

C7188 Úvod do molekulární medicíny 6/12



MOLEKULÁRNÍ EPIDEMIOLOGIE



Ondřej Slabý & Jiří Šána

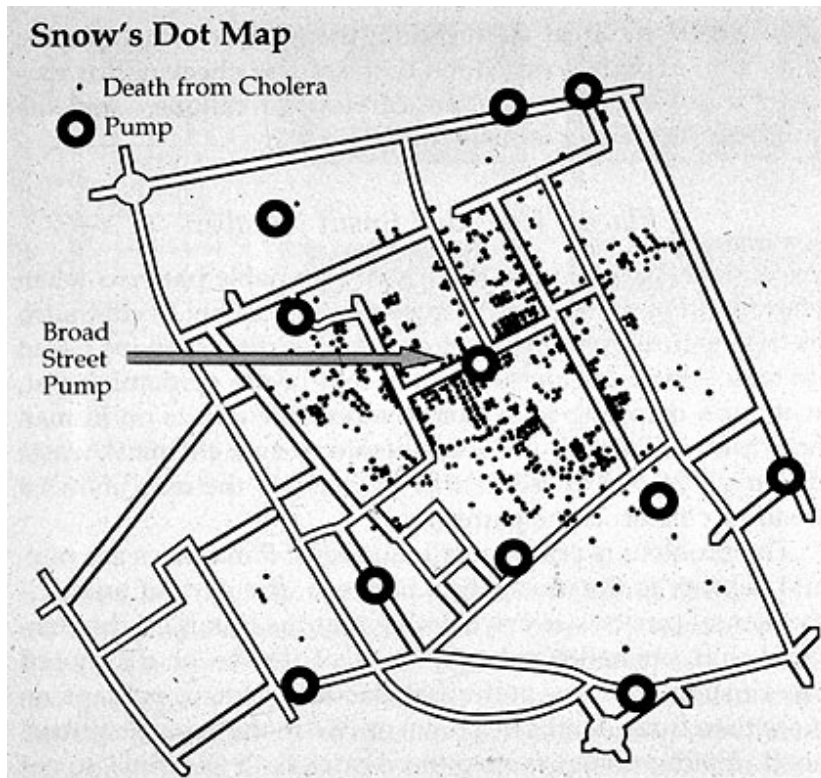
Lékařská fakulta & CEITEC, Masarykova univerzita

Masarykův onkologický ústav

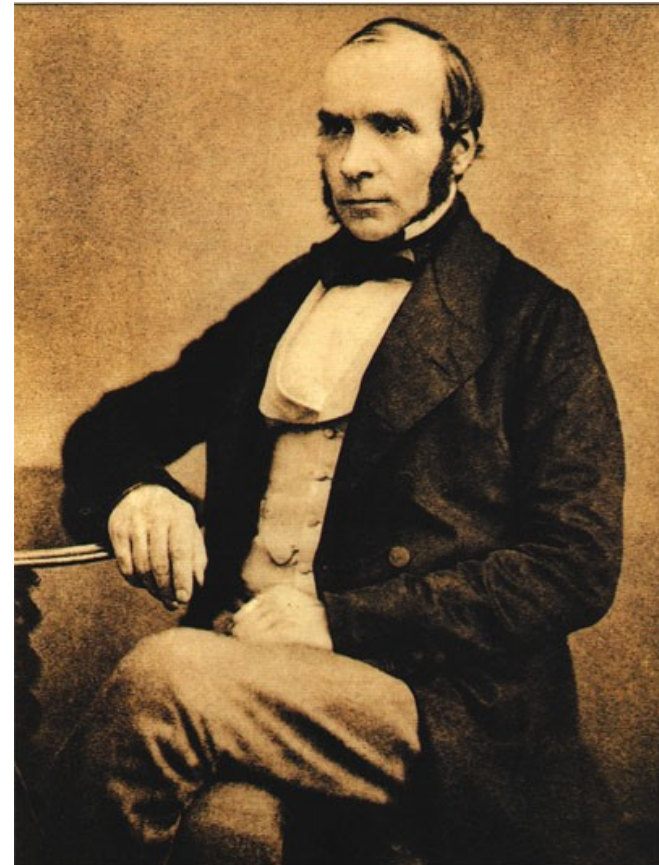
Fakultní nemocnice Brno



Historie – cholera v Londýně (1854)



Of 83 people, only 10 lived closer to a different pump than Broad Street
Of these 10, 5 preferred taste of Broad Street water and 3 were children who went to nearby school



John Snow is credited by many with developing the modern field of epidemiology

John Snow and the Pump Handle

John Snow and cholera
in 1854 London

<http://www.ph.ucla.edu/epi/snow.html>



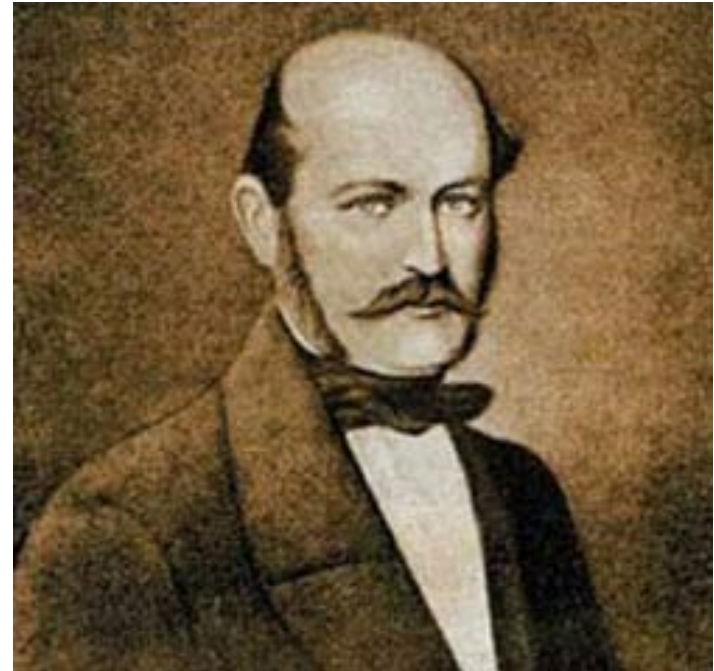
Ignác Filip Semmelweis (1818 -1865)

Horečka omladnic v porodnické klinice ve Vídni
vznik choroby přičítán
„kosmicko-telurickým" vlivům

Zavedl mytí rukou v chlorové vodě

Příčiny, pojem a ochrana před horečkou omladnic

„Vraždění šestinedělek musí přestat!„



Epidemiologie – vymezení pojmu

Původ slova epidemiologie je odvozen z řeckých slov *epi* (nad, mezi) a *démos* (lid) a *logos* (slovo, věda, studium) a může být volně přeložen jako „studium toho, co je nad lidmi“.

- **popis zdravotního stavu populace, popis frekvence a rozsahu a onemocnění na populační úrovni**
- **popis vlivu onemocnění na populaci, včetně socioekonomických dopadů**
- **identifikace příčin a rizikových faktorů určitého onemocnění, poskytuje podklady pro preventivní opatření**
- **hodnocení efektivity lékařské péče, jak preventivní tak i následné, poskytuje podklady pro management**
- **prognózy vývoje onemocnění**
- **podklady pro analýzu rizik a stanovení zákonných limitů**

Epidemiologie – vymezení pojmu

➔ Incidence

- popisuje výskyt nových případů onemocnění v populaci ve studovaném období
- počet nových případů / celkový počet osob ve studované populaci v určitém časovém úseku
- vysoké hodnoty incidence ukazují na vysoké riziko onemocnění
- výhodné při popisu akutních onemocnění

