21R	OTF3	TNFAIP3
C4	FAS	IL23	OX40L	TNF- α
CD224	HLA-DM	IL23A	P21	TNFR2
CD226	HLA-DR	IL23R	PARP	TNFRSF1B
CD24	HLA-DR3	IRAK1	PD1	TNFRSF13b
CD3Y	HLA-DRB1	IRF1	PDCD1	TNFSF4
CD72	HLA-DQ	IRF2	PON2	TNFSF5
CD154	HLA-DQB1	IRF5	PRKCB	TNFSRF5
CD80	HLA-G	IRF7	PTPN22	XCC1
CD86	IAN5	IRF- α	SELP	XCC2
CRP	IFNA	IRF- γ	SLC5A11	XCC4
CTLA4	IGLV8	ITGAM	SPP1	
CYP2D6	IKBKE	KIAA1542	STAT4	
DNMT1	IL1Ra	MAMDC1	TAP2	
EGFR	IL6	MBL	T-bet	

Geny, které byly zkoumány přímo u pacientů příslušících k určitému světovému etniku, představují další skupinu. Pro zjednodušení byli pacienti rozděleni do 4 velkých etnických skupin (tak, jak je dělí i většina studií na PubMedu), a to na bělochy, Asiaty, afroameričany a Hispánce. Suverénně nejvíce studií bylo popsáno u Asiátů, a to zejména u Číňanů a Japonců. Výsledky pro Asiaty jsou uvedeny v tabulce 2.2, pro bělochy v tabulce 2.3, pro černochoy v tabulce 2.4 a pro Hispánce v tabulce 2.5.

Tab. 2.2. Geny zkoumané u Asiatů

ASIATÉ						
obecně	Čína		Japonsko	Korea	Taiwan	Malajsie
ELF1	ACE	IL10	APRIL	HLA-DR	CD4	IL6
ETS1	Adiponectin gene	IL18	BLK	IL6	FCGR2B	Fc- γ
WDFY4	BANK1	IRF5	CTLA4	IRF5	HLA-DRB1	
	BLK	IRF7	DMA	Fc- γ	IL4	
	C242T	ITGAM	DMB	FOXJ1	IL10	
	CD226	KIAA	Fc- γ	PPAR- γ 2	ITGAM	
	CTLA4	KIR	FCGR2B	PXK	NBS1	
	CYP1A1	NCF2	HLA-DR2	TLR9	TNF- α	
	CYP2E1	OAZ	HLA-DR4	TNF- β	TNF- β	
	eNOS	PTPN22	HLA-DRB1	TNFB	XRCC1	
	ETS1	RasG RP3	IL10	TNFB2		
	Fc- γ	SLC15A4	IRF5			
	FOXP3	STAT4	STAT4			
	GSTT1	STAT6	TAP1			
	GSTM1	TBX21	TAP2			
	HLA-A	TLR9	TNF2			
	HLA-B	TNIP1	TNFAIP3			
	HLA-DR	TNFIP3	TNFR2			
	IKZF1	TNF B	TNFRSF1B			
	IL1	TNFSF4	TNIP1			
	IL4	VISA	TNXB			
			TRAF1			
			TYK2			

Tab. 2.3. Geny zkoumané u bělochů

BĚLOŠI – EVROPANÉ							
Běloši	Evropané	Španělsko	Polsko	Itálie	Island	Německo	Maďarsko
C4	ITGAM	CCR2	ITGAM	IL10	C4	IL6	IL23
Fc- γ	PDCD1	CCR5	PCD1	TNF	HLA-DR		
HLA-DP		CD38	R620W		HLA-DQ		
HLA-DR		CTLA4					
HLA-DQ		HLA-DR					
		HLA-DQ					
		MCP1					
		MYO9B					
		P53					
		TAP2					

Tab. 2.4. Geny zkoumané u černochů

ČERNOŠI – AFROAMERIČANÉ	
ACE	IRF5
C4A	MPO
CD44	MYH9
CTLA-4	NOS2
Fc- γ	SLEH1
HLA-DR	TNF- α
HLA-DQ	

Tab. 2.5. Geny zkoumané u Hispánců

HISPÁNCI			
Hispánci	Mexiko	Chile	Kolumbie
ITGAM	HLA-DRB1	Fc- γ	TAP1
	HSP702		TAP2
	IRF5		
	BLK		
	PTPN22		
	TLR9		
	TNF- α		

Kapitola 3

Příprava metaanalýzy

3.1 Co je metaanalýza?

Metaanalýza je statistická metoda, která kombinuje závěry primárních, stejným problémem se zabývajících a na sobě nezávislých studií do jednoho souhrnného výsledku. Ten má potom větší váhu než výsledky jednotlivých studií, protože zahrnuje mnohem více dat (jedinců). Primární studie bývají vyhledávány v elektronických databázích podle určitých předem stanovených kritérií. Nejčastěji je metaanalytická metoda používána v medicíně a sociálních vědách. Pokud je metaanalýza provedena správně, poskytuje přesnější a objektivnější informace o daném problému než jednotlivé studie (EuroMISE [online], 2006).

Celková velikost skutečného účinku θ se odhaduje jako $\hat{\theta}$ z k jednotlivých studií pomocí odhadů účinku z každé studie ($\hat{\theta}_i, i = 1 \dots k$). Jednotlivé odhady efektů $\hat{\theta}_i$ se v různých metaanalytických metodách odhadují různě.

Existuje více druhů metaanalytických metod, ale obecně je můžeme rozdělit na „fixed effect“ modely (modely pevných efektů, modely s pevně danými účinky) a „random effect“ modely (modely náhodných efektů, modely s náhodnými účinky). Před provedením samotné metaanalýzy je potřeba ověřit homogenitu studií, abychom metodu metaanalýzy zvolili správně.

3.2 Homogenita studií

Mějme skutečnou velikost účinku i té studie θ_i a celkový účinek θ . Studie považujeme za homogenní, jestliže platí $\theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k = \theta$, tedy velikosti účinků v jednotlivých studiích jsou shodné a navíc se rovnají skutečnému celkovému účinku, který je v metaanalýze odhadován.

Vážený průměr odhadů účinku jednotlivých studií $\hat{\theta}$ je dán jako

$$\hat{\theta} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i \hat{\theta}_i}{\sum_{i=1}^k w_i}, \quad (3.1)$$

kde w_i je váha jednotlivých studií definovaná jako

$$w_i = \frac{1}{var_i} = \frac{1}{\frac{1}{a_i} + \frac{1}{b_i} + \frac{1}{c_i} + \frac{1}{d_i}}, \quad (3.2)$$

kde a_i, b_i, c_i a d_i jsou buňky kontingenčních tabulek (viz níže), var_i je rozptyl veličiny $\hat{\theta}_i$. Předpokládáme, že $\hat{\theta}_i$ má přibližně normální rozdělení pravděpodobnosti $N(\theta, var_i)$. Potom $\hat{\theta} \sim N\left(\theta, \frac{1}{\sum_{i=1}^k w_i}\right)$ a používá se k výpočtu intervalu spolehlivosti pro θ .

3.3 Teorie – Testování homogenity studií Q testem

Pro ověření homogenity studií se používá několik sobě podobných metod, které jsou založeny na χ^2 nebo F statistice. Nejčastěji používanou metodou je tzv. Cochranův (Q) test. Ten pokládá nulovou hypotézu $H_0 : \theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k$. Proti ní je postavena alternativní hypotéza H_1 : alespoň jedna θ_i se liší od ostatních (Sutton et al., 2002).

Q statistika je dána jako součet čtverců odchylek odhadů účinku jednotlivých studií od celkového odhadu účinku. Q statistika má za platnosti nulové hypotézy χ^2 rozdělení pravděpodobnosti s $k - 1$ stupni volnosti, k je počet zahrnutých studií. Testová statistika vypadá následovně (Sutton et al., 2002):

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i (\hat{\theta}_i - \hat{\theta})^2, \quad (3.3)$$

kde $\hat{\theta}$ je dána vztahem (3.1), w_i je váha jednotlivých studií definovaná vztahem (3.2) a $\hat{\theta}_i$ je definováno jako $\ln(OR_i)$.

Pro početní potřeby se používá upravený vzorec

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i \hat{\theta}_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^k w_i \hat{\theta}_i\right)^2}{\sum_{i=1}^k w_i}. \quad (3.4)$$

Pokud je výsledná hodnota testové statistiky vyšší než kritická hodnota daného rozdělení pravděpodobnosti na předem určené hladině významnosti (většinou 0,05) a pro $(k - 1)$ stupňů volnosti, zamítáme nulovou hypotézu o homogenitě studií.

Příklad

Jako příklad uvádím výpočet homogenity studií u genotypu AA (rs352139). Data potřebná k výpočtu jsou uvedena v tabulce 3.1. Budu testovat na hladině významnosti 0,05.

Tab. 3.1. Data genotypu AA polymorfismu rs352139 ze 4 studií

Studie	Pacientů	Kontrol	Pacientů AA (a)	Kontrol AA (c)	Pacientů jiný (b)	Kontrol jiný (d)
PDF2	323	310	101	96	222	214
PDF3	315	338	48	54	267	284
PDF5	220	203	49	61	171	142
PDF6	438	781	179	341	259	440

Nejprve si připravím mezivýpočty – tabulka 3.2.

Tab. 3.2. Mezivýpočty pro test homogenity studií AA rs352139

$OR_1 = 1,014$	$\hat{\theta}_1 = 0,014$	$var_{\ln(OR)1} = 0,0295$	$w_1 = 33,89$
$OR_2 = 0,945$	$\hat{\theta}_2 = -0,056$	$var_{\ln(OR)2} = 0,0466$	$w_2 = 21,46$
$OR_3 = 0,667$	$\hat{\theta}_3 = -0,405$	$var_{\ln(OR)3} = 0,0497$	$w_3 = 20,12$
$OR_4 = 0,892$	$\hat{\theta}_4 = -0,115$	$var_{\ln(OR)4} = 0,0146$	$w_4 = 68,49$

Samotný výpočet vypadá následovně:

$$Q = 33,89 \cdot 0,014^2 + 21,46 \cdot (-0,056)^2 + 20,12 \cdot (-0,405)^2 + 68,49 \cdot (-0,115)^2 - \frac{[33,89 \cdot 0,014 + 21,46 \cdot (-0,056) + 20,12 \cdot (-0,405) + 68,49 \cdot (-0,115)]^2}{33,89 + 21,46 + 20,12 + 68,49}$$

$$\vdots$$

$$Q = 2,33$$

Kritická hodnota pro χ^2 rozdělení pravděpodobnosti se 3 stupni volnosti je 7,815. Protože je tedy výsledná hodnota testové statistiky nižší než kritická hodnota, nezamítám nulovou hypotézu a homogenitě dat ve studiích.

Interpretace výsledku testu homogenity ale není tak jednoduchá, protože Q test i jiné testy homogenity mají jisté nedostatky. Jde zejména o to, že síla testu bývá při malém počtu sjednocovaných studií malá. Tedy heterogenita nemusí být odhalena, přestože je značná, a to proto, že test má v případě malého počtu sjednocovaných studií malou sílu. Naopak test může objevit variabilitu i tam, kde ve skutečnosti není tak značná, a to díky velkému počtu sjednocovaných studií, protože v tom případě má Q test zase naopak sílu velkou (Huedo-Medina et al., 2006; Sutton et al., 2002).

Pravděpodobnost chyby se zvyšuje také faktem, že studie, které nenalezly skutečné efekty, jsou publikovány méně než ty, které opravdu odhalily nějaký vliv (Sutton et al., 2002).

A čím může být vlastně heterogenita způsobena? Může jít o prostou náhodu nebo o nepravou heterogenitu způsobenou různými měřítky ve studiích, také charakteristikami vstupních dat a nebo může být prostě nevysvětlitelná (Sutton et al., 2002).

3.4 Teorie – Testování homogenity studií pomocí I^2 indexu

Výše popsaný Q test, který je v metaanalýzách velmi často používán, nás informuje pouze o tom, zda homogenita je nebo není přítomna, ale neříká nám nic o její míře, stupni. Proto se také často společně s Q testem používá výpočet I^2 indexu, který udává stupeň heterogenity studií v metaanalýze. I když I^2 index je velmi prospěšným a vhodným doplněním samotného Q testu, stejně jako on je ovlivněn velikostí vzorku, tedy má při malém množství dat malou sílu (Huedo-Medina et al., 2006).

I^2 může být interpretován jako procento celkové variability. Je dán vzorcem

$$I^2 = \begin{cases} \frac{Q - (k - 1)}{Q} \cdot 100 & , Q > (k - 1) \\ 0 & , Q < (k - 1). \end{cases} \quad (3.5)$$

Pokud $I^2 = 0$, znamená to, že variabilita odhadů účinku je způsobena vzorkovací chybou. $I^2 = 50$ říká, že polovina veškeré heterogenity je způsobena skutečnou rozdílností studií. Bylo navrženo, aby $I^2 = 25$, 50 a 75 znamenalo nízkou, střední a vysokou míru heterogenity (Huedo-Medina et al., 2006).

