

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ**  
**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**  
**ΤΗΣ**  
**ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ**

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΜΠΑ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ**

**Μπράλιου Γεωργία**  
**ΔΙΔΑΣΚΟΥΣΑ ΠΔ 407/80**  
**Μπάγκος Παντελεήμων**  
**ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ  
ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ**



**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ  
ΤΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ**

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΜΠΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ**

**Μπράλιου Γεωργία, ΔΙΔΑΣΚΟΥΣΑ ΠΔ 407/80  
Μπάγκος Παντελεήμων, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΛΑΜΙΑ 2017**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ  
ΤΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ**

**Τριμελής Επιτροπή**

**Μπράλιου Γεωργία, ΔΙΔΑΣΚΟΥΣΑ ΠΔ 407/80  
Μπάγκος Παντελεήμων, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
Πλαγιανάκος Βασίλειος, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

*ΜΙΑ ΑΣΤΡΑΠΗ Η ΖΩΗ ΜΑΣ  
... μα προλαβαίνουμε!*

*Ν. Καζαντζάκης*

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες καθηγητές κο Παντελή Μπάγκο και κα Γκρέτα Μπράλιου για την καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που έδειξαν προς το μέρος μου και συνέβαλαν σε μια αξιόλογη και ουσιαστική συνεργασία.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τη φίλη μου Αθηνά για την συμπαράσταση και καθοδήγηση που μου έδειξε σε κάθε στάδιο αυτής της εργασίας, καθώς και για την αναγκαία ώθηση που προσέφερε να παρακάμψω κάθε εμπόδιο και να κοιτάξω μπροστά.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απονείμω στους γονείς μου και στην αδελφή μου, που παρά τις κρίσιμες εποχές που διανύουμε μου παρείχαν ηθική συμπαράσταση και στήριξαν κάθε φάση της ακαδημαϊκής μου πορείας.

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις <sup>(1)</sup>, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία: ...../...../20.....

Η Δηλούσα

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.





# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ .....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> - ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ .....	9
1.1 Από το DNA στα γονίδια .....	9
1.2 Νόμος διαχωρισμού αλληλόμορφων γονιδίων.....	9
1.3 Το γονίδιο eNOS και η λειτουργία του.....	10
1.3.1 Ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS .....	10
1.4 Πνευμονική Υπέρταση.....	10
1.4.1 Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση .....	11
1.4.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.....	11
1.5 Μετα-Ανάλυση .....	12
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ .....	15
2.1.1 Ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού με PCR .....	15
2.1.2 Γονοτυπική Ανάλυση του A/B eNOS πολυμορφισμού .....	17
2.1.3 Επιλογή των primers .....	18
2.1.4 Επιλογή της πολυμεράσης .....	20
2.1.5 Gradient PCR .....	21
2.1.6 Παρασκευή γέλης αγαρόζης (agarose gel) .....	22
2.1.7 Παρασκευή γέλης πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel).....	23
2.1.8 Ηλεκτροφόρηση του polyacrylamide gel .....	25
2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	27

2.2.1	Συστηματική Ανασκόπηση για META-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	27
2.2.2	Συγκέντρωση δεδομένων για Μετα-Ανάλυση.....	30
2.2.3	Βασικές εκτιμήσεις κατά την Μετα-Ανάλυση.....	31
2.2.3.1	Μέγεθος επίδρασης – effect size.....	31
2.2.3.2	Μοντέλα σταθερών και τυχαίων επιδράσεων.....	32
2.2.3.3	Κριτήριο ετερογένειας Q.....	32
2.2.3.4	p-value.....	32
2.2.3.5	Υπολογισμός του $\tau^2$ .....	33
2.2.3.6	Υπολογισμός του $I^2$ .....	33
2.2.3.7	Έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης.....	33
2.2.3.8	Έλεγχος για ισορροπία Hardy-Weinberg.....	33
2.2.4	Οι εντολές του STATA.....	34
2.2.5	Εκτέλεση εντολών με χρήση του STATA.....	37
2.3	Cochran-Armitage Trend Test.....	39
2.3.1	Η μέθοδος MAX.....	39
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1	Γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS στο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού.....	41
3.1.1	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών.....	41
3.1.2	Προσδιορισμός γονοτύπων σε γέλη αγαρόζης.....	43
3.1.3	Προσδιορισμός γονοτύπων σε γέλη πολυακρυλαμιδίου.....	44
3.2	Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση.....	55
3.2.1	Συστηματική Ανασκόπηση για ΠΑΥ.....	55
3.2.2	Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ.....	57
3.2.3	Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.....	59

3.2.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας .....	63
3.2.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας .....	64
3.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.....	67
3.3.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΧΑΠ .....	67
3.3.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ .....	69
3.3.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας .....	71
3.3.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας .....	73
3.3.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας .....	74
3.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με/χωρίς ΠΥ σε ασθενείς με ΧΑΠ .....	75
3.4.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΠΥ σε ΧΑΠ .....	75
3.4.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ.....	77
3.4.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.....	79
3.4.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας.....	80
3.4.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας .....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	83
4.1 Συμπεράσματα - συζήτηση του ελέγχου γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΠΑΥ.....	83
4.2 Συμπεράσματα – συζήτηση του ελέγχου γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΧΑΠ.....	84
4.4 Επίλογος .....	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	87



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide) είναι το μόριο που παράγεται από ενδοθηλιακά κύτταρα στο σώμα μας και είναι υπεύθυνο για τη διαστολή αγγείων, ρυθμίζοντας έτσι την πίεση του αίματος. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την δημιουργία μονοξειδίου του αζώτου ονομάζεται eNOS.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου eNOS αποτελούν πιθανά αίτια για την εμφάνιση πνευμονικών αγγειακών νόσων. Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι δύο ασθένειες που ενδεχομένως να οφείλονται σε πολυμορφισμούς του γονιδίου eNOS.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS για πιθανή συσχέτιση με ΠΑΥ, ΧΑΠ και ΠΥ σε ΧΑΠ. Ο πολυμορφισμός βρίσκεται στο εσώνιο 4 αυτού του γονιδίου. Παρουσιάζει 5 επαναλήψεις μιας ακολουθίας από 27 ζεύγη βάσεων και είναι της μορφής VNTR. Η εργασία αποτελείται από δύο κύρια σκέλη. Το πρώτο σκέλος είναι η πειραματική έρευνα. Το δεύτερο σκέλος είναι η Μετα-Ανάλυση.

**Α ΜΕΡΟΣ:** Έγινε γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS σε 88 δείγματα ασθενών με ΠΑΥ και 88 δείγματα υγιών μαρτύρων από Ελλάδα. Η ανίχνευση του γενετικού πολυμορφισμού έγινε με PCR. Η ένδειξη για παρουσία 5 επαναλήψεων αντιστοιχεί στο αλληλόμορφο B και η ένδειξη για παρουσία 4 επαναλήψεων στο αλληλόμορφο A. Η καταγραφή των γονοτύπων όλων των δειγμάτων συνέβαλε στο επόμενο στάδιο αυτής της μελέτης.

**Β ΜΕΡΟΣ:** Δεύτερο μέρος της μελέτης ήταν η Μετα-Ανάλυση. Έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed και καταγράφηκαν μελέτες ασθενών-μαρτύρων που εξέταζαν τον πολυμορφισμό A/B του γονιδίου eNOS ως προς τη γενετική συσχέτιση με ΠΑΥ, ΧΑΠ και ΠΥ σε ΧΑΠ. Τα γονοτυπικά δεδομένα των μελετών που συγκεντρώθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 κύριες ομάδες. Τα αποτελέσματα του εργαστηριακού μέρους ομαδοποιήθηκαν στα δεδομένα της ομάδας 1.

- ομάδα 1: μελέτες που ελέγχουν τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ
- ομάδα 2: μελέτες που ελέγχουν τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΧΑΠ
- ομάδα 3: μελέτες που ελέγχουν τη γενετική συσχέτιση A/B του γονιδίου eNOS σε ασθενείς με ΧΑΠ με / χωρίς πνευμονική υπέρταση

Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε μετα-αναλυτικές μεθόδους για πρόβλεψη του μοντέλου κληρονομικότητας του πολυμορφισμού για κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS συσχετίζεται με την εμφάνιση ΧΑΠ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας, ενώ για ΠΑΥ και ΠΥ σε ΧΑΠ όχι. Περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος χρειάζονται για να διερευνηθεί η συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με την εμφάνιση των παραπάνω ασθενειών.

## ABSTRACT

Nitrogen Monoxide (Nitric Oxide) is a molecule produced by endothelial cells in our body and is responsible for the expansion vessel, thereby regulating blood pressure. The gene responsible for generating Nitric Oxide is referred as eNOS.

Studies have shown that polymorphisms of the eNOS gene are possible causes for the occurrence of pulmonary vascular diseases. Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Obstructive Pulmonary Disease are two diseases that may be attributable to polymorphisms of the eNOS gene.

The present study examines the polymorphism A/B of the eNOS gene for possible association with PAH, COPD and PH in COPD. This polymorphism is located in intron 4 of the eNOS gene. It presents five repeats of a of 27 bp sequence and is a VNTR polymorphism. The study consists of two main parts. The first part is the laboratory research. The second part is the Meta-Analysis.

PART A: Genotypic analysis of the A/B eNOS gene polymorphism was performed in 88 case subjects with PAH and 88 control subjects in the Greek cohort. Detection of the genetic polymorphism was conducted by using PCR. The indication for the presence of 5 repeats corresponds to the presence of allele B and the evidence for the presence of 4 repeats corresponds to allele A. Genotypic data recording of all samples contributed to the next step of this study.

PART B: Second part of the study was the Meta-Analysis. Literature search in PubMed database was performed and case-control studies were recorded that examined the possible association of the A/B eNOS gene polymorphism with PAH, COPD and PH in COPD. Genotype data from the studies obtained were categorized into three main groups. The results from the laboratory part were pooled in group 1.

- group 1: studies that examine the genetic association of A/B eNOS gene polymorphism with PAH
- group 2: studies that examine the genetic association of A/B eNOS gene polymorphism with COPD
- group 3: studies that examine the genetic association of A/B eNOS gene polymorphism in COPD cases with / without PH

Subsequently, we applied meta-analytic methods for predicting the model of inheritance of the eNOS gene polymorphism in each of the above groups.

The results showed that the A/B eNOS gene polymorphism is associated with the development of COPD as to the recessive pattern of inheritance, whereas for PAH and PH in COPD not. Further research with a larger number of studies is needed to explore the correlation of the polymorphism with the above mentioned diseases.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
NO	Nitric Oxide
ΠΥ	Πνευμονική Υπέρταση
ΠΑΥ	Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση
ΧΑΠ	Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια
PH	Pulmonary Hypertension
PAH	Pulmonary Arterial Hypertension
IPAH	Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMID	PubMed id
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
bp	Base pairs
OR	Odds Ratio
CI	Confidence Interval

## ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

gene	γονίδιο
disease	Ασθένεια
Polymorphism	Πολυμορφισμός
Genotype	Γονότυπος
Pulmonary Hypertension	Πνευμονική Υπέρταση
Pulmonary Arterial Hypertension	Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση
Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια
Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
DNA denaturation	Αποδιάταξη DNA
Genomic DNA	Γενωμικό DNA
buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα
Primer	Εκκινητής
Polyacrylamide gel	γέλη Πολυακρυλαμιδίου
Meta-analysis	Μετα-ανάλυση
Confidence Interval	Διάστημα Εμπιστοσύνης



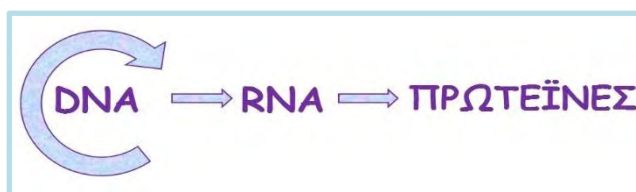
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> - ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

## 1.1 Από το DNA στα γονίδια

Το DNA αποτελεί το γενετικό υλικό όλων των οργανισμών και συντίθεται από νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια δεοξυριβόζη, μια αζωτούχο βάση (A, T, G, C) και μια φωσφορική ομάδα.

Η αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας οργανώνεται σε λειτουργικές μονάδες, τα γονίδια. Τα μόρια του DNA πακετάρονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν τα νουκλεοσώματα. Τα νουκλεοσώματα πακετάρονται σχηματίζοντας ινίδια χρωματίνης. Τα ινίδια χρωματίνης με τη σειρά τους αναδιπλώνονται σχηματίζοντας τα χρωμοσώματα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα σε ένα απλοειδές κύτταρο αποτελείται από περίπου  $3 \times 10^9$  ζεύγη βάσεων που είναι οργανωμένα σε 23 χρωμοσώματα.

Το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας παρουσιάζεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1 Το κεντρικό δόγμα της Βιολογίας

Τα γονίδια είναι η πληροφορία μιας συγκεκριμένης ακολουθίας βάσεων του DNA. Ορισμένα γονίδια μεταγράφονται σε mRNA και στη συνέχεια μεταγράφονται σε πρωτεΐνες. Η αλληλουχία των βάσεων του mRNA καθορίζει την αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες, με βάση έναν κώδικα αντιστοίχισης νουκλεοτιδίων-αμινοξέων. Αυτός είναι ο γενετικός κώδικας. Τα γονίδια αποτελούνται από εσώνια και εξώνια. Τα εξώνια είναι οι αλληλουχίες των γονιδίων που τελικά μεταφράζονται σε αμινοξέα. Τα εσώνια είναι οι ενδιάμεσες αλληλουχίες γονιδίων που δε μεταφράζονται σε αμινοξέα. Ορισμένες πρωτεΐνες που συντίθενται έχουν καταλυτική δράση και ονομάζονται ένζυμα.

## 1.2 Νόμος διαχωρισμού αλληλόμορφων γονιδίων

Ο Mendel διατύπωσε ότι οι κληρονομικοί παράγοντες οφείλονται κυρίως στα γονίδια. Πρότεινε ότι ο κληρονομικός χαρακτήρας ελέγχεται από δύο παράγοντες που υπάρχουν σε κάθε άτομο. Οι διαφορετικές μορφές του ίδιου χαρακτήρα ελέγχονται από αλληλόμορφα γονίδια. Ένα άτομο με ίδια αλληλόμορφα γονίδια είναι ομόζυγο ως προς μία ιδιότητα, ενώ ένα άτομο με διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια είναι ετερόζυγο. Στα ετερόζυγα άτομα το αλληλόμορφο που καλύπτει την έκφραση του άλλου ονομάζεται επικρατές και αυτό

που καλύπτεται υπολειπόμενο. Το σύνολο των αλληλόμορφων γονιδίων ενός οργανισμού ονομάζεται γονότυπος.

## 1.3 Το γονίδιο eNOS και η λειτουργία του

Το μονοξείδιο του αζώτου (*Nitric Oxide - NO*) είναι ένα απαραίτητο ενδογενές αγγειοδιασταλτικό που ρυθμίζει τον τόνο του πνευμονικού αγγειακού δικτύου (Hampl and Herget 2000). Συντίθεται τοπικά σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα από το ένζυμο endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Το ένζυμο eNOS είναι ένα βασικό καταλυτικό ένζυμο, υπεύθυνο για την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου (Droma, *et al.* 2002). Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο eNOS έχει ανατεθεί στο χρωμόσωμα 7. Το γονίδιο αποτελείται από 26 εξώνια και 25 εσώνια και έχει μέγεθος 21kb (Miyahara, *et al.* 1994). Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο eNOS, μερικοί από τους οποίους έχουν αναφερθεί ότι συσχετίζονται με πνευμονικές αγγειακές διαταραχές (Miyamoto, *et al.* 1998).

### 1.3.1 Ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS

Στο εσώνιο 4 του γονιδίου eNOS έχουν καταγραφεί 5 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες από 27 ζεύγη βάσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι είτε θα υπάρχει ένα αλληλόμορφο με πέντε επαναλήψεις των 27bp, είτε θα υπάρχει αλληλόμορφο με 4 επαναλήψεις των 27bp. Ο πολυμορφισμός αυτού του τύπου είναι πολυμορφισμός Μεταβλητού Αριθμού Συνδυασμένων Επαναλήψεων ή Variable Number of Tandem Repeats (VNTR). Έχει καθιερωθεί βάσει βιβλιογραφίας (Ulasli, *et al.* 2013) να αναφερόμαστε στο αλληλόμορφο με τις 5 επαναληπτικές ακολουθίες ως allele B και στο αλληλόμορφο με τις 4 επαναληπτικές ακολουθίες ως allele A. Όταν ένα άτομο φέρει δύο ίδια αλληλόμορφα του γονιδίου λέμε ότι είναι ομόζυγο ως προς το αλληλόμορφο A (AA) ή ως προς το B (BB) αντίστοιχα. Όταν φέρει δύο διαφορετικά αλληλόμορφα λέμε ότι είναι ετερόζυγο (AB). Το αλληλόμορφο B συναντάται σε μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό, γι' αυτό ονομάζεται αλληλόμορφο άγριου τύπου (wild type allele).

## 1.4 Πνευμονική Υπέρταση

Η πνευμονική υπέρταση είναι μία από τις κύριες πνευμονικές αγγειακές νόσους. Προκαλείται από την υψηλή αρτηριακή πίεση στις πνευμονικές αρτηρίες (>25mmHg), οι οποίες μεταφέρουν το αίμα από την καρδιά στους πνεύμονες. Η ΠΥ βλάπτει το δεξιό μέρος της καρδιάς καθιστώντας το ανίκανο να κυκλοφορεί αποτελεσματικά το αίμα σε όλο το σώμα. Μπορεί επίσης να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια και να αποβεί μοιραία.

Τα συμπτώματα πνευμονικής υπέρτασης, όταν αυτά εκδηλώνονται, μπορεί να περιλαμβάνουν:

- ✚ Δύσπνοια
- ✚ Κόπωση
- ✚ Στηθάγχη
- ✚ Μειωμένη ικανότητα άσκησης
- ✚ Βήχα με αίμα
- ✚ Βραχνάδα

Οι αιτίες πνευμονικής υπέρτασης ποικίλουν. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές πνευμονικής υπέρτασης και κάθε μία αντιμετωπίζεται διαφορετικά.

Οι γιατροί ταξινομούν την πάθηση σε πέντε κύριες ομάδες (Simonneau, *et al.* 2013):

- ✚ Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ).
- ✚ Πνευμονική υπέρταση λόγω αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας.
- ✚ Πνευμονική υπέρταση λόγω πνευμονικών παθήσεων ή έλλειψης οξυγόνου (υποξία).
- ✚ Χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση.
- ✚ Πνευμονική υπέρταση με ασαφή αιτία ή διάφορα συμπτώματα.

### 1.4.1 Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση

Η ΠΑΥ είναι μία σοβαρή νόσος των αρτηριών των πνευμόνων, η οποία επηρεάζει και την καρδιά. Καθώς αναπτύσσεται η ΠΑΥ, η ροή του αίματος διαμέσου των πνευμονικών αρτηριών περιορίζεται και η δεξιά πλευρά της καρδιάς τίθεται υπό αυξανόμενη πίεση για να μπορέσει να ωθήσει το αίμα προς τους πνεύμονες. Πρόκειται για μία σπάνια νόσο, η οποία προσβάλλει περίπου 25-50 άτομα ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος. Εμφανίζεται με διπλάσια συχνότητα στις γυναίκες από ό,τι στους άντρες (Peacock, *et al.* 2007). Τα συμπτώματα είναι κυρίως αίσθημα δύσπνοιας και κόπωσης. Η ΠΑΥ μπορεί να είναι ιδιοπαθής (idiopathic PAH) ή κληρονομήσιμη (heritable PAH) (Simonneau, *et al.* 2013). Ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS έχει δείξει ότι ενδεχομένως επηρεάζει την παθογένεση της ΠΑΥ (Vadapalli, *et al.* 2012) (Ulrich, Szamalek-Hoegel, *et al.*).

### 1.4.2 Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) είναι μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας στο δυτικό κόσμο. Ανήκει στην τρίτη ομάδα ταξινόμησης της ΠΥ. Η συνηθέστερη αιτία που προκαλεί ΧΑΠ είναι το κάπνισμα (Ulrich, Hersberger, *et al.* 2010). Οι αεραγωγοί των πνευμόνων σταδιακά στενεύουν, με αποτέλεσμα να μην γίνεται φυσιολογική ανταλλαγή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα στο αίμα. Τα συμπτώματα

περιλαμβάνουν χρόνια παραγωγικό βήχα, χρόνια αποβολή πτυέλων και δύσπνοια. Η πνευμονική υπέρταση (ΠΥ) αποτελεί σοβαρή επιπλοκή της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και αναπτύσσεται σε ποσοστό 30%-70% των ασθενών με ΧΑΠ, αυξάνοντας έτσι τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητά τους (Minai, Chaouat and Adnot 2010). Ο γενετικός πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS ενδεχομένως να επηρεάζει την εμφάνιση ΠΥ σε ΧΑΠ (Shaw, *et al.* 2012).

## 1.5 Μετα-Ανάλυση

Μετα-ανάλυση είναι η ποσοτική σύνθεση πληροφοριών από διάφορες μελέτες (Lau, Ioannidis and Schmid 1997) και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αξιολόγηση μιας ερευνητικής διαπίστωσης (J. P. Ioannidis 2003). Συνδυάζοντας πληροφορίες από διαφορετικές μελέτες μπορεί μια ολοκληρωμένη ανάλυση να αποκτήσει μεγαλύτερη στατιστική ισχύ ως προς την επίδραση μιας θεραπείας σε σχέση με μια ανάλυση που βασίζεται σε μία μόνο μελέτη (Normand 1999), καθώς επίσης και να αξιολογηθεί η ετερογένεια μεταξύ των μελετών (Trikalinos, *et al.* 2008). Ο όρος «μετα-ανάλυση» παρουσιάστηκε το 1976 στον τομέα της ψυχολογίας και των κοινωνικών επιστημών (Glass 1976) και πλέον χρησιμοποιείται ευρέως πέραν του πεδίου της ιατρικής (Littell, Corcoran and Pillai 2008). Επιπλέον, η μετα-αναλυτική προσέγγιση έχει ευρέως υιοθετηθεί από τους ραγδαία εξελισσόμενους τομείς της γενετικής επιδημιολογίας, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για συνεισφορά ενάντια στον κίνδυνο ανάπτυξης ανθρώπινων ασθενειών.

## 1.6 Σκοπός της εργασίας

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση είναι μια ασθένεια οφείλεται σε αύξηση της πίεσης του αίματος στους πνεύμονες. Συμπτώματα της ΠΑΥ είναι κυρίως δύσπνοια και αίσθημα κόπωσης. Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση μπορεί να είναι ιδιοπαθής.

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια χαρακτηρίζεται από μόνιμη μη αναστρέψιμη απόφραξη των αεραγωγών (βρόγχων). Παρουσιάζεται κυρίως σε άτομα που είναι συστηματικοί καπνιστές. Χαρακτηρίζεται από χρόνια βήχα και δύσπνοια. Πολλές φορές άτομα με ΧΑΠ μπορεί να παρουσιάσουν και πνευμονική υπέρταση. Η νόσος ΧΑΠ αναδεικνύεται σε ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα υγείας της σύγχρονης εποχής μας.

Μελέτες διερευνούν το γεγονός ότι η εμφάνιση των παραπάνω ασθενειών ενδέχεται όχι μόνο να οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, αλλά και σε γενετικούς. Η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών λειτουργεί σαν αγγειοδιασταλτικό, ρυθμίζοντας έτσι την πίεση του αίματος. Το γονίδιο που κωδικοποιεί μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου είναι το eNOS. Πολυμορφισμοί που βρίσκονται στο γονίδιο eNOS ενδέχεται να επηρεάσουν τα επίπεδα

παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου και κατά συνέπεια να παρουσιάζουν εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με ανεπάρκεια του πνευμονικού αγγειακού δικτύου. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS (intron 4 27bp VNTR) ως προς τη συσχέτισή του με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ), τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και την πνευμονική υπέρταση σε άτομα που πάσχουν από ΧΑΠ.

Είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων προγνωστικών και διαγνωστικών μεθόδων όπως και νέων θεραπευτικών στρατηγικών που θα βοηθήσουν άτομα σε κατηγορίες υψηλού κινδύνου, καθώς και ασθενείς με ΠΑΥ και ΧΑΠ, αλλά και να αυξήσουν το προσδόκιμο της ζωής τους.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από 88 ασθενείς που είχαν ΠΑΥ (cases) και 88 υγιείς μάρτυρες (controls) από το ΑΤΤΙΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ Νοσοκομείο. Τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων έδωσε ο κος Ηρακλής Τσαγκάρης, ενώ η απομόνωση των γενωμικών DNA πραγματοποιήθηκε από την κα Αργυρή Γιαλεράκη. Στην έρευνα συμμετείχαν ο κος Αργύριος Τσαντές και η κα Ελένη Βρίγκου. Τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -20°C. Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA έγινε με NucleoSpin® Blood kit.

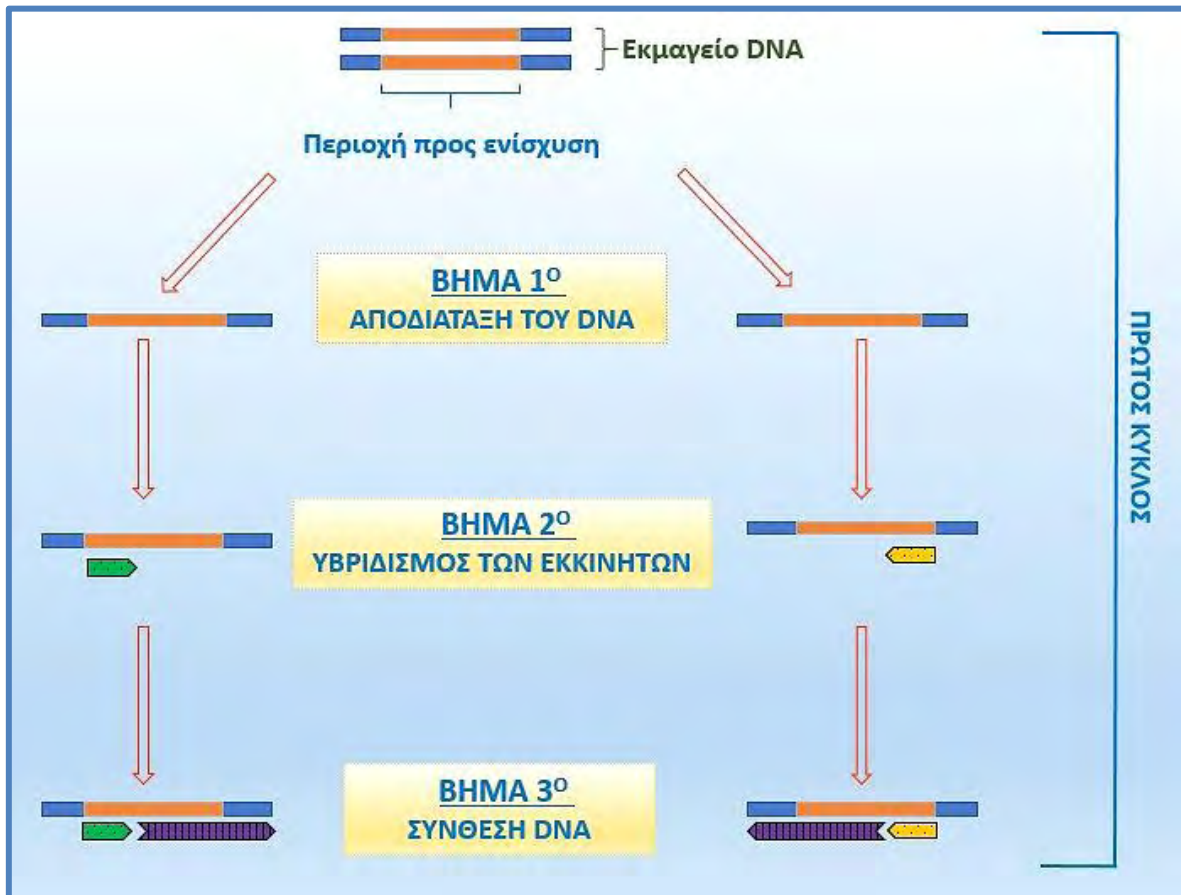
#### 2.1.1 Ανίχνευση γενετικού πολυμορφισμού με PCR

Το 1983, ο Kary Mullis, ανέπτυξε την μοριακή τεχνική που ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR είναι μία σχετικά απλή και ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων που επιτελούνται σε διαφορετική θερμοκρασία. Η τεχνική PCR θεωρείται εξαιρετικά ευαίσθητη, δεδομένου ότι το τελικό προϊόν της μετά από 30-40 κύκλους ανέρχεται στο ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανάλυση πολύ μικρών ακόμη και μικροσκοπικών δειγμάτων DNA.

Για να αντιγραφεί ένα τμήμα DNA με PCR απαιτούνται τα ακόλουθα συστατικά:

1. **Πρότυπο ή εκμαγείο (template) DNA** - που περιέχει άθικτη την ακολουθία του DNA που θα αντιγραφεί
2. **Μεμονωμένα δεοξυνουκλεοτίδια (A, T, G, και C)** - πρώτη ύλη του DNA (dNTPs)
3. **DNA πολυμεράση** - ένζυμο απαραίτητο για την αντιγραφή, ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες
4. **Ιόντα μαγνησίου** - συμπράγοντας (καταλύτης) που απαιτείται για τη λειτουργία της DNA πολυμεράσης
5. **Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers)** - τμήματα DNA το κάθε ένα συμπληρωματικό με την αλληλουχία ενός κλώνου της δίκλωνης έλικας του DNA στα δύο αντίθετα άκρα της επιλεγμένης περιοχής που πρόκειται να αντιγραφεί
6. **Διάλυμα αλάτων (buffer)**- παρέχει το κατάλληλο ιοντικό περιβάλλον και το pH για την αντίδραση PCR

Ένας βασικός κύκλος PCR αποτελείται από τρεις αντιδράσεις, οι οποίες εκτελούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στην πρώτη αντίδραση, το εκμαγείο DNA αποδιατάσσεται σε απλούς κλώνους σε υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα (94 °C για 1 λεπτό στις αντιδράσεις μας). Στη δεύτερη αντίδραση, η θερμοκρασία μειώνεται (45-68 °C) ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν στο εκμαγείο DNA, και πάλι για ένα μικρό χρονικό διάστημα (για πχ. 1 λεπτό). Στην τρίτη αντίδραση, η θερμοκρασία αυξάνεται στη βέλτιστη θερμοκρασία για την DNA πολυμεράση για να συνθέσει το DNA (72 °C για 1 λεπτό). Οι αντιδράσεις αυτές συνοψίζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 ο πρώτος κύκλος της PCR

Παρόλο που η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη (μια ενιαία αντίδραση τριών κύκλων δεν απαιτεί συνήθως πάνω από 2-3 λεπτά), είναι απαραίτητο να επαναληφθεί αυτός ο κύκλος συνήθως τριάντα φορές, προκειμένου να συντεθεί αρκετό DNA για να αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή.



## 2.1.2 Γονοτυπική Ανάλυση του A/B eNOS πολυμορφισμού

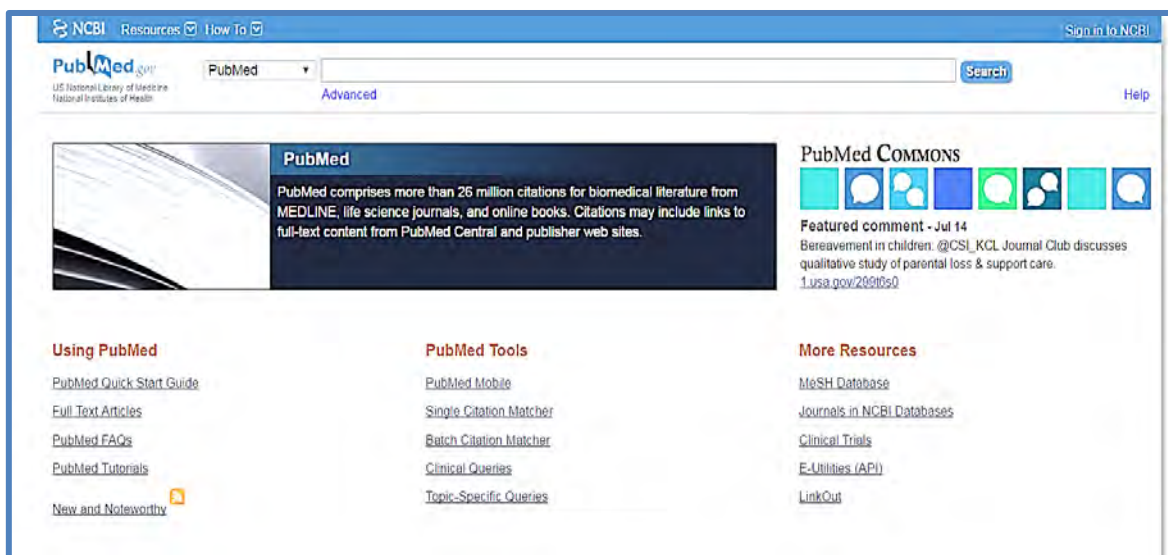
Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό. Όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς το θετικό πόλο. Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις. Εάν και τα δύο αλληλόμορφα περιέχουν 5 επαναλήψεις (5 repeats) της αλληλουχίας των 27 βάσεων, το προϊόν θα είναι μια ζώνη μεγέθους 420 bp (5R-5R). Εάν και τα δύο αλληλόμορφα περιέχουν 4 επαναλήψεις (4 repeats) της αλληλουχίας των 27 βάσεων, τότε διακρίνεται μια ζώνη 393 bp (4R-4R). Εάν το ένα αλληλόμορφο περιέχει 5 επαναλήψεις και το άλλο 4 επαναλήψεις της αλληλουχίας των 27 βάσεων, τότε διακρίνονται 2 ζώνες με μεγέθη 420 bp και 393 bp (5R-4R) (Εικόνα 3).

<u>eNOS POLYMORPHISM</u>	<u>GENOTYPE</u>	<u>ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR</u>
5R 5R	Ομόζυγος (BB)	420 ζεύγη βάσεων
4R 4R	Ομόζυγος (AA)	393 ζεύγη βάσεων
5R 4R	Ετερόζυγος (AB)	420 και 393 ζεύγη βάσεων

Εικόνα 3 Οι γονότυποι του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS

## 2.1.3 Επιλογή των primers

Σε πρώτο στάδιο έπρεπε αρχικά να εντοπίσουμε τους primers με τους οποίους θα δουλέψει το πείραμα για την PCR. Αυτό έγινε κάνοντας μια έρευνα μέσω της βάσης δεδομένων Pubmed (εικόνα 4), για να εξετάσουμε τον τρόπο με τον οποίο είχαν εργασθεί αντίστοιχα άλλες επιστημονικές ομάδες πάνω σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων για πολυμορφισμούς του γονιδίου eNOS.



Εικόνα 4 Η Βάση δεδομένων PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Σκοπός ήταν η ανεύρεση δημοσιευμένων μελετών ασθενών-μαρτύρων σχετικά με το γονίδιο eNOS. Σημαντικό κομμάτι των μελετών είναι να συμπεριλαμβάνεται αναλυτική παρουσίαση του τρόπου παρουσίασης των μεθόδων του επιστημονικού μέρους. Ο τρόπος με τον οποίο συλλέχθηκαν οι μελέτες έγινε με τον εξής τρόπο. Εισάγαμε στο search box της pubmed ένα ερώτημα (*query*).

**Query: (“Nitric oxide synthase” OR NOS OR eNOS) AND (“Pulmonary Hypertension”) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP)**

Μέσω αυτού του ερωτήματος προέκυψαν 235 δημοσιευμένα άρθρα, εκ των οποίων έγιναν δεκτά μόνο 14. Στη συνέχεια έγινε καταχώρηση των δεδομένων κάθε μελέτης σε φύλλα δεδομένων (Excel). Παρακάτω παρουσιάζεται τμήμα του γονιδίου στο οποίο έγινε BLAST για να βρεθεί η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία των 27bp.

## Homo sapiens chromosome 7

>chromosome:GRCh38:7:150996833:150997453:1

150996833 CAGCTTAGGGAGAGCGAGCTGGTGTTCGGGGCTAAGCAGGCCTGGCGCAACGCTCCCCGC 150996892

150996893 TGCCTGGGCCGGATCCAGTGGGGGAAGCTGCAGGTGCGGCTGGCCAGCGACTGAGAGACC 150996952

150996953 CGGGCGCTACCAAAGGGGAGCGGGGTGGCGGGGCAGTTCCTAAGGCTTCCCGGGGGCTG 150997012

150997013 GGAGGTCCCAAAGTGTGGGGGAGATCCTTGCCTTTTCCCTTAGAGACTGGAAAGGTAGGG 150997072

150997073 GGACTGCCCCACCCTCAGCACCCAGGGGAACCTCAGCCCAGTAGTGAAGACCTGGTTATC 150997132

150997133 **AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG**GCTGGAGGAGGGGAAA**GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGG** 150997192

150997193 **TGAGGAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG****GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAGGA** 150997252

150997253 **AGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG****GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG**GACAGCTG 150997312

150997313 AGCGGAGCTTCCCTGGGCGGTGCTGTCTAGTAGCAGGAGCAGCCTCCTGGAAAAGCCCTGG 150997372

150997373 CTGCTGCTTCTCCCCAAGAGAGAAGGCTTCTCCCGCCAGGCCAGTCCAGTGCAGCCCCT 150997432

150997433 CACCCACACCCACTGCTACCCAGTTCCTTCTGCTTCGGCCCGCACCTCCCTCACACCCC 150997492

150997493 AGCCACAGACTCGGGGCTGGCCTTAGTTACTGGAACGCCT**CTGTGACCACAGCACTAAGAG** 150997552

150997553 **A**AGCAAGTGCCTCCATGGGGGACTTGGTCCCATGGCCTTGGCTCCTTACCATCACTGG 150997612

150997613 CCGCCAAAGAGTTTGAATAAAGCCACGTGCCAGTGAATCCCAAAGGAACCTCAACTAA 150997672

150997673 AATAAAAACAATCCTATCTGACACTTGCCTGACCCTCTAAGTCATTCAAAGCTTTAGCTC 150997732

150997733 AACTTCGATCCATCTGAGCTG

Με υπογραμμισμένη γραμματοσειρά απεικονίζονται οι θέσεις που θα αποτελέσουν τη βάση για τη δημιουργία των primers και με σκίαση οι επαναλήψεις της 27bp repeat. Όπως παρατηρείται, η επανάληψη της ακολουθίας VNTR παρουσιάζει 5 επαναλήψεις.

Οι primers που επιλέξαμε ήταν αρχικά δύο διαφορετικά ζεύγη ακολουθιών (Πίνακες 1, 2).

Πίνακας 1 - 1 <sup>ο</sup> σετ εκκινήτων					
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC(%)	Reference
FORWARD PRIMER	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG	21	60.9 °C	57.14	(Novoradovsky, <i>et al.</i> 1999) (Wang, <i>et al.</i> 1996)
REVERSE PRIMER	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	20	55.4 °C	50.00	

Πίνακας 2 - 2 <sup>ο</sup> σετ εκκινήτων					
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC(%)	Reference
FORWARD PRIMER	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG	21	60.9 °C	57.14	(Yildiz, <i>et al.</i> 2003)
REVERSE LONG PRIMER	TCTCTTAGTGCTGTGGTCACAG	22	57.7 °C	50.00	

Ενώ το πρώτο σετ primers είναι όπως προτείνεται μέσα από τη βιβλιογραφία, το δεύτερο σετ το επιλέξαμε με συμπληρωματική προσθήκη των δυο βάσεων στην αλληλουχία του reverse primer, γιατί ο πρώτος primer με 20 βάσεις μόνο θεωρείται μικρός. Θεωρήσαμε ότι οι προηγούμενοι primers θα παρουσιάσουν πρόβλημα και κατά μία έννοια το δεύτερο σετ θα είναι βέλτιστο. Ύστερα από ελέγχους χρησιμοποιήσαμε το 1<sup>ο</sup> σετ εκκινήτων.

## 2.1.4 Επιλογή της πολυμεράσης

Επόμενο βήμα ήταν η επιλογή της πολυμεράσης που θα χρησιμοποιούσαμε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Από την εταιρεία KAPABIOSYSTEMS, η οποία διέθετε ένα ικανοποιητικό PCR kit, διαλέξαμε το KAPA HiFi Hotstart PCR Kit. Η πολυμεράση (KAPA HiFi DNA polymerase) δίνει τη δυνατότητα για ισχυρή ενίσχυση του PCR product, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τους κύκλους που απαιτούνται κατά τη διαδικασία του προγράμματος της PCR.

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανά 20 μl δείγματος PCR παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3 - Τελική συγκέντρωση ανά δείγμα PCR		
	Our final concentration	20 μl reaction
H <sub>2</sub> O		11.48
5x KAPA HiFi buffer	1x	4
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	0
KAPA dNTPs (10mM each in mix)	0.3 mM each	0.6
Forward primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.66
Reverse primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.66
Genomic DNA (10ng/μl)	10-100 ng	2.2
KAPA HiFi (1unit/μl)	1U/50μl reaction	0.4

- Ο KAPA HiFi buffer περιέχει 2mM MgCl<sub>2</sub> (1X).
- Τα KAPA dNTPs είναι τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (A, T, G, C).
- Το Genomic DNA είναι το γενωμικό DNA κάθε δείγματος.
- Οι primers αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl για τη διατήρηση της ακαριερότητας τους.
- Τα δείγματα DNA αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl για τη διατήρηση της ακαριερότητας τους.
- Όλα τα αντιδραστήρια διατηρούνταν σε θερμοκρασίες των -20 °C.

## 2.1.5 Gradient PCR

Για την ορθή εκτέλεση της PCR ακολουθήσαμε ένα Gradient PCR, ούτως ώστε να ταυτοποιήσουμε την βέλτιστη θερμοκρασία για την πρόσδεση των primers (Annealing Temperature) στο εκμαγείο DNA (Πίνακας 4).

Πίνακας 4 - Πρόγραμμα για Gradient PCR			
Step	Temperature	Duration	Cycles
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	98 °C	20 sec	30
Υβριδοποίηση των primers (Annealing)	60-75 °C	15 sec	
Επιμήκυνση (Extension)	72 °C	15-60 sec/kb	
Τελική Επιμήκυνση (Final Extension)	72 °C	1 min/kb	1

Χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από το δείγμα C65. Το δείγμα αυτό πολλαπλασιάστηκε σε 12 διαφορετικές θερμοκρασίες (annealing T<sub>m</sub>) από το πρώτο σετ primer και στις ίδιες 12 διαφορετικές θερμοκρασίες από το δεύτερο σετ, για να δούμε σε ποιες θερμοκρασίες και ποιο σετ εκκινητών δίνει πιο ευκρινή εικόνα πολλαπλασιασμένου DNA. Δημιουργήθηκαν δύο διαφορετικά MasterMix για κάθε σετ εκκινητών (Πίνακας 5).