• Prevalence

- popisuje zastoupení dané nemoci ve studované populaci v daném okamžiku
- okamžitý počet nemocných / celkový počet osob ve studované populaci
- prevalence výhodná pro popis dlouho trvajících chronických onemocnění
- prevalence závisí na počtu osob, které onemocněly a na délce nemoci
- není nutně mírou rizika onemocnění

$$\text{Prevalence} = \text{Incidence} \times \text{Doba trvání}$$

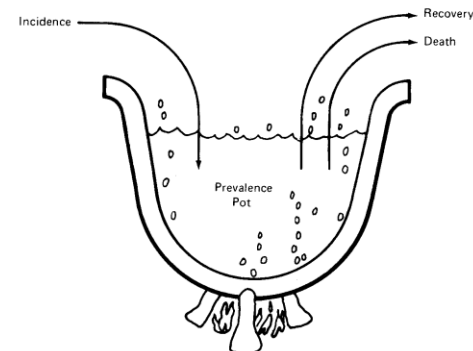


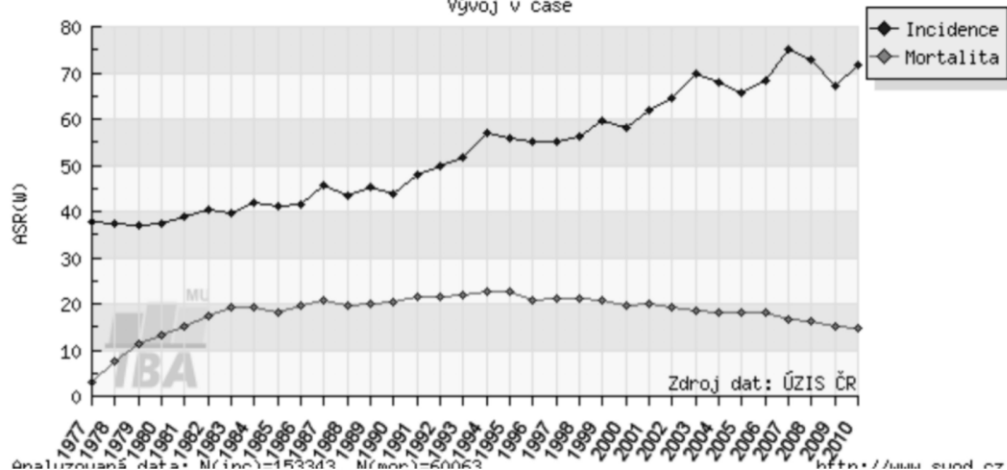
FIGURE 5 The Relationship between Incidence and Prevalence.

Přednáška částečně převzata od Ing. Miloslava Pouzara Ph.D.

Epidemiologie – vymezení pojmu

C50,D05 – Nádory prsu, ženy

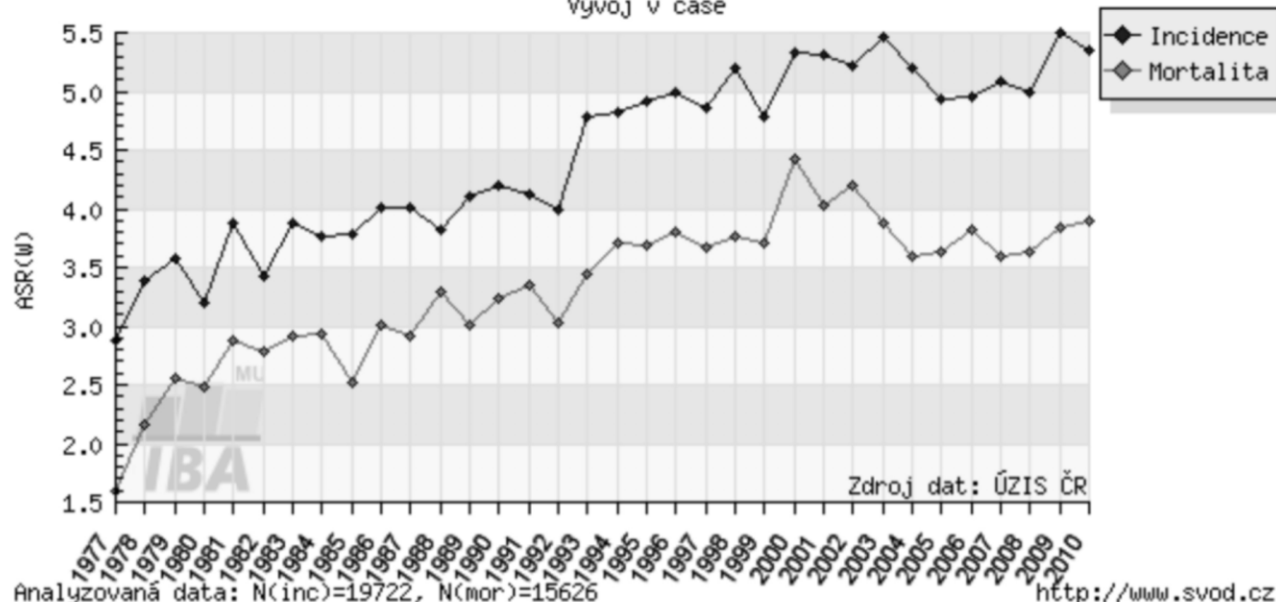
Vývoj v čase



Analýzovaná data: N(inc)=153243, N(mor)=50052 <http://www.svod.cz>

C71 – ZN mozku

Vývoj v čase



Analýzovaná data: N(inc)=19722, N(mor)=15626 <http://www.svod.cz>

Kauzální vztah

- ➔ Pokud změna frekvence, nebo kvality expozice vede k odpovídající změně ve frekvenci výskytu onemocnění

- ➔ Typy kauzálních vztahů
 - postačující příčina – pokud je daný faktor přítomen, nemoc se vždy projeví (genetická onemocnění – Downův syndrom)
 - nutná příčina – pokud daný faktor není přítomen, nemoc se neprojeví (infekční nemoci – tuberkulóza)
 - rizikový faktor – pokud je daný faktor přítomen, zvyšuje pravděpodobnost vzniku onemocnění (cigaretový kouř – rakovina plic)
 - nekauzální vztah – mezi proměnnými je náhodná (nevysvětlující) závislost (lineární vztah mezi počtem zubních plomb a rizikem infarktu myokardu)

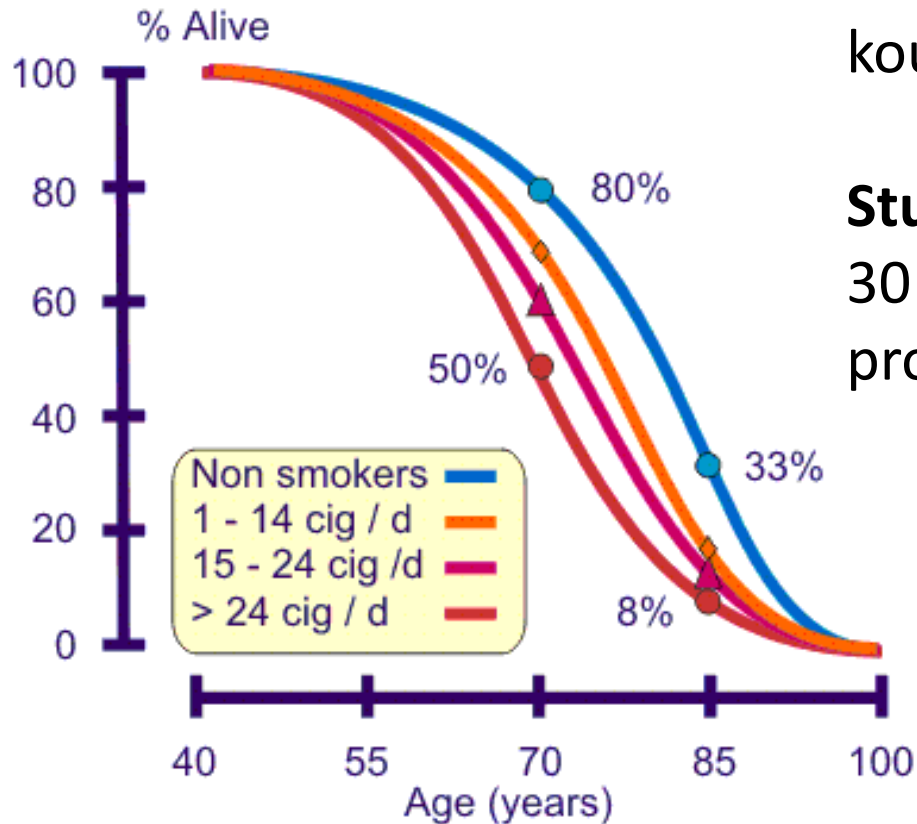
Austin Bradford Hill (1897-1991)

