

ΠΜΣ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑ

Μελέτες αλληλεπίδρασης γονιδίου – περιβάλλοντος για το μελάνωμα

ΑΘΗΝΑ, 2019

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

που απονέμει η Ιατρική Σχολή και το Τμήμα Μαθηματικών του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εγκρίθηκε την 4/11/2019 από την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Ε. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ (Επιβλέπων)

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ



Κ. ΚΑΤΣΟΥΓΙΑΝΝΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ



Π. ΤΟΥΛΟΥΜΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Δέρμα	4
1.1.1 Ανατομία Δέρματος	4
1.1.2 Σπίλοι	5
1.2 Καρκίνος του Δέρματος	6
1.2.1 Ακτινική Υπερκεράτωση	6
1.2.2 Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα	6
1.2.3 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα	7
1.2.4 Κακοήθες Μελάνωμα	7
1.2.5 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά	8
1.3 Μελάνωμα	8
1.3.1 Ιστορία Μελανώματος	9
1.3.2 Χαρακτηριστικά Μελανώματος	11
1.3.3 Επιδημιολογία Μελανώματος	13
1.4 Γενετική Επιδημιολογία	15
1.4.1 Το Ανθρώπινο Γονιδίωμα	15
1.4.2 Ποικιλομορφία Ανθρώπινου Γονιδιώματος	15
1.5 Γενετική και Μελάνωμα	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
2.1 Μεθοδολογία	19
2.1.1 Πληθυσμός της UKBiobank	19
2.1.2 Έκθεση στην Ηλιακή Ακτινοβολία.....	19
2.1.3 Περιστατικά Μελανώματος	20
2.1.4 Γονοτύπηση	21
2.1.5 Στατιστική Ανάλυση	21

2.1.6 Μελέτες Ασθενών-μαρτύρων	22
2.1.7 Μελέτες Αλληλεπίδρασης Γονιδίου-περιβάλλοντος	23
2.1.8 Η Μέθοδος case-only	24
2.2 Αποτελέσματα	26
2.3 Συζήτηση.....	34
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	39
ABSTRACT.....	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41

Συντομογραφίες

AK: Actinic Keratosis

BCC: Basal Cell Carcinoma

SCC: Squamous Cell Carcinoma

MM: Malignant Melanoma

NMSC: Non Melanoma Skin Cancer

WHO: World Health Organization

AAD: American Academy of Dermatology

IARC: International Agency for Research on Cancer

GWAS: Genome-Wide Association Studies

WGS: Whole-Genome Sequencing

SNPs: Single-Nucleotide Polymorphisms

eQTL: expression Quantitative Trait Loci

ICD-9: International Classification of Diseases, Ninth Revision

ICD-10: International Classification of Diseases, Tenth Revision

ORs: Odds Ratios

CI: Confidence Intervals

RR: RelativeRatio

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΔΕΡΜΑ

1.1.1 Ανατομία Δέρματος

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος και αντιπροσωπεύει περίπου το 8% του σωματικού βάρους του ενήλικα. Η επιφάνεια του δέρματος παρουσιάζει πτυχώσεις (γραμμές του Langer). Η τομή του δέρματος στις χειρουργικές επεμβάσεις πρέπει να γίνεται παράλληλα με τις γραμμές αυτές, ώστε η ουλή που θα προκύψει να δώσει καλό αισθητικό αποτέλεσμα. Το δέρμα αποτελείται από την επιδερμίδα και το χόριο (Εικόνα 1).

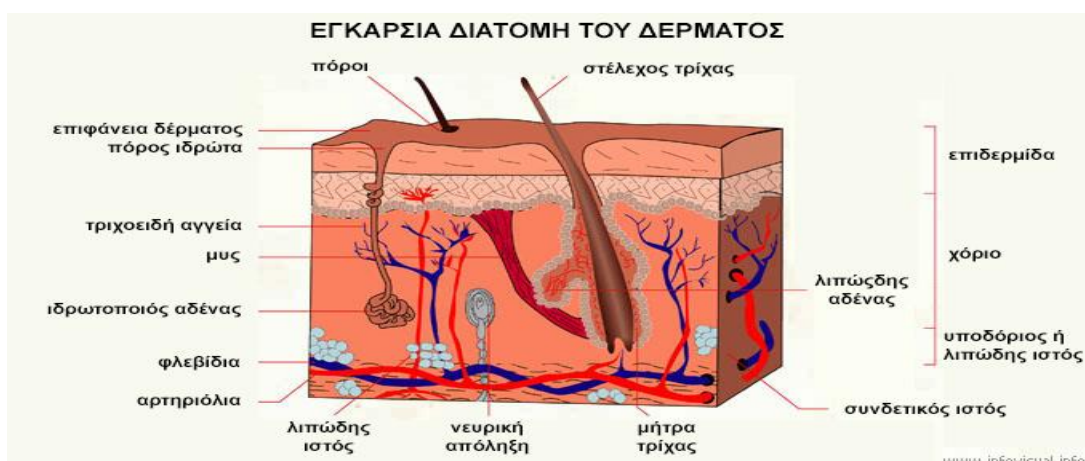
Στην επιδερμίδα διακρίνουμε πέντε στοιβάδες επιθηλιακών κυττάρων: τη βασική ή μητρική, την ακανθωτή, την κοκκώδη, τη διαυγή και την κεράτινη στοιβάδα. Στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας εντοπίζονται τα μελανοκύτταρα, που παράγουν τη μελανίνη.

Το χόριο αποτελείται από συνδετικό ιστό, ίνες (δικτυωτές, ελαστικές, κολλαγόνες κ.λ.π) και κύτταρα, όπως ινοβλάστες, πλασματοκύτταρα, μαστοκύτταρα κ.ά. Το χόριο χαρακτηρίζεται από την παρουσία των εξαρτημάτων του δέρματος, στα οποία περιλαμβάνονται:

- Οι σμηγματογόνοι αδένες, που απαντώνται σε όλη την επιφάνεια του σώματος, εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα,
- Οι ιδρωτοποιοί αδένες και
- Οι τρίχες, που εξορμούνται από τους επιθηλιακούς θύλακες και αναδύονται λοξά.

Κάτω από το χόριο βρίσκονται το υποδόριο ή υποδερμίδα που αποτελείται από το υποδόριο λίπος και χαλαρό συνδετικό ιστό (Κανέλλος 2016).

Εικόνα 1: Ανατομία του δέρματος.



1.1.2 Σπίλοι

Ο σπίλος είναι μια μικρή (6 mm), σαφώς περιγεγραμμένη βλάβη, με σαφή όριο και με μια μόνο απόχρωση του χρώματός του, που κυμαίνεται από μπεζ ή ροζ μέχρι σκούρο καφέ. Οι σπίλοι έχουν καλοήγη φυσική πορεία. Κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής του ασθενούς, αυτοί οι σπίλοι έχουν επίπεδο σχήμα και είναι μικροί και καφεοειδείς. Καλούνται και συνδεδσμικοί σπίλοι, λόγω του ότι τα κύτταρα του σπύλου εντοπίζονται στο όριο επιδερμίδας και χορίου. Κατά τις επόμενες δύο δεκαετίες, αυτοί οι σπίλοι μεγαλώνουν σε μέγεθος και συχνά υπεγείρονται, δίνοντας την εντύπωση δερματικού στοιχείου.

Ο όρος “άτυπος σπύλος” έχει αντικαταστήσει τον όρο “δυσπλαστικός σπύλος”. Η διάγνωση των άτυπων σπύλων είναι κλινική και όχι ιστολογική και οι σπίλοι θα πρέπει να αφαιρούνται μόνο εφ’ όσον υπάρχει υποψία μελανώματος. Κλινικά οι σπίλοι αυτοί είναι μεγάλοι (διάμετρος >5 χιλιοστά), χωρίς σαφές περίγραμμα, με ανώμαλα όρια και ανομοιόμορφα κατανεμημένη χρωστική. Οι έρευνες έχουν προσδιορίσει έναν αυξημένο κίνδυνο μελανώματος στους παρακάτω πληθυσμούς: ασθενείς με 50 ή περισσότερους σπύλους με έναν ή περισσότερους άτυπους σπύλους και με έναν σπύλο διαμέτρου τουλάχιστον 8 χιλιοστών ή μεγαλύτερο και ασθενείς με λίγους έως πολλούς αποδεδειγμένα άτυπους σπύλους. Οι συγγενείς ατόμων με οικογενές μελάνωμα (πολυάριθμους άτυπους σπύλους και θετικό οικογενειακό ιστορικό) δικαιούνται να υποβάλλονται σε ακόμη πιο προσεκτική εξέταση, μιας και ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε αυτά τα άτομα αγγίζει το 50% μέχρι την ηλικία των 50 ετών.

Η αντιμετώπιση μικρών συγγενών σπύλων, διαμέτρου μικρότερης από μερικά εκατοστά, δεν ακολουθεί μια ενιαία γραμμή. Η συντριπτική πλειοψηφία δε θα εξαλλαγεί ποτέ, αλλά μερικοί ειδικοί πιστεύουν ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος σε αυτές τις περιοχές μπορεί να είναι λίγο μεγαλύτερος από ότι στο γενικό πληθυσμό. Η εκτομή θα πρέπει να θεωρείται σωστή επιλογή για συγγενείς σπύλους των οποίων τα όρια (τραχιά, οζώδη) ή το χρώμα (διάφορες αποχρώσεις) καθιστούν δύσκολη την παρατήρηση πρώιμων σημείων εξαλλαγής.

Οι κυανοί σπίλοι είναι μικρές, ελαφρώς υπεργερμένες και κυανόμαυρες βλάβες. Αν υφίστανται χωρίς να εμφανίσουν κάποια αλλοίωση επί πολλά χρόνια, μπορεί να θεωρηθούν καλοήθεις, αφού οι κακοήθεις κυανοί σπίλοι είναι σπάνιοι. Παρ’ όλα αυτά, οι κυανόμαυρες βλατίδες και τα οζίδια που πρωτοεμφανίζονται ή αυξάνονται σε μέγεθος θα πρέπει να αξιολογούνται για τον αποκλεισμό του οζώδους μελανώματος (Κανέλλος 2016; Papadakis & McPhee 2017).

1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Ο καρκίνος του δέρματος είναι ένα κακοήθες νεόπλασμα που αναπτύσσεται από τα κύτταρα της επιδερμίδας. Οφείλεται κυρίως στην υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, υπάρχει όμως και κληρονομική προδιάθεση. Αποτελεί έναν αρκετά συχνό τύπο καρκίνου, καθώς σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) καταγράφονται σχεδόν 3 εκατομμύρια περιστατικά ετησίως. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι καρκίνου του δέρματος: Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα (BCC), Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (SCC) και το Μελάνωμα. Τα πρώτα δύο μαζί με έναν αριθμό από λιγότερο κοινούς καρκίνους του δέρματος είναι γνωστά ως καρκίνος του δέρματος χωρίς μελάνωμα (NMSC).

1.2.1 Ακτινική Υπερκεράτωση (AK)

Οι ακτινικές υπερκερατώσεις είναι μικρές (0,2-0,6 cm) πλάκες στο χρώμα του δέρματος, ροδόχροες ή ελαφρώς υπερμελαγχρωτικές, που δίνουν την αίσθηση του γυαλόχαρτου και είναι ευαίσθητες κατά την ψηλάφηση. Παρουσιάζονται στα ηλιοεκτεθειμένα σημεία του σώματος ατόμων άνω των 60 ετών με δέρμα ανοιχτού χρώματος. Οι ακτινικές υπερκερατώσεις θεωρούνται προκαρκινωμάτωσης καταστάσεις, αλλά μόνο 1:1.000 βλάβες το χρόνο εξελίσσονται σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα. Η εφαρμογή υγρού αζώτου αποτελεί μια ταχεία και αποτελεσματική μέθοδο εξάλειψης των δερματικών αλλοιώσεων. Σε άτομα με πολλαπλές βλάβες σε μια περιοχή θα πρέπει να θεωρηθούν εναλλακτικές μέθοδοι χρησιμοποιώντας τοπικούς παράγοντες. Κάθε βλάβη που επιμένει θα πρέπει να αξιολογείται με πιθανή βιοψία (Κανέλλος 2016; Papadakis & McPhee 2017).

1.2.2 Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα (BCC)

Τα Βασικοκυτταρικά Καρκινώματα αποτελούν τις πιο συχνές μορφές καρκίνου. Παρουσιάζονται στις ηλιοεκτεθειμένες περιοχές του δέρματος υγιών και ανοιχτόχρωμων ατόμων ηλικίας 40-80 ετών. Η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελεί την αιτία εκδήλωσης της νόσου. Εκδηλώνονται τις περισσότερες φορές με τη μορφή βλατίδων ή οζιδίων που φέρουν στην επιφάνειά τους μια κεντρική εφελκίδα ή διάβρωση. Τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα αναπτύσσονται αργά, αποκτώντας διάμετρο 1-2 εκατοστών ή μεγαλύτερη συνήθως μετά από τη μακροχρόνια ανάπτυξή τους. Στην περιοχή της ράχης και του στέρνου τα βασικοκυτταρικά καρκινώματα εκδηλώνονται ως ερυθρωπές, ελαφρώς στίλβουσες, λεπιδώδεις πλάκες. Ενώ δεν παρουσιάζονται σχεδόν ποτέ μεταστάσεις, η θεραπεία των βασικοκυτταρικών καρκινωμάτων μπορεί να προκαλέσει σημαντικά αισθητή δυσμορφία στις περιοχές αυτές, ειδικά σε μη επαρκώς θεραπευθείσες ή υποτροπιάζουσες βλάβες. Όταν υπάρχει υποψία για την ύπαρξη βασικοκυτταρικού καρκινώματος, θα πρέπει να διενεργείται βιοψία στη βλάβη με τη μέθοδο της επιφανειακής οριζόντιας εκτομής (shaved biopsy) ή με τη βοήθεια διατρητήρα

(punch biopsy). Η ακτινοθεραπεία είναι αποτελεσματική και μερικές φορές κατάλληλη για ηλικιωμένα άτομα. Η χειρουργική επέμβαση Mohs παρέχει τα υψηλότερα ποσοστά ίασης (98%) και έχει ως αποτέλεσμα τη μικρότερη απώλεια ιστού (Κανέλλος 2016; Papadakis & McPhee 2007).

1.2.3 Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (SCC)

Το Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα παρουσιάζεται συνήθως ως επακόλουθο μακροχρόνιας έκθεσης στον ήλιο σε ηλιοεκτεθειμένα μέρη του δέρματος ανοιχτόχρωμων ατόμων, τα οποία εκδηλώνουν ηλιακό έγκαυμα εύκολα κατά την έκθεσή τους στον ήλιο και μαυρίζουν ελάχιστα. Είναι δυνατόν να προέλθει από ακτινική υπερκεράτωση. Οι βλάβες εκδηλώνονται ως μικρά ερυθρά, κωνικά, σκληρά οζίδια, τα οποία μερικές φορές εξελκώνονται. Η συχνότητα των μεταστάσεων δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια, αν και η μεταστατική νόσος θεωρείται λιγότερο πιθανή στην περίπτωση του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος που εξορμάται από ακτινική υπερκεράτωση σε σχέση με εκείνο που εμφανίζονται *de novo*. Τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα των χειλέων, της στοματικής κοιλότητας, της γλώσσας και των γεννητικών οργάνων έχουν πολύ υψηλότερα ποσοστά μεταστάσεων.

Η εξέταση του δέρματος και η θεραπεία είναι το ίδιο σημαντικά όπως και στην περίπτωση του βασικοκυτταρικού καρκινώματος. Η καλύτερη μέθοδος αντιμετώπισης του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος είναι η χειρουργική εκτομή. Η ηλεκτροαποξήρανση και η απόξεση, καθώς και η ακτινοθεραπεία με ακτίνες Χ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για κάποιες βλάβες. Επιπροσθέτως η ψηλάφηση των χειλέων είναι ουσιαστική για την ανίχνευση σκληρών ή διηθημένων περιοχών που αντιπροσωπεύουν αρχόμενο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα. Σε όλες τις περιπτώσεις θα πρέπει να διενεργείται βιοψία (Κανέλλος 2016; Papadakis & McPhee 2007).

