Thai Journal of Genetics 2009, 2(2) : 103–119

การวิเคราะห์อภิมานสำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์

อรนุช ประดิษฐ์ทรัพย์[1] มานพ พิทักษ์ภากร[1,2] นรินทร์ ศรีรัตนวิริยะกุล[2]
ศิษเฎศ ทองสิมา[3] และ อนันต์ชัย อัศวเมฆิน[1]*

[1] *หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย* [2]*หน่วยเวชพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700*

[3] *ห้องปฏิบัติการชีวสิถิติและสารสนเทศ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120*

**Corresponding author: anunchai_ice@yahoo.com*

บทคัดย่อ

การศึกษาทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ (genetic epidemiology) มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมกับการเกิดโรค นำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรคพันธุกรรม และพัฒนาวิธีการป้องกันและวิธีการรักษาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ปัจจุบันการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม ทำนายความเสี่ยงการเกิดโรคที่มีความผิดปกติจากหลายยีน (multifactorial disease) นั้นยังไม่มีประสิทธิภาพมากนัก เนื่องจากงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ในเรื่องเดียวกันมีความไม่สอดคล้องกันของผลการศึกษา จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้วิจารณญาณในการนำข้อมูลดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรค การนำศาสตร์ที่เรียกว่า การวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) มาช่วยหาข้อสรุปในงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ที่มีคำถามงานวิจัยเหมือนกันอย่างเป็นระบบ จะทำให้ผลการศึกษามีความน่าเชื่อถือมากขึ้น บทความนี้ได้นำเสนอขั้นตอนการวิเคราะห์อภิมานสำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ หลักทางสถิติที่ใช้ ปัญหาที่พบในการวิเคราะห์อภิมาน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพันธุศาสตร์ของโรคที่มีความผิดปกติจากหลายยีนต่อไป

บทนำ

ระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ เป็นการศึกษารูปแบบการกระจายของโรคทางพันธุกรรม และปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรค โดยมีเป้าหมายสำคัญเพื่อลดอุบัติการณ์ของโรค และนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรค โดยทั่วไป สามารถแบ่งโรคทางพันธุกรรมออกเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ โรคที่มีความผิดปกติจากยีนเดียว (monogenic disease) และโรคที่มีความผิดปกติจากหลายยีน (multifactorial disease) ซึ่งโรคที่มีความผิดปกติจากยีนเดียว พบได้ไม่บ่อยนัก โดยทั่วไปพบต่ำกว่าร้อยละ 0.05 ของประชากร และมีรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ชัดเจน เช่น autosomal dominant, autosomal recessive หรือ รูปแบบที่มีโครโมโซมเพศ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น X-linked เป็นต้น ส่งผลให้การตรวจทางพันธุกรรมของโรคยีนเดียวนั้น เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในเรื่องของการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรค (genetic testing) ของสมาชิกในครอบครัว การตอบสนองจากการใช้ยา และการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ในขณะที่โรคพันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัยซับซ้อน (common complex genetic disease) ซึ่งพบได้บ่อยกว่า เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคหืด โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ออทิสติก เป็นต้น มีความเกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน (polygenic disease) และมีปฏิสัมพันธ์กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมด้วย ทำให้การประเมินความเสี่ยงมีความซับซ้อนมากกว่า ในปัจจุบันการศึกษาทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ มุ่งเน้นการค้นหายีนที่ส่งผลต่อความโน้มเอียงในการเกิดโรค (susceptibility gene) โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทาง

พันธุกรรมกับการเกิดโรคพันธุกรรมที่เกิดจากหลายปัจจัยซับซ้อน

การศึกษาทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ ในการตรวจสอบยีนที่เป็นสาเหตุ หรือส่งผลถึงความโน้มเอียงต่อการเกิดโรค มักเป็นการศึกษาในรูปแบบงานวิจัยแบบการเปรียบเทียบ ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกและกลุ่มควบคุม (case-control study) ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ของพอลิมอร์ฟิซึมทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ที่ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสในหนึ่งตำแหน่งที่เรียกว่า สนิป (single nucleotide polymorphisms, SNP) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิก (case) ที่สนใจเทียบกับกลุ่มควบคุม การเปรียบเทียบลักษณะนี้เรียกว่า การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่มีผลต่อโรคจากกลุ่มผู้ป่วย และกลุ่มควบคุมในระดับประชากร (population-based case-control genetic association study) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ เป็นการศึกษาความแตกต่างของสนิปบนยีนที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรคโดยตรง (candidate gene association study) ซึ่งงานวิจัยชนิดนี้ จะต้องมีความรู้พื้นฐานทางอณูชีววิทยา ที่เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรค หรือการตอบสนองต่อยาเป็นอย่างดี โดยเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสนิป ในกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษากับกลุ่มควบคุม ในกรณีที่มีสนิปหลายตำแหน่ง ในยีนที่สนใจทำการศึกษา จะจัดกลุ่มสนิปที่เป็นตัวแทนให้เป็นแฮโพลไทป์ (haplotype) เพื่อใช้ทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในกลุ่มประชากร ส่วนงานวิจัยอีกแบบหนึ่งเป็นการศึกษาสนิปที่กระจายตัวทั่วจีโนม (genome-wide association study) ซึ่งเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิป กับลักษณะทางคลินิกบางอย่าง เช่น การหายีนก่อโรค โดยเปรียบเทียบความถี่แอลลีลของสนิป ที่กระจายตัวทั่วจีโนมในกลุ่มทดลอง ที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม หากพบความแตกต่างของสนิปในบริเวณใดบนจีโนม ก็สามารถบอกได้ว่าในบริเวณที่พบความแตกต่างดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ศึกษา โดยงานวิจัยดังกล่าว ไม่จำเป็นต้องมีความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาของลักษณะทางคลินิกที่ต้องการศึกษา อย่างไรก็ดี งานวิจัยแบบ case-control study ดังกล่าวยังมีข้อควรพิจารณาอีกมาก เช่น ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง การเลือกใช้สนิปที่เป็นตัวแทน (tag-SNP) หรือการอ้างอิงความถี่ของสนิปในประชากรต่างเผ่าพันธุ์ในงานวิจัย โดยไม่ยืนยันความถี่ของสนิปในประชากรที่ศึกษา และการเลือกใช้สนิปที่เป็นตัวแทนที่มีความถี่น้อยเกินไปในการจัดชุดของแฮโพลไทป์ ข้อพิจารณาเหล่านี้ล้วนแต่ทำให้ผลของการศึกษาแตกต่างกันและมีความแม่นยำลดลง

ปัจจุบันการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม ทำนายความเสี่ยงการเกิดโรคที่มีความผิดปกติจากหลายยีนนั้น ยังไม่มีประสิทธิภาพมากนัก สาเหตุหนึ่งเกิดจากความไม่สอดคล้องกันของผลการศึกษา ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้ให้ผลตรงกันหรือขัดแย้งกัน ขึ้นอยู่กับความโน้มเอียงของปัจจัยทางพันธุกรรม ที่อาจจะไม่เหมือนกันในแต่ละเชื้อชาติและข้อจำกัดอื่นๆ เช่น จำนวนตัวอย่าง คุณภาพของงานวิจัย การควบคุมตัวกวนและชาติพันธุ์ เป็นต้น ดังนั้น ถ้าสามารถระบุได้ว่ามียีนใดบ้างที่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรค และยีนใดเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมากที่สุด จะทำให้การค้นคว้าวิจัยเพื่อหาวิธีในการรักษาโรคนั้นทำได้สะดวกและรวดเร็ว และมีโอกาสประสบความสำเร็จมากขึ้น (เพราะสามารถลดจำนวนยีนที่จะศึกษา โดยศึกษาจากยีนที่มีความเสี่ยงสูงสุดก่อน) จึงมีการนำศาสตร์ที่เรียกว่า การวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) ซึ่งเป็นการวิจัยเชิงปริมาณที่อาศัยวิธีทางสถิติ เพื่อหาผลสรุปจากหลายงานวิจัยที่มีคำถามงานวิจัยเหมือนกันอย่างเป็นระบบ การวิเคราะห์อภิมานช่วยเพิ่มศักยภาพในการอธิบาย และสรุปความไม่สอดคล้องกันของงานวิจัยต่างๆ ทำให้ได้ข้อสรุปที่น่าเชื่อถือมากขึ้น การวิเคราะห์อภิมานสำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ (Thakkinstian *et al*., 2005) เริ่มเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น และมีการจัดเก็บรวบรวมข้อสรุปจากการวิเคราะห์อภิมานไว้ในระบบฐานข้อมูล คือ The Human Genome Epidemiology Network หรือเรียกย่อๆ ว่า HuGENet (HuGENavigator) โดย

เครือข่ายดังกล่าว ได้เปิดให้ใช้บริการการสืบค้นข้อมูลการวิเคราะห์อภิมานผ่านอินเตอร์เน็ตที่ http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/default.html ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำเอาข้อสรุปดังกล่าวไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไป บทความนี้เสนอขั้นตอนของการวิเคราะห์อภิมานสำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ สถิติที่ใช้ และปัญหาที่พบในการวิเคราะห์อภิมาน

ขั้นตอนการวิเคราะห์อภิมานสำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์

การวิเคราะห์อภิมานประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ (Thakkinstian *et al*., 2005, Minelli *et al*., 2008) คือ

1. การรวบรวมงานวิจัยอย่างเป็นระบบ (systematic review)