Πίνακας 5 - Προετοιμασία των MasterMix				
	Our final concentration	20 µl reaction	Master Mix (1) for 13 samples	Master Mix (2) for 13 samples
H <sub>2</sub> O		11.48	149.24	149.24
5x KAPA HiFi buffer	1x	4	52	52
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	0	0	0
KAPA dNTPs (10mM each in mix)	0.3 mM each	0.6	7.8	7.8
Forward primer (10 pmol/µl) (10µM)	0.3 µM	0.66	8.58	8.58
Reverse primer (10 pmol/µl) (10µM)	0.3 µM	0.66	8.58	–
Reverse primer long (10 pmol/µl) (10µM)	0.3 µM	0.66	–	8.58
Genomic DNA (10ng/µl)	10-100 ng	2.2	28.6	28.6
KAPA HiFi (1unit/µl)	1U/50µl reaction	0.4	5.2	5.2

Οι θερμοκρασίες στις οποίες έγινε πρόσδεση των εκκινήτων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6 - Annealing Temperatures (°C)											
58.8	59.4	60.1	61.4	63	64.6	66.1	67.7	69.3	70.6	71	72

Το τελικό πρόγραμμα PCR που ακολουθήσαμε για πολλαπλασιασμό όλων των δειγμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7 - ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR			
Step	Temperature	Duration	Cycles
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη (Denaturation)	98 °C	20 sec	30
Υβριδοποίηση των primers (Annealing)	62.6 °C	15 sec	
Επιμήκυνση (Extension)	72 °C	15 sec	
Τελική Επιμήκυνση (Final Extension)	72 °C	2 min	1

Στο Gradient PCR ελέγχθηκε επίσης και η δράση του 5x GC Buffer, καθώς και του DMSO. Τελικά σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το 5x KAPA HiFi buffer.

Το φόρτωμα των δειγμάτων μετά από κάθε PCR γινόταν σε 2.5 – 3% agarose gel. Παρατηρήσαμε ότι κατά την οπτικοποίηση του gel σε έκθεση UV υπήρχαν πολλά απροσδιόριστα τμήματα για κάθε δείγμα και οι ζώνες που έπρεπε να προκύψουν δεν εμφανίζονταν καθαρά. Γι' αυτό το λόγο, επαναλήφθηκε 2 φορές ένα gradient PCR.

Η διαχωριστική ικανότητα συνέχιζε να μην είναι ικανοποιητική επειδή η διαφορά των γονοτύπων των δειγμάτων ήταν μόνο 27 base pairs. Αποφασίστηκε η χρήση της γέλης πολυακρυλαμίδιου για την ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων PCR.

### 2.1.6 Παρασκευή γέλης αγαρόζης (agarose gel)

Για την παρασκευή 1,5% agarose gel των 150 ml, υπολογίζω  $\frac{1,5 \cdot 150}{100} = 2,25$  gr αγαρόζης. Σε μια κωνική φιάλη των 250 ml ρίχνω την αγαρόζη και προσθέτω 150ml 1xTAE buffer. Τοποθετώ την φιάλη σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου τρία λεπτά. Βγάζω την κωνική φιάλη έξω από τα μικροκύματα. Περιμένω λίγα λεπτά και στη συνέχεια προσθέτω στο διάλυμα 8ml φθορίζουσας ουσίας (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain|BIOTIUM) για να έχουμε ορατά αποτελέσματα κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία του gel. Έπειτα ρίχνω το διάλυμα της αγαρόζης σε ένα δίσκο ηλεκτροφόρησης ειδικά σχεδιασμένο για να

πάρει το gel τη μορφή που θέλω και τοποθετώ τα χτενάκια, ώστε μετά την αφαίρεσή τους να σχηματιστούν τα πηγαδάκια που θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Αναμένω περίπου 30-60 min έως ότου σταθεροποιηθεί το gel για να συνεχίσω με το φόρτωμα των δειγμάτων.

### 2.1.7 Παρασκευή γέλης πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide gel)

Η συσκευή για την ηλεκτροφόρηση του gel πολυακρυλαμιδίου δόθηκε από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών – Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (από τον κο Μιχάλη Αλέξη και την κα Δήμητρα Μήτσιου) στο εργαστήριο ΕΜΥΒΓ αποκλειστικά για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Για την παρασκευή γέλης πολυακρυλαμιδίου ακολουθήσαμε βήμα προς βήμα τη μεθοδολογία και το πρωτόκολλο με τα απαραίτητα αντιδραστήρια (Green and Sambrook 2012). Τα υλικά που απαιτούνται για τη δημιουργία του gel είναι :

1. 5x TBE Buffer
2. dH<sub>2</sub>O (deionized water/απιονισμένο νερό)
3. Acrylamide:Bis-acrylamide Solution 29:1 (ακρυλαμίδιο)
4. TEMED
5. 10% Ammonium Persulfate (APS)

Όλα τα υλικά παρέχονται έτοιμα από πριν εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα 5x TBE Buffer. Για την παρασκευή του 5x TBE σε φιάλη 1 λίτρου χρειαζόμαστε:

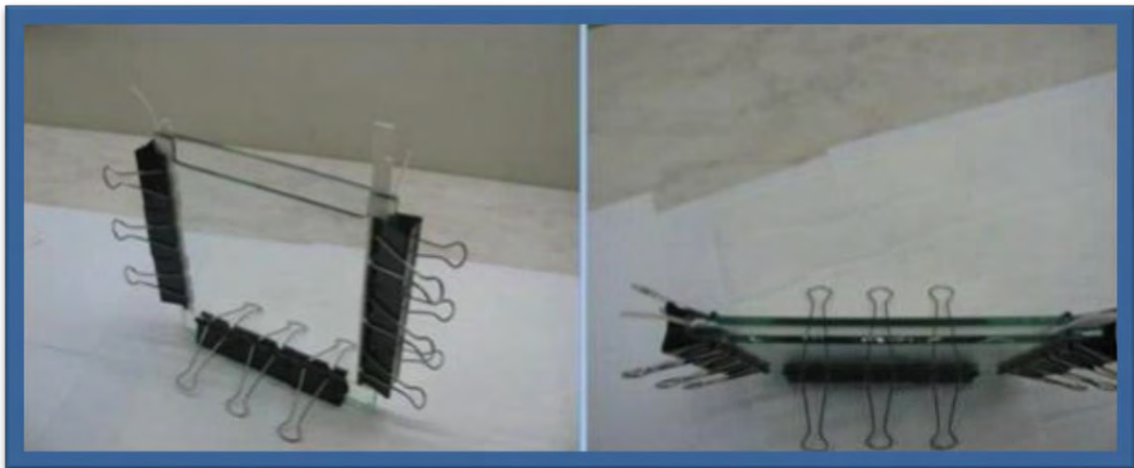
- 1) 54 gr Tris base
- 2) 27.5 gr Boric acid
- 3) 20 ml EDTA 5M pH8

Πίνακας 8 - Τελικές συγκεντρώσεις για τη δημιουργία του gel πολυακρυλαμιδίου					
Total volume	Acrylamide:Bisacrylamide	dH <sub>2</sub> O	5x TBE	APS	TEMED
100 ml	19.9 ml	59.4 ml	20 ml	0.7 gr	35 μl



Εικόνα 5 Γυλιά για την παρασκευή του polyacrylamide gel

Κατόπιν παρασκευάζουμε 6% gel πολυακρυλαμιδίου για συνολικό όγκο 100ml. Σε μια κωνική φιάλη των 250ml ρίχνουμε με τη σειρά ένα ένα τα αντιδραστήρια. Τέλος αναδεύουμε με γρήγορες κινήσεις και ρίχνουμε το περιεχόμενο ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες ηλεκτροφόρισης.



Εικόνα 6 Οι γυάλινες πλάκες της ηλεκτροφόρισης

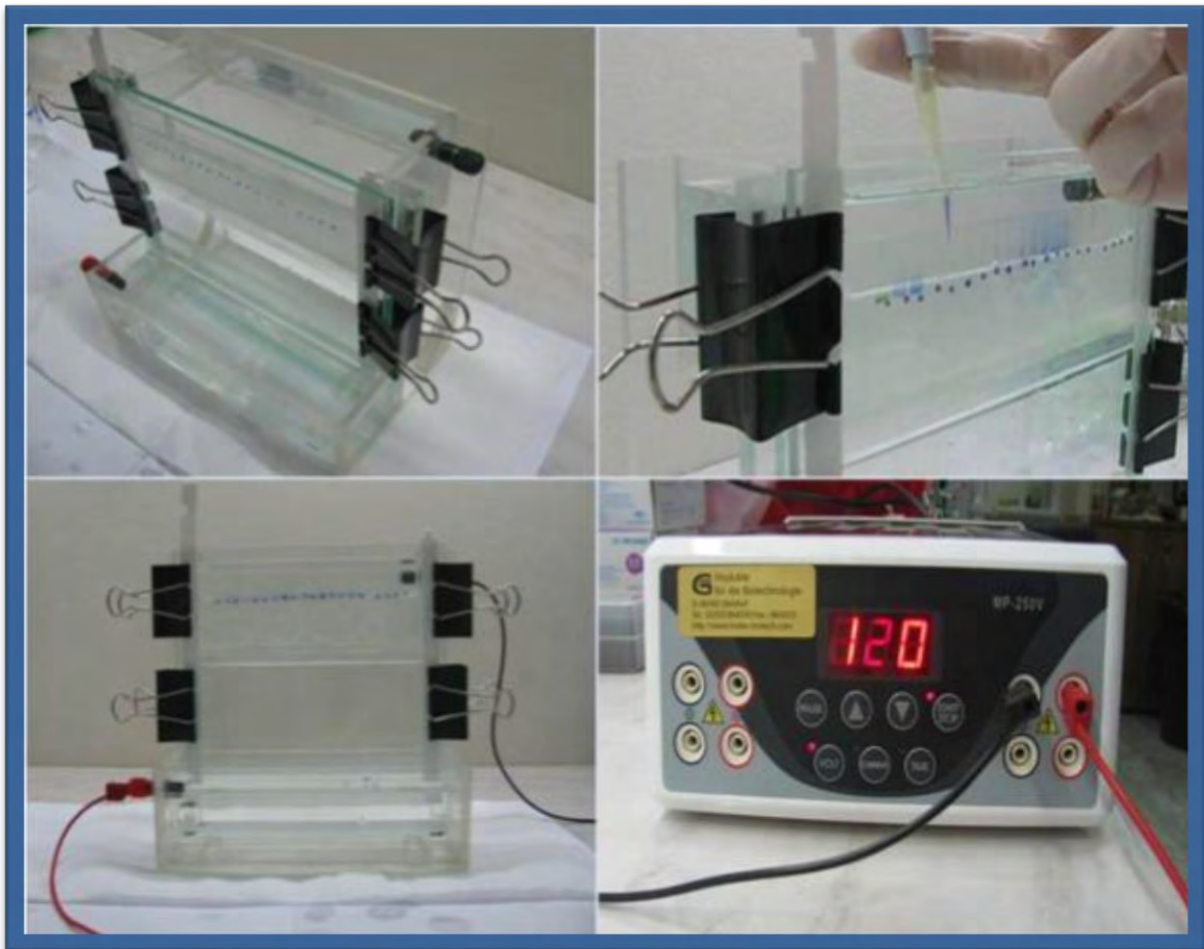
Εισάγουμε τα χτενάκια στην σχισμή των δύο πλακών για να σχηματιστούν τα πηγαδάκια και περιμένουμε περίπου 30-40min για να πολυμεριστεί το ακρυλαμίδιο.



## 2.1.8 Ηλεκτροφόριση του polyacrylamide gel

Τελευταίο στάδιο είναι ηλεκτροφόριση της γέλης πολυακρυλαμιδίου.

- ✓ Αφαιρούνται προσεκτικά τα χτενάκια από το gel για να μην καταστραφούν τα πηγαδάκια ή να αλλοιωθούν.
- ✓ Ενσωματώνονται οι γυάλινες πλάκες πάνω στην συσκευή ηλεκτροφόρισης.
- ✓ Γεμίζουμε τις δεξαμενές της συσκευής με 5x TBE Buffer και προσέχουμε να μην παρουσιάζεται διαρροή.
- ✓ Αφαιρούμε φυσαλίδες αέρα που τυχόν δημιουργήθηκαν στο κάτω μέρος του gel.
- ✓ Φορτώνουμε δείγματα.
- ✓ Ενώνουμε τον αρνητικό πόλο της γεννήτριας με το μαύρο καλώδιο και τον θετικό πόλο με το κόκκινο καλώδιο και εφαρμόζουμε σταθερή τάση 120V.



Εικόνα 7 Φόρτωση των δειγμάτων στο polyacrylamide gel και εφαρμογή τάσης 120V



## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ ΓΙΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

### 2.2.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ορθή διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης κύριο προαπαιτούμενο είναι η συγκέντρωση σχετικών δεδομένων από μελέτες που εκφράζουν ένα κοινό ερώτημα, ή με άλλα λόγια, η δημιουργία μιας *συστηματικής ανασκόπησης (systematic review)*. Η συστηματική ανασκόπηση βασίζεται σε ένα διατυπωμένο με σαφήνεια ερώτημα, αναγνωρίζει τις σχετικές έρευνες-μελέτες και αξιολογεί τα στοιχεία τους μέσω μιας ρητής μεθοδολογίας (Khan, *et al.* 2003). Τα στάδια μιας συστηματικής ανασκόπησης μπορούν αν διατυπωθούν σε πέντε βήματα:

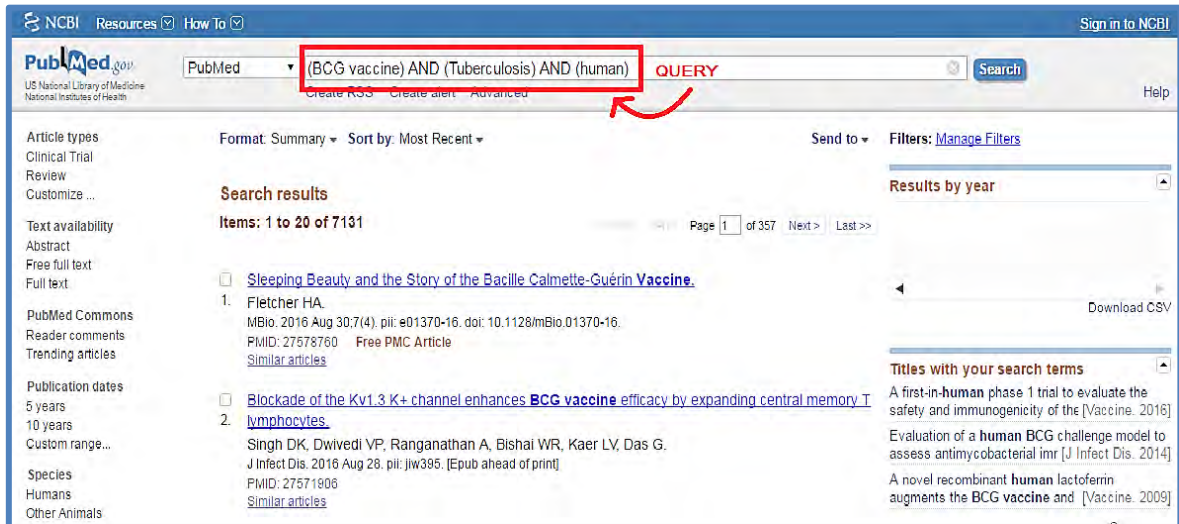
Βήμα 1 <sup>ο</sup>	Δημιουργία ερωτήματος για συστηματική ανασκόπηση βάση μιας αρχικής υπόθεσης
Βήμα 2 <sup>ο</sup>	Εύρεση και αναγνώριση σχετικών μελετών
Βήμα 3 <sup>ο</sup>	Εκτίμηση της ποιότητας των μελετών που βρέθηκαν
Βήμα 4 <sup>ο</sup>	Σύνοψη των δεδομένων
Βήμα 5 <sup>ο</sup>	Ερμηνεία αποτελεσμάτων

← **META-ΑΝΑΛΥΣΗ**

Σημαντικό κομμάτι της συστηματικής ανασκόπησης είναι η ανεύρεση ερευνητικών άρθρων που σχετίζονται με το προϋπάρχον ερώτημα της έρευνας.

Το σύνολο της πληροφορίας που σχετίζεται με την γενετική έχει αυξηθεί εντυπωσιακά. Οι υπολογιστές όμως παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διαχείριση αυτών των πληροφοριών σήμερα, χάρη στην πρόσβαση σε γενετικές βάσεις δεδομένων. Ένας αριθμός από σημαντικές και εξαιρετικά χρήσιμες γενετικές βάσεις δεδομένων βρίσκονται στο δικτυακό τόπο του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (NCBI, National Center for Biotechnological Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ένα από τα εργαλεία που διατίθενται στον δικτυακό τόπο του NCBI είναι η βάση δεδομένων PubMed. Η βάση δεδομένων PubMed διαθέτει συνδέσεις σε βιβλιογραφικές παραπομπές, περιλήψεις, καθώς και συνδέσεις σε δικτυακούς τόπους που περιέχουν άρθρα σε ηλεκτρονική μορφή από ερευνητικά περιοδικά. Η αναζήτηση γίνεται εισάγοντας όρους, ονόματα συγγραφέων ή και τίτλους άρθρων (Russel 2006).

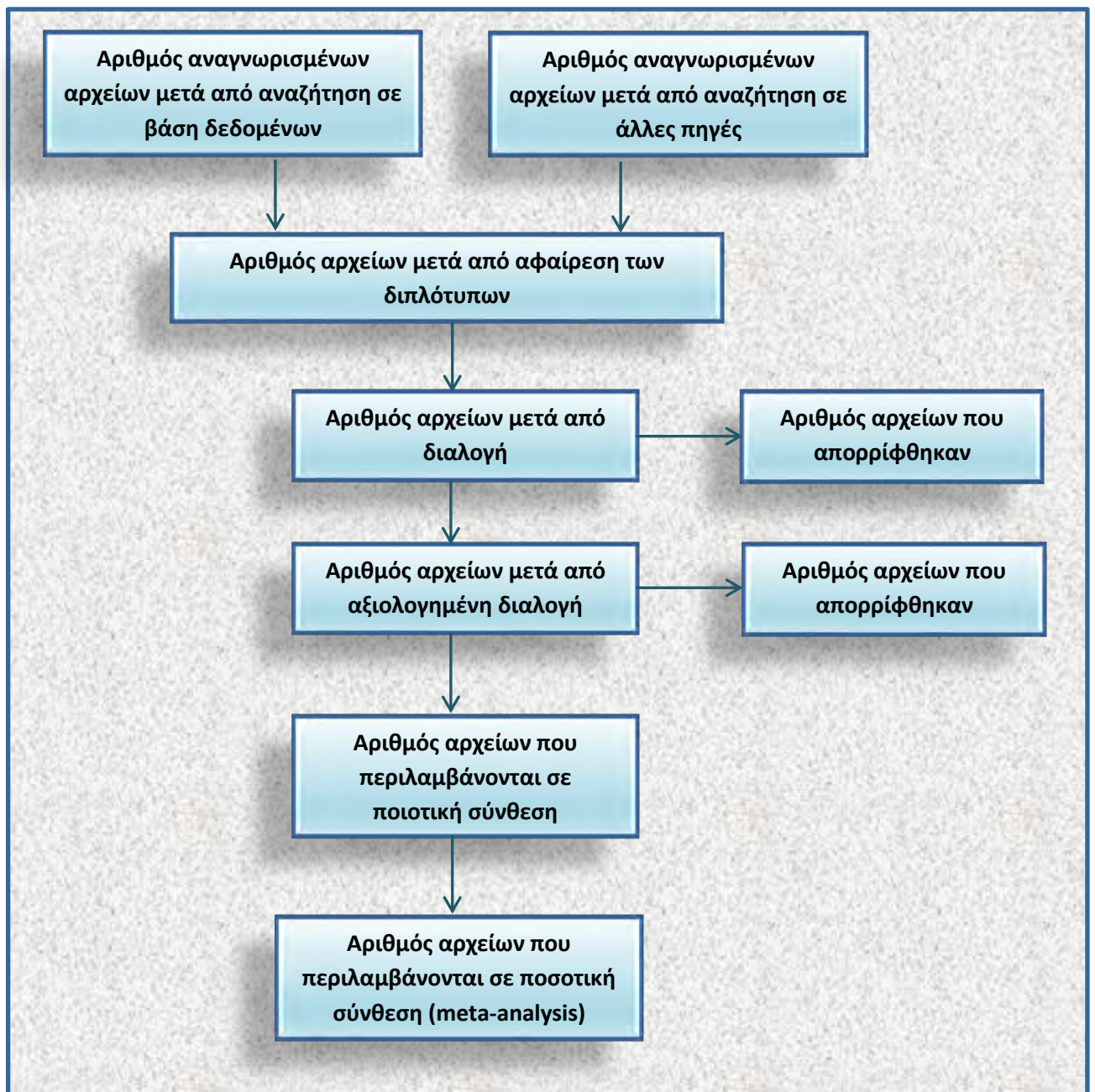
Εισάγοντας το κατάλληλο ερώτημα (query) στο search box της βάσης δεδομένων PubMed, εμφανίζονται αυτομάτως όλα τα σχετικά άρθρα που υπάγονται στη βάση δεδομένων προς μελέτη.



Εικόνα 8 Παράδειγμα αναζήτησης στη Βάση δεδομένων PubMed όταν εισάγεται σαν ερώτημα το query " (BCG VACCINE)AND(TUBERCULOSIS)AND(HUMAN) "

Στη συνέχεια, εφόσον έχει γίνει η σωστή διαλογή των μελετών, η καταγραφή των δεδομένων από τις διάφορες μελέτες μπορεί να συμπεριληφθεί σε φύλλα εργασίας (EXCEL). Η γενικευμένη ιδέα της συστηματικής ανασκόπησης μπορεί να παρουσιαστεί στο διάγραμμα ροής PRISMA (Εικόνα 9).

## Διάγραμμα Ροής Prisma για συστηματική ανασκόπηση



Εικόνα 9 Διάγραμμα ροής για συστηματική ανασκόπηση

## 2.2.2 Συγκέντρωση δεδομένων για Μετα-Ανάλυση

Για την διεξαγωγή της μετα-ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Pubmed με σκοπό την ανεύρεση ερευνητικών άρθρων σχετικά με την ασθένεια της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (PAH) σε συνδυασμό με το γονίδιο eNOS και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD) σε συνδυασμό με το γονίδιο eNOS. Σκοπός είναι ο εντοπισμός εκείνων των άρθρων στα οποία περιγράφεται η μελέτη ασθενών-μαρτύρων (case-control studies) και στη συνέχεια η καταχώρηση των αποτελεσμάτων κάθε έρευνας σε φύλλα δεδομένων (EXCEL). Ξεκινώντας λοιπόν, εισάγαμε στο search box της Pubmed συγκεκριμένα ερωτήματα (queries) τα οποία στη συνέχεια θα έδιναν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

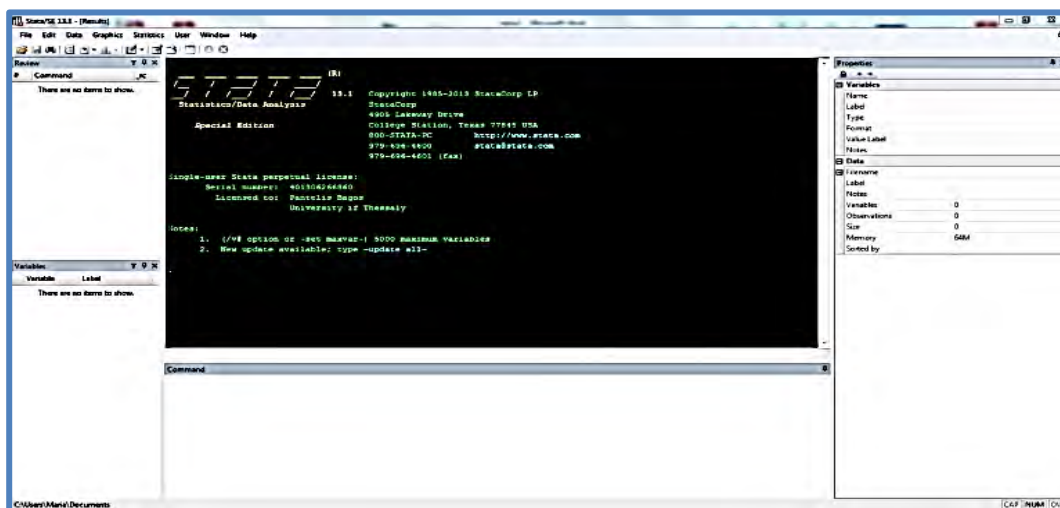
Για τον συνδυασμό eNOS και PAH, το *query 1* ήταν:

**("Nitric oxide synthase" OR NOS OR eNOS OR Nos3) AND ("Pulmonary Hypertension" OR PAH OR "Pulmonary Arterial Hypertension" OR "IDIOPATHIC Pulmonary Hypertension" OR "Primary Pulmonary Hypertension" OR hPAH OR hPH OR iPAH OR PPH) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP)**

Για τον συνδυασμό eNOS και COPD, το *query 2* ήταν:

**("Nitric oxide synthase" OR NOS OR eNOS) AND ("Chronic Obstructive Pulmonary Disease" OR COPD OR "chronic obstructive lung disease" OR COLD OR "chronic obstructive airway disease" OR COAD) AND (GENE OR MUTANT OR MUTATION OR VARIANT OR ALLELE OR POLYMORPHISM OR SNP)**

Κατόπιν χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATA 13 (Stata Corporation, Texas, USA) για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων της μετα-ανάλυσης.



Εικόνα 10 Το στατιστικό πακέτο STATA

## 2.2.3 Βασικές εκτιμήσεις κατά την Μετα-Ανάλυση

### 2.2.3.1 Μέγεθος επίδρασης – effect size

Για την διεξαγωγή της μετα-ανάλυσης πρέπει να οριστεί ένα μέγεθος επίδρασης. Το μέγεθος της επίδρασης είναι μία τιμή που αντικατοπτρίζει το μέγεθος της σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών. Στην παρούσα μελέτη ως μέγεθος επίδρασης ορίζεται το **Odds Ratio**, ή αλλιώς σχετικός λόγος πιθανοτήτων.

	Events	Non-Events	N
Cases	A	B	$n_1$
Controls	C	D	$n_2$

Θεωρούμε ότι τα δεδομένα ασθενών-μαρτύρων είναι διακριτά και κατανέμονται σε έναν πίνακα δυαδικών στοιχείων. Έτσι λοιπόν μπορεί να οριστεί το Odds Ratio ως η πιθανότητα να νοσήσει κάποιος που έχει εκτεθεί στον παράγοντα κινδύνου σε σύγκριση με την πιθανότητα να νοσήσει κάποιος ενώ δεν έχει εκτεθεί στον παράγοντα κινδύνου. Οι υπολογισμοί διεξάγονται σε λογαριθμική κλίμακα. Ο υπολογισμός του odds ratio ορίζεται ως εξής:

$$OddsRatio = \frac{AD}{BC}$$

Τότε ο λογάριθμος του Odds Ratio ορίζεται:

$$LogOddsRatio = \ln(OddsRatio) ,$$

με προσεγγιστική διακύμανση:

$$V_{LogOddsRatio} = \frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}$$

και τυπικό σφάλμα:

$$SE_{LogOddsRatio} = \sqrt{V_{LogOddsRatio}} .$$

Τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης υπολογίζονται ως εξής:

$$LL_{LogOR} = LogOR - 1.96 * SE_{LogOR}$$

και

$$UL_{LogOR} = LogOR + 1.96 * SE_{LogOR} ,$$

όπου LL(lower limit) είναι το κάτω όριο και UL(upper limit) είναι το άνω όριο εμπιστοσύνης.

Τέλος, υπολογίζεται μια τιμή Z για να ελεγχθεί η μηδενική υπόθεση ότι η μέση επίδραση είναι 0:

$$Z = \frac{\text{LogOR}}{SE_{\text{LogOR}}}$$

(Borenstein, *et al.* 2009)

### 2.2.3.2 Μοντέλα σταθερών και τυχαίων επιδράσεων

Είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε το μοντέλο επίδρασης, βάσει του οποίου διεξάγεται η μετα-ανάλυση. Υπάρχουν δύο μοντέλα επίδρασης:

- το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (*fixed effects model*). Σε αυτό το μοντέλο λαμβάνουμε υπόψιν την ύπαρξη ομογένειας σε όλη την έκταση των μελετών που συνδυάζονται. Εδώ τα δεδομένα ομαδοποιούνται κατά τη μέθοδο των Mantel-Haenszel (Mantel and Haenszel 1959).
- το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (*random effects model*). Σε αυτό το μοντέλο λαμβάνουμε υπόψιν την ύπαρξη ετερογένειας. Κάθε μελέτη εκφράζει ένα διαφορετικό μέγεθος επίδρασης και τα δεδομένα ομαδοποιούνται κατά την μέθοδο των DerSimonian-Laird (DerSimonian and Laird 1986).

### 2.2.3.3 Κριτήριο ετερογένειας Q

Το κριτήριο Q (Q-statistic) είναι η μέτρηση που βασίζεται σε δοκιμασία  $\chi^2$  για την εκτίμηση της ετερογένειας κατά μήκος των μελετών που περιλαμβάνονται για μετα-ανάλυση. Το μέγεθος της επίδρασης κάθε μελέτης συγκρίνεται με την συγκεντρωτική εκτίμηση (Cook, Mulrow and Haynes 1997). Ο τύπος που για τον υπολογισμό του Q είναι :

$$Q = \sum_{i=1}^k W_i (Y_i - M)^2$$

όπου  $W_i$  είναι το βάρος της μελέτης,  $Y_i$  είναι το μέγεθος επίδρασης της μελέτης,  $M$  η συνολική επίδραση και  $k$  ο αριθμός των μελετών (Borenstein, *et al.* 2009).

Επίσης ορίζονται οι βαθμοί ελευθερίας (*degrees of freedom*) :

$$df = k - 1$$

,όπου  $k$  ο αριθμός των μελετών.

### 2.2.3.4 p-value

Προκειμένου να διαπιστώσουμε κατά πόσο συσχετίζεται ο πολυμορφισμός A/B του γονιδίου eNOS με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, ελέγχουμε τη λεγόμενη μηδενική υπόθεση (*null hypothesis*). Η τιμή Q και οι βαθμοί ελευθερίας  $df$  που ορίστηκαν παραπάνω



συντελούν για να προσδιοριστεί η πιθανότητα *p-value*. Αν το *p-value* είναι μικρότερο από 0.05, τότε μπορούμε να πούμε ότι αληθεύει η αρχική υπόθεση, δηλαδή υπάρχει συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ασθένεια. Ειδάλλως απορρίπτεται η αρχική υπόθεση.

### 2.2.3.5 Υπολογισμός του $\tau^2$

Η παράμετρος  $\tau^2$  είναι η διακύμανση των ενδιάμεσων μελετών. Η μέθοδος των DerSimonian-Laird παρουσιάζει τον τύπο για τον υπολογισμό του  $\tau^2$  :

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

,όπου C είναι:

$$C = \sum Wi - \frac{\sum Wi^2}{\sum Wi}$$

(Borenstein, *et al.* 2009)

### 2.2.3.6 Υπολογισμός του $I^2$

Η τιμή  $I^2$  περιγράφει το ποσοστό επί τοις εκατό της συνολικής διακύμανσης μεταξύ των διαφόρων μελετών που οφείλεται στην ετερογένεια (Higgins, *et al.* 2003). Ο τύπος για τον υπολογισμό του  $I^2$  είναι:

$$I^2 = \left( \frac{Q - df}{Q} \right) * 100\%$$

Εάν η τιμή του  $I^2$  κυμαίνεται κοντά στο μηδέν, τότε αυτό είναι ένδειξη για χαμηλή ετερογένεια. Αντίθετα αν είναι πολύ μεγάλη, τότε πρέπει να εξεταστεί η εμφάνιση διακύμανσης εφαρμόζοντας μεθόδους όπως η μετα-παλινδρόμηση (Borenstein, *et al.* 2009).

### 2.2.3.7 Έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης

Ένας επιπρόσθετος έλεγχος που εφαρμόστηκε κατά την μετα-ανάλυση είναι ο έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (*publication bias*). Το σφάλμα δημοσίευσης ορίζει ότι οι μελέτες με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα είναι πιο πιθανό να δημοσιευτούν σε σχέση με τις μελέτες που δεν έχουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Εφαρμόζονται δύο μέθοδοι για αυτόν τον έλεγχο, το τεστ του Begg και το τεστ του Egger.

### 2.2.3.8 Έλεγχος για ισορροπία Hardy-Weinberg

Όταν έγινε η συλλογή των δεδομένων για μετα-ανάλυση ελέγξαμε αν τα δεδομένα κάθε μελέτης βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Η ισορροπία Hardy-Weinberg είναι μία

αρχή που ορίζει ότι οι γονοτυπικές συχνότητες σε ένα πληθυσμό θα παραμείνουν αμετάβλητες από γενιά σε γενιά απουσία εξωτερικών παραγόντων. Θέτουμε την συχνότητα εμφάνισης του αλληλομορφου A ως  $p$  και τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλομορφου B ως  $q$ . Προκύπτουν αντίστοιχα οι τιμές των γονοτυπικών συχνοτήτων  $f(AA) = p^2$ ,  $f(BB) = q^2$  και  $f(AB) = pq$ .

Αν το άθροισμα  $(p + q)^2 = p^2 + q^2 + 2pq = 1$  ισοδυναμεί με τη μονάδα τότε μπορούμε να πούμε ότι ο πληθυσμός που εξετάζουμε βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg (Gelehrter, Collins and Ginsburg 1998).

## 2.2.4 Οι εντολές του STATA

Πίνακας 9 - Οι βασικές εντολές για μετα-ανάλυση με τη χρήση του STATA	
<b>genetate</b> <b>replace</b>	Η εντολές <b>generate</b> και <b>replace</b> χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν νέες μεταβλητές και για να τροποποιήσουν το περιεχόμενο των ήδη υπάρχουσων μεταβλητών, αντίστοιχα.
<b>metan</b>	Είναι η εντολή που παρουσιάζει τη συγκεντρωτική στατιστική ανάλυση σε συνδυασμό με ένα forest plot. Η συγκέντρωση των odds ratios, logORs και τυπικών σφαλμάτων (standard errors) ενσωματώνονται βάσει δύο μετα-αναλυτικών μεθόδων, τα μοντέλα σταθερών επιδράσεων (fixed effects model) και τα μοντέλα τυχαίων επιδράσεων (random effects model). Στο forest plot παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάθε μελέτης, τα οποία εμφανίζονται με ένα τετράγωνο πάνω σε μία ευθεία γραμμή. Το τετράγωνο αντιπροσωπεύει το βάρος της επίδρασης της μελέτης και η ευθεία το διάστημα εμπιστοσύνης. Η συνολική επίδραση όλων των μελετών καθώς και το συγκεντρωτικό διάστημα εμπιστοσύνης συνοψίζονται σε έναν ρόμβο. (Ross, <i>et al.</i> 2008)
<b>metabias gr(b)</b>	Με αυτή την εντολή ελέγχεται ο κίνδυνος εμφάνισης <i>συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης</i> κατά τους Begg and Mazumdar (Begg and Mazumdar 1994). Εκτελείται ένα προσαρμοσμένο τεστ βαθμού συσχέτισης ανάμεσα στις αρχικές προβλέψεις εκτιμήσεων (logOR) και στις διακυμάνσεις τους (SE_logOR). Τα αποτελέσματα της εντολής απεικονίζονται σε ένα funnel plot όπου ελέγχεται η συμμετρία των δεδομένων πάνω στο γράφημα. Η παρουσία ασυμμετρίας στο πάνω μέρος του γραφήματος, όπου απεικονίζονται μελέτες με υψηλό τυπικό σφάλμα, μπορεί να δώσει ένδειξη για σφάλμα δημοσίευσης (Steichen 1998).
<b>metabias gr(e)</b>	Με αυτή την εντολή ελέγχεται ο κίνδυνος εμφάνισης <i>συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης</i> κατά τους Egger και συνεργάτες (Egger, <i>et al.</i> 1997). Εκτελείται ένα τεστ γραμμικής παλινδρόμησης ανάμεσα σε σταθερές εκτιμήσεις αποτελεσμάτων ( $\log OR/se_{\log OR}$ ) και ακρίβειας ( $1/se_{\log OR}$ ). Για να αποφευχθεί συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης πρέπει η ευθεία παλινδρόμησης να τέμνει τον άξονα των x, δηλαδή η τιμή 0 να περιλαμβάνεται στο τελικό διάστημα εμπιστοσύνης, καθώς και να υπάρχει συμμετρία ως προς την κατανομή των αποτελεσμάτων αυτών γύρω από την ευθεία (Steichen 1998).

<b>metareg</b>	Εάν διαπιστωθεί η <i>ύπαρξη ετερογένειας</i> στην επίδραση των μεταξύ τους μελετών, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της μετα-παλινδρόμησης (metaregression) για την ανάλυση του συσχετισμού που εξετάζεται σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά των μελετών. Η μετα-παλινδρόμηση μπορεί να εκτελεστεί στο STATA με την εντολή <b>metareg</b> (Sharp 1998).
<b>metacum</b>	Η εντολή <b>metacum</b> παρέχει αθροιστικές συγκεντρωτικές εκτιμήσεις, όρια εμπιστοσύνης, και μια δοκιμή, ότι η πραγματική συγκεντρωτική επίδραση είναι μηδενική είτε προέρχεται από μοντέλο σταθερών επιδράσεων είτε από τυχαίων επιδράσεων (Sterne 1998). Προερατικά, δημιουργεί ένα γράφημα που απεικονίζει αθροιστικά συγκεντρωτικές εκτιμήσεις, όπως παρουσιάζεται στο άρθρο των Lau <i>et al.</i> (Lau, Antman, <i>et al.</i> 1992).
<b>metatrend</b>	Η εντολή <b>metatrend</b> εκτελεί μία αθροιστική μετα-ανάλυση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο τυχαίων επιδράσεων των DerSimonian και Laird (Lau, Schmid and Chalmers 1995). Στη συνέχεια πραγματοποιεί δύο δοκιμές για να εκτιμηθεί το φαινόμενο του Πρωτέα ( <i>Proteus phenomenon</i> ), δηλαδή η εμφάνιση μιας πρόωρης ακραίας πρόβλεψης που διαψεύδεται από μεταγενέστερες έρευνες. Η πρώτη μέθοδος είναι η αποκαλούμενη προσέγγιση «first vs. subsequent» (Ioannidis and Trikalinos 2005). Η δεύτερη μέθοδος επικαλείται την εκτέλεση παλινδρόμησης με χρήση γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων (GLS) (Bagos and Nikolopoulos 2009).
<b>metainf</b>	Η εντολή <b>metainf</b> εξετάζει την επίδραση μιας μελέτης στη συνολική εκτίμηση της μετα-ανάλυσης. Αυτή η εντολή εμφανίζει γραφικά τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης σε ένα γράφημα ράβδων, παραλείποντας μια μελέτη κάθε φορά σε κάθε επανάληψη. (Tobias 1999)

**Πίνακας 10 - Οι παραγόμενες μεταβλητές κατά την εκτέλεση των εντολών**

<b>_ES</b>	Effect size	Μέγεθος επίδρασης, για την παρούσα μελέτη είναι το Odds Ratio (OR)
<b>_seES</b>	Standard error of effect size	Τυπικό σφάλμα του OR
<b>_selogES</b>	Standard error of log ES	Τυπικό σφάλμα του log(OR)
<b>_LCL</b>	Lower Confidence limit for ES	Κάτω όριο εμπιστοσύνης του OR
<b>_UCL</b>	Upper Confidence limit for ES	Άνω όριο εμπιστοσύνης του OR
<b>_WT</b>	Study percentage weight	Ποσοστό επί τοις εκατό του βάρους της μελέτης
<b>_SS</b>	Study sample size	Μέγεθος δείγματος της μελέτης

Πίνακας 11 - Επιπρόσθετες επιλογές κατά την εκτέλεση των εντολών	
<b>or</b>	Γίνεται ομαδοποίηση των Odds Ratios.
<b>fixed</b>	Καθορίζει τη χρήση μοντέλου σταθερών επιδράσεων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Mantel και Heansznel.
<b>random</b>	Καθορίζει τη χρήση μοντέλου τυχαίων επιδράσεων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των DerSimonian και Laird.
<b>eform</b>	Χρησιμοποιείται για να προβάλλει σε γράφημα το αποτέλεσμα μιας εντολής .
<b>xlab (.1, 1, 10)</b>	Δίνει όρια στον άξονα των x για να προβάλλει μια μεταβλητή σε γράφημα που θα παίρνει τιμές από 0.1, 1 έως και 10.
<b>label (namevar=author)</b>	Αλλάζει την ετικέτα namevar σε author, ώστε να προβάλλονται τα στοιχεία του συγγραφέα κάθε μελέτης στον κατακόρυφο άξονα ενός γραφήματος.
<b>eff (f)</b>	Με αυτήν την επιλογή εκτελούνται όλοι οι υπολογισμοί με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων (fixed effects model). Αλλάζοντας την επιλογή σε <u>eff(r)</u> εκτελούνται όλοι οι υπολογισμοί με χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων (random effects model).
<b>wsse</b>	Η συγκεκριμένη επιλογή χρησιμοποιείται κατά την εκτέλεση της εντολής metareg. Συνοπολογίζει το τυπικό σφάλμα μελέτης ( <i>within study standard error</i> ) για τους σχετικούς ελέγχους.
<b>Level (95)</b>	Υποδηλώνει το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

## 2.2.5 Εκτέλεση εντολών με χρήση του STATA

Οι εντολές που χρησιμοποιήθηκαν εκτελέστηκαν στο command line του στατιστικού πακέτου STATA. Λήφθηκαν υπόψη το συνεπικρατές (*B vs. A*), υπολειπόμενο (*BB vs. AA+AB*) και επικρατές (*BB+AB vs. AA*) μοντέλο κληρονομικότητας. Χρησιμοποιήθηκε ένα σετ εντολών και για τις τρεις ομάδες ασθενών-μαρτύρων. Για κάθε μια από τις τρεις ομάδες εξετάσαμε και τα τρία μοντέλα κληρονομικότητας ως προς τον πολυμορφισμό A/B του γονιδίου eNOS.

### Συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (Codominant)

```
generate oral=log(( allelebcases* alleleacontrols)/( alleleacases*
allelebcontrols))
replace oral=log(((0.5+ allelebcases)*(0.5+ alleleacontrols))/((0.5+
alleleacases)*(0.5+ allelebcontrols))) if allelebcases==0|
alleleacontrols==0| alleleacases==0|allelebcontrols==0
generate stdor=sqrt(1/ allelebcases+1/ alleleacases+1/ allelebcontrols+1/
alleleacontrols)
replace stdor=sqrt(1/( allelebcases+0.5)+1/( alleleacases+0.5)+1/(
allelebcontrols+0.5)+1/( alleleacontrols+0.5)) if allelebcases==0|
alleleacases==0| allelebcontrols==0| alleleacontrols==0
metan allelebcases allelebcontrols alleleacases alleleacontrols, or
random sortby(date) label(namevar=author,yearvar=date) xlab(0.1,1,3)
metabias oral stdor, gr(b)
metabias oral stdor, gr(e)
metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)
metacum oral stdor, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
metatrend oral stdor
metaninf oral eform label(namevar=author)
```

### Υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας (Recessive)

```
generate oral=log(( casesbb* controlaaab)/( controlsbb* casesaaab))
replace oral=log(((0.5+ casesbb)*(0.5+ controlaaab))/((0.5+
controlsbb)*(0.5+ casesaaab))) if casesbb==0| controlaaab==0|
controlsbb==0| casesaaab==0
generate stdor=sqrt(1/ casesbb+1/ casesaaab+1/ controlsbb+1/ controlaaab)
replace stdor=sqrt(1/( casesbb+0.5)+1/( casesaaab+0.5)+1/(
controlsbb+0.5)+1/( controlaaab+0.5)) if casesbb==0|controlaaab==0|
controlsbb==0| casesaaab==0
metan casesbb controlsbb casesaaab controlaaab , or random
sortby(date) label(namevar=author,yearvar=date) xlab(0.1,1,3)
metabias oral stdor, gr(b)
metabias oral stdor, gr(e)
metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)
metacum oral stdor, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
metatrend oral stdor
metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)
```

## Επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (Dominant)

```
generate oral=log(( casesbbab* controlsaa)/( controlbbab* casesaa))
replace oral=log(((0.5+ casesbbab)*(0.5+
controlsaa))/((0.5+controlbbab)*(0.5+ casesaa))) if casesbbab==0|
controlsaa==0| controlbbab==0| casesaa==0
generate stdor=sqrt(1/ casesaa+1/ casesbbab+1/ controlsaa+1/ controlbbab)
replace stdor=sqrt(1/( casesaa+0.5)+1/(
casesbbab+0.5)+1/(controlsaa+0.5)+1/( controlbbab+0.5)) if casesbbab==0|
controlsaa==0|controlbbab==0| casesaa==0
metan casesbbab controlbbab casesaa controlsaa , or random
sortby(date) label(namevar=author,yearvar=date) xlab(0.1,1,3)
metabias oral stdor, gr(b)
metabias oral stdor, gr(e)
metareg oral stdor, level(95) wsse(stdor)
metacum oral stdor, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(author) eform
metatrend oral stdor
metaninf oral stdor,random eform label(namevar=author)
```

## 2.3 Cochran-Armitage Trend Test

Παράλληλα με τις εντολές της μετα-ανάλυσης διεξήχθη και ένα επιπλέον τεστ, το Cochran Armitage trend test (CATT). Είναι μια μέθοδος για πρόβλεψη του μοντέλου κληρονομικότητας (Cochran 1954) (Armitage 1955) που ελέγχει γραμμική συσχέτιση ανάμεσα σε δύο μεταβλητές. Για την παρούσα μελέτη είναι τα γονοτυπικά δεδομένα ως προς τις ομάδες ασθενών-μαρτύρων (Bagos 2013). Διατυπώνεται ένα *Z-test*. Θεωρούμε ότι τα δεδομένα κατανέμονται σε έναν πίνακα μεταβλητών ως εξής:

Contingency Table with the distribution of cases and controls				
	AA(g <sub>0</sub> )	AB(g <sub>1</sub> )	BB(g <sub>2</sub> )	Total
Cases	$r_0$	$r_1$	$r_2$	$r$
Controls	$s_0$	$s_1$	$s_2$	$s$
Total	$n_0$	$n_1$	$n_2$	$n$

Ο τύπος για τον υπολογισμό του *Z-score* λαμβάνοντας υπόψη τη μηδενική υπόθεση (H<sub>0</sub>) είναι:

$$Z_{CATT(x)} = \frac{U_x}{\sqrt{\text{var}_{H_0}(U_x)}} = \frac{\sqrt{n} \sum_{i=0}^2 x_i (sr_i - rs_i)}{\sqrt{rsn \left[ n \sum_{i=0}^2 x_i^2 n_i - \left( \sum_{i=0}^2 x_i n_i \right)^2 \right]}} \sim N(0, 1)$$

Η κωδικοποίηση  $x_i = (0, 1/2, 1)$  αντιστοιχεί στον έλεγχο για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας ( $Z_{CATT(1/2)}$ ). Η κωδικοποίηση  $x_i = (0, 1, 1)$  αντιστοιχεί στον έλεγχο για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας ( $Z_{CATT(1)}$ ). Η κωδικοποίηση  $x_i = (0, 0, 1)$  αντιστοιχεί στο υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας ( $Z_{CATT(0)}$ ). Με το CATT test έγινε υπολογισμός των *Z-scores* ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας, επικρατές και υπολειπόμενο για τη μέθοδο τυχαίων επιδράσεων.

### 2.3.1 Η μέθοδος MAX

Πολλές προσεγγίσεις έχουν προταθεί για την εφαρμογή αξιόπιστων μεθόδων (robust analysis) που θα ανιχνεύουν το υποβόσκον μοντέλο κληρονομικότητας, εφαρμόζοντας αναλυτικές μεθόδους με χαμηλό επίπεδο σφαλμάτων. Το τεστ MAX βασίζεται στην ιδέα ότι γίνεται δοκιμή για όλα τα πιθανά μοντέλα κληρονομικότητας και τέλος επιλέγεται εκείνο με το μεγαλύτερο score κατά απόλυτη τιμή (Freidlin, *et al.* 2002).

$$Z_{MAX} = \max(|Z_{CATT(0)}|, |Z_{CATT(1/2)}|, |Z_{CATT(1)}|)$$

Έγινε εφαρμογή των δύο παραπάνω μεθόδων με χρήση του στατιστικού πακέτου STATA  
13. Οι εντολές που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων είναι:

```
ssc install integrate
gen snp=1
gvar controlsaa controlsab controlsbb casesaa casesab casesbb,snp(snp)
method(add) effect(r)
gvar controlsaa controlsab controlsbb casesaa casesab casesbb,snp(snp)
method(dom) effect(r)
gvar controlsaa controlsab controlsbb casesaa casesab casesbb,snp(snp)
method(rec) effect(r)
gvar controlsaa controlsab controlsbb casesaa casesab casesbb,snp(snp)
method(max) effect(r)
```



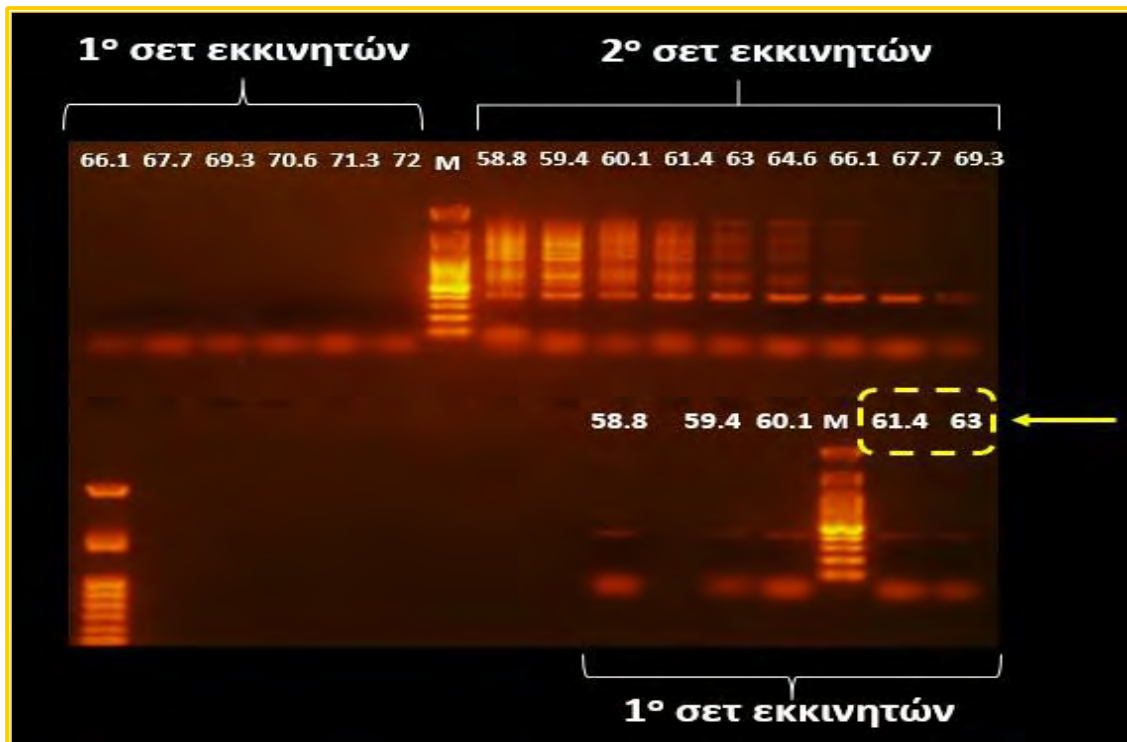
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Γονοτυπική ανάλυση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS στο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού

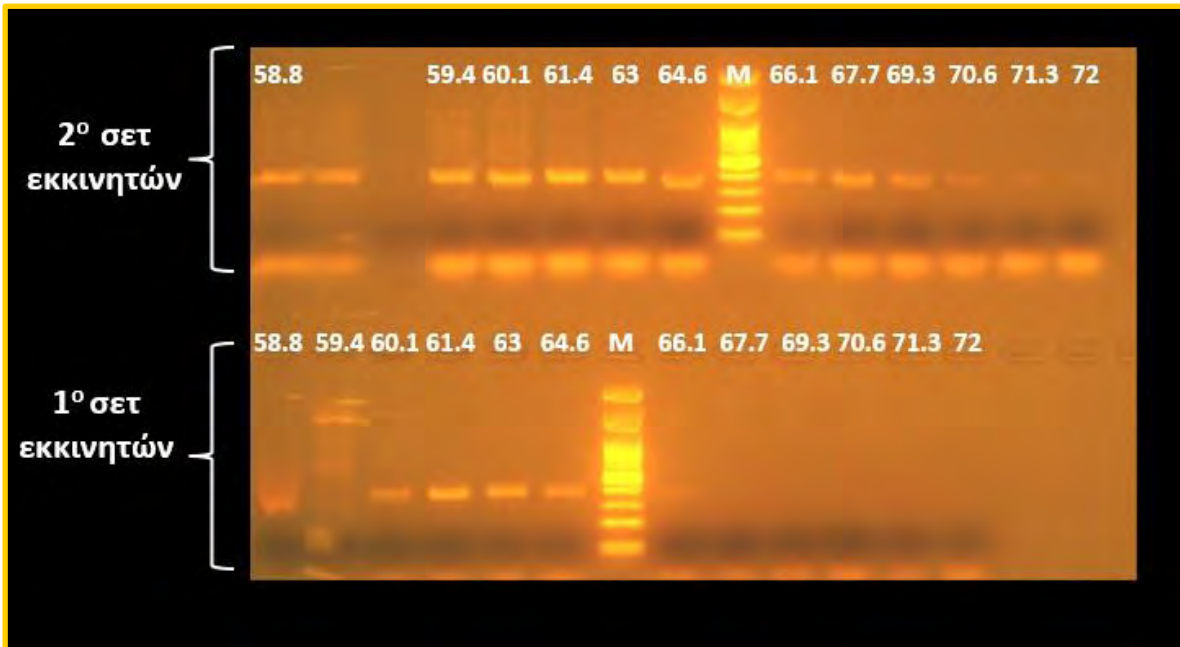
#### 3.1.1 Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών

Έγινε γονοτυπική ανάλυση για τον προσδιορισμό A/B του γονιδίου eNOS σε 88 δείγματα ασθενών και 88 δείγματα μαρτύρων από Ελλάδα.

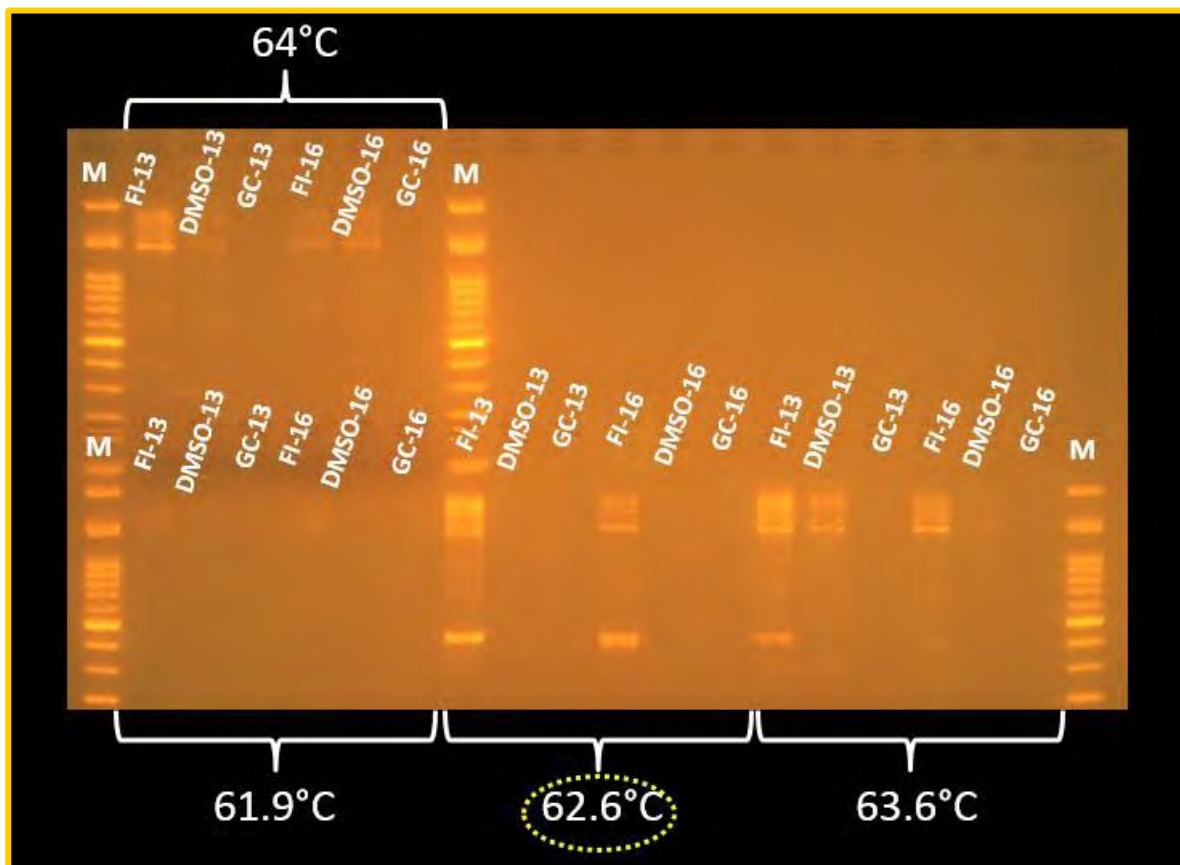
Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing T<sub>m</sub>) πραγματοποιήθηκε gradient PCR. Η επιλογή του σετ εκκινητών έγινε με το πρώτο gradient PCR (εικόνα 11). Ικανοποιητικό πολλαπλασιασμό είχαμε με το 1<sup>ο</sup> σετ εκκινητών, οπότε επιλέχθηκε αυτό. Υπολογίσαμε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών ήταν μεταξύ 61.4 - 63 °C (εικόνα 11, 12). Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δράση του DMSO, του 5x GC buffer και του KAPA HiFi buffer σε gradient PCR για τα δείγματα C13 και C16 (εικόνα 13). Τελικά, επιλέχθηκε ο KAPA HiFi buffer και η θερμοκρασία υβριδοποίησης (annealing temperature) οι 62.6 °C.



Εικόνα 11 πρώτο Gradient PCR με δείγμα C65



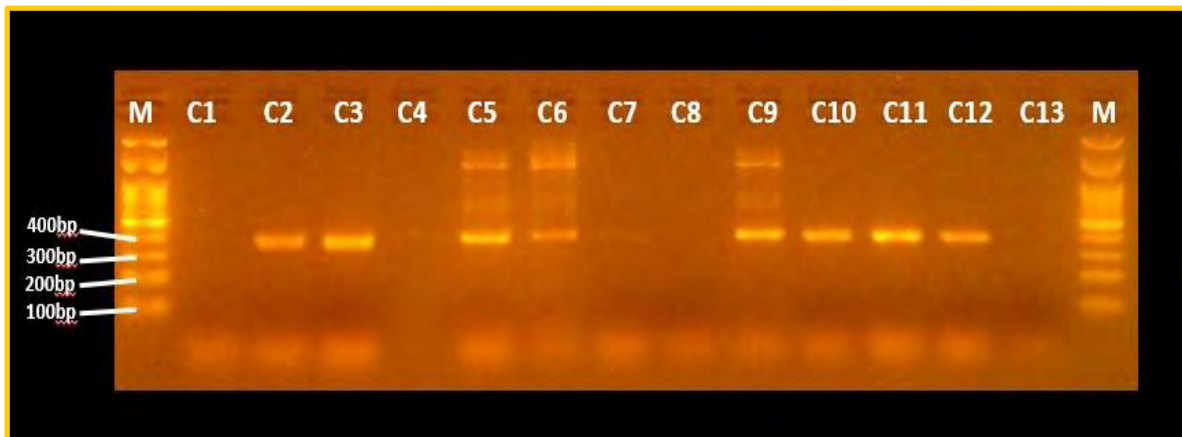
Εικόνα 12 δεύτερο Gradient PCR με δείγμα C65



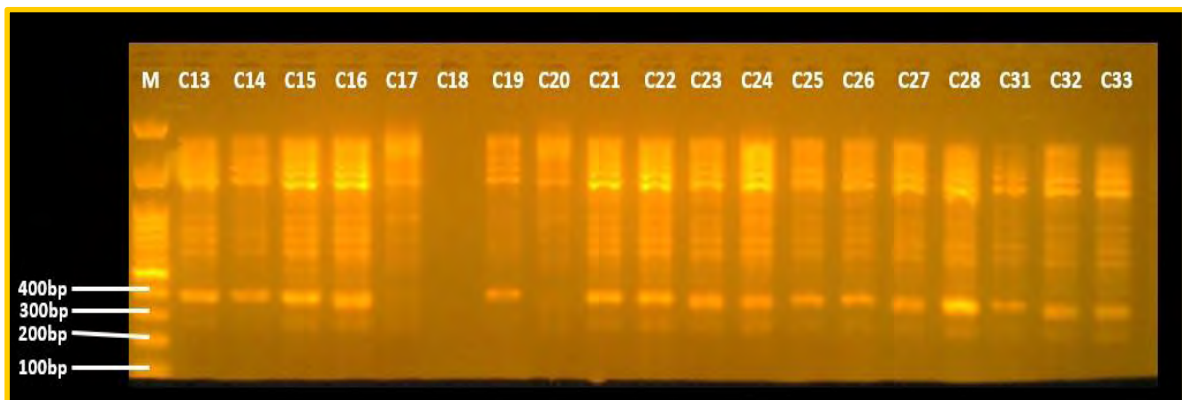
Εικόνα 13 τρίτο Gradient PCR με δείγματα C13 και C16

### 3.1.2 Προσδιορισμός γονοτύπων σε γέλη αγαρόζης

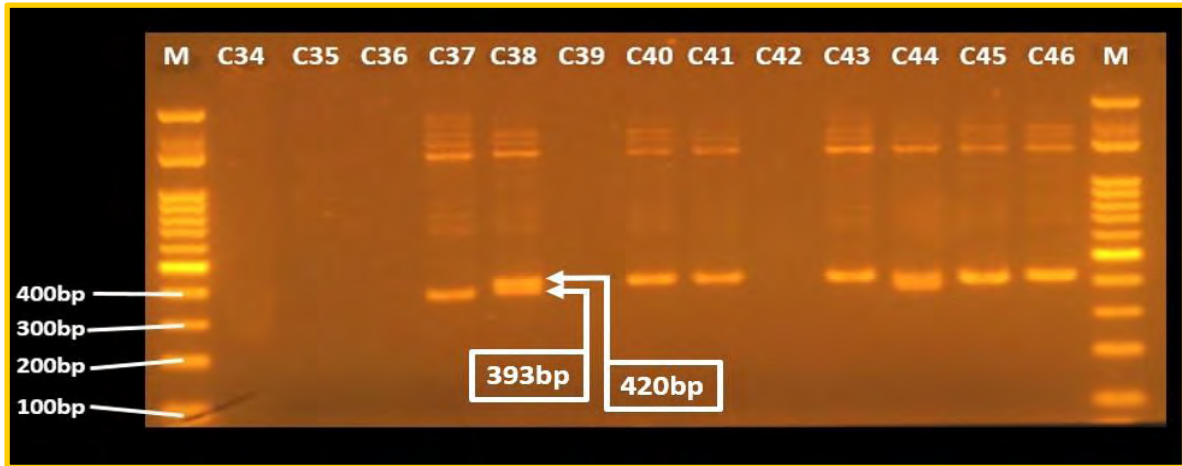
Καταρχήν, επιλέχθηκε να ηλεκτροφορηθούν τα δείγματα σε 2.5 και 3% γέλη αγαρόζης. Επειδή οι γονότυποι των δεγμάτων θα διέφεραν μόνο κατά 27 βάσεις (τμήματα 393 και 420 bp) επιλέχθηκε αυτή η μεγάλη συγκέντρωση αγαρόζης λόγω της μεγαλύτερης διακριτικής/ διαχωριστικής ικανότητας σε σχέση με το σύνηθες 1%. Όπως φαίνονται και στις εικόνες 14, 15, 16 η διάκριση γονοτύπων AB από BB είναι ιδιαίτερα δύσκολη (ουσιαστικά φαίνεται μόνο στην εικόνα 16).



Εικόνα 14 2.5% agarose gel δείγματα C1 – C13



Εικόνα 15 3% agarose gel δείγματα C13 – C33

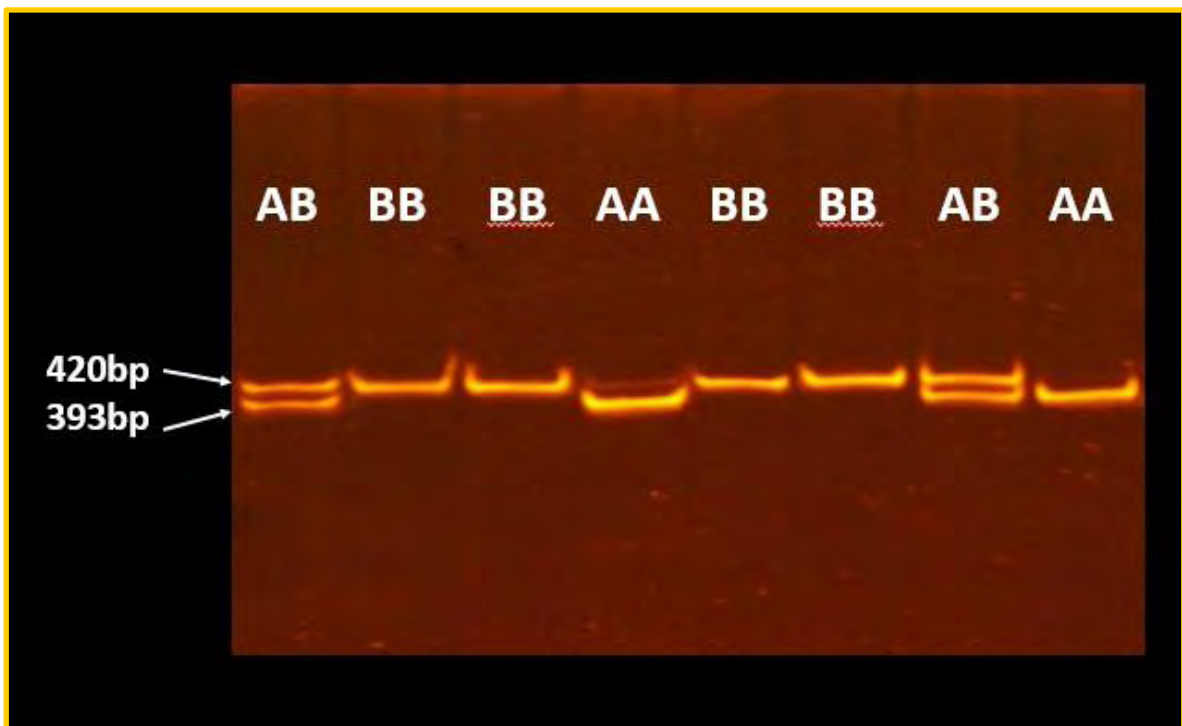


Εικόνα 16 2.5% agarose gel δείγματα C34 – C46

Γι'αυτό αποφασίστηκε η χρήση γέλης πολυακρυλαμιδίου 6% που έχει ακόμα μεγαλύτερη διαχωριστική/ διακριτική ικανότητα.

### 3.1.3 Προσδιορισμός γονοτύπων σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

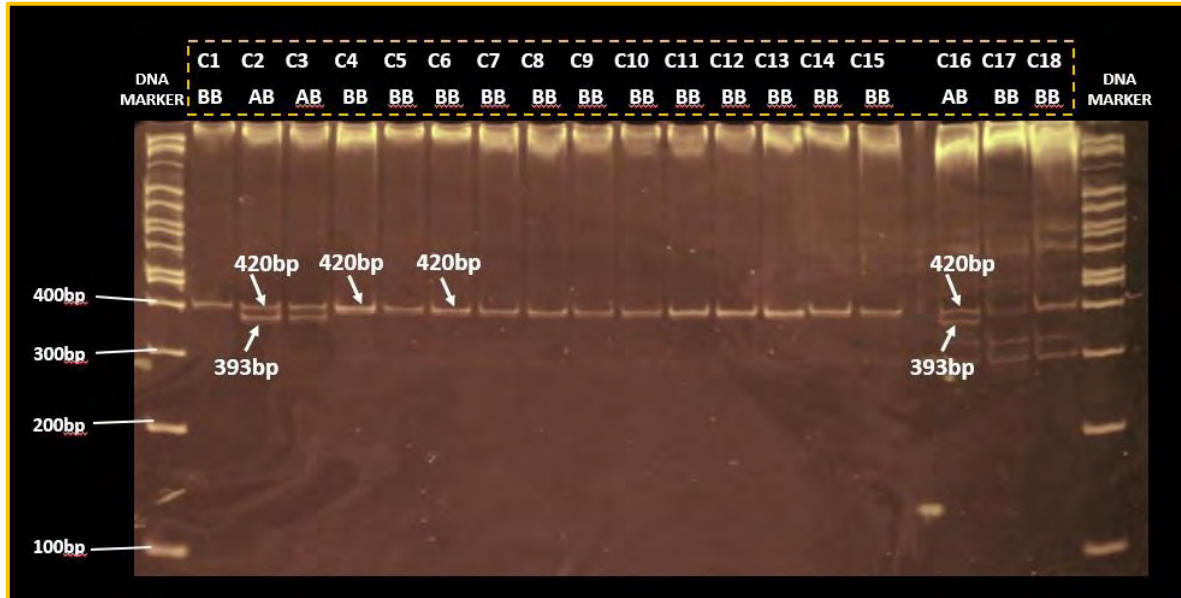
Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε gel πολυακρυλαμιδίου μπορέσαμε να διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις. Τα ενισχυμένα προϊόντα PCR του eNOS πολυμορφισμού θα εμφανίζονται ως μία μπάντα (μία γραμμή) σε ένα ομόζυγο άτομο και ως δύο μπάντες (δύο γραμμές) σε ένα ετερόζυγο άτομο (εικόνα 17).



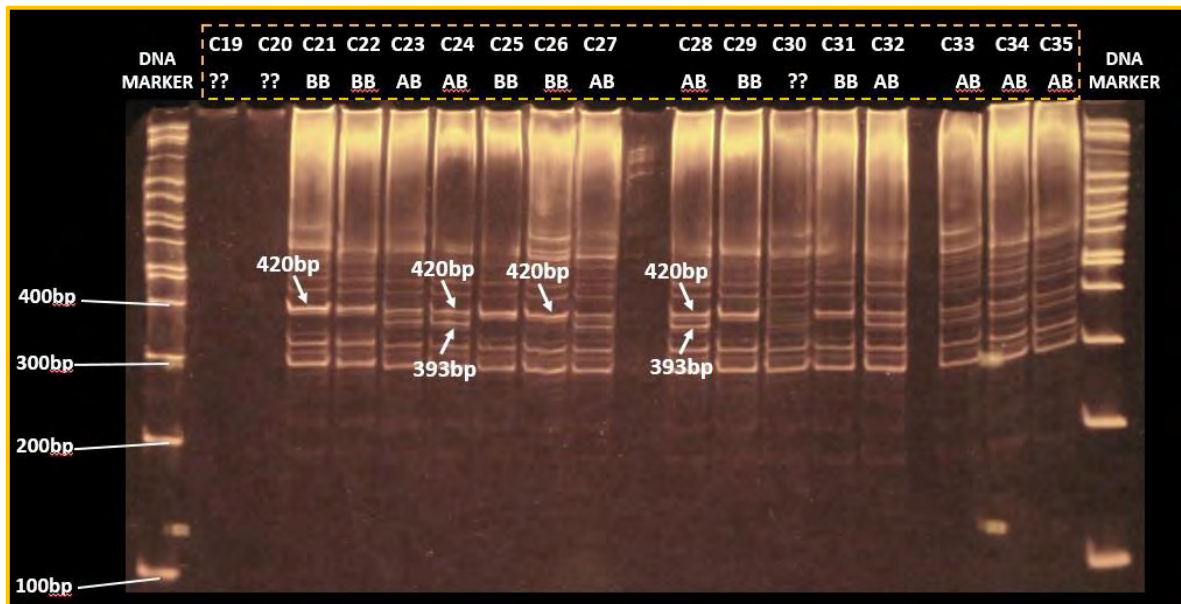
Εικόνα 17 Αποτελέσματα μετά από ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε polyacrylamide gel

Με αυτόν τρόπο καταφέραμε να καταγράψουμε τον γονότυπο κάθε δείγματος για τον πολυμορφισμό A/B του γονιδίου eNOS.

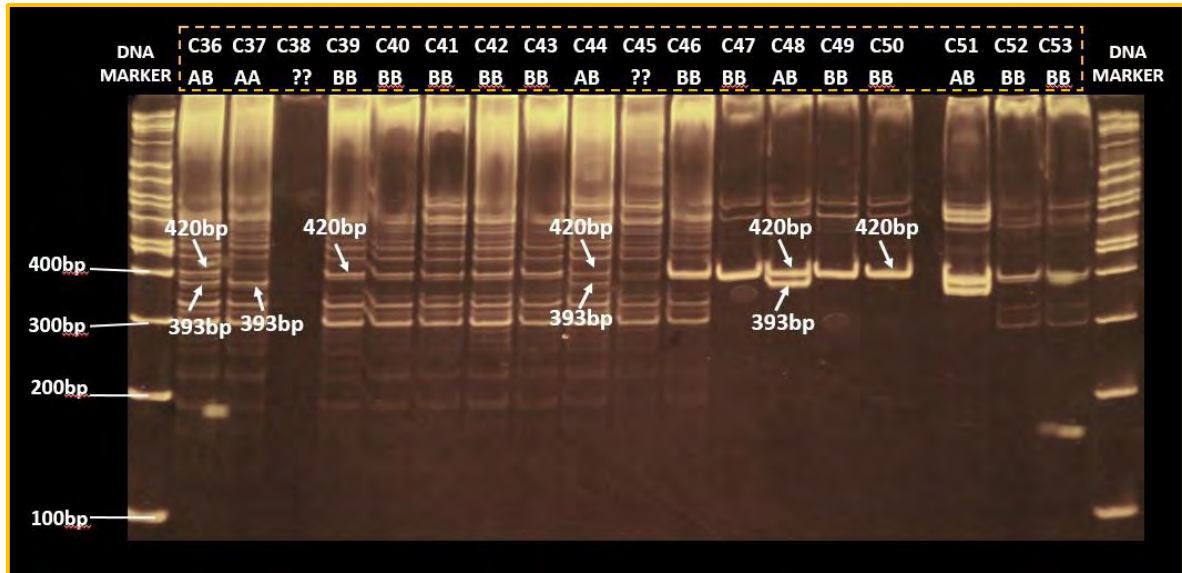
Οι γονότυποι μετά από ηλεκτροφόρηση κάθε δείγματος σε gel πολυακρυλαμιδίου παρουσιάζονται στις εικόνες 18 έως 30.



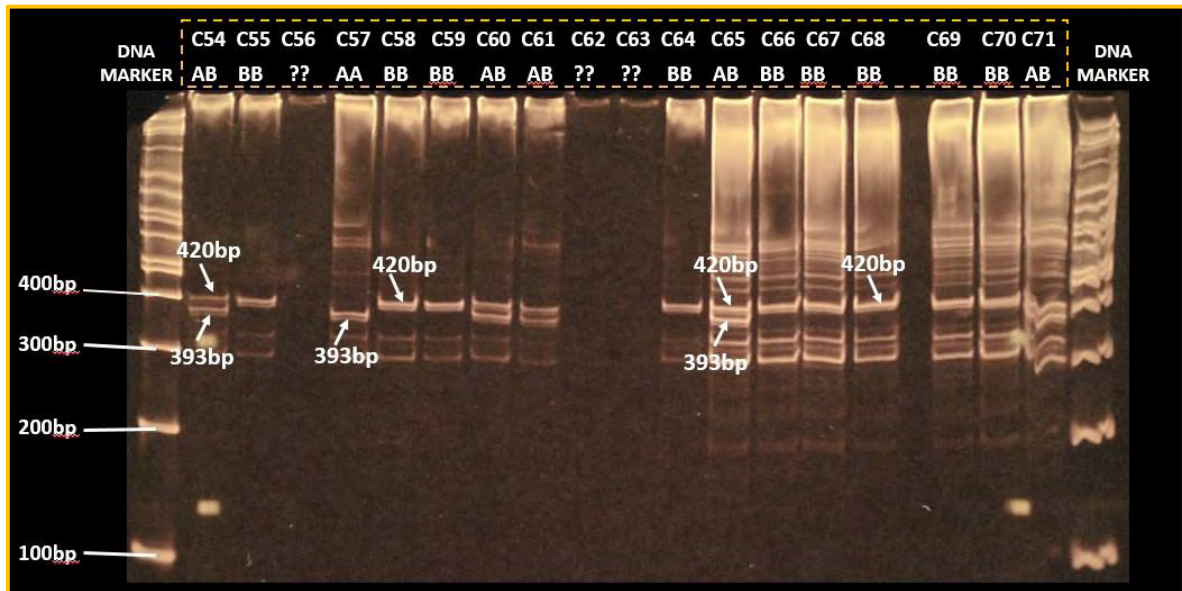
Εικόνα 18 polyacrylamide gel - δείγματα C1 έως C18



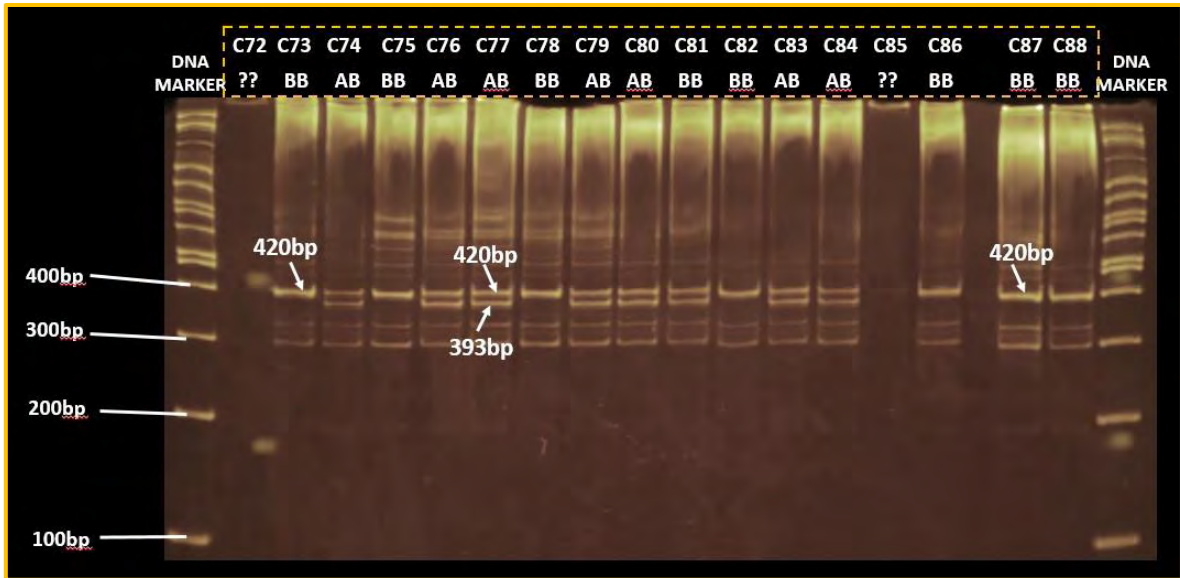
Εικόνα 19 polyacrylamide gel - δείγματα C19 έως C35



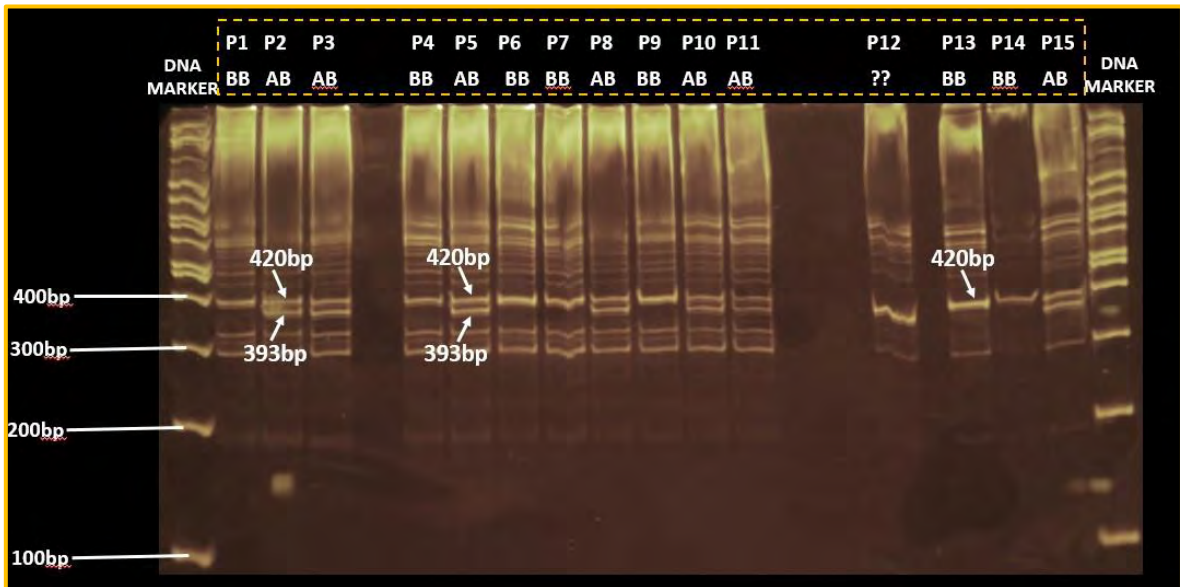
Εικόνα 20 polyacrylamide gel - δείγματα C36 έως C53



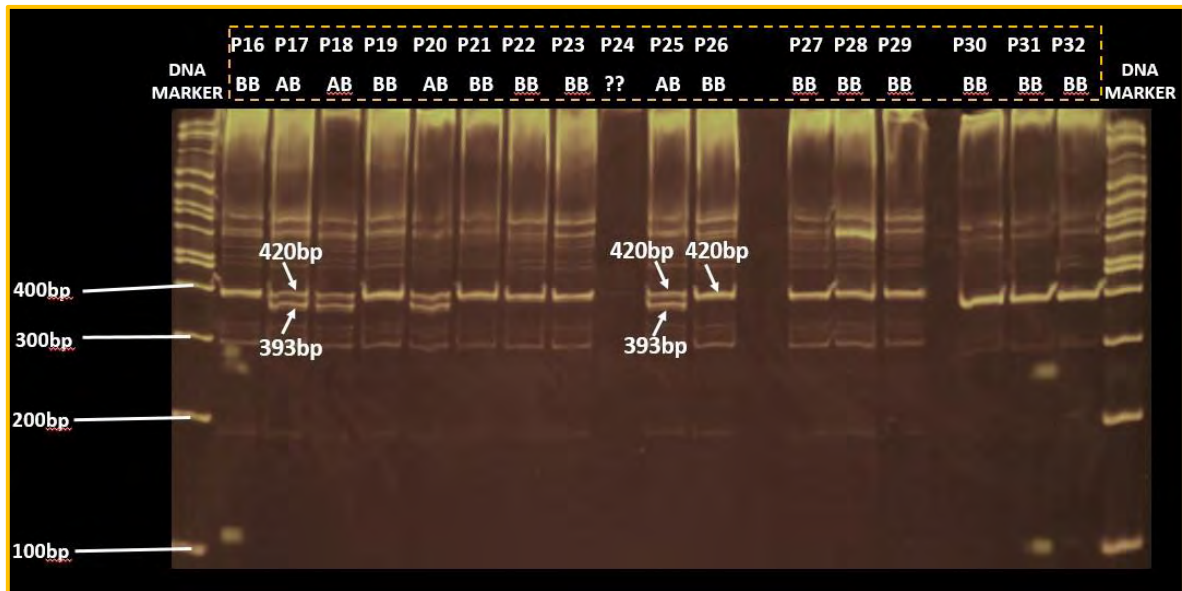
Εικόνα 21 polyacrylamide gel - δείγματα C54 έως C71