1.2.4 Κακήθες Μελάνωμα

Το κακήθες μελάνωμα αποτελεί την πιο σοβαρή μορφή καρκίνου του δέρματος. Είναι θανατηφόρος αν και εμφανίζεται σε μικρότερο ποσοστό από τα 2 παραπάνω και προέρχεται από τα μελανοκύτταρα της επιδερμίδας. Μπορεί να αναπτυχθεί και σε υγιή επιφάνεια δέρματος (*de novo*) αλλά και σε περιοχές που εκτίθενται στην ηλιακή ακτινοβολία. Παθολογοανατομικά εμφανίζεται με διάφορους τύπους, ενώ μακροσκοπικά είναι ανώμαλο στο σχήμα και έχει διαφορετικό μέγεθος, χρώμα και εμφανίζει μεγάλο κίνδυνο μεταστάσεων.

1.2.5 Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος του δέρματος είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου στον άνθρωπο (Linares et al. 2015). Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος, συμπεριλαμβανομένου τόσο του κακοήθους μελανώματος (MM) όσο και του μη μελανωματικού καρκίνου του δέρματος (NMSC) έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO). Μέχρι στιγμής, μεταξύ 2-3 εκατομμυρίων μη μελανωματικού καρκίνου και 132,000 κακοήθους μελανώματος εμφανίζονται παγκοσμίως κάθε χρόνο. Ένας στους τρεις καρκίνους που διαγνώστηκαν είναι ένας καρκίνος του δέρματος και σύμφωνα με το Skin Cancer Foundation Statistics ένας στους πέντε Αμερικανούς θα αναπτύξει καρκίνο του δέρματος κατά τη διάρκεια της ζωής του. Η επίπτωση του NMSC είναι 18-20 φορές υψηλότερη από αυτή του μελανώματος (Amos et al. 2011; Apalla et al. 2017). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών, η επίπτωση του SCC αυξάνεται κατά 3-10% ετησίως. Για την ίδια περίοδο, εκτιμάται ότι το ποσοστό επίπτωσης του BCC έχει αυξηθεί μεταξύ 20-80% στις ΗΠΑ. Το BCC είναι πιο κοινό από το SCC, με τυποποιημένη αναλογία περίπου 4:1.2 (Apalla et al. 2017).

Καθώς τα επίπεδα του όζοντος εξαντλούνται, η ατμόσφαιρα χάνει όλο και περισσότερο τη λειτουργία του προστατευτικού φίλτρου και η περισσότερη ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία φτάνει στην επιφάνεια της Γης. Εκτιμάται ότι η μείωση των επιπέδων του όζοντος κατά 10% θα οδηγήσει σε επιπλέον 300,000 περιπτώσεις μη μελανωματικού καρκίνου και 4,500 περιπτώσεις μελανώματος του δέρματος. Η παγκόσμια επίπτωση του μελανώματος συνεχίζει να αυξάνεται, ωστόσο, οι κύριοι παράγοντες που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη του μελανώματος φαίνεται να συνδέονται με την έκθεση στον ήλιο και το ιστορικό ηλιακών εγκαυμάτων (WHO).

1.3 ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Το μελάνωμα είναι μια μορφή καρκίνου του δέρματος που εμφανίζεται όταν τα κύτταρα που παράγουν χρωστικές, γνωστά ως μελανοκύτταρα, μεταλλάσσονται και γίνονται καρκινικά. Το μελάνωμα είναι μια πάρα πολύ σοβαρή νόσος, γιατί δίνει εύκολα μεταστάσεις σε άλλα όργανα του σώματος, μέσω του λεμφικού συστήματος. Αυτό το σύστημα αποτελείται από λεπτά αγγεία που σχηματίζουν δίκτυο, όπως τα αιμοφόρα αγγεία, σε όλους τους ιστούς του σώματος. Τα καρκινικά κύτταρα αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και δια μέσου της λέμφου (του υγρού που περιέχουν τα λεμφικά αγγεία), φτάνουν στους λεμφαδένες. Ομάδες από λεμφαδένες βρίσκονται κυρίως στις μασχάλες, το λαιμό, τους βουβώνες και τη κοιλιά. Το μελάνωμα μπορεί επίσης να δώσει μεταστάσεις και μέσω του αίματος (αιματογενής διασπορά). Τα περισσότερα κύτταρα χρωστικής βρίσκονται στο δέρμα, αλλά το μελάνωμα μπορεί επίσης να εμφανιστεί στα μάτια (οφθαλμικό μελάνωμα) και σε άλλα μέρη του σώματος, περιλαμβανομένων οστών των

εντέρων. Το κακόηθες μελάνωμα (Εικόνα 2) αποτελεί σήμερα γύρω στο 3% του συνόλου των καρκίνων στο ανθρώπινο σώμα. Το 30-40% των μελανωμάτων αναπτύσσονται σε έδαφος προϋπάρχοντος μελανοκυτταρικού σπίλου, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό αναπτύσσεται σε υγιές δέρμα χωρίς την παρουσία συνοδού ή προγενέστερης βλάβης. Το μελάνωμα διαγιγνώσκεται συνήθως κατά τη μέση ηλικία των 50 ετών, αλλά σήμερα διαγιγνώσκεται επίσης πιο συχνά στους νεότερους ενήλικες και πολύ σπάνια στην παιδική ηλικία (Κανέλλος 2016; Papadakis & McPhee 2017). Όταν εντοπιστεί νωρίς, το 5-ετές ποσοστό επιβίωσης για το μελάνωμα είναι 99%.

Εικόνα 2: Κακόηθες μελάνωμα.



1.3.1 Ιστορία Μελανώματος

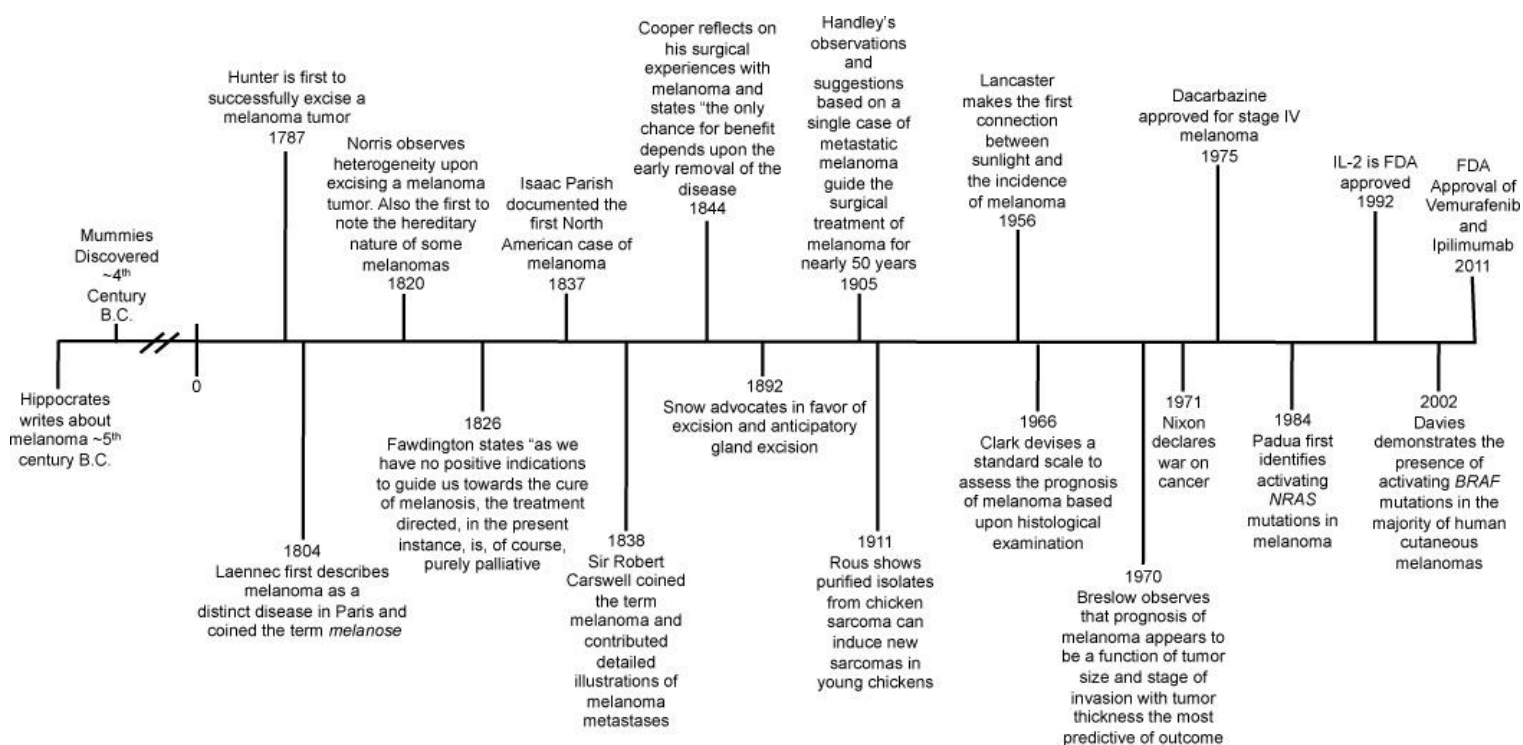
Τον 5^ο αιώνα π.Χ., ο Ιπποκράτης περιέγραψε και όρισε για πρώτη φορά το μελάνωμα από την ελληνική λέξη μέλας που σημαίνει σκούρο. Εννέα προκολομβιανικές μούμιες στο Περού της ίδιας χρονικής περιόδου που μελετήθηκαν τη δεκαετία του '60 εμφανίζουν στο σκελετό τους στοιχεία μελανώματος. Η επόμενη αναφορά στον καρκίνο του δέρματος έγινε από τον Έλληνα γιατρό, Ρούφο τον Εφέσιο. Το 1787, πρώτος ο Σκωτσέζος John Hunter χειρούργησε άντρα ασθενή με μελάνωμα και αφαίρεσε με επιτυχία τον κακόηθη όγκο (Εικόνα 3). Τότε δεν γνώριζε τι ακριβώς είναι και αναφέρθηκε σε ένα καρκινικό υποσάρκωμα στην κάτω γνάθο. Ο αφαιρούμενος αυτός όγκος διατηρήθηκε στο Hunterian Museum του Royal College of Surgeons of England. Εξετάστηκε μικροσκοπικά το 1968 και κατηγοριοποιήθηκε ως δείγμα μεταστατικού μελανώματος.

Το 1804 ο Rene Laennec διαχώρισε το μελάνωμα ως μια ξεχωριστή ασθένεια και πρόσθεσε τον όρο μελάνωση. Λίγο αργότερα, το 1820, ο William Norris διέκρινε την ετερογένεια που παρουσιάζουν πολλοί όγκοι του μελανώματος. Εκτέλεσε αυτοψία σε έναν 59χρονο άντρα και βρήκε πως όλα τα ενδοκοιλιακά όργανα, εκτός από το ήπαρ και τη χοληδόχο κύστη, είχαν προσβληθεί από τη νόσο και υποστήριζε

ότι το μελάνωμα μπορεί να είναι μεταστατικό μιας και διεισδύει σε γειτονικά όργανα. Αργότερα, πρότεινε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των κοινών σπύλων και του δερματικού μελανώματος καθώς και ότι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την εξέλιξη του.

Το 1826, ο Breschet πραγματοποίησε κλινικές παρατηρήσεις του μελανώματος και επιβεβαίωσε την ύπαρξή του και σε άλλα είδη οργανισμών, ενώ το 1837 τεκμηριώνεται η πρώτη περίπτωση γυναίκας ασθενούς με μελάνωμα στη Βόρεια Αμερική από τον Isaac Parish. Ο τελικός ορισμός ως μελάνωμα προήλθε από τον Sir Robert Carswell το 1838. Το 1956 ο Henry Lancaster ανέφερε τη σημαντική συσχέτιση της υπεριώδους ακτινοβολίας από την έκθεση στον ήλιο με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος. Το 1970 ο Alexander Breslow παρατήρησε ότι η πρόγνωση του δερματικού μελανώματος σχετιζόταν τόσο με το μέγεθος του όγκου και το επίπεδο της διήθησης όσο και με το πάχος του όγκου. Τελευταία, οι ερευνητές στρέφονται προς τη γενετική αιτιολογία του δερματικού μελανώματος και ανακάλυψαν ότι το 5-12% των κληρονομικών περιπτώσεων σχετίζονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο CDKN2A. Στις αρχές της δεκαετίας '80 ταυτοποίησαν μεταλλάξεις του NRAS σε κύτταρα μελανώματος και το 2002 του γονιδίου BRAF, ορίζοντας τα γονίδια αυτά ως δείκτες πρόγνωσης του δερματικού μελανώματος (Πλάκα 2017; Vito et al. 2012).

Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση των γεγονότων που αποτέλεσαν σημεία-κλειδιά στην ιστορία του μελανώματος.



1.3.2 Χαρακτηριστικά Μελανώματος

Πώς εμφανίζεται το μελάνωμα;

Συχνά, η πρώτη ένδειξη για το μελάνωμα είναι αλλαγή στο μέγεθος, σχήμα ή χρώμα ενός σπίλου (ελιάς). Φυσιολογικά ένας σπίλος είναι ένα καφέ, σκούρο ή μαύρο σημάδι στο δέρμα. Μπορεί να είναι επίπεδος ή επηρμένος και το σχήμα μπορεί να είναι στρογγυλό ή οβάλ. Οι σπίλοι είναι συνήθως μικροί, μικρότεροι από 0,5 εκατοστό. Ένας σπίλος μπορεί να υπάρχει από τη γέννηση ή μπορεί να εμφανιστεί αργότερα, συνήθως τα πρώτα 10 χρόνια της ζωής. Πολλοί από τους σπίλους εξαφανίζονται σε μεγάλες ηλικίες. Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν 10-30 σπίλους στο δέρμα τους. Η μεγάλη πλειοψηφία από αυτούς είναι τελείως ακίνδυνοι. Φυσικά το μελάνωμα μπορεί να εμφανιστεί και σαν ένας καινούριος σπίλος.

Το μελάνωμα στους άνδρες εμφανίζεται συχνότερα στον κορμό, στο κεφάλι και στο λαιμό. Στις γυναίκες εμφανίζεται συνήθως στους βραχίονες και στις κνήμες. Είναι πιο συχνό στα ανοιχτόχρωμα δέρματα. Στη μαύρη φυλή και σε πολύ μελαχρινά άτομα, είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί στις παλάμες και στα πέλματα. Δεν υπάρχει μοναδική ή συγκεκριμένη κλινική παρουσίαση μελανώματος. Η κλινική παρουσίαση των μελανωμάτων ποικίλει ανάλογα με τον ανατομικό εντοπισμό και τον τύπο ανάπτυξης, δηλαδή τον ιστοπαθολογικό τύπο του καρκίνου. Υπάρχουν περίπου 15,400 νέα μελανώματα στο Ηνωμένο Βασίλειο κάθε χρόνο και 2,400 θάνατοι δηλαδή πάνω από 6 κάθε μέρα, σύμφωνα με το Cancer Research UK.

Ποια είναι τα αίτια του μελανώματος;

Ξέρουμε ότι η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία του ήλιου είναι ένας παράγοντας κινδύνου που αυξάνει την πιθανότητα προσβολής από μελάνωμα. Οι άνθρωποι με κόκκινα ή ξανθά μαλλιά, μπλε μάτια και γενικά ανοιχτόχρωμοι, είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν μελάνωμα. Τα άτομα με μαύρο χρώμα δέρματος λιγότερο συχνά εμφανίζουν τη νόσο, προφανώς γιατί έχουν περισσότερη μελανίνη στο δέρμα τους που τους προστατεύει. Ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος είναι μεγαλύτερος σε ανθρώπους με δυσπλαστικούς σπίλους ή οικογενειακό ιστορικό μελανώματος ή σε αυτούς με μεγάλους σπίλους (ελιές). Ρόλο παίζει επίσης και το μέρος όπου ένα άτομο ζει. Σε περιοχές με αυξημένη ηλιακή ακτινοβολία, ο κίνδυνος αυξάνεται. Έτσι, σε παγκόσμιο επίπεδο τα μεγαλύτερα ποσοστά μελανώματος βρίσκονται στην Αυστραλία.