1.1 การกำหนดคำถามงานวิจัยที่ต้องการได้ข้อสรุป ซึ่งต้องเป็นคำถามที่มีการทำวิจัยมาแล้วเป็นจำนวนมากพอสมควร และเป็นคำถามที่ยังไม่ได้คำตอบสรุปแน่ชัด จากนั้นสิ่งที่สำคัญที่สุดคือการสืบค้นงานวิจัยที่ศึกษาปัญหาเดียวกันจากแหล่งสืบค้นข้อมูลต่างๆ ให้ได้ครบถ้วนมากที่สุดอย่างเป็นระบบ โดยค้นหาทั้งข้อมูลที่ตีพิมพ์แล้ว และยังไม่ได้ตีพิมพ์ เพื่อลดอคติจากการตีพิมพ์ (publication bias) เช่น การสืบค้นจากฐานข้อมูลสาธารณะ Embase (http://www.embase.com/) หรือ PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) หรือ HuGENet (http://www.hugenavigator.net/) ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่ได้รวบรวมงานวิจัยเป็นหมวดหมู่ทั้งตามชนิดยีนและชนิดโรคพันธุกรรม ทำให้สะดวกในการสืบค้นงานวิจัยมากขึ้น

1.2 กำหนดเกณฑ์การรับเข้าหรือคัดออกของข้อมูล (inclusion and exclusion criteria) เพื่อจะได้ตรวจสอบว่าผู้รายงานได้ทำตามขั้นตอนอย่างถูกต้อง สมบูรณ์ และปราศจากอคติ ในขั้นตอนต่างๆ ของงานวิจัย การคัดเลือกงานวิจัยที่จะนำมาวิเคราะห์อภิมาน จะใช้ผู้ประเมินอย่างน้อย 2 คนในการคัดเลือก กลั่นกรองข้อมูล และประเมินคุณภาพของงานวิจัยที่จะนำมาวิเคราะห์ และถ้าเป็นไปได้ควรเลือกงานวิจัยมาไม่น้อยกว่า 10 เรื่อง

1.3 การระบุ จำแนก ตรวจสอบลงรหัสงานวิจัย (data extraction) เป็นขั้นตอนการปรับข้อมูลให้เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ โดยพิจารณาทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อหาการวิจัย และวิธีการวิจัย ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์อภิมานจะครอบคลุมข้อมูลต่างๆ เช่น ปีที่ทำวิจัย ประเภทของการวิจัย (เป็นวิทยานิพนธ์/ รายงานวิจัย) ประชากร ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง เป็นต้น

1.4 การประเมินคุณภาพของงานวิจัย (quality score assessment) คุณภาพของแต่ละงานได้รับการประเมินในรูปแบบของการให้คะแนนโดยผู้ประเมิน 2 คนเดิมเช่นกัน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้งานวิเคราะห์อภิมานมีความสมเหตุสมผลและเชื่อถือได้หรือไม่ ซึ่งการประเมินคุณภาพของงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์นี้ จะให้คะแนนงานตามคำแนะนำของ STREGA statement (Little *et al*., 2009) ซึ่งจำแนกได้ดังรายการต่อไปนี้

• Selection bias หมายถึงการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบอย่างไม่ยุติธรรมในกลุ่มคนที่เป็นโรคและคนปกติ เช่น การเลือกผู้ป่วยมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับผลการรักษาไม่สอดคล้องกัน ทำให้มีผลกระทบต่อผลของการทดลอง

• Information bias หมายถึงการวัดค่าของข้อมูลที่ได้ก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็น ความผิดพลาดที่เกิดจากขั้นตอนการวัดค่าภาวะที่สนใจว่าจะทำให้เกิดอะไรบางอย่าง (exposure) หรือ การวัดผลที่เกิดขึ้นที่สนใจหรือการเป็นโรคที่ไม่ยุติธรรม ซึ่งอาจเกิดจากขาดการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการทำจีโนไทป์ เช่น การตรวจสอบความถูกต้องของจีโนไทป์ด้วยการทำซ้ำอีกครั้ง หรือใช้เทคนิคอื่นในการทำจีโนไทป์ ขาดการทำปกปิดที่มาของข้อมูล (blinding) ของเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการ แพทย์ที่เข้าร่วม และนักวิจัย รวมทั้งการจำแนกลักษณะทางคลินิกที่สนใจไม่ถูกต้อง (phenotype misclassification) เนื่องจากมีเกณฑ์ที่ไม่เหมาะสม และมีการประเมินลักษณะที่สนใจกับสิ่งแวดล้อมไม่ถูกต้อง เป็นต้น

• Confounder เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้การวิเคราะห์ของแต่ละกลุ่มไม่สอดคล้องกัน ตัวอย่างของ confounder ที่สำคัญ คือ ข้อมูลจาก population stratification เนื่องจากความถี่ของแอลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรย่อย (sub-population) และการปนกันของข้อมูลทางพันธุกรรมของหลายเชื้อชาติเข้าด้วยกัน ส่งผลให้เกิดความสับสนของผลสรุปในงานศึกษาด้านระบาดวิทยาพันธุศาสตร์

• อคติจากการตีพิมพ์ วารสารส่วนใหญ่มักเลือกงานวิจัยที่ได้ผลดีมาตีพิมพ์ ดังนั้นอาจทำให้เกิดอคติได้ อาจแก้ปัญหาโดยรวมเอางานที่ไม่ได้ตีพิมพ์หรืองานวิจัยที่ตีพิมพ์ในระดับท้องถิ่น มาวิเคราะห์รวมด้วย

• Selective outcome and analysis reporting bias เกิดจากการที่คณะผู้วิจัยรายงานผลเพียงบางส่วนของที่ทำทั้งหมด และมักจะเป็นส่วนที่ให้ผลวิเคราะห์ที่เป็นบวกซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างน้อย 1 แบบมากกว่าที่จะรายงายผลที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีจำนวนมากกว่า

1.5 การสร้างค่าขนาดอิทธิพล (effect size) เนื่องจากงานวิจัยที่นำมาวิเคราะห์อภิมานมีแบบแผนการวิจัยที่ต่างกัน ศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่แตกต่างกันออกไป เช่น เชื้อชาติ อายุ เพศ เป็นต้น การวิเคราะห์ค่าสถิติด้วยวิธีการต่างกัน จึงทำให้ค่าสถิติจากงานวิจัยแต่ละเรื่องแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ดังนั้นผู้สังเคราะห์จึงต้องนำค่าสถิติเหล่านั้นมาเปลี่ยนแปลงเป็นหน่วยมาตรฐานเดียวกัน หรือสร้างดัชนีมาตรฐานจากงานวิจัยต่างๆ เสียก่อน เนื่องจากงานระบาดวิทยาพันธุศาสตร์นั้น เป็นการศึกษาว่าการมีความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคหรือไม่ ดังนั้น งานวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้ จะรวบรวมกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมมาจำนวนหนึ่ง แล้วตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมของแต่ละคน เพื่อแบ่งเป็นกลุ่มในการคำนวณ ค่าขนาดอิทธิพลแบ่งได้เป็นหลายประเภท แต่ที่นิยมนำมาใช้ในงานระบาดวิทยาพันธุศาสตร์นั้น มี 2 ประเภท คือ odds ratio (OR) และ relative risk (RR)

2. การวิเคราะห์อภิมาน

2.1 ตรวจสอบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎความสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy- Weinberg Equilibrium; HWE) (Minelli et al., 2008)

การตรวจสอบนี้จะทำเฉพาะในกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจสอบว่ากลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นเป็นไปตามกฎของ ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก หรือไม่ เนื่องจากว่าการเบี่ยงเบนจากสัดส่วนที่คาดหมายจากกฎ แสดงให้เห็นถึงการเกิดการกลายพันธุ์ในแอลลีลของสนิปยังไม่เข้าสู่สมดุล (นั่นคือความถี่ของแอลลีลยังไม่คงที่) หรืออาจมีความผิดพลาดเกิดขึ้นระหว่างการตรวจสอบจีโนไทป์ในห้องทดลอง หรืออาจบอกได้ว่ากลุ่มประชากรที่ศึกษานั้นมี population stratification (Cardon and Palmer, 2003) นอกจากนี้ยังอาจสะท้อนว่า ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่จะมาเป็นกลุ่มควบคุมนั้น มีความลำเอียงเกิดขึ้น การที่ไม่ตรวจสอบฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในกลุ่มที่ป่วยเป็นโรค เนื่องจากว่า มีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดการคัดเลือกไว้ของแอลลีลต่างๆ กับลักษณะทางคลินิกที่สนใจ และทำให้สัดส่วนของคนที่มีจีโนไทป์ต่างๆ แตกต่างจากสัดส่วนที่ควรจะเป็น ดังนั้นตัวอย่างในกลุ่มผู้ป่วย นั้นย่อมมีแนวโน้มสูงที่จะไม่เป็นไปตาม HWE (Thakkinstian *et al*., 2005)