Pokud $I^2 \neq 0$, je doporučeno pro správnou interpretaci I^2 indexu vypočítat i $100(1 - \alpha)\%$ interval spolehlivosti (IS). K jeho výpočtu se používá jiná míra heterogenity, známá též jako Birgeův poměr (Birge's ratio, poprvé popsán Birgeem v roce 1932) (Huedo-Medina et al., 2006). Je definován jako

$$H^2 = \frac{Q}{k - 1}. \quad (3.6)$$

I^2 index je potom dán vztahem

$$I^2 = \frac{H^2 - 1}{H^2} \cdot 100 \quad (3.7)$$

a $100(1 - \alpha)\%$ interval spolehlivosti jako

$$\exp\{\ln(H) \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot SE [\ln(H)]\}. \quad (3.8)$$

$z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ je $100(1 - \frac{\alpha}{2})\%$ kvantil standardního normálního rozdělení pravděpodobnosti, pro hladinu významnosti 0,05 je tato hodnota 1,96, a $SE [\ln(H)]$ je směrodatná odchylka $\ln(H)$ definovaná jako

$$SE [\ln(H)] = \begin{cases} \frac{\ln(Q) - \ln(k-1)}{2 \cdot (\sqrt{2Q} - \sqrt{2k-3})} & , Q > k \\ \sqrt{\frac{1}{2 \cdot (k-2)} \cdot \left(1 - \frac{1}{3 \cdot (k-2)^2}\right)} & , Q \leq k. \end{cases} \quad (3.9)$$

Nesmíme zapomenout, že daný IS je v měřítku H . Pro přepočítání na jednotky I^2 je potřeba použít rovnici (3.7).

Příklad

Jako příklad použijme jiný polymorfismus, u kterého Q statistika ukázala, že studie nejsou homogenní. Jedná se o rs187084. Q statistika daná softwarem R má hodnotu 8,96. Nejprve vypočítám samotnou hodnotu I^2 indexu pomocí rovnic (3.6) a (3.7), tedy

$$H^2 = \frac{8,96}{4-1} \doteq 2,9867$$

$$I^2 = \frac{2,9867 - 1}{2,9867} \cdot 100 \doteq 66,52$$

Více než 66 % heterogenity je dáno skutečnou rozdílností mezi studiemi. Nyní ještě dopočítám IS. Nejprve potřebuji vypočítat směrodatnou odchylku:

$$SE [\ln(H)] = \frac{\ln(8,96) - \ln(4-1)}{2 \cdot (\sqrt{2 \cdot 8,96} - \sqrt{2 \cdot 4 - 3})} = \dots = 0,2733$$

Nyní lze snadno dopočítat 95% IS pro H :

$$\exp(\ln\sqrt{2,9867} \pm 1,96 \cdot 0,2733)$$

$$\vdots$$

$$[1,0115; 2,5929]$$

Nakonec je potřeba IS převést zpět na I^2 měřítko, tedy meze IS dosadím za H do rovnice (3.7). Výsledný IS je nakonec $I^2 = [2,26; 88,53]$.

3.5 Fixed a random effects modely

Pokud jsou použité studie homogenní, můžeme použít jeden z fixed effects modelů. Pak se předpokládá, že studie odhadují jeden skutečný základní efekt. V případě, že vybrané studie předpoklad homogenity nespĺňují – jsou heterogenní, používá se k jejich metaanalýze vhodně zvolený random effects model (Sutton et al., 2002).

Fixed effects metod máme na výběr hned několik – obecná fixed effect metoda (general fixed effects model), Mantel-Haenszelova metoda (Mantel-Haenszel method), Petoova metoda (Peto's method), technika maximální věrohodnosti (maximum-likelihood techniques) (Sutton et al., 2002) a další. V této práci byla v první metaanalýze splněna homogenita studií, proto jsem použila fixed effects model. Vybrala jsem Mantel-Haenszelův (M-H) model, protože je doporučován pro metaanalýzy s menším počtem slučovaných studií, a také proto, že je implementován ve statistickém softwaru R.

Pokud však homogenita není splněna, není možné fixed effects modely použít. Než abychom dopodrobna pátrali po příčinách heterogenity a snažili se ji vysvětlit, můžeme raději použít random effects modely, které homogenitu dat nepředpokládají, ale naopak berou v úvahu to, že studie odhadují různé efekty. Uvažují dva prameny variability, jak variabilitu mezi studii, tak v rámci jednotlivých studií. Při jejich realizaci je snižována relativní váha studií o velkém počtu dat a jedinců a naopak je zvýšena váha menších studií. Tím je heterogenita studií zohledněna (Sutton et al., 2002).

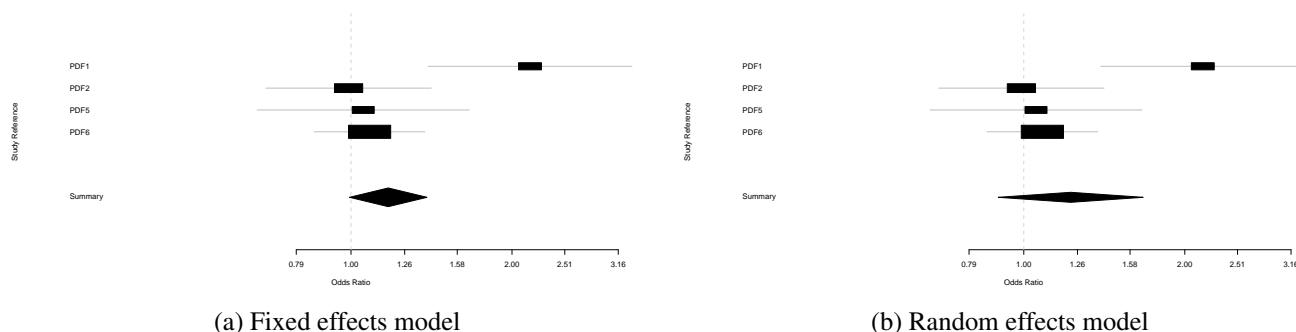
Random effects modely mívají širší interval spolehlivosti (IS) odhadu odds ratio než fixed effects modely. Pokud bychom použili fixed effects model na nehomogenní studie, jeho užší interval spolehlivosti by nemusel překrývat hodnotu 1, čímž bychom dokázali statisticky významný vliv genotypu na rozvoj nemoci, což by byl ale nesprávný závěr. S použitím správného modelu je však IS širší a pravděpodobněji tak překryje hodnotu 1, což znamená, že v dané metaanalýze jsme nedokázali statisticky významný vliv, a to je správný závěr.

Příklad nesprávného a správného použití těchto metod vidíme v tabulce 3.3 a na grafech 3.1a a 3.1b. Pokud bychom na tyto nehomogenní studie (jde o genotyp TT polymorfismu rs187084) použili fixed effects model (obr. 3.1a), málem bychom chybně dokázali statisticky významný vliv. Naopak při použití správného modelu (random effects model, obr. 3.1b) daný IS „spolehlivě“ překrývá hodnotu 1, tedy statisticky významný efekt není dokázán, což je správně.

Ve druhé metaanalýze této práce právě nebyla splněna homogenita vybraných studií, proto jsem pro tento případ vybrala jeden z random effects modelů. Konkrétně se jedná o model DerSimonian-Lairdové (DS-L), který je nejčastěji používaným random effects modelem a je také implementován v softwaru R.

Tab. 3.3. Rozdílné hodnoty odds ratio při použití fixed a random effects modelu

Studie	Fixed effects model		Random effects model	
	Jednotlivá OR	Celkové M-H OR	Jednotlivá OR	Celkové DS-L OR
PDF1	2,16 (1,39 – 3,35)	1,17 (0,99 – 1,39)	2,16 (1,39 – 3,35)	1,22 (0,9 – 1,67)
PDF2	0,99 (0,69 – 1,41)		0,99 (0,69 – 1,41)	
PDF5	1,05 (0,67 – 1,66)		1,05 (0,67 – 1,66)	
PDF6	1,08 (0,85 – 1,37)		1,08 (0,85 – 1,37)	



Obr. 3.1. Grafická ukázka rozdílu v použití fixed a random effects modelu

3.6 Teorie – Odds ratio

Odds ratio (OR) je česky obvykle překládáno jako poměr šancí, i když se většinou jedná o šance na negativní událost, např. rozvoj nemoci nebo smrt. Je zde zmíněno proto, že se s ním často počítá v metaanalýzách. OR lze v medicíně chápat jako podíl výskytu faktoru u nemocných a výskytu faktoru u zdravých jedinců. Nejlépe to můžeme znázornit pomocí kontingenční tabulky (jako je tabulka 3.4).

Tab. 3.4. Příklad kontingenční tabulky pro výpočet OR

Faktor	nemocní	zdraví	celkem
ano	a	c	$a + c$
ne	b	d	$b + d$
celkem	$a + b$	$c + d$	n

Odds ratio spočítáme jako podíl výrazů $\frac{a}{c}$ a $\frac{b}{d}$, tedy

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}. \quad (3.10)$$

Vyjde-li odds ratio 1, jde o náznak, že událost (nemoc, smrt) je stejně pravděpodobná v obou skupinách (s faktorem i bez něj). Tuto interpretaci je nutné podložit výpočtem intervalu spolehlivosti (IS). Vychází se z faktu, že logaritmická škála OR má přibližně normální rozdělení pravděpodobnosti. Nejprve tedy vypočítáme $\ln(OR)$ a rozptyl $var_{\ln(OR)}$, který je definována takto:

$$var_{\ln(OR)} = \frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}. \quad (3.11)$$

Potom IS logaritmu OR na předem určené hladině významnosti vypočítáme jako

$$\ln(OR) \pm z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \sqrt{var_{\ln(OR)}}, \quad (3.12)$$

kde $z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ je $100(1 - \frac{\alpha}{2})\%$ kvantil standardizovaného normálního rozdělení pravděpodobnosti (pro 95% IS je to 1,96). Tento IS převedeme na IS s normální číselnou škálou tak, že každou mezí intervalu umocním Eulerovo číslo e (transformace inverzní k logaritmu).

Příklad

Jednoduchou kontingenční tabulku můžu vytvořit z dat každé jednotlivé studie, které budu později využívat v metaanalýze. Předběhnu-li, tak např. kontingenční tabulka dat ukazujících počty pacientů a kontrol s AA genotypem polymorfismu rs352139 ve studii PDF2 (kapitola 4) může vypadat následovně (tab. 3.5).

Tab. 3.5. Kontingenční tabulka pro genotyp AA (rs352139) ze studie PDF2

genotyp	pacienti	kontroly	celkem
AA	101	96	197
jiný	222	214	436
celkem	323	310	633

Z této tabulky mohu vypočítat OR pro genotyp AA (kolikrát větší šanci pro vznik SLE mají jedinci s AA genotypem).

Výpočet je jednoduchý:

$$OR_{AA} = \frac{101 \cdot 214}{96 \cdot 222} = \frac{21614}{21312} \doteq 1,0142.$$

Tento výsledek lze interpretovat tak, že jedinci s genotypem AA mají 1,0142x větší „šanci pro rozvoj SLE“. K tomuto OR je nutné dopočítat příslušný interval spolehlivosti (používám standardní 95% IS). Nejprve spočítám rozptyl $\ln(OR)$.

$$var_{\ln(OR)} = \frac{1}{101} + \frac{1}{96} + \frac{1}{222} + \frac{1}{214} \doteq 0,0295$$

Pro samotný výpočet IS použiju vzorec (3.12).

$$\begin{aligned} \ln(1,0142) \pm 1,96 \cdot \sqrt{0,0295} \\ \vdots \\ [-0,32; 0,35] \end{aligned}$$

V posledním kroku převedu logaritmickou škálu IS na číselnou:

$$[e^{-0,32}, e^{0,35}] = [0,72; 1,42]$$

Nyní, když IS skutečně zahrnuje číslo 1, mohu říci, že genotyp v této studii nemá vliv na rozvoj SLE.

3.7 Teorie – Mantel-Haenszelova metoda metaanalýzy

Mantel-Haenszelova metoda je jednou z nejpoužívanějších fixed effects metod metaanalýzy. Tato metoda odhaduje souhrnné OR pomocí jednotlivých OR zahrnovaných studií. Tuto metodu jako první definovali Mantel a Haenszel. Souhrnný odhad OR ($\hat{\theta}_{MH(OR)}$) se počítá následovně (Sutton et al., 2002):

$$\hat{\theta}_{MH(OR)} = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{a_i d_i}{n_i}}{\sum_{i=1}^k \frac{b_i c_i}{n_i}}, \quad (3.13)$$

kde a_i , b_i , c_i a d_i jsou buňky čtyřpolních kontingenčních tabulek z $i = 1 \dots k$ studií.

Dále se doporučuje vypočítat i $100(1 - \alpha)\%$ interval spolehlivosti. K tomu nejdříve potřebujeme znát rozptyl daného odhadu.