Πώς γίνεται η διάγνωση του μελανώματος;

Επειδή το μελάνωμα μπορεί να δώσει μεταστάσεις, η έγκαιρη διάγνωση από τον δερματολόγο έχει μεγάλη σημασία. Η βιοψία είναι αυτή που θα θέσει την οριστική διάγνωση. Ο όγκος αφαιρείται και εξετάζεται κάτω από το μικροσκόπιο από ένα παθολογοανατόμο. Το επόμενο βήμα είναι να καθοριστεί η έκταση ή το στάδιο του όγκου και αυτό γίνεται με τη μέτρηση του πάχους του, το βάθος στο οποίο έχει φτάσει στο δέρμα και ανάλογα με το εάν υπάρχουν μεταστάσεις στους παρακείμενους λεμφαδένες ή σε άλλα όργανα του σώματος. Όταν καθοριστεί το στάδιο, τότε σχεδιάζεται ανάλογα και η θεραπεία, λαμβάνοντας επί πλέον υπ' όψιν και την ηλικία και τη γενική υγεία του ασθενή (Situm et al. 2014).

Πώς θεραπεύεται το μελάνωμα;

Οι περισσότεροι ασθενείς αντιμετωπίζονται χειρουργικά. Το μελάνωμα και ένα μέρος υγιούς δέρματος γύρω από αυτό αφαιρούνται. Μερικές φορές τοποθετείται και ένα μόσχευμα (=κομμάτι δέρματος από άλλο σημείο που αντικαθιστά το αφαιρεθέν). Η χειρουργική αφαίρεση προκαλεί μερικές φορές την εμφάνιση ουλών. Σε ασθενείς με μελάνωμα που έχει φτάσει σε βάθος ή έχει εξαπλωθεί, υπάρχει ο κίνδυνος της υποτροπής παρ' όλη την αφαίρεση. Τότε, μπορεί να γίνει και η λεγόμενη υποστηρικτική θεραπεία με χημειοθεραπεία (αντικαρκινικά φάρμακα). Επειδή ταυπάρχοντα σήμερα φάρμακα δεν είναι πολύ δραστικά σε περιπτώσεις προχωρημένης νόσου, γίνονται συνεχώς έρευνες και μελετώνται νέες θεραπείες.

Ένα καινούριο θεραπευτικό κεφάλαιο, λέγεται βιοθεραπεία και χρησιμοποιεί φυσικές ουσίες που τις παράγει ο ίδιος ο οργανισμός του ανθρώπου. Σκοπός η ενίσχυση ή η αποκατάσταση του αμυντικού συστήματος του οργανισμού, ώστε να "πολεμήσει" τη νόσο πιο αποτελεσματικά. Δύο τέτοιες ουσίες - φάρμακα, είναι η ιντερλευκίνη-2 και η ιντερφερόνη. Μερικές φορές θα χρειαστούν και ακτινοβολίες, με τις οποίες οι υψηλής ισχύος ακτίνες Χ καταστρέφουν τη ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αυξάνονται και να πολλαπλασιάζονται. Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται περισσότερο για την απάλυνση του πόνου.

Η Αλφαβήτα του Μελανώματος (ABCDE)

Τα 5 πρώτα γράμματα της αλφαβήτου αποτελούν ένα οδηγό για τα πρώιμα προειδοποιητικά σημεία του μελανώματος, σύμφωνα με το SkinCancerFoundation (Ίδρυμα Καρκίνου του Δέρματος).

- A** εκφράζει την ασυμμετρία (ASYMMETRY)
- B** εκφράζει το όριο (BORDER)
- C** εκφράζει το χρώμα (COLOR)
- D** εκφράζει τη διάμετρο (DIAMETER)
- E** εκφράζει την εξέλιξη ή την αλλαγή (EVOLVING)

Εικόνα 4: Σημεία αλλαγής ενός σπίλου σε μελάνωμα.



Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute), περίπου 96,480 νέα μελάνωμα αναμένεται να διαγνωσθούν το 2019 και περίπου 7,230 άνθρωποι αναμένεται να πεθάνουν από μελάνωμα. Υπολογίζεται ότι 192,310 περιπτώσεις μελανώματος θα διαγνωσθούν στις ΗΠΑ το 2019. Από αυτές, 95,830 περιπτώσεις θα είναι *in situ* (μη επεμβατικές), περιορίζονται στην επιδερμίδα (το ανώτερο στρώμα του δέρματος) και 96,480 περιπτώσεις θα είναι επεμβατικές, διεισδύοντας στην επιδερμίδα στο δεύτερο στρώμα του δέρματος (το δέρμα). Από τις επεμβατικές περιπτώσεις, 57,220 θα είναι άνδρες και 39,260 θα είναι γυναίκες.

1.3.3 Επιδημιολογία Μελανώματος

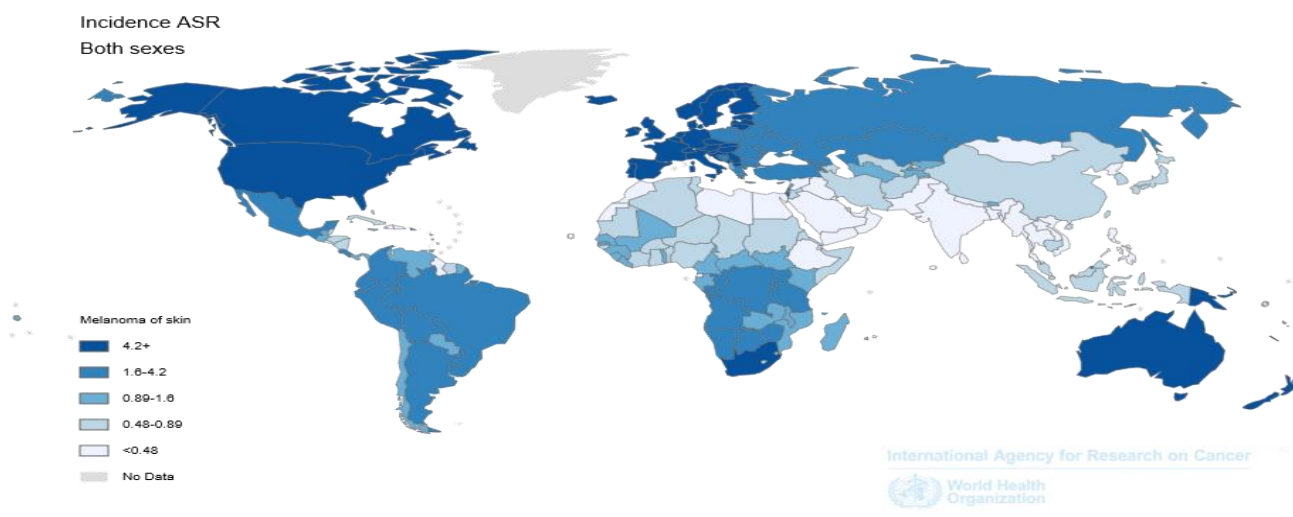
Σύμφωνα με το Skin Cancer Foundation, κατά την τελευταία δεκαετία (2008-2018) ο αριθμός των νέων περιπτώσεων μελανώματος που διαγνώστηκαν ετησίως αυξήθηκε κατά 53%. Το μελάνωμα είναι πιο κοινό στη λευκή φυλή από ότι σε άλλες φυλές. Συνολικά, ο κίνδυνος ανάπτυξης μελανώματος κατά τη διάρκεια ζωής

είναι περίπου 2,4% στους Καυκάσιους, 0,1% στους μαύρους πληθυσμούς και 0,5% στους Ισπανόφωνους. Ο κίνδυνος μελανώματος αυξάνεται με την ηλικία. Η μέση ηλικία κατά τη στιγμή της διάγνωσης είναι περίπου 60 έτη (Nathan et al. 2015). Το μελάνωμα είναι περίπου 1.5 φορές πιο συχνό στους άνδρες από τις γυναίκες. Έχει αποδειχθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης δεν διαφέρει σημαντικά μέχρι την ηλικία των 40 ετών, ωστόσο μετά την ηλικία των 75 ετών η συχνότητα εμφάνισης γίνεται σχεδόν τριπλάσια σε άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. Ειδικότερα, η Αμερικανική Ακαδημία Δερματολογίας (AAD) αναφέρει ότι το μελάνωμα είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες ηλικίας 20 έως 29 ετών, με 68,000 νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2010 (Riker et al. 2010). Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισής του συνδέεται στενά με το συστατικό χρώμα του δέρματος και εξαρτάται από τη γεωγραφική ζώνη (Apalla et al. 2016).

Τα συσσωρευτικά επιδημιολογικά δεδομένα από την Ευρώπη, τον Καναδά και τις Ηνωμένες Πολιτείες δείχνουν μια συνεχή και δραματική αύξηση της επίπτωσης κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης έχουν αναφερθεί στη Νέα Ζηλανδία με 50 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα, και την Αυστραλία με 48 περιπτώσεις ανά 100,000 άτομα (59 για άνδρες και 39 για γυναίκες το 2011), ενώ ακολουθούν οι ΗΠΑ (21.6 νέες περιπτώσεις ετησίως ανά 100,000 το 2012) και η Ευρώπη (13.2 και 13.1 νέες περιπτώσεις ετησίως ανά 100,000 ανδρών και γυναικών αντίστοιχα).

Η μεγάλη διακύμανση των ποσοστών επίπτωσης δεν παρατηρείται μόνο μεταξύ διαφορετικών ηπείρων. Τα στοιχεία από το European Cancer Observatory δείχνουν επίσης σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών. Οι σκανδιναβικές χώρες (ιδίως η Σουηδία, με εκτιμώμενη συχνότητα επίπτωσης 23.9 το 2012), η Ελβετία και η Μεγάλη Βρετανία αναφέρουν τα υψηλότερα ποσοστά (> 16.9 ανά 100,000 για το 2012), ενώ οι βαλκανικές χώρες, η Μολδαβία, η Βοσνία και Ερζεγοβίνη, κρατούν χαμηλά επίπεδα (<5.3 ανά 100,000 για το 2012) (Apalla et al. 2017).

Εικόνα 5: Επιδημιολογία μελανώματος παγκοσμίως για το έτος 2012 (IARC).



1.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η γενετική επιδημιολογία είναι ο επιστημονικός κλάδος που αποσκοπεί στον καθορισμό του ρόλου των γενετικών παραγόντων στην υγεία και την ασθένεια καθώς και της αλληλεπίδρασής τους με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στο παρελθόν, η γενετική επιδημιολογία είχε αποδειχθεί ιδιαίτερα επιτυχημένη στη χαρτογράφηση γονιδίων με μεγάλα μεγέθη επιδράσεων σε ατομικό επίπεδο, όπως για παράδειγμα στις μονογονικές διαταραχές όπου η οικογενειακή επανάληψη ακολουθεί τους νόμους της μεντελιανής κληρονομικότητας. Με την εμφάνιση νέων μεθόδων γονοτύπησης και την ανάπτυξη μεθοδολογιών γενετικής στατιστικής, ο τομέας της γενετικής επιδημιολογίας έχει εστιάσει πρόσφατα την προσοχή του στην ανάλυση της γενετικής αρχιτεκτονικής των κοινών πολύπλοκων ασθενειών. Σε αντίθεση με τις μονογονικές ασθένειες, οι κοινές πολύπλοκες ασθένειες προκαλούνται από μεγάλο αριθμό γονιδίων με μικρό έως μέτριο μέγεθος επίδρασης και από αλληλεπιδράσεις με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ευρυγονιδιωματικές μελέτες μεγάλης κλίμακας και μελέτες για ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS και WGS) έχουν καταγράψει μεγάλο αριθμό γενετικών παραλλαγών που αφορούν σύνθετα χαρακτηριστικά και ασθένειες. Αναμένεται πως μεταγενέστερες προσπάθειες θα αλλάξουν τον τρόπο με τον οποίο θα εξασκείται η ιατρική στο άμεσο μέλλον (Panatsopoulou & Wheeler 2018).

1.4.1 Το Ανθρώπινο Γονιδίωμα

Οι τελευταίες δεκαετίες χαρακτηρίζονται από μια σημαντική ανάπτυξη των βιοϊατρικών επιστημών γενικά και πιο συγκεκριμένα της γενετικής. Η πρόοδος που έχει συντελεστεί από το 1865, όταν ο Gregor Mendel διατύπωσε τους θεμελιώδεις νόμους της γενετικής, μέχρι σήμερα έχουν καταδείξει το ρόλο της γενετικής πληροφορίας τόσο στην φυσιολογία όσο και στην παθολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Η πληροφορία αυτή κωδικοποιείται με τη μορφή βάσεων του DNA, το οποίο αποτελεί και το φορέα της κληρονομικότητας (Watson & Crick 1953). Το σύνολο της γενετικής πληροφορίας του ανθρώπου συνιστά το ανθρώπινο γονιδίωμα. Υπολογίζεται πως το απλοειδές ανθρώπινο γονιδίωμα, αυτό που απαντάται δηλαδή στους γαμέτες, αποτελείται από 3.3 περίπου δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων, τα οποία είναι νουκλεοτίδια, και σύμφωνα με τις πρόσφατες εκτιμήσεις περιέχει περίπου 20,000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Λιγότερο από το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος συνδράμει στην κωδικοποίηση πρωτεϊνών (Παναγιώτου 2014; Clamp et al. 2007).

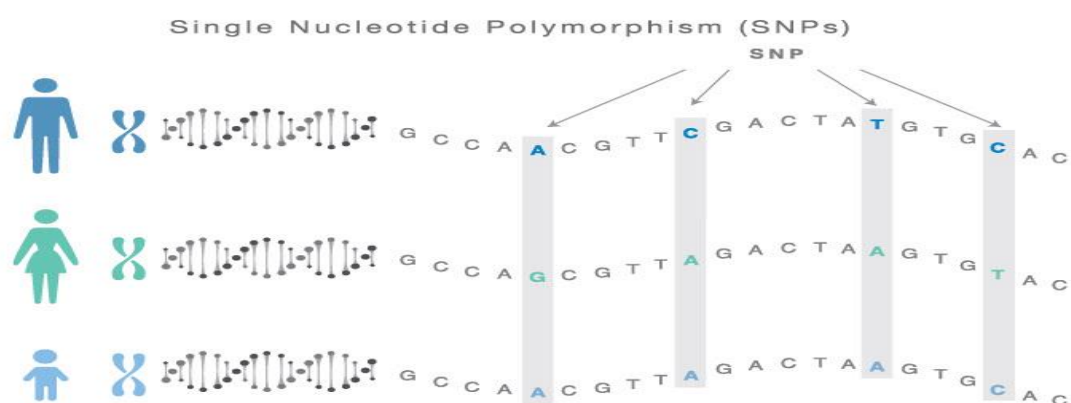
1.4.2 Ποικιλομορφία Ανθρώπινου Γονιδιώματος

Το γονιδίωμα δύο ατόμων που δεν έχουν κάποια συγγένεια μεταξύ τους είναι πανομοιότυπο κατά 99.9%, ενώ το υπόλοιπο 0.1% ποικίλλει με διάφορους

τρόπους. Αυτό σημαίνει πως στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 3 εκατομμύρια πολυμορφικές θέσεις. Οι εναλλακτικές αλληλουχίες που βρίσκονται σε μια πολυμορφική θέση καλούνται αλληλόμορφα ή αλλήλια. Για μια δεδομένη θέση ένα άτομο μπορεί να είναι ομόζυγο ή ετερόζυγο, δηλαδή να έχει τα ίδια ή διαφορετικά αλληλόμορφα αντιστοίχως στα δύο χρωμοσώματα. Η ποικιλομορφία του ανθρώπινου γονιδιώματος κυμαίνεται από μεγάλες δομικές αλλαγές ολόκληρων χρωμοσωμικών περιοχών μέχρι πολυμορφισμούς μερικών ή και ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Οι πολυμορφισμοί του ενός νουκλεοτιδίου ή μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) αποτελούν την πιο συχνά απαντώμενη μορφή ποικιλομορφίας στο ανθρώπινο DNA. Οι πολυμορφισμοί (Εικόνα 6) συνιστώνται στην αντικατάσταση μιας βάσης από κάποια άλλη (για παράδειγμα μια αδερίνη αντικαθίσταται από κυτοσίνη) και έχουν συνήθως μικρή ως μέτρια διεισδυτικότητα. Τα SNPs απαντώνται με συχνότητα $\geq 1\%$ στον πληθυσμό, ενώ για πολυμορφισμούς με μικρότερες συχνότητες στον πληθυσμό και μεγάλη διεισδυτικότητα χρησιμοποιείται ο όρος μετάλλαξη.