สถิติที่ใช้ในการตรวจสอบ HWE คือ การทดสอบไค-สแควร์ (χ^2 test) เป็นการทดสอบทางสถิติถึงความเหมือนของสิ่งที่เกิดขึ้นในความเป็นจริงว่าผลออกมาใกล้เคียงกับสิ่งที่คาดหวังมากน้อยเท่าใด ยกตัวอย่างเช่น สมมติต้องการทอดลูกเต๋า 60 ครั้งแล้วนับจำนวนครั้งที่ลูกเต๋าหงายหน้า 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 แล้วบันทึกลงในตาราง ย่อมเป็นที่แน่นอนว่าโอกาสที่ลูกเต๋าจะหงายขึ้นหน้าต่างๆ (1-6) นั้นมีเท่ากัน ซึ่งในที่นี้ คือ 10 ครั้ง (นี่คือสิ่งที่คาดหวังหรือที่เรียกว่า expected frequency) แต่เมื่อทดลองทอดลูกเต๋าจริงๆ แล้ว จะพบว่าจำนวนครั้งที่ลูกเต๋าหงายหน้าแต่ละหน้านั้น (observed frequency) ไม่เท่ากันในความเป็นจริง โดยต้องใช้ null hypothesis (H_0) และ alternative hypothesis (H_1) ในกรณีนี้สมมติฐาน H_0 คือ ลูกเต๋าไม่มีความแตกต่างระหว่าง observed และ

expected frequency อย่างมีนัยสำคัญ หรือ อีกนัยหนึ่งก็คือ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการทดลอง กับสิ่งที่คาดหวังตามทฤษฎีนั้น เกิดขึ้นด้วยความบังเอิญ ส่วนสมมติฐาน H_1 คือ ลูกเต๋ามีความแตกต่างระหว่าง observed และ expected frequency อย่างมีนัยสำคัญ หรืออีกนัยหนึ่งคือมีอะไรบางอย่างนอกเหนือจากความบังเอิญ ที่ทำให้ผลที่ได้แตกต่างจากค่าที่คาดหวังไว้ จากนั้นจึงกำหนดเกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินใจ (confidence) ว่าจะยอมรับสมมติฐาน H_0 หรือจะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 โดยปกติแล้วการทดสอบทางสถิติจะใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ซึ่งหมายความว่าโอกาสที่จะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 โดยแท้จริงแล้วสมมติฐาน H_0 ถูกต้องนั้นมีเพียง 5% (ถือว่าน้อยค่อนข้างมั่นใจว่า ถ้าปฏิเสธสมมติฐาน H_0 แล้วการปฏิเสธนั้นถือว่าทำถูกต้องแล้ว) ในที่นี้จะใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เช่นกัน

ถ้าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีการกระจายตัวของจีโนไทป์เป็นไปตาม HWE ก็นำไปรวมกับงานวิจัยอื่นได้ แต่หากพบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่สอดคล้องตาม HWE ในกลุ่มควบคุมนั้นจะสามารถนำมารวมในการทำวิเคราะห์อภิมานได้หรือไม่ ยังเป็นเรื่องที่มีการถกเถียงกันอยู่ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ผู้วิเคราะห์อภิมานพึงกระทำคือ ทำการวิเคราะห์อภิมานสองครั้ง โดยครั้งแรกให้รวมงานดังกล่าวในการวิเคราะห์ ส่วนอีกครั้งไม่นำมารวม แล้วดูผลสรุป (pooled effect size) ที่ออกมา ถ้าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันทั้งสองครั้ง นั่นหมายความว่าข้อมูลที่ได้มาค่อนข้างแน่นอน แต่หากค่าที่ได้จากการวิเคราะห์อภิมานทั้งสองครั้งนั้นแตกต่างกันพอสมควร ค่าที่ได้จากการทำวิเคราะห์อภิมานโดยคิดเฉพาะงานวิจัยที่สอดคล้องตาม HWE นั้นน่าเชื่อถือมากกว่า

2.2 ตรวจสอบความหลากหลายของงานวิจัยที่นำมาวิเคราะห์ (heterogeneity)

งานที่ศึกษาปัญหาเดียวกัน โดยกลุ่มคนที่แตกต่างกันไปในเวลาที่ต่างกัน กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาย่อมแตกต่างกัน การรวมข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์อภิมานนั้น ข้อมูลจะต้องมีตัวแปรที่เหมือนกัน จึงจะสามารถรวมเข้ากันได้ ตัวแปรเหล่านี้ เช่น เพศ อายุ รวมทั้งเทคนิคหรือระเบียบวิธีในการทำวิจัย เป็นต้น ทั้งกลุ่มตัวอย่าง และวิธีการในการทำวิจัยที่แตกต่างกันนี้ จะส่งผลให้ผลสรุปที่ได้แตกต่างกันในแต่ละการศึกษา จนบางครั้งอาจแตกต่างกันมาก จนเหมือนกับไม่ได้ศึกษาในเรื่องเดียว และทำให้เกิดความหลากหลาย (heterogeneity) ระหว่างงานได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง population stratification เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความหลากหลายในงานระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ เนื่องจากความถี่ของแอลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรย่อย และการปนกันของข้อมูลทางพันธุกรรมของหลายเชื้อชาติเข้าด้วยกัน ส่งผลให้เกิดความสับสนของผลสรุปในงานศึกษาด้านระบาดวิทยาพันธุศาสตร์

การตรวจสอบความหลากหลาย นั้นทำได้หลายวิธี คือ χ^2 test, Q-test และ I^2 test แต่วิธีที่นิยมทำคือ Q-test และ χ^2 test โดยสำหรับ χ^2 test จะตั้งสมมติฐาน H_0 คือกลุ่มตัวอย่างถูกเลือกมาจากประชากรกลุ่มเดียวกัน (นั่นคือไม่มีความหลากหลายระหว่างงานแต่ละงาน) ส่วนสมมติฐาน H_1 คือกลุ่มตัวอย่างถูกเลือกมาจากประชากรคนละกลุ่มกัน (นั่นคือมีความหลากหลายระหว่างงานแต่ละงาน) แต่เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินใจว่าจะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 จะทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 90% แทน เนื่องจากการทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายนั้นมีความสามารถในการพบความหลากหลายได้ค่อนข้างต่ำ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมมากที่สุดในการตรวจสอบความหลากหลายคือ Q-test ซึ่งเป็นการหา Q statistics ของ odds ratio (OR) ของจีโนไทป์ทีละคู่ ก่อนอื่นจะต้องทบทวนก่อนว่า ข้อมูลที่มีนั้นประกอบด้วยจีโนไทป์ 3 แบบ ตัวอย่างการทำ Q-test เช่น ถ้าให้ยีนใดๆ มีแอลลีลได้ 2 แบบ ให้ G เป็นแอลลีลไวด์ไทป์ ส่วน A เป็นแอลลีลเสี่ยง หรือแอลลีลกลาย จะนิยาม OR1 คือ OR ของ AA เทียบกับ GG, OR2 คือ OR ของ AG เทียบกับ GG และ OR 3 คือ OR ของ AA เทียบกับ AG การทำ Q-test นั้นคือการหาค่า Q statistics ของทั้ง OR1, OR2 และ OR3

แล้วแทนค่าลงไปในสูตร โดยใช้เกณฑ์ในการตัดสินว่าจะยอมรับหรือปฏิเสธ null hypothesis เหมือนกับ chi-square test ส่วนค่า I^2 นั้นคิดจาก [Q-(number of studies – 1)]/Q โดยมีค่าระหว่าง 0% ถึง 100% ถ้ามีค่าตั้งแต่ 50% ขึ้นไปจะถือว่า มีความหลากหลายระหว่างงานที่นำมาวิเคราะห์อภิมาน (Thakkinstian *et al*., 2005; Minelli *et al*., 2008)

ถ้าไม่มีความหลากหลายระหว่างงานวิจัยที่นำมาวิเคราะห์อภิมาน สามารถดำเนินการต่อเพื่อหา pooled OR ได้ทันที แต่หากพบว่ามีความหลากหลายระหว่างงานวิจัยที่นำมาวิเคราะห์ สิ่งที่ผู้วิเคราะห์อภิมานจะต้องทำคือ หาสาเหตุที่ทำให้เกิดความหลากหลาย วิธีการหาสาเหตุนั้น ทำได้โดยการกลับไปดูข้อมูลที่ได้ทำไว้ในขั้นตอนของ systematic review แล้วลองดูว่าสามารถแบ่งงานวิจัยทั้งหมดออกเป็นสองกลุ่มได้หรือไม่ ถ้าได้ก็แบ่งทำ subgroup analysis แต่ในกลุ่มย่อยก็ยังต้องตรวจสอบความหลากหลายด้วย จะเห็นว่าข้อมูลที่ถูกดึงออกมาจากงานวิจัยแต่ละงานวิจัย แล้วมาใส่ตารางนั้น มีความสำคัญมากในการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนั้นการทบทวนวรรณกรรมทั้งหมด และการสกัดข้อมูลนั้น จำเป็นต้องทำด้วยความละเอียดรอบคอบ เพราะอาจพบสาเหตุของความหลากหลายได้จากข้อมูลในตารางดังกล่าว ถ้าพบว่ากลุ่มหนึ่งยังคงมีความหลากหลาย แต่อีกกลุ่มหนึ่งไม่พบความหลากหลาย จะสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่ใช้เป็นตัวแบ่งงานวิจัยออกเป็นสองกลุ่มนี้ เป็นสาเหตุของการเกิดความหลากหลาย จากนั้นจะวิเคราะห์เฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีความหลากหลายต่อไป การวิเคราะห์เพื่อหาค่า pooled OR ในกลุ่มที่มีความหลากหลายนั้นจริงๆ แล้วสามารถทำได้ โดยสูตรทางสถิติที่ใช้นั้น จะแตกต่างออกไปจากการวิเคราะห์ในกลุ่มที่ไม่มีความหลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม ผลลัพธ์สุดท้ายที่ได้ (pooled OR) นั้นแทบจะไม่มีความหมายใดๆ และมักไม่น่าเชื่อถือพอที่จะใช้สรุปผลได้ ดังนั้นเมื่อมีการตรวจพบความหลากหลายแล้ว สิ่งที่สำคัญที่พึงกระทำนั้น ไม่ใช่การวิเคราะห์เพื่อให้ได้มาซึ่ง pooled OR แต่หากเป็นการตรวจหาสาเหตุของการเกิดความหลากหลาย