Jako první prokázal vztah
kouření a karcinomu plic

Studie na britských lékařích

30 000 účastníků

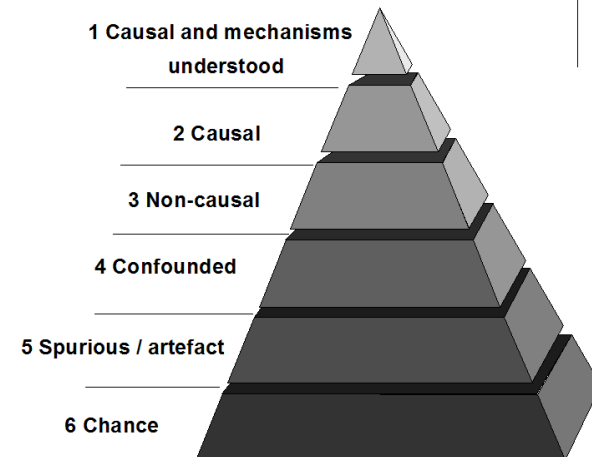
prospektivní 50 let trvající studie



Bradford Hillova kriteria kauzality

- **Korelace (síla asociace)** – čím větší korelace mezi nezávislou proměnnou (expozice) a závislou proměnnou (počet onemocnění), tím vyšší pravděpodobnost kauzálního vztahu mezi proměnnými
 - Semelweis (1818-1865) - významně vyšší úmrtnost na horečku omladnic na klinice řízené lékaři, oproti porodnici s porodními bábami – příčinná souvislost?
 - Durkheim 1951 – počet sebevražd ve 4 pruských regionech na poč. 19 století koreluje s poměrným zastoupením protestantského obyvatelstva – příčinná souvislost ?
- **Časová souslednost** – příčina by měla předcházet následek
 - blesk předchází hrom – příčinná souvislost?
 - v letech kdy se začalo s průmyslovým spalováním odpadů vzrostl počet případů rakoviny – příčinná souvislost? (doba latence 20 let !)
 - v letech po zákazu používání azbestu stále stoupá počet případů azbestem vyvolané rakoviny – příčinná souvislost? (doba latence 20 let)

Figure 5.13 The pyramid of associations



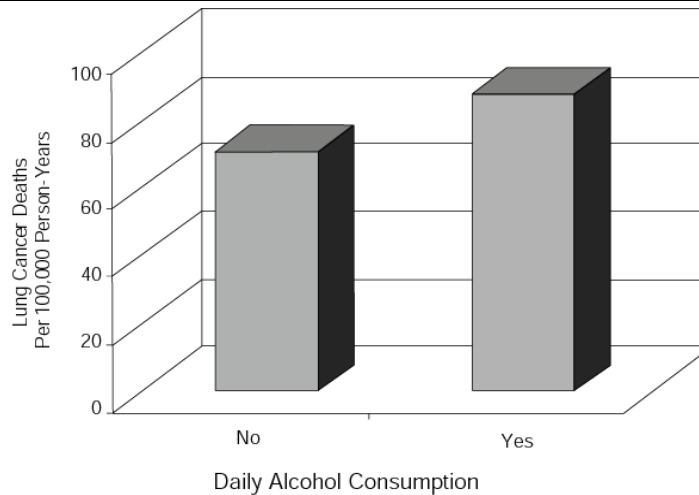
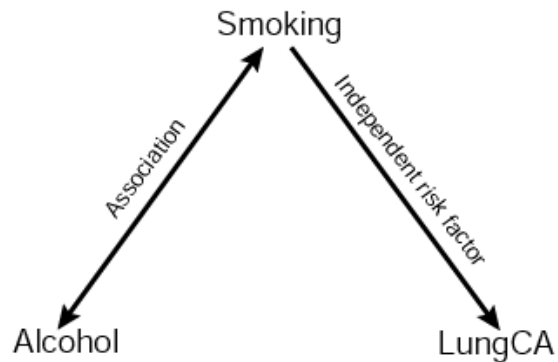
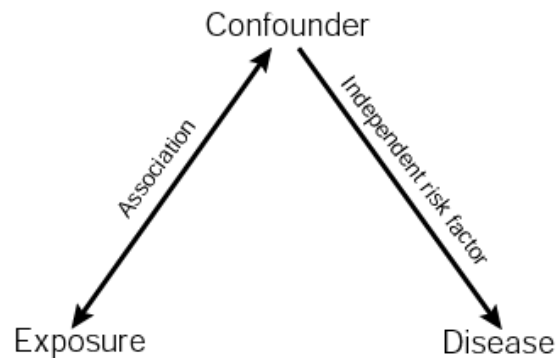
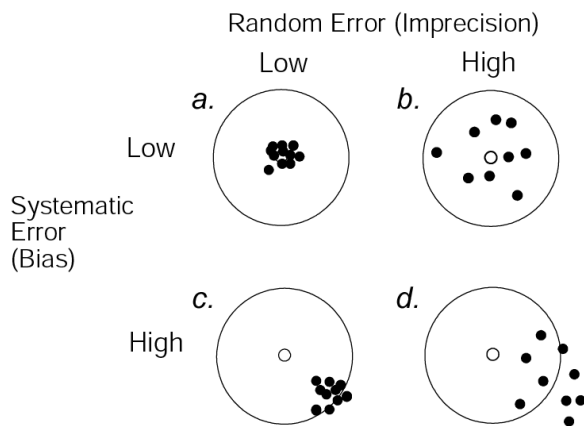
Bradford Hillova kriteria kauzality

- **Konzistence** – čím větší je shoda výsledků různých studií zabývajících se danou dvojicí
- **Koherence** – logická provázanost s výsledky jiných vědních oborů
- **Biologická přijatelnost (věrohodnost)** – existence teoretického mechanismu vysvětlujícího vztah mezi příčinou a následkem
 - formaldehyd je genotoxický a vysoce dráždivý – informace o zvýšeném výskytu tumorů v dýchacích cestách je věrohodná
 - formaldehyd má velký distribuční objem a rychle se v organismu odbourává, ani vysoké koncentrace v ovzduší výrazně nezvyšují jeho koncentraci v tělních tekutinách – informace o zvýšeném výskytu nádorů vnitřních orgánů nevěrohodná
- ⇒ **Specifická** – čím menší počet příčin postačuje k vysvětlení následku, tím lépe
- ⇒ **Vztah dávka účinek** – čím větší míra expozice tím větší míra a četnost následků
 - emise z dieselových motorů – mnoho studií popisuje vztah k rakovině plic, není vztah dávka účinek, patrně vliv kouření (confounding factor)

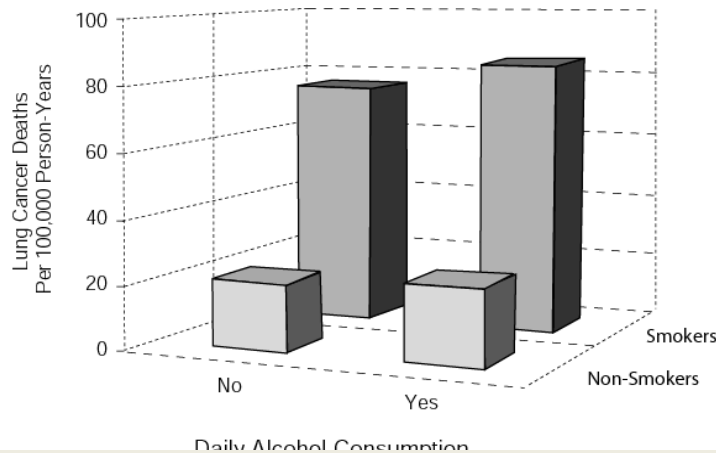
Faktory ovlivňující určení kauzality

Bias (zkreslení – systematická chyba)	Vychýlení výsledku jedním směrem (zvyšuje pravděpodobnost nalezení neexistujícího vztahu) - Selection bias (výběrové zkreslení), Allocation bias (chyba přiřazení), Recall bias (informační zkreslení), publikační bias, observační bias, bias daný ztrátou osob ze studie, apod.
Random Error (náhodná chyba)	snižuje pravděpodobnost nalezení existujícího vztahu, snižuje sílu statistických testů
Confounding factor (zavádějící faktor)	neexistující vztah mezi expozicí látky A a onemocněním je nalezen díky vztahu mezi expozicí látky A a látky B, která skutečně dané onemocnění vyvolává
Synergismus	vzájemná kombinace dvou či více příčin a jednoho následku
Modifikace efektu	různé úrovně expozice vyvolávají různá onemocnění