Η πλειοψηφία των πολυμορφικών θέσεων του γονιδιώματος όπου εντοπίζονται τα SNPs είναι κυρίως διαλληλικές, δηλαδή δύο διαφορετικές μορφές, π.χ. Α ή Γ. Δεδομένου ότι σε έναν μη νοσούντα πληθυσμό τα δύο αυτά αλληλόμορφα θα πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, το ένα από τα δύο αλληλόμορφα μιας πολυμορφικής θέσης έχει συχνότητα $< 50\%$ και ονομάζεται ελάσσον αλλήλιο και το άλλο έχει συχνότητα $> 50\%$ και καλείται μείζον αλλήλιο. Ακόμη, με βάση τη συχνότητα του ελάσσονος αλληλίου οι πολυμορφισμοί αυτοί διακρίνονται σε κοινούς (συχνότητα $> 5\%$) και σπάνιους (συχνότητα $\leq 5\%$). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ο αριθμός των SNPs με μεγάλες συχνότητες ελάσσονος αλληλομόρφου είναι αισθητά μικρότερος από αυτόν των SNPs με μικρότερες συχνότητες (Παναγιώτου 2014).

Εικόνα 6: Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί (SNPs).



1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Οι ευρυγονιδιωματικές μελέτες GWAS διερευνούν ταυτόχρονα εκατομμύρια SNPs σε ολόκληρο το γονιδίωμα και αξιολογούν πιθανούς συσχετισμούς για να εντοπίσουν γονίδια που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες. Ένα κύριο χαρακτηριστικό των GWAS μελετών είναι ότι έχουν ελεύθερη υπόθεση, προσφέροντας την ευκαιρία να ξεπεραστούν οι δυσκολίες και τα εμπόδια που επιβάλλει η ελλιπής κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ασθενειών. Επομένως, τα προηγουμένως ανυποψίαστα γονίδια και μονοπάτια που δεν θα είχαν εξεταστεί ποτέ θα μπορούσαν τώρα να αποκαλυφθούν στο πλαίσιο αυτής της προσέγγισης. Τα τελευταία χρόνια, η GWAS ανάλυση έχει εντοπίσει περισσότερες από 2,000 ισχυρές ενώσεις με περισσότερες από 300 σύνθετες ασθένειες και γνωρίσματα. Δεδομένου ότι η γενετική αρχιτεκτονική αρκετών ασθενειών είναι μάλλον περίπλοκη, κάθε SNP που διερευνάται συμβάλλει ελάχιστα στον γενικό κίνδυνο ενός ατόμου. Έτσι, οι μεμονωμένες GWAS συχνά υπονομεύονται για να ανιχνεύσουν νέες παραλλαγές και η στατιστική σύνθεση πληροφοριών από διάφορους πόρους που αξιολογούν το ίδιο ερευνητικό ερώτημα έχει γίνει αναγκαιότητα (Evangelou & Stratigos 2016).

Υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις GWAS με βάση τον πληθυσμό για το μελάνωμα (Amos et al. 2011; Barrett et al. 2011; Bishop et al. 2009; Macgregor et al. 2011). Αυτές οι μελέτες έχουν εντοπίσει 13 τόπους οι οποίοι ήταν γενικότεροι για το γονιδίωμα, αν και ορισμένες από αυτές τις περιοχές ήταν ήδη γνωστοί τόποι κινδύνου για μελάνωμα. Πολλοί από τους εντοπισμένους τόπους περιλαμβάνουν γονίδια που σχετίζονται φαινοτυπικά με τον κίνδυνο μελανώματος. Τα MC1R, ASIP, TYR, SLC45A2 συσχετίζονται με χρώση, ενώ τα CDKN2A-MTAP, PLA2G6 και TERT συσχετίζονται με τον αριθμό των σπύλων. Σε τέσσερις επιπλέον τόπους που βρίσκονται στα γονίδια ARNT-SETDB1, CASP8, FTO και MX2, ο λειτουργικός μηχανισμός παραμένει ασαφής.

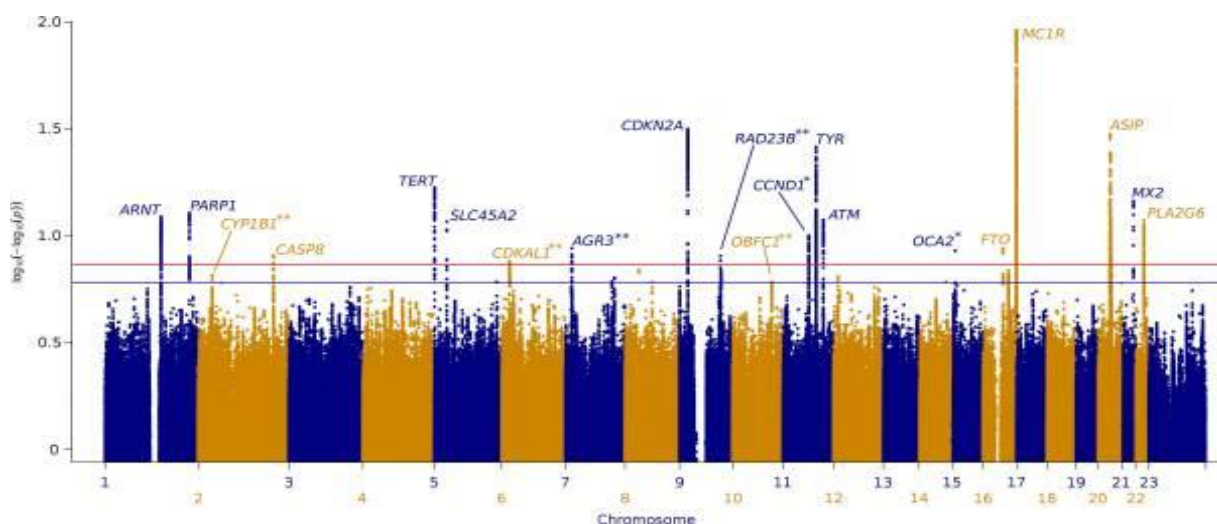
Η μεγαλύτερη GWAS μελέτη στον τομέα του μελανώματος διεξήχθη σε πληθυσμούς ευρωπαϊκής καταγωγής χρησιμοποιώντας ένα σχεδιασμό δύο όψεων, μια ανακάλυψη και μια προσπάθεια αναπαραγωγής. Αυτή η μελέτη εξέτασε συνολικά 15,990 ασθενείς με μελάνωμα και 26,409 μάρτυρες, χρησιμοποιώντας δεδομένα από 11 ομάδες στην προσπάθεια ανακάλυψης και 3 επιπλέον ομάδες στο στάδιο της αναπαραγωγής (Law et al. 2015). Η μελέτη ήταν σε θέση να αναπαράγει και τους 13 προηγουμένους δημοσιευμένους τόπους. Επιπλέον, 5 θέσεις που δεν είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με το μελάνωμα έφτασαν σε σημαντικό βαθμό στο γονιδίωμα, όπως συνέβη και με 2 προαναφερθέντες αλλά μη αναπαραγωγικούς τόπους. Τα ταυτοποιημένα SNPs βρίσκονται στους 2p22.2 (RMDN2), 6p22.3 (CDKAL1), 7p21.1 (AGR3), 9q31.2 (TMEM38B), 10q24.33 (OBFC1), 11q13.3 (CCND1) και 15q13.1 (OCA2) τόπους. Με την εξαίρεση των SNPs στο 9q31.2, οι

προσδιορισμένοι τόποι περιέχουν SNPs που εμπίπτουν σε υποθετικά ρυθμιστικά στοιχεία στακερατινοκύτταρα ή μελανοκύτταρα. Η ανάλυση eQTL πρότεινε ότι τα SNPs στο 7p21 ρυθμίζουν την έκφραση του AGR3 που έχει εμπλακεί στην έκβαση του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών. Τα SNPs στο 2p22.3 σχετίζονται με την έκφραση του CYP1B1. Επίσης, έχει αναφερθεί μια συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου μελανώματος και των SNPs στο γονίδιο OBFC1 που σχετίζεται με το τελομερές, επιπλέον των καθιερωμένων συσχετισμών στους τόπους TERT-CLPTM1L, PARP1 και ATM.

Συνοπτικά, περίπου 20 τόποι έχουν αποδειχθεί ότι έχουν συνολική σημασία για το γονιδίωμα για τον κίνδυνο μελανώματος. Οι τόποι αυτοί εξηγούν το 19.2% του οικογενή σχετικού κινδύνου για μελάνωμα, με το MC1R να εξηγεί μόνο το 5.3% (Law et al. 2015). Πέντε τόποι βρίσκονται σε περιοχές που σχετίζονται με τον χρωματισμό, τρεις βρίσκονται σε περιοχές που σχετίζονται με τους σπίλους και τέσσερις βρίσκονται σε περιοχές που σχετίζονται με τη συντήρηση των τελομερών. Το τελευταίο παρέχει περαιτέρω στοιχεία ότι η πορεία της τελομεράσης μπορεί να είναι σημαντική στην κατανόηση της εξέλιξης του μελανώματος.

Η τελευταία GWAS μελέτη για το μελάνωμα ήταν σχεδόν τετραπλάσια σε μέγεθος δείγματος σε σύγκριση με την προηγούμενη μεγαλύτερη μελέτη. Είναι ενδιαφέρον ότι και οι πέντε νέοι τόποι δεν σχετίζονται σημαντικά με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου εμφάνισης μελανώματος, όπως τα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη μελάγχρωση. Αυτή είναι μια αρκετά ενδιαφέρουσα παρατήρηση που μπορεί να επισημάνει νέες οδούς και τονίζει τη σημασία των μεγαλύτερων μεγεθών δειγμάτων για νέες ανακαλύψεις (Evangelou & Stratigos 2016).

Εικόνα 7: Γράφημα Manhattan από τη GWASμετα-ανάλυση (Lawetal. 2015).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1.1 Πληθυσμός της UK Biobank

Πληθυσμός της μελέτης είναι η βιοτράπεζα UK Biobank. Η UK Biobank είναι μια πολύ μεγάλη και λεπτομερής προοπτική μελέτη με πάνω από 500,000 συμμετέχοντες ηλικίας 40-69 ετών, όταν στρατολογήθηκαν το 2006-2010 (Sudlow et al. 2015). Οι συμμετέχοντές της, παρακαλουθήθηκαν από κέντρα αξιολόγησης στα οποία καταγράφηκαν κατά την έναρξη της εισαγωγής τους στη βιοτράπεζα στοιχεία σχετικά με τον τρόπο ζωής τους, το περιβάλλον, το ιατρικό ιστορικό και τη σύνθεση του σώματος τους χρησιμοποιώντας ερωτηματολόγια με οθόνη αφής, συνεντεύξεις και φυσικές μετρήσεις. Για την παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήσαμε ένα υποσύνολο του πληθυσμού της βιοτράπεζας UK Biobank, οι οποίοι ήταν μη συγγενικά άτομα, ευρωπαϊκής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, αποκλείσαμε άτομα χωρίς διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, άτομα με μη ευρωπαϊκή καταγωγή και με τη χρήση των κεντρικά παρεχόμενων δεδομένων συγγενείας της UK Biobank, αποκλείσαμε από την ανάλυση οποιαδήποτε ζεύγη συγγενών 1ου και 2ου βαθμού.

2.1.2 Έκθεση στην Ηλιακή Ακτινοβολία

Η UK Biobank συγκέντρωσε εκτενείς πληροφορίες σχετικά με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων της, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων από ερωτηματολόγια και φυσικές μετρήσεις για ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών εκθέσεων (Sudlow et al. 2015). Αξιολογήσαμε την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία βάση ενός ερωτηματολογίου με οθόνη αφής στο οποίο οι συμμετέχοντες κατέγραψαν την απάντησή τους στην ερώτηση: "Σε μια τυπική μέρα το καλοκαίρι, πόσες ώρες ξοδεύεις σε εξωτερικούς χώρους;". Πιθανές απαντήσεις για τους συμμετέχοντες στην παραπάνω ερώτηση ήταν ο αριθμός των ωρών που σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους και οι επιλογές "Λιγότερο από μία ώρα την ημέρα", "Δεν γνωρίζω" και "Προτιμώ να μην απαντήσω" (Εικόνα 8). Συμμετέχοντες με χαμηλή έκθεση θεωρήθηκαν όσοι σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους λιγότερες από τη διάμεσο τιμή ώρες και σαν συμμετέχοντες με υψηλή έκθεση όσοι σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους περισσότερες από τη διάμεσο τιμή.

2.1.3 Περιστατικά Μελανώματος

Δεδομένα για τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου ήταν διαθέσιμα για κάθε συμμετέχοντα μέσω της σύνδεσης με τα κεντρικά μητρώα του Εθνικού Κέντρου Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου (NHS). Εντοπίσαμε 2,862 μη συγγενικά άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής με διαθέσιμα γενετικά δεδομένα, των οποίων η πρωτογενής διάγνωση καρκίνου ήταν μελάνωμα σύμφωνα με τους κώδικους ICD-9 και ICD-10. Από την ανάλυση αποκλείστηκαν οι συμμετέχοντες με διάγνωση μελανώματος πριν από την εισαγωγή τους στη βιοτράπεζα ($N = 1,852$). Από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες της UK Biobank επιλέξαμε 321,570 υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο οι οποίοι δεν είχαν ποτέ διαγνωσθεί με καρκίνο ή είχαν αναφέρει την ύπαρξη καρκίνου μέσω αυτοαναφοράς και δεν είχαν καταχωρηθεί ποτέ στο εθνικό μητρώο καρκίνου. Σαν διάρκεια παρακολούθησης (follow-up) ορίστηκε ο χρόνος από την ημερομηνία ένταξης στη βιοτράπεζα μέχρι την εμφάνιση μελανώματος για τα περιστατικά μελανώματος και ως την 31^η Μαρτίου για τους υγιείς μάρτυρες χωρίς καρκίνο. Ως εκ τούτου, στην ανάλυση μας συμπεριλήφθηκαν 322,608 συμμετέχοντες. Μεταξύ αυτών υπήρχαν 1,038 νέα περιστατικά μελανώματος.

Εικόνα 8 : Πιθανές απαντήσεις για την αξιολόγηση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία.

In a typical DAY in summer, how many hours do you spend outdoors?

hours

7

8

9

Clear

4

5

6

Less than an hour a day

1

2

3

Do not know

0

Prefer not to answer

 Back

 Info

 Help

 Next

2.1.4 Γονοτύπηση

Τα δεδομένα της UKBiobank περιέχουν γονότυπους για 488,377 συμμετέχοντες. Από αυτούς, 438,427 άτομα έχουν γονοτυπηθεί σε 825,427 πολυμορφισμούς από το Affymetrix UK Biobank Axiom Array chip, ενώ οι υπόλοιποι 49,950 γονοτυπήθηκαν σε 807,411 πολυμορφισμούς από το Affymetrix UK BiLEVE Axiom Array chip της μελέτης UK BiLEVE (Wain et al. 2015). Η καταγραφή των μη τυποποιημένων πολυμορφισμών (imputation) πραγματοποιήθηκε κεντρικά από την UK Biobank χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα αναφοράς που συγχώνευσε τις πλατφόρμες UK10K and 1000 Genomes Phase 3 καθώς επίσης και την Haplotype Reference Consortium (HRC) πλατφόρμα (Bycroft et al. 2017). Ανάλυση κυρίων συνιστωσών πραγματοποιήθηκε κεντρικά από την UKBiobank για να αξιολογηθεί η πληθυσμιακή διαστρωμάτωση.