2.3 หารูปแบบทางพันธุกรรม (genetic model) ของความหลากหลายทางพันธุกรรม

ปกติแล้วการวิเคราะห์อภิมานเป็นการรวมงานวิจัย โดยที่แต่ละงานวิจัยนั้นเป็นการเปรียบเทียบระหว่างปัจจัยเสี่ยงเพียง 2 ปัจจัย เช่น ในการศึกษาเรื่องการสูบบุหรี่กับการเกิดมะเร็งปอด จะมีปัจจัยเสี่ยง 2 ปัจจัยคือ การสูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ แต่ในงานศึกษาด้านความสัมพันธ์ของโรคต่างๆ กับข้อมูลทางพันธุกรรมนั้น มีปัจจัยเสี่ยงอย่างน้อยถึง 3 ปัจจัย นั่นคือ ถ้ายีนหนึ่งมี ได้ 2 แบบคือ A และ a และมีจีโนไทป์ได้ 3 แบบ คือ AA, Aa และ aa หากต้องการคำนวณหาค่า pooled effect size จะต้องทำให้เหลือเพียง 2 ปัจจัยเสี่ยงเสียก่อน โดยเปลี่ยนจากจีโนไทป์เป็นการบ่งบอกถึงรูปแบบการแสดงออกของแอลลีลในยีนหนึ่งๆ ซึ่งก็คือการหา genetic model นั่นเอง genetic model นั้นมีอยู่ด้วยกัน 4 แบบซึ่งคือ dominant, recessive, co-dominant และ complete overdominant วิธีหา genetic model ที่ดีที่สุดคือ การหาค่า λ ซึ่งเป็นการคิดค่า pooled OR_{Aa} เทียบระหว่างจีโนไทป์ Aa กับ aa (ไวด์ไทป์ฮอโมไซกัส) หารด้วยค่า pooled OR_{AA} เทียบระหว่างจีโนไทป์ AA (มิวแทนต์ฮอโมไซกัส) กับ aa โดยถ้าค่า λ ที่คิดได้นั้นมีค่าเท่ากับ 0 ควรใช้ recessive model หากเท่ากับ 0.5 ควรใช้ co-dominance model หากได้ 1 ควรใช้ dominant model และถ้าได้มากกว่า 1 ควรใช้ complete overdominant model ในการยุบปัจจัยเสี่ยงจาก 3 ให้เหลือ 2 ปัจจัยเสี่ยงเพื่อให้สามารถคิดค่า pooled effect ได้ต่อไป (Minelli *et al*., 2005)

$$\lambda = \log OR_{Aa}/\log OR_{AA}$$

λ	**Genetic Model**
0	Recessive
0.5	Co-dominant
1	Dominant
>1	Complete overdominant

2.4 รวมผลที่ได้ในแต่ละงานเข้าด้วยกันโดยการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อให้ได้ pooled effect size

Pooled effect size หรือส่วนมากจะเป็น pooled odds ratio ซึ่งได้จาก ผลรวมของ OR ของแต่ละการศึกษาคูณกับน้ำหนักความถูกต้อง (weight) ของการศึกษานั้นๆ หารด้วยค่าน้ำหนักความถูกต้องรวมกันทั้งหมด ดังนี้

$$\text{pooled effect size} = \frac{\Sigma \text{ effect size} \times \text{weight}}{\Sigma \text{ weight}}$$

การทำงานวิจัยนั้นเป็นการศึกษาในกลุ่มคนที่สุ่มมาเพียงกลุ่มหนึ่ง ซึ่งกลุ่มคนเหล่านี้เปรียบเสมือนตัวแทนของประชากรทั้งหมด ดังนั้นค่า OR ที่คำนวณได้นั้นจึงเป็นเพียงค่า OR โดยประมาณของประชากรที่ศึกษา ในทางสถิติสิ่งที่เป็นดัชนีบอกความถูกต้องของค่าประมาณกับค่าจริงคือ confidence interval งานใดที่มีจำนวนตัวอย่างที่ศึกษามาก ค่า OR ที่ได้จากงานนั้นก็จะใกล้เคียงกับค่าความเป็นจริงมาก และยิ่งทำให้ 95% CI ของผลการทดลองนั้นแคบ ซึ่งก็หมายความว่าผลที่ได้จากการศึกษานั้นมีความน่าเชื่อถือมาก และงานดังกล่าวก็จะได้น้ำหนักความถูกต้องมากในการวิเคราะห์อภิมาน

น้ำหนักความถูกต้องนั้นคิดได้ด้วยกัน 2 วิธี ขึ้นอยู่กับว่าการศึกษาที่จะนำมารวมกันนั้นมีความหลากหลายหรือไม่ ถ้าไม่มีความหลากหลายจะรวมข้อมูลโดยใช้ fixed effect model แต่ถ้ามีความหลากหลายจะต้องใช้ random effect model โดยใน fixed effect model จะใช้หลักที่ว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในแต่ละการศึกษา ถูกเลือกมาจากประชากรกลุ่มเดียวกัน ดังนั้น จึงมีความหลากหลายแค่เพียงภายในแต่ละการศึกษา และค่า OR ที่ได้ในแต่ละการศึกษานั้นจะแกว่งไปมารอบๆ ค่าคงที่ค่าหนึ่ง (fixed value) ซึ่งค่านี้ก็คือ ค่า OR ของประชากรที่กลุ่มตัวอย่างถูกเลือกมา หรือก็คือ ค่า pooled OR ที่ได้หลังจากที่วิเคราะห์อภิมานนั่นเอง วิธีที่นิยมคิดมี 2 วิธีคือ Mantel-Heinszel method และ inverse variance method ส่วน random effect model นั้นเป็นการคิดน้ำหนักความถูกต้องโดยใช้หลักที่ว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในแต่ละการศึกษานั้น ไม่ได้มาจากประชากรกลุ่มเดียวกัน แต่เป็นส่วนหนึ่งของประชากรใหญ่กลุ่มหนึ่ง ดังนั้นค่า OR ที่ได้ในแต่ละการศึกษานั้นจะแกว่งไปมารอบๆ ค่า OR ของประชากรที่กลุ่มตัวอย่างนั้นถูกเลือกมา ซึ่งค่า OR นี้ไม่ใช่ค่า pooled OR ที่จะใช้ในการตีความในการวิเคราะห์อภิมาน แต่เป็นค่า OR ของประชากรกลุ่มใหญ่ในแต่ละประชากรนั้นถูกเลือกมาแบบสุ่ม (random effect model) หรือก็คือ ค่า OR เฉลี่ยของการศึกษาแต่ละงาน และแท้จริงแล้วแทบจะไม่มีความหมายอะไรเลย ดังนั้นเมื่อใดที่พบความหลากหลายสิ่งที่ควรทำนั้น ไม่ใช่การคำนวณเพื่อหา pooled OR เพราะแม้จะหาค่าออกมาได้ ก็ไม่สามารถใช้ในการตีความได้ แต่ที่ควรทำคือ หาสาเหตุของการเกิดความหลากหลาย แต่หากต้องการคำนวณน้ำหนักความถูกต้อง เพื่อหาค่า pooled OR วิธีที่นิยมทำคือ Dersimonion & Liard method ซึ่งสูตรที่ใช้คิดนั้นไม่เพียงคำนึงถึงความหลากหลายภายในการศึกษาแต่ละงาน แต่ยังคำนึงถึงความหลากหลายระหว่างงานวิจัยด้วย งานวิเคราะห์อภิมานจำนวนหนึ่งนิยมวิเคราะห์ทั้ง fixed และ random แล้วดูผลของค่า pooled OR ที่ได้จากทั้ง 2 โมเดล ถ้าค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกันนั่นหมายความว่าข้อมูลนั้นค่อนข้างมีความถูกต้องในการเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรนั้น (Thakkinstian *et al*., 2005)

2.5 การแปลความหมายของ forest plot และการสรุปผล

เมื่อคำนวณค่า pooled OR ได้แล้ว นำ OR ของแต่ละการศึกษาและ pooled OR มา plot ลงบน forest plot (Fig. 1) โดยใช้รูปสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดแทนค่า pooled OR จะสามารถสรุปผลได้ดังนี้ ถ้าสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดนั้นมีส่วนใดส่วนหนึ่งตัด (ค่าความเชื่อมั่นระดับ 95% ซึ่งครอบคลุม 1.00 ด้วย) เส้นแสดง OR = 1 (line of no effect) สรุปได้ว่า การมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงนั้นก็มีโอกาสในการเกิดโรคที่เท่ากัน แต่หากสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดนั้น ไม่มีส่วนใดส่วน