Rakovina plic o 30% častější mezi konzumenty alkoholu



Stratifikace dat – zvlášť kuřáci a nekuřáci



kouření je zavádějící faktor při popisu vztahu mezi konzumací alkoholu a rakovinou plic

Epidemiologické studie

Observační (pozorovací)

Kauzistiky (*case reports*)

Série případů (*case series*)

Korelační studie (*correlational studies*)

Průřezové studie (*cross-sectional studies*)

Studie případů a kontrol (*case-control studies*)

Kohortové studie (*cohort studies*)

DESKRIPTINÍ

ANALYTICKÉ

Intervenční (experimentální)

Klinické studie (*clinical trial*)

Terénní kontrolované studie (*field trial*)

K
V
A
L
I
T
A

V
Ý
P
O
V
Ě
D
I

Průřezové studie

Cross-sectional studies

- **retrospektivní studie**
- náhodný výběr jedinců ze studované populace – data na individuální bázi
- jednorázový sběr dat o zdravotním stavu a expozici studovaných jedinců
- prevalence onemocnění a prevalence expozic (**varianty daného genu**)
- rozdělení populace na 4 skupiny – exponovaní s nemocí, exponovaní bez nemoci, neexponovaní s nemocí a neexponovaní bez nemoci
- v jednom časovém bodě porovnáváme riziko onemocnění v exponované a neexponované populaci nebo míru expozice v nemocné a zdravé populaci
- můžeme najít vztah (asociaci), ale nelze prokázat kauzalitu
- nedostatek informací o časové souslednosti, možná záměna příčiny a následku (různá skladba potravin u lidí s určitou nemocí – příčina? následek?)
- retrospektivní sledování – zkreslení informací zejména o expozici
- rychlost, nízká cena

Míry efektu – průřezová studie

Risk disease (riziko onemocnění) (exposure) – $A/A+B$

Risk disease (riziko onemocnění)(no exposure) – $C/C+D$

Risk ratio (poměr rizik) – $(A/A+B)/(C/C+D)$

TABLE 21.3 Prevalence Data: Rate Ratio and Rate Difference

		Disease	
		+	-
Exposure	+	<i>A</i>	<i>B</i>
	-	<i>C</i>	<i>D</i>

Alelicka varianta daného genu

Prevalence of disease in exposed population = $A/(A + B)$

Prevalence of disease in the unexposed population = $C/(C + D)$

Rate ratio = $A/(A + B)$ divided by $C/(C + D)$

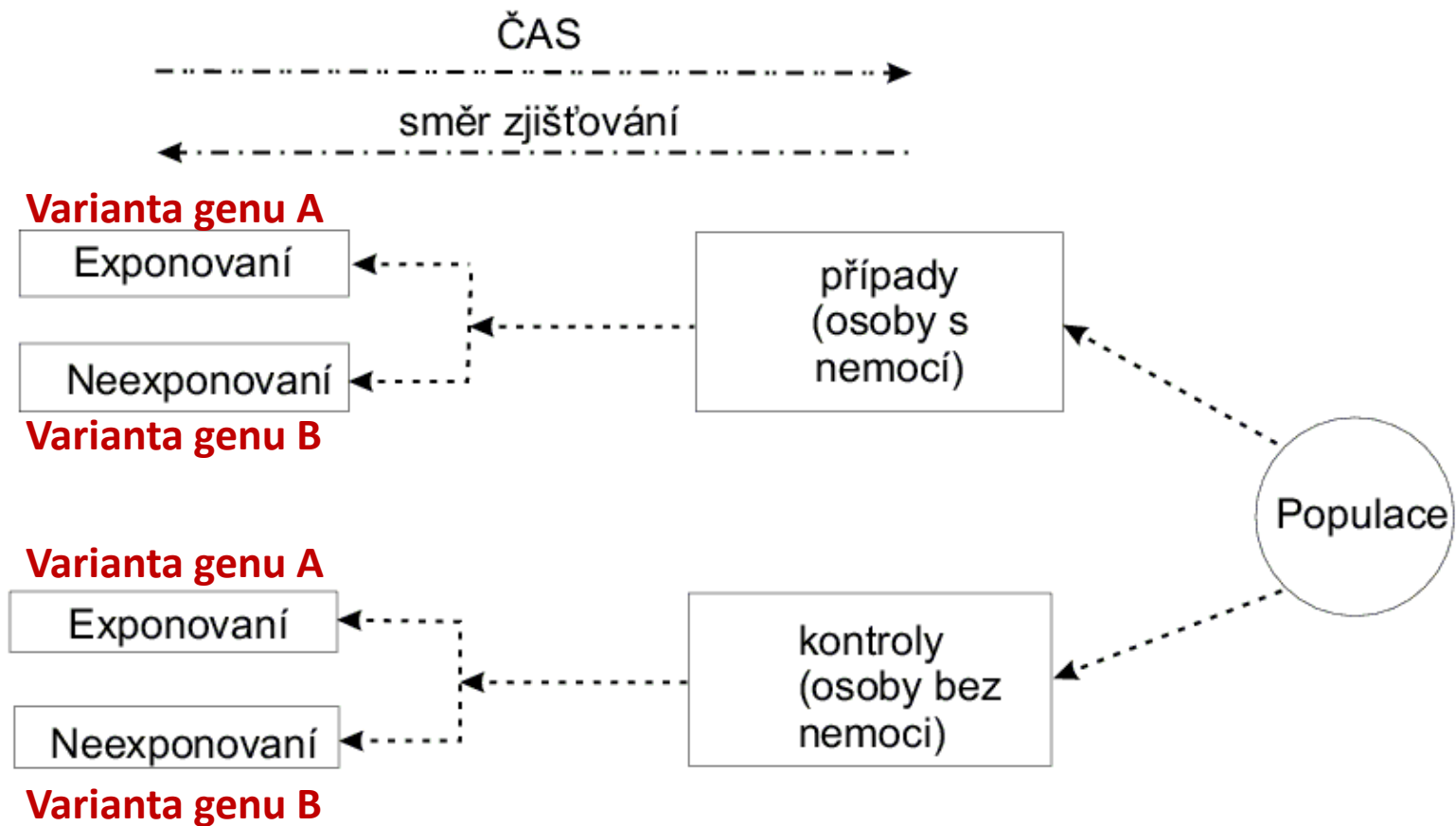
Rate difference = $A(A + B) - C/(C + D)$

Studie případů a kontrol

- Case-control studies

- **retrospektivní analytická studie**
- testování hypotéz o příčinách onemocnění, o vztahu mezi expozicí a nemocí
- incidence i prevalence onemocnění, dvě populace
- **VĚTŠINA ASOCIAČNÍCH STUDIÍ (ALELA-ONEMOCNĚNÍ) MÁ CHARAKTER CASE-CONTROL STUDIE**
- **identifikace případů (cases)** – jedinci se sledovaným onemocněním
- **výběr kontrol (controls)** – jedinci bez sledovaného onemocnění, ale v ostatních aspektech (věk, pohlaví, socioekonomický status) co nejvíce podobní případům
 - „Density sampling“ – výběr kontrol v okamžiku identifikace případu (výhodné pro dlouhotrvající studie)
 - „Cumulative sampling“ – výběr kontrol na konci studie
- v obou skupinách hodnotíme úroveň expozice
 - vyšší ve skupině případů – látka působí jako rizikový faktor
 - vyšší ve skupině kontrol – látka působí jako protektivní (ochranný) faktor
- zkreslení
 - výběrové – skupina kontrol nereprezentuje studovanou populaci
 - „recall bias“ - případy mají tendenci nadhodnocovat expozici