Ten vypočítáme následovně:

$$var_{MH(OR)} = \frac{\sum_{i=1}^k P_i R_i}{2 \cdot \left(\sum_{i=1}^k R_i\right)^2} + \frac{\sum_{i=1}^k (P_i S_i + Q_i R_i)}{2 \cdot \left(\sum_{i=1}^k R_i\right) \cdot \left(\sum_{i=1}^k S_i\right)} + \frac{\sum_{i=1}^k Q_i S_i}{2 \cdot \left(\sum_{i=1}^k S_i\right)^2}, \quad (3.14)$$

kde $P_i = \frac{a_i+d_i}{n_i}$, $Q_i = \frac{b_i+c_i}{n_i}$, $R_i = \frac{a_i d_i}{n_i}$ a $S_i = \frac{b_i c_i}{n_i}$.

100(1 - α)% interval spolehlivosti pro souhrnné OR (θ) je potom dán vzorcem

$$\exp \left[\ln \left(\hat{\theta}_{MH(OR)} \right) - z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{var_{MH(OR)}} \right] \leq \theta \leq \exp \left[\ln \left(\hat{\theta}_{MH(OR)} \right) + z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{var_{MH(OR)}} \right], \quad (3.15)$$

kde $z_{1-\frac{\alpha}{2}}$ je 100(1 - $\frac{\alpha}{2}$)% kvantil standardního normálního rozdělení pravděpodobnosti. Platí stejná interpretace jako u jednoduchého OR, tedy pokud IS zahrnuje hodnotu 1, metaanalýza neukázala na statisticky významný efekt.

Příklad

Použiju stejný genotyp jako v příkladu předchozím. Je dobře vidět, že v tabulce 3.1, kterou použijeme k výpočtu Mantel-Haenszelova OR, je uvedena kontingenční tabulka (tab. 3.5) zapsána do jednoho řádku. Výpočet Mantel-Haenszelova OR potom vypadá následovně:

$$\hat{\theta}_{MH(OR)} = \frac{\left[\left(\frac{101 \cdot 214}{323 + 310} \right) + \dots + \left(\frac{179 \cdot 440}{438 + 781} \right) \right]}{\left[\left(\frac{222 \cdot 96}{323 + 310} \right) + \dots + \left(\frac{259 \cdot 341}{438 + 781} \right) \right]} = \dots \doteq 0,89$$

Dále určím 95% IS. Předem si vypočtu hodnoty P_i , Q_i , R_i a S_i . Vše je uvedeno v tabulce 3.6. Potom už počítám podle rovnice (3.14).

$$var_{MH(OR)} = \frac{0,498 \cdot 34,145 + 0,508 \cdot 20,876 + 0,857 \cdot 16,449 + 0,508 \cdot 64,610}{2 \cdot (34,145 + 20,876 + 16,449 + 64,610)^2} +$$

$$+ \frac{(0,498 \cdot 33,668 + 0,502 \cdot 34,145) + \dots + (0,508 \cdot 72,452 + 0,492 \cdot 64,610)}{2 \cdot (34,145 + 20,876 + 16,449 + 64,610) \cdot (33,668 + 22,080 + 24,660 + 72,452)} +$$

$$+ \frac{0,502 \cdot 33,668 + 0,492 \cdot 22,080 + 0,548 \cdot 24,660 + 0,492 \cdot 72,452}{2 \cdot (33,668 + 22,080 + 24,660 + 72,452)^2} = \dots \doteq 0,007372$$

Tab. 3.6. Přichystané hodnoty P_i , Q_i , R_i a S_i pro výpočet IS OR genotypu AA (rs352139)

P_i	Q_i	R_i	S_i
$P_1 = 0,498$	$Q_1 = 0,502$	$R_1 = 34,145$	$S_1 = 33,668$
$P_2 = 0,508$	$Q_2 = 0,492$	$R_2 = 20,876$	$S_2 = 22,080$
$P_3 = 0,857$	$Q_3 = 0,548$	$R_3 = 16,449$	$S_3 = 24,660$
$P_4 = 0,508$	$Q_4 = 0,492$	$R_4 = 64,610$	$S_4 = 72,452$

Tento výsledek použiju pro výpočet intervalu spolehlivosti podle rovnice (3.15).

$$\begin{aligned} \exp \left[\ln(0,89) - 1,96 \cdot \sqrt{0,007372} \right] &\leq \theta \leq \exp \left[\ln(0,89) + 1,96 \cdot \sqrt{0,007372} \right] \\ &\vdots \\ 0,749 &\leq \theta \leq 1,049 \end{aligned}$$

Výsledný 95% interval spolehlivosti je tedy $[0,749; 1,049]$.

3.8 Teorie – Metaanalytická metoda DerSimonian-Lairdové

Tento model je jeden ze základních tzv. random effects modelů metaanalýz. Standardní random effects model, který je velmi často v metaanalýzách používán, byl poprvé popsán DerSimonianovou a Lairdovou. Model předpokládá, že rozdíly mezi studii pocházejí z náhodného rozdělení, které má však pevnou střední hodnotu a rozptyl (Sutton et al., 2002).

Z předchozích 2 podkapitol již víme, jak je definována statistika Q – rovnice (3.4), také proměnné $\hat{\theta}_i$ a w_i . Pro přehlednost je tady raději definujme ještě jednou, a také další výrazy, které jsou potřeba k výpočtu souhrnného bodového odhadu OR. Mějme tedy

$$\hat{\theta}_i = \ln(OR_i) \quad (3.16)$$

$$w_i = \frac{1}{var_i} = \frac{1}{\frac{1}{a_i} + \frac{1}{b_i} + \frac{1}{c_i} + \frac{1}{d_i}} \quad (3.17)$$

$$Q = \sum_{i=1}^k w_i \hat{\theta}_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^k w_i \hat{\theta}_i \right)^2}{\sum_{i=1}^k w_i} \quad (3.18)$$

$$\bar{w} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i}{k} \quad (3.19)$$

$$s_w^2 = \frac{1}{k-1} \left[\left(\sum_{i=1}^k w_i^2 \right) - k\bar{w}^2 \right] \quad (3.20)$$

$$U = (k-1) \left(\bar{w} - \frac{s_w^2}{k\bar{w}} \right) \quad (3.21)$$

$$\hat{\tau}^2 = \begin{cases} \frac{Q - (k-1)}{U} & , Q > (k-1) \\ 0 & , Q < (k-1). \end{cases} \quad (3.22)$$

$$w_i^* = \frac{1}{\frac{1}{w_i} + \hat{\tau}^2} \quad (3.23)$$

Souhrnný bodový odhad v logaritmické škále ($\hat{\theta}_i = \ln(OR_i)$) potom vypočítáme pomocí výše uvedených vzorců jako

$$\hat{\theta}_{RND(\ln(OR))} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i^* \hat{\theta}_i}{\sum_{i=1}^k w_i^*} \quad (3.24)$$

a jeho skutečnou hodnotu jako

$$\hat{\theta}_{RND} = e^{\hat{\theta}_{RND(\ln(OR))}}. \quad (3.25)$$

A co vlastně jednotlivé proměnné znamenají?

$\hat{\theta}_i$ je odhad efektu genotypu v jednotlivých studiích

w_i je váha jednotlivých studií

Q je testová statistika pro testování homogenity dat ve studiích

\bar{w} je střední hodnota vah jednotlivých studií

s_w^2 je rozptyl vah jednotlivých studií

$\hat{\tau}^2$ je rozptyl odhadů efektů jednotlivých studií

w_i^* je upravená váha jednotlivých studií

Nakonec ještě dopočítáme $100(1 - \alpha)\%$ IS pro souhrnné OR (θ), a to podle vzorce

$$\hat{\theta}_{RND} - \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}}}{\sqrt{\sum_{i=1}^k w_i^*}} \leq \theta \leq \hat{\theta}_{RND} + \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}}}{\sqrt{\sum_{i=1}^k w_i^*}}. \quad (3.26)$$

Opět pro IS platí stejná interpretace, zahrnuje-li hodnotu 1, metaanalýza neukázala na staticky významný vliv.

Příklad

Celý tento postup ukážu na příkladu genotypu TT polymorfismu rs187084, u něhož nebyla splněna homogenita studií. S metodou DerSimonian-Lairdové pracuji v kapitole 5. Data pro výpočet souhrnného bodového odhadu OR a následně i intervalu spolehlivosti jsou uvedena v tabulce 3.7.

Tab. 3.7. Data pro TT rs187084 pro ukázkou výpočtu odhadu OR podle DerSimonian-Lairdové

Studie	Pacienti TT	Kontroly TT	Pacienti jiný	Kontroly jiný
PDF1	123	119	44	92
PDF2	80	102	168	212
PDF5	49	51	134	147
PDF6	194	335	232	434

Dále si připravím potřebné mezivýpočty (tabulka 3.8).

Tab. 3.8. Mezivýpočty TT rs187084 pro ukázkou výpočtu odhadu OR podle DerSimonian-Lairdové

$\hat{\theta}_1 =$	0,771	$var_{\ln(OR)1} =$	0,050	$w_1 =$	19,948
$\hat{\theta}_2 =$	-0,011	$var_{\ln(OR)2} =$	0,033	$w_2 =$	30,328
$\hat{\theta}_3 =$	0,053	$var_{\ln(OR)3} =$	0,054	$w_3 =$	18,423
$\hat{\theta}_4 =$	0,080	$var_{\ln(OR)4} =$	0,015	$w_4 =$	67,777

Potom mohu vypočítat konkrétní hodnoty proměnných:

$$Q = 19,948 \cdot 0,771^2 + 30,328 \cdot (-0,011)^2 + 18,423 \cdot 0,053^2 + 67,777 \cdot 0,080^2 - \frac{[19,948 \cdot 0,771 + 30,328 \cdot (-0,011) + 18,423 \cdot 0,053 + 67,777 \cdot 0,080]^2}{19,948 + 30,328 + 18,423 + 67,777} = \dots = 8,970$$

$$\bar{w} = \frac{19,948 + 30,328 + 18,423 + 67,777}{4} = 34,119$$

$$s_w^2 = \frac{1}{3} [(19,948^2 + 30,328^2 + 18,423^2 + 67,777^2) - 3 \cdot 34,119^2] = 919,507$$

$$U = 3 \left(34,119 - \frac{919,507}{4 \cdot 34,119} \right) = 82,115$$

$$\hat{\tau}^2 = \frac{8,970 - 3}{82,115} = 0,073$$

$$w_1^* = \frac{1}{\frac{1}{19,948} + 0,073} = 8,121$$

$$w_2^* = \frac{1}{\frac{1}{30,328} + 0,073} = 9,436$$

$$w_3^* = \frac{1}{\frac{1}{18,423} + 0,073} = 7,857$$

$$w_4^* = \frac{1}{\frac{1}{67,777} + 0,073} = 11,395$$

$$\hat{\theta}_{RND(\ln(OR))} = \frac{8,121 \cdot 0,771 + 9,436 \cdot (-0,011) + 7,857 \cdot 0,053 + 11,395 \cdot 0,080}{8,121 + 9,436 + 7,857 + 11,395} \doteq 0,20336$$

$$\rightarrow \hat{\theta}_{RND} \doteq e^{0,20336} \doteq 1,2255$$

Nyní ještě dopočítám 95% IS pro celkové OR (θ). Vycházím ze vzorce (3.26).

$$1,2255 - \frac{1,96}{\sqrt{8,121 + 9,436 + 7,857 + 11,395}} \leq \theta \leq 1,2255 + \frac{1,96}{\sqrt{8,121 + 9,436 + 7,857 + 11,395}}$$

$$\vdots$$

$$0,90 \leq \theta \leq 1,55$$

Výsledný IS je tedy [0,90; 1,55].

3.9 Výběr genu

Při volbě genu vhodného pro metaanalýzu se vyskytly jisté problémy. Od doby zadání práce po vypracování metaanalýzy, tedy v průběhu asi 1 roku, bylo u genů souvisejících s lupusem publikováno mnoho metaanalýz, v posledním roce konkrétně 7. Celkem jsem našla 17 metaanalýz (viz tabulka 3.9)

Tab. 3.9. Dosud publikované metaanalýzy

Analyzovaný gen	Měsíc a rok vydání	Analyzovaný gen	Měsíc a rok vydání
BANK1	leden 2011	PDCD1	duben 2009
ITGAM	leden 2011	TNF II	březen 2007
PTPN22	leden 2011	HLA-DRB1	únor 2008
TNFAIP3	leden 2011	HLA-DQB1	únor 2008
BLK	prosinec 2010	ACE	duben 2006
TNF- α	červen 2010	MBL	prosinec 2005
Fc- γ	březen 2010	IL10	listopad 2005
STAT4	leden 2010	CTLA4	duben 2005
IRF5	srpen 2009		

Tím se mi výběr genu vhodného pro metaanalýzu velmi zúžil. V rámci zadání jsem měla analyzovat gen, který bude s lupusem jasně souviset a bude o něm publikováno dost studií na to, aby se mezi nimi daly vybrat ty, které budou použitelné pro metaanalýzu (pro tuto práci jsem vybírala pouze case-control studie). Jediným vhodným genem se zdá být gen pro TLR9, o němž jsem v souvislosti se SLE na serveru PubMed našla 15 článků a současně dosud nebyla publikována žádná metaanalýza.