หนึ่งตัดเส้นตรงที่ใช้แบ่งการทดลองที่ส่งผลกระทบ (ทางขวามือ) และการทดลองที่ไม่ได้ส่งผลกระทบ (line of no effect) (95% ของความเชื่อมั่นซึ่งไม่ครอบคลุม 1.00) โดยถ้าสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดเอียงไปทางขวามือของ line of no effect (ค่า odds ratio > 1.00) สามารถสรุปได้ว่า คนที่มีปัจจัยเสี่ยงนั้นมีโอกาสในการเกิดโรคมากกว่าคนที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงเท่ากับค่า pooled OR เท่า แต่หากสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดเอียงไปทางซ้ายมือของ line of no effect (ค่า odds ratio < 1.00) สามารถสรุปได้ว่า คนที่มีปัจจัยเสี่ยงนั้นมีโอกาสในการเกิดโรคเป็น pooled OR เท่า (มีโอกาสเป็นโรคน้อยกว่า) ของคนที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยง การตรวจสอบอคติจากการตีพิมพ์ หมายถึงโอกาสที่ negative study จะได้รับการตีพิมพ์นั้นมีน้อยกว่า positive study ดังนั้นงานวิเคราะห์อภิมานที่รวบรวมผลจาก positive studiy เท่านั้นจึงมักจะให้ผลเอียงไปทางบวก (falsely skewed positive result) ซึ่งอาจมีค่าผิดไปจากค่าที่แท้จริง การตรวจสอบอคติจากการตีพิมพ์นั้น ทำได้ 2 วิธี วิธีแรกคือการใช้ graphical method โดยการสร้างกราฟระหว่าง effect size บนแกน y และ some measurement of precision เช่น ขนาดของตัวอย่าง หรือ standard error บนแกน x กราฟที่ได้นี้เรียกว่า funnel plot เนื่องจากงานที่ศึกษาจากตัวอย่างจำนวนน้อยนั้น ผลที่ได้จะมีการกระจายตัวค่อนข้างมาก (นั่นคือจุดต่างๆ ที่กระจายอยู่บนกราฟนั้นจะกระจายมาก) ในขณะที่งานที่ศึกษาจากตัวอย่างจำนวนมากนั้น ผลที่ได้จะมีการกระจายตัวที่น้อยกว่า (ดังนั้นเมื่อนำผลที่ได้มาพลอตบนกราฟจุดต่างๆ จะเกาะกลุ่มกันมากกว่า) ด้วยเหตุนี้ถ้าไม่มีอคติจากการตีพิมพ์ จะได้ funnel plot เป็นรูปสามเหลี่ยมที่สมมาตร แต่หากว่ารูปที่ได้นั้นไม่สมมาตรจะเป็นการบ่งบอกว่ามีอคติจากการตีพิมพ์ วิธีที่สองที่ใช้ในการตรวจสอบอคติจากการตีพิมพ์นั้น คือการใช้หลักทางสถิติในการตรวจสอบ โดยมีสถิติ 2 ชนิด

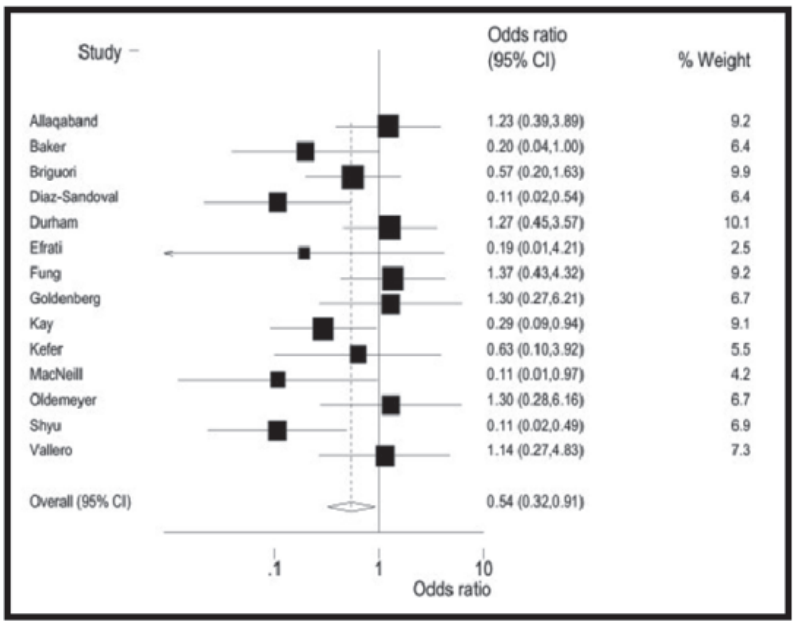
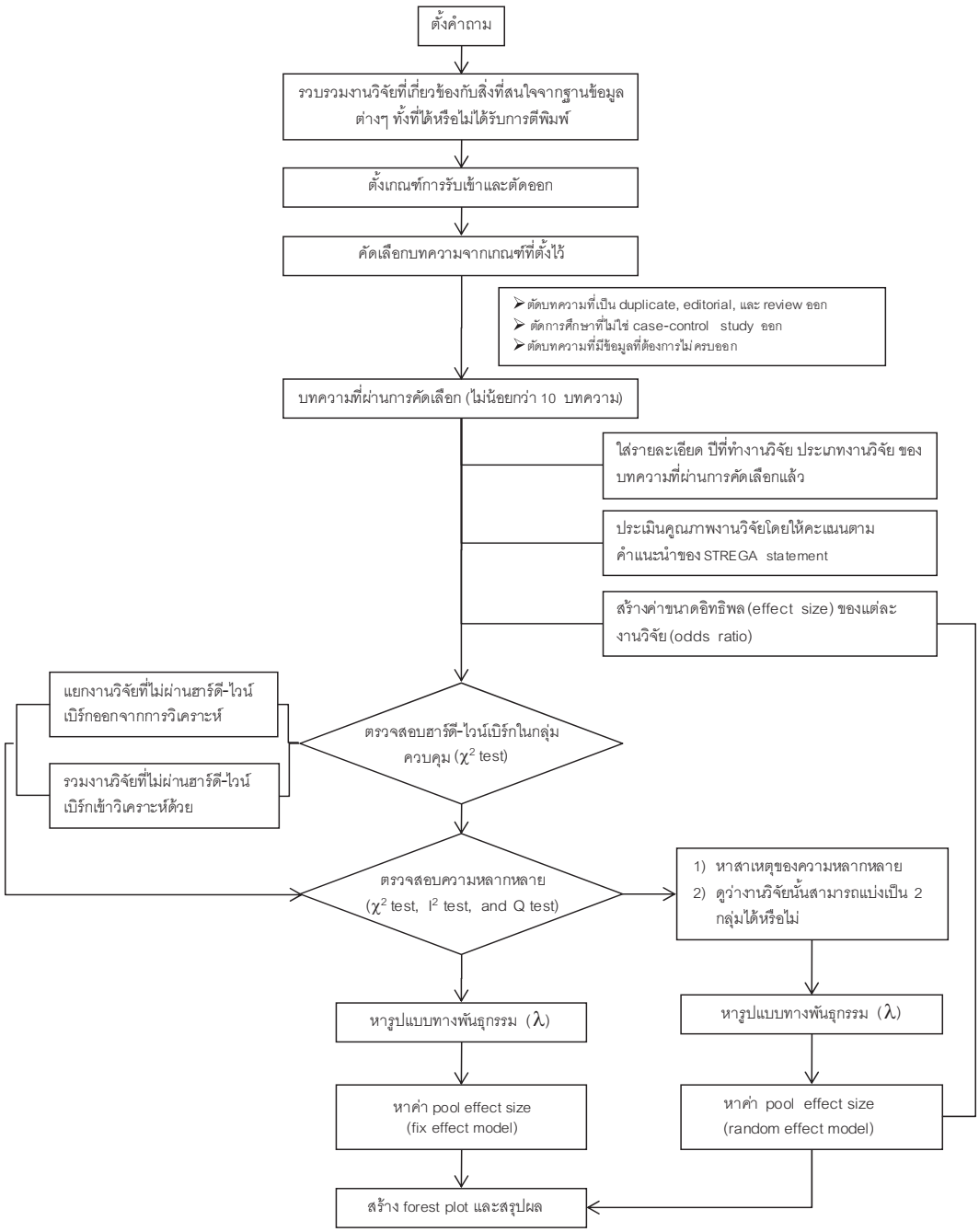


Figure 1 Forrest plot demonstrating OR, 95%Cl and weight from each study. Each black box represents OR of each study (the size of the box varied by weight). The extended lines to both sides of each box represent 95% CI (the shorter of the line refers the narrower of 95%CI and the greater of the weight). Diamond figure demonstrates pooled OR and 95%CI after analysis. Dashed line indicates pooled OR. Bold line (line of no effect) indicates OR = 1 meaning that the candidate polymorphism does not contain any effect on the disease pathogenesis.

หลักคือ Egger's test และ Begg's test ค่าสุดท้ายที่ได้จากการทดสอบนี้คือ ค่า *p*-value โดยถ้าค่า *p*-value ที่ได้นั้นมีค่าน้อยกว่า 0.05 (ในกรณีที่ทดสอบที่ค่าความเชื่อมั่น 95%) แสดงว่ามีอคติจากการตีพิมพ์ (Thakkinstian *et al*., 2005)

จากขั้นตอนการวิเคราะห์อภิมาน สำหรับงานวิจัยทางระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ทั้งหมดที่ได้กล่าวมาแล้ว สามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังต่อไปนี้

แผนภาพขั้นตอนการวิเคราะห์อภิมาน



ตัวอย่างการวิเคราะห์อภิมานงานวิจัยสำหรับงานด้านระบาดวิทยาพันธุศาสตร์

การวิเคราะห์อภิมานงานวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน PDCD1 ต่อการเกิดโรคลูปัส (SLE) ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 2 ขั้น ก็คือการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ และการวิเคราะห์อภิมาน