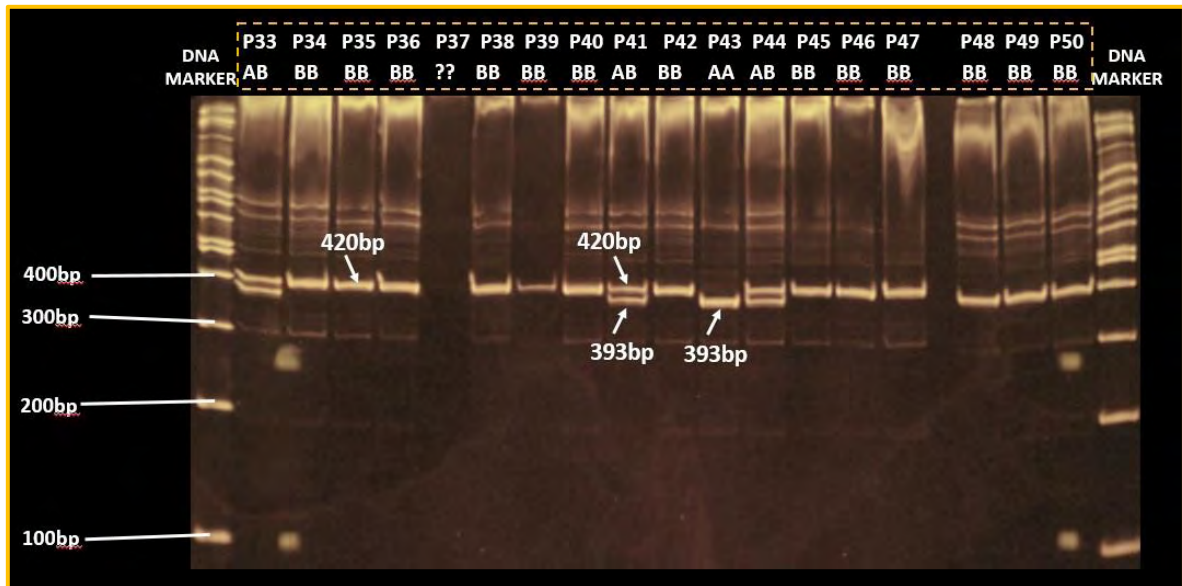
Εικόνα 22 polyacrylamide gel - δείγματα C72 έως C88



Εικόνα 23 polyacrylamide gel - δείγματα P1 έως P15

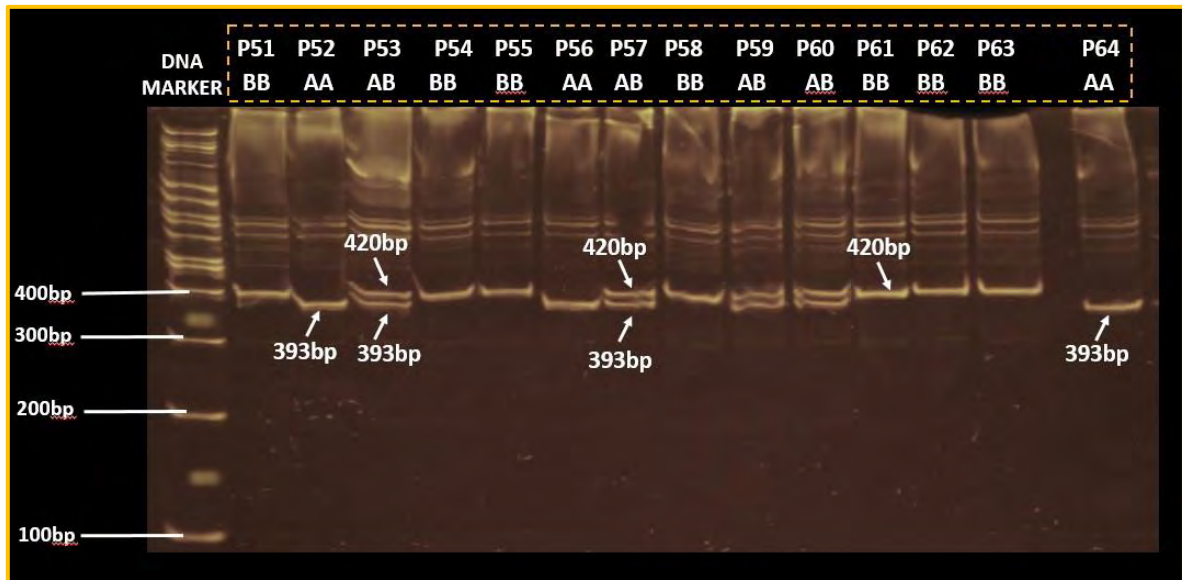


Εικόνα 24 polyacrylamide gel - δείγματα P16 έως P32

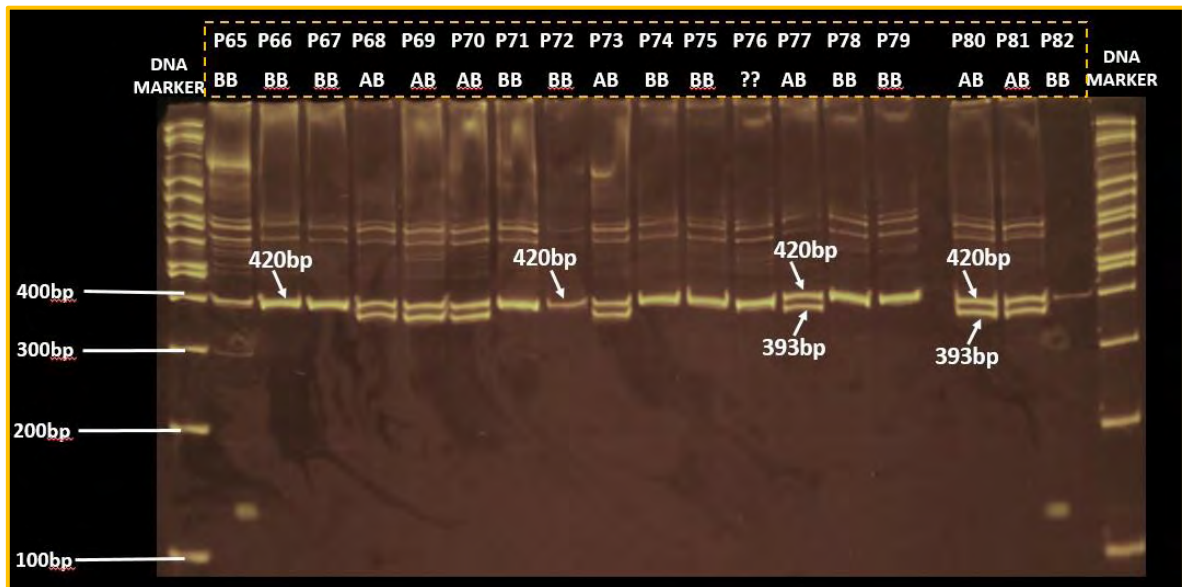


Εικόνα 25 polyacrylamide gel - δείγματα P33 έως P50

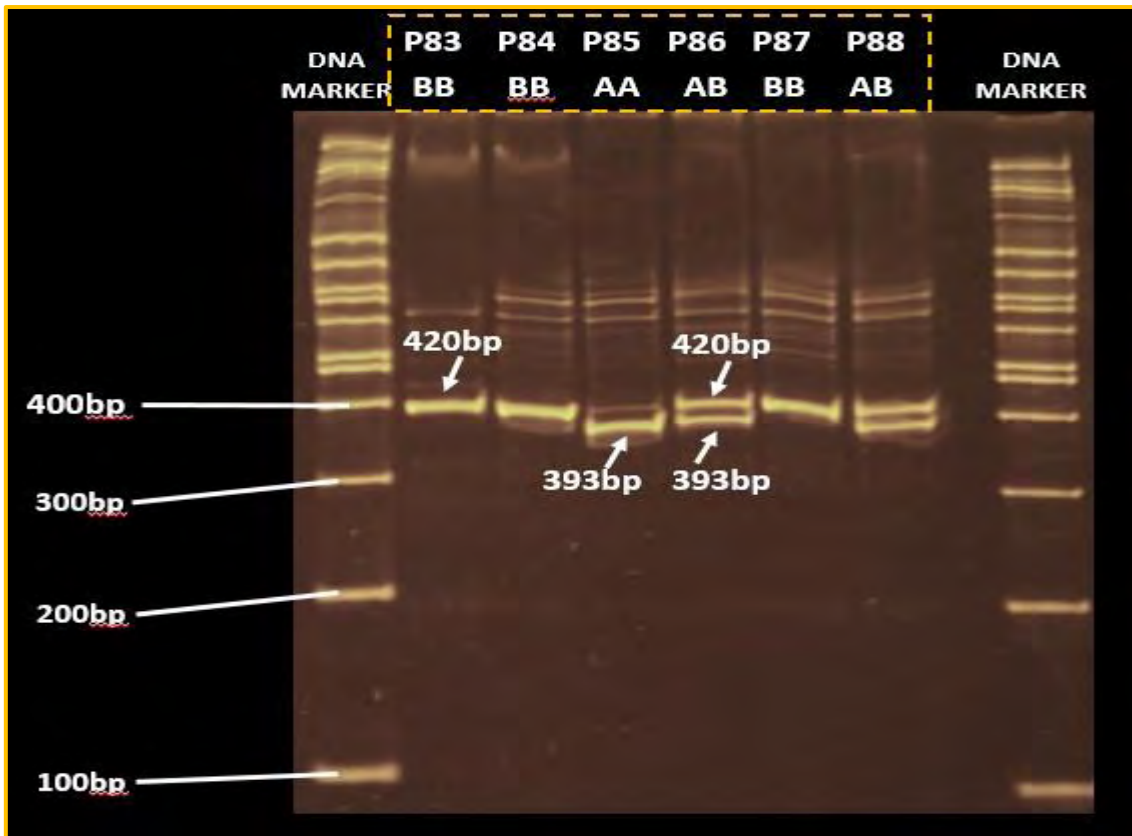




Εικόνα 26 polyacrylamide gel - δείγματα P51 έως P64



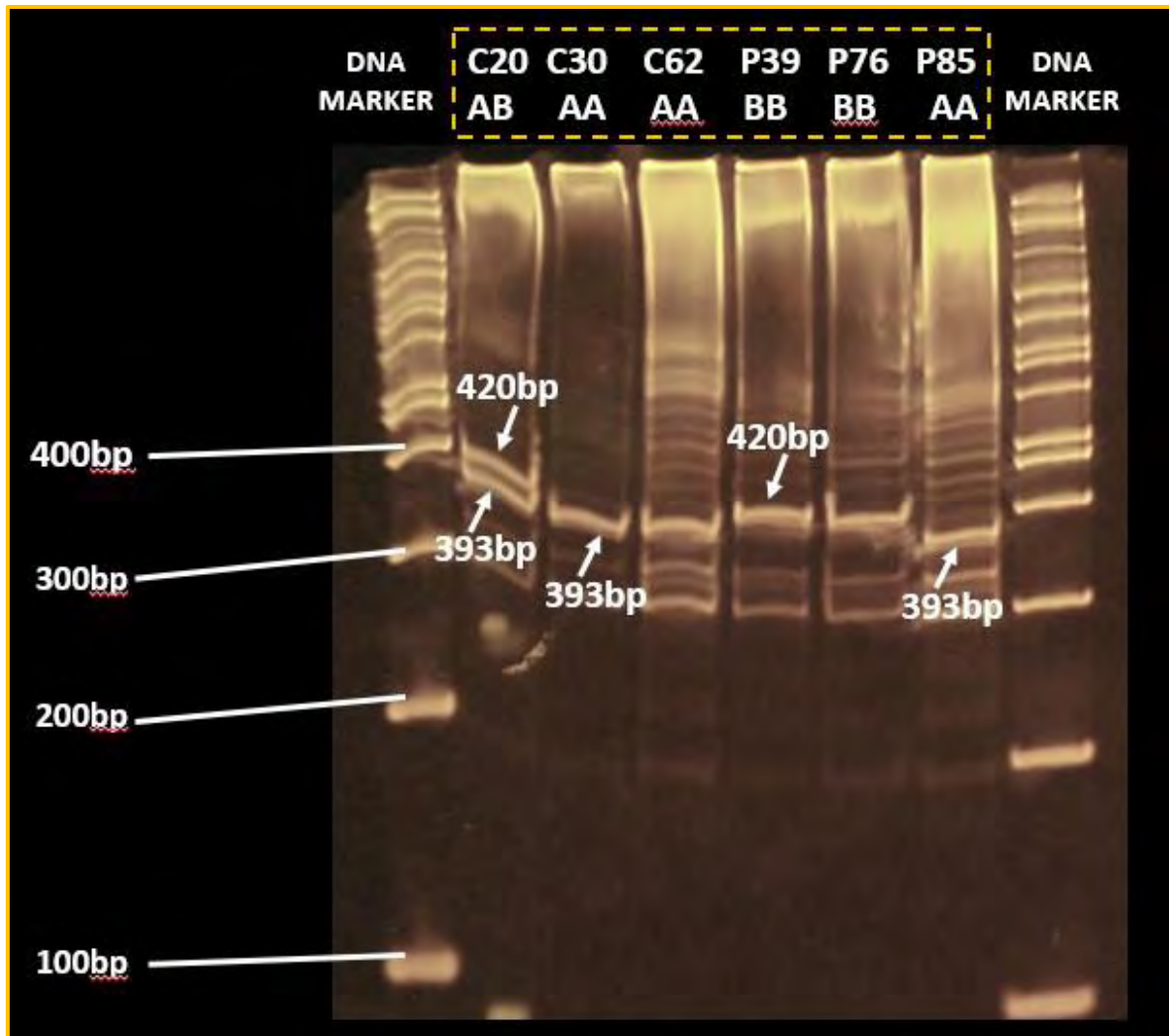
Εικόνα 27 polyacrylamide gel - δείγματα P65 έως P82



Εικόνα 28 polyacrylamide gel - δείγματα P83 έως P88



Εικόνα 29 polyacrylamide gel - δείγματα C19, C20, C30, C38, C45, C56, C62, C63, C72, C85, P12, P24, P37, P39, P72, P82



Εικόνα 30 polyacrylamide gel - δείγματα C20, C30, C62, P39, P76, P85

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλές διαδρομές παρουσιάζονται ζώνες που αντιστοιχούν σε μη ειδικό πολλαπλασιασμό. Αυτό οφείλεται πιθανόν στο γεγονός ότι από απροσεξία χρησιμοποιήσαμε απιονισμένο νερό κατά την προετοιμασία του MasterMix και όχι δις-απεσταγμένο νερό. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μη ειδική υβριδοποίηση των εκκινητών σε τμήματα DNA π.χ. από μικροοργανισμούς.

Οι γονότυποι του πολυμορφισμού eNOS για όλα τα δείγματα ασθενών-μαρτύρων παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 12 - ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ-ΜΑΡΤΥΡΩΝ ΤΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΓΙΑ ΠΑΥ**

ΜΑΡΤΥΡΕΣ (CONTROLS)								ΑΣΘΕΝΕΙΣ (PATIENTS)							
C1	BB	C23	AB	C45	BB	C67	BB	P1	BB	P23	BB	P45	BB	P67	BB
C2	AB	C24	AB	C46	BB	C68	BB	P2	AB	P24	BB	P46	BB	P68	AB
C3	AB	C25	BB	C47	BB	C69	BB	P3	AB	P25	AB	P47	BB	P69	AB
C4	BB	C26	BB	C48	AB	C70	BB	P4	BB	P26	BB	P48	BB	P70	AB
C5	BB	C27	AB	C49	BB	C71	AB	P5	AB	P27	BB	P49	BB	P71	BB
C6	BB	C28	AB	C50	BB	C72	BB	P6	BB	P28	BB	P50	BB	P72	BB
C7	BB	C29	BB	C51	AB	C73	BB	P7	BB	P29	BB	P51	BB	P73	AB
C8	BB	C30	AA	C52	BB	C74	AB	P8	AB	P30	BB	P52	AA	P74	BB
C9	BB	C31	BB	C53	BB	C75	BB	P9	BB	P31	BB	P53	AB	P74	BB
C10	BB	C32	AB	C54	AB	C76	AB	P10	AB	P32	BB	P54	BB	P76	BB
C11	BB	C33	AB	C55	BB	C77	AB	P11	AB	P33	AB	P55	BB	P77	AB
C12	BB	C34	AB	C56	BB	C78	BB	P12	AA	P34	BB	P56	AA	P78	BB
C13	BB	C35	AB	C57	AA	C79	AB	P13	BB	P35	BB	P57	AB	P79	BB
C14	BB	C36	AB	C58	BB	C80	AB	P14	BB	P36	BB	P58	BB	P80	AB
C15	BB	C37	AA	C59	BB	C81	AB	P15	AB	P37	BB	P59	AB	P81	AB
C16	AB	C38	AB	C60	AB	C82	BB	P16	BB	P38	BB	P60	AB	P82	BB
C17	BB	C39	BB	C61	AB	C83	AB	P17	AB	P39	BB	P61	BB	P83	BB
C18	BB	C40	BB	C62	AA	C84	AB	P18	AB	P40	BB	P62	BB	P84	BB
C19	BB	C41	BB	C63	BB	C85	AB	P19	BB	P41	AB	P63	BB	P85	AA
C20	AB	C42	BB	C64	BB	C86	BB	P20	AB	P42	BB	P64	AA	P86	AB
C21	BB	C43	BB	C65	AB	C87	BB	P21	BB	P43	AA	P65	BB	P87	BB
C22	BB	C44	AB	C66	BB	C88	BB	P22	BB	P44	AB	P66	BB	P88	AB

Η κατανομή των γονοτυπικών δεδομένων του A/B eNOS πολυμορφισμού στο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού παρουσιάζεται στον πίνακα 13.

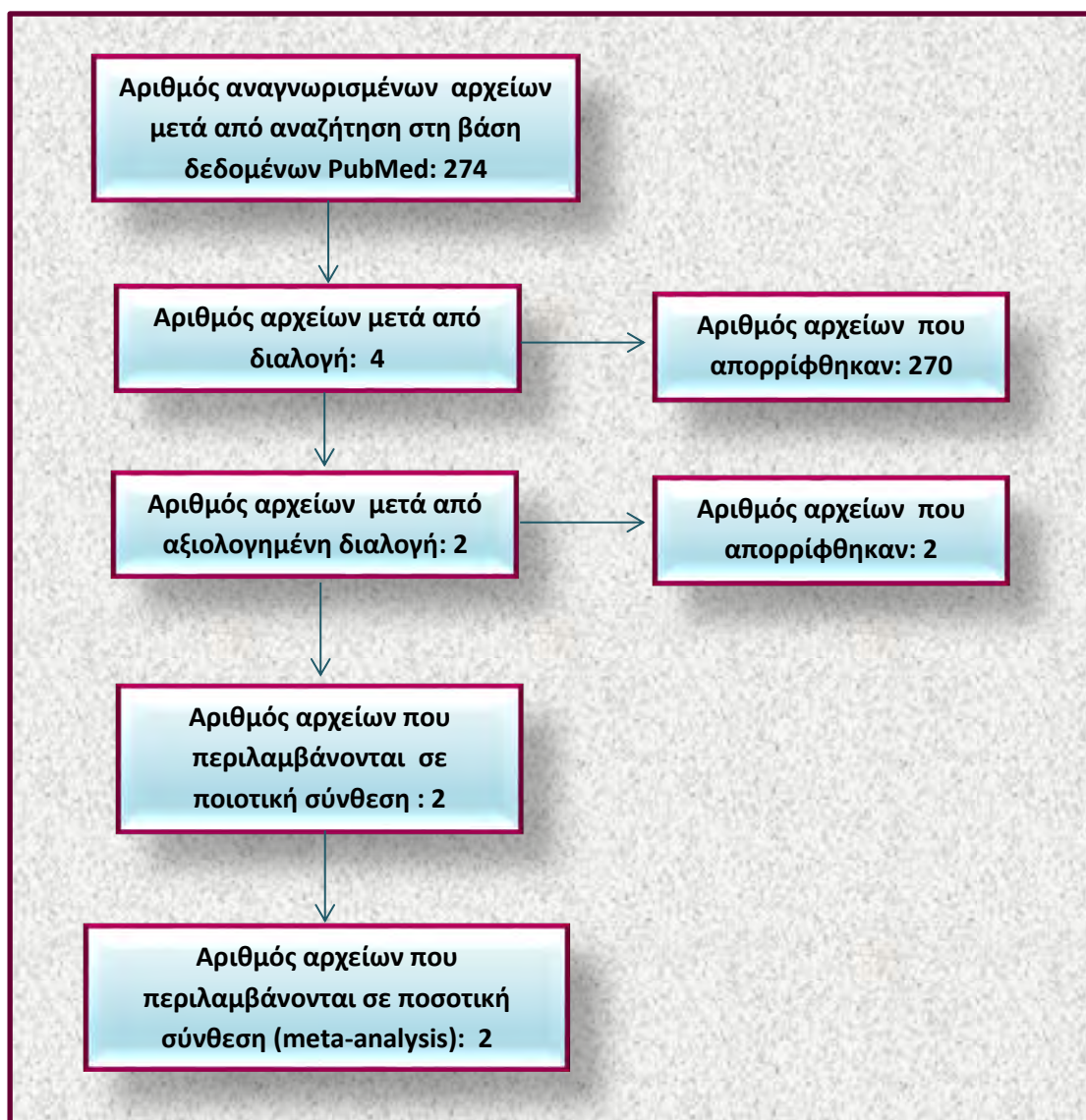
<b>Πίνακας 13 – Γονοτυπικές Συχνότητες του A/B eNOS πολυμορφισμού</b>		
	<b>Patient group (n=88)</b>	<b>Control group (n=88)</b>
<b>eNOS GENOTYPE</b>		
<b>AA</b>	6 (5.28%)	4 (3.52%)
<b>AB</b>	27 (23.76%)	31 (27.28%)
<b>BB</b>	55 (48.4%)	53 (46.64%)
<b>eNOS Allele</b>		
<b>A</b>	39 (22.2%)	39 (22.2%)
<b>B</b>	137 (77.8%)	137 (77.8%)



## 3.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με Πνευμονική Αρτηριακή Υπέρταση

### 3.2.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΠΑΥ

Έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για εύρεση μελετών που κάνουν έλεγχο ως προς τη συσχέτιση A/B του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ. Μετά από συστηματική ανασκόπηση έγιναν δεκτά δύο άρθρα, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής δεδομένων (εικόνα 31). Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του εργαστηριακού μέρους της ομάδας ασθενών-μαρτύρων για το δείγμα του ελληνικού πληθυσμού ομαδοποιήθηκαν με τα αποτελέσματα από την συστηματική ανασκόπηση και δημιουργήθηκε ο πίνακας 14.



Εικόνα 31 Συστηματική ανασκόπηση για ΠΑΥ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 14 - ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ Α/Β ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ eNOS ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΠΑΥ**

PMID	AUTHOR	DATE	COUNTRY	CASES	Diagnostic Criteria	CONTROLS	Diagnostic Criteria	ALLELE A CASES	ALLELE A CONTROLS	ALLELE B CASES	ALLELE B CONTROLS	CASES AA	CASES AB	CASES BB	CONTROLS AA	CONTROLS AB	CONTROLS BB	HWE YES/NO
22754222	Vadapalli <i>et al.</i>	2012	India	77	IPAH patients	100	healthy subjects without history of cardiac and systemic disorders	13	20	64	80							
19844076	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	16	IPAH patients	24	24 controls with left heart disease without PH	1	9	23	39	0	1	11	1	7	16	YES
Current Study	Current Study	2016	Greece	88	IPAH patients	88	healthy subjects	39	39	137	137	6	27	55	4	31	53	YES

IPAH: Idiopathic Pulmonary Hypertension, HWE: Hardy Weinberg Equilibrium



### 3.2.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ

Για να κάνουμε πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης εφαρμόσαμε το Cochran Armitage Trend Test (CATT). Παράλληλα με το CATT έγινε έλεγχος συσχέτισης και με τη μέθοδο MAX. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων προέκυψαν βάσει του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων. Μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι :

- για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.47
- για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.67
- για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.39
- για τη μέθοδο MAX το p-value ήταν 0.56

Παρατηρήσαμε ότι τα συγκεντρωτικά p-value μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων δε δίνουν ένδειξη για γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS για ΠΑΥ για τον συνεπικρατή, επικρατή και υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (p-value στατιστικά σημαντικό αν είναι <0.05) (Πίνακας 15).

Ο πίνακας χωρίζεται από αριστερά σε 4 ενότητες. Οι τρεις πρώτες ενότητες αναφέρουν τα αποτελέσματα του CATT για τα τρία διαφορετικά μοντέλα κληρονομικότητας και η τελευταία ενότητα τα αποτελέσματα μετά από εφαρμογή της μεθόδου MAX. Στη συνέχεια, οι επόμενες τρεις στήλες αναφέρουν τα στοιχεία των μελετών που συγκεντρώθηκαν. Στην τέταρτη στήλη εμφανίζεται ο υπολογισμός για το Q statistic ( $\chi^2$ ). Οι επόμενες στήλες με τίτλο z1, z2 και z3 αντιστοιχούν στον υπολογισμό των Z-scores για το υπολειπόμενο, συνεπικρατές και επικρατές μοντέλο αντίστοιχα. Παρουσιάζεται η εκτίμηση για το p-value κάθε μελέτης μεμονωμένα, καθώς και το συγκεντρωτικό p-value όλων των μελετών ως προς το συνεπικρατές(pz2\_meta), επικρατές(pz3\_meta) και υπολειπόμενο(pz1\_meta) μοντέλο κληρονομικότητας. Συνοψίζεται το συγκεντρωτικό Z-score για κάθε ενότητα. Ενώ είχαν καταγραφεί τρεις μελέτες για ΠΑΥ, η μία από τις τρεις δεν είχε ολοκληρωμένα δεδομένα (Vadapalli *et al.*) και γι' αυτό τα test διεξήχθησαν μόνο με τις υπόλοιπες δύο.

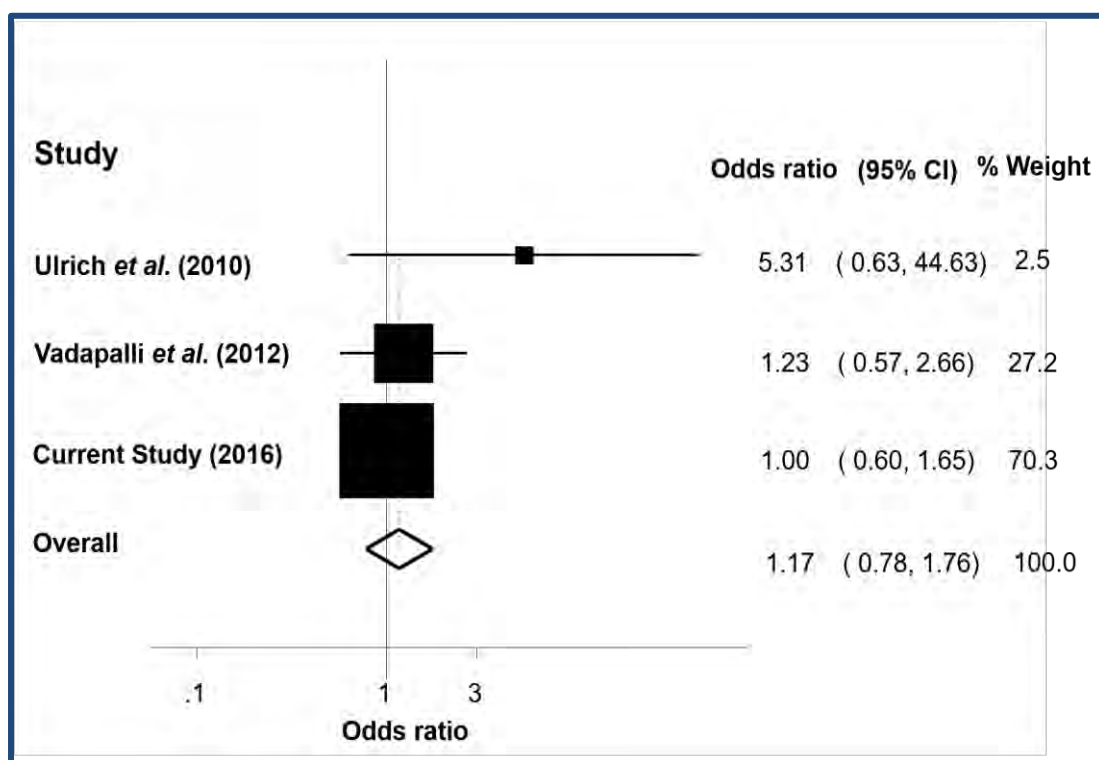
ΠΙΝΑΚΑΣ 15 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ CATT/MAX ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΠΑΥ

Codominant	author	date	country	_qhet	_z2	_pz2	_pz2_meta	_z2_meta			
	Vadapalli <i>et al.</i>	2012	India	2,352592			0,476752	0,711536			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		1,629916	0,103119					
	Current Study	2016	Greece		0	1					
Dominant	author	date	country	_qhet	_z3	_pz3	_pz3_meta	_z3_meta			
	Vadapalli <i>et al.</i>	2012	India	0,765716			0,677753	0,415532			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		0,717137	0,47329					
	Current Study	2016	Greece		-0,65123	0,5149					
Recessive	author	date	country	_qhet	_z1	_pz1	_pz1_meta	_z1_meta			
	Vadapalli <i>et al.</i>	2012	India	2,008242			0,399269	0,842928			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		1,632993	0,10247					
	Current Study	2016	Greece		0,309614	0,756855					
MAX	author	date	country	_qhet	_z1	_z2	_z3	_pmax	pmax_meta	zmax_meta	_z_max
	Vadapalli <i>et al.</i>	2012	India	1,390584				1	0,5625877	0,5790021	0
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		1,632993	1,629916	0,717137	0,199857			1,281958
	Current Study	2016	Greece		0,309614	0	-0,65123	0,762566			0,302113

### 3.2.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση σε τρεις μελέτες ασθενών-μαρτύρων (Πίνακας 14) για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (*B vs. A*).

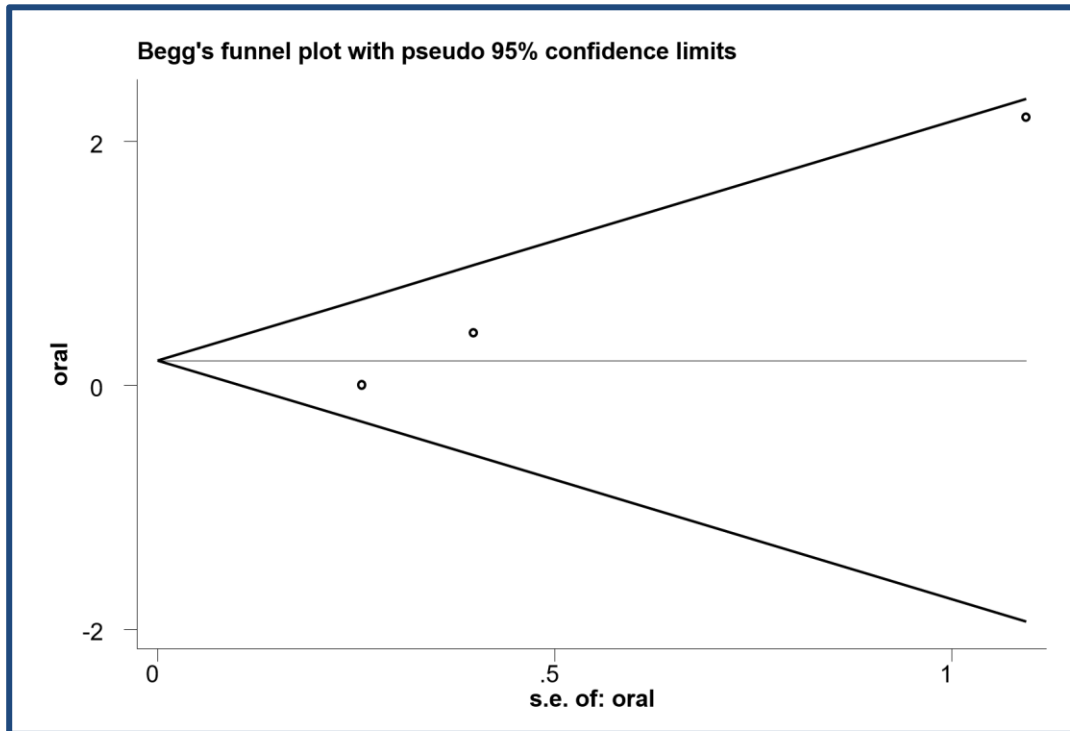
Το forest plot για το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (*fixed effects model*) έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας, επειδή το συγκεντρωτικό OR ήταν 1.17 (95% CI = 0.78-1.76) και το *p*-value ήταν 0.447 (>0.05) (εικόνα 32) (Παράρτημα εικόνα 50).



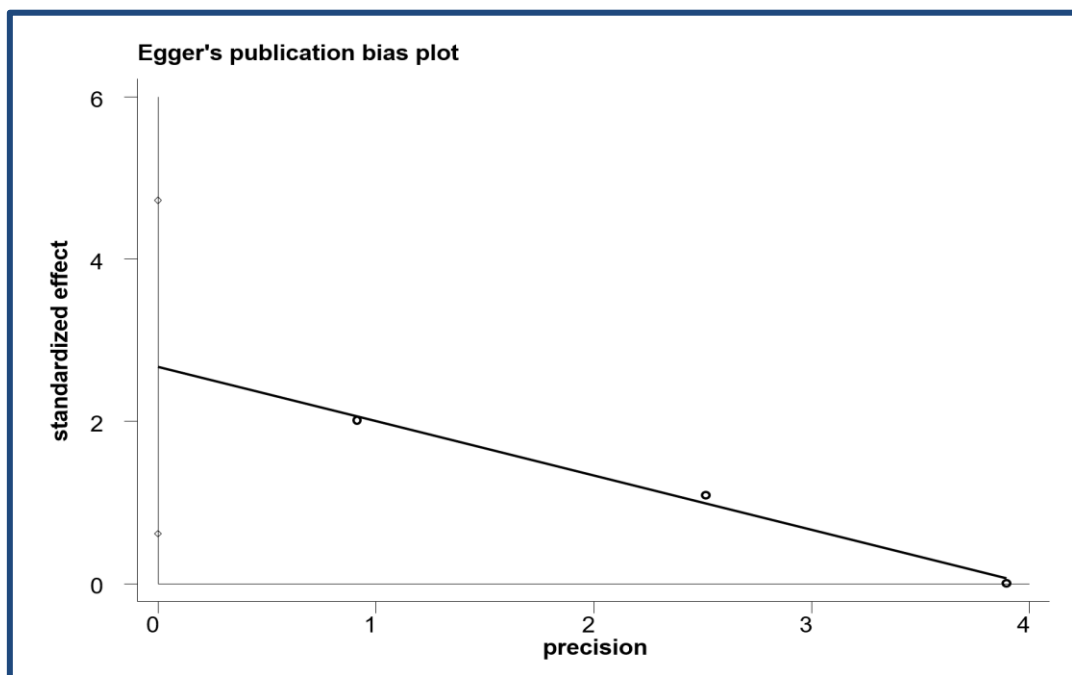
Εικόνα 32 forest plot PAH (B vs. A) – fixed effects model

Το ποσοστό επί τοις εκατό για τον υπολογισμό της ετερογένειας ήταν  $I^2 = 14.1\%$ , το οποίο είναι ένδειξη για χαμηλή ετερογένεια. Δεν χρειάστηκε να εξετάσουμε τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού για ΠΑΥ με τη μέθοδο των τυχαίων επιδράσεων για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας.

Έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα διαγράμματα των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν υπάρχει ένδειξη για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα δεδομένα των μελετών παρουσιάζονται ομοιόμορφα κατανεμημένα πάνω στα δύο γραφήματα (εικόνα 33, 34).

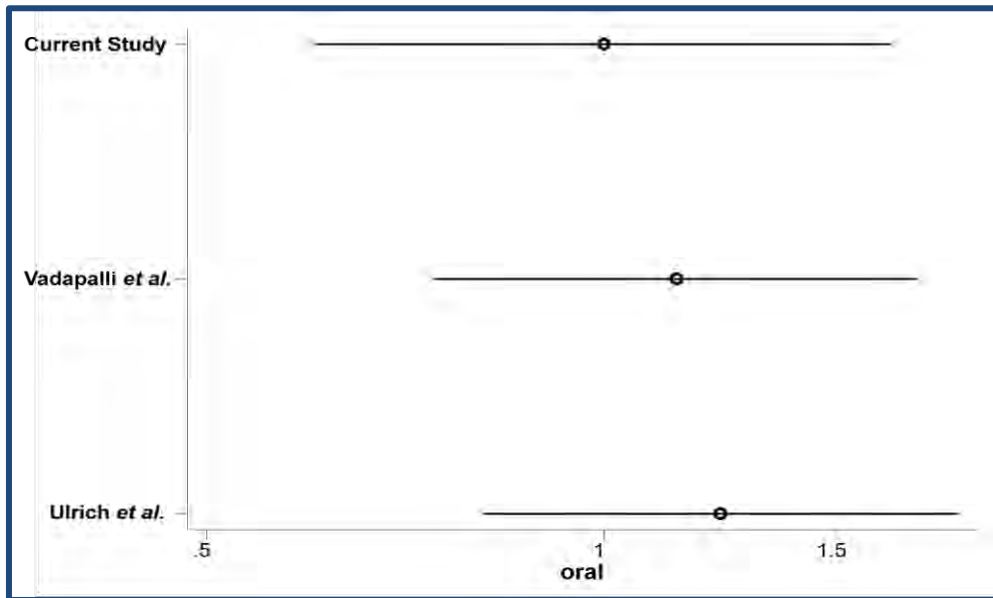


Εικόνα 33 Begg's funnel plot



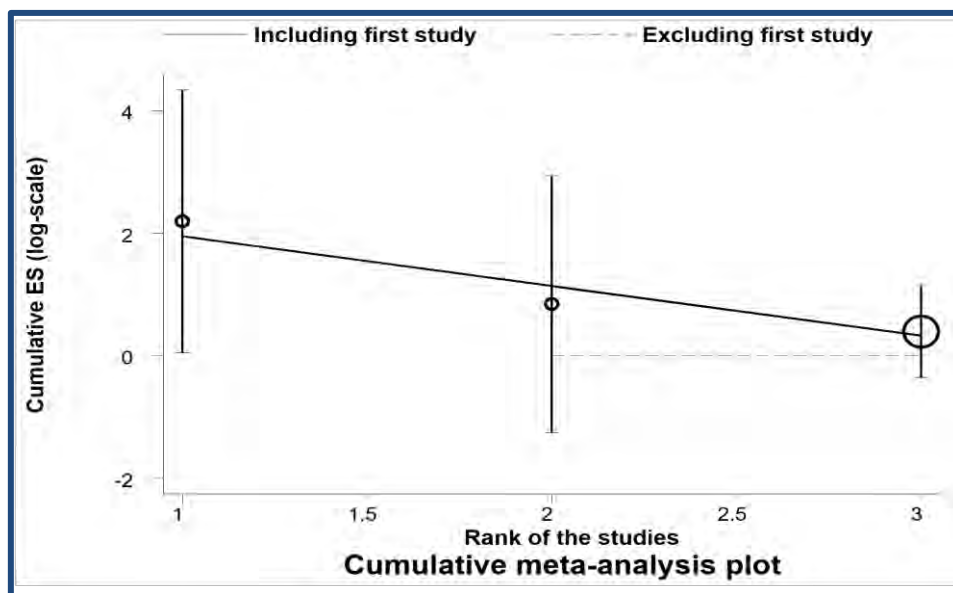
Εικόνα 34 Egger's plot

Έγινε αθροιστική μετα-ανάλυση για μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν επηρεάζεται το τρέχον αποτέλεσμα και για τα δύο μοντέλα επιδράσεων (εικόνα 35) (Παράρτημα εικόνα 51).



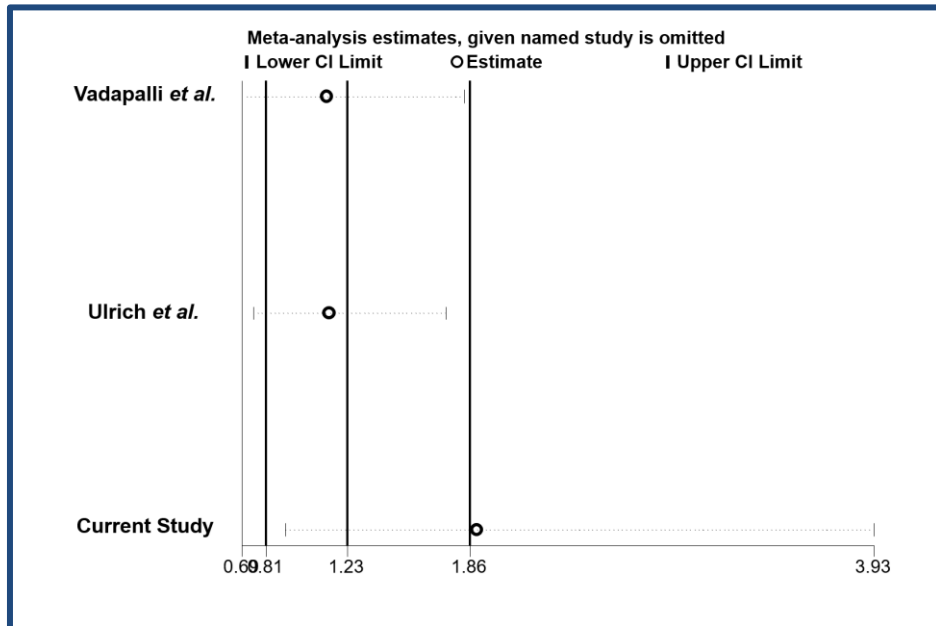
Εικόνα 35 metacum graph PAH (B vs. A) (fixed effects model)

Έγινε έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν επηρεάζει κάποια μελλοντική πρόβλεψη το τρέχον αποτέλεσμα και συνεπώς δεν παρουσιάζεται φαινόμενο του Πρωτέα (εικόνα 36) (Παράρτημα εικόνα 52).