3.10 TLRs – Toll-like receptors

Název genové rodiny TLRs, tedy Toll-like receptors, je odvozen z německého výrazu „toll“ = zmatený. Poprvé bylo tohoto označení použito u mušky Octomilky (*Drosophila melanogaster*). U ní je znám membránový receptor zvaný Toll, který, pokud je mutací deaktivován, způsobuje „zmatený“ vývoj larev. U dospělců Octomilek však tento receptor pomáhá při boji proti infekcím a plísním. Vědci předpokládali, že u savců existuje podobný imunitní systém jako Toll u Octomilek a skutečně u nich byly později nalezeny receptory, které se stavbou velmi podobají Toll receptoru. Byly pojmenovány Toll-like receptors, tedy receptory podobné Toll molekule. Dnes jich známe celkem 10 (TLR-1 – TLR-10) a pravděpodobně existují ještě 3 další typy (Hořejší, 2004).

TLRs jsou považovány za jedny z nejdůležitějších molekul při rozpoznání patogenu a aktivaci vrozené imunity. Jsou to transmembránové proteiny, které na sebe vážou příslušný ligand. Tím bývá určitý

lipopolysacharid, lipoprotein, úlomky bakteriálních bičků, bakteriální DNA, virová RNA a další antigeny nebo jejich fragmenty. Po jejich navázání na TLR je spuštěna kaskáda intracelulárních procesů a tím zahájena rychlá obranná reakce organismu. Už toto samo o sobě je staví na přední příčky významnosti pro imunitní pochody. TLRs však exprimují i dendritické buňky, které jsou součástí specifické imunitní reakce a fungují jako antigen prezentující buňky (APC – antigen-presenting cell). Antigeny jsou rozpoznány receptory na povrchu T-lymfocytů, které spouštějí proliferaci a diferenciaci lymfocytů, což aktivuje buněčnou i humorální imunitní odpověď.

3.11 TLR9

Receptor TLR9, jinak nazvaný také CD289, může být aktivován nemetylovaným cytidin-fosfát-guanosin (CpG) dinukleotidem. Ten je obsažen v DNA bakterií, ale nikoli člověka. TLR9 vytváří signály, které aktivují buňky k prozánětlivé reakci. Ta vede ke tvorbě cytokinů (např. interferonu 1 a IL-12).

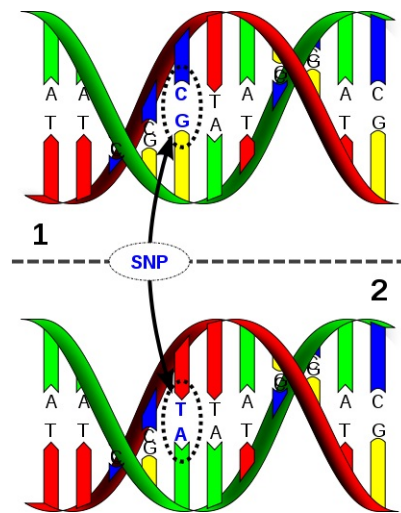
Gen pro TLR9 leží člověka na chromozomu 3 (3p21.3). Nejčastěji je exprimován dendritickými buňkami, B-lymfocyty a NK buňkami (natural killer), a to zejména ve tkáních bohatých na tyto buňky, jako je slezina, lymfatické uzliny, červená kostní dřeň a krev.

3.12 Polymorfismy genu TLR9

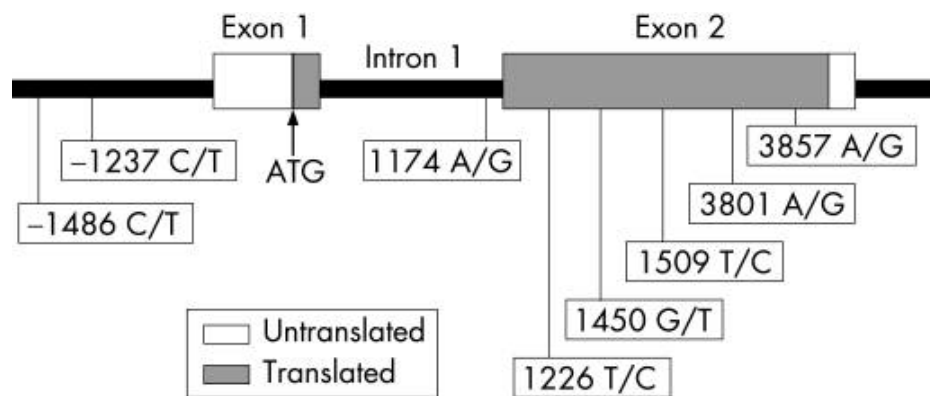
Ve studiích zabývajících se úlohou TLR9 genu při vzniku SLE jsou zkoumány různé jeho varianty. Všechny studie zkoumaly tzv. SNP, tedy jednonukleotidové polymorfismy (z angl. Single-Nucleotide Polymorphism, ukázka SNP je na obrázku 3.2, převzato z <http://cs.wikipedia.org>). Jedná se o odchylky v sekvenci DNA, u SNP konkrétně o jednoduchou záměnu jednoho nukleotidu za jiný. Vzácnější alela se musí vyskytovat alespoň u 1 % populace, abychom vůbec mohli hovořit o polymorfismu. Jinak by se jednalo pouze o vzácnou mutaci.

Nejčastěji zkoumané polymorfismy TLR9 genu jsou znázorněny na obrázku 3.3 (převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1955115/>).

Popis obr. 3.3: exon je část genu, která se přepisuje do sekvence aminokyselin a podílí se tak na tvorbě požadovaného polypeptidu (bílkoviny). Intron je část genu, která není přepisována do sekvence polypeptidů, protože ještě před samotnou translací probíhá sestřih (splicing), při kterém jsou introny vystřiženy. Jejich význam není zatím zcela jasný. ATG na obrázku je tzv. start kodon, u kterého začíná translace daného genu. Nese číslo 1 a SNP jsou počítány od něj (před ním se znaménkem minus, za ním se znaménkem plus). Šedě vyplněná pole znázorňují oblasti exonů, které jsou přepisovány, nepřepisované oblasti jsou znázorněny bílou barvou. Jednotlivé polymorfismy nesou číslo podle počtu nukleotidů před nebo za start kodonem a počáteční písmena zaměněných nukleotidů. SNPs se označují přesněji zkratkou „rs“ a šesti nebo sedmimístným číselným kódem. Tím je polymorfismus jasně definován.



Obr. 3.2. Ukázka jednonukleotidového polymorfismu



Obr. 3.3. Polymorfismy u genu TLR9

3.13 ACR kritéria pro diagnostiku SLE

Všechny studie zahrnuté do metaanalýzy deklarovaly, že pacienti se SLE splnili ACR (American College of Rheumatology) criteria for SLE. American College of Rheumatology je organizace lékařů a zdravotníků, kteří se specializují na artritidu a jiná onemocnění kostí, kloubů a svalů. Tato skupina vytvořila v roce 1971 první klasifikační kritéria pro SLE. Jejich aktualizace potom byly provedeny v letech 1982 a 1996.

Kritéria jsou následující:

- Motýlovitý ekzantém (malar rash) – vystupující ekzém na lících
- Diskoidní ekzantém (discoid rash) – červené šupinaté skvrny způsobující svědění
- Fotosensitivita – zvýšená citlivost na sluneční záření způsobující vyrážku
- Ulcerace v ústní dutině (afty) – zahrnuje ulcerace v ústech i nose (bez zjevné příčiny)
- Neerozivní artritida – zánět dvou a více periferních kloubů (otok, citlivost)
- Serositida – zánět pohrudnice nebo osrdečníku (výpotek v osrdečníku)
- Renální poruchy – proteinurie, tvorba „srpků“
- Neurologické poruchy – záchvaty, psychóza (bez jiné příčiny)
- Hematologické poruchy – hemolytická anémie, leukopenie, trombocytopenie
- Imunologické poruchy – přítomnost anti ds-DNA, APA (antifosfolipidové protilátky)
- Pozitivní ANA (Anti-Nuclear Antibodies) test – přítomnost protilátek proti jadernému materiálu

Specifické pro SLE jsou ANA protilátky a anti ds-DNA. Nejsou sice pro toto onemocnění plně specifické, ale směřují diagnózu do skupiny autoimunitních nemocí. Vyšetření autoprotilátek je základem pro stanovení správné diagnózy.

Kritérií je tedy celkem 11 a pro diagnózu SLE pacienti musí splňovat alespoň 4. Správná fenotypová klasifikace je potřebná zejména pro case-control studie, aby bylo srovnávání pacientů a zdravých jedinců smysluplné a objektivní.

Kapitola 4

Metaanalýza I: polymorfismus rs352139 genu TLR9

4.1 Metody získávání dat

Cílem následující metaanalýzy bylo sloučit výsledky studií zabývajících se souvislostí variant genu pro TLR9 se systémovým lupusem. Studie jsem vyhledávala na serveru PubMed. Pomocí vyhledávacích výrazů „SLE“, „TLR9“, „polymorphism“ a „association“ včetně jejich kombinací jsem našla 15 studií. Z nich ale 2 studovaly jiné onemocnění (tuberkulóza, tyreoidální orbitopatie), 2 se zabývaly jinou příčinou onemocnění (IRF5 gen, parvovirus B19), 1 genem TLR9 u myší, 3 nebyly ve formátu case-control (ale family-based) a 1 byla pouze v čínštině. Tyto studie jsem z metaanalýzy vyloučila. Pro vlastní metaanalýzu mi tak zůstalo 6 studií. Pracovně byly pojmenovány PDF1 – PDF6. Všechny vybrané studie se zabývaly Asiaty. Polymorfismy zkoumané ve těchto studiích jsou zobrazeny v tabulce 4.1.

Tab. 4.1. Polymorfismy zkoumané ve studiích PDF1 – PDF6

PDF1	PDF2	PDF3	PDF4	PDF5	PDF6
- 1486 T>C rs187084 rs2066807	- 1486 T>C rs187084 - 1237 C>T rs5743836 + 1174 A>G rs352139 + 2848 G>A	+ 1174 A>G rs352139 + 1635 G>A rs352140	- 1237 C>T rs5743836	- 1486 C>T rs187084 - 1237 C>T rs5743836 + 1174 A>G rs352139 + 1126 C>T rs5743842 + 1450 T>C rs5743843 + 1509 C>T rs5743844 + 3801 G>A rs5743845 + 3857 G>A rs5743846	- 1486 T>C rs187084 - 1237 C>T rs5743836 + 1174 A>G rs352139 + 1635 G>A rs352140

Nejvíce článků, a to celkem 4 ze 6, se zabývalo polymorfismy rs352139 a rs187084. Čtyřikrát byl zkoumán i polymorfismus rs5743836, ale ten byl ze studie PDF2 vyloučen pro nízkou frekvenci. Proto se metaanalýza bude týkat polymorfismů rs352139 a rs187084.

U polymorfismu rs352139 spojeného se záměnou A>G v pozici + 1174 se konkrétně budu zabývat genotypy AA, AG, GG. U tohoto polymorfismu jsem analyzovala celkem 1325 pacientů a 1650 kontrolních zdravých jedinců.

Z publikovaných prací jsem extrahovala následující údaje: rok vydání publikace, národnost pacientů a počty pacientů a kontrol, jejich průměrný věk a počet pacientů a kontrol s genotypy AA, resp. AG a GG. U některých studií nebyly veškeré tyto údaje dostupné. Vše je přehledně znázorněno v tabulce 4.2.

Tab. 4.2. Data ze studií o TLR9 polymorfismu rs352139

Název studie		PDF2	PDF3	PDF5	PDF6
Rok vydání		2004	2009	2007	2005
Národnost		Korean	Chinese Han	Japanese	Chinese HongKong
Pacienti	počet	323	315	220	438
	věk	35,6 (10,5 – 72,7)	32,4 ± 11,1	–	39,2 ± 11,9
Kontroly	počet	310	338	203	781
	věk	–	31,7 ± 9,1	–	29,7 ± 9,4
Genotyp pacientů: (počet, %)	AA	101 (31,3)	48 (15,2)	49 (22,3)	179 (40,9)
	AG	165 (51,1)	145 (46,0)	115 (52,3)	220 (50,2)
	GG	57 (17,6)	122 (38,7)	56 (25,54)	39 (8,90)
Genotyp kontrol: (počet, %):	AA	96 (31,0)	54 (16,0)	61 (30,0)	341 (43,7)
	AG	161 (51,9)	179 (53,0)	105 (51,7)	354 (45,3)
	GG	53 (17,1)	105 (31,1)	37 (18,2)	86 (11,0)

4.2 Výpočet pro jednotlivé genotypy AA, AG a GG

Pro výpočty jsem použila statistický software R s implementací balíčku rmeta a příkazu meta.MH. Tento příkaz na výstupu zobrazuje hodnoty odhadů OR jednotlivých studií včetně jejich IS, dále celkový Mantel-Haenszelův odhad OR včetně IS a také hodnotu testu homogeneity – zde je použita Woolfova metoda (Woolf's test). Ta je definována stejně jako Q test (Rosner, 2006).