1. การรวบรวมงานวิจัยอย่างเป็นระบบ

1.1 คำถามที่สนใจและต้องการหาข้อสรุป คือ บุคคลที่มีพอลิมอร์ฟิซึมของยีน PDCD1 มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรค SLE มากกว่าบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความหลากหลายของยีนนี้หรือไม่ ดังนั้น ต้องสืบค้นหาบทความงานวิจัย ที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PDCD1 และโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรค SLE จากแหล่งสืบค้นข้อมูลต่างๆ ได้แก่ HuGENet, PubMed และ Embase แล้วเลือกโรค SLE และ ยีน PDCD1 เป็นคำสำคัญ พบว่ามีงานที่เกี่ยวข้องกับ ยีน PDCD1 และ/หรือ SLE ทั้งหมด 16 งาน (Prokunina *et al*., 2002; Ferreiros-Vidal *et al*., 2004; Lin *et al*., 2004; Sanghera *et al*., 2004; James *et al*., 2005; Johansson *et al*., 2005; Reddy *et al*., 2005; Wang *et al*., 2006; Abelson *et al*., 2007; Thorburn *et al*., 2007; Velazquez-Cruz *et al*., 2007; Miyagawa *et al*., 2008; Mostowska *et al*., 2008; Tsai *et al*., 2008; Wang *et al*., 2008; Bertsias *et al*., 2009)

1.2 กำหนดเกณฑ์การรับเข้าหรือคัดออกทุกๆ บทความงานวิจัย ที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PDCD1 และโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรค SLE ที่เป็นไปตามเกณฑ์ต่อไปนี้ จะถูกเลือกนำมาวิเคราะห์อภิมาน โดยไม่จำกัดในเรื่องของจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษา:

- ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PDCD1 ที่ ตำแหน่งใน intron 4 (PD1.3 A/G)
- ศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มคนสองกลุ่ม กลุ่มหนึ่งคือผู้ที่เป็นโรค SLE และอีกกลุ่มหนึ่งคือผู้ควบคุม และไม่รวมงานวิจัยที่ศึกษาโดยใช้ฐานครอบครัว
- กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาจะเป็นเพศใดหรืออายุเท่าใดก็ได้ แต่ต้องมีการสรุปผลแยกไว้ชัดเจน
- มีข้อมูลมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ นั่นคือ มีการแสดงจำนวนคนที่มีจีโนไทป์ต่างๆ ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม
- มีการรายงานชัดเจนว่างานวิจัยนั้น ศึกษาจากฐานประชากรที่ระบุเชื้อชาติไว้ชัดเจน ถ้ามีงานใดที่ตีพิมพ์ซ้ำกัน ให้เลือกชิ้นที่สมบูรณ์และตีพิมพ์ใหม่ล่าสุดมาวิเคราะห์อภิมาน
- ตีพิมพ์เป็นภาษาอังกฤษ

จากการค้นหาจาก HuGENet ซึ่งได้มา 16 งานนั้น พบว่ามี 4 งานวิจัยที่ผ่านเกณฑ์คัดเลือก

1.3 การระบุ จำแนก การตรวจสอบลงรหัสงานวิจัย โดยใช้ผู้ประเมิน 2 คนอ่านงานวิจัยทั้งหมดที่ผ่านเกณฑ์ตามข้อ 1.2 ทั้ง 4 งานโดยละเอียด และดึงข้อมูลสำคัญทั้งหมดมาเติมในตาราง (Table 1 and 2)

1.4 ประเมินคุณภาพของงานวิจัย (quality score assessment) โดยใช้คน 2 คนเดิมที่ระบุ จำแนก การตรวจสอบลงรหัสงานวิจัย มาประเมินคุณภาพของงานที่นำมาวิเคราะห์อภิมานตามเกณฑ์ต่อไปนี้ (Table 3)

1.5 คำนวณหาขนาดอิทธิพล (effect size) จากค่า odds ratio ของการศึกษาทั้งหมด ได้ผลดังนี้ คือ

Study	Odds ratio	95%CI
2	1.348772	0.857 to 2.0158
5	2.726944	1.4449 to 5.3316
10	0.704055	0.2241 to 2.0029
11	1.228798	0.8798 to 1.8646
11	2.185185	0.5471 to 9.9512

2. การวิเคราะห์อภิมาน

2.1 ตรวจสอบ HWE จะทำเฉพาะในกลุ่มควบคุมเท่านั้น โดยใช้ χ^2-test ที่ระดับความเชื่อมั่น

Table 1 All literatures that were selected by inclusion criteria.

Ref/Title	Study design	Ethnic	Cases (Phenotype)	Controls	Results	Method
Association of PD1 polymorphism with renal manifestations in SLE/Johansson *et al*. (2005)	Population Case-control	Northern Swedish (homogeneous)	260(220F : 51.2±14.4 + 40M : 52.5±18.9) patients according to ACR	670 (490F : 59.4±12.4 + 180M : 64.1±10.2) controls were geographically matched and drawn from the northern Sweden part of WHO, MONICA	1. PD-1.3 is not associated with susceptibility to SLE per se. 2. PD1.3A is associated with renal manifestations in SLE patients. 3. Distribution of genotypes in patients and controls conformed to HWE.	PD1.3A/G polymorphism was genotyped using ABI Prism 7900HT Sequence Detection System
Associations of PD-1 gene polymorphisms with childhood onset SLE/Velazquez-Cruz *et al*. (2007)	Population Case-control	Mexican	250 childhood- onset SLE patients; 228 sporadic SLE + 22 familial SLE (214F + 36M; 11.62±2.46). Diagnosis by ACR criteria.	355 healthy controls, blood bank donors and sex matched (305F + 50M)	1. Only PD-1.3A allele was significantly associated to childhood-onset SLE. 2. 155 patients (62%) had lupus nephritis, and no association with PD1 SNPs. 3. The ACG haplotype was more frequent in SLE patients. 4. Genotype frequencies of PD1.3, 1.5, 1.6 were in HWE in cases and controls. 5. Frequency of PD1.3A allele was lower in male than female cases.	Polymorphisms were genotyped by TaqMan technology (PCR) and confirmed by PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)
Investigate the associations of PD-1 gene polymorphisms with susceptibility to SLE in Taiwan/Wang *et al*. (2006)	Population Case-control	Taiwanese	109 patients with SLE (100F + 9M; 39.1±10.9). The diagnosis of SLE was in accordance with ACR*1997	100 healthy controls (84F + 16M; 37.2±7.4) from the volunteer of the local residents	1. PD-1 7209C/C and PD-1 7209C were significantly higher in patients. 2. PD1-536A, 7146G, 7209C, 7499G were associated with the development of SLE. 3. Association of PD-1 7209C independent of PD-1 ligand.	Gene polymorphisms determined by the method of PCR/restriction fragment length polymorphism HWE?
Role of PD1.3 with risk of sporadic SLE and occurrence of antiphospholipid antibodies/Sanghera *et al*. (2004)	Population Case-control	European American/ African American (bi-ethnic women)	311 women with SLE (276 European Americans + 35 African Americans). All met the 1982 ACR criteria	390 age-matched healthy control women (359 European Americans + 31 African Americans) from central blood bank of Pittsburgh	1. No significant difference in the frequency of the A allele between SLE cases and controls in either the European or African American. 2. However, the APA-adjusted OR between AA/AG genotypes versus GG showed a modest association with SLE risk in European and African Americans. 3. The A allele carriers were protected against the occurrence of APA (antiphospholipid antibodies) in both cases and controls. 4. Polymorphism in intron 4 of the PD1 gene affects the occurrence of APA and slightly modify the risk of sporadic SLE. 5. Genotype frequencies were in HWE in both case and control.	G/A polymorphism was detected by digesting the PCR-amplified product and then fractionating the digest by size in agarose gel

Table 2 Genotype and allelic frequency of SNP PD1.3

Study	Allele frequency						Genotype frequency							
	Case			Control			Case				Control			
	A	G	N	A	G	N	AA	AG	GG	N	AA	AG	GG	N
(Johansson *et al.*, 2005) Swedish **(2)**	38 (7.3)	482 (92.7)	520	74 (5.5)	1266 (94.5)	1340	2 (0.7)	34 (13.1)	224 (86.2)	260	1 (0.2)	72 (10.7)	597 (89.1)	670
(Velazquez-Cruz *et al.*, 2007) Mexican **(5)**	26 (5.2)	474 (94.8)	500	14 (2.0)	696 (98.0)	710	0 (0.0)	26 (10.4)	224 (89.6)	250	0 (0.0)	14 (3.9)	341 (96.1)	355
(Wang *et al.*, 2006) Taiwanese **(10)**	7 (3.2)	211 (96.8)	218	9 (4.5)	191 (95.5)	200	1 (0.9)	5 (4.6)	103 (94.5)	109	1 (1.0)	7 (7.0)	92 (92.0)	100
(Sanghera *et al.*, 2004) European American **(11)**	71 (12.9)	481 (87.1)	552	77 (10.7)	641 (89.3)	718	3 (1.1)	65 (23.5)	208 (75.4)	276	4 (1.1)	69 (19.2)	286 (79.7)	359
(Sanghera *et al.*, 2004) African American **(11)**	7 (10.0)	63 (90.0)	70	3 (4.8)	59 (95.2)	62	0 (0.0)	7 (20.0)	28 (80.0)	35	0 (0.0)	3 (9.7)	28 (90.3)	31

Table 3 Quality assessment score for SLE disease

Criteria	Score
1. Representativeness of cases	2
A. Randomly selected from case population with clearly defined random frame	
B. Randomly selected from case population without clearly defined random frame or with extensive inclusion criteria	1
C. Method of selection not described	0
2. Representativeness of controls	
D. Controls were randomly drawn from the same area as cases with the same criteria	2
E. Controls were randomly drawn from a different area than cases	1
F. Not described	0
3. Ascertainment of SLE cases	
G. Clearly described objective criteria for diagnosis of SLE	1
H. Not described	0
4. Ascertainment of controls	
I. SLE examinations were performed on controls to prove that controls did not have SLE	2
J. Article merely stated that controls were subjects who did not have SLE; no proof provided	1
K. Not described	0
5. Ascertainment of genotyping examination	
L. Genotyping done under “blind” conditions	10
M. Un-blinded or not mentioned	
6. Test for Hardy-Weinberg equilibrium	
N. Hardy-Weinberg equilibrium in control group	21
O. Hardy-Weinberg disequilibrium in control group	
P. Hardy-Weinberg equilibrium not checked	0
7. Association assessment	
Q. Assessed association between genotypes and SLE with appropriate statistics and adjusting confounders	2
R. Assessed association between genotypes and SLE with appropriate statistics without adjusting confounders	1
S. Inappropriate statistic used	0