2.1.5 Στατιστική Ανάλυση

Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία αναλύθηκε σε σχέση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος χρησιμοποιώντας μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης ενώ υπολογίστηκαν τα ORs και τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (CIs). Οι αναλύσεις προσαρμόστηκαν ως προς το φύλο, την ηλικία και τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες. Η ανάλυση γενετικών συνιστωσών χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της γενετικής απόστασης και της συγγένειας μεταξύ των πληθυσμών. Οι 20 γενετικοί πολυμορφισμοί, με βάση τους οποίους διεξάγεται η ανάλυση, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ευρυγονιδιωματικό επίπεδο στην πρόσφατη μετα-ανάλυση των 11 GWAS μελετών (Law et al. 2015). Οι εκτιμητές επίδρασης των αλληλόμορφων κινδύνου των 20 πολυμορφισμών, όπως προήλθαν από τη μετα-ανάλυση, περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Κάθε γενετικός πολυμορφισμός εκφράζεται ανάλογα με το αν εμπεριέχει το έλασσον αλληλόμορφο ή όχι (προσθετικό μοντέλο/ additive model). Το έλασσον αλληλόμορφο, σε ορισμένους πολυμορφισμούς αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου. Για κάθε έναν από τους 20 γενετικούς πολυμορφισμούς, συγκρίναμε τη συσχέτιση της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος. Υπολογίσαμε το λόγο αναλογιών για κάθε έλασσον αλληλόμορφο (per-allele odds ratio). Επιπλέον, στις παραπάνω συσχετίσεις προστέθηκαν αλλά και αναλύθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των γενετικών πολυμορφισμών με τον, υπό μελέτη, περιβαλλοντικό παράγοντα. Τέλος, μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης αναπτύχθηκαν για τον περιβαλλοντικό παράγοντα μετά τη διαμόρφωσή του, έτσι ώστε να παρέχουν πληροφορίες. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Rstudio (<https://www.rstudio.com/>) και

χρησιμοποιήθηκε το Plink 2.0 (<https://www.cog-genomics.org/plink/2.0/>) (Chang et al. 2015).

Πίνακας 1 : Εκτιμητές επίδρασης των αλληλόμορφων κινδύνου των 20 πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης μελανώματος σε ευρυ-γονιδιωματικό επίπεδο.

Πολυμορφισμός	Πλησιέστερο Γονίδιο	Αλληλίο Κινδύνου	Συχνότητα Αλληλίου Κινδύνου	Εκτιμητές Επίδρασης
rs12410869	ARNT/SETDB1	G	0.62	0.089
rs1858550	PARP1	C	0.66	0.094
rs6750047	RMDN2 (CYP1B1)	A	0.48	0.057
rs7582362	CASP8	A	0.27	0.080
rs380286	TERT/CLPTM1L	A	0.43	0.161
rs250417	SLC45A2	C	0.96	0.612
rs6914598	CDKAL1	C	0.33	0.077
rs1636744	AGR3	T	0.40	0.050
rs7852450	CDKN2A/MTAP	T	0.46	0.212
rs10739221	TMEM38B (RAD23B, TAL2)	T	0.23	0.100
rs2995264	OBFC1	G	0.09	0.190
rs498136	CCND1	A	0.34	0.118
rs1393350	TYR	A	0.27	0.121
rs73008229	ATM	G	0.86	0.212
rs4778138	OCA2	A	0.86	0.067
rs12596638	FTO	A	0.16	0.095
rs75570604	MC1R	C	0.10	0.421
rs6088372	ASIP	T	0.15	0.272
rs408825	MX2	T	0.60	0.227
rs2092180	PLA2G6	A	0.52	0.116

2.1.6 Μελέτες ασθενών-μαρτύρων (case-control studies)

Οι μελέτες ασθενών-μαρτύρων αποτελούν έναν ερευνητικό σχεδιασμό που χρησιμοποιείται για να διερευνήσει τη σχέση μεταξύ μιας έκθεσης και ενός αποτελέσματος που αφορά την υγεία (Journal of Physiotherapy 2017). Σε μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων, οι ασθενείς που έχουν αναπτύξει τη νόσο ταυτοποιούνται και η προηγούμενη έκθεσή τους σε εικαζόμενους αιτιολογικούς παράγοντες συγκρίνεται με εκείνη των μαρτύρων που δεν έχουν τη νόσο. Αυτό επιτρέπει την εκτίμηση των λόγων πιθανότητας (Odds Ratio). Λαμβάνονται υπόψη οι πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες μετρώντας τους και πραγματοποιώντας τις

κατάλληλες προσαρμογές στην ανάλυση. Τελικά, ο στόχος όλων των μελετών ασθενών-μαρτύρων είναι να εξεταστεί, αν η έκθεση προκαλεί το αποτέλεσμα, κάτι που δε γίνεται πάντοτε σαφές (The BMJ 1979). Έτσι, λοιπόν, σκοπός και της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί αν η έκθεση, και πιο συγκεκριμένα στην ηλιακή ακτινοβολία, οδηγεί στην ανάπτυξη μελανώματος.

2.1.7 Μελέτες αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων γονιδίου-περιβάλλοντος είναι καθοριστική στο αναδυόμενο πεδίο της γενετικής επιδημιολογίας (Ruth 1996). Η γνώση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι σημαντική για την πρόληψη κινδύνου και τον εντοπισμό πληθυσμών υψηλού κινδύνου με σκοπό την ενημέρωση της δημόσιας υγείας για στοχευμένη πρόληψη. Οι μελέτες αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος μπορούν επίσης να βοηθήσουν στην ανακάλυψη νέων γενετικών παραγόντων κινδύνου, ενώ θα μπορούσαν να εντοπιστούν καινούριοι παράγοντες περιβαλλοντικού κινδύνου, όταν η περιβαλλοντική έκθεση είναι ένα μείγμα διαφόρων συνθετών. Ακόμη, οι μελέτες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απόκτηση γνώσεων των βιολογικών μηχανισμών, πάνω στους οποίους βασίζεται η σχέση μεταξύ ενός παράγοντα κινδύνου και της ασθένειας που μας ενδιαφέρει.

Για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος πρέπει να είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες για τα δύο στοιχεία της σχέσης. Τις περισσότερες φορές, η αλληλεπίδραση αξιολογείται σε πολλαπλασιαστική κλίμακα, δηλαδή οι ερευνητές εκτιμούν αν η κοινή επίδραση, που μετράται ως σχετικός κίνδυνος ή λόγος πιθανοτήτων του γενετικού και του περιβαλλοντικού παράγοντα, είναι σημαντικά μεγαλύτερη ή μικρότερη από εκείνη που αναμένονταν πολλαπλασιάζοντας τους σχετικούς κινδύνους των δύο χωριστά. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος μπορεί επίσης να εκτιμηθεί ως απόκλιση από το προσθετικό μοντέλο όταν εξετάζονται οι διαφορές κινδύνου και όχι τα μέτρα αναλογίας (Anja et al. 2016).

Εννοιολογικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδίου (G) και περιβάλλοντος (E) αναφέρεται στο βαθμό στον οποίο η κοινή επίδραση των δύο παραγόντων στη νόσο (D) διαφέρει από τις ανεξάρτητες επιδράσεις των δύο. Η από κοινού επίδραση των G και E είναι η επίδραση επί του D λόγω της παρουσίας και των δύο παραγόντων. Η ανεξάρτητη επίδραση καθενός παράγοντα είναι η επίδρασή του στο D απουσία του άλλου. Η πολλαπλασιαστική αλληλεπίδραση αξιολογείται με τη σύγκριση του κοινού αποτελέσματος με εκείνο των ανεξάρτητων επιδράσεων. Για παράδειγμα, αν η ανεξάρτητη επίδραση του G ισούται με 2 και αυτή του E με 3, τότε θα αναμένουμε ότι η κοινή επίδραση των G και E θα είναι 6, αν δεν υπάρχει

πολλαπλασιαστική αλληλεπίδραση. Αν G και E αλληλεπιδρούν για να προκαλέσουν τη νόσο (D) τότε το κοινό αποτέλεσμα θα είναι κάτι διαφορετικό από το 6, το προϊόν των ανεξάρτητων επιδράσεων (Gatto et al. 2004).

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που πρέπει να ξεπεραστούν είναι να συγκεντρωθεί το μέγεθος του δείγματος, που απαιτείται για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος με επαρκή ισχύ. Ως γενικός κανόνας, οι μελέτες που αποσκοπούν στην εκτίμηση της απόκλισης από την πολλαπλασιαστικότητα πρέπει να είναι τουλάχιστον τέσσερις φορές το μέγεθος που χρειάζεται για να εξεταστούν οι επιδράσεις του γενετικού ή του περιβαλλοντικού παράγοντα μόνο (Smith & Day 1984).

2.1.8 Η μέθοδος case-only

Η χρήση της case-only μεθόδου, για την εκτίμηση της αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος, προτάθηκε από τους Piegorsch και άλλοι (Piegorsch et al. 1994). Η επιλογή των ασθενών στην case-only μέθοδο είναι ίδια με εκείνη που γνωρίζουμε στις μελέτες ασθενών-μαρτύρων. Αν και μόνο με τον case-only σχεδιασμό κανείς δε μπορεί να εκτιμήσει τις ανεξάρτητες επιδράσεις της έκθεσης και του γονότυπου, η υπόθεση της ανεξαρτησίας της περιβαλλοντικής έκθεσης και του γονότυπου αποτελούν τη βασική προϋπόθεση αυτού του σχεδιασμού (Rothman et al. 2008). Ακόμη, ο σχεδιασμός αυτός προσφέρει σημαντική αύξηση της ισχύος καθώς και μεγαλύτερη ακρίβεια στην εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε σύγκριση με τα παραδοσιακά σχεδιασμού ασθενών – μαρτύρων (Piegorsch et al. 1994). Στην case-only μέθοδο το σύνολο του δείγματος αποτελούν τα άτομα εκείνα που είναι ασθενείς, δηλαδή στη συγκεκριμένη μελέτη τα άτομα που εμφανίζουν μελάνωμα.

Το μέγεθος που προκύπτει από την case-only τεχνική ερμηνεύεται ως απόκλιση από την πολλαπλασιαστική σχέση (Rothman et al. 2008). Φαίνεται πως η μέθοδος αυτή είναι πιο αποτελεσματική από την παραδοσιακή μελέτη ασθενών-μαρτύρων μιας και οδηγεί σε πιο ακριβείς μετρήσεις, αποτέλεσμα της μικρότερης διασποράς και της μεγαλύτερης ομοιογένειας. Επομένως, προκειμένου να διερευνηθεί ένας συγκεκριμένος λόγος πιθανοτήτων για την αλληλεπίδραση, ο case-only σχεδιασμός χρειάζεται λιγότερους ασθενείς από τις μελέτες ασθενών-μαρτύρων. Επιπλέον, η ομάδα ελέγχου συχνά έχει λιγότερα κίνητρα να συμμετάσχει στη μελέτη και έτσι η μέθοδος case-only συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση του πιθανού σφάλματος που μπορεί να προκύψει λόγω των συμμετοχόντων (Hassanzadeh et al. 2012).

Στον case-only σχεδιασμό ο λόγος των πιθανοτήτων (OR) υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την αλληλεπίδραση με το OR της ομάδας ελέγχου. Εάν η παραδοχή της ανεξαρτησίας γονιδίου και έκθεσης στην ομάδα ελέγχου είναι έγκυρη και το νόσημα σπάνιο, το OR στην case-only μέθοδο μετρά αλληλεπιδραστικό

αποτέλεσμα σε ένα πολλαπλασιαστικό μοντέλο παρόμοιο με τις συμβατικές μελέτες ασθενών-μαρτύρων (Gatto et al. 2004).

Η υπόθεση της ανεξαρτησίας για το OR της πολλαπλασιαστικής αλληλεπίδρασης στην case-only μέθοδο είναι μερικές φορές διαρθρωμένη ως παραδοχή της ανεξαρτησίας του γενετικού και του περιβαλλοντικού παράγοντα μεταξύ των μη ασθενών. Επειδή ο γενετικός και ο περιβαλλοντικός παράγοντας είναι και οι δυο αιτίες του αποτελέσματος, αυτή η υπόθεση δεν κρατεί σχεδόν ποτέ ακριβώς (Gatto et al. 2004; Hernan et al. 2004; VanderWeele & Robins 2007). Παρόλα αυτά όμως, η παραδοχή της σπανιότητας της νόσου σε συνδυασμό με την παραδοχή των ανεξάρτητων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στον πληθυσμό συνεπάγεται πως οι γενετικές και περιβαλλοντικές εκθέσεις είναι προσεγγιστικά ανεξάρτητες μεταξύ των μη ασθενών (Tyler et al. 2010). Για το λόγο αυτό οι Piegorsch και άλλοι διατύπωσαν τις παραδοχές του σχεδιασμού της case-only μεθόδου ως προς τις υποθέσεις που απαιτούσαν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες να είναι ανεξάρτητοι στον πληθυσμό και η νόσος να είναι σπάνια σε αυτόν. Τα αποτελέσματα των Yang και άλλοι (Yang et al. 1999) και Schmidt και Schaid (Schmidt & Schaid 1999) δείχνουν πως αν οι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι ανεξάρτητοι στον πληθυσμό και αν δεν υπάρχει αλληλεπίδραση στην πολλαπλασιαστική κλίμακα στις επιδράσεις των δύο παραγόντων στο αποτέλεσμα, τότε δε θα υπάρχει συσχετισμός των παραγόντων μεταξύ των ασθενών. Όμως, σε τέτοιες περιπτώσεις, θα εξακολουθεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο παραγόντων στους μη ασθενείς, αλλά αν η νόσος είναι σπάνια αυτός ο συσχετισμός μπορεί να είναι μικρός.

Στη συνέχεια, δίνεται ένας τύπος για να περιγράψει τη μορφή στην οποία καταλήγει το OR για τις σχέσεις γονιδίου-περιβάλλοντος.

$$G-E_{ORinD^-} = G-E_{ORinPop} \times \left(\frac{\left(\frac{1}{P(D/G-E^-)} - 1 \right) \times \left(\frac{1}{P(D/G-E^-)} - R_G \right)}{\left(\frac{1}{P(D/G-E^-)} - R_G \right) \times \left(\frac{1}{P(D/G-E^-)} - R_E \right)} \right)$$

Στην εξίσωση, το $G-E_{ORinD^-}$ αντιπροσωπεύει το OR γονιδίου-περιβάλλοντος στην ομάδα ελέγχου και το $G-E_{ORinPop}$ αντιπροσωπεύει το OR του γονιδίου-περιβάλλοντος στον πληθυσμό. Επιπλέον, το $P(D / G-E^-)$ εκφράζει την κατηγορία αναφοράς, δηλαδή δείχνει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άτομα που δεν έχουν τον γενετικό αλλά ούτε και τον περιβαλλοντικό παράγοντα. Το RR_{GE} ή OR_{GE} αντιπροσωπεύει το OR της νόσου σε αυτούς που έχουν και τους δύο παράγοντες. Τέλος, το RR_G ή OR_G εκφράζει το OR της νόσου στα άτομα που εμφανίζουν μόνο το γενετικό παράγοντα, ενώ το RR_E ή OR_E στα άτομα που εμφανίζουν μόνο τον περιβαλλοντικό παράγοντα (Anja et al. 2016).

Στη παρούσα μελέτη, για την case-only μέθοδο, αποκλείσαμε από την ανάλυση όλους τους μάρτυρες και έτσι το δείγμα μας αποτελούνταν από 1,038 άτομα που

έπασχαν από μελάνωμα. Χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή το γενετικό πολυμορφισμό κάθε φορά και ανεξάρτητη μεταβλητή την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα προσαρμόστηκαν ως προς το φύλο, την ηλικία και τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες. Τα ORs που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τα ORs από την ανάλυση ασθενών-μαρτύρων με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι δύο, υπό μελέτη, παράγοντες αλληλεπιδρούν στον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 2: Περιγραφικά μέτρα θέσης και διασποράς.