Woolfova (Q) statistika má za platnosti nulové hypotézy χ^2 rozdělení pravděpodobnosti. Hodnotu Woolfovy statistiky tedy srovnávám s kritickou hodnotou χ^2 rozdělení pravděpodobnosti pro $(k-1)$ stupně volnosti. Pokud je hodnota testu vyšší než kritická hodnota, zamítáme nulovou hypotézu o homogenitě studií. Testuji na hladině významnosti 0,05. Mám zde 4 proměnné (celkový počet pacientů, celkový počet

kontrol, počet pacientů s daným genotypem a počet kontrol s daným genotypem), proto stupeň volnosti má hodnotu 3. Výsledky testu homogenity pro jednotlivé genotypy jsou zobrazeny v tabulce 4.3.

Tab. 4.3. Test homogenity pro polymorfismus rs352139

genotyp	hodnota testové statistiky	kritická hodnota	p-hodnota
AA	2,33	7,815	0,5067
AG	5,87	7,815	0,1181
GG	6,54	7,815	0,0880

Zjistila jsem, že žádná hodnota testové statistiky nepřekročila kritickou hodnotu pro 3 stupně volnosti, tedy nemohu zamítnout nulovou hypotézu. Dá se tedy říci, že studie jsou homogenní. Tento fakt si můžu ještě potvrdit srovnáním uvedených p-hodnot s hladinou významnosti testu (stanovenou na 0,05), kdy lze vidět, že všechny dosažené p-hodnoty jsou vyšší, tedy nulovou hypotézu skutečně nelze vyvrátit.

Nyní přejdu k samotnému výpočtu. Používám Mantel-Haenszelův test, který odhaduje souhrnný poměr šancí ze všech 4 studií. Zde testuji hypotézu H_0 : Mezi daným genotypem a rozvojem systémového lupusu není žádný vztah. Tuto hypotézu chci vyvrátit ve prospěch alternativní hypotézy H_1 : Genotyp má vliv na rozvoj nemoci. Výstupem metaanalýzy jsou poměry šancí pro jednotlivé studie a jejich 95% IS a také celkový bodový Mantel-Haenszelův odhad OR a jeho 95% IS. Pokud tento interval spolehlivosti překrývá hodnotu 1, nelze říci, že uvedený genotyp má vliv na rozvoj nemoci.

Výsledky testování Mantel-Haenszelovým testem pro jednotlivé genotypy AA, AG a GG jsou zobrazeny v tabulkách 4.4, 4.5 a 4.6 a jejich grafické znázornění na obrázcích 4.1, 4.2 a 4.3.

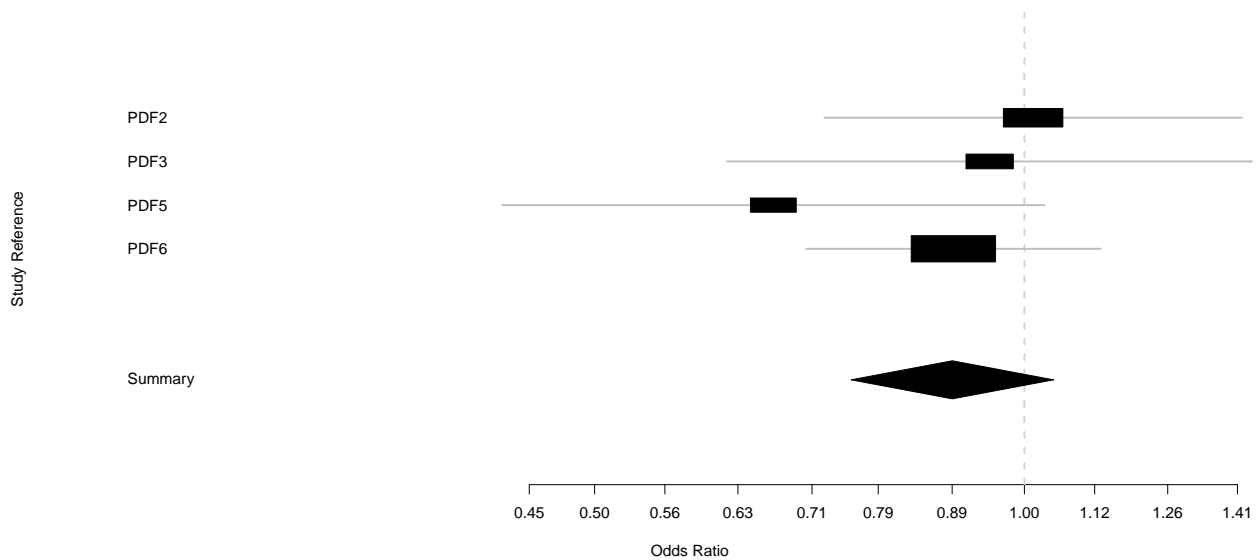
V grafech (forest plots) vidíme na ose x hodnoty OR v normální číselné škále, na ose y jsou znázorněny výsledky jednotlivých studií. Odhady jednotlivých OR jsou znázorněny jako čtverce, jejichž šířka je úměrná velikosti studií a výška je úměrná převrácené hodnotě směrodatné odchylky σ ($\sigma = \sqrt{\text{var}_{OR_i}}$). Čtverce jsou doplněny jednotlivými intervaly spolehlivosti – vodorovná čára. Celkový Mantel-Haenszelův odhad OR je znázorněn jako černý kosočtverec (diamant).

Ačkoli ve všech 3 případech Mantel-Haenszelova OR dosahují hodnot různých od 1, 95% interval spolehlivosti zahrnuje hodnotu 1, tedy stav, kdy uvedený genotyp nemá na rozvoj nemoci žádný vliv. V této metaanalýze jsem tedy nepotvrdila statisticky významný vliv genotypu na rozvoj systémového lupusu.

Přesto nelze nezmínit, že určitý rozdíl v efektu jednotlivých genotypů vidět lze. U genotypu AA vidíme, že interval spolehlivosti souhrnného OR se jedničky dotýká jen lehce, zprava. Naopak u genotypu GG je zřejmé, že IS celkového OR má větší hodnotu, překrývá jedničku také jen lehce, ale zleva. I když tento efekt tedy není statisticky významný, náznak asociace uvedeného polymorfismu se SLE nelze zcela vyloučit (genotyp AA má pravděpodobně protektivní vliv, kdežto genotyp GG je naopak rizikový pro rozvoj SLE).

Tab. 4.4. Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp AA (rs352139)

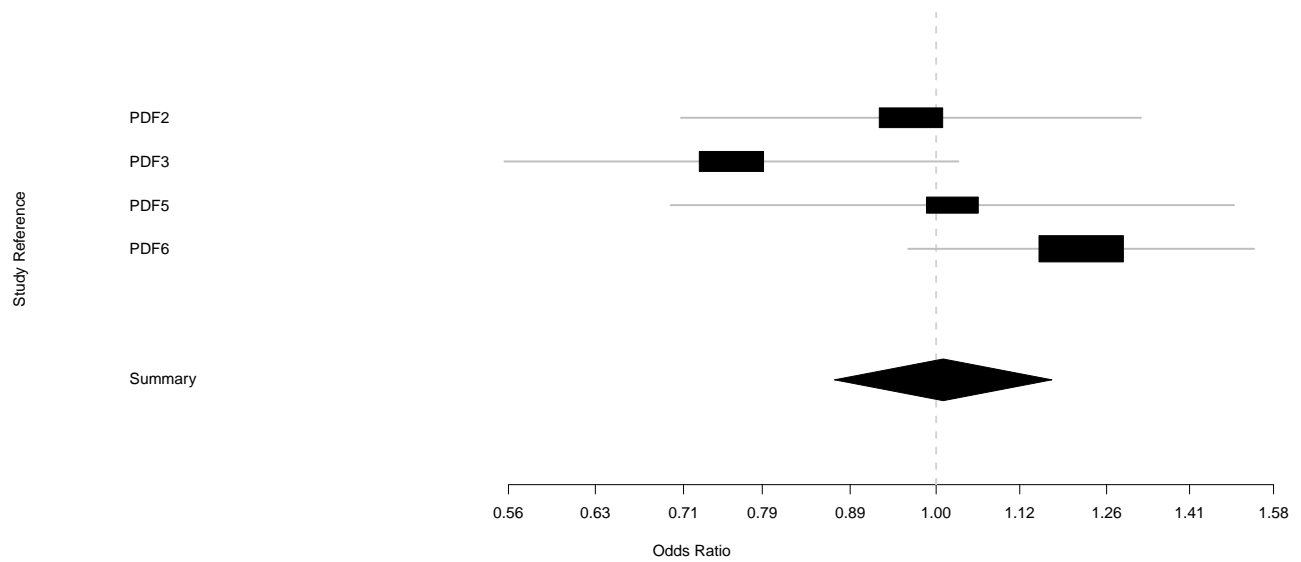
Studie	Rok	Národnost	Cases	Controls	Cases AA	Controls AA	OR (95% interval)
PDF2	2004	Korean	323	310	101 (31,3 %)	96 (31,0 %)	1,01 (0,72 – 1,42)
PDF3	2010	Chinese	315	338	48 (15,2 %)	54 (16,0 %)	0,95 (0,62 – 1,44)
PDF5	2007	Japanese	220	203	49 (22,3 %)	61 (30,0 %)	0,67 (0,43 – 1,03)
PDF6	2005	Chinese	438	781	179 (40,9 %)	341 (43,7 %)	0,89 (0,70 – 1,13)
Celkové Mantel-Haenszel OR							0,89 (0,76 – 1,05)



Obr. 4.1. Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp AA (rs352139)

Tab. 4.5. Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp AG (rs352139)

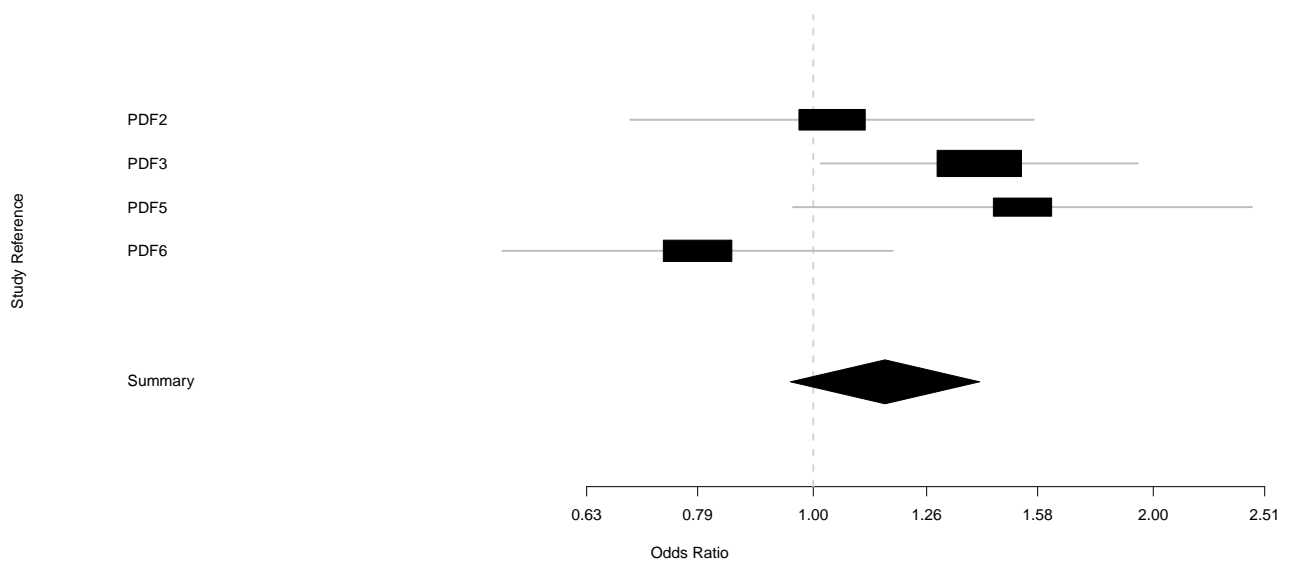
Studie	Rok	Národnost	Cases	Controls	Cases AG	Controls AG	OR (95% interval)
PDF2	2004	Korean	323	310	165 (51,1 %)	161 (51,9 %)	0,97 (0,71 – 1,32)
PDF3	2010	Chinese	315	338	145 (46,0 %)	179 (53,0 %)	0,76 (0,56 – 1,03)
PDF5	2007	Japanese	220	203	115 (52,3 %)	105 (51,7 %)	1,02 (0,70 – 1,50)
PDF6	2005	Chinese	438	781	220 (50,2 %)	354 (45,3 %)	1,22 (0,96 – 1,54)
Celkové Mantel-Haenszel OR							1,01 (0,87 – 1,17)



Obr. 4.2. Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp AG (rs352139)

Tab. 4.6. Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro genotyp GG (rs352139)

Studie	Rok	Národnost	Cases	Controls	Cases GG	Controls GG	OR (95% interval)
PDF2	2004	Korean	323	310	57 (17,6 %)	53 (17,1 %)	1,04 (0,69 – 1,57)
PDF3	2010	Chinese	315	338	122 (38,7 %)	105 (31,1 %)	1,40 (1,02 – 1,94)
PDF5	2007	Japanese	220	203	56 (25,54 %)	37 (18,2 %)	1,53 (0,96 – 2,45)
PDF6	2005	Chinese	438	781	39 (8,90 %)	86 (11,0 %)	0,79 (0,53 – 1,18)
Celkové Mantel-Haenszel OR							1,16 (0,95 – 1,40)



Obr. 4.3. Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro genotyp GG (rs352139)

4.3 Výpočet pro jednotlivé alely A, G

Pokusím se dokázat, zda na rozvoj SLE nemají významnější vliv alely daného SNP. Každý člověk má 2 alely určitého znaku (polymorfismu), tedy počet pacientů i kontrol se zdvojnásobí. Počty alel jsem získala následovně: počet alely A u pacientů = 2 · počet pacientů s AA genotypem + počet pacientů s AG genotypem. Tato metoda byla použita např. ve studii nazvané PDF1, relativní frekvence jsou definovány také v Christensen (1998). Stejným způsobem jsem počítala i alely u kontrol, viz tabulka 4.7.