95% พบว่า *p*-value ของการศึกษาทั้งหมด คือ 0.603, 0.143, 3.444, 0.005 และ 0.082 เนื่องจากไม่มีค่าใดเกิน critical value ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า การศึกษาทั้งหมดสอดคล้องตามกฎ HWE

2.2 ตรวจสอบความหลากหลาย โดยวัดเป็นค่า odds ratio ที่เปรียบเทียบระหว่างจีโนไทป์ AA เทียบกับจีโนไทป์ GG และจีโนไทป์ AG เทียบกับจีโนไทป์ GG ปัจจุบันนี้มีหลายโปรแกรมที่เข้ามาช่วยในการคำนวณหาค่าความหลากหลาย เช่น โปรแกรม comprehensive meta-analysis (CMA) และ MIX ซึ่งคำนวณหาค่า Q-statistics ของการศึกษานี้ได้เท่ากับ 6.718 ซึ่งมีค่า *p*-value เท่ากับ 0.152 ซึ่งไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90% ดังนั้นจึงไม่มีความหลากหลายในการศึกษาที่เลือกมา

2.3 ตรวจสอบค่าอิทธิพลของยีน ถ้าไม่มีความหลากหลายในการศึกษาที่เลือกมาแล้ว ลำดับต่อไปคือ หาค่าอิทธิพลของยีนโดยใช้การวิเคราะห์แบบ linear regression ซึ่งจะช่วยลดค่าความผิดพลาดชนิดที่ 1 (type 1 error) ที่ส่งผลให้เกิดผลบวกลวงของคำตอบ (false positive) ซึ่งอาจเกิดได้เมื่อทำการทดลองหลายๆ ครั้ง การตั้งสมมติฐานในการหาค่าอิทธิพลของยีนคือ ผลของจีโนไทป์ในทุกๆ การศึกษามีผลต่อการเกิดโรค SLE

2.4 หารูปแบบทางพันธุกรรม เป็นการคำนวณหาค่า pooled OR (OR_{AA}) ซึ่งเป็นการเทียบระหว่างจีโนไทป์ AA (มิวแทนต์ฮอโมไซกัส) กับจีโนไทป์ GG (ไวด์ไทป์ฮอโมไซกัส) และ pooled OR (OR_{AG}) ซึ่งเทียบระหว่างค่าจีโนไทป์ AG กับจีโนไทป์ GG โดยใช้สูตรดังนี้

$$\lambda = \log OR_{AG}/\log OR_{AA}$$

ถ้า $\lambda = 0$ แสดงว่า มีการแสดงออกแบบด้อย (recessive)

ถ้า $\lambda = 0.5$ แสดงว่า มีการแสดงออกแบบเด่นร่วม (co-dominant)

ถ้า $\lambda = 1$ แสดงว่า มีการแสดงออกแบบเด่น (dominant)

เมื่อผ่านการวิเคราะห์แล้วพบว่า ค่า OR_{AG} = 1.421 และ ค่า OR_{AA} = 1.414

ดังนั้น $\lambda = \log 1.421/\log 1.414 = 1.014$

เนื่องจากค่า λ มีค่าใกล้เคียง 1 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรม PD1.3 A/G นั้นมีรูปแบบทางพันธุกรรมเป็นแบบเด่น นั่นหมายความว่า การที่มีจีโนไทป์ที่มี แอลลีล A เพียงแอลลีลเดียว ก็เพียงพอที่ก่อให้เกิดการแสดงออกทางคลินิก ดังนั้นจึงสามารถรวมข้อมูลของคนที่มีจีโนไทป์ AA และจีโนไทป์ AG เข้าด้วยกันเป็นกลุ่มเดียวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์อภิมาน

2.5 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า pooled effect size หรือ pooled OR ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนสุดท้ายที่จะหาค่า OR เพื่อสรุปว่าผู้ที่มีแอลลีลเสี่ยง (A) จะมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรค SLE มากกว่าคนที่ไม่มีหรือไม่อย่างไร จากขั้นตอน 2.4 ทำให้ทราบว่าแอลลีล A นั้นมีการแสดงออกแบบเด่น ดังนั้นในขั้นตอนสุดท้ายในการหา pooled OR จึงเป็นการเทียบกันระหว่างจีโนไทป์ AA + AG กับ GG โดยต้องรวมจำนวนของผู้ที่มีแอลลีล A เข้าด้วยกัน เพื่อลดจำนวนปัจจัยเสี่ยงจาก 3 ปัจจัย ให้เหลือเพียง 2 ปัจจัย

จากการหาค่า Q-statistics เท่ากับ 6.718 มีค่า *p*-value เท่ากับ 0.152 ซึ่งไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90% จึงไม่มีความหลากหลายระหว่างการศึกษาที่นำมารวมกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ fixed effect model ในการหาค่า pooled OR จะได้ค่า pooled OR สุดท้าย คิดได้เท่ากับ 1.426 ค่า *p*-value เท่ากับ 0.005 ซึ่งมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยดูจากสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดใน forest plot นั้นไม่มีส่วนใดตัด line of no effect ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ผู้ที่มีจีโนไทป์ AA หรือ AG นั้นมีโอกาสในการเป็นโรค SLE มากกว่า ผู้ที่มีจีโนไทป์ GG 1.426 เท่า ซึ่งการคิดค่า pooled OR นี้สามารถทำได้ในโปรแกรม comprehensive meta-analysis (CMA 2009) และ MIX (MIX 2008) ได้เช่นกัน (Fig. 2)

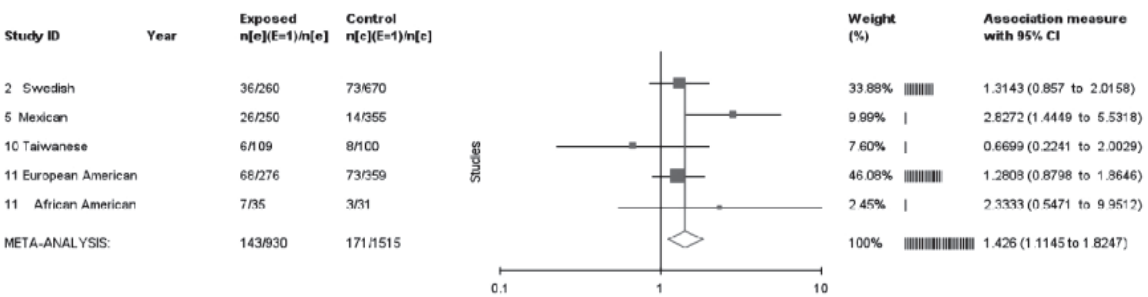


Figure 2 Forrest plot demonstrating OR, 95% CI and weight from each study. The line with diamond figure demonstrates pooled OR and 95% CI from all studies, which were 1.426(1.1145-1.8247) respectively. Therefore, PD 1.3 is significantly associated with SLE.

2.6 ตรวจสอบอคติจากการตีพิมพ์ โดยใช้ Egger's test ค่าสุดท้ายที่ได้จากการทดสอบนี้คือ ค่า *p*-value โดยถ้าค่า *p*-value ที่ได้นั้นมีค่าน้อยกว่า 0.05 ที่ ค่าระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่ามีอคติจากการตีพิมพ์ ในโปรแกรม comprehensive meta-analysis ก็มีฟังก์ชันที่ใช้ในการตรวจสอบอคติจากการตีพิมพ์ โดยพบว่า ค่า *p*-value จาก Egger's test นั้นเท่ากับ 0.383 จึงสรุปได้ว่า การศึกษาที่เลือกเข้ามานั้นไม่มีอคติจากการตีพิมพ์

บทสรุป

การวิเคราะห์อภิมานงานวิจัย เป็นระเบียบวิธีทางสถิติ ที่ช่วยเพิ่มโอกาสให้ได้ข้อสรุปจากการรวมข้อมูลของหลายๆ งานวิจัย ที่ทั้งได้รับการตีพิมพ์และไม่ได้รับการตีพิมพ์ ซึ่งงานวิเคราะห์อภิมานลักษณะนี้ อาศัยทักษะความรู้ ความชำนาญของผู้วิจัยและการทำงานอย่างมีระบบ เพื่อให้ได้รับข้อมูลที่เชื่อถือได้ หากมีความผิดพลาดในขั้นตอนใดก็ตามจะทำให้การแปลผลที่ได้ผิดไปจากความเป็นจริง รวมทั้งไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง และอาจทำให้ผู้ที่นำข้อมูลไปใช้เกิดความผิดพลาดตามมาได้ บทความนี้จึงได้เน้นย้ำถึงขั้นตอนของการวิเคราะห์ และการแปลผลที่ได้จากการวิเคราะห์อภิมานงานวิจัยสำหรับงานด้านระบาดวิทยาพันธุศาสตร์ เพื่อให้ผู้ที่ต้องการทำวิจัยได้ค้นพบข้อสรุปใหม่ และสร้างองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ต่อไป

Glossary

Alternative hypothesis สมมติฐานรอง หรือสมมติ-ฐานทางเลือก เขียนสัญลักษณ์ด้วย (Ha หรือ H1) เป็นทางเลือกที่จะเป็นไปได้หากสมมติฐานหลักถูกปฏิเสธ ดังนั้นทางเลือกจึงอาจจะมีมากกว่าหนึ่งทาง