Εικόνα 36 metatrend graph PAH (B vs. A)

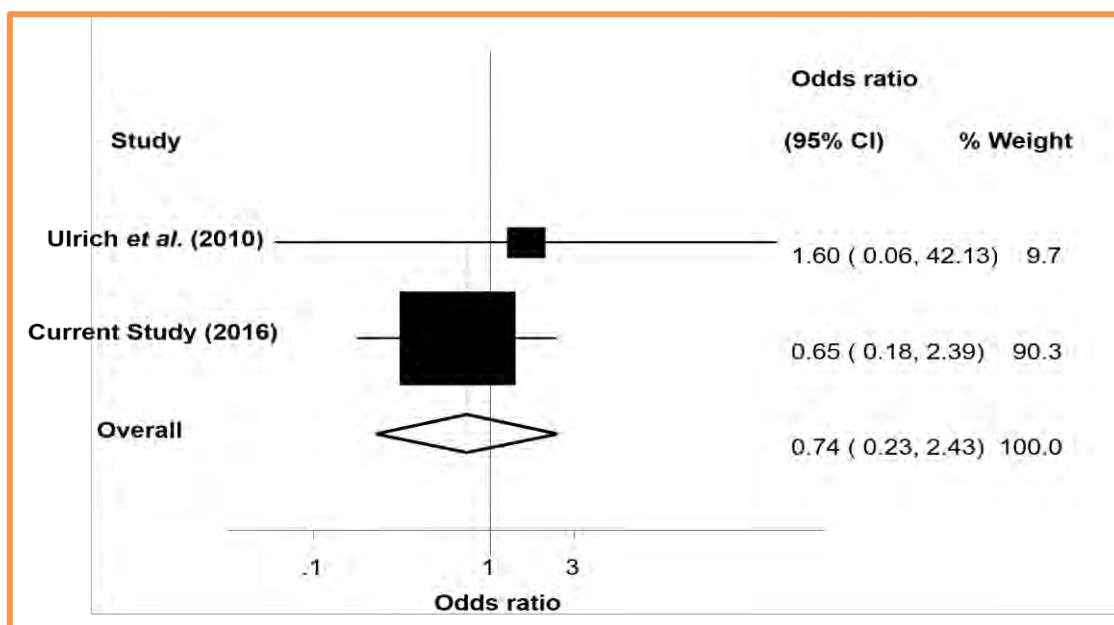
Η τελευταία δοκιμή είχε σαν αποτέλεσμα τον έλεγχο της επίδρασης κάθε μελέτης στη συγκεντρωτική μετα-ανάλυση με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι καμία μελέτη δεν παρουσιάζει επιρροή ως προς το τελικό αποτέλεσμα (εικόνα 37) (Παράρτημα εικόνα 53).



Εικόνα 37 metainf graph PAH (B vs. A) (fixed effects model)

### 3.2.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ βάσει του μοντέλου σταθερών επιδράσεων για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (BB+AB vs. AA). Το forest plot έδειξε ότι δεν υπάρχει γενετική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης όσον αφορά τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (εικόνα 38). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.74 (95% CI = 0.23-2.43) και το p-value ήταν 0.623 (>0.05). Το  $I^2$  ήταν 0% και έδειξε ότι δεν υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Μία από τις τρεις μελέτες (Vadaralli *et al.*) δεν είχε πλήρη γονοτυπικά δεδομένα, γι' αυτό το λόγο δε μετρήθηκε υπόψιν κατά την εκτέλεση των εντολών (Παράρτημα εικόνα 54).



Εικόνα 38 forest plot PAH (BB+AB vs. AA) - fixed effects model

Έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα γραφήματα των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν παρουσιάστηκε συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 55, 56). Ο έλεγχος της αθροιστικής μετα-ανάλυσης έδειξε ότι δεν υπάρχει παραποίηση στο τρέχον αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 57, 58). Ο έλεγχος της επίδρασης κάθε μελέτης στη συγκεντρωτική μετα-ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επιρροή κάθε μεμονωμένης μελέτης στο συνολικό αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 59, 60). Οι εκτιμήσεις για το φαινόμενο του Πρωτέα δεν ήταν εφικτό να διεξαχθούν, καθώς τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή.

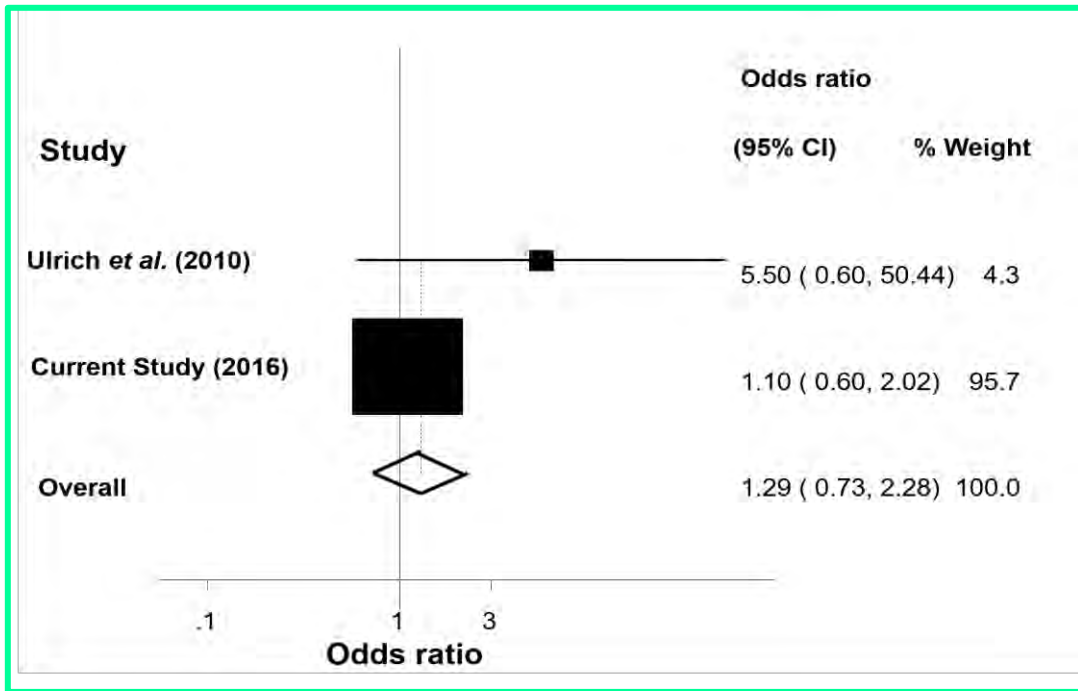
### 3.2.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΑΥ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας (BB vs. AA+AB). Το forest plot έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (εικόνα 39). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 1.29 (95% CI=0.73-2.28) και το p-value ήταν 0.385 (>0.05). Η τιμή για το  $I^2$  ήταν 47.6%, το οποίο είναι ένδειξη για ετερογένεια. Μία από τις τρεις μελέτες (Vadaralli *et al.*) δεν είχε πλήρη γονοτυπικά δεδομένα, γι'αυτό το λόγο δε μετρήθηκε υπόψιν κατά την εκτέλεση των εντολών (Παράρτημα εικόνα 61).

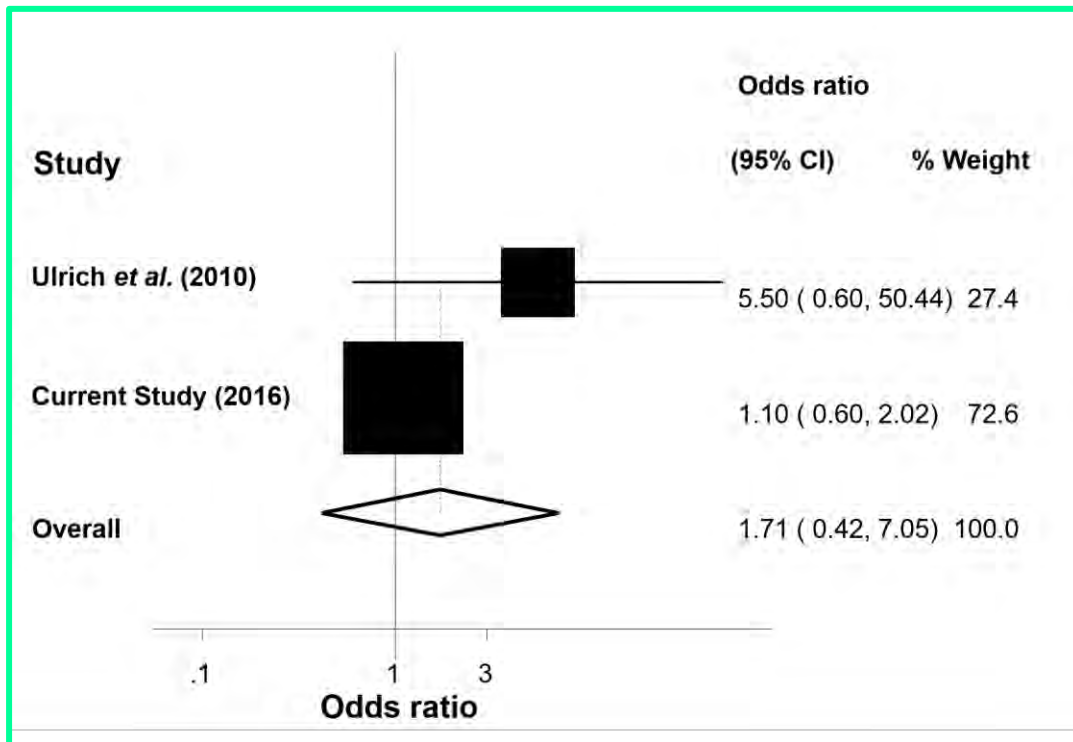
Για το λόγο ότι υπήρχε ένδειξη για ετερογένεια, επαναλήφθηκε το τεστ με τη μέθοδο τυχαίων επιδράσεων. Το forest plot έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (εικόνα 40). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 1.71 (95% CI=0.42-7.05) και το p-value ήταν 0.457 (>0.05). Μία από τις τρεις μελέτες (Vadaralli *et al.*) δεν είχε πλήρη γονοτυπικά δεδομένα, γι'αυτό το λόγο δε μετρήθηκε υπόψιν κατά την εκτέλεση των εντολών (Παράρτημα εικόνα 62).

Τα γραφήματα των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται ένδειξη για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 63, 64). Ο έλεγχος με την εφαρμογή της αθροιστικής μετα-ανάλυσης με τη μέθοδο των τυχαίων επιδράσεων δεν έδειξε ότι παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Παράρτημα εικόνες 65, 66). Έγινε έλεγχος ως προς την επίδραση κάθε μελέτης στη συγκεντρωτική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο τυχαίων επιδράσεων. Δεν υπάρχει επιρροή ως προς κάποια μελέτη μεμονωμένα που να διαφοροποιεί το τελικό αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 67, 68). Δεν ήταν εφικτό να γίνει έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα, διότι τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή.





Εικόνα 39 forest plot PAH (BB vs. AA+AB) - fixed effects model



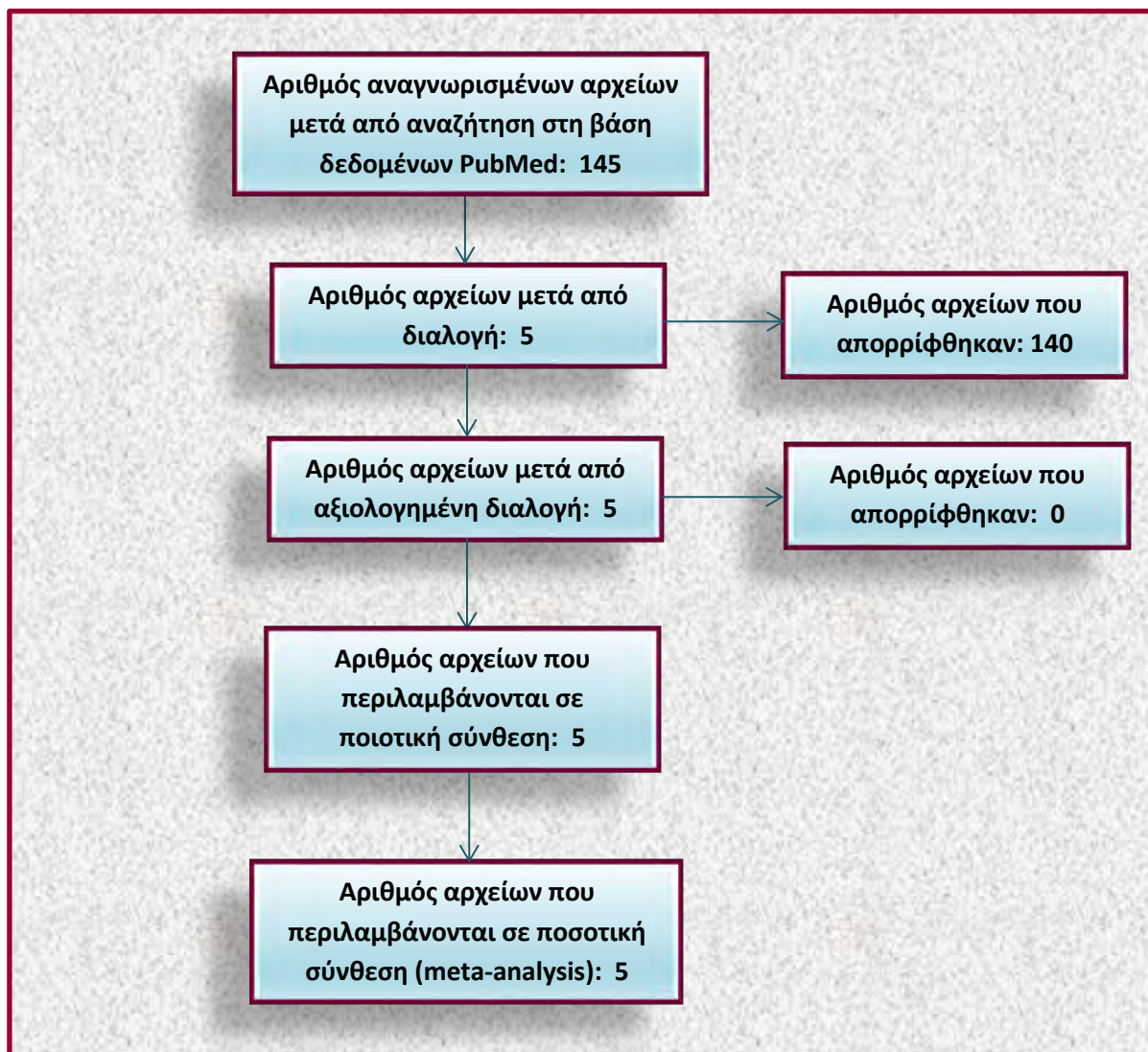
Εικόνα 40 forest plot PAH (BB vs. AA+AB) - random effects model



### 3.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια

#### 3.3.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΧΑΠ

Έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για εύρεση μελετών που κάνουν έλεγχο ως προς τη συσχέτιση A/B του γονιδίου eNOS με ΧΑΠ. Μετά από συστηματική ανασκόπηση έγιναν δεκτά πέντε άρθρα, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής δεδομένων (εικόνα 41). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα συνοψίστηκαν στον πίνακα 16.



Εικόνα 41 Συστηματική ανασκόπηση για ΧΑΠ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 16 - ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ Α/Β ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ εΝΟΣ ΜΕ ΧΑΠ**

PMID	AUTHOR	DATE	COUNTRY	CASES	Diagnostic Criteria	CONTROLS	Diagnostic Criteria	ALLELE A CASES	ALLELE A CONTROLS	ALLELE B CASES	ALLELE B CONTROLS	CASES AA	CASES AB	CASES BB	CONTROLS AA	CONTROLS AB	CONTROLS BB	HWE YES/NO
24057178	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey	80	50 COPD patients without PH, 30 COPD patients with PH	49	49 healthy subjects	9	7	151	91	1	7	72	0	7	42	YES
22695028	Shaw <i>et al.</i>	2012	Australia	277	COPD patients with high RVSP	297	controls	86	92	468	502	8	70	199	11	70	216	YES
19556740	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	49	COPD patients	24	controls	19	9	79	39	1	17	31	1	7	16	YES
14682408	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey	42	COPD patients with smoking history	40	healthy subjects							31			33	
17658478	Arif <i>et al.</i>	2007	India	190	COPD patients with smoking history	134	healthy subjects with smoking history	83	33	297	233	13	57	120	5	23	105	NO

RVSP: Right Ventricular Systolic Pressure, HWE: Hardy Weinberg Equilibrium

### 3.3.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ

Για να κάνουμε πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης εφαρμόσαμε το Cochran Armitage Trend Test (CATT). Παράλληλα με το CATT έγινε έλεγχος συσχέτισης και με τη μέθοδο MAX. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων προέκυψαν βάσει του μοντέλου σταθερών επιδράσεων. Μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι :

- για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.10
- για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.67
- για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.07
- για τη μέθοδο MAX το p-value ήταν 0.11

Παρατηρήσαμε ότι τα συγκριτικά p-value μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων δίνουν ένδειξη για γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS για ΧΑΠ για τον συνεπικρατή, επικρατή και υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (p-value στατιστικά σημαντικό αν είναι <0.05) (Πίνακας 17). Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας προσέγγισε την στατιστικά σημαντική ένδειξη.

Ο πίνακας χωρίζεται από αριστερά σε 4 ενότητες. Οι τρεις πρώτες ενότητες αναφέρουν τα αποτελέσματα του CATT για τα τρία διαφορετικά μοντέλα κληρονομικότητας και η τελευταία ενότητα τα αποτελέσματα μετά από εφαρμογή της μεθόδου MAX. Οι επόμενες τρεις στήλες αναφέρουν τα στοιχεία των μελετών που συγκεντρώθηκαν. Στην τέταρτη στήλη εμφανίζεται ο υπολογισμός για το Q statistic ( $_{qhet}$ ). Οι επόμενες στήλες με τίτλο  $z_1$ ,  $z_2$  και  $z_3$  αντιστοιχούν στον υπολογισμό των Z-scores για το υπολειπόμενο, συνεπικρατές και επικρατές μοντέλο αντίστοιχα. Παρουσιάζεται η εκτίμηση για το p-value κάθε μελέτης μεμονωμένα, καθώς και το συγκεντρωτικό p-value όλων των μελετών ως προς το συνεπικρατές( $_{pz2\_meta}$ ), επικρατές( $_{pz3\_meta}$ ) και υπολειπόμενο( $_{pz1\_meta}$ ) μοντέλο κληρονομικότητας. Συνοψίζεται το τελικό Z-score για κάθε ενότητα.

Ενώ είχαν καταγραφεί πέντε μελέτες για ΧΑΠ, η μία από τις πέντε δεν είχε ολοκληρωμένα δεδομένα (Yildiz *et al.*) και γι'αυτό τα test διεξήχθησαν μόνο με τις υπόλοιπες τέσσερις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ SATT/MAX ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΧΑΠ

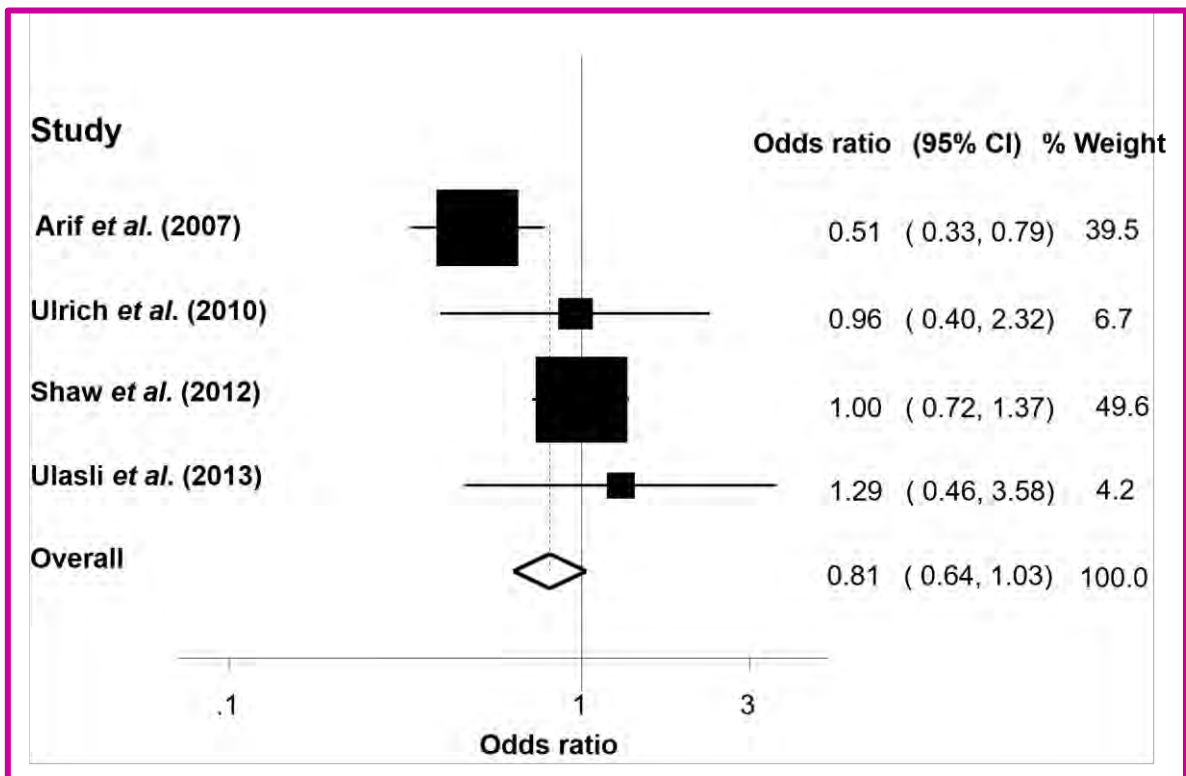
Codominant	author	date	country	_qhet	_z2	_pz2	pz2_meta	_z2_meta				
	Arif <i>et al.</i>	2007	India	5,734465	-2,85599	0,00429	0,103092	1,630045				
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		0,474934	0,634834						
	Shaw <i>et al.</i>	2012	Australia		-0,01595	0,987277						
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey									
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		-0,09486	0,924423						
Dominant	author	date	country	_qhet	_z3	_pz3	pz3_meta	_z3_meta				
	Arif <i>et al.</i>	2007	India	2,426314	-1,18864	0,234582	0,6757476	0,418273				
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		-0,78567	0,432058						
	Shaw <i>et al.</i>	2012	Australia		0,545804	0,5852						
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey									
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		0,522701	0,601182						
Recessive	author	date	country	_qhet	_z1	_pz1	pz1_meta	_z1_meta				
	Arif <i>et al.</i>	2007	India	6,727994	-3,03786	0,002383	0,0744898	1,783593				
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		0,736992	0,461127						
	Shaw <i>et al.</i>	2012	Australia		-0,23705	0,812617						
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey									
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		-0,28509	0,775575						
MAX	author	date	country	cases	_qhet	_z1	_z2	_z3	_pmax	pmax_meta	zmax_meta	_z_max
	Arif <i>et al.</i>	2007	India	190	5,498116	-3,03786	-2,855993	-1,18864	0,005521	0,1166679	1,568915	2,774934
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey	80		0,736992	0,4749344	-0,78567	0,678643			0,414315
	Shaw <i>et al.</i>	2012	Australia	277		-0,23705	-0,015946	0,545804	0,826181			0,219602
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey	42					1			0
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	49		-0,28509	-0,094864	0,522701	0,84252			0,198672

### 3.3.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

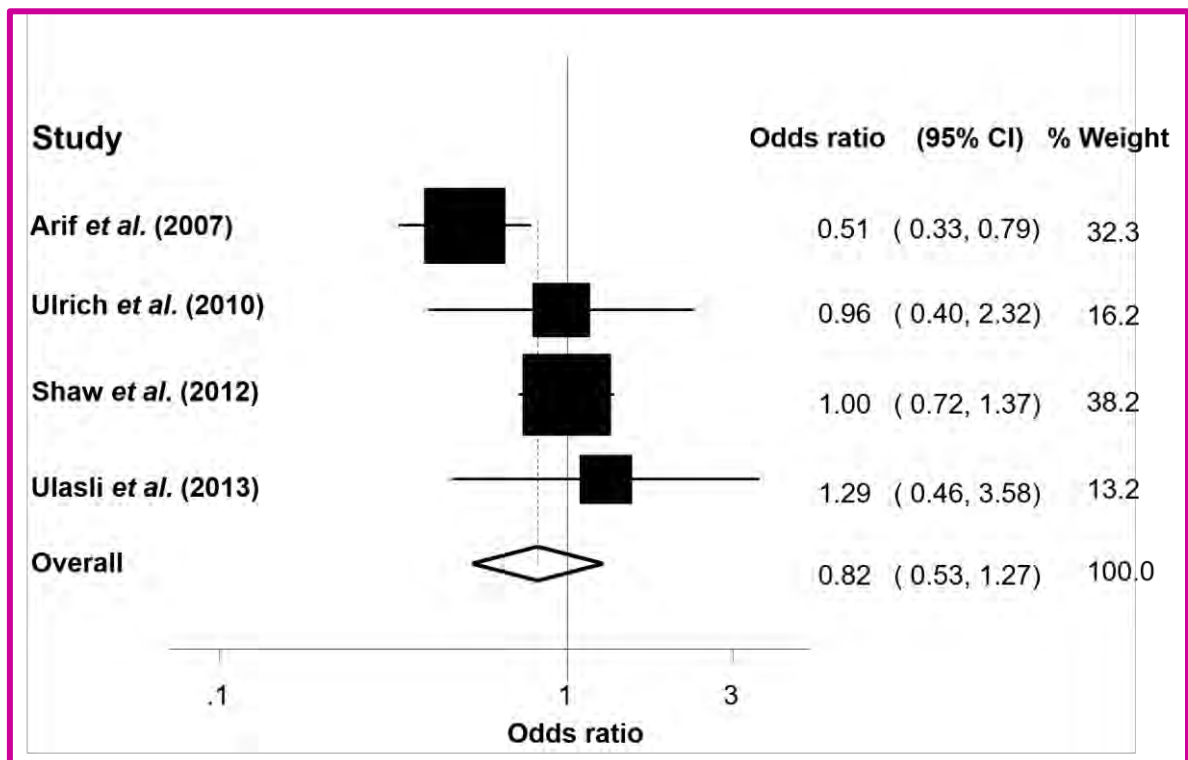
Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με χρόνια απογραφική πνευμονοπάθεια σε πέντε μελέτες ασθενών-μαρτύρων (Πίνακας 16) για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (*B* vs. *A*). Το forest plot για τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων έδειξε ότι οριακά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (εικόνα 42). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.81 (95% CI = 0.64-1.03) και το *p*-value ήταν 0.089 (>0.05). Η τιμή για το  $I^2$  ήταν 56.9% (>50%), το οποίο είναι ένδειξη για εμφάνιση ετερογένειας. Μία από τις πέντε μελέτες δεν είχε ολοκληρωμένα γονοτυπικά δεδομένα (Yildiz *et al.*), γι' αυτό δε μετρήθηκε υπόψιν στο forest plot (Παράρτημα εικόνα 69).

Για το λόγο ότι υπήρχε ένδειξη για ετερογένεια, επαναλήφθηκε το τεστ με τη μέθοδο των τυχαίων επιδράσεων. Το forest plot έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (εικόνα 43). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.82 (95% CI = 0.53-1.27) και το *p*-value ήταν 0.384 (>0.05). Μία από τις πέντε μελέτες δεν είχε ολοκληρωμένα γονοτυπικά δεδομένα (Yildiz *et al.*), γι' αυτό δε μετρήθηκε υπόψιν στο forest plot (Παράρτημα εικόνα 70).

Το γράφημα του Begg και του Egger έδειξε ότι δεν παρουσιάζεται ένδειξη για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης, καθώς παρουσιάζεται ομοιόμορφη κατανομή των δεδομένων πάνω στα γραφήματα (Παράρτημα εικόνες 71, 72). Ο έλεγχος με χρήση της μεθόδου μετα-παλινδρόμησης έδειξε ότι συγκλίνει το αποτέλεσμα των μελετών (Παράρτημα εικόνα 73). Ο έλεγχος με την αθροιστική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο των σταθερών και τυχαίων επιδράσεων έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μελετών (Παράρτημα εικόνες 74 έως 77). Εφαρμόστηκε έλεγχος για το φαινόμενο του Πρωτέα με τη μέθοδο γενικευμένων ελαχίστων τετραγώνων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν επηρεάζεται το τρέχον αποτέλεσμα από μεταγενέστερες μελέτες και κατά συνέπεια δεν παρουσιάζεται φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 78, 79). Έγινε έλεγχος ως προς την επίδραση κάθε μελέτης στη συγκεντρωτική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο σταθερών και τυχαίων επιδράσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μελέτη του Shaw *et al.* επιδρά θετικά ως προς το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο των σταθερών επιδράσεων (Παράρτημα εικόνες 80 έως 83).



Εικόνα 42 forest plot COPD (B vs. A) - fixed effects model

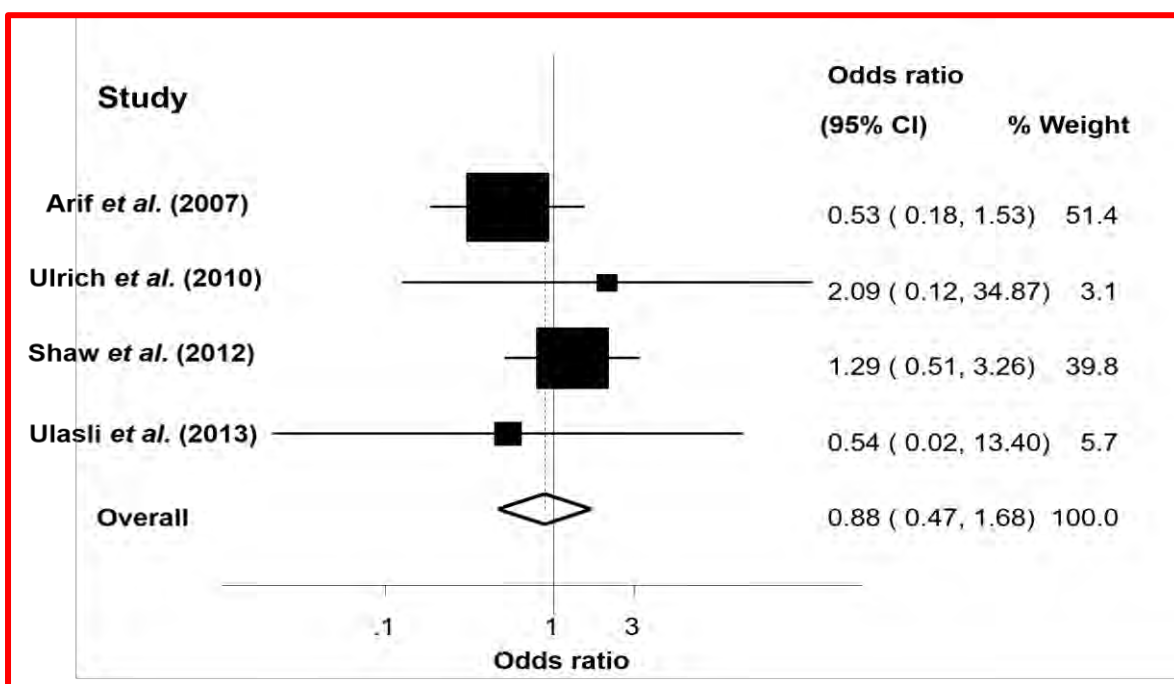


Εικόνα 43 forest plot COPD (B vs. A) - random effects model



### 3.3.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Το forest plot με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό του γονιδίου eNOS που εξετάζουμε με ΧΑΠ για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (εικόνα 44). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.88 (95% CI = 0.47-1.68) και το p-value ήταν 0.706 (>0.05). Η τιμή για το  $I^2$  ήταν 0%, το οποίο είναι ένδειξη για μηδενική ετερογένεια. Μία από τις πέντε μελέτες δεν είχε πλήρη γονοτυπικά δεδομένα, γι' αυτό δε μετρήθηκε κατά την εκτέλεση των εντολών (Yildiz *et al.*) (Παράρτημα εικόνα 84).

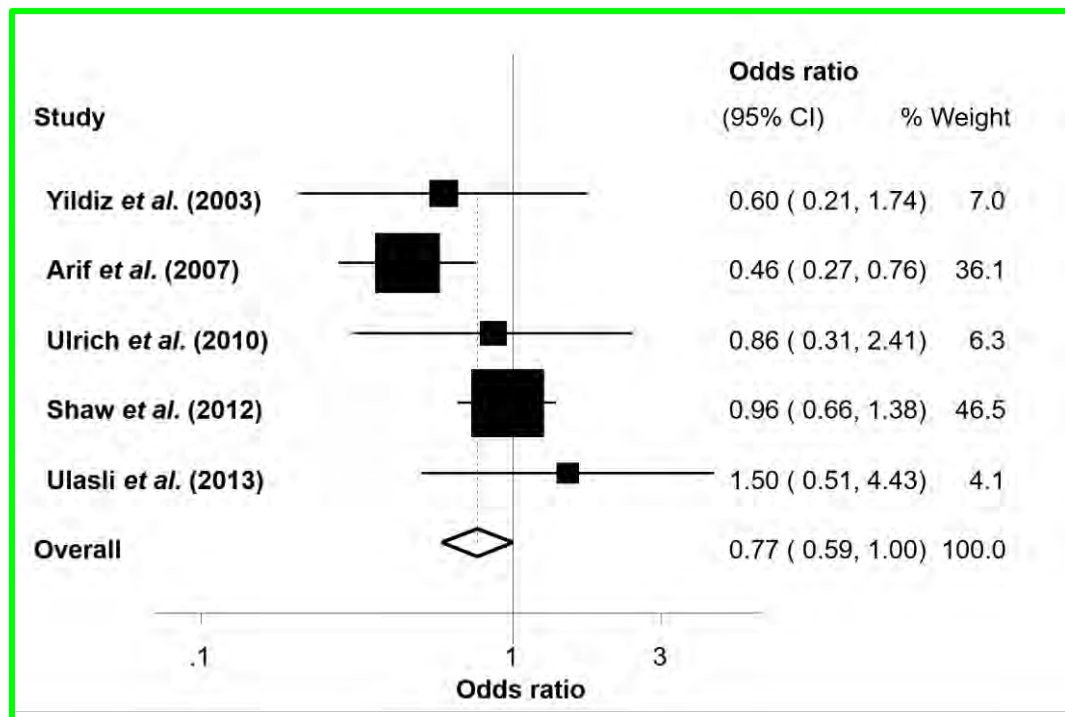


Εικόνα 44 forest plot COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα αποτελέσματα των γραφημάτων των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται σφάλμα δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 85, 86). Η αθροιστική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Παράρτημα εικόνες 87, 88). Δεν παρουσιάστηκε φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 89). Ελέγχθηκε η επιρροή κάθε μελέτης στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα. Καμία μελέτη δεν έδειξε να επηρεάζει το τρέχον αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 90, 91).

### 3.3.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΧΑΠ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας

Εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Το forest plot με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με ΧΑΠ (εικόνα 45). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.77 (95% CI = 0.59-1.00) και το p-value ήταν 0.05 ( $\leq 0.05$ ). Η τιμή για το  $I^2$  ήταν 43.5%, το οποίο είναι ένδειξη για χαμηλού επιπέδου ετερογένεια (Παράρτημα εικόνα 92).



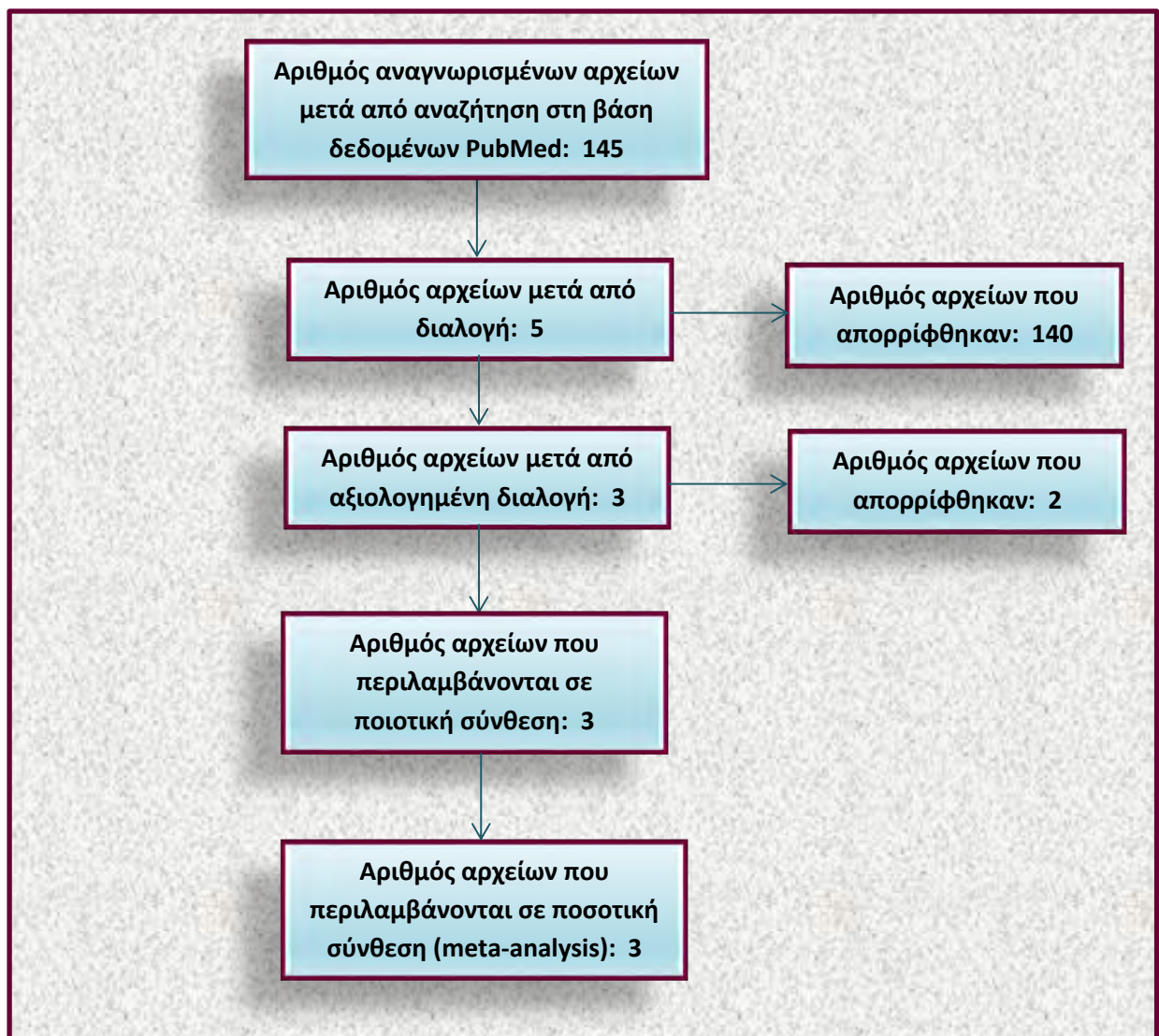
Εικόνα 45 forest plot COPD (BB vs. AA+AB) – fixed effects model

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα αποτελέσματα των γραφημάτων των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 93, 94). Η αθροιστική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων έδειξε ότι τα δεδομένα της μελέτης του Yildiz *et al.* παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε συνδυασμό με τις προηγούμενες μελέτες (Παράρτημα εικόνες 95, 96). Εξετάστηκε το φαινόμενο του Πρωτέα. Το γράφημα έδειξε ότι δεν παρουσιάστηκε φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 97, 98). Ελέγχθηκε η επιρροή κάθε μελέτης στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα. Μετά από την αφαίρεση δύο μελετών, των Ulasli *et al.* και Shaw *et al.*, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική ένδειξη ως προς το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 99, 100).

## 3.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με/χωρίς ΠΥ σε ασθενείς με ΧΑΠ

### 3.4.1 Συστηματική Ανασκόπηση για ΠΥ σε ΧΑΠ

Έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed για εύρεση μελετών που κάνουν έλεγχο ως προς τη συσχέτιση A/B του γονιδίου eNOS με/χωρίς ΠΟΥ σε ΧΑΠ. Μετά από συστηματική ανασκόπηση έγιναν δεκτά τρία άρθρα, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα ροής δεδομένων (εικόνα 46). Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα συνοψίστηκαν στον πίνακα 18.



Εικόνα 46 Συστηματική Ανασκόπηση για ΠΥ σε ΧΑΠ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 18 - ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ Α/Β ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ eNOS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΑΠ ΜΕ / ΧΩΡΙΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

PMID	AUTHOR	DATE	COUNTRY	CONTROLS	Diagnostic Criteria	CASES	Diagnostic Criteria	ALLELE A CASES	ALLELE A CONTROLS	ALLELE B CASES	ALLELE B CONTROLS	CASES AA	CASES AB	CASES BB	CONTROLS AA	CONTROLS AB	CONTROLS BB	HWE YES/NO
24057178	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey	50	COPD patients without PH	30	COPD patients with PH	3	6	57	94	1	1	28	0	6	44	YES
19556740	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	22	COPD patients without PH	27	COPD patients with PH	11	8	43	36	1	9	17	0	8	14	YES
14682408	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey	14	COPD patients without PH	24	COPD patients with PH	4	7	44	21	0	4	20	0	7	7	YES

HWE: Hardy Weinberg Equilibrium

### 3.4.2 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ

Για να κάνουμε πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΠΥ σε ΧΑΠ εφαρμόσαμε το Cochran Armitage Trend Test (CATT). Παράλληλα με το CATT έγινε έλεγχος συσχέτισης και με τη μέθοδο MAX. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων προέκυψαν βάσει του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων. Μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι :

- για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.38
- για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.11
- για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας το p-value ήταν 0.18
- για τη μέθοδο MAX το p-value ήταν 0.29

Παρατηρήσαμε ότι τα συγκετρωτικά p-value μετά από εφαρμογή των δύο μεθόδων δε δίνουν ένδειξη για γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS για ΠΥ σε ΧΑΠ για τον συνεπικρατή, επικρατή και υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (p-value στατιστικά σημαντικό αν είναι <0.05) (Πίνακας 19).