Tab. 4.7. Rozdělení alel A a G ve studiích polymorfismu rs352139

Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti A	pacienti G	kontoly A	kontroly G
PDF2	646	620	367	279	353	267
PDF3	630	676	389	241	389	287
PDF5	440	406	213	227	227	179
PDF6	876	1562	578	298	1036	526

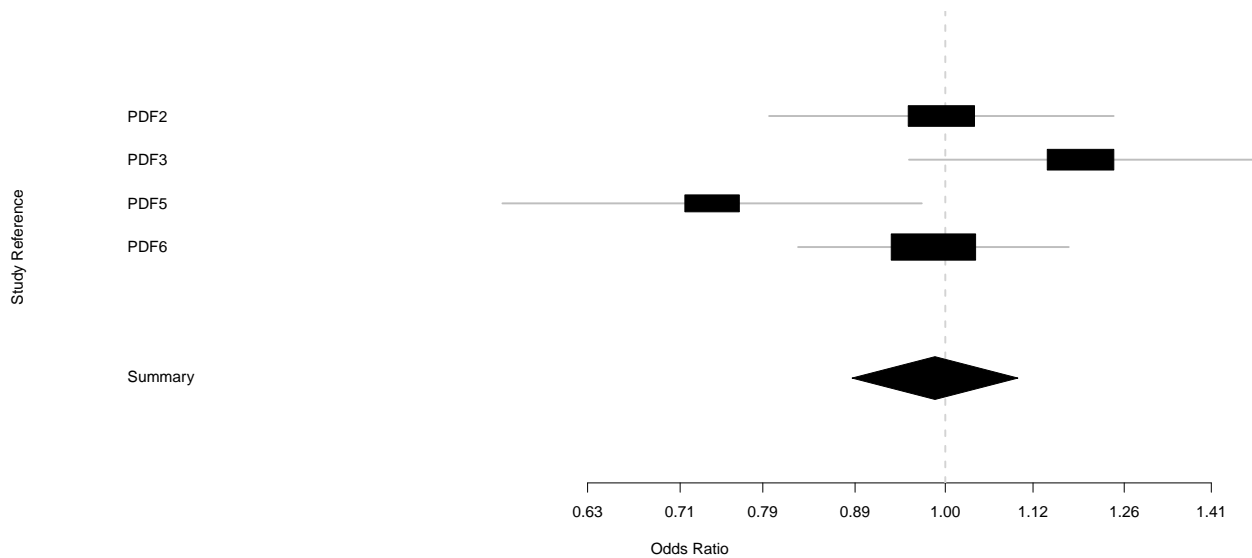
Nejprve, stejně jako v předchozím případě, zkontroluji hodnotu testu homogenity (tabulka 4.8). Hodnoty Woolfovy testové statistiky pro obě alely vyšly zcela shodně. Test potvrdil, stejně jako u genotypů, homogenitu studií. Mohu tedy přistoupit k samotnému Mantel-Haenszelovu testu. Jeho výsledky včetně grafického znázornění ukazují tabulky 4.9 a 4.10 a grafy a 4.4 a 4.5. Jak je z výsledků patrné, ani u alel nelze říci, že by některá měla statisticky významný vliv na vznik systémového lupusu. Oba souhrnné odhady OR dokonce mají na grafech velmi podobnou polohu (se středem velmi blízko hodnotě 1).

Tab. 4.8. Test homogenity pro alely A a G (rs352139)

Alela	hodnota testové statistiky	kritická hodnota	p-hodnota
A	7,11	7,815	0,0683
G	7,11	7,815	0,0683

Tab. 4.9. Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro alelu A (rs352139)

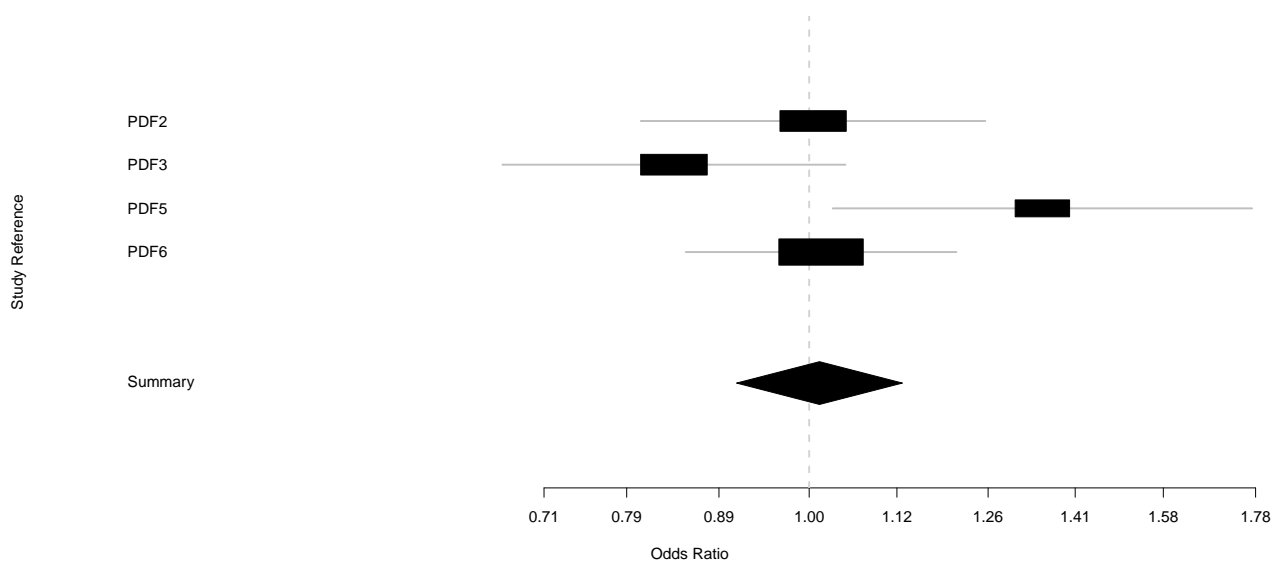
Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti A	kontoly A	OR (95% interval)
PDF2	646	620	367	353	0,99 (0,80 – 1,24)
PDF3	630	676	389	389	1,19 (0,95 – 1,49)
PDF5	440	406	213	227	0,74 (0,56 – 0,97)
PDF6	876	1562	578	1036	0,98 (0,83 – 1,17)
Celkové Mantel-Haenszel OR					0,99 (0,89 – 1,10)



Obr. 4.4. Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro alelu A (rs352139)

Tab. 4.10. Výsledky Mantel-Haenszelova testu pro alelu G (rs352139)

Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti G	kontoly G	OR (95% interval)
PDF2	646	620	279	267	1,01 (0,80 – 1,26)
PDF3	630	676	241	287	0,84 (0,67 – 1,05)
PDF5	440	406	227	179	1,35 (1,03 – 1,77)
PDF6	876	1562	298	526	1,02 (0,85 – 1,21)
Celkové Mantel-Haenszel OR					1,01 (0,91 – 1,13)



Obr. 4.5. Grafické znázornění Mantel-Haenszelova OR pro alelu G (rs352139)

Kapitola 5

Metaanalýza II: polymorfismus rs187084 genu TLR9

5.1 Data

U polymorfismu rs187084 spojeného se záměnou T > C v pozici -1486 jsem zkoumala vliv genotypů TT, CT a CC. U tohoto polymorfismu jsem analyzovala celkem 1024 pacientů a 1492 kontrolních zdravých jedinců.

Byly extrahovány tyto údaje: rok publikace, národnost, počet pacientů a kontrol, jejich průměrný věk a počet pacientů a kontrol s genotypy TT, resp. CT, CC. U některých studií nebyly veškeré tyto údaje dostupné. Vše je přehledně znázorněno v tabulce 5.1.

5.2 Výpočet pro jednotlivé genotypy TT, TC a CC

Pro výpočty jsem opět použila statistický software R s implementací balíčku rmeta a příkazu meta.MH. Na výstupu jsem nejprve zjistila hodnotu Woolfova testu homogenity. Jak je vidět z tabulky 5.2, studie nejsou homogenní, protože hodnota testové statistiky přesáhla kritickou hodnotu, a to pro genotypy TT a CC. To můžeme vidět i při porovnání příslušné p-hodnoty s hladinou významnosti, která je stanovená na 0,05. U zmíněných genotypů je p-hodnota nižší, tedy nulová hypotéza o homogenitě studií je zamítnuta.

Nebudu zkoumat, čím je heterogenita způsobena, ale použiju jeden z random effects modelů. Jedná se konkrétně o model DerSimonian-Lairdové, který je také implementován v statistickém softwaru R. K jeho spuštění se využívá balíček rmeta a příkaz meta.DSL.

Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách 5.3, 5.4 a 5.5. Grafické znázornění je vidět na obrázcích 5.1, 5.2 a 5.3.

Z jednotlivých grafů je patrné, že opět každý 95% IS překrývá číslo 1, tedy žádný statistický

Tab. 5.1. Data ze studií o TLR9 polymorfismu rs187084

Název studie		PDF1	PDF2	PDF5	PDF6
Rok vydání		2010	2004	2007	2005
Národnost		Taiwan (Chinese)	Korean	Japanese	Chinese HongKong
Pacienti	počet	167	248	183	426
	věk	–	35,6 (10,5 - 72,7)	–	39,2 ± 11,9
Kontroly	počet	211	314	198	769
	věk	–	–	–	29,7 ± 9,4
Genotyp pacientů: (počet, %)	TT	123 (73,6)	80 (32,3)	49 (26,8)	194 (45,5)
	CT	39 (23,4)	124 (50,0)	95 (51,9)	192 (45,1)
	CC	5 (3,0)	44 (17,7)	39 (21,3)	40 (9,35)
Genotyp kontrol: (počet, %):	TT	119 (56,4)	102 (32,5)	51 (25,8)	335 (43,6)
	CT	67 (31,8)	162 (51,6)	108 (54,5)	350 (45,5)
	CC	25 (11,8)	50 (15,9)	39 (19,7)	84 (10,9)

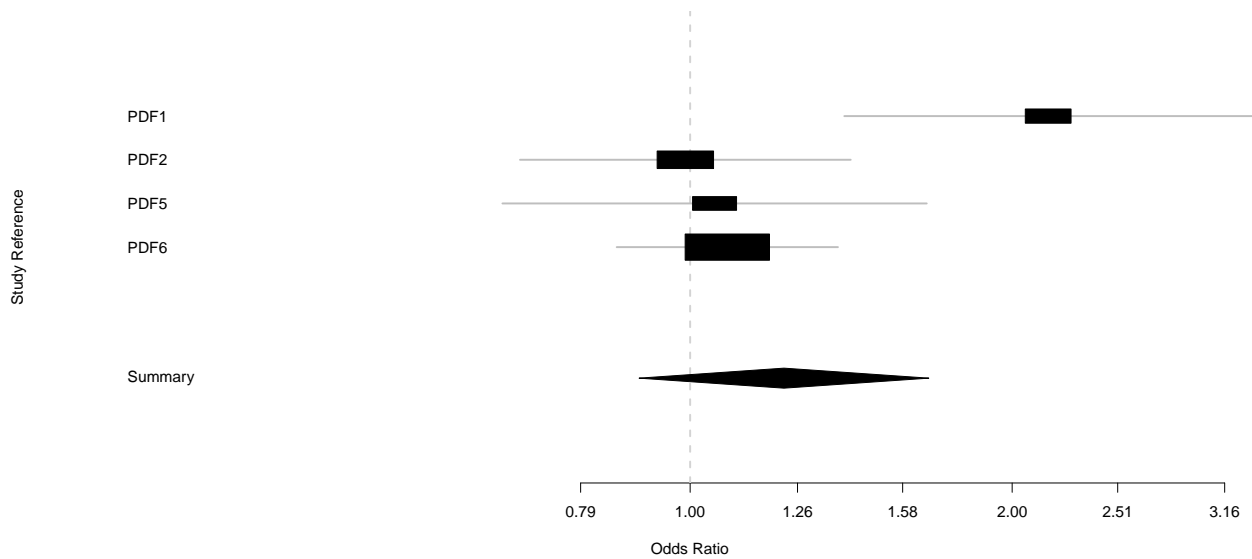
Tab. 5.2. Test homogenity pro polymorfismus rs187084

genotyp	hodnota Woolfova testu	kritická hodnota	p-hodnota
TT	8,96	7,815	0,0298
CT	2,39	7,815	0,4957
CC	9,30	7,815	0,0256

významný výsledek nebyl nalezen. Ovšem, tak jako v předchozí metaanalýze genotypů AA, AG a GG polymorfismu rs352139, i zde je jistý rozdíl v grafech patrný. Pravděpodobně genotyp TT bude spíše rizikový, kdežto CC spíše protektivní.