Studie případů a kontrol (case-control studies)



Míry efektu – studie případů a kontrol

odd disease (šance onemocnět) (exposure) – A/B

odd disease (šance onemocnět) (no exposure) – C/D

odds ratio (poměr šancí) – $(A/B)/(C/D)$

TABLE 21.5 Case–Control Data: Odds Ratio

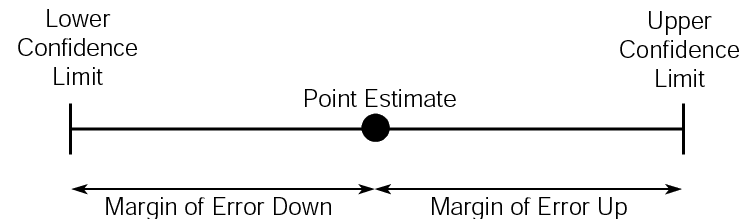
		Disease	
		+	–
Exposure	+	<i>A</i>	<i>B</i>
	–	<i>C</i>	<i>D</i>

Rate ratio = odds ratio = AD/BC

konfidenční interval (CI - confidence interval)

Interval vypočítaný na základě výběru, ve kterém je neznámý populační parametr obsažen s pravděpodobností 95%.

šířka CI – míra přesnosti (čím užší CI, tím vyšší přesnost) studie s větším počtem pozorování mívají užší CI
Alela A (OR, **6.3**; 95% CI, 3.4-11.6)



Příklad studie případ-kontrola

Stanovení OR vyjadřujícího asociaci mezi užíváním salycilátů a Reyova syndromu

	Rey. sy ano	Rey. sy ne	Celkem
Salyc. Ano	26	53	79
Salyc. Ne	1	87	88
celkem	27	140	167

KONTINGENČNÍ TABULKA
Tabulka křížových klasifikací
Čtyřpolní (2x2)

$$OR = AD/BC = 26 \times 87 / 53 \times 1 = 42,7$$

Děti s Reyovým syndromem 42,7 častěji užívaly k léčbě virového onemocnění salyciláty.

Kohortové studie

- Cohort studies

Kohorta je skupina osob, které mají nějakou společnou charakteristiku, a které jsou sledovány po určité období

–V kohortových studiích jsou porovnávány skupiny zdravých osob (kohorty), rozlišené na základě přítomnosti (skupina základní) či nepřítomnosti (skupina kontrolní) suspektního rizikového faktoru.

–Prospektivní kohortové studie

- Specific exposure cohorts – kohorty tvořeny na základě různé expozice rizikového faktoru, výhodné pokud je expozice málo častá (např. Hirošima)
- General population cohorts – expoziční status jedinců stanoven až v průběhu první fáze studie, někdy periodicky přehodnocován, výhodné u častých nebo simultánních expozic

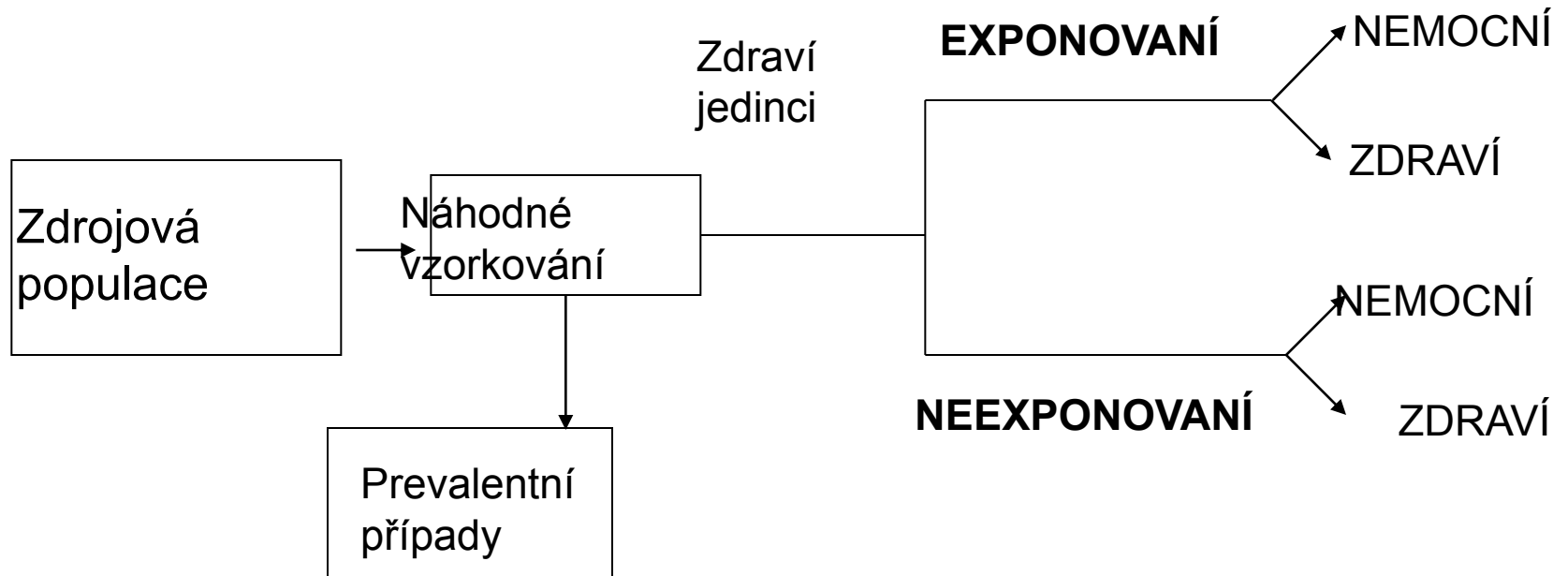
–Retrospektivní (historické) kohortové studie

–v kohortách se porovnává výskyt onemocnění

Kohortové studie (cohort studies)

ČAS

SMĚR ZJIŠŤOVÁNÍ



Míry efektu – kohortní studie

TABLE 21.4 Incidence Data: Rate Ratio and Rate Difference

		Disease	
		+	-
Exposure	+	<i>A</i>	<i>B</i>
	-	<i>C</i>	<i>D</i>

Incidence of disease in exposed population = A/PY (person-year)

Incidence of disease in unexposed population = C/PY

Rate ratio = A/PY divided by C/PY

Rate difference = $(A/PY - C/PY)$

Příklad kohortní studie

Stanovení RR vyjadřujícího asociaci mezi kouřením matek v těhotenství a kojeneckou úmrtností

	úmrtí ano	úmrtí ne	Celkem
Kouření ano	60	1940	2000
Koření ne	80	3920	4000
celkem	140	5860	6000

Incidence exponovaných = $60/2000 = 0,030$

Incidence neexponovaných = $80/4000 = 0,020$

RR = poměr incidencí exponovaných/neexponovaných = $0,030/0,020 = 1,5$

Kojenecká úmrtnost je 1,5x vyšší u dětí exponovaných.

Síla vztahu (asociace), statistické testování hypotéz

RR (Rate Ratio)

1.0-1.2

1.2-1.5

1.5-3.0

3.0-10.00

>10.0

Síla vztahu

žádný

slabý

střední

silný

velmi silný

- H_0 - neexistuje vztah mezi expozicí a onemocněním
- H_A – existuje vztah mezi expozicí a onemocněním

- příklady nulových hypotéz H_0

- Rate difference = 0
- RR (relative risk) = 1
- OR (odds ratio) = 1
- SMR = 100

Závěr testu

platí H_0
(není vztah)

platí H_1
(je vztah)

nezamítnout H_0

zamítnout H_0

	platí H_0 (není vztah)	platí H_1 (je vztah)
nezamítnout H_0	správné rozhodnutí	Chyba 2. druhu (β)
zamítnout H_0	Chyba 1. druhu (α)	správné rozhodnutí

Definice molekulární epidemiologie

Molekulární epidemiologie spojuje vysoce citlivé laboratorní techniky vyvinuté v rámci molekulární biologie s klasickými epidemiologickými postupy. ¹

Molekulární epidemiologie se vyvíjela jako spojení mezi základním výzkumem v molekulární biologii a epidemiologickými studiemi zaměřenými především na vznik nádorového bujení u lidí. Jejím smyslem je kombinace laboratorních stanovení interní dávky, biologicky účinné dávky, biologických účinků a vlivu vnímavosti jednotlivce s epidemiologickými metodami.