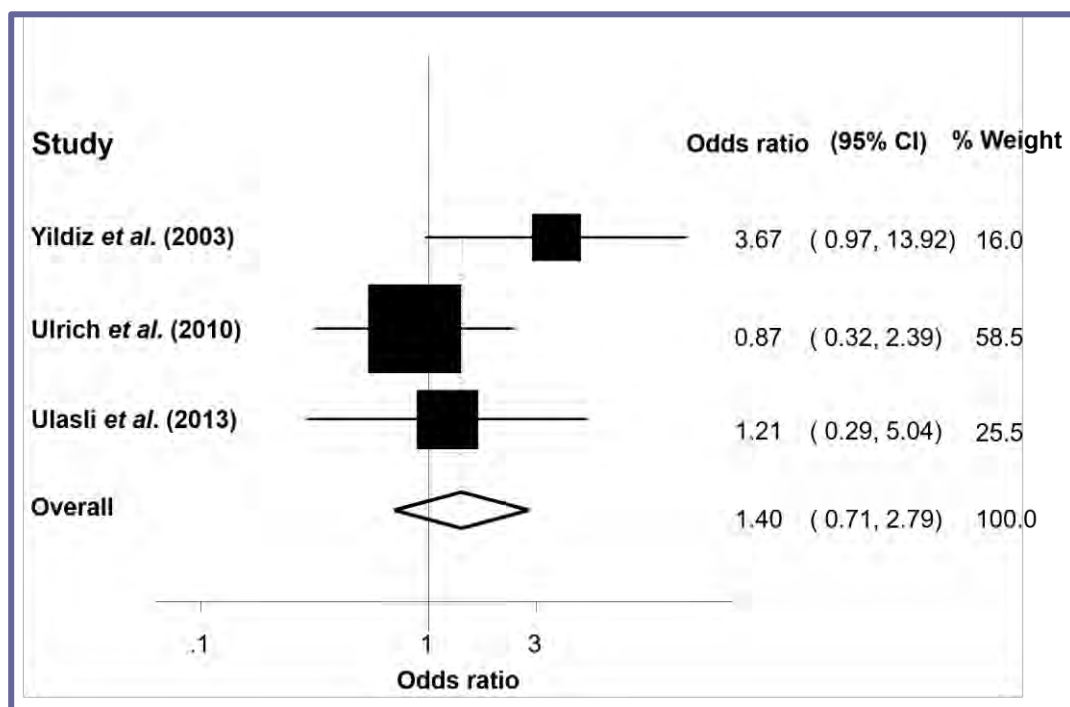
Ο πίνακας χωρίζεται από αριστερά σε 4 ενότητες. Οι τρεις πρώτες ενότητες αναφέρουν τα αποτελέσματα του CATT για τα τρία διαφορετικά μοντέλα κληρονομικότητας και η τελευταία ενότητα τα αποτελέσματα μετά από εφαρμογή της μεθόδου MAX. Οι επόμενες τρεις στήλες αναφέρουν τα στοιχεία των μελετών που συγκεντρώθηκαν. Στην τέταρτη στήλη εμφανίζεται ο υπολογισμός για το Q statistic ( $_{qhet}$ ). Οι επόμενες στήλες με τίτλο  $z_1$ ,  $z_2$  και  $z_3$  αντιστοιχούν στον υπολογισμό των Z-scores για το υπολειπόμενο, συνεπικρατές και επικρατές μοντέλο αντίστοιχα. Παρουσιάζεται η εκτίμηση για το p-value κάθε μελέτης μεμονωμένα, καθώς και το συγκεντρωτικό p-value όλων των μελετών ως προς το συνεπικρατές( $p_{z2\_meta}$ ), επικρατές( $p_{z3\_meta}$ ) και υπολειπόμενο( $p_{z1\_meta}$ ) μοντέλο κληρονομικότητας. Συνοψίζεται το τελικό Z-score για κάθε ενότητα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ SATT/MAX ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΓΙΑ ΠΥ ΣΕ ΧΑΠ

ΠΙΝΑΚΑΣ 19 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ SATT/MAX ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΓΙΑ ΠΥ ΣΕ ΧΑΠ											
<b>Codominant</b>	author	date	country	_qhet	_z2	_pz2	_pz2_meta	_z2_meta			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	3,885456	-0,28893	0,772636	0,381805	0,874576			
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey		2,185556	0,028848					
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		0,245102	0,806377					
<b>Dominant</b>	author	date	country	_qhet	_z3	_pz3	_pz3_meta	_z3_meta			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	0,085091	-0,91203	0,361755	0,118695	1,560277			
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey								
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		-1,29914	0,193896					
<b>Recessive</b>	author	date	country	_qhet	_z1	_pz1	_pz1_meta	_z1_meta			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland	3,008352	-0,04863	0,96121	0,183988	1,328575			
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey		2,185556	0,028848					
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey		0,7698	0,441418					
<b>MAX</b>	author	date	country	_qhet	_z1	_z2	_z3	_pmax			
	Ulrich <i>et al.</i>	2010	Switzerland		-0,04863	-0,28893	-0,91203	0,599219	0,2995758	1,037344	0,525524
	Yildiz <i>et al.</i>	2003	Turkey		2,185556	2,185556		0,028432			2,191274
	Ulasli <i>et al.</i>	2013	Turkey	4,030897	0,7698	0,245102	-1,29914	0,349193			0,936156

### 3.4.3 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με πνευμονική υπέρταση σε άτομα που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Το forest plot έδειξε με τη μέθοδο των σταθερών επιδράσεων ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (εικόνα 47). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 1.40 (95% CI = 0.71-2.79) και το p-value ήταν 0.332 (>0.05). Το  $I^2$  ήταν 30.9%, το οποίο είναι ένδειξη για χαμηλή ετερογένεια (Παράρτημα εικόνα 101).

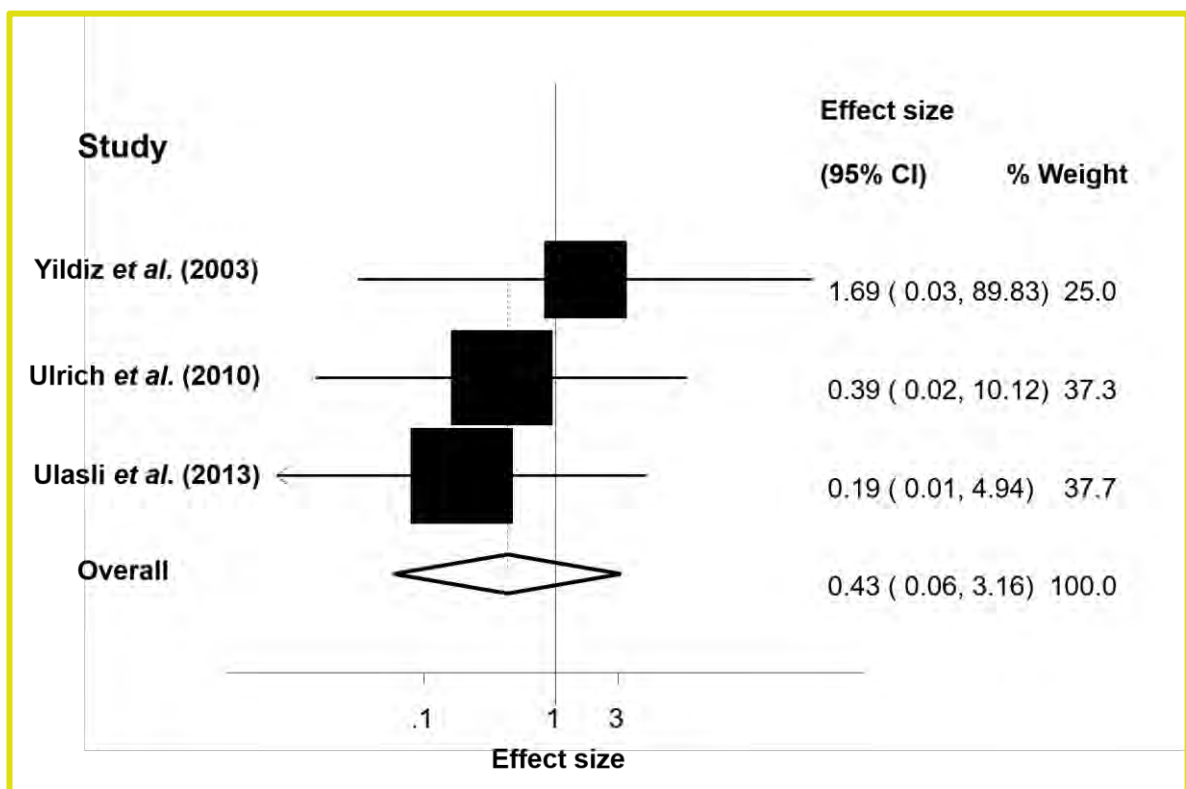


Εικόνα 47 forest plot PH in COPD (B vs. A) - fixed effects model

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης. Τα αποτελέσματα των γραφημάτων των Begg και Egger έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται σφάλμα δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 102, 103). Η αθροιστική μετα-ανάλυση με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Παράρτημα εικόνες 104, 105). Εξετάστηκε το φαινόμενο του Πρωτέα. Το γράφημα έδειξε ότι δεν παρουσιάστηκε φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 105, 106). Ελέγχθηκε η επιρροή κάθε μελέτης στο συγκεντρωτικό αποτέλεσμα. Καμία μελέτη δεν έδειξε να επηρεάζει το τρέχον αποτέλεσμα (107, 108).

### 3.4.4 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με πνευμονική υπέρταση σε άτομα που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας. Το forest plot με τη μέθοδο σταθερών επιδράσεων έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS για ΠΥ σε ΧΑΠ για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (εικόνα 48). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.43 (95% CI = 0.06-3.16) και το p-value ήταν 0.410 (>0.05). Το I<sup>2</sup> ήταν 0%, το οποίο είναι ένδειξη για μηδενική ετερογένεια (Παράρτημα εικόνα 110).



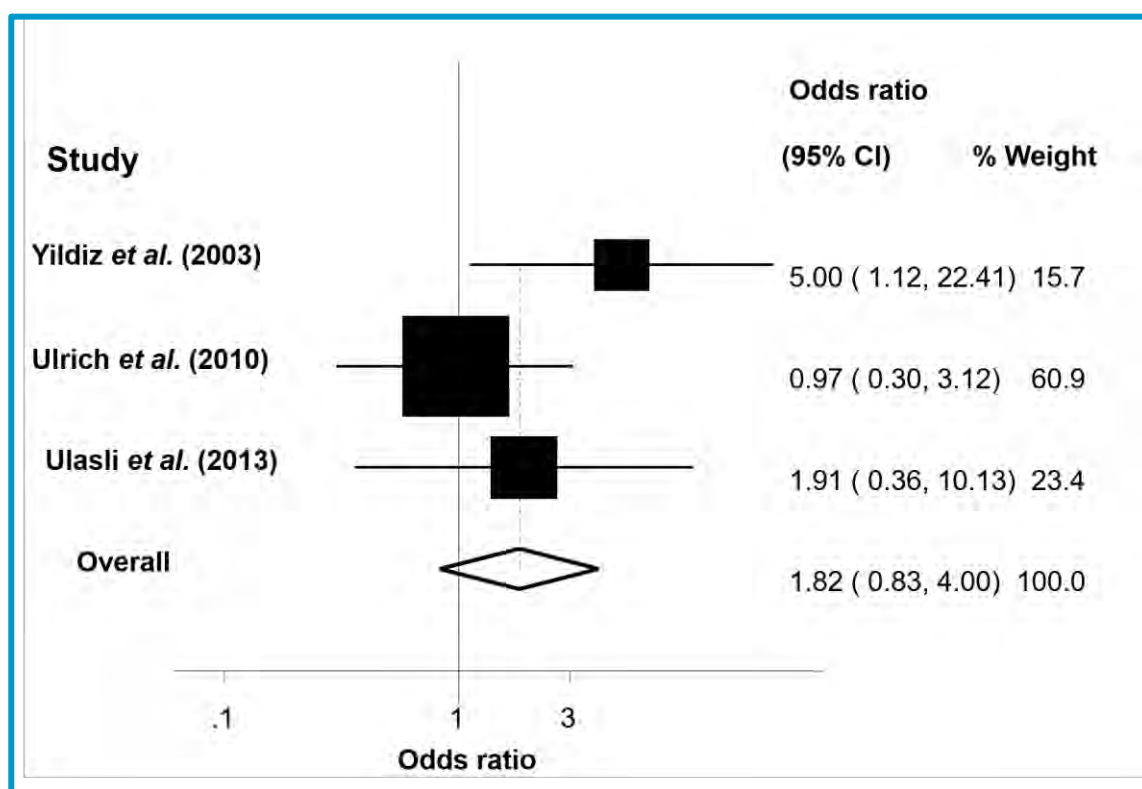
Εικόνα 48 forest plot PH in COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model

Έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα σημοσίευσης. Οι ενδείξεις στα γραφήματα του Begg και του Egger υποδηλώνουν απουσία σφάλματος δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 111, 112). Έγινε έλεγχος με χρήση αθροιστικής μετα-ανάλυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται συσχέτιση (Παράρτημα εικόνες 113, 114). Έγινε έλεγχος για φαινόμενο του Πρωτέα. Το γράφημα έδειξε ότι δεν παρουσιάζεται φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 115, 116). Έγινε αθροιστική μετα-ανάλυση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν επηρεάζει κάποια μελέτη το συγκεντρωτικό αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 117, 118).



### 3.4.5 Έλεγχος γενετικής συσχέτισης πολυμορφισμού A/B eNOS με ΠΥ σε ΧΑΠ ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας

Έγινε έλεγχος ως προς τη γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με πνευμονική υπέρταση σε άτομα που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Το forest plot έδειξε με τη μέθοδο των σταθερών επιδράσεων ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και ΠΥ με ΧΑΠ για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (εικόνα 49). Το συγκεντρωτικό OR ήταν 1.82 (95% CI = 0.83-4.00) και το p-value ήταν 0.133 (>0.05). Το I<sup>2</sup> ήταν 30%, το οποίο είναι ένδειξη για χαμηλό ποσοστό ετερογένειας (Παράρτημα εικόνα 119).



Εικόνα 49 forest plot PH in COPD (BB vs.AB+AA) - fixed effects model

Έγινε έλεγχος για συστηματικό σφάλμα σημοσίευσης. Οι ενδείξεις στα γραφήματα του Begg και του Egger έδειξαν την απουσία συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης (Παράρτημα εικόνες 120, 121). Κάναμε έλεγχο για αθροιστική μετα-ανάλυση για το μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική ένδειξη (Παράρτημα εικόνες 122, 123). Έγινε έλεγχος για φαινόμενο του Πρωτέα. Το γράφημα έδειξε ότι δεν παρουσιάζεται φαινόμενο του Πρωτέα (Παράρτημα εικόνες 124, 125). Έγινε έλεγχος ως προς την επιρροή κάθε μελέτης στη

συγκεντρωτική μετα-ανάλυση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν επηρεάζει κάποια μελέτη το τρέχον αποτέλεσμα (Παράρτημα εικόνες 126, 127).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε γονοτυπικός έλεγχος του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS στο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού και στη συνέχεια ελέγχθηκε η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με τρεις ασθένειες του πνευμονικού αγγειακού δικτύου:

- Την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ)
- Τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)
- Τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια με πνευμονική υπέρταση (ΠΥ σε ΧΑΠ)

Τα αποτελέσματα του εργαστηριακού μέρους έδειξαν ότι οι συχνότητες του αριθμού των αλληλόμορφων B και A για τον πολυμορφισμό VNTR του γονιδίου eNOS είναι ίσες στο σύνολο των ασθενών και των μαρτύρων (Allele B: 77.8%, Allele A: 22.2%).

Συγκεντρώσαμε μελέτες ασθενών μαρτύρων που πληρούσαν τις προϋποθέσεις για τη διεξαγωγή μιας μετα-ανάλυσης. Συγκεντρώθηκαν 3 μελέτες για ΠΑΥ, εκ των οποίων η μία ήταν η εργαστηριακή έρευνα που διεξήχθη στο εργαστήριο της Βιολογίας του Πανεπιστημίου. Επίσης συγκεντρώθηκαν 5 μελέτες για ΧΑΠ και 3 μελέτες για ΠΥ σε ΧΑΠ. Έτσι, καταφέραμε να δημιουργήσουμε τρεις διαφορετικές ομάδες δεδομένων για να προχωρήσουμε στο στάδιο της στατιστικής ανάλυσης. Κάθε ομάδα διερευνήθηκε ως προς τρία μοντέλα κληρονομικότητας και ως προς το Cochran Armitage Trent Test (CATT). Τα μοντέλα κληρονομικότητας που εξετάστηκαν είναι:

- ❖ Συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (*B vs. A*)
- ❖ Επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας (*AB+BB vs. AA*)
- ❖ Υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας (*BB vs. AA+AB*)

### 4.1 Συμπεράσματα - συζήτηση του ελέγχου γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΠΑΥ

Με τη μέθοδο CATT έγινε πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με ΠΑΥ ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας και προέκυψε η τιμή του συγκεντρωτικού z-score=0.711 με αντίστοιχο p-value=0.47. Αντίστοιχα, με τη μέθοδο CATT υπολογίστηκαν τα p-value=0.67 και z-score=0.41 για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας και p-value=0.39 και z-score=0.84 για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας.

Στη συνέχεια έγινε μετα-ανάλυση ορίζοντας σαν μέγεθος επίδρασης το Odds Ratio για τον προσδιορισμό της γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με ΠΑΥ ως προς τρία διαφορετικά μοντέλα κληρονομικότητας.

Το συγκεντρωτικό OR για το συνεπικρατές μοντέλο (*B vs. A*) ήταν OR=0.17 με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.78-1.76) και p-value=0.447.

Στον έλεγχο για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας το συγκεντρωτικό OR ήταν 0.74 με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.23-2.43) και p-value=0.623.

Το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας ελέγχθηκε με εφαρμογή του μοντέλου σταθερών και τυχαίων επιδράσεων λόγω ύπαρξης ετερογένειας μεταξύ των μελετών. Στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων οι μετρήσεις ήταν OR=1.29, CI=(0.73-2.28) και p-value=0.385, ενώ αντίστοιχα για το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων οι μετρήσεις ήταν OR=1.71, CI=(0.42-7.05) και p-value=0.457.

Τόσο το CATT τεστ όσο και τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης για όλα τα μοντέλα κληρονομικότητας. Πιθανός λόγος που δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού του γονιδίου eNOS με ΠΑΥ είναι το γεγονός ότι είχαμε μικρό αριθμό μελετών καθώς επίσης ότι μία από τις μελέτες είχε ανεπαρκή δεδομένα (Vadaralli *et al*). Ένας δεύτερος λόγος είναι ότι κατά την καταγραφή των δεδομένων υπήρχαν ορισμένα δημοσιευμένα άρθρα σε άλλη γλώσσα πέραν της αγγλικής και ήταν χωρίς πρόσβαση.

## 4.2 Συμπεράσματα – συζήτηση του ελέγχου γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΧΑΠ

Εφαρμόστηκε η μέθοδος CATT βάση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων για πρόβλεψη της γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS ως προς το συνεπικρατές, επικρατές και υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Οι υπολογισμοί που προέκυψαν για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας έδειξαν συγκεντρωτικό z-score=1.63 και αντίστοιχο p-value=0.10. Έπειτα, οι υπολογισμοί για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας έδειξαν συγκεντρωτικό p-value=0.67 και συγκεντρωτικό z-score=0.41. Τέλος, οι υπολογισμοί για έλεγχο συσχέτισης ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας έδωσαν συγκεντρωτικά αποτελέσματα p-value=0.07 και z-score=1.78.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μετα-αναλυτικές μέθοδοι με μέγεθος επίδρασης το Odds Ratio για έλεγχο γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με την εμφάνιση της ΧΑΠ. Οι μετρήσεις που προέκυψαν ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας με τη μέθοδο των σταθερών επιδράσεων ήταν OR=0.81, CI=(0.64-1.03) και p-value=0.089. Λόγω ύπαρξης ετερογένειας μεταξύ των μελετών ( $I^2=56,6\%$ ), έγινε ένας επιπρόσθετος έλεγχος με τη χρήση της μεθόδου των τυχαίων επιδράσεων. Οι μετρήσεις που προέκυψαν ήταν OR=0.82, CI=(0.53-1.27) και p-value=0.384.

Ο έλεγχος της γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού ως προς το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας έδωσε συγκεντρωτικό OR=0.88, με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.47-1.68) και p-value=0.706.

Στον έλεγχο γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας οι συγκεντρωτικές μετρήσεις ήταν OR=0.77, με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.59-1.00) και p-value=0.05.

Το CATT τεστ έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού για κανένα μοντέλο κληρονομικότητας. Παρόλα αυτά, υπήρξε οριακά στατιστικά σημαντική ένδειξη για συσχέτιση ως προς το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης με μέγεθος επίδρασης το OddsRatio έδειξαν ότι για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας οριακά δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και την εμφάνιση της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, με ένδειξη για υψηλό ποσοστό ετερογένειας μεταξύ των μελετών. Εκείνο που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική ένδειξη για γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας.

Πιθανός λόγος που δεν υπήρξε ταύτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της μεθόδου CATT και Μετα-Ανάλυσης με OddsRatio είναι γιατί μία από τις 5 μελέτες που είχαν συγκετρωθεί κατά τη συστηματική ανασκόπηση είχε ανεπαρκή δεδομένα (Yildiz *et.al*).

### 4.3 Συμπεράσματα – συζήτηση του ελέγχου γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού για ΠΥ σε ΧΑΠ

Εφαρμόστηκε η μεθοδος CATT για πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με ΠΥ σε ΧΑΠ. Το συγκεντρωτικό z-score για το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας ήταν 0.87 και η τιμή του p-value=0.38. Το συγκεντρωτικό z-score για το επικρατές μοντέλο κληρονομικότητας ήταν 1.5 και η τιμή του p-value=0.11. Το συγκεντρωτικό z-score για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας ήταν 1.38 και η τιμή του p-value=0.18.

Κατόπιν, έγινε έλεγχος γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού με μετα-ανάλυση εφαρμόζοντας σαν μέγεθος επίδρασης το Odds Ratio.

Ο έλεγχος γενετικής συσχέτισης ως προς το συνεπικρατές μοντέλο κληρονομικότητας έδωσε συγκεντρωτικό OR=1.40 και διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.71-2.79). Η τιμή του p-value ήταν 0.235.

Εξετάστηκε η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού με τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας. Οι μετρήσεις που προέκυψαν ήταν OR=0.43, με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.06-3.16) και p-value=0.708.

Τέλος, ελέγχθηκε η γενετική συσχέτιση του πολυμορφισμού για το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονομικότητας. Τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης ήταν OR=1.82, με διαστήματα εμπιστοσύνης CI=(0.83-4.00) και p-value=0.240.

Έγινε πρόβλεψη γενετικής συσχέτισης με το CATT και με μετα-αναλυτικές μεθόδους για έλεγχο συσχέτισης για πνευμονική υπέρταση σε ΧΑΠ. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας με πνευμονική υπέρταση για κανένα μοντέλο κληρονομικότητας.

## 4.4 Επίλογος

Εν κατακλείδι, στην παρούσα εργασία έγινε γονοτυπική ανάλυση σε 88 δείγματα ασθενών και 88 δείγματα υγιών μαρτύρων από το ΑΤΤΙΚΟΝ Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση στο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού.

Παρόλ' αυτά, η συγκεκριμένη έρευνα έδειξε ότι παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και την εμφάνιση Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, καθώς και οριακά μη σημαντική συσχέτιση για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας. Ως προς τον έλεγχο του πολυμορφισμού για την εμφάνιση της Πνευμονικής Αρτηριακής Υπέρτασης και για Πνευμονική Υπέρταση σε ΧΑΠ δεν υπήρξε ένδειξη για γενετική συσχέτιση.

Για την περαιτέρω αξιολόγηση του πολυμορφισμού A/B του γονιδίου eNOS και τον κίνδυνο εμφάνισης πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και πνευμονικής υπέρτασης σε ΧΑΠ, περισσότερες μελέτες με ολοκληρωμένα γονοτυπικά δεδομένα απαιτούνται για την επαλήθευση των ερευρημάτων μας. Ίσως πρέπει να διερευνηθούν και επιπλέον περιοχές του γονιδίου eNOS όπου παρουσιάζονται πολυμορφισμοί άλλου τύπου, ώστε να βρεθεί ο μηχανισμός που οδηγεί στην παθογένεση των παραπάνω ασθενειών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Armitage, P. 1955. «Tests for linear trends in proportions and frequencies.» *Biometrics* 11: 375–386.
- Bagos, PG. 2013. «Genetic model selection in genome-wide association studies: robust methods and the use of meta-analysis.» *Stat Appl Genet Mol Biol* 12 (3): 285-308.
- Bagos, PG, and GK Nikolopoulos. 2009. "Generalized least squares for assessing trends in cumulative meta-analysis with applications in genetic epidemiology." *Journal of Clinical Epidemiology* 62 (10): 1037-1044.
- Begg, CB, και M Mazumdar. 1994. «Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias.» *Biometrics* 50: 1088-101.
- Borenstein, Michael, Larry V Hedges, Julian PT Higgins, και Hannah R Rothstein. 2009. *Introduction to Meta-Analysis*. UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Cochran, WG. 1954. «Some methods for strengthening the common chi-squared tests.» *Biometrics* 10: 417–451.
- Cook, DJ, CD Mulrow, και RB Haynes. 1997. «Systematic reviews: synthesis of best evidence for clinical decisions.» *Ann Intern Med* 126: 376–80.
- DerSimonian, R, και N Laird. 1986. «Meta-analysis in clinical trials.» *Control Clin Trials* 7: 177–88.
- Droma, Y, M Hanaoka, M Ota, Y Katsuyama, T Koizumi, K Fujimoto, T Kobayashi, και K Kubo. 2002. «Positive Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms With High-Altitude Pulmonary Edema.» *Circulation* 106 (7): 826-30.
- Egger, M, GD Smith, M Schneider, και C Minder. 1997. «Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test.» *BMJ* 315: 629-34.
- Freidlin, B, G Zheng, Z Li, και JL Gastwirth. 2002. «Trend tests for case-control studies of genetic markers: power, sample size and robustness.» *Human Heredity* 53 (3): 146-52.
- Gelehrter, DT, SF Collins, και D Ginsburg. 1998. *Principles of Medical Genetics*. 2nd ed. USA: Williams & Wilkins.
- Glass, G. 1976. «Primary, secondary and meta-analysis of research.» *Educ Res* 5:3-8.
- Green, Michael R., και Joseph Sambrook. 2012. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Τόμ. 1. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hampl, V, και J Herget. 2000. «Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension.» *Physiological Reviews* 80 (4): 1337-1372.

- Higgins, Julian PT, Simon G Thompson, Jonathan J Deeks, και Douglas G Altman. 2003. «Measuring inconsistency in meta-analyses.» *BMJ* 327: 557–60.
- Ioannidis, J. P. 2003. «Genetic associations: False or true?» *Trends Mol. Med.* 135-138.
- Ioannidis, JP, και TA Trikalinos. 2005. «Early extreme contradictory estimates may appear in published research: the Proteus phenomenon in molecular genetics research and randomized trials.» *J Clin Epidemiol* 58 (6): 543-9.
- Khan, Khalid S, Regina Kunz, Jos Kleijnen, and Gerd Antes. 2003. "Five steps to conducting a systematic review." *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE* 96:118-121.
- Lau, J, CH Schmid, και TC Chalmers. 1995. «Cumulative meta-analysis of clinical trials builds evidence for exemplary medical care.» *J Clin Epidemiol* 48 (1): 45-57.
- Lau, J, EM Antman, J Jimenez-Silva, B Kupelnick, F Mosteller, και TC Chalmers. 1992. «Cumulative meta-analysis of therapeutic trials for myocardial infarction.» *New England Journal of Medicine* 327 (4): 248-54.
- Lau, J., J. P. Ioannidis, and C.H. Schmid. 1997. "Quantitative synthesis in systematic reviews." *Ann Intern Med* 820–826.
- Littell, Julia H., Jacqueline Corcoran, και Vijayan Pillai. 2008. *Systematic Reviews and Meta-Analysis*. New York: Oxford University Press.
- Mantel, N, και W Haenszel. 1959. «Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease.» *J Natl Cancer Inst* 22: 719–48.
- Minai, OA, A Chaouat, και S Adnot. 2010. «Pulmonary hypertension in COPD: epidemiology, significance, and management: pulmonary vascular disease: the global perspective.» *Chest* 137 ((6 Suppl)): 39S-51S.
- Miyahara, K, T Kawamoto, K Sase, Y Wi, K Toda, και LX Yang. 1994. «Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene.» *Eur. J. Biochem.* 223 (3): 719-26.
- Miyamoto, Y, Y Saito, N Kajiyama, M Yoshimura, Y Shimasaki, M Nakayama, S Kamitani, και συν. 1998. «Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension.» *Hypertension* 32 (1): 3-8.
- Normand, S.L. 1999. «META-ANALYSIS: FORMULATING, EVALUATING, AND REPORTING.» *Statist. Med.* 18: 321–359.
- Novoradovsky, A, ML Brantly, MA Waclawiw, PP Chaudhary, H Ihara, L Qi, NT Eissa, και συν. 1999. «Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency.» *Am J Respir Cell Mol Biol* 20 (3): 441-7.
- Peacock, AJ, NF Murphy, JJ McMurray, L Caballero, και S Stewart. 2007. «An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension.» *European Respiratory Journal* 30 (1): 104-109.



- Ross, Harris J, Michael J Bradburn, Jonathan J Deeks, Roger M Harbord, Douglas G Altman, και Jonathan A C Sterne. 2008. «metan: fixed- and random-effects meta-analysis.» *The Stata Journal* 8 (1): 3–28.
- Russel, Peter J. 2006. *iGenetics : A Mendelian Approach (1st edition)*. New York: Pearson Education, Inc.-Benjamin Cummings.
- Sharp, Stephen. 1998. «sbe23: Meta-analysis regression.» *Stata Technical Bulletin*, 16-24.
- Shaw, JA, Dent, AG, LH Passmore, DJ Burstow, RV Bowman, PV Zimmerman, KM Fong, και IA Yang. 2012. «Genetic influences on right ventricular systolic pressure (RVSP) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).» *BMC Pulmonary Medicine* 12-25.
- Simonneau, G, MA Gatzoulis, I Adatia, D4 Celermajer, C Denton, A Ghofrani, M Gomez Sanchez, και συν. 2013. «Updated clinical classification of pulmonary hypertension.» *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25 Suppl): D34-41.
- Steichen, Thomas J. 1998. «sbe19: Tests for publication bias in meta-analysis.» *Stata Technical Bulletin* 41: 9-15.
- Sterne, Jonathan. 1998. «sbe22: Cumulative meta-analysis.» *Stata Technical Bulletin*, 13–16.
- Tobias, Aurelio. 1999. «sbe26: Assessing the influence of a single study in meta-analysis.» *Stata Technical Bulletin*, 15-17.
- Trikalinos, TA, G Slanti, E Zintzaras, και JP. Ioannidis. 2008. «Meta-analysis methods.» *Adv Genet* 60:311-334.
- Ulasli, SS, FO Eyuboglu, H Verdi, και FB Atac. 2013. «Associations between endothelial nitric oxide synthase A/B, angiotensin converting enzyme I/D and serotonin transporter L/S gene polymorphisms with pulmonary hypertension in COPD patients.» *Molecular Biology Reports* 40 (10): 5625-33.
- Ulrich, S, J Szamalek-Hoegel, M Hersberger, M Fischler, JS Garcia, LC Huber, E Grünig, B Janssen, και R Speich. 2010. «Sequence variants in BMPR2 and genes involved in the serotonin and nitric oxide pathways in idiopathic pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension:relation to clinical parameters and comparison with left heart disease.» *Respiration* 79 (4): 279-87.
- Ulrich, S, M Hersberger, M Fischler, Y Nussbaumer-Ochsner, U Treder, EW Russi, και R Speich. 2010. «Genetic polymorphisms of the serotonin transporter, but not the 2a receptor or nitric oxide synthetase, are associated with pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease.» *Respiration* 79 (4): 288-95.
- Vadapalli, S, ML Satyanarayana, KL Chaitra, HS Rani, BK Sastry, και P Nallari. 2012. «Epistatic interactions in idiopathic pulmonary arterial hypertension.» *Indian Journal of Human Genetics* 18 (1): 56-61.

Wang, XL, AS Sim, RF Badenhop, RM McCredie, και DE Wilcken. 1996. «A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene.» *Nature Medicine* 2 (1): 41-45.

Yildiz, P, H Oflaz, N Cine, N Erginel-Unaltuna, F Erzenin, και V Yilmaz. 2003. «Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase enzyme associated with pulmonary hypertension in patients with COPD.» *Respiratory Medicine* 97 (12): 1282–1288.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 20 – ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΑΡΘΡΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΠΡΟΣ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΩΝ PRIMERS ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΤΗΣ PCR**

PMID	REFERENCE FROM PMID 1	DISEASE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	METHOD OF ELECTROPHORESIS	PCR PROGRAM	DNA POLYMERASE
22695028	[2] 10030842	COPD	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTG	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	6% PAGE	-	REDTaq DNA polymerase
19844076	[42]8564837	IPAH and CTPH	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	5% PAGE	DENAT 94°C ANNEAL 56°C EXTEN 72°C	Taq DNA polymerase
19556740	[22] 8564837	PH in COPD patients	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	5% PAGE	DENAT 94°C ANNEAL 56°C EXT 72°C	Taq DNA polymerase
14682408		PH in COPD patients	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAT	3% agarose gel	DENAT 94°C ANNEAL 55°C EXT 72°C	Taq DNA polymerase
12176955	[15]8564837	HAPE	AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT	TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC	12% PAGE	DENAT 94°C ANNEAL 56°C EXT 72°C	Taq DNA polymerase

Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Ulrich et al. (2010)	5.308	0.631	44.631	2.51
Vadapalli et al. (2016)	1.231	0.569	2.663	27.21
Current Study (2016)	1.000	0.605	1.654	70.28
M-H pooled OR	1.171	0.780	1.758	100.00

Heterogeneity chi-squared = 2.33 (d.f. = 2) p = 0.312  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 14.1%  
Test of OR=1 : z= 0.76 p = 0.447

Εικόνα 50 meta-analysis table PAH (B vs. A) (fixed effects model)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 3 studies (exponential form)					
Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Current Study	1.000	0.605	1.654	0.000	1.000
Vadapalli et al.	1.135	0.744	1.732	0.587	0.557
Ulrich et al.	1.226	0.810	1.857	0.964	0.335

Εικόνα 51 metacum table PAH (B vs. A) (fixed effects model)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]	
Vadapalli et al.	1.1213413	.68711305	1.8299848
Ulrich et al.	1.1350391	.74377394	1.7321309
Current Study	1.8904145	.90861195	3.9331059
Combined	1.2263504	.81004162	1.856615

Εικόνα 52 influential meta-analysis table PAH (B vs. A) (fixed effects model)

Number of studies: 3

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]
First study	9.0000	0.045	1.0533 76.9048
Subsequent studies	1.1350	0.557	0.7438 1.7321
All Studies	1.4831	0.304	0.6991 3.1463

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

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

z-value = 1.856

P-value = 0.063

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

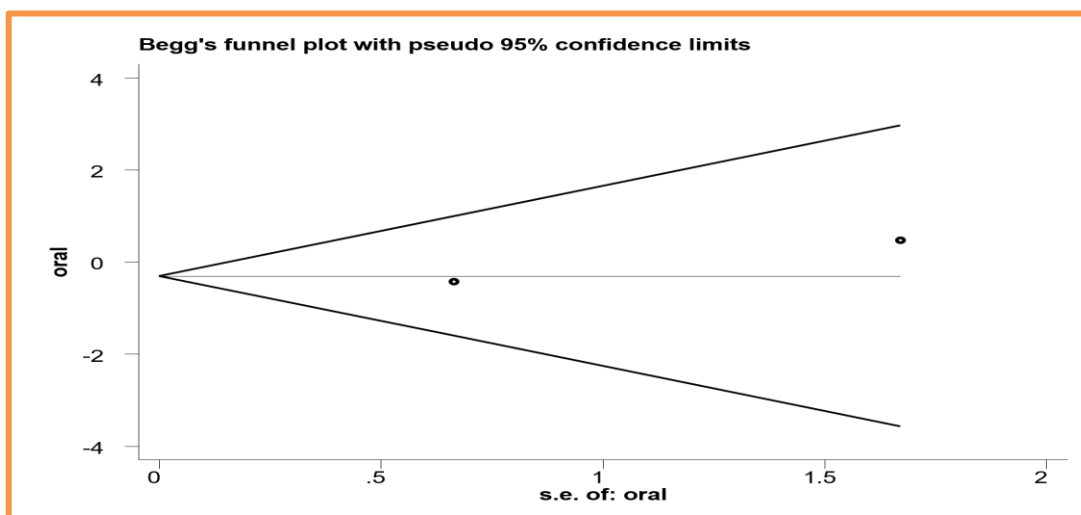
	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]	rho
Including all studies	-0.81255	0.07203	0.000	-0.95373 -0.67136	-
0.548					
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000 0.00000	-
0.857					

Εικόνα 53 metatrend table PAH (B vs. A)

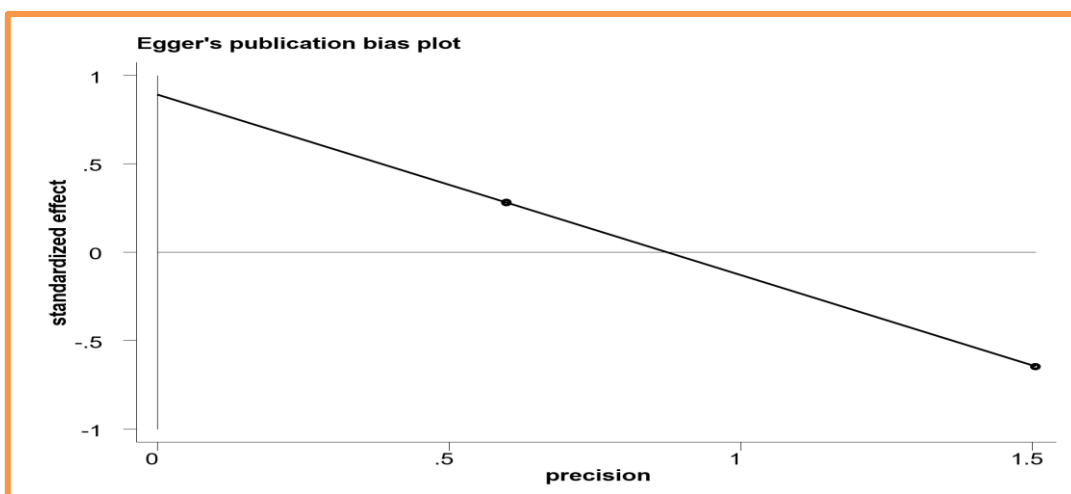
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Ulrich et al. (2010)	1.596	0.060	42.126	9.75
Current Study (2016)	0.651	0.177	2.391	90.25
M-H pooled OR	0.743	0.227	2.433	100.00

Heterogeneity chi-squared = 0.25 (d.f. = 1) p = 0.618  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 0.0%  
Test of OR=1 : z= 0.49 p = 0.623

Εικόνα 54 meta-analysis table PAH (BB+AB vs. AA) (fixed effects model)



Εικόνα 55 Begg's funnel plot PAH (BB+AB vs. AA)



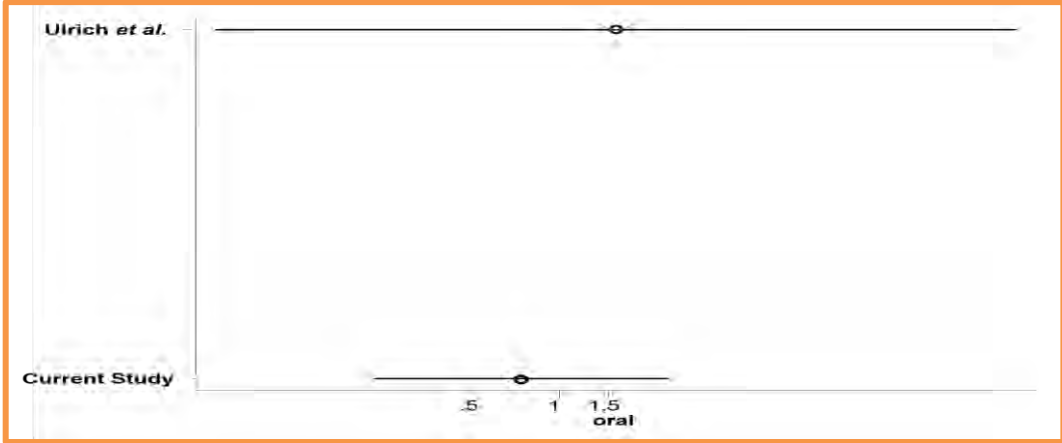
Εικόνα 56 Egger's plot PAH (BB+AB vs. AA)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 2 studies (exponential form)

---

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Ulrich et al.	1.596	0.060	42.126	0.280	0.780
Current Study	0.736	0.220	2.465	-0.498	0.619

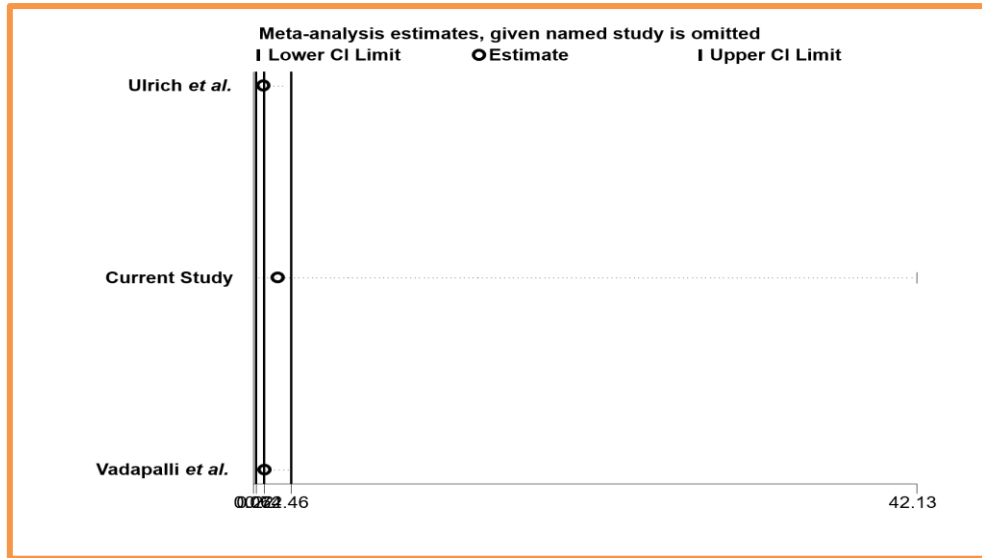
Εικόνα 57 metacum eNOS & PAH (BB+AB vs. AA) - fixed effects model



Εικόνα 58 metacum graph PAH (BB+AB vs. AA) (fixed effects model)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulrich et al.	.65079367	.17714483 2.390882
Current Study	1.5957447	.06044707 42.126129
Vadapalli et al.	.73552519	.21951002 2.4645677
Combined	.73552516	.21951001 2.4645676

Εικόνα 59 influential meta-analysis table PAH (BB+AB vs. AA) (fixed effects model)



Εικόνα 60 metainf graph PAH (BB+AB vs. AA) (fixed effects model)



Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Ulrich et al. (2010)	5.500	0.600	50.442	4.28
Current Study (2016)	1.101	0.600	2.020	95.72
M-H pooled OR	1.289	0.727	2.284	100.00