Χαρακτηριστικά	Άτομα χωρίς μελάνωμα (n=322,608)	Άτομα με μελάνωμα (n=1,038)	Σύνολο
Φύλο			
Άνδρες [N (%)]	153,595 (47.76)	517 (49.8)	154,112 (47.77)
Ηλικία (έτη) [Μέση Τιμή (TA ¹)]	56.08 (8.01)	58.51 (7.65)	56.08 (8)
Χρώμα Δέρματος [N (%)]			
Λευκό	24,518 (7.72)	109 (10.64)	24,627 (7.73)
Ανοιχτόχρωμο	225,619 (71.04)	793 (77.44)	226,412 (71.06)
Ανοιχτό καφέ	60,864 (19.16)	116 (11.33)	60,980 (19.14)
Σκούρο καφέ	5,207 (1.64)	4 (0.32)	5,211 (1.64)
Καφέ	1,378 (0.43)	2 (0.2)	1,380 (0.43)
Μαύρο	29 (0.01)	0 (0)	29 (0.01)
Χρώμα μαλλιών [N (%)]			
Ξανθό	35,351 (11.01)	164 (15.81)	35,515 (11.03)
Κόκκινο	13,760 (4.29)	93 (8.97)	13,853 (4.3)
Ανοιχτό καφέ	129,333 (40.3)	442 (42.62)	129,775 (40.3)
Σκούρο καφέ	123,574 (38.5)	290 (27.97)	123,864 (38.47)
Μαύρο	15,066 (4.69)	28 (2.7)	15,094 (4.69)
Άλλο	3,880 (1.2)	20 (1.93)	3,900 (1.21)
Ικανότητα μαυρίσματος [N (%)]			
Βαθύ μαύρισμα	66,350 (21.05)	158 (15.43)	66,508 (21.03)
Ελαφρύ μαύρισμα	128,680 (40.83)	398 (38.87)	129,078 (40.82)
Περιστασιακό μαύρισμα	66,819 (21.2)	239 (23.34)	67,058 (21.21)
Κάψιμο	53,308 (16.91)	229 (22.36)	53,537 (16.93)

Ηλιακή προστασία [N (%)]			
Ποτέ/Σπάνια	27,271 (8.53)	65 (6.3)	27,336 (8.53)
Μερικές φορές	109,290 (34.2)	301 (29.19)	109,591 (34.18)
Τις περισσότερες φορές	117,817 (36.87)	447 (43.36)	118,264 (36.89)
Πάντα	65,174 (20.4)	218 (21.14)	65,392 (20.4)
Χρόνος σε εξωτερικές δραστηριότητες το χειμώνα (ώρες) [Διάμεσος (Εύρος ²)]	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
Χρόνος σε εξωτερικές δραστηριότητες το καλοκαίρι (ώρες) [Διάμεσος (Εύρος ²)]	3 (2-5)	4 (2-5)	3 (2-5)

1: Τυπική Απόκλιση 2: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος

Μελετήθηκαν συνολικά 1,038 ασθενείς (cases) με μελάνωμα και 321,570 μάρτυρες (controls). Το 48% των συμμετεχόντων αποτελούσαν οι άνδρες, ενώ η μέση ηλικία ήταν τα 56 έτη. Ακόμη, η διάμεση τιμή για τον χρόνο που περνούσαν τα άτομα σε εξωτερικούς χώρους το καλοκαίρι ήταν οι 3 ώρες για τους μάρτυρες και οι 4 ώρες για τους ασθενείς. Επιπλέον, το 71% των συμμετεχόντων ήταν άτομα με ανοιχτές αποχρώσεις δέρματος, ενώ περίπου το 79% αποτελούσαν άτομα με καφέ αποχρώσεις, όσον αφορά στο χρώμα μαλλιών. Τέλος, το ποσοστό των υπό μελέτη ατόμων που είχαν προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία μερικές φορές αλλά και τις περισσότερες φορές ανέρχεται στο 71.07%. Ο Πίνακας 2 δείχνει την κατανομή των δημογραφικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στις δύο ομάδες, αλλά και συνολικά.

Πίνακας 3: Πολυμορφισμοί που επιλέχθηκαν.

Πολυμορφισμός	Πλησιέστερο Γονίδιο	Έλασσον Αλληλίο	Συχνότητα Ελάσσονος Αλληλίου
rs12410869	ARNT/SETDB1	T	0.38
rs1858550	PARP1	A	0.34
rs6750047	RMDN2 (CYP1B1)	A	0.48
rs7582362	CASP8	A	0.27
rs380286	TERT/CLPTM1L	A	0.43
rs250417	SLC45A2	G	0.04
rs6914598	CDKAL1	C	0.33
rs1636744	AGR3	T	0.40
rs7852450	CDKN2A/MTAP	T	0.46
rs10739221	TMEM38B (RAD23B, TAL2)	T	0.23
rs2995264	OBFC1	G	0.09
rs498136	CCND1	A	0.34
rs1393350	TYR	A	0.27
rs73008229	ATM	A	0.14
rs4778138	OCA2	G	0.14
rs12596638	FTO	A	0.16
rs75570604	MC1R	C	0.10
rs6088372	ASIP	T	0.15
rs408825	MX2	C	0.40
rs2092180	PLA2G6	G	0.48

Επιλέχθηκαν 20 γενετικοί πολυμορφισμοί για την ανάλυση, όπως επισημάνθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο. Όλοι οι πολυμορφισμοί βρίσκονταν σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg equilibrium [HWE]) στην ομάδα των μαρτύρων, με βάση ένα χ^2 τεστ ($p < 0.05$ αντιπροσωπεύει απόκλιση από την ισορροπία). Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι γενετικοί πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν στη μελέτη, καθώς και τα ελάσσονα αλληλόμορφα μαζί με τις συχνότητες εμφάνισής τους στον πληθυσμό. Κάθε γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να εμπεριέχει ή όχι το έλλασοναλληλόμορφο, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να αποτελεί ή να μην αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου.

Η μεταβλητή της ηλιακής ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε στην κατηγορική της μορφή. Έτσι, οι δύο κατηγορίες που προέκυψαν αφορούσαν συμμετέχοντες με χαμηλή έκθεση και υψηλή έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Στην πρώτη ομάδα ανήκαν άτομα που σπατάλησαν σε εξωτερικούς χώρους λιγότερες από 3 ώρες και

στην δεύτερη ομάδα περισσότερες από 3 ώρες αντίστοιχα. Η δίτιμη αυτή μορφή της περιβαλλοντικής μεταβλητής διαμορφώθηκε σύμφωνα με τη διάμεσο τιμή.

Στις πολυπαραγοντικές αναλύσεις και με βάση ένα πολλαπλασιαστικό μοντέλο (multiplicative model), δεκατέσσερις πολυμορφισμοί προέκυψαν στατιστικά σημαντικοί σε σχέση με το μελάνωμα σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τα αποτελέσματα των πολυπαραγοντικών αναλύσεων για όλους τους πολυμορφισμούς σε σχέση με το μελάνωμα φαίνονται στον Πίνακα 4. Επιπλέον, στις παραπάνω αναλύσεις προστέθηκαν και οι αλληλεπιδράσεις των γενετικών πολυμορφισμών με τον περιβαλλοντικό παράγοντα, δηλαδή την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Παρόλα αυτά, καμία αλληλεπίδραση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική. Τα ORs καθώς και τα διαστήματα εμπιστοσύνης για κάθε έναν γενετικό πολυμορφισμό που προήλθαν από τις μελέτες αλληλεπίδρασης βελτιώνουν τον Πίνακα 4. Πιο συγκεκριμένα, από το μοντέλο της λογιστικής παλινδρόμησης πηγάζουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs12410869, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T που δεν αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 15% (CI:0.75-0.97) λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs380286, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο A που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 25% (CI:1.08-1.43) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs250417, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο G που δεν αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 50% (CI:0.31-0.82) λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs7852450, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 31% (CI:1.13-1.52) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs10739221, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 18% (CI:1.05-1.34) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs2995264, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο G που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 24% (CI:1.07-1.45) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs498136, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο A που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 17% (CI:1.03-1.32)

αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.

- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs1393350, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο A που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 13% (CI:1.0004-1.28) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs73008229, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο A που δεν αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 17% (CI:0.71-0.95) λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs75570604, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο C που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 54% (CI:1.34-1.78) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs6088372, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T που αποτελεί και το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 35% (CI:1.18-1.53) αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs408825, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο C που δεν αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 21% (CI:0.70-0.90) λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.
- ✓ Για τον πολυμορφισμό rs2092180, τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο G που δεν αποτελεί το αλληλόμορφο κινδύνου, έχουν 19% (CI:0.71-0.93) λιγότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μελάνωμα σε σχέση με εκείνους που δεν το φέρουν.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης για τη σχέση μεταξύ πολυμορφισμών και μελανώματος.

SNP		Logistic Model ¹	Logistic Model with Interaction ¹	
		OR _{SNP} (95% CI)	OR _{SNP} (95% CI)	OR _{GxE} (95% CI)
rs12410869	TT or TG GG	0.85 (0.75, 0.97) Reference	0.82 (0.65, 1.01) Reference	1.07 (0.82, 1.40) Reference
rs1858550	AA or AC CC	0.92 (0.81, 1.05) Reference	0.91 (0.73, 1.13) Reference	1.03 (0.79, 1.35) Reference
rs6750047	AA or AG GG	0.86 (0.75, 0.99) Reference	0.83 (0.65, 1.05) Reference	1.06 (0.79, 1.43) Reference
rs7582362	AA or AG GG	1.10 (0.97, 1.25) Reference	1.14 (0.92, 1.42) Reference	0.94 (0.72, 1.23) Reference
rs380286	AA or AG	1.25 (1.08, 1.43)	1.29 (1.01, 1.65)	0.95 (0.70, 1.28)

	GG	Reference	Reference	Reference
rs250417	GG or GC	0.50 (0.31, 0.82)	0.54 (0.24, 1.22)	0.90 (0.33, 2.45)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs6914598	CC or CT	1.03 (0.91, 1.17)	0.87 (0.70, 1.09)	1.28 (0.97, 1.67)
	TT	Reference	Reference	Reference
rs1636744	TT or TC	1.04 (0.91, 1.18)	1.18 (0.93, 1.49)	0.83 (0.63, 1.10)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs7852450	TT or TC	1.31 (1.13, 1.52)	1.57 (1.20, 2.07)	0.76 (0.55, 1.06)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs10739221	TT or TC	1.18 (1.05, 1.34)	1.16 (0.93, 1.44)	1.03 (0.79, 1.35)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs2995264	GG or GA	1.24 (1.07, 1.45)	1.13 (0.86, 1.48)	1.15 (0.83, 1.60)
	AA	Reference	Reference	Reference
rs498136	AA or AC	1.17 (1.03, 1.32)	1.04 (0.84, 1.30)	1.18 (0.90, 1.55)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs1393350	AA or AG	1.13 (1.0004, 1.28)	1.10 (0.88, 1.36)	1.05 (0.81, 1.37)
	GG	Reference	Reference	Reference
rs73008229	AA or AG	0.82 (0.71, 0.95)	0.86 (0.67, 1.11)	0.93 (0.68, 1.27)
	GG	Reference	Reference	Reference
rs4778138	GG or GA	0.97 (0.83, 1.13)	0.86 (0.65, 1.14)	1.19 (0.85, 1.66)
	AA	Reference	Reference	Reference
rs12596638	AA or AG	1.13 (0.99, 1.30)	1.31 (1.04, 1.64)	0.81 (0.61, 1.07)
	GG	Reference	Reference	Reference
rs75570604	CC or CG	1.54 (1.34, 1.78)	1.37 (1.07, 1.77)	1.19 (0.87, 1.61)
	GG	Reference	Reference	Reference
rs6088372	TT or TC	1.35 (1.18, 1.53)	1.15 (0.91, 1.45)	1.26 (0.95, 1.67)
	CC	Reference	Reference	Reference
rs408825	CC or CT	0.79 (0.70, 0.90)	0.76 (0.61, 0.94)	1.07 (0.82, 1.40)
	TT	Reference	Reference	Reference
rs2092180	GG or GA	0.81 (0.71, 0.93)	0.86 (0.68, 1.09)	0.91 (0.69, 1.22)
	AA	Reference	Reference	Reference

1: Adjusted for sex, age and the first 10 principal components.

Όσον αφορά στην case-only μέθοδο, το δείγμα μας περιορίστηκε στα 1,038 άτομα που αποτελούσαν εκείνους που πάσχουν από μελάνωμα. Η ανεξαρτησία μεταξύ των γενετικών και του περιβαλλοντικού παράγοντα επιτυγχάνεται προσεγγιστικά στους μη ασθενείς, όπως επισημάνθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Για το λόγο αυτό, προχωρούμε σε μελέτες αλληλεπίδρασης χρησιμοποιώντας την case-only μέθοδο και αναλύοντας ξανά κάθε γενετικό πολυμορφισμό ξεχωριστά. Η γενική εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο της εν λόγω μεθόδου είναι η:

$$G = a_0 + \alpha_1 E + a_p C_p,$$

όπου G ο γενετικός παράγοντας, E ο περιβαλλοντικός παράγοντας και C_p οι διάφοροι συγχυτικοί παράγοντες. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων από τις δυο μεθόδους, την case-control και την case-only. Κανένα από τα ORs που προέκυψαν από την case-only ανάλυση δεν ήταν στατιστικά

σημαντικό, συμπέρασμα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της case-control μεθόδου. Μάλιστα, τα ORs των δύο αναλύσεων είναι πολύ κοντά, όπως και τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Παρόλα αυτά, τα διαστήματα εμπιστοσύνης για την case-only μέθοδο δεν παρατηρείται να είναι πιο στενά, πράγμα που συμβαίνει συχνά σε άλλες έρευνες. Έτσι, λοιπόν, οι δύο αναλύσεις επιβεβαιώνουν η μία τα αποτελέσματα της άλλης και οδηγούν στο συμπέρασμα πως ο γενετικός και ο περιβαλλοντικός παράγοντας δεν αλληλεπιδρούν στον κίνδυνο εμφάνισης μελάνωματος, με βάση το συγκεκριμένο πληθυσμό.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα αλληλεπιδράσεων των δύο μεθόδων ανάλυσης.

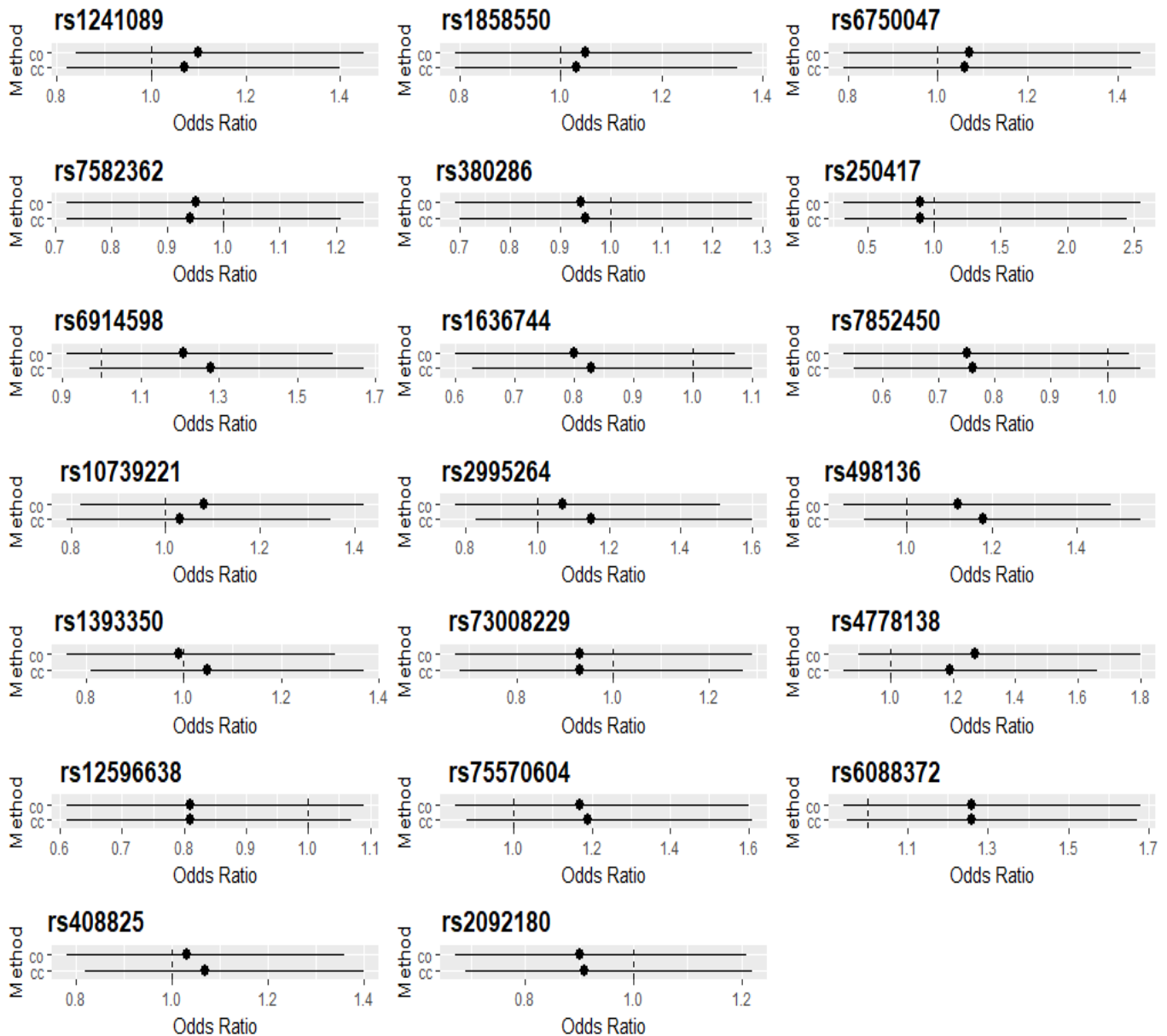
Case-control Method ¹			Case-only Method ¹	
SNP		OR _{GxE} (95% CI)	Time summer	OR (95% CI)
rs1241089	TT or TG	1.07 (0.82, 1.40)	>= 3h/day	1.10 (0.84, 1.45)
	GG	Reference	< 3h/day	Reference
rs1858550	AA or AC	1.03 (0.79, 1.35)	>= 3h/day	1.05 (0.79, 1.38)
	CC	Reference	< 3h/day	Reference
rs6750047	AA or AG	1.06 (0.79, 1.43)	>= 3h/day	1.07 (0.79, 1.45)
	GG	Reference	< 3h/day	Reference
rs7582362	AA or AG	0.94 (0.72, 1.23)	>= 3h/day	0.95 (0.72, 1.25)
	GG	Reference	< 3h/day	Reference
rs380286	AA or AG	0.95 (0.70, 1.28)	>= 3h/day	0.94 (0.69, 1.28)
	GG	Reference	< 3h/day	Reference
rs250417	GG or GC	0.90 (0.33, 2.45)	>= 3h/day	0.90 (0.32, 2.55)
	CC	Reference	< 3h/day	Reference
rs6914598	CC or CT	1.28 (0.97, 1.67)	>= 3h/day	1.21 (0.91, 1.59)
	TT	Reference	< 3h/day	Reference
rs1636744	TT or TC	0.83 (0.63, 1.10)	>= 3h/day	0.80 (0.60, 1.07)
	CC	Reference	< 3h/day	Reference
rs7852450	TT or TC	0.76 (0.55, 1.06)	>= 3h/day	0.75 (0.53, 1.04)
	CC	Reference	< 3h/day	Reference
rs10739221	TT or TC	1.03 (0.79, 1.35)	>= 3h/day	1.08 (0.82, 1.42)
	CC	Reference	< 3h/day	Reference
rs2995264	GG or GA	1.15 (0.83, 1.60)	>= 3h/day	1.07 (0.77, 1.51)
	AA	Reference	< 3h/day	Reference