Tento přístup představuje přirozenou konvergenci mezi molekulární biologií a epidemiologií.

Pubmed – 2009 – 7700 odkazů v databázi při zadání „molecular epidemiology“
Především molekulární typizace infekčních agens

¹Schulte PA. *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. San Diego: Academic Press; 1993.

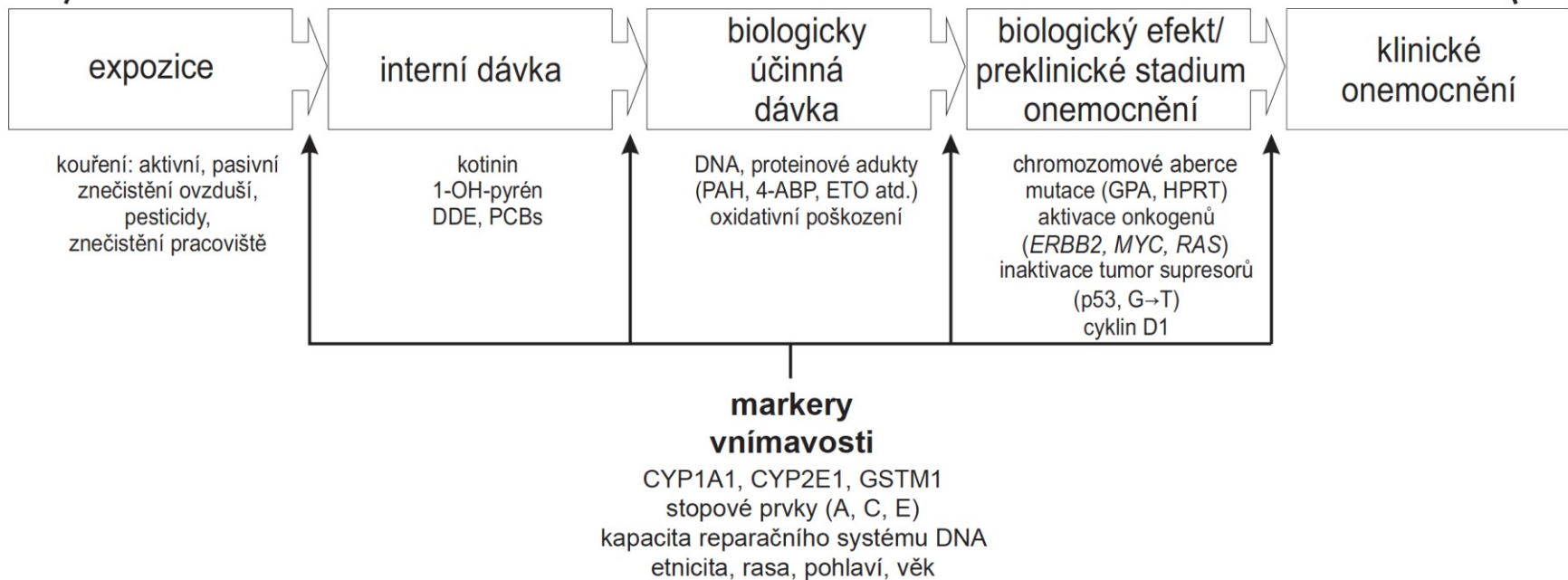
Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění



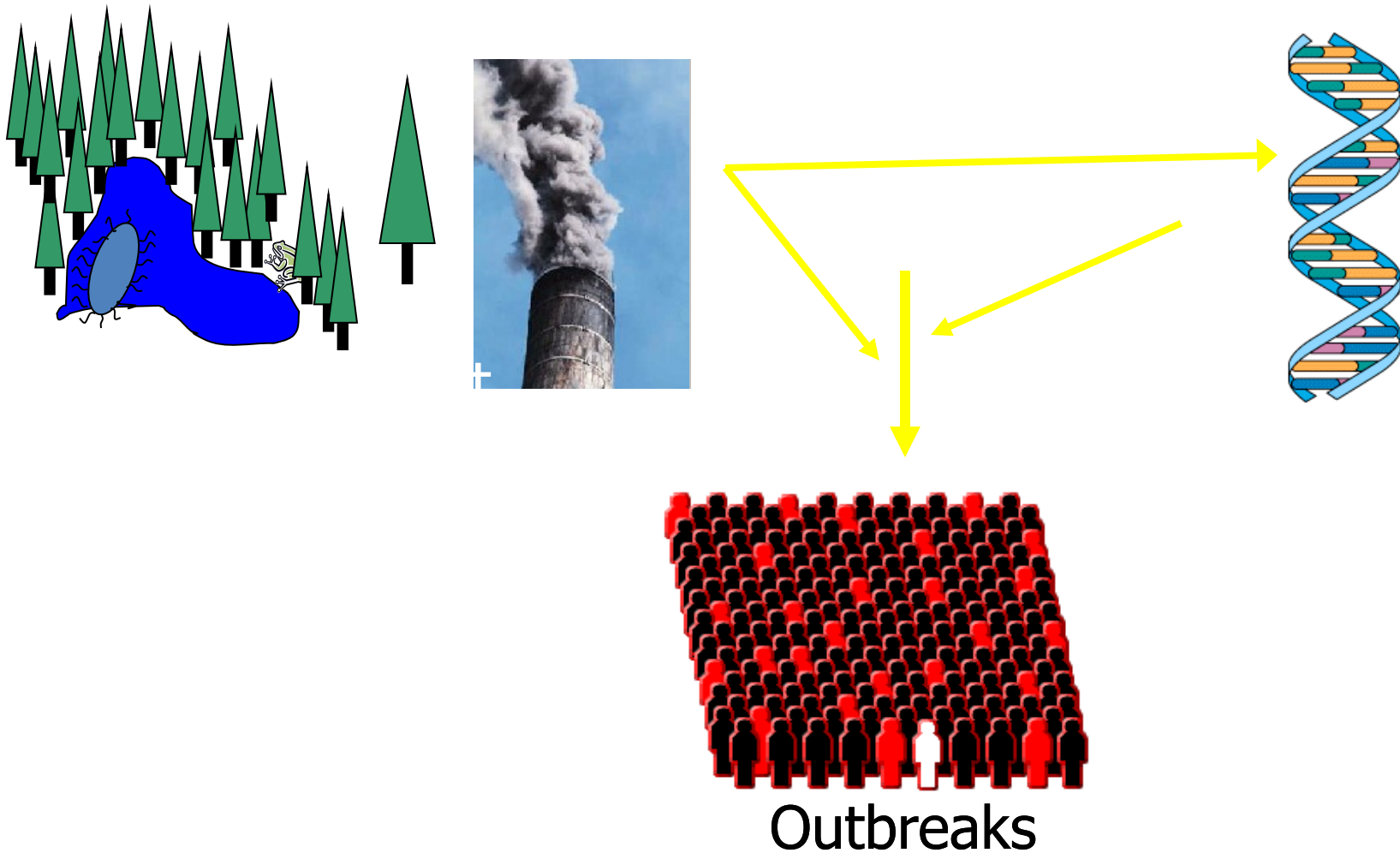
klasická epidemiologie

markery
expozice

markery
onemocnění



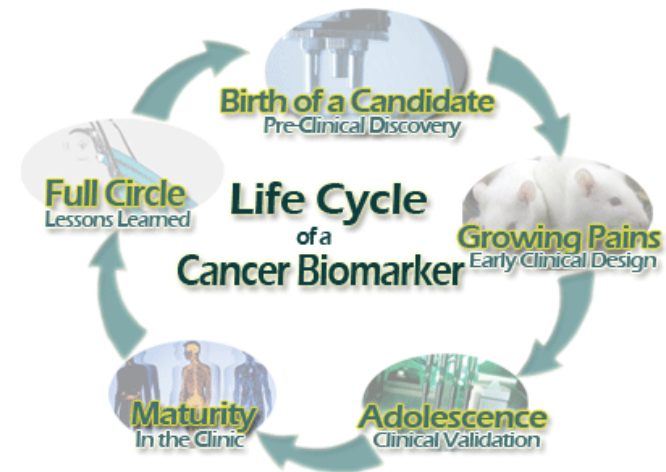
Interakce molekulárních faktorů a prostředí



Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Kategorie markerů používaných v epidemiologických studiích nádorových onemocnění:

1. Markery expozice (např. přítomnost onkogenního viru)
2. Markery dávky (např. titr viru)
3. Markery interní dávky (např. množství DNA aduktů s karcinogenem)
4. Markery biologicky účinné dávky (např. somatické mutace p53)
5. Markery strukturního a funkčního poškození (např. chromozomální aberace)
6. Markery vnímavosti (např. SNP genů metabolických enzymů)
7. Diagnostické markery
8. Prognostické a prediktivní markery



Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery expozice – Příklad HPV a karcinomu děložního hrdla

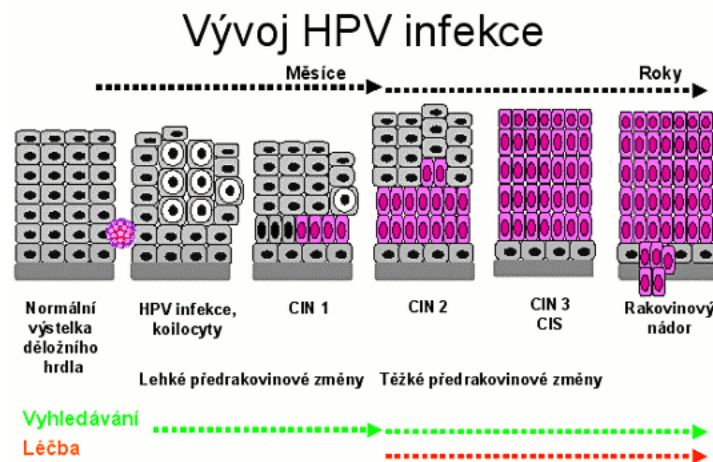
100 podtypů HPV, a pouze limitovaný počet má onkogenní potenciál
Vybrané podtypy HPV jsou asociovány s dlaždicobuněčným karcinomem, adenokarcinomem, dysplazií cervixu penisu, anu, vaginy, a vulvy.
HPV je detekován v 95% až 100% vzorků cervikálního karcinomu ->
a stal se tak „nutnou příčinou“ nádorů děložního hrdla.

Ženy s vyšším počtem kopií HPV viru v cervikální tkáni více rizikové (**marker dávky**).

Virapap (OR, **6.3**; 95% CI, 3.4-11.6)

Southernův přenos (OR, **16.3**; CI 7.7-34.4)

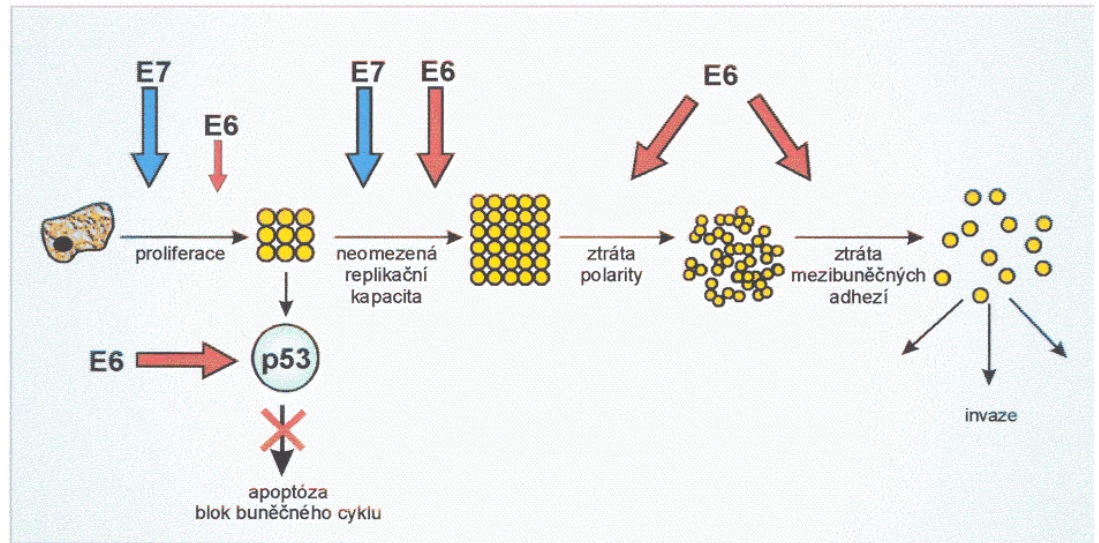
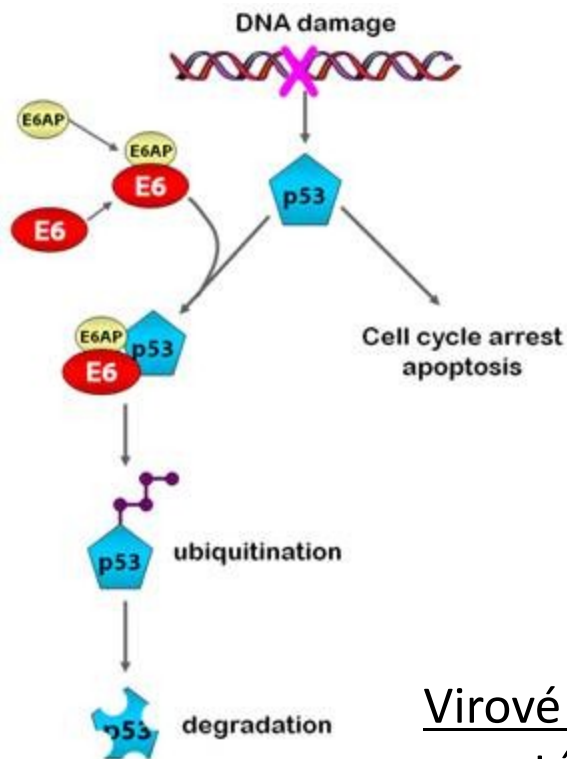
PCR (OR, **24.3**; CI, 14.4-41.0)



Nutnost citlivých molekulárně biologických metod!!!!

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery expozice – Příklad HPV a karcinomu děložního hrdla



Virové onkoproteiny E6, E7: stimulují proliferaci, inhibují apoptózu, zvyšují replikační potenciál, mění morfologii buněk, indukují maligní fenotyp

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery biologicky účinné dávky - somatické mutace

Ultrafialové záření indukuje mutace p53 a nádory kůže

Klasická epidemiologie již dávno asociovala sluneční záření z nádory kůže, molekulární epidemiologie identifikovala specifické vlnové délky slunečního záření, které jsou karcinogenní (290-320 nm – UVB) a vedou k mutacím nádorového supresoru p53