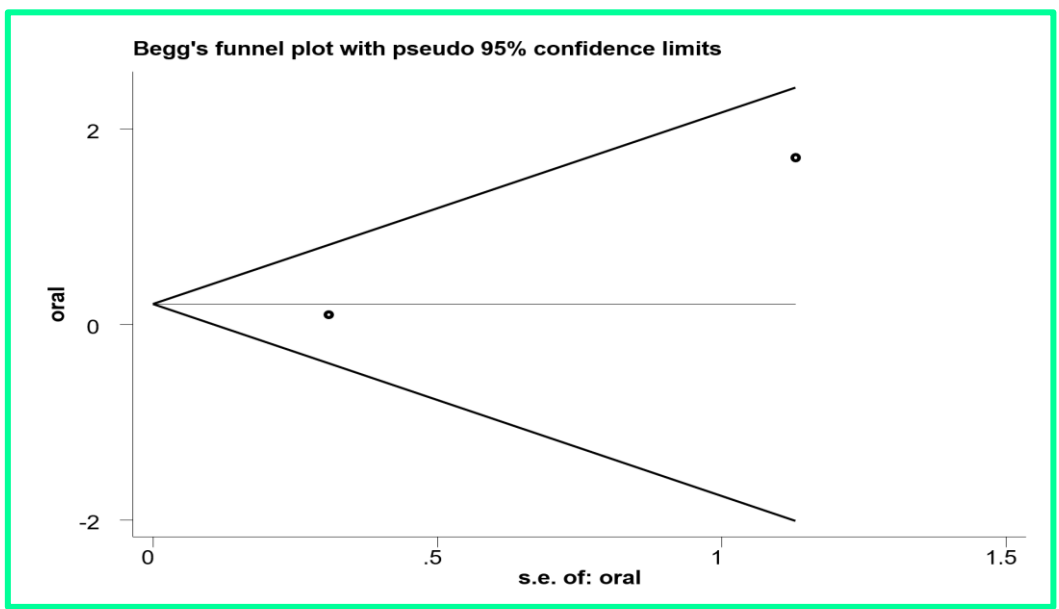
Heterogeneity chi-squared = 1.91 (d.f. = 1) p = 0.167  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 47.6%  
Test of OR=1 : z= 0.87 p = 0.385

Εικόνα 61 meta-analysis table PAH (BB vs. AA+AB) - fixed effects model

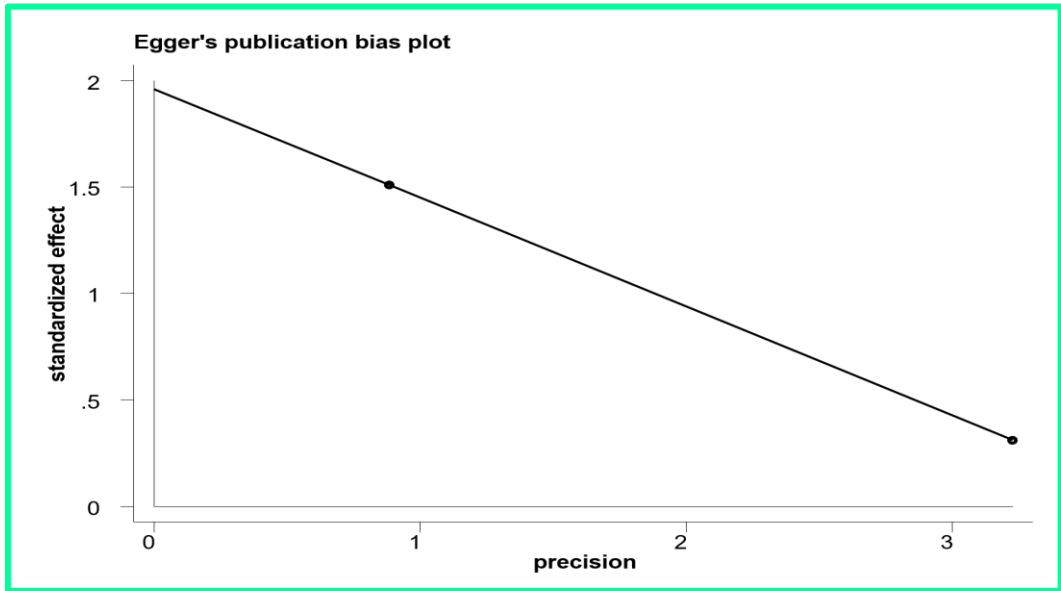
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Ulrich et al. (2010)	5.500	0.600	50.442	27.44
Current Study (2016)	1.101	0.600	2.020	72.56
D+L pooled OR	1.711	0.415	7.050	100.00

Heterogeneity chi-squared = 1.91 (d.f. = 1) p = 0.167  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 47.6%  
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.6231  
Test of OR=1 : z= 0.74 p = 0.457

Εικόνα 62 meta-analysis table PAH (BB vs. AA+AB) - random effects model



Εικόνα 63 Begg's funnel plot PAH (BB vs. AA+AB)

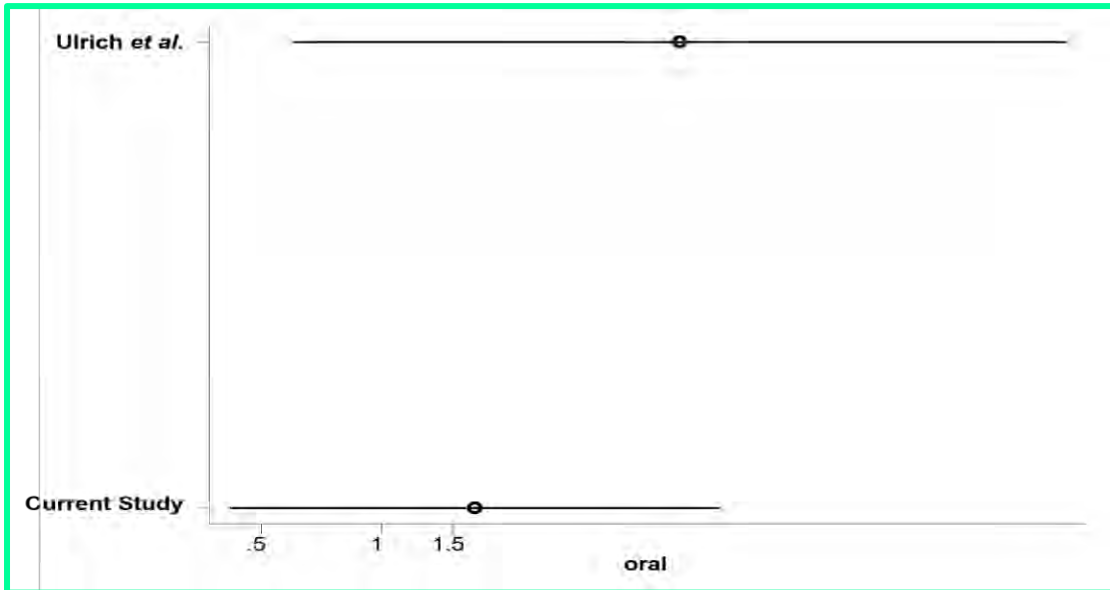


Εικόνα 64 Egger's plot PAH (BB vs. AA+AB)

Cumulative random-effects meta-analysis of 2 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI Lower	95% CI Upper	z	P value
Ulrich et al.	5.500	0.600	50.442	1.508	0.132
Current Study	1.704	0.419	6.926	0.745	0.457

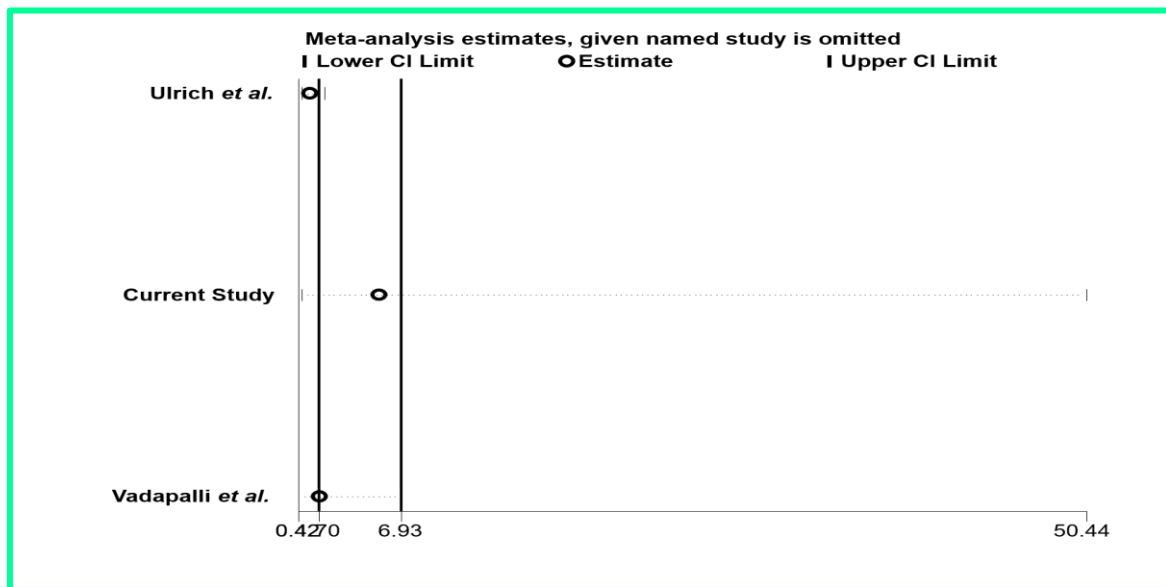
Εικόνα 65 metacum table PAH (BB vs. AB+AA) (random effects model)



Εικόνα 66 metacum graph PAH (BB vs. AB+AA) (random effects model)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulrich et al.	1.100629	.59980476 2.0196307
Current Study	5.5	.59970367 50.441574
Vadapalli et al.	1.7037383	.41907787 6.9264555
Combined	1.7037383	.41907787 6.9264553

Εικόνα 67 influential meta-analysis table PAH (BB vs. AB+AA) (random effects model)



Εικόνα 68 influential meta-analysis graph PAH (BB vs. AB+AA) (random effects model)

Study	OR	[95% Conf. Interval]	% Weight
Arif et al. (2007)	0.507	0.327 0.786	39.50
Ulrich et al. (2010)	0.960	0.398 2.316	6.70
Shaw et al. (2012)	0.997	0.724 1.373	49.62
Ulasli et al. (2013)	1.291	0.465 3.584	4.19
M-H pooled OR	0.813	0.641 1.032	100.00

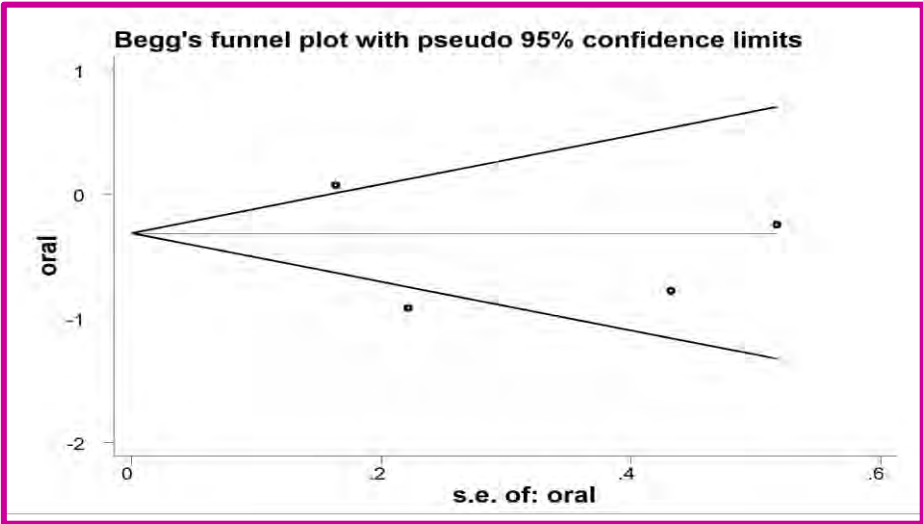
Heterogeneity chi-squared = 6.96 (d.f. = 3) p = 0.073  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 56.9%  
Test of OR=1 : z= 1.70 p = 0.089

Εικόνα 69 meta-analysis table COPD (B vs. A) - fixed effects model

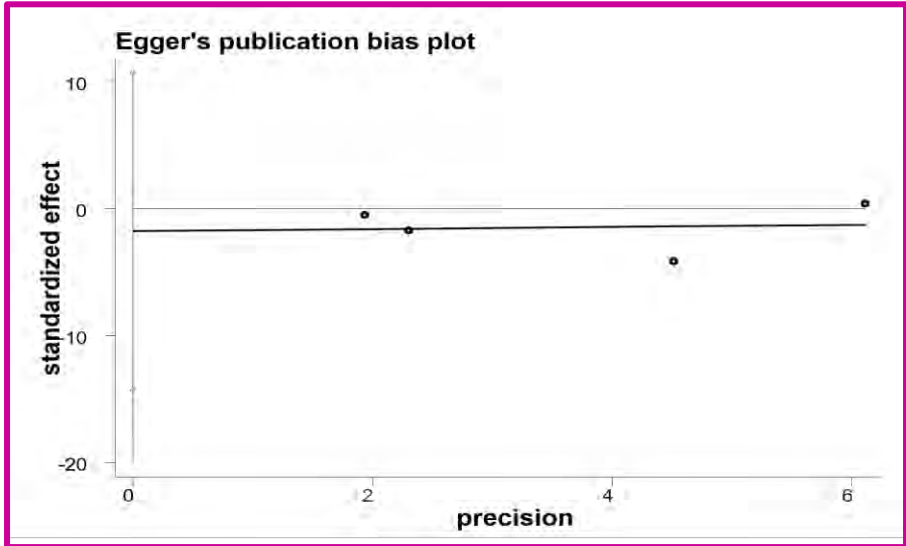
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Arif et al. (2007)	0.507	0.327	0.786	32.35
Ulrich et al. (2010)	0.960	0.398	2.316	16.25
Shaw et al. (2012)	0.997	0.724	1.373	38.17
Ulasli et al. (2013)	1.291	0.465	3.584	13.24
D+L pooled OR	0.824	0.532	1.275	100.00

Heterogeneity chi-squared = 6.96 (d.f. = 3) p = 0.073  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 56.9%  
Estimate of between-study variance Tau-squared = 0.1034  
Test of OR=1 : z= 0.87 p = 0.384

Εικόνα 70 meta-analysis table COPD (B vs. A) - random effects model



Εικόνα 71 Begg's funnel plot COPD (B vs.A)



Εικόνα 72 Egger's plot COPD (B vs.A)

Meta-analysis regression		No of studies = 4			
		tau^2 method	reml		
		tau^2 estimate =	.277		
Successive values of tau^2 differ by less than 10^-4 :convergence achieved					
	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
stdor	-.6102904	2.205615	-0.28	0.782	-4.933216 3.712635
_cons	-.2687266	.7307886	-0.37	0.713	-1.701046 1.163593

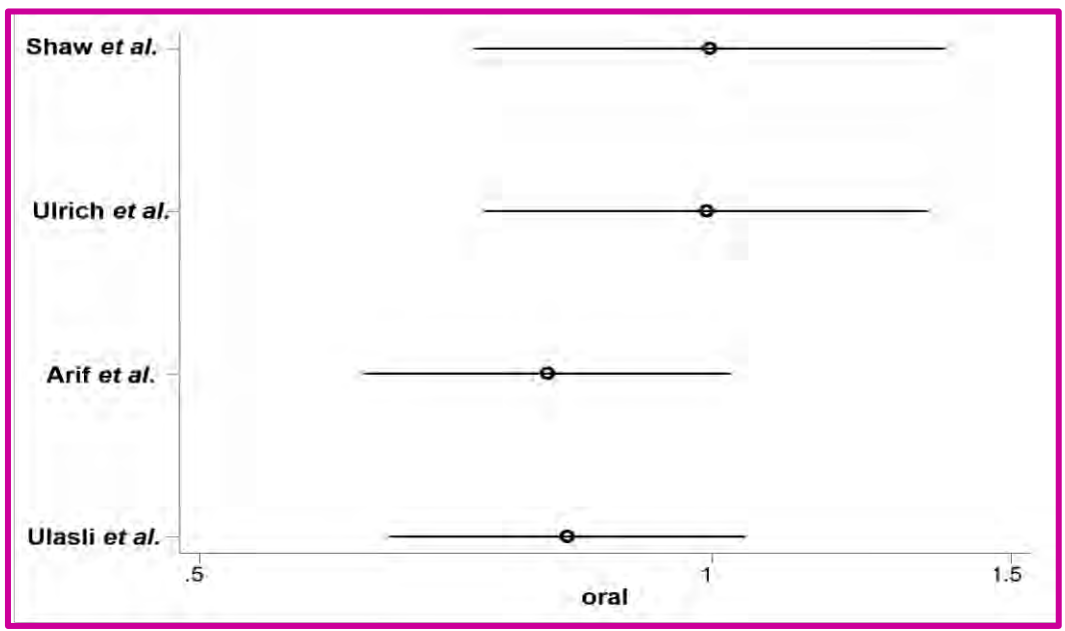
Εικόνα 73 meta-regression COPD (B vs.A)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)					
	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Trial					
Shaw et al.	0.997	0.724	1.373	-0.016	0.987
Ulrich et al.	0.993	0.735	1.341	-0.047	0.963
Arif et al.	0.801	0.625	1.026	-1.758	0.079
Ulasli et al.	0.822	0.646	1.046	-1.593	0.111

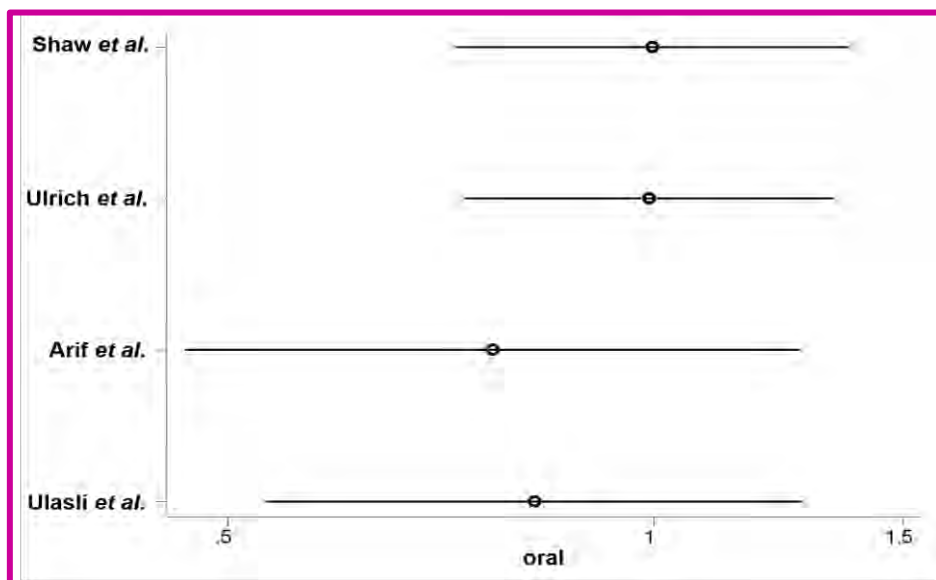
Εικόνα 74 metacum table COPD (B vs. A) – fixed effects model

Cumulative random-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)					
	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Trial					
Shaw et al.	0.997	0.724	1.373	-0.016	0.987
Ulrich et al.	0.993	0.735	1.341	-0.047	0.963
Arif et al.	0.769	0.466	1.269	-1.026	0.305
Ulasli et al.	0.824	0.532	1.274	-0.871	0.384

Εικόνα 75 metacum table COPD (B vs. A) – random effects model



Εικόνα 76 metacum graph COPD (B vs.A) - fixed effects model



Εικόνα 77 metacum graph COPD (B vs.A) - random effects model

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 4

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	0.9973	0.987	0.7243	1.3732
Subsequent studies	0.7437	0.323	0.4133	1.3382
All Studies	0.8238	0.384	0.5324	1.2744

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

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

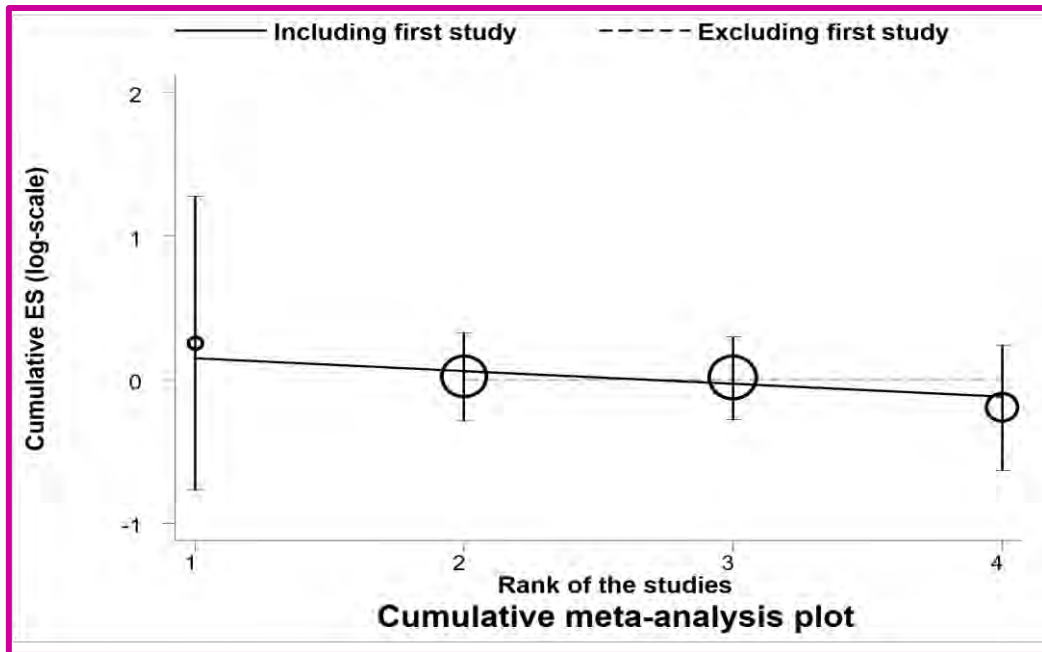
z-value = 0.860

P-value = 0.390

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	-0.10206	0.01032	0.000	-0.12228	-0.08184	-0.726
Excluding first study	-0.09012	0.04504	0.045	-0.17839	-0.00185	-0.803

Εικόνα 78 metatrend table COPD (B vs.A)



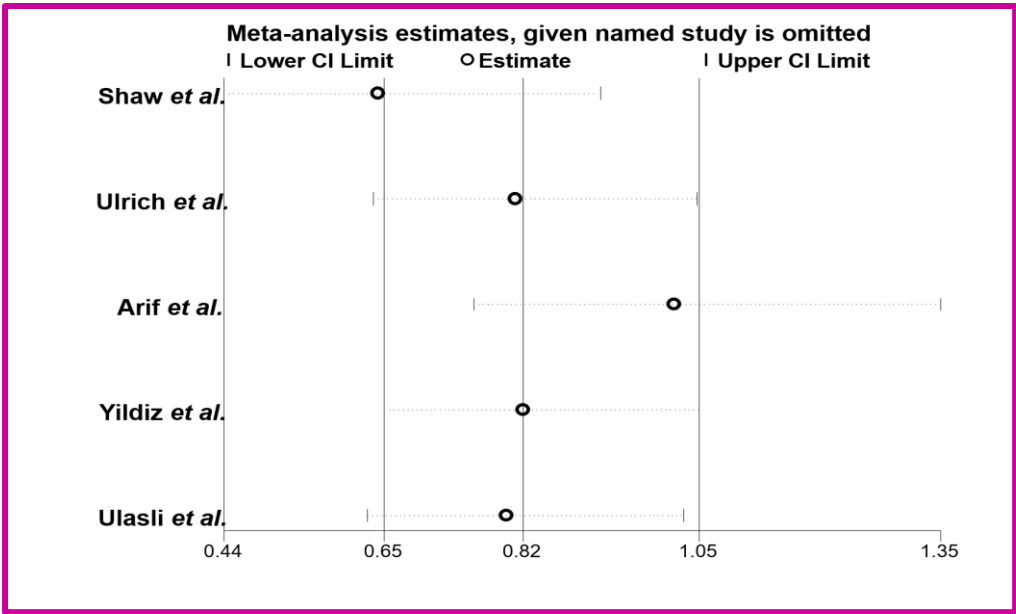
Εικόνα 79 metatrend graph COPD (B vs.A)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Shaw et al.	.6382333	.44247684 .92059451
Ulrich et al.	.81200987	.63209957 1.0431268
Arif et al.	1.0138153	.75982296 1.3527117
Yildiz et al.	.82220918	.64617896 1.046193
Ulasli et al.	.80065745	.62485516 1.0259216
Combined	.82220916	.64617894 1.046193

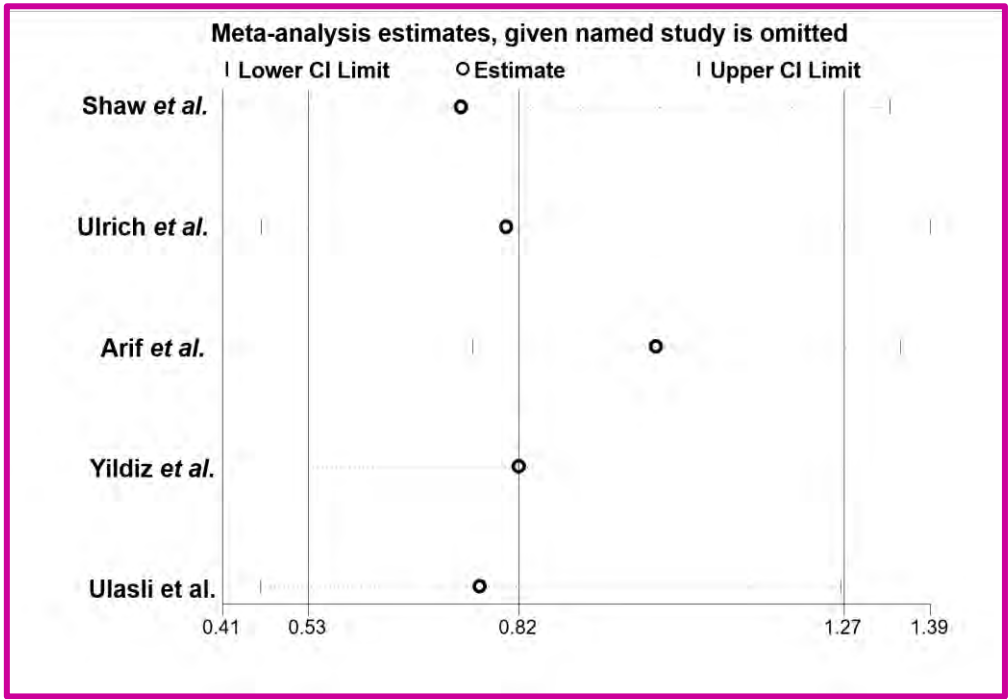
Εικόνα 80 metainf table COPD (B vs.A) - fixed effects model

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Shaw et al.	.7436679	.41328719 1.338154
Ulrich et al.	.80660576	.46669126 1.394097
Arif et al.	1.0138153	.75982296 1.3527117
Yildiz et al.	.82375354	.53245205 1.2744244
Ulasli et al.	.76944464	.46645415 1.2692461
Combined	.82375352	.53245203 1.2744244

Εικόνα 81 metainf table COPD (B vs.A) - random effects model



Εικόνα 82 metaif graph COPD (B vs.A) - fixed effects model



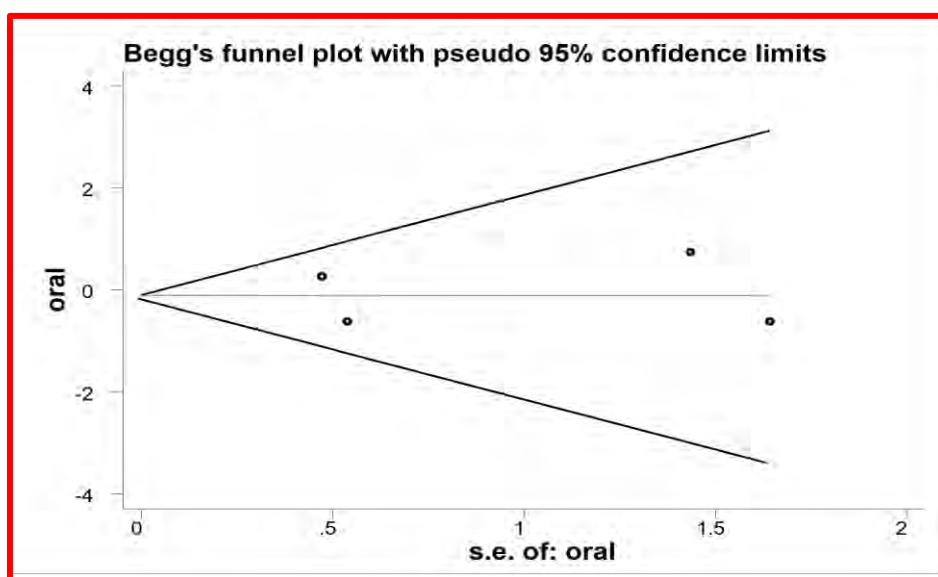
Εικόνα 83 metaif graph COPD (B vs.A) - random effects model



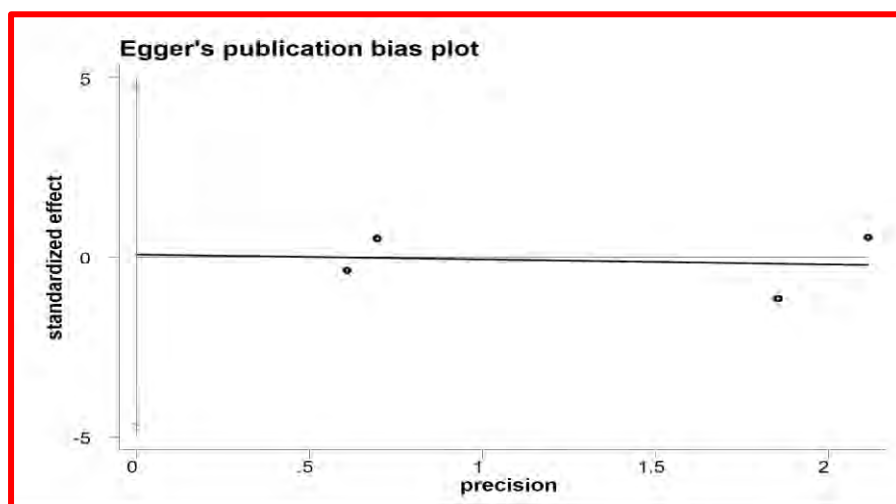
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Arif et al. (2007)	0.532	0.185	1.529	51.42
Ulrich et al. (2010)	2.087	0.125	34.873	3.14
Shaw et al. (2012)	1.293	0.512	3.264	39.78
Ulasli et al. (2013)	0.535	0.021	13.402	5.66
M-H pooled OR	0.884	0.466	1.677	100.00

Heterogeneity chi-squared = 1.99 (d.f. = 3) p = 0.575  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 0.0%  
Test of OR=1 : z= 0.38 p = 0.706

Εικόνα 84 meta-analysis table COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model



Εικόνα 85 Begg's funnel plot COPD (BB+AB vs. AA)

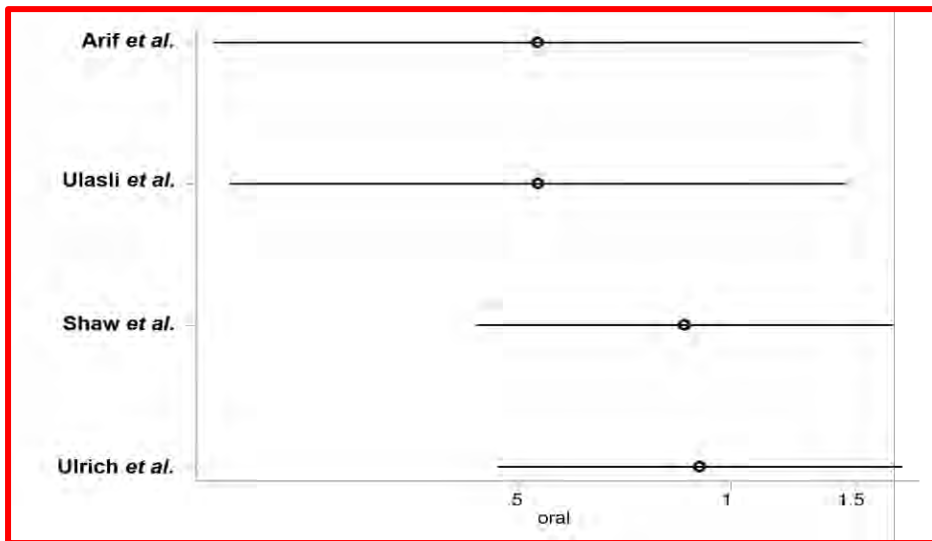


Εικόνα 86 Egger's plot COPD (BB+AB vs. AA)

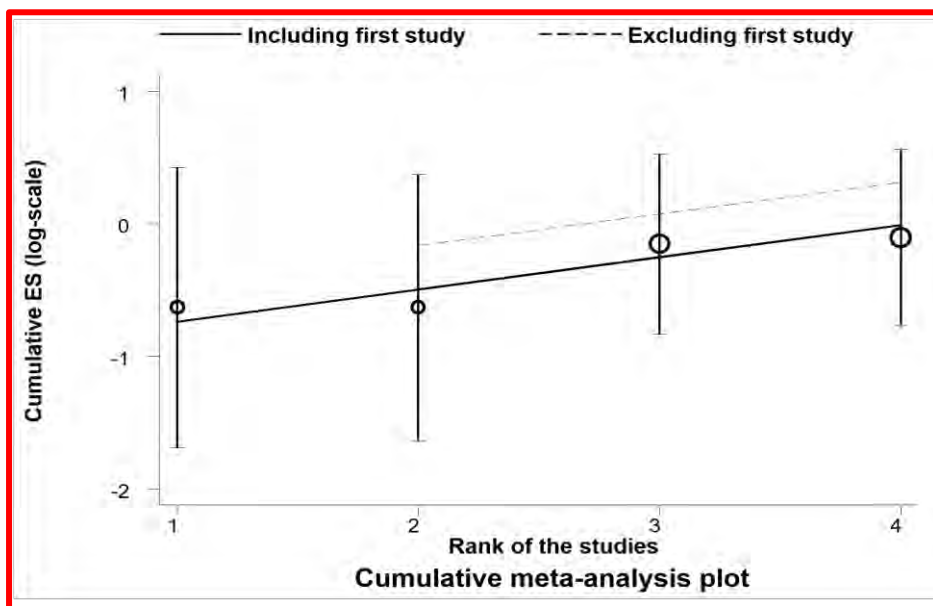
Cumulative fixed-effects meta-analysis of 4 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Arif et al.	0.532	0.185	1.529	-1.172	0.241
Ulasli et al.	0.532	0.195	1.452	-1.232	0.218
Shaw et al.	0.860	0.435	1.698	-0.435	0.663
Ulrich et al.	0.903	0.466	1.749	-0.303	0.762

Εικόνα 87 metacum table COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model



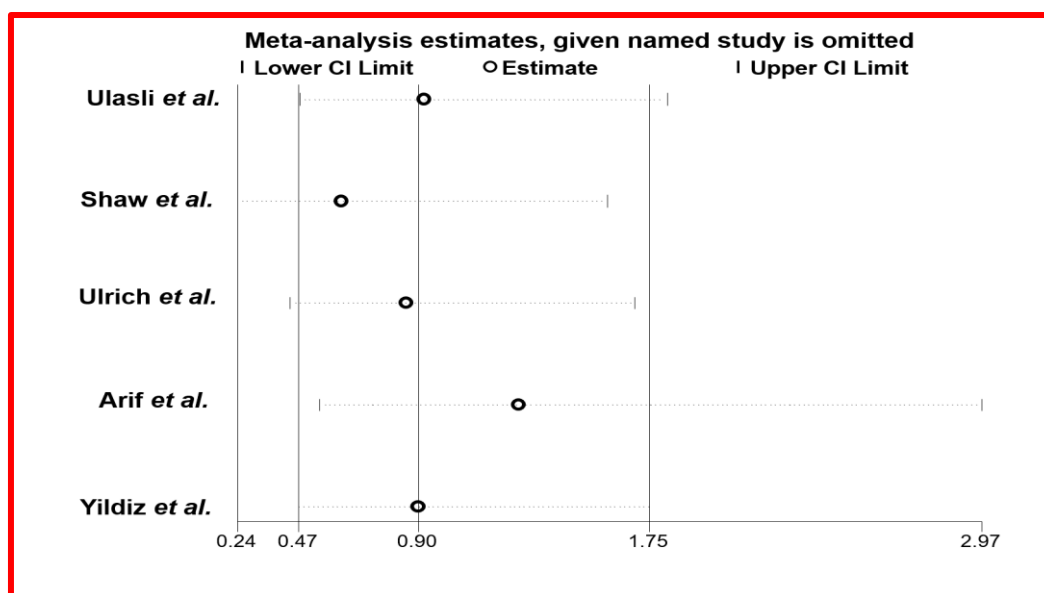
Εικόνα 88 metacum graph COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model



Εικόνα 89 metatrend graph COPD (BB+AB vs. AA)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulasli et al.	.92393684	.47002801 1.8161882
Shaw et al.	.62078995	.24120736 1.597713
Ulrich et al.	.85979688	.43537942 1.6979458
Arif et al.	1.2704698	.54387563 2.9677625
Yildiz et al.	.90290731	.46599701 1.7494568
Combined	.90290731	.46599701 1.7494567

Εικόνα 90 metaifn table COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model

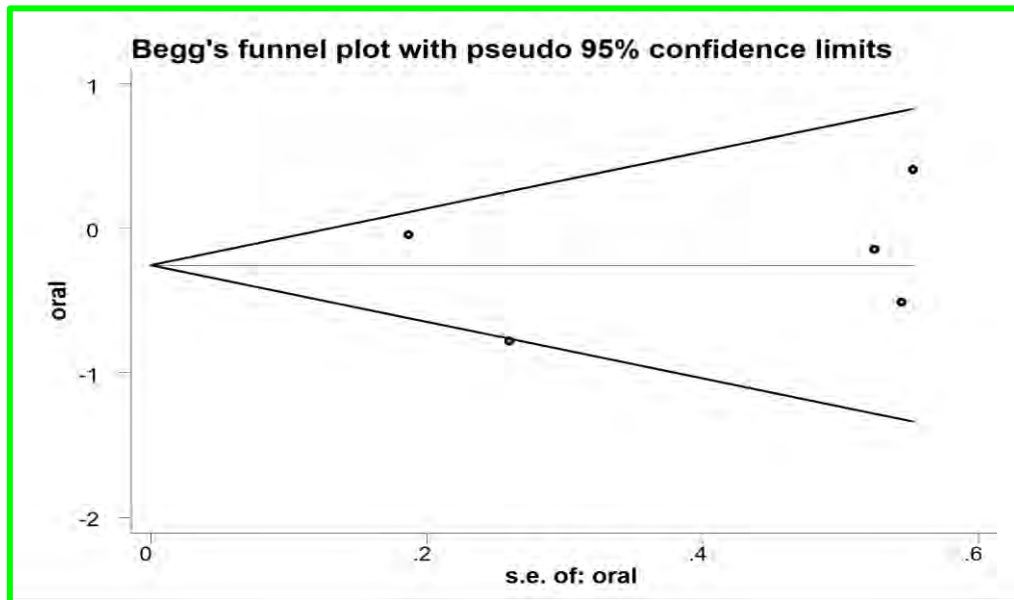


Εικόνα 91 metaifn graph COPD (BB+AB vs. AA) - fixed effects model

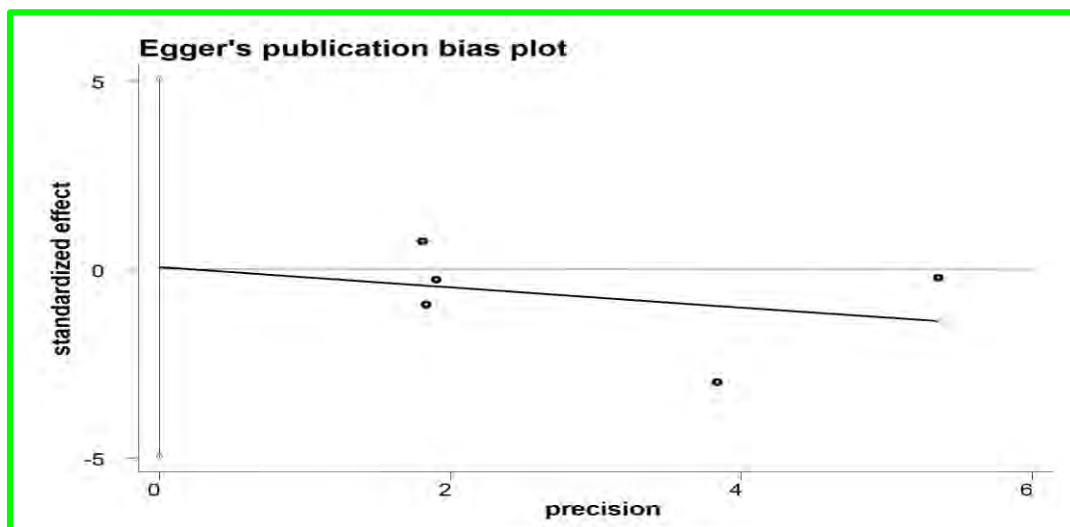
Study	OR	[95% Conf. Interval]	% Weight
Yildiz et al. (2003)	0.598	0.206 1.737	7.02
Arif et al. (2007)	0.457	0.274 0.762	36.07
Ulrich et al. (2010)	0.861	0.308 2.408	6.25
Shaw et al. (2012)	0.957	0.664 1.379	46.53
Ulasli et al. (2013)	1.500	0.508 4.432	4.13
M-H pooled OR	0.768	0.589 1.000	100.00

Heterogeneity chi-squared = 7.08 (d.f. = 4) p = 0.132  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 43.5%  
Test of OR=1 : z= 1.96 p = 0.050

Εικόνα 92 meta-analysis table COPD (BB vs.AA+AB) (fixed effects model)



Εικόνα 93 Begg's funnel plot COPD (BB vs.AA+AB)