rs498136	AA or AC CC	1.18 (0.90, 1.55) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	1.12 (0.85, 1.48) Reference
rs1393350	AA or AG GG	1.05 (0.81, 1.37) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	0.99 (0.76, 1.31) Reference
rs73008229	AA or AG GG	0.93 (0.68, 1.27) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	0.93 (0.67, 1.29) Reference
rs4778138	GG or GA AA	1.19 (0.85, 1.66) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	1.27 (0.90, 1.80) Reference
rs12596638	AA or AG GG	0.81 (0.61, 1.07) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	0.81 (0.61, 1.09) Reference
rs75570604	CC or CG GG	1.19 (0.88, 1.61) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	1.17 (0.85, 1.60) Reference
rs6088372	TT or TC CC	1.26 (0.95, 1.67) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	1.26 (0.94, 1.68) Reference
rs408825	CC or CT TT	1.07 (0.82, 1.40) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	1.03 (0.78, 1.36) Reference
rs2092180	GG or GA AA	0.91 (0.69, 1.22) Reference	$\geq 3\text{h/day}$ $< 3\text{h/day}$	0.90 (0.67, 1.21) Reference

1: Adjusted for sex, age and the first 10 principal components.

Μια εικόνα του παραπάνω πορίσματος φαίνεται να δίνει το Γράφημα 1. Τα ORs των δύο μεθόδων, που ουσιαστικά αντιστοιχούν στην κοινή επίδραση του γενετικού και περιβαλλοντικού παράγοντα, δεν έχουν σημαντικές διαφορές αλλά μάλιστα είναι πολύ κοντά. Το ίδιο ισχύει και για τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Επομένως, οι δύο τρόποι ανάλυσης αλληλεπιδράσεων, η case-control μέθοδος και η case-only, καταλήγουν στο συμπέρασμα πως στον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και ο κάθε γενετικός πολυμορφισμός δεν επιδρούν κοινά.

Γράφημα 1: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των δύο μεθόδων για κάθε γενετικό πολυμορφισμό.



2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία βασίστηκε στη μελέτη αλληλεπιδράσεων γονιδίου – περιβάλλοντος και στη σύγκριση των δύο επιμέρους μεθόδων, της case-control ανάλυσης αλλά και της case-only. Η τελευταία δεν κάνει υποθέσεις για την κατανομή του περιβαλλοντικού παράγοντα, γεγονός που παρέχει ευελιξία σε αυτή την προσέγγιση. Η εφαρμογή των δύο μεθόδων είναι εύκολη, απαιτώντας μόνο τη γνώση και τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης. Οι μελέτες αλληλεπίδρασης

γονιδίου – περιβάλλοντος και γονιδίου – γονιδίου παίζουν όλο και πιο σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της αιτιολογίας των σύνθετων ανθρώπινων νοσημάτων μιας και η εξερεύνηση του ανθρώπινου γονιδιώματος παρέχει περαιτέρω πληροφορίες για τα γονίδια. Έτσι, η μέθοδος case-only συνιστά ένα αποτελεσματικό μέσο για την υλοποίηση τέτοιων μελετών. Χρησιμοποιήσαμε δεδομένα για το μελάνωμα από την UK Biobank ώστε να αποτυπώσουν τους σχεδιασμούς μας.

Είναι ωφέλιμο να επισημανθεί πως ο ορισμός και η μέτρηση της αλληλεπίδρασης έχουν αποτελέσει αντικείμενο συζητήσεων στην επιδημιολογική βιβλιογραφία. Σημαντική είναι η διαφοροποίηση μεταξύ των εννοιών της στατιστικής και της βιολογικής αλληλεπίδρασης. Η στατιστική αλληλεπίδραση συνήθως αναφέρεται στην απ'κλιση από τη θεμελιώδη μορφή ενός στατιστικού μοντέλου. Επειδή όμως υπάρχουν ποικίλα στατιστικά μοντέλα (προσθετικό, πολλαπλασιαστικό κ.ά.), ο όρος δεν έχει σαφές περιεχόμενο. Στην επιδημιολογία, η στατιστική αλληλεπίδραση αντιστοιχεί στην έκφραση «τροποποίηση του μέτρου αποτελέσματος» (effect measure modification), που αναφέρεται στη διαφοροποίηση της σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών ανάλογα με τα επίπεδα μιας τρίτης μεταβλητής. Η βιολογική αλληλεπίδραση, στα πλαίσια του μοντέλου της επαρκούς αιτίας, υπάρχει όταν δύο ή περισσότερες συνιστώσες αιτίες συνυπάρχουν στην ίδια επαρκή αιτία που με ένα συγκεκριμένο μηχανισμό προκαλεί μια ορισμένη νόσο. Στην μέτρηση της βιολογικής αλληλεπίδρασης το ενδιαφέρον επικεντρώνεται όχι στην διεξαγωγή της στατιστικής μοντελοποίησης, αλλά στην εκτίμηση της αναλογίας της νόσου μεταξύ εκείνων που εκτίθενται από κοινού και στους δύο παράγοντες, αφού μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των δύο εκθέσεων. Για την αντιμετώπιση προβλημάτων δημόσιας υγείας σχετικά με τη μείωση της συχνότητας των ασθενειών μελέτες έχουν προτείνει πως, η βιολογική αλληλεπίδραση είναι πολύ σημαντική (Galanis & Sparos 2004).

Ερευνήθηκαν, λοιπόν, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και των 20 γενετικών πολυμορφισμών ξεχωριστά. Η μελέτη ασθενών – μαρτύρων δε βρήκε καμία σημαντική αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων. Σκοπός των ασθενών – μαρτύρων μελετών είναι η εξερεύνηση υποθέσεων σχετικά με τις αιτιολογικές επιδράσεις. Όμως, όπως συμβαίνει και με όλες τις μελέτες παρατήρησης, απλές (μη διορθωμένες) εκτιμήσεις των επιδράσεων είναι πιθανό να υπόκεινται σε λάθη λόγω συγχυτικών παραγόντων. Μια εμπεριστατωμένη ανάλυση αυτού του σχεδιασμού απαιτεί διόρθωση των λόγων πιθανοτήτων (odds ratio) με στόχο των περιορισμό των συγχυτικών παραγόντων. Ακόμη και όταν γίνονται επιμελείς προσπάθειες περιορισμού αυτών των παραγόντων, θα υπάρχει κάτι που δεν έχει ελεγχθεί. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα από μελέτες ασθενών – μαρτύρων, πάντα θα σχετίζονται με κάποια αβεβαιότητα (Journal of Physiotherapy 2017). Έτσι και στην παρούσα ανάλυση τα μοντέλα προσαρμόστηκαν ως προς το

φύλο, την ηλικία και τις πρώτες 10 κύριες γενετικές συνιστώσες, με σκοπό τον έλεγχο και περιορισμό των συγχυτικών παραγόντων.

Το δεύτερο βήμα της εργασίας ήταν η εφαρμογή της case-only μεθόδου. Όπως υποδηλώνει το όνομα, ολόκληρο το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση αυτή αποτελείται από τα άτομα που έπασχαν από μελάνωμα. Το γεγονός αυτό, αποτελεί μια δυναμική του σχεδιασμού, καθώς η επιλογή των μαρτύρων είναι πιθανό να οδηγήσει σε σφάλματα. Ο σχεδιασμός αυτός προσφέρει σημαντική αύξηση της ισχύος καθώς και μεγαλύτερη ακρίβεια στην εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε σύγκριση με τα παραδοσιακά σχεδιασμού ασθενών-μαρτύρων. Κάθε άτομο με μελάνωμα κωδικοποιείται ως θετικό ή αρνητικό για έναν γενετικό παράγοντα (G) και έναν περιβαλλοντικό παράγοντα (E). Ο λόγος πιθανοτήτων (OR) για την case-only ανάλυση προέρχεται από την διασταυρούμενη κατηγοριοποίηση του δείγματος μελέτης για την κατάσταση G και E. Αυτό το OR είναι η πιθανότητα του E δεδομένης της παρουσίας του G διαιρούμενης από τις πιθανότητες του E δεδομένης της απουσίας του G. Όπως πάντα, το OR είναι αντιστρέψιμο, έτσι ώστε το OR από την case-only μέθοδο να μπορεί επίσης να ερμηνευτεί ως η πιθανότητα του G παρουσία του E διαιρούμενη από τις πιθανότητες του G δεδομένης της απουσίας του E. Η λογική πίσω από τη μελέτη case-only είναι ότι αυτό το OR μπορεί να ερμηνευτεί ως η πολλαπλασιαστική αλληλεπίδραση μεταξύ G και E στην πρόκληση ασθενειών. Με την εφαρμογή της case-only μεθόδου πάλι δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του γενετικού και του περιβαλλοντικού παράγοντα. Επιπλέον, τα διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν δεν φάνηκε να είναι πιο στενά σε σχέση με εκείνα που υπολογίστηκαν με την ανάλυση ασθενών – μαρτύρων, όπως έχει συμβεί σε άλλες έρευνες.

Οι επιδημιολόγοι ήταν αρχικά ενθουσιασμένοι με την case-only μελέτη για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων γονιδίου-περιβάλλοντος. Αυτός ο καινοτόμος σχεδιασμός προσέφερε την ευκαιρία να μελετηθεί η αλληλεπίδραση που ήταν πιο στατιστικά αποδοτική από την ανάλογη της ασθενών - μαρτύρων ανάλυσης και δεν υπόκειται σε κοινά σφάλματα που προκύπτουν από την επιλογή των μαρτύρων. Ωστόσο, η εγκυρότητα της case-only μελέτης εξαρτάται από μια υπόθεση πως ο περιβαλλοντικός παράγοντας και ο γενετικός είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Πιο πρόσφατα, οι ανησυχίες για τις παραβιάσεις αυτής της υπόθεσης έχουν προκαλέσει την πτώση του αρχικού ενθουσιασμού (Gatto et al. 2004; Helbig et al. 2012; Piegorsch et al. 1994).

Ο case-only σχεδιασμός για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος έχει επικριθεί για την ευαισθησία του σε σφάλματα που προκαλούνται από την έλλειψη ανεξαρτησίας μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Όπως συνιστάται στη βιβλιογραφία, οι ερευνητές συχνά χρησιμοποιούν ελέγχους για να αξιολογήσουν εάν η υπόθεση της ανεξαρτησίας είναι αξιόπιστη (Gatto et al. 2004). Παρόλα αυτά, η υπόθεση αυτή είναι κάποιες φορές

διαρθρωμένη ως παραδοχή της ανεξαρτησίας των παραγόντων κινδύνου μεταξύ των μη ασθενών. Η παραδοχή της σπανιότητας της νόσου σε συνδυασμό με την παραδοχή των ανεξάρτητων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στον πληθυσμό συνεπάγεται πως οι γενετικές και περιβαλλοντικές εκθέσεις είναι προσεγγιστικά ανεξάρτητες μεταξύ των μη ασθενών, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο (Tyler et al. 2010).

Είναι γνωστό πως ο λόγος πιθανότητας που σχετίζεται με έναν περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου για την παρουσία ενός βιολογικού δείκτη αποτελεί ένα κατάλληλο μέτρο για τον χαρακτηρισμό του βαθμού της αιτιολογικής ετερογένειας μεταξύ των ομάδων ασθενειών που ορίζονται από το δείκτη. Αυτή η παράμετρος έχει αποδειχθεί ότι είναι η αναλογία του σχετικού κινδύνου του παράγοντα που προκαλεί θετικό δείκτη για τη νόσο προς το σχετικό κίνδυνο που προκαλεί αρνητικό δείκτη για τη νόσο. Επιπλέον, μπορεί να εκτιμηθεί απευθείας από μια κατάλληλα σχεδιασμένη μελέτη case-only χωρίς να χρειαστεί η ομάδα ελέγχου. Ο ορισμός μιας ομάδας ελέγχου είναι απαραίτητος εάν επιθυμούμε να αξιολογήσουμε τους μεμονωμένους σχετικούς κινδύνους.

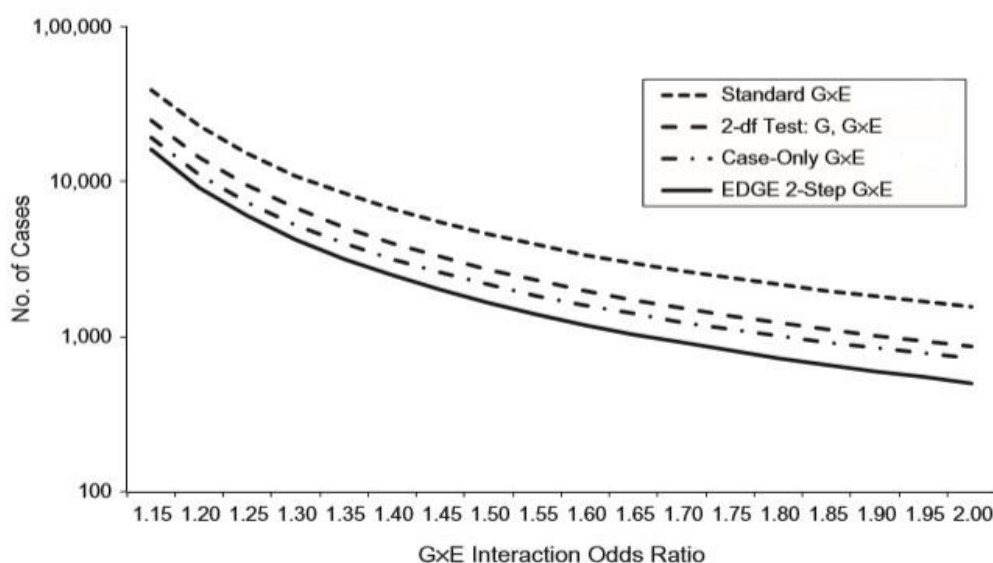
Η χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης στον case-only σχεδιασμό συνιστά μια βολική αναλυτική προσέγγιση για την αξιολόγηση της παρουσίας αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο κατάλληλος ρόλος τέτοιου είδους μεθόδων είναι διερευνητικός, προκειμένου να εξεταστεί η φύση των επιπτώσεων των γνωστών παραγόντων κινδύνου αλλά και να εντοπιστούν μη γνωστοί παράγοντες που μπορεί να δρουν σε σπάνια γενετικά χαρακτηριστικά, κάτι που θα ήταν πιθανό η τυπική μέθοδος ασθενών – μαρτύρων να παραβλέψει λόγω έλλειψης ισχύος (Begg & Zhang 1994).