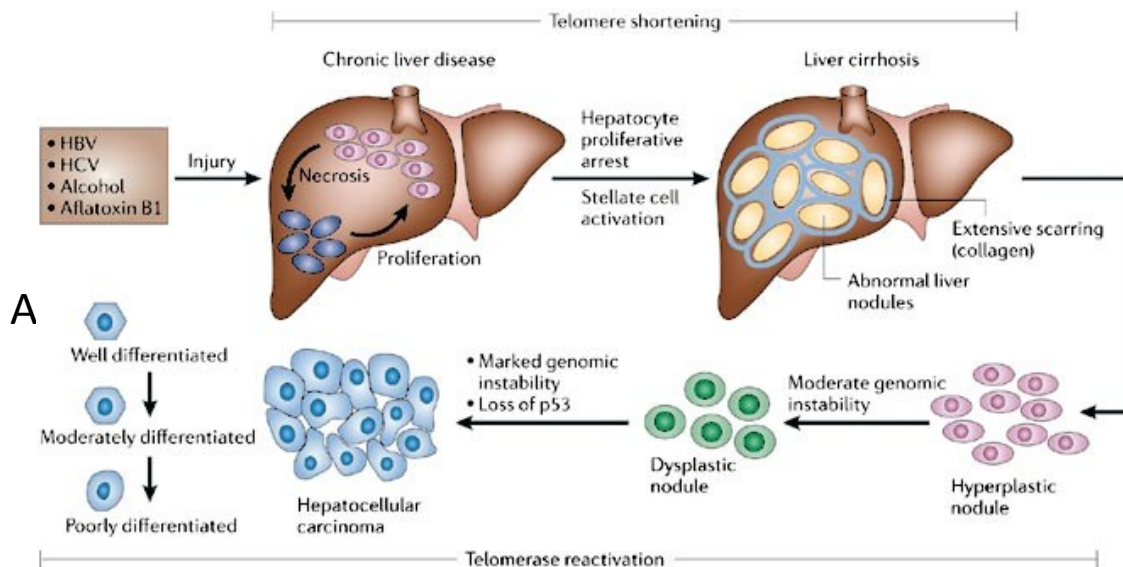
Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery biologicky účinné dávky - somatické mutace

Aflatoxin, hepatitidy a hepatocelulární karcinom

Nejrizikovější faktory pro hepatocelulární karcinom jsou expozice aflatoxinu, hepatitida B nebo C a alkohol. Aflatoxin je mykotoxin objevující se v kontaminovaných potravinách jako jsou ořechy, buráky, kukuřice a další. Aflatoxin tvoří adukty s DNA v moči a séru, které slouží jako biomarkery biologicky účinné dávky v epidemiologických studiích. Prospektivní studie

ukazují, že se hladiny těchto komplexů zvyšují během rozvoje hepatocelulárního karcinomu.



Expozice aflatoxinu vede ke klasické transverzi G:C na T:A ve třetí bázi kodonu 249 p53.

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Somatické mutace v nádorovém supresoru p53

Carcinogen Exposure	Neoplasm	Mutation
Aflatoxin B ₁	Hepatocellular carcinoma	Codon 249 (AGG → AGT)
Sunlight	Skin carcinoma	Dipyrimidine mutations (CC → TT) on nontranscribed DNA strand
Tobacco smoke	Lung carcinoma	G:C → T:A mutations on non-transcribed DNA strand (frequently codons: 157, 248, and 273)
Tobacco and alcohol	Carcinoma of the head and neck	Increased frequency p53 mutations (especially codons 157 and 248)
Radon	Lung carcinoma	Codon 249 (AGG → ATG)
Vinyl chloride	Hepatic angiosarcoma	A:T → T:A transversions

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery vnímavosti (Zárodečné mutace, hereditární syndromy)

Penetrance popisuje podíl jednotlivců nést zvláštní variaci genu to také vyjádřit spojovanou vlastnost.

Geny s vysokou penetrancí = rodinné studie, geny s nízkou penetrancí = asociační studie

Germ-line mutace

Geny s vysokou penetrancí

Karcinom prsu (BRCA1, BRCA2, ATM-radiosensitivity, PTEN-Cowden syndrom, TP53-Li Fraumeni Syndrom)

Kolorektální karcinom

Lynchuv syndrom (MMR genes)
Mikrosatelitní nestabilita (MSH2, MLH1,...)

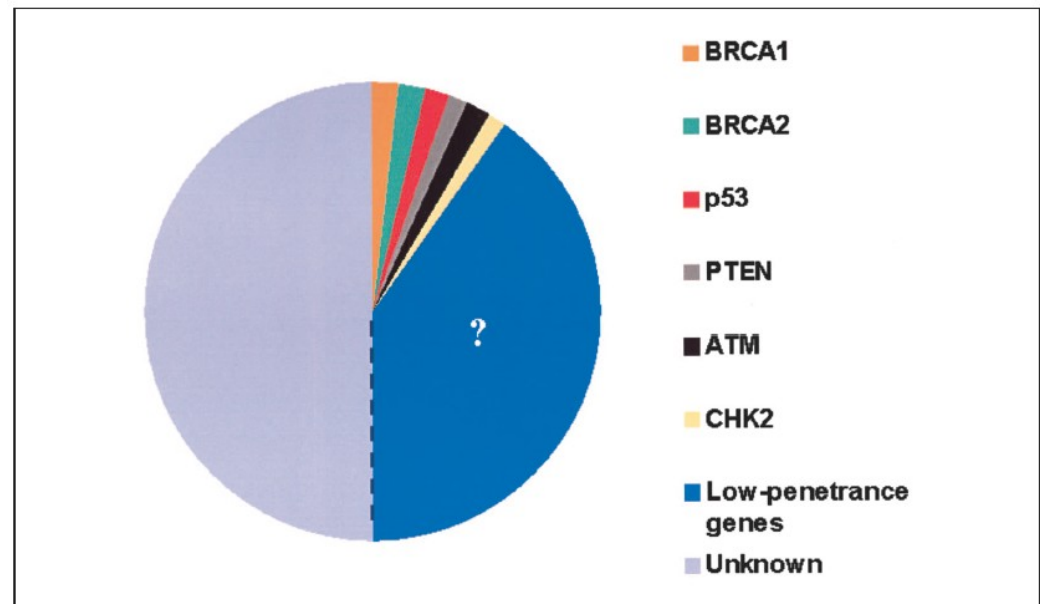


FIGURE 2 Proportion of Breast Cancer Attributable to Known and Unknown Germline Genetic Mutations.

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění

Markery vnímavosti (metabolismus karcinogenů, detoxifikační geny)

Téměř všechny karcingeny vyžadují aktivaci metabolickými enzymy

Zároveň existují detoxifikační enzymy, které umožňují jejich odbourávání

Při tepelné úpravě masa vznikají heterocyklické aminy a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH)

Např. heterocyklické aminy jsou metabolizovány

N-acetyltransferázou 2 (NAT2)

SNP v kódující sekvenci NAT2 vede k tvorbě proteinových variant dělicích bělošskou populaci

na pomalé acetylátory (55%, rychlé acetylátory 45%)

Pomalí acetylátoři konzumující velké množství červeného masa mají významně vyšší riziko CRC.

Take home

Epidemiologie, základní pojmy, kauzalita

Bradford Hillova kriteria kauzality

Faktory ovlivňující určení kauzality

Epidemiologické studie – dělení, přehled

Studie průřezové +příklad

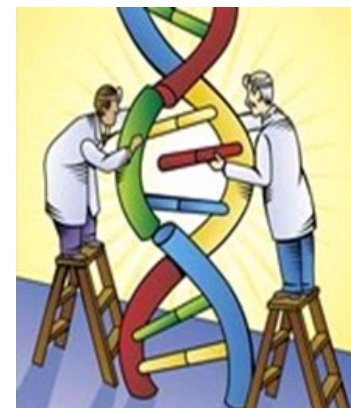
Studie případ-kontrola + příklad

Studie kohortové +příklad

Síla vztahu (asociace), statistické testování hypotéz

Definice molekulární epidemiologie (interakce molekulárních faktorů a prostředí)

Molekulární epidemiologie nádorových onemocnění (kategorie markerů)



Náplň příští přednášky

Molekulární farmakologie I – cílená léčba – vývoj nových léčiv = identifikace nových molekulárních cílů, vysokovýkonný screening, tkáňové kultury, transgenní zvířecí modely, poměr rizik a prospěchu, ekonomická a etická hlediska při výběru identifikovaných cílů a vývoji nových léčiv

Molekulární farmakologie II – principy biologické léčby – monoklonální protilátky – příprava monoklonálních protilátek a rekombinantních proteinů, nízkomolekulární inhibitory – racionální design léčiv, siRNA, mikroRNA – tlumení genové exprese na post-transkripční úrovni, transport léčiv (lipozomy, imunoglobuliny, nanočástice a supramolekulární systémy)

Dotazy?