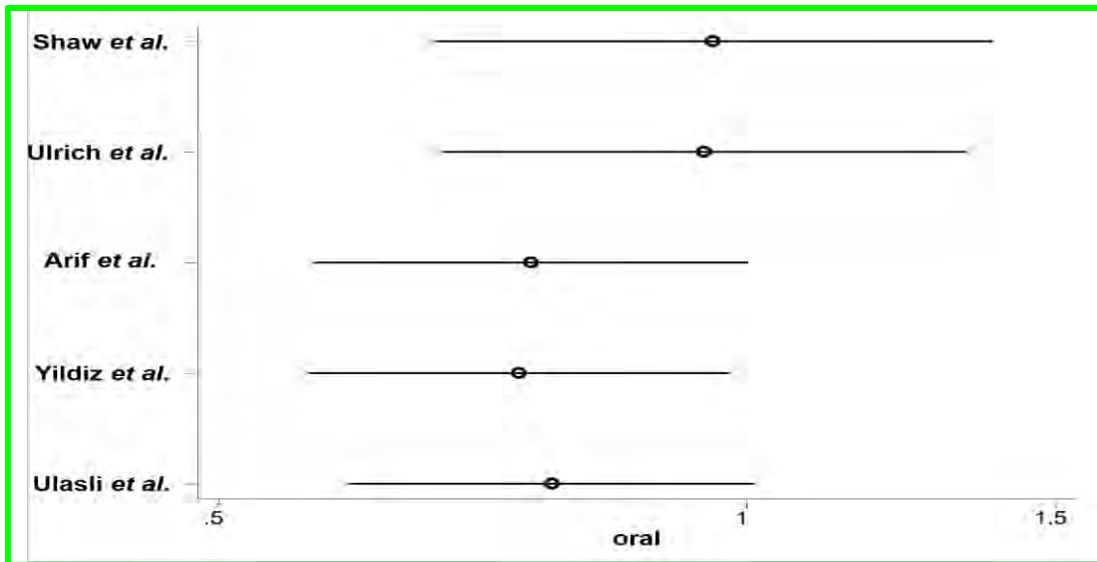
Εικόνα 94 Egger's plot COPD (BB vs.AA+AB)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 5 studies (exponential form)

---

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Shaw et al.	0.957	0.664	1.379	-0.237	0.813
Ulrich et al.	0.945	0.670	1.334	-0.319	0.750
Arif et al.	0.753	0.566	1.002	-1.945	0.052
Yildiz et al.	0.742	0.563	0.977	-2.124	0.034
Ulasli et al.	0.774	0.592	1.011	-1.877	0.061

Εικόνα 95 metacum table COPD (BB vs.AA+AB) - fixed effects model



Εικόνα 96 metacum graph COPD (BB vs.AA+AB) - fixed effects model

```

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis
-----
Number of studies: 5

'First vs. Subsequent' method
-----

```

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	0.9567	0.813	0.6637	1.3792
Subsequent studies	0.6693	0.129	0.3988	1.1233
All Studies	0.7623	0.203	0.5021	1.1573

```

-----
Test for the equality of the ESs (log-scale)
-----
Ho: ES(first) = ES(subsequent)
z-value = 1.105
P-value = 0.269

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test
-----

```

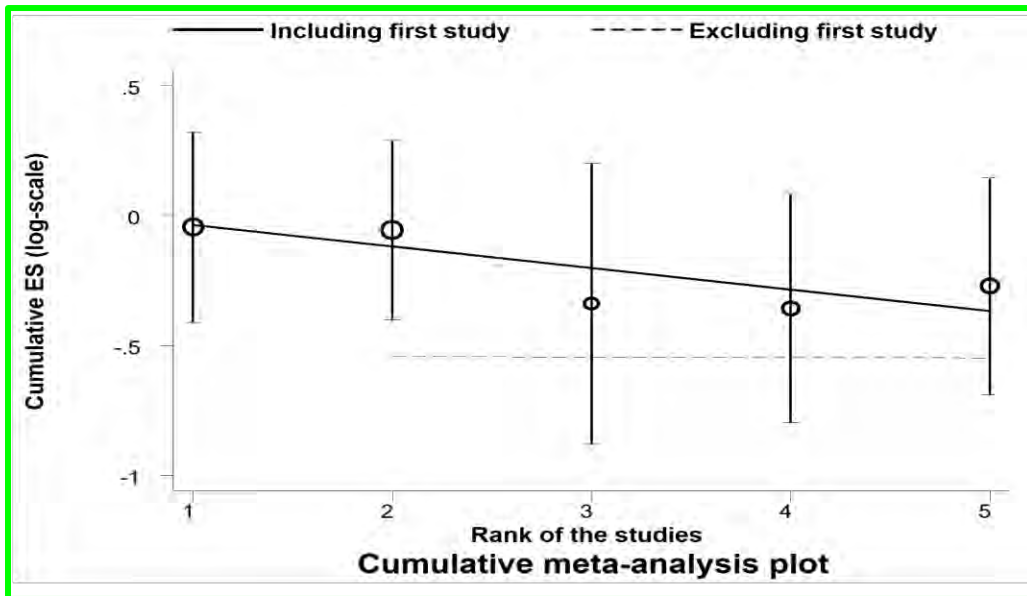
	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	-0.08292	0.02040	0.000	-0.12289	-0.04294	-0.244
Excluding first study	-0.00158	0.06771	0.981	-0.13428	0.13113	-0.350

```

-----

```

Εικόνα 97 metatrend table COPD (BB vs.AA+AB)

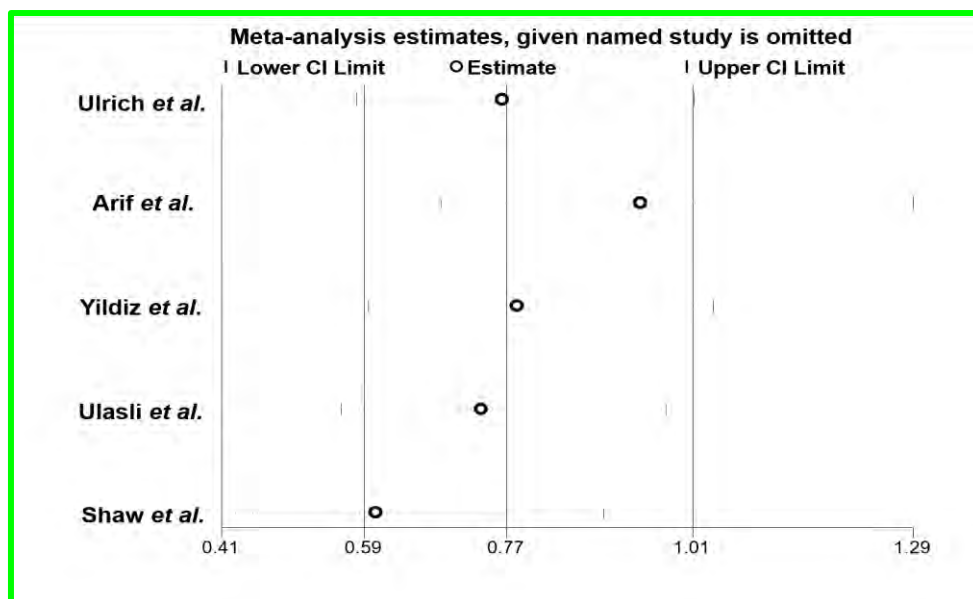


Εικόνα 98 metatrend graph COPD (BB vs.AA+AB)

```
metaninf oral stdor, fixed eform label(namevar=author)
```

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulrich et al.	.76815861	.58236611 1.0132245
Arif et al.	.9445976	.69014752 1.2928609
Yildiz et al.	.78763711	.59755695 1.0381809
Ulasli et al.	.74160409	.5627901 .97723228
Shaw et al.	.60702515	.41022518 .89823723
Combined	.77411268	.59249518 1.0114014

Εικόνα 99 metainf table COPD (BB vs.AA+AB) - fixed effects model

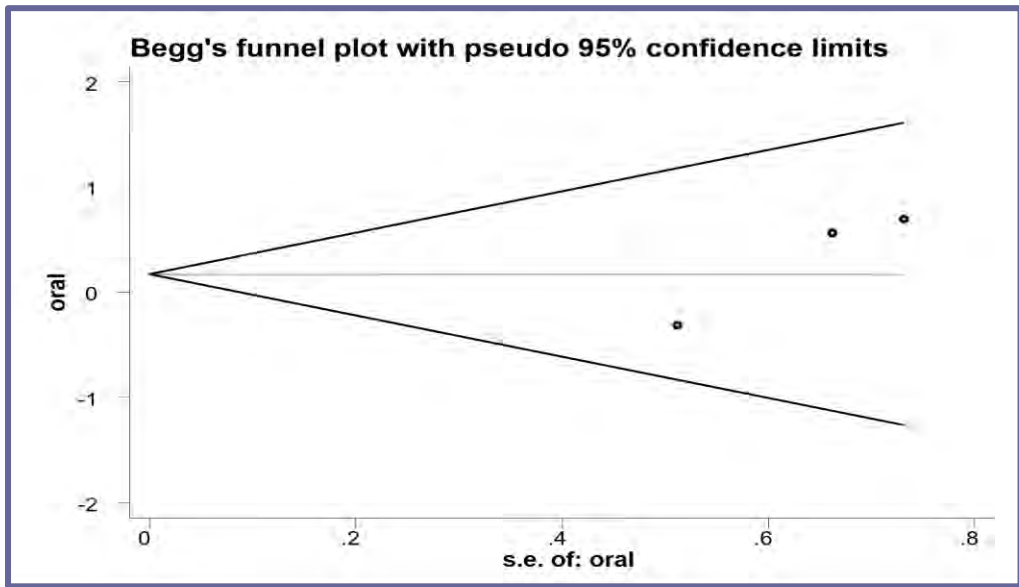


Εικόνα 100 metainf graph COPD (BB vs.AA+AB) - fixed effects model

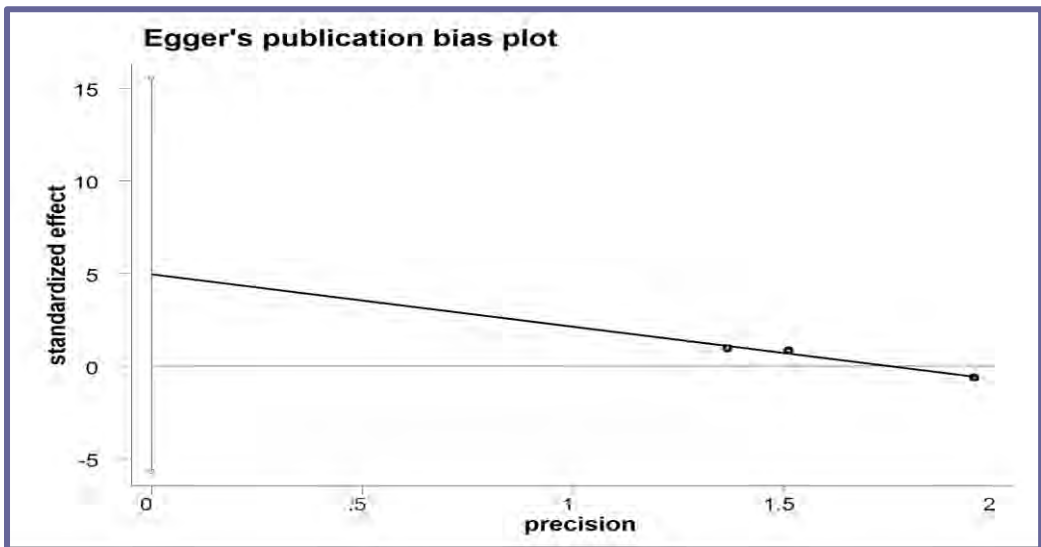
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Yildiz et al. (2003)	3.667	0.966	13.918	16.00
Ulrich et al. (2010)	0.869	0.316	2.391	58.49
Ulasli et al. (2013)	1.213	0.292	5.040	25.51
M-H pooled OR	1.404	0.707	2.788	100.00

Heterogeneity chi-squared = 2.89 (d.f. = 2) p = 0.235  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 30.9%  
Test of OR=1 : z= 0.97 p = 0.332

Εικόνα 101 meta-analysis table PH in COPD (B vs. A) – fixed effects model



Εικόνα 102 Begg's funnel plot COPD (B vs.A)

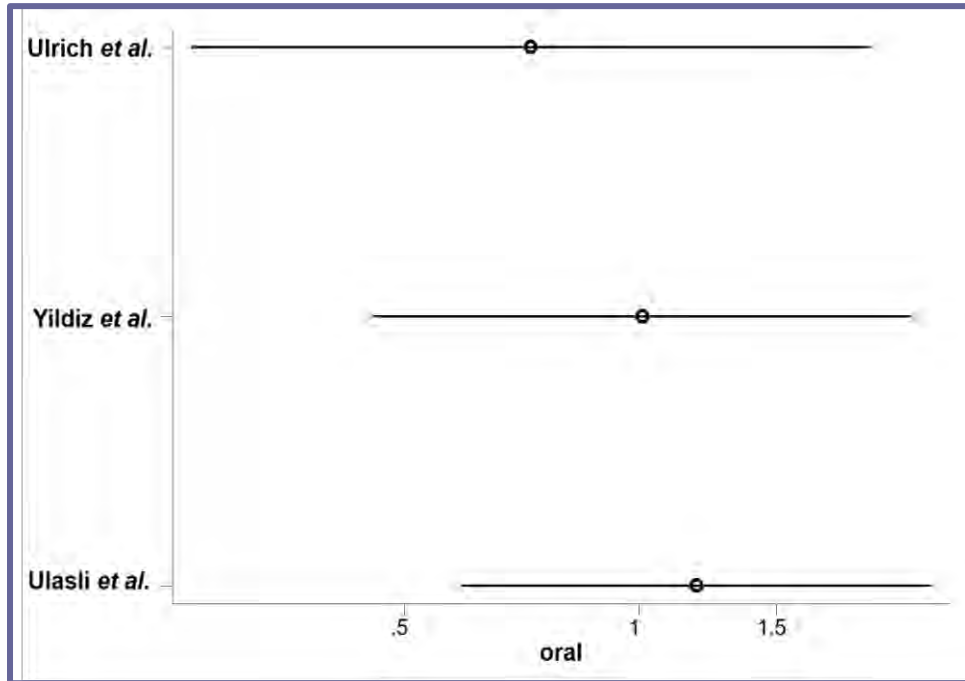


Εικόνα 103 Egger's plot COPD (B vs.A)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 3 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Ulrich et al.	0.727	0.266	1.985	-0.622	0.534
Yildiz et al.	1.010	0.457	2.235	0.026	0.980
Ulasli et al.	1.186	0.592	2.376	0.482	0.630

Εικόνα 104 metacum table PH in COPD (B vs.A) – fixed effects model



Εικόνα 105 metacum graph PH in COPD (B vs.A) – fixed effects model

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 3  
'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]	
First study	1.7500	0.398	0.4781	6.4060
Subsequent studies	1.0540	0.914	0.4054	2.7404
All Studies	1.1861	0.630	0.5921	2.3758

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

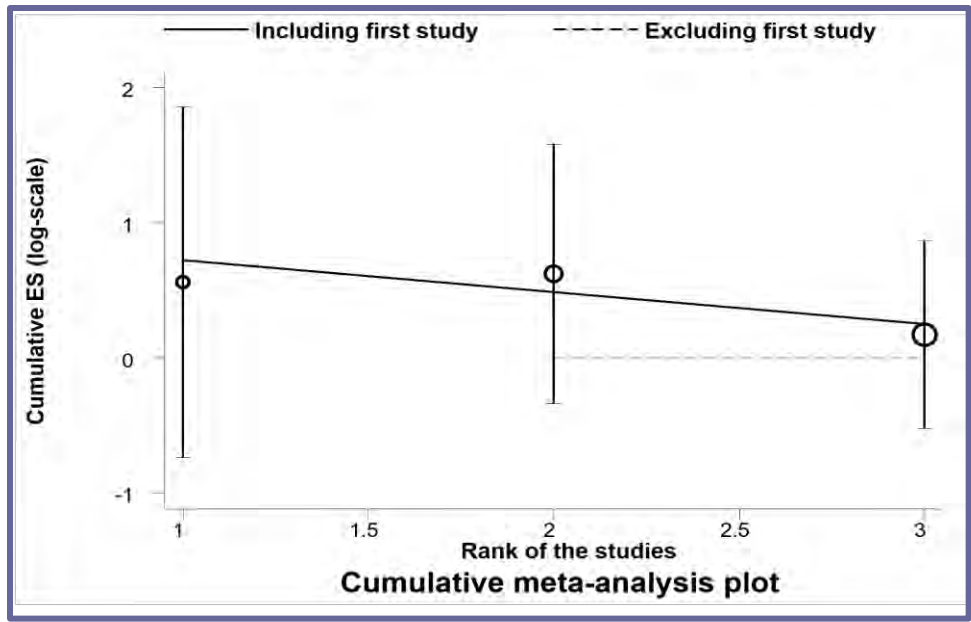
Ho: ES(first) = ES(subsequent)  
z-value = 0.617  
P-value = 0.537

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]		rho
Including all studies	-0.23665	0.04025	0.000	-0.31553	-0.15776	-0.712
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000	0.00000	-0.585

Εικόνα 106 metatrend table PH in COPD (B vs.A)

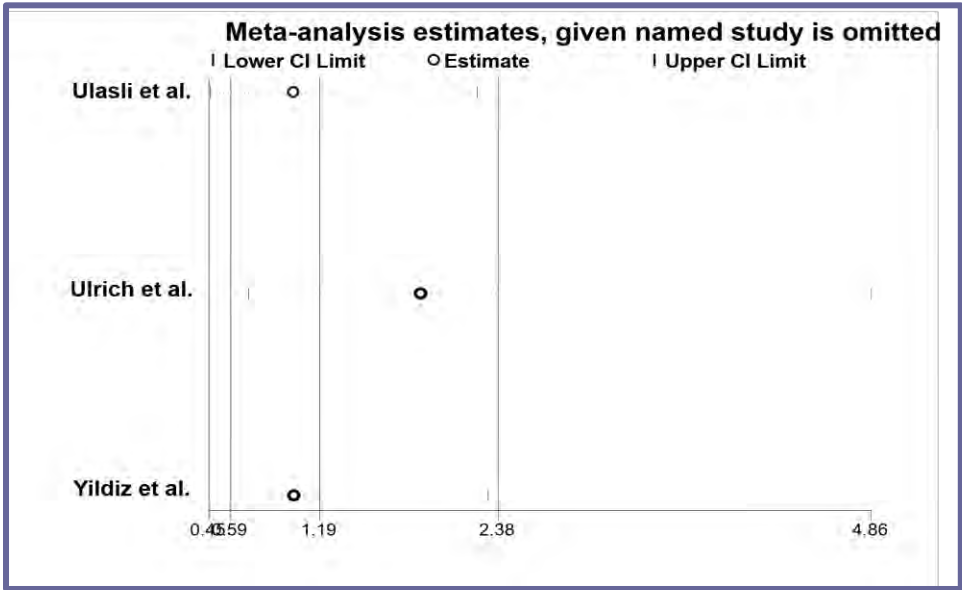




Εικόνα 107 metatrend graph PH in COPD (B vs.A)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulasli et al.	1.0104328	.45671391 2.2354796
Ulrich et al.	1.8584515	.71011651 4.8637676
Yildiz et al.	1.0145186	.44574749 2.3090382
Combined	1.1860864	.59215452 2.3757329

Εικόνα 108 metainf table PH in COPD (B vs.A) - fixed effects model

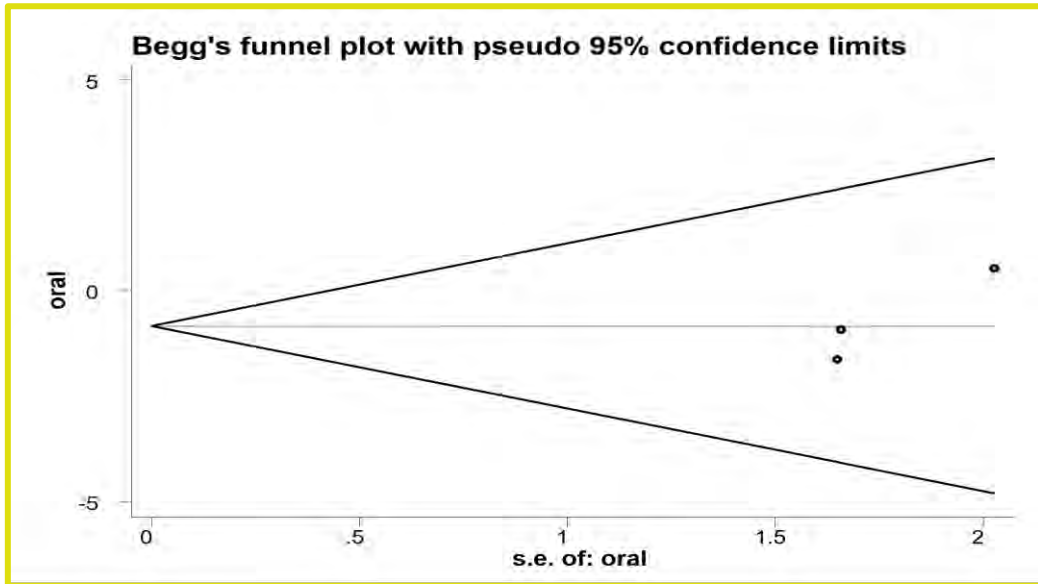


Εικόνα 109 metainf graph PH in COPD (B vs.A) - fixed effects model

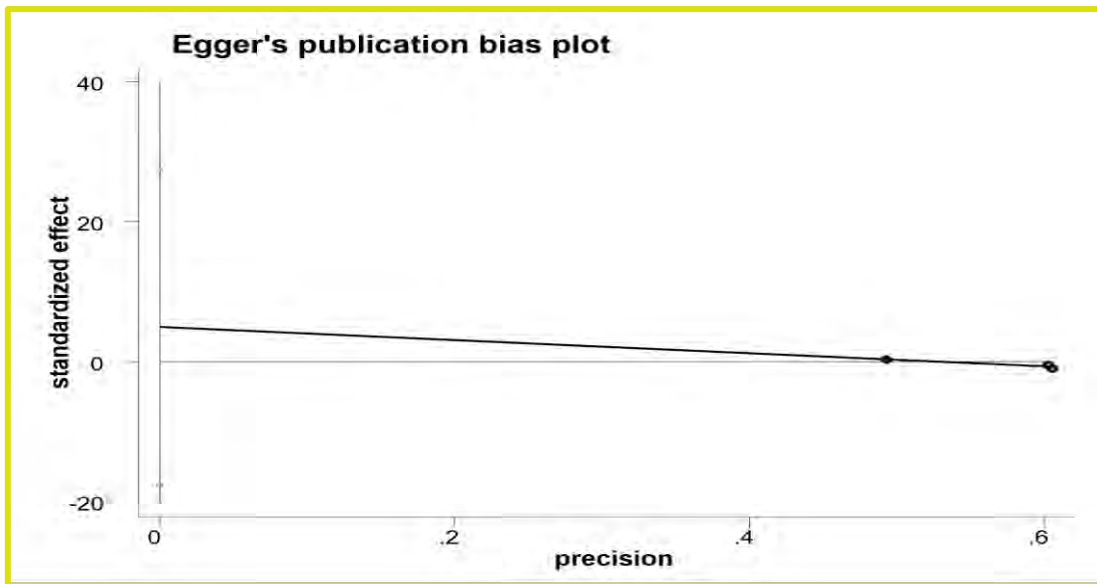
Study	ES	[95% Conf. Interval]		% Weight
Yildiz et al. (2003)	1.690	0.032	89.827	24.96
Ulrich et al. (2010)	0.393	0.015	10.121	37.32
Ulasli et al. (2013)	0.195	0.008	4.936	37.71
I-V pooled ES	0.434	0.060	3.159	100.00

Heterogeneity chi-squared = 0.69 (d.f. = 2) p = 0.708  
I-squared (variation in ES attributable to heterogeneity) = 0.0%  
Test of ES=1 : z= 0.82 p = 0.410

Εικόνα 110 meta-analysis table PH in COPD (BB+AB vs.AA) - fixed effects model



Εικόνα 111 Begg's funnel plot PH in COPD (BB+AB vs.AA)

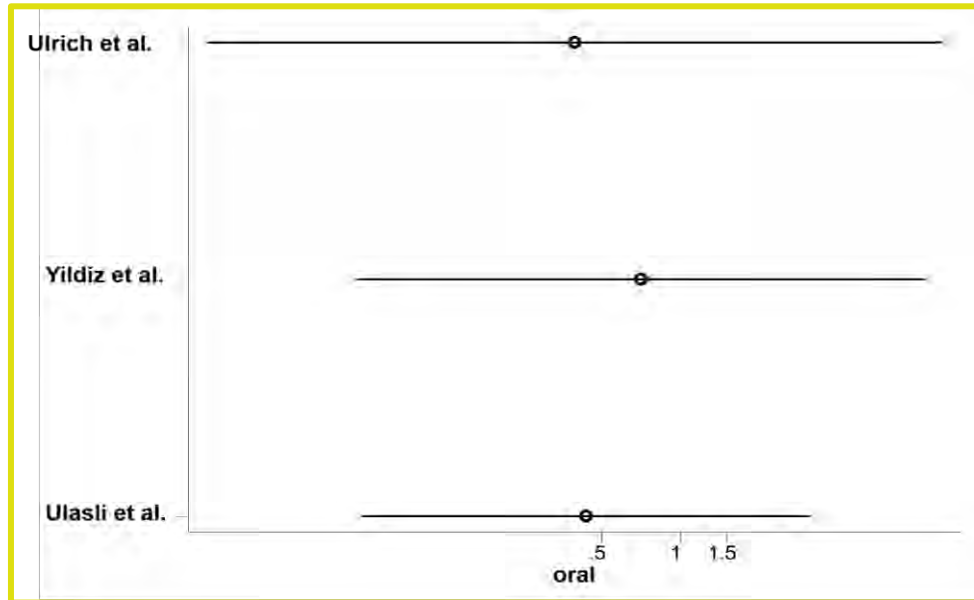


Εικόνα 112 Egger's plot PH in COPD (BB+AB vs.AA)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 3 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Ulrich et al.	0.393	0.015	10.121	-0.564	0.573
Yildiz et al.	0.705	0.057	8.718	-0.273	0.785
Ulasli et al.	0.434	0.060	3.159	-0.824	0.410

Εικόνα 113 metacum table PH in COPD (BB+AB vs.AA) - fixed effects model



Εικόνα 114 metacum graph PH in COPD (BB+AB vs.AA) - fixed effects model

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 3

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]
First study	0.3926	0.573	0.0152 10.1212
Subsequent studies	0.4604	0.544	0.0375 5.6521
All Studies	0.4338	0.410	0.0596 3.1587

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

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

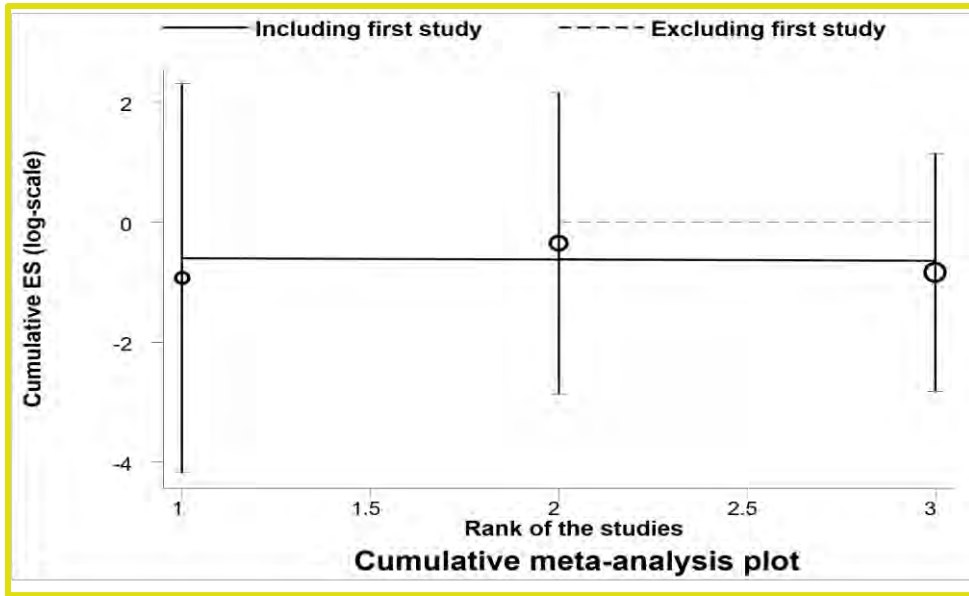
z-value = -0.076

P-value = 0.939

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]	rho
Including all studies	-0.02074	0.08222	0.801	-0.18190 0.14042	-0.734
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000 0.00000	-0.561

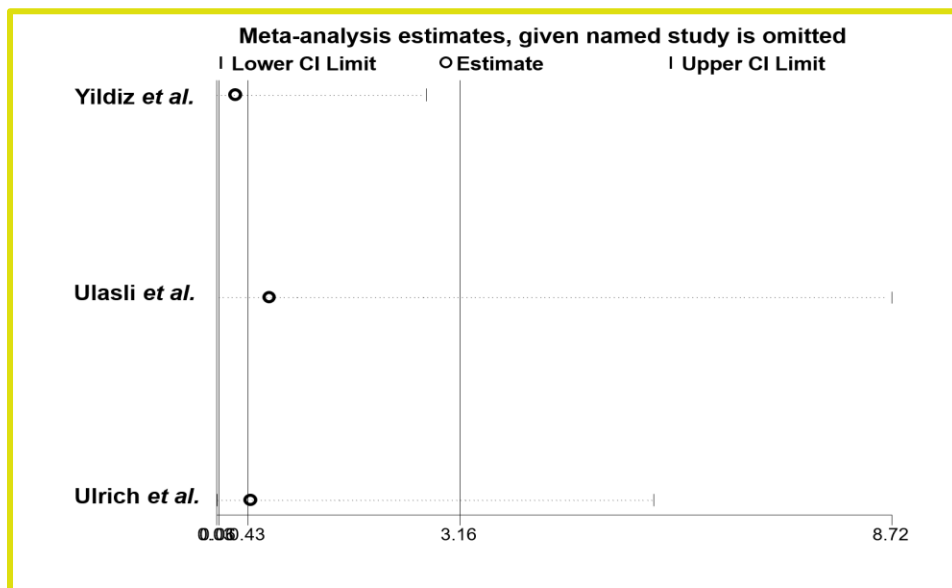
Εικόνα 115 metatrend table PH in COPD (BB+AB vs.AA)



Εικόνα 116 metatrend graph PH in COPD (BB+AB vs.AA)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Yildiz et al.	.27598333	.0278979 2.7301986
Ulasli et al.	.70466572	.05695621 8.7181673
Ulrich et al.	.46042457	.03750827 5.6518416
Combined	.43383538	.05958688 3.1586336

Εικόνα 117 metacum table PH in COPD (BB+AB vs.AA) - fixed effects model

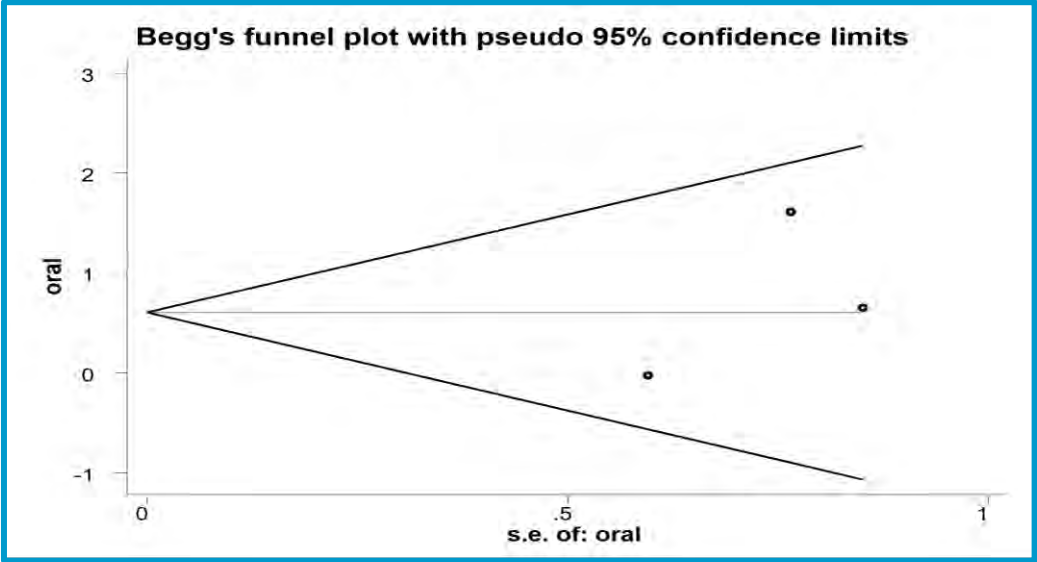


Εικόνα 118 metacum graph PH in COPD (BB+AB vs.AA) - fixed effects model

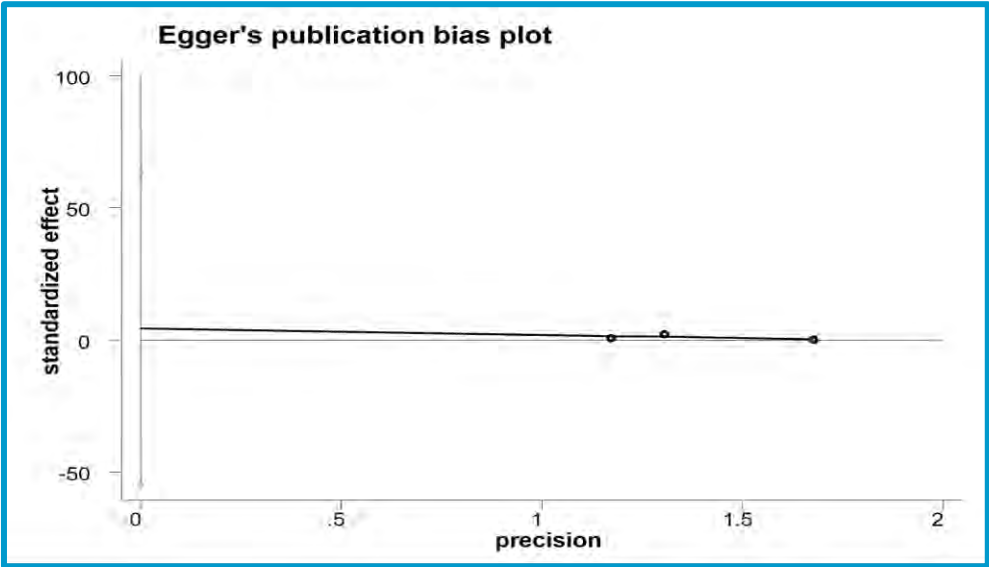
Study	OR	[95% Conf. Interval]		% Weight
Yildiz et al. (2003)	5.000	1.116	22.408	15.70
Ulrich et al. (2010)	0.971	0.302	3.124	60.87
Ulasli et al. (2013)	1.909	0.360	10.131	23.43
M-H pooled OR	1.824	0.832	3.996	100.00

Heterogeneity chi-squared = 2.86 (d.f. = 2) p = 0.240  
I-squared (variation in OR attributable to heterogeneity) = 30.0%  
Test of OR=1 : z= 1.50 p = 0.133

Εικόνα 119 meta-analysis table PH in COPD (BB vs.AB+AA) - fixed effects model



Εικόνα 120 Begg's funnel plot PH in COPD (BB vs.AB+AA)

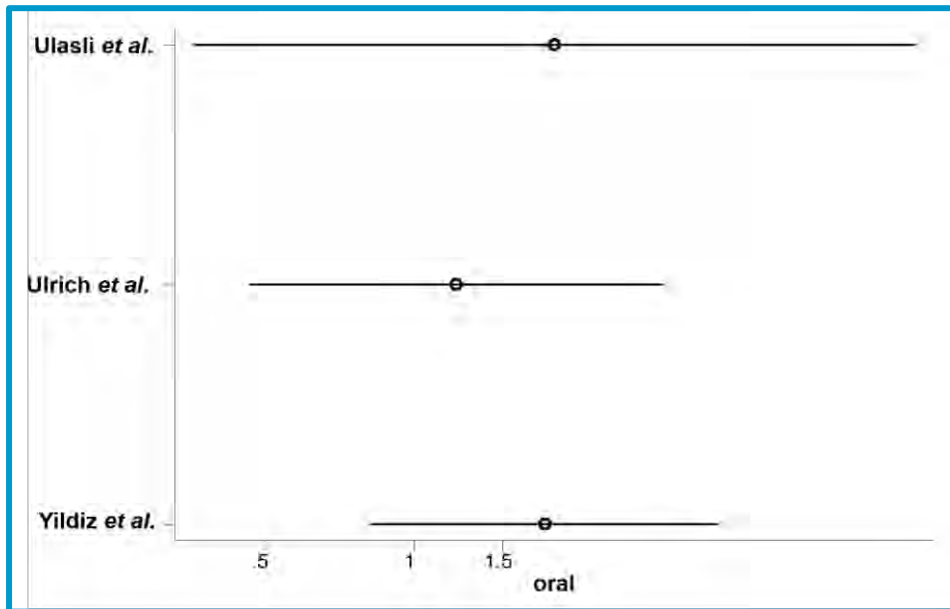


Εικόνα 121 Egger's plot PH in COPD (BB vs.AB+AA)

Cumulative fixed-effects meta-analysis of 3 studies (exponential form)

Trial	Cumulative estimate	95% CI		z	P value
		Lower	Upper		
Ulasli et al.	1.909	0.360	10.131	0.759	0.448
Ulrich et al.	1.213	0.466	3.159	0.396	0.692
Yildiz et al.	1.827	0.816	4.095	1.465	0.143

Εικόνα 122 metacum table PH in COPD (BB vs.AB+AA) - fixed effects model



Εικόνα 123 metacum table PH in COPD (BB vs.AB+AA) - fixed effects model

Tests for detecting trends in cumulative meta-analysis

Number of studies: 3

'First vs. Subsequent' method

	Effect Size (ES)	P-value	[95% Conf. Interval]
First study	1.9091	0.448	0.3597 10.1313
Subsequent studies	2.0542	0.378	0.4149 10.1718
All Studies	1.9212	0.192	0.7200 5.1265

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

Ho: ES(first) = ES(subsequent)

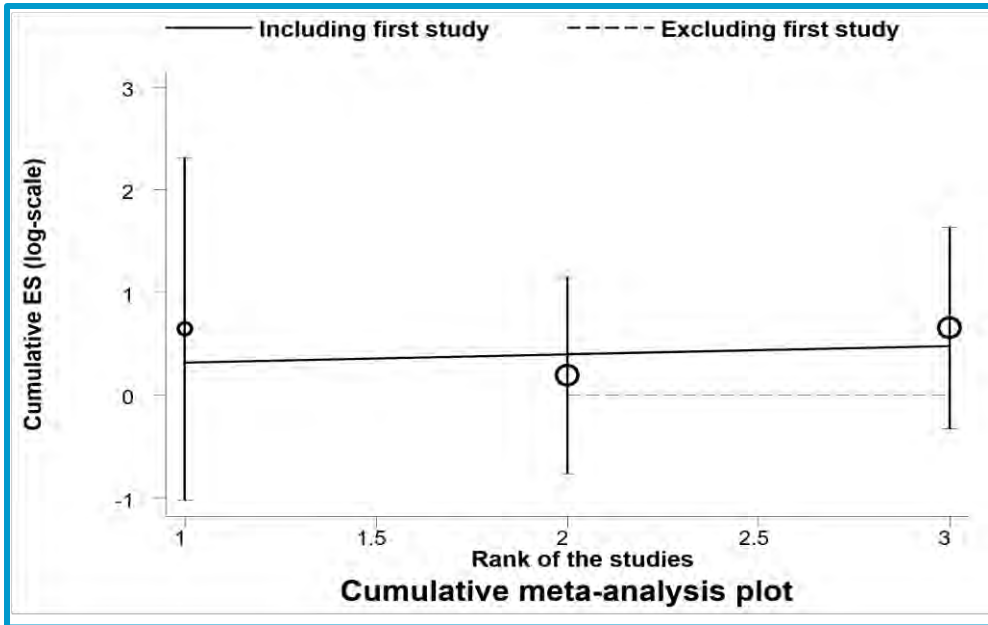
z-value = -0.062

P-value = 0.950

Generalized Least Squares (GLS) Regression-based test

	Coef.	Std. Err.	P-value	[95% Conf. Interval]	rho
Including all studies	0.07807	0.07070	0.269	-0.06050 0.21664	-0.787
Excluding first study	0.00000	0.00000	.	0.00000 0.00000	-0.769

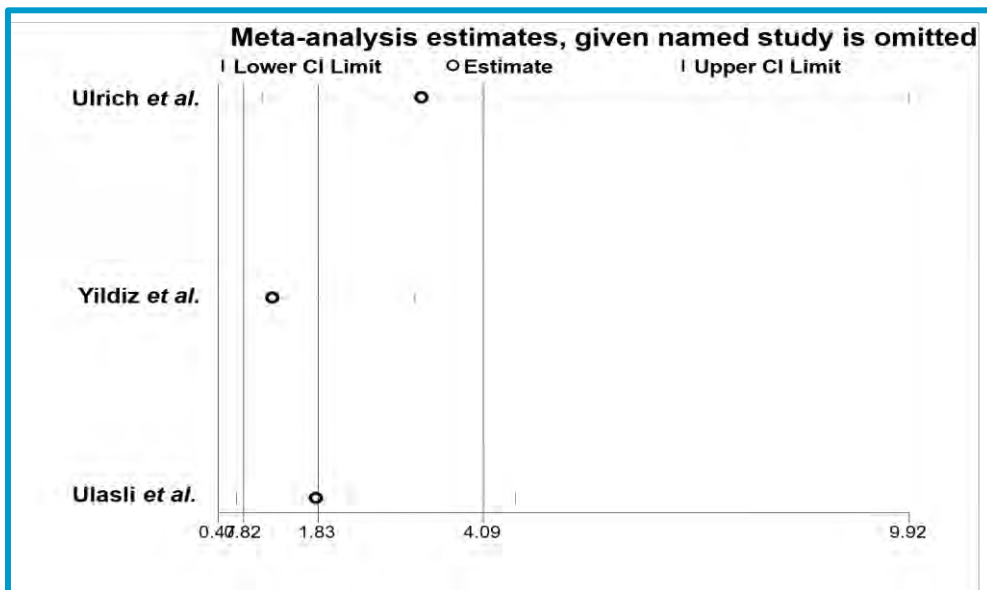
Εικόνα 124 metatrend table PH in COPD (BB vs.AB+AA)



Εικόνα 125 metatrend graph PH in COPD (BB vs.AB+AA)

Study omitted	Estimate	[95% Conf. Interval]
Ulrich et al.	3.2518549	1.0656606 9.9230108
Yildiz et al.	1.2130928	.46585795 3.15889
Ulasli et al.	1.8032364	.71742976 4.5323758
Combined	1.827436	.81554393 4.0948406

Εικόνα 126 metainf table PH in COPD (BB vs.AB+AA) – fixed effects model



Εικόνα 127 metainf graph PH in COPD (BB vs.AB+AA) – fixed effects model