Tab. 5.3. Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp TT (rs187084)

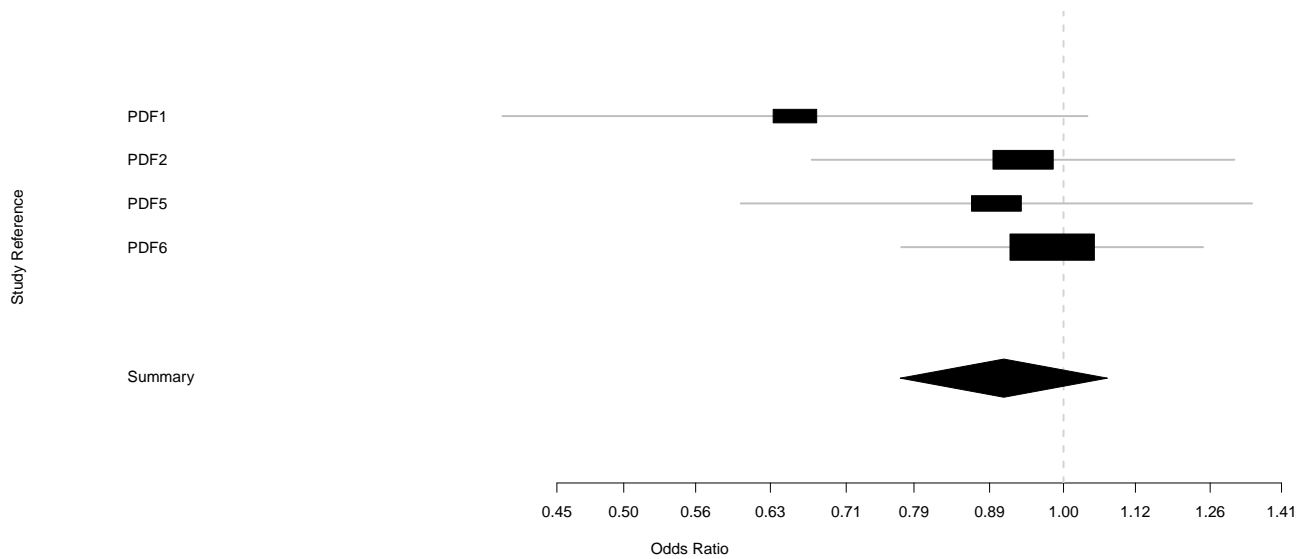
Studie	pacienti	kontroly	pacienti TT	kontoly TT	OR (95% interval)
PDF1	167	211	123	119	2,16 (1,39 – 3,35)
PDF2	248	314	80	102	0,99 (0,69 – 1,41)
PDF5	183	198	49	51	1,05 (0,67 – 1,66)
PDF6	426	769	194	335	1,08 (0,85 – 1,37)
Celkové OR podle DerSimonian-Lairdové					1,22 (0,90 – 1,67)



Obr. 5.1. Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp TT (rs187084)

Tab. 5.4. Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp TC (rs187084)

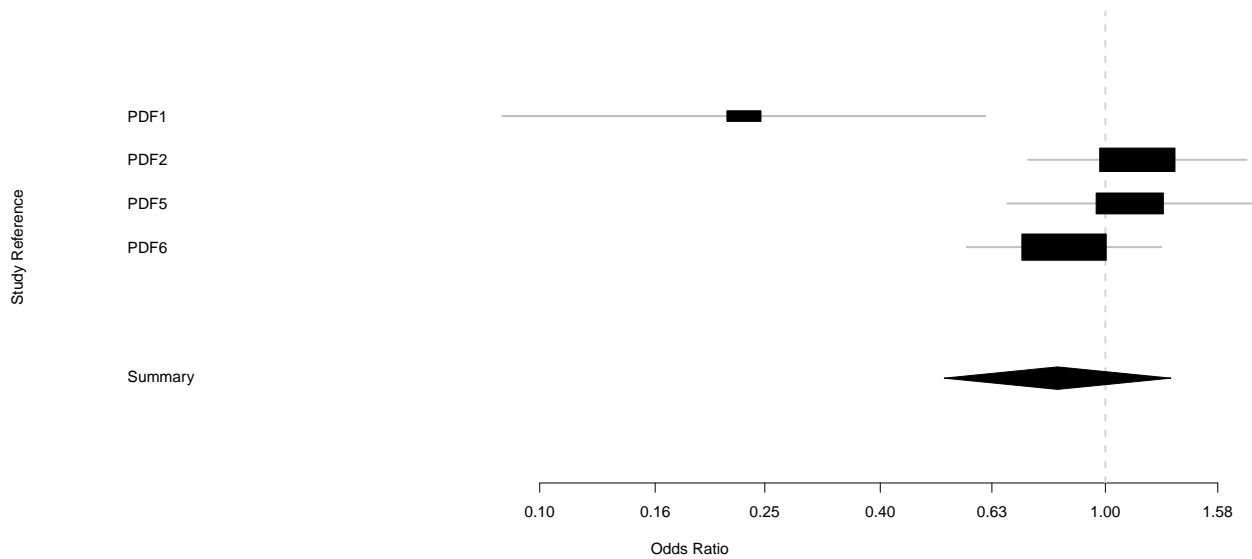
Studie	pacienti	kontroly	pacienti TC	kontoly TC	OR (95% interval)
PDF1	167	211	39	67	0,65 (0,41 – 1,04)
PDF2	248	314	124	162	0,94 (0,67 – 1,31)
PDF5	183	198	95	108	0,90 (0,60 – 1,35)
PDF6	426	769	192	350	0,98 (0,77 – 1,25)
Celkové OR podle DerSimonian-Lairdové					0,91 (0,77 – 1,07)



Obr. 5.2. Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp TC (rs187084)

Tab. 5.5. Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro genotyp CC (rs187084)

Studie	pacienti	kontroly	pacienti CC	kontoly CC	OR (95% interval)
PDF1	167	211	5	25	0,23 (0,09 – 0,61)
PDF2	248	314	44	50	1,14 (0,73 – 1,78)
PDF5	183	198	39	39	1,10 (0,67 – 1,82)
PDF6	426	769	40	84	0,85 (0,57 – 1,26)
Celkové OR podle DerSimonian-Lairdové					0,82 (0,52 – 1,31)



Obr. 5.3. Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro genotyp CC (rs187084)

5.3 Výpočet pro jednotlivé alely T, C

Opět se pokusím dokázat alespoň vliv alel. Jejich počty jsem získala stejným způsobem jako v předchozím případě a jsou shrnuty v tabulce 5.6.

Tab. 5.6. Rozdělení alel T a C ve studiích polymorfismu rs187084

Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti T	pacienti C	kontoly T	kontroly C
PDF1	334	422	285	49	305	117
PDF2	496	628	284	212	366	262
PDF5	366	396	193	173	210	186
PDF6	852	1538	580	272	1020	518

Nejdříve zkontroluji homogenitu dat (tabulka 5.7).

Tab. 5.7. Test homogenity pro alely T a C (rs187084)

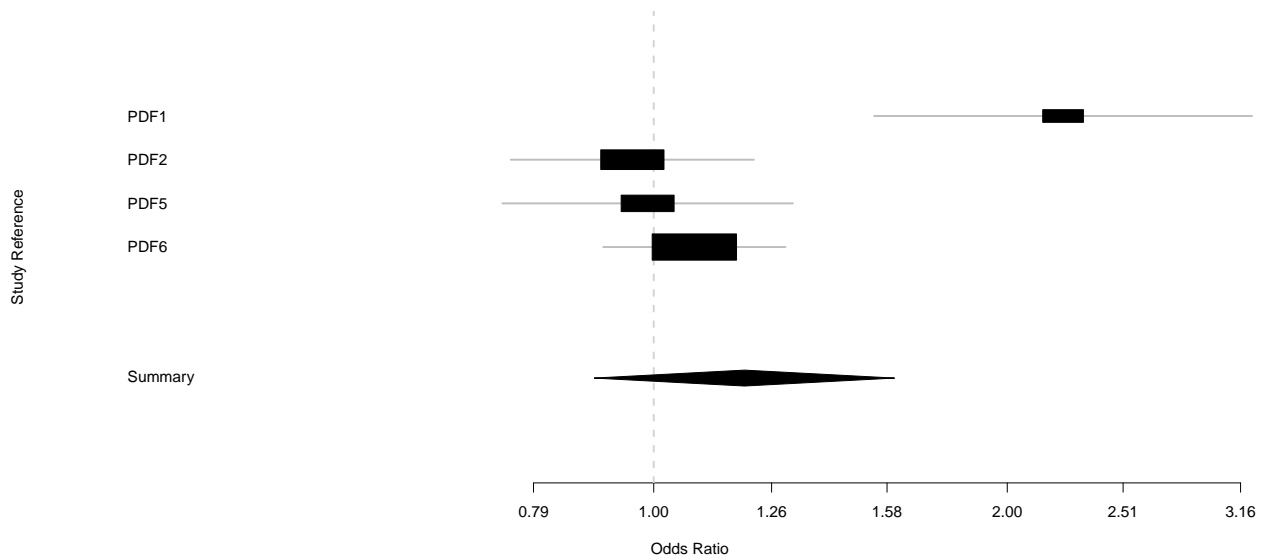
Alela	hodnota testové statistiky	kritická hodnota	p-hodnota
T	15,79	7,815	0,0012
C	15,79	7,815	0,0012

Jak je vidět v tabulce 5.7, hodnoty testové statistiky přesáhly kritickou hodnotu, proto zamítám hypotézu o homogenitě studií (stejně jako u genotypů příslušného polymorfismu). Z toho důvodu použiji, stejně jako v případě genotypů, random effects model zvaný metoda DerSimonian-Lairdové. Výsledky jsou zobrazeny v tabulkách 5.8 a 5.9 a znázorněny v grafech 5.4 a 5.5.

Opět vidím, že příslušné IS překrývají hodnotu 1, tedy nedokázala jsem statistickou spojitost alely T ani C s rozvojem systémového lupusu. Opět je zde ale vidět, že jednotlivé alely mají pravděpodobně rozdílné efekty (alela T píše protektivní, alela C naopak rizikový).

Tab. 5.8. Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro alelu T (rs187084)

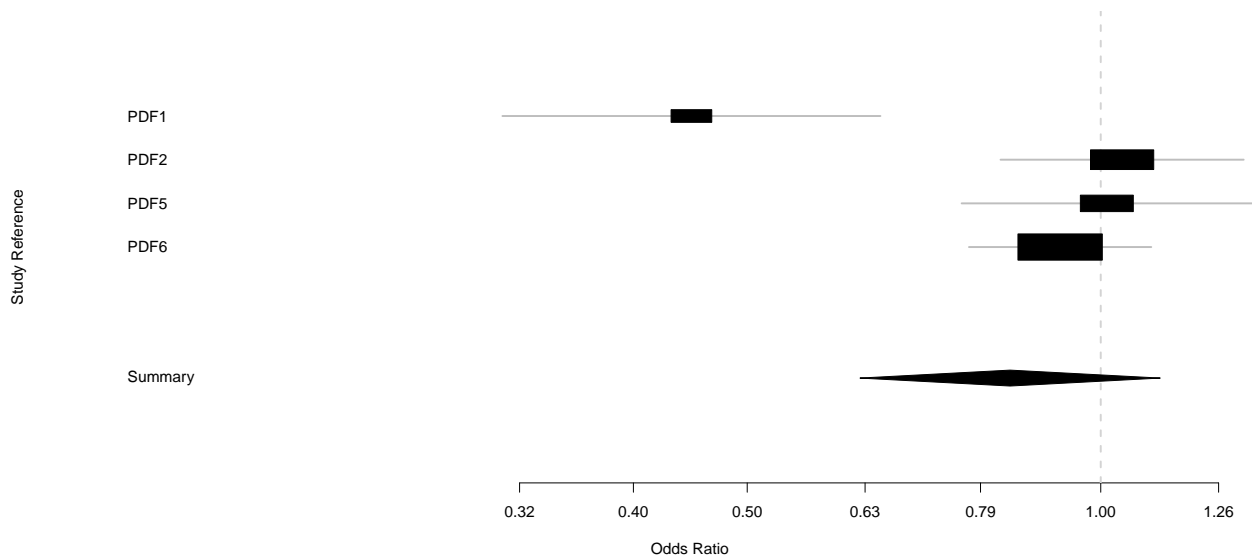
Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti T	kontoly T	OR (95% interval)
PDF2	646	620	367	353	2,23 (1,54 – 3,23)
PDF3	630	676	389	389	0,96 (0,76 – 1,22)
PDF5	440	406	213	227	0,99 (0,74 – 1,31)
PDF6	876	1562	578	1036	1,08 (0,91 – 1,29)
Celkové OR podle DerSimonian-Lairdové					1,19 (0,89 – 1,60)



Obr. 5.4. Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro alelu T (rs187084)

Tab. 5.9. Výsledky testu DerSimonian-Lairdové pro alelu C (rs187084)

Studie	2 · pacienti	2 · kontroly	pacienti C	kontoly C	OR (95% interval)
PDF2	646	620	279	267	0.45 (0.31 – 0.65)
PDF3	630	676	241	287	1.04 (0.82 – 1.32)
PDF5	440	406	227	179	1.01 (0.76 – 1.35)
PDF6	876	1562	298	526	0.92 (0.77 – 1.10)
Celkové OR podle DerSimonian-Lairdové					0.84 (0.62 – 1.12)



Obr. 5.5. Grafické znázornění OR podle DerSimonian-Lairdové pro alelu C (rs187084)

Závěr

V předložené práci jsem popsala základní informace o onemocnění SLE; o jeho etiopatogenezi, vyvolávajících faktorech, symptomech a terapii.

