



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

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ**  
**ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ-**  
**ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΜΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ**  
**ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**Βασιλείου Χριστίνα**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**Υπεύθυνοι**  
**Μπράλιου Γεωργία**  
**Διδάσκουσα ΠΔ407/80**  
**Μπάγκος Παντελής**  
**Αναπληρωτής Καθηγητής**

**Λαμία, 2017**





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

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ**  
**ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ-**  
**ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΜΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ**  
**ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**Βασιλείου Χριστίνα**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**Υπεύθυνοι**  
**Μπράλιου Γεωργία**  
**Διδάσκουσα ΠΔ407/80**  
**Μπάγκος Παντελής**  
**Αναπληρωτής Καθηγητής**

**Λαμία, 2017**

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.....

Ο – Η Δηλ.

(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.

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ  
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΡΕΝΙΝΗΣ-  
ΑΓΓΕΙΟΤΕΝΣΙΝΗΣ ΜΕ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ  
ΥΠΕΡΤΑΣΗ**

**Βασιλείου Χριστίνα**

**Τριμελής Επιτροπή:**

Μπράλιου Γεωργία, Διδάσκουσα ΠΔ407/80 (επιβλέπουσα)

Μπάγκος Παντελής, Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)

Πλαγιανάκος Βασίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια των προπτυχιακών σπουδών κατά την διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2015-2016.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα μαζί τους για την πραγματοποίηση της.

Πρώτη από όλους θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της πτυχιακής εργασίας, διδάσκουσα Γεωργία Μπράλιου για την πολύτιμη καθοδήγηση της και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε. Χωρίς τις συμβουλές, την βοήθεια, τα σχόλια και τις προτάσεις της, αυτή η εργασία δεν θα ήταν εφικτή. Ήταν χαρά μου να συνεργαστώ μαζί σας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Παντελή Μπάγκο, για την αμέριστη βοήθεια και τον πλούτο των γνώσεων που μου παρείχε που συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Σας ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές σας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην διδάκτορα Παναγιώτα Κοντού για την απλόχερη βοήθεια της σε κάθε δυσκολία που παρουσιάστηκε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου, για την βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια. Σας ευχαριστώ για την ψυχολογική υποστήριξη που με υπομονή και κουράγιο μου προσφέρατε.

Σας ευχαριστώ όλους!





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια χαρακτηρίζονται από αυξημένη πίεση στο πνευμονικό αγγειακό σύστημα και προοδευτική έλλειψη λειτουργικότητας των πνευμόνων αντίστοιχα. Πρόκειται για δύο ανίατες νόσους που δυσχεραίνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών και παρουσιάζουν μεγάλη θνησιμότητα. Ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE έχει συχνά συνδεθεί με τις παραπάνω ασθένειες. Η δράση του ενζύμου μετατροπής της αγγιοτενσίνης I (ACE) στο σύστημα ρενίνης- αγγιοτενσίνης και κατ' επέκταση στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, το καθιστούν ιδανικό στόχο για την ανάπτυξη δεικτών πρόγνωσης και θεραπείας των ασθενειών αυτών.

**Υλικά και Μέθοδοι:** Στην παρούσα πτυχιική εργασία προσδιορίστηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Οι γονότυποι για το γονίδιο ACE προσδιορίστηκαν σε 88 ασθενείς με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και 88 υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου από το νοσοκομείο «Αττικόν». Η εξακρίβωση των γονοτύπων έγινε με την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση G<sub>WAR</sub> και μετα-ανάλυση, χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και επιπρόσθετων μελετών με σκοπό τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D του ACE με τις παραπάνω ασθένειες. Η ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο STATA τόσο με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων, ενώ για τις συγκρίσεις των αλληλόμορφων και των γονοτύπων ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς χρησιμοποιήθηκε το μέγεθος επίδρασης OR (Odds Ratio). Για την στατιστική ανάλυση G<sub>WAR</sub> χρησιμοποιήθηκαν τα τεστ CATT και MAX.

**Αποτελέσματα:** Η μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονοτύπων ID+DD έναντι του γονοτύπου II έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση με OR ίσο με 3.19 και διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI: 1.26 8.03) στο δείγμα ασθενών-υγιών από το νοσοκομείο «Αττικόν». Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση με τη χρήση του τεστ MAX και  $p=0.0026$ . Δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ούτε και με την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

**Λέξεις κλειδιά:** PH (Pulmonary Hypertension), COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), ACE I/D polymorphism, PCR, meta-analysis, G<sub>WAR</sub>

## ABSTRACT

**Introduction:** Pulmonary arterial hypertension and chronic obstructive pulmonary disease are being characterized by increased blood pressure in the pulmonary vasculature and progressive lack of functionality of the lung. These are two incurable diseases that impede the quality of life of patients and show high mortality. The I/D polymorphism of the ACE gene is often connected with the above diseases. The action of the angiotensin converting enzyme (ACE) in the renin-angiotensin system and the regulation of blood pressure, are making it an ideal target for the development of prognostic markers and treatment of these diseases.

**Materials and Methods:