Association study การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหลักที่ต้องการศึกษาโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มประชากรที่มีและไม่มีลักษณะที่สนใจ ในกรณีที่ศึกษากับเครื่องหมายทางพันธุกรรม จะเรียกว่า genetic association study

Case-control study การศึกษาวิจัยปัจจัยเสี่ยงของโรค โดยมีกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเป็นโรค (case) และกลุ่มที่ไม่เป็นโรค (control) แล้วศึกษาย้อนหลังไปในอดีตว่าทั้ง 2 กลุ่มเคยสัมผัส (expose) กับปัจจัยเสี่ยงมากน้อยแตกต่างกันหรือไม่ แล้วรายงานผลการวิจัยเป็น odds ratio

Confounder เหตุการณ์หรือปัจจัยที่ไม่ใช่ปัจจัยหลักที่กำลังศึกษา (เหตุกับผล หรือ ตัวแปรต้นกับตัวแปรตาม) ซึ่งมีอิทธิพลต่อความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหลักที่ศึกษา

Genetic epidemiology การศึกษาหน้าที่ของปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีอิทธิพลต่อสุขภาพและการเกิดโรคในครอบครัว และกลุ่มประชากร และความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมกับสิ่งแวดล้อม

Null hypothesis สมมติฐานหลักเขียนสัญลักษณ์ด้วย (Ho) เป็นความเชื่อเบื้องต้นว่าสิ่งที่เราสนใจหาคำตอบ ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลง หรือหากไม่มีเหตุผลหรือหลักฐานเพียงพอ เราจะยอมรับสมมติฐานหลักไว้ก่อน เช่น สนิปในยีน PDCD1 ไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคลูปัส

Relative risk ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคของผู้ที่มีปัจจัยใดที่จำเพาะ เทียบกับผู้ที่ไม่มีปัจจัยนั้นๆ ในประชากร ตัวอย่าง

ปัจจัยดังกล่าว เช่น เครื่องหมายทางพันธุกรรม จีโนไทป์ การสัมผัสปัจจัยแวดล้อมหรือยาบางชนิด

Odds ratio โอกาสที่ผู้เป็นโรคจะมีปัจจัยเสี่ยงหารด้วยโอกาสที่ผู้ไม่เป็นโรคจะมีปัจจัยเสี่ยง แต่ในกรณีที่ผลลัพธ์เกิดยากหรือพบได้น้อยนั้น ค่า OR จะใกล้เคียงกับค่า RR

$$\text{Odds ratio} = \frac{\text{ความน่าจะเป็นของเหตุการณ์ที่สนใจจะเกิดขึ้น}}{\text{ความน่าจะเป็นของการไม่เกิดเหตุการณ์ที่สนใจ}}$$

ถ้า OR, RR เท่ากับ 1 หมายถึง ปัจจัยเสี่ยงไม่มีความสัมพันธ์กับผลลัพธ์ที่สนใจ

ถ้า OR, RR มากกว่า 1 หมายถึง กลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยงพบการเกิดผลลัพธ์มากกว่า

ถ้า OR, RR น้อยกว่า 1 หมายถึง กลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยงพบการเกิดผลลัพธ์น้อยกว่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่ให้กับ อรนุช ประดิษฐ์ทรัพย์ และ อนันต์ชัย อัศวเมฆิน และขอขอบคุณข้าว ต้นสมบูรณ์และทีมนักวิจัยที่ห้องปฏิบัติการชีวสถิติและเสารสนเทศที่วิเคราะห์อภิมานในโรค SLE ที่ใช้เป็นตัวอย่างในบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

Abelson, A.K., Johansson, C.M., Kozyrev, S.V., Kristjansdottir, H., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Jonsen, A., Lima, G., Scherbarth, H. R., Gamron, S., Allievi, A., Palatnik, S.A., Alvarellos, A., Paira, S., Graf, C., Guilleron, C., Catoggio, L.J., Prigione, C., Battagliotti, C.G., Berbotto, G.A., Garcia, M.A., Perandones, C.E., Truedsson, L., Steinsson, K., Sturfelt, G., Pons-Estel, B. and Alarcon-Riquelme, M.E. 2007. No evidence of association between genetic variants of the PDCD1 ligands and SLE. *Genes Immun* 8: 69-74.

Bertsias, G. K., Nakou, M., Choulaki, C., Raptopoulou, A., Papadimitraki, E., Goulielmos, G., Kritikos, H., Sidiropoulos, P., Tzardi, M., Kardassis, D., Mamalaki, C. and Boumpas, D.T. 2009. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60: 207-218.

Cardon, L.R. and Palmer, L.J. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361: 598-604.

CMA 2009. http://www.meta-analysis.com/.

Ferreiros-Vidal, I., Gomez-Reino, J.J., Barros, F., Carracedo, A., Carreira, P., Gonzalez-Escribano, F., Liz, M., Martin, J., Ordi, J., Vicario, J.L. and Gonzalez, A. 2004. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 50: 2590-2597.

HuGENavigator (http://www.hugenavigator.net/).

James, E. S., Harney, S., Wordsworth, B. P., Cookson, W.O., Davis, S.J. and Moffatt, M.F. 2005. PDCD1: a tissue-specific susceptibility locus for inherited inflammatory disorders. *Genes Immun* 6: 430-437.

Johansson, M., Arlestig, L., Moller, B. and Rantapaa-Dahlqvist, S. 2005. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52: 1665-1669.

Lin, S.C., Yen, J. H., Tsai, J.J., Tsai, W.C., Ou, T. T., Liu, H.W. and Chen, C.J. 2004. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50: 770-775.

Little, J., Higgins, J.P., Ioannidis, J.P., Moher, D., Gagnon, F., von Elm, E., Khoury, M.J., Cohen, B., Davey-Smith, G., Grimshaw, J., Scheet, P., Gwinn, M., Williamson, R.E., Zou, G.Y., Hutchings, K., Johnson, C.Y., Tait, V., Wiens, M., Golding, J., van Duijn, C., McLaughlin, J., Paterson, A., Wells, G., Fortier, I., Freedman, M., Zecevic, M., King, R., Infante-Rivard, C., Stewart, A. and Birkett, N. 2009. STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)-an extension of the STROBE statement. *Genet Epidemiol* 33: 581-598.

Minelli, C., Thompson, J.R., Abrams, K.R., Thakkinstian, A. and Attia, J. 2005. The choice of a genetic model in the meta-analysis of molecular association studies. *Int J Epidemiol* 34: 1319-1328.

Minelli, C., Thompson, J.R., Abrams, K.R., Thakkinstian, A. and Attia, J. 2008. How should we use information about HWE in the meta-analyses of genetic association studies? *Int J Epidemiol* 37: 136-146.

MIX (2008). http://www.mix-for-meta-analysis.info/

Miyagawa, H., Yamai, M., Sakaguchi, D., Kiyohara, C., Tsukamoto, H., Kimoto, Y., Nakamura, T., Lee, J.H., Tsai, C.Y., Chiang, B.L., Shimoda, T., Harada, M., Tahira, T., Hayashi, K. and Horiuchi, T. 2008. Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 47: 158-164.

Mostowska, M., Wudarski, M., Chwalinska-Sadowska, H. and Jagodzinski, P.P. 2008. The programmed cell death 1 gene 7209 C>T polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *Clin Exp Rheumatol* 26: 457-460.

Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A.J., Tentler, D., Kristjansdottir, H., Grondal, G., Bolstad, A. I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jonssen, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllensten, U. B., Harley, J. B., Alarcon-Segovia, D., Steinsson, K. and Alarcon-Riquelme, M.E. 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32: 666-669.

Reddy, M.V., Johansson, M., Sturfelt, G., Jonsen, A., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Rantapaa-Dahlqvist, S. and Alarcon-Riquelme, M. E. 2005. The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes Immun* 6: 658-662.

Sanghera, D. K., Manzi, S., Bontempo, F., Nestlerode, C. and Kamboh, M. I. 2004. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 115: 393-398.

Thakkinstian, A., McElduff, P., D'Este, C., Duffy, D. and Attia, J. 2005. A method for meta-analysis of molecular association studies. *Stat Med* 24: 1291-1306.

Thorburn, C.M., Prokunina-Olsson, L., Sterba, K. A., Lum, R.F., Seldin, M.F., Alarcon-Riquelme, M.E. and Criswell, L.A. 2007. Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort. *Genes Immun* 8: 279-287.

Tsai, L.J., Hsiao, S.H., Tsai, L.M., Lin, C.Y., Tsai, J. J., Liou, D.M. and Lan, J.L. 2008. The sodium-

dependent glucose cotransporter SLC5A11 as an autoimmune modifier gene in SLE. *Tissue Antigens* 71: 114-126.

Velazquez-Cruz, R., Orozco, L., Espinosa-Rosales, F., Carreno-Manjarrez, R., Solis-Vallejo, E., Lopez-Lara, N.D., Ruiz-Lopez, I.K., Rodriguez-Lozano, A.L., Estrada-Gil, J.K., Jimenez-Sanchez, G. and Baca, V. 2007. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 15: 336-341.

Wang, Q., Ye, D., Yin, J., Li, X., Zhang, G., Zhang, Y. and Zhang, X. 2008. Programmed cell death-1 genotypes are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus among Chinese. *Arch Dermatol Res* 300: 91-93.

Wang, S.C., Chen, Y.J., Ou, T.T., Wu, C.C., Tsai, W.C., Liu, H.W. and Yen, J.H. 2006. Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *J Clin Immunol* 26: 506-511.