V další části je prezentován přehled literatury zabývající se genetickými faktory tohoto onemocnění a jejich etnickými rozdíly. Ačkoliv jde o onemocnění, u kterého heritabilita (neboli dědičnost) hraje významnou roli, „patologické“ geny samy o sobě nestačí k manifestaci SLE; důležitý je také vliv „spouštěcích“ faktorů (např. virové infekce, stresu apod.), které vyvolají klinické projevy choroby.

V současnosti se problematice genetického podkladu SLE věnuje v literatuře velká pozornost. Byla publikována řada studií (typu „case-control“ nebo „linkage-study“), které analyzovaly geny, resp. jejich varianty – tzv. polymorfismy (a příslušné genotypové a/nebo alelické frekvence) ve vztahu ke SLE. Asociační (tj. case-control) studie sledují, zda se u nemocných příslušná varianta genu vyskytuje častěji, příp. méně často, než ve zdravé populaci. Pokud ano, lze konstatovat, že daná varianta je riziková, resp. protektivní pro vznik a/nebo rozvoj daného onemocnění.

V kapitolách 4 a 5 prezentuji výsledky metanalýzy dvou polymorfismů v genu pro TLR9, a to rs352139 a rs187084, které jsem si vybrala z následujících, již zmiňovaných, důvodů:

- u ostatních genů souvisejích se SLE, u kterých bylo publikováno více studií, již metaanalýzy byly provedeny
- uvedené dva SNPs byly analyzovány ve většině dosud publikovaných prací o TLR9 u SLE; další varianty tohoto genu byly vyšetřovány pouze sporadicky

V první metaanalýze jsem k výpočtům použila „fixed effects“ model. Nepodařilo se mi prokázat statisticky významný vliv polymorfismu rs352139 pro rozvoj SLE. Z grafů je však patrné, že alely G a A v homozygotní kombinaci (tj. genotyp GG a AA) měly tendenci k „rizikovosti“ a naopak „protektivně“ pro vznik daného onemocnění. Ve druhé metaanalýze nebyla splněna homogenita studií, proto jsem pro hodnocení efektu rs187084 varianty použila „random effects“ model. Také tato metaanalýza neprokázala statisticky signifikantní efekt tohoto polymorfismu ve vztahu ke SLE. Z grafů je však opět patrné, že jednotlivé genotypy mohou působit odlišně (byť statisticky nevýznamně) při rozvoji SLE.

Nakonec bych ráda zmínila, že jsem se při psaní této práce naučila pracovat se statistickým softwarem R, tedy konkrétně s balíčkem pro metaanalýzy rmeta a také jsem lépe porozuměla sázecímu programu \LaTeX , s jehož základy jsem se seznámila v rámci kurzu „Elektronická sazba a publikování v \TeX u“ pana RNDr. Romana Plcha, Ph.D.

Seznam zkratek

<i>ACR</i>	American College of Rheumatology – Americká revmatologická asociace
<i>ANA</i>	Anti-nuclear antibody – protilátky proti jadernému materiálu buňky
<i>anti ds-DNA</i>	Protilátky proti dvouvláknové DNA
<i>APA</i>	Antifosfolipidové protilátky
<i>APC</i>	Antigen-presenting cell – buňka prezentující antigen
<i>AV blok</i>	Atrioventrikulární blok – částečný blok převodu vzruchu ze síně na komoru
<i>CNS</i>	Centrální nervová soustava
<i>CpG</i>	Cytidin-fosfát-guanosin
<i>DS-L model</i>	model DerSimonian-Lairdové
<i>EBV</i>	Epstein-Barr Virus – virus Epstein-Barrové
<i>HLA</i>	Human leukocyte antigen – MHC u člověka
<i>IS</i>	Interval spolehlivosti
<i>M-H model</i>	Mantel-Haenszelův model
<i>MHC</i>	Major histocompatibility complex – glykoproteinové komplexy na povrchu savčích buněk rozeznávající antigeny
<i>NK buňky</i>	Natural killer buňky – druh lymfocytů, který je schopen zabít nádorové buňky či buňky napadené virem
<i>OR</i>	Odds ratio – poměr šancí
<i>SLE</i>	Systémový lupus erythematosus
<i>SNP</i>	Single-nucleotide polymorphism – jednonuklotidový polymorfismus
<i>TLR</i>	Toll-like receptor – receptor podobný Toll molekule

Seznam použité literatury

- [1] ANAMNEZA [online]. Autoimunitní imunopatologický zánět. Dostupné z WWW: <http://www.anamneza.cz/module/clanek.php?id=837&sekce=1>.
- [2] Doc. MUDr. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, DrSc. *Medicina.cz* [online]. 10. 7. 2002. Autoimunitní onemocnění. Dostupné z WWW: http://www.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=4729.
- [3] *BIOLOGICKÁ LÉČBA* [online]. 2011. Systémový lupus. Dostupné z WWW: <http://www.cilena-lecba.cz/systemovy-lupus>. ISSN 1804-1892.
- [4] *Česká nadace pro nemoci ledvin* [online]. 2008. Systémový lupus erythematosus. Dostupné z WWW: <http://www.nadaceledviny.cz/informacni-brozurky-systemovy-lupus-erythematosus.html?idAktualni=1440&jazyk=cz>.
- [5] Prof. MUDr. DOSTÁL, Ctibor, DrSc. Systémová revmatická onemocnění 1. díl. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2001, č. 3. Dostupný z WWW: www.solen.cz/pdfs/int/2001/03/03.pdf.
- [6] Prof. MUDr. DOSTÁL, Ctibor, DrSc.; MUDr. TEGZOVÁ, Dana. Systémový lupus erythematosus. *Postgraduální medicína* [online]. 6. 11. 2009, č. 9. Dostupný z WWW: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/systemovy-lupus-erythematosus-447987>.
- [7] *EuroMISE* [online]. 2006. Meta-analýza. Dostupné z WWW: <http://ucebnice.euromise.cz/index.php?conn=0§ion=epidem&node=node139>.
- [8] HOŘEJŠÍ, Václav. Receptory TLR - klíčové molekuly imunitního systému: Imunologové stále ještě objevují molekulární obdoby neznámých velkých zvířat. *Vesmír: v poznání je síla*. 2004, roč. 83, s. 134. Dostupný také z WWW: <http://www.vesmir.cz/clanek/receptory-tlr-klicove-molekuly-imunitniho-systemu>.
- [9] HUEDO-MEDINA, Tania B.; SÁNCHEZ-MECA, Julio; MARÍN-MARTÍNEZ, Fulgencio; BOTELLA, Juan. Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I² index? *Psychological Methods*. Červen 2006, vol. 11, n. 2, s. 193 – 206.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [10] Doc. CHRISTENSEN, Knud, Ph.D. *Knud Christensen, Associate professor, Ph.D.* [online]. 1998. Gene counting method for calculation of gene frequencies. Dostupné z WWW: <http://www.husdyr.kvl.dk/html/kc/popgen/genetics/2/1.htm>.
- [11] LEE, H. S.; BAE, S. C. *PubMed* [online]. 19. 12. 2010. What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947557>.
- [12] *LUPUS* [online]. 25. 7. 2009. Dostupné z WWW: <http://www.lupus-sle.cz/>.
- [13] ROSNER, Bernard. *Fundamentals of biostatistics*. 6. vydání. Belmont: Thomson brooks/cole, 2006. 879 s. ISBN 0-534-41820-1.
- [14] SLÁMOVÁ, A. *Společná Revma Liga Měst* [online]. 7. 4. 2010. Systémový lupus erythematosus. Dostupné z WWW: <http://revmaligaspolecna.blog.cz/1004/systemovy-lupus-erythematosus-sle>.
- [15] SUTTON, Alex J.; ABRAHAMS, Keith R.; JONES, David R.; SHELDON, Trevor A.; SONG Fujian. *Methods for Meta-Analysis in Medical Research*. Chichester: WILEY SERIES IN PROBABILITY AND STATISTICS, 2002. 317 s. ISBN 0-471-49066-0.
- [16] TUREK, Ivan. *ČESKÁ REVματοLOGICKÁ SPOLEČNOST: ČLS JEP* [online]. 2005. Systémový lupus erythematosus. Dostupné z WWW: <http://www.revma.cz/crs/sle.htm>.
- [17] VALENOVÁ, Iveta. Co je to lupus?. *Sestra: zdn.cz* [online]. 14.11.2007, č. 11. Dostupný z WWW: <http://www.zdn.cz/archiv/sestra/?id=2607>.
- [18] VENCOVSKÝ, J.; DOSTÁL, C. Etiopatogenetický podklad systémového lupus erythematosus a perspektivy terapie v budoucnosti. *MEDICÍNA: Odborné fórum lékařů a farmaceutů* [online]. 25. 11. 1998, č. 10. Dostupný z WWW: http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1098/med1098_45.html.
- [19] *Vitalion: Lepší informace, lepší zdraví* [online]. 2011. Lupus erythematosus. Dostupné z WWW: <http://nemoci.vitalion.cz/lupus-erythematosus/>.

Doporučená literatura

- [20] MELOUN, Milan; MILITKÝ, Jiří. *Statistické zpracování experimentálních dat: v chemometrii, biometrii, ekonometrii a v dalších oborech přírodních, technických a společenských věd*. 2. vydání. Praha: EAST PUBLISHING, a. s. , 1998. 839 s. ISBN 80-7219-003-2.
- [21] *PubMed.gov: U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health* [online]. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Seznam studií použitých v metaanalýze:

- [PDF1] HUANG, Chung-Ming; HUANG, Po-Hao; CHEN, Chi-Lan; LIN, Ying-Ju; TSAI, Chang-Hai; HUANG, Wen-Liang; TSAI, Fuu-Jen. Association of toll-like receptor 9 gene polymorphism in Chinese patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Rheumatology International*. 17. 4. 2011.
- [PDF2] HUR, J.-W.; SHIN, H. D.; PARK, B. L.; KIM, L. H.; KIM, S.-Y.; BAE, S.-C. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. Březen 2005, vol. 65, n. 3, s. 266–270.
- [PDF3] ZHOU, X.-J.; LV, J.-C.; CHENG, W.-R.; YU, L.; ZHAO, M.-H.; ZHANG, H. Association of TLR9 gene polymorphisms with lupus nephritis in a Chinese Han population. *Clinical and Experimental RHEUMATOLOGY*. Květen 2010, vol. 28, n. 3, s. 397–400.
- [PDF4] DEMIRCI; F. Yesim K.; MANZI, Susan; RAMSEY-GOLDMAN, Rosalind; KENNEY, Margaret; SHAW, Penny S.; DUNLOP-THOMAS, Charmayne M.; KAO, Amy H.; RHEW, Elisa Y; BONTEMPO, Franklin; KAMMERER, Candace; KAMBOH, M. Ilyas. Association study of Toll-like receptor 5 (TLR5) and Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*. Srpen 2007, vol. 34, n. 8, s. 1708–1711.
- [PDF5] TAO, Kayoko; FUJII, Mutsuko; TSUKUMO, Shin-ichi; MAEKAWA, Yoichi; KISHIHARA, Kenji; KIMOTO, Yasutaka; HORIUCHI, Takahiko; HISAEDA, Hajime; AKIRA, Shizuo; KAGAMI, Shoji; YASUTOMO, Koji. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Annals of the RHEUMATIC DISEASES*. Červenec 2007, vol. 66, n. 7, s. 905–909.
- [PDF6] NG, M. W.; LAU, C. S.; CHAN, T. M.; WONG, W. H. S.; LAU, Y. L. Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (TLR9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology*. Listopad 2005, vol. 44, n. 11, s. 1456–1457.