Η αδυναμία εντόπισης στατιστικά σημαντικών αλληλεπιδράσεων στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι πιθανό να οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος των συμμετεχόντων και ως αποτέλεσμα στην έλλειψη στατιστικής ισχύος. Απαραίτητη είναι η περαιτέρω διερεύνηση χρησιμοποιώντας και άλλες μεθόδους. Τα ευρήματα από τις GWAS μελέτες υποδηλώνουν ότι πολλά σύνθετα νοσήματα είναι πολυγονιδιακά, συμπέρασμα της κοινής δράσης ενός μεγάλου αριθμού μεταβλητών. Έτσι, πολυγονιδιακά σκορ κινδύνου (**Polygenic Risk Scores**), τα οποία ποσοτικοποιούν τον γενετικό κίνδυνο από ένα σύνολο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, προσφέρουν μια εναλλακτική και παράλληλα ελκυστική λύση για την επαρκή ανάλυση αλληλεπιδράσεων γονιδίου – περιβάλλοντος (Gillett et al. 2018; Meisner et al 2019).

Περαιτέρω στατιστικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων γονιδίου – περιβάλλοντος. Η διαδικασία των 2-degrees-of-freedom (2-df) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξεταστεί η ύπαρξη ή όχι της κοινής επίδρασης του γονιδίου και του περιβάλλοντος, μιας και η διαδικασία αυτή επιφέρει

καλύτερη ισχύ. Ακόμη, στην case-only μέθοδο, για να μειωθεί το τυχόν σφάλμα και να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητα της υπόθεσης ανεξαρτησίας των δύο υπό μελέτη παραγόντων, έχει προταθεί η εμπειρική Μπεϋζιανή εκτίμηση (empirical Bayes strategy). Τέλος, πολλές προσεγγίσεις 2 βημάτων (2-step tests) έχουν σχεδιαστεί για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της ανάλυσης αλληλεπιδράσεων, ενώ ελέγχουν το σφάλμα Τύπου I. Όλες αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν την παρακάτω γενική πραγμάτευση: Βήμα 1: Για όλα τα M (π.χ. 1 εκατομμύριο) SNPs υπολογίζεται το στατιστικό $T1$ και η αντίστοιχη τιμή p -value $p1$. Βήμα 2: Δίνεται προτεραιότητα στα SNPs με βάση το $p1$ (διεξαγωγή του βήματος 2 μόνο σε m SNPs με $p1 < 0.05$) και υπολογίζεται το στατιστικό $T2$ της αλληλεπίδρασης γονιδίου – περιβάλλοντος με αντίστοιχο p -value $p2$. Η ισχύς αυξάνεται λόγω της ανάγκης προσαρμογής στο βήμα 2 μόνο για $m < M$ δοκιμές. Για παράδειγμα, το Γράφημα 2 δείχνει ότι οι προσεγγίσεις case-only, 2-df και 2 βημάτων μπορούν να απαιτήσουν ουσιαστικά χαμηλότερα μεγέθη δειγμάτων για να επιτευχθεί 80% ισχύς για την ανίχνευση $G \times E$ σε σύγκριση με το παραδοσιακό μοντέλο που προκύπτει από τις μελέτες ασθενών – μαρτύρων. Η αποτελεσματικότητα των διαφόρων προσεγγίσεων, η μία σε σχέση με την άλλη, ποικίλει ανάλογα με το υποκείμενο πραγματικό μοντέλο (Hsu et al. 2012; Kraft et al. 2007; Mukherjee et al. 2008; Gauderman et al. 2017).

Γράφημα 2: Απαιτούμενο μέγεθος δείγματος (n) έναντι του μεγέθους αποτελέσματος αλληλεπίδρασης γονιδίου-περιβάλλοντος ($G \times E$) για την επίτευξη 80% ισχύος χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης (Gauderman et al. 2017).



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Οι μελέτες αλληλεπίδρασης γονιδίου – περιβάλλοντος αποτελούν έναν σημαντικό σχεδιασμό για τη βελτίωση της ακρίβειας της εκτίμησης τόσο των γενετικών όσο και των περιβαλλοντικών επιδράσεων. Για την υλοποίηση αυτών των μελετών συνήθως χρειάζονται μια ομάδα ασθενών και μια ελέγχου. Η επιλογή όμως της ομάδας ελέγχου συχνά επιφέρει προβλήματα. Έτσι, νέες μέθοδοι, όπως η ανάλυση case-only, έχουν προταθεί για την καλύτερη διεξαγωγή συμπερασμάτων. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται μια σύγκριση των case-control και case-only μεθόδων.

Μέθοδοι: Χρησιμοποιήσαμε δεδομένα από τη βιοτράπεζα UK Biobank. Μελετήσαμε 20 γενετικούς πολυμορφισμούς που έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος σε ευρυγονιδιωματικό επίπεδο. Έλαβαν μέρος 1,038 άτομα με μελάνωμα και 321,570 υγιείς μάρτυρες. Υπολογίσαμε και συγκρίναμε ORs των αλληλεπιδράσεων καθώς και τα διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν ύστερα από την εκτέλεση της λογιστικής παλινδρόμησης για τους δύο σχεδιασμούς έρευνας.

Αποτελέσματα: Ένας γενετικός πολυμορφισμός ήταν στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο σημαντικότητας 5×10^{-8} . Παρόλα αυτά, στα μοντέλα ελέγχου των αλληλεπιδράσεων με τις δύο μεθόδους, καμία σχέση δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και ο κάθε ένας από τους 20 γενετικούς πολυμορφισμούς ξεχωριστά δεν είχαν κοινή επίδραση.

Συμπέρασμα: Το μικρό μέγεθος δείγματος και η έλλειψη ισχύος αποτελούν τους πιθανούς λόγους που δεν εντοπίστηκε κάποια σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του γενετικού και του περιβαλλοντικού παράγοντα. Τα ευρήματά μας δικαιολογούν περαιτέρω διερεύνηση με σκοπό την ανάπτυξη συστάσεων για την πρόληψη ασθενειών.

Λέξεις-κλειδιά: αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος, μελάνωμα, ηλιακή ακτινοβολία, γενετικοί πολυμορφισμοί

ABSTRACT

Background: Study of gene-environment interaction is important for improving accuracy and precision in the assessment of both genetic and environmental influences. Implementation of these studies usually requires a group of patients and a group of controls. However, the selection of the control group has been associated with problems. Thus, new methods, such as case-only analysis, have been created to study such interactions. The objective of this study is to compare the case-only and case-control designs using data from patients with melanoma.

Methods: We used data from UK Biobank. We studied 20 genetic polymorphisms that have been shown to be related to the risk of melanoma at a genome-wide level. 1,038 people with melanoma and 321,570 healthy controls were enrolled. Using and comparing a case-control and a case-only design, we performed logistic regression analyses to investigate statistical interactions between each one genetic polymorphism and solar radiation.

Results: A genetic polymorphism was statistically significant at a significance level of 5×10^{-8} . However, under the interaction models, no association found statistically significant leading to the conclusion that exposure to solar radiation and each of the 20 genetic polymorphisms separately did not have a common effect.

Conclusions: The small sample size and lack of power are the possible reasons why no significant interaction between the genetic and environmental factors has been identified. Our findings warrant further investigation in epidemiological and functional studies to aid in the development of recommendations for disease prevention.

Keywords: Gene-environment interaction, melanoma, solar radiation, genetic polymorphisms

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κανέλλος Δ. Ιωάννης. Γενική Χειρουργική 2^η έκδοση, εκδόσεις ΡΟΤΟΝΤΑ.
2. Παναγιώτου Ορέστης. Γενετικές συσχετίσεις για γενετικούς πολυμορφισμούς χαμηλής συχνότητας σε μελέτες γονιδιακής σάρωσης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής.
3. Πλάκα Μιχαέλα, Επιδημιολογική και μοριακή μελέτη ασθενών με διάγνωση μελανώματος σε νεαρή ηλικία (<40 ετών), Αθήνα 2017.
4. Amos CI, Wang LE, Lee JE, et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. Hum Mol Genet. 2011;20(24):5012–5023.
5. Anja Rudolph, Jenny Chang-Claude and Marjanka K Schmidt: Gene–environment interaction and risk of breast cancer. Br J Cancer. 2016 Jan 19; 114(2): 125–133. doi: 10.1038/bjc.2015.439.
6. Apalla Zoe, Lallas Aimilios et al.: Epidemiological trends in skin cancer. Dermatol Pract Concept. 2017 Apr; 7(2): 1–6. doi: 10.5826/dpc.0702a01.
7. Apalla Zoe, Nashan Dorothée et al.: Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. Dermatol Ther (Heidelb). 2017 Jan; 7(Suppl 1): 5–19.
8. Barrett JH, Iles MM, Harland M, et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. Nat Genet. 2011;43(11):1108–1113.
9. Begg CB, Zhang ZF: Statistical analysis of molecular epidemiology studies employing case-series. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1994 Mar;3(2):173–5.
10. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. Nat Genet. 2009;41(8):920–925.
11. Bycroft C, Freeman C, Petkova D, Band G, Elliott LT, Sharp K, et al. Genome-wide genetic data on ~500,000 UK Biobank participants. bioRxiv. 2017.
12. Case-control studies. Journal of Physiotherapy Volume 63, Issue 4, October 2017, Pages 264-266.
13. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. GigaScience. 2015;4:7.

14. Clamp Michele, Fry Ben et al.: Distinguishing protein-coding and non-coding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4; 104(49): 19428–19433. doi: 10.1073/pnas.0709013104.
15. Evangelou Evangelos & Stratigos J Alexander (2016) Lessons from genome-wide studies of melanoma: towards precision medicine, *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 1:5, 443-449, DOI: [10.1080/23808993.2016.1240586](https://doi.org/10.1080/23808993.2016.1240586).
16. GALANIS P., SPAROS L.: Biological and statistical interaction, *Laboratory of Clinical Epidemiology, School of Nursing, University of Athens, Athens, Greece, Archives of Hellenic Medicine* 2004, 21(2):123–136.
17. Gatto NM, Campbell UB, Rundle AG, Ahsan H. Further development of the case-only design for assessing gene-environment interaction: evaluation of and adjustment for bias. *Int J of Epidemiol*. 2004;33:101424. doi: 10.1093/ije/dyh306. PubMed PMID: 15358745.
18. Gatto M. Nicolle, Campbell B. Ulka et al.: Further development of the case-only design for assessing gene–environment interaction: evaluation of and adjustment for bias. *International Journal of Epidemiology* 2004;33:1014–1024, doi:10.1093/ije/dyh306.
19. Gauderman WJ, Mukherjee B et al.: Update on the State of the Science for Analytical Methods for Gene-Environment Interactions. *Am J Epidemiol*. 2017 Oct 1;186(7):762-770. doi: 10.1093/aje/kwx228.
20. Gillett AC, Vassos E, Lewis CM: Transforming Summary Statistics from Logistic Regression to the Liability Scale: Application to Genetic and Environmental Risk Scores. *Hu Hered m*. 2018;83(4):210-224. doi: 10.1159/000495697.
21. Hassanzadeh Jafar, Moradzadeh Rahmatollah et al.: A Comparison of Case-Control and Case-Only Designs to Investigate Gene-Environment Interactions Using Breast Cancer Data. *Iran J Med Sci*. 2012 Jun; 37(2): 112–118. PMID: [23115440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23115440/) .
22. Helbig KL, Nothnagel M et al.: A case-only study of gene-environment interaction between genetic susceptibility variants in NOD2 and cigarette smoking in Crohn's disease aetiology. *BMC Med Genet*. 2012 Mar 14;13:14. doi: 10.1186/1471-2350-13-14. DOI:10.1186/1471-2350-13-14.
23. Hernán MA, Hernández-Díaz S, Robins JM: A structural approach to selection bias. *Epidemiology*. 2004 Sep;15(5):615-25.
24. Hsu L, Jiao S, Dai JY, et al.: Powerful cocktail methods for detecting genome-wide gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*. 2012;36(3):183–194.
25. *Journal of Physiotherapy* 63 (2017) 264–266.

26. Kraft P, Yen YC, Stram DO, et al.: Exploiting gene environment interaction to detect genetic associations. *Hum Hered.*2007;63(2):111–119.
27. Law MH, Bishop DT, Lee JE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet.* 2015;47(9):987–995, doi: 10.1038/ng.3373.
28. Linares MA, Alan Zakaria, Parminder Nizran: Skin Cancer. *Prim Care* 2015 Dec; 42(4)645-59.
29. Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, et al. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. *Nat Genet.* 2011;43(11):1114–1118.
30. Meisner Allison , Kundu Prosenjit , Chatterjee Nilanjan . Case-only analysis of gene-environment interactions using polygenic risk scores. *bioRxiv.* 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/555300>.
31. Mukherjee B, Chatterjee N. Exploiting gene-environment independence for analysis of case-control studies: an empirical Bayes-type shrinkage estimator to trade-off between bias and efficiency. *Biometrics.* 2008;64(3):685–694.
32. Nathan P. et al.: Uveal Melanoma UK National Guidelines. *Eur J Cancer.* 2015 Nov;51(16):2404-12. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.013. Epub 2015 Aug 13.
33. Panatsopoulou Kalliope, Wheeler Eleanor. Key Concepts in Genetic Epidemiology, Humana Press.
34. Papadakis M., S. McPhee. *Current Medical Diagnosis and Treatment* 2017.
35. Papadakis M., S. McPhee. *Current Medical Diagnosis and Treatment* 2007.
36. Piegorsch WW, Weinberg CR, Taylor JA. Non-hierarchical logistic models and case-only designs for assessing susceptibility in population-based case-control studies. *Stat Med* 1994;13:153–62.
37. Riker Al et al.: The epidemiology, prevention and detection of melanoma. *Ochsner J.* 2010 Summer;10(2):56-65.
38. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern Epidemiology.* 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 573-5.
39. Ruth Ottman, Ph.D.: Gene–Environment Interaction: Definitions and Study Designs. *Prev Med.* 1996 Nov–Dec; 25(6): 764–770. PMID: 8936580.
40. Schmidt S, Schaid DJ : Potential misinterpretation of the case-only study to assess gene-environment interaction. *Am J Epidemiol.*1999 Oct 15;150(8):878-85.

41. Situm M et al.: Melanoma--clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2014;22(1):1-12.
42. Smith PG, Day NE (1984). The design of case-control studies: the influence of confounding and interaction effects. *Int J Epidemiol* 13(3): 356–365.
43. Sudlow C, Gallacher J, Allen N, Beral V, Burton P, Danesh J, et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. *PLoS medicine*. 2015;12(3):e1001779.
44. The BMJ : Chapter 8. Case-control and cross sectional studies.
45. Tyler J. VanderWeele, Sonia Hernández-Díaz, and Miguel A. Hernán: Case-only gene-environment interaction studies: when does association imply mechanistic interaction? *Genet Epidemiol*. 2010 May; 34(4): 327–334. doi: [10.1002/gepi.20484](https://doi.org/10.1002/gepi.20484).
46. VanderWeele TJ, Robins JM : Directed acyclic graphs, sufficient causes, and the properties of conditioning on a common effect. *Am J Epidemiol*. 2007 Nov 1;166(9):1096-104. Epub 2007 Aug 16.
47. Vito W. Rebecca et al.: A Brief History of Melanoma: From Mummies to Mutations. *Melanoma Res*. 2012 Apr; 22(2): 114–122. doi: 10.1097/CMR.0b013e328351fa4d.
48. Wain LV, Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Artigas MS, et al. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015;3(10):769-81.
49. Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953;171(4361):964-7.
50. Yang Q, Khoury MJ et al.: Case-only design to measure gene-gene interaction. *Epidemiology*. 1999 Mar;10(2):167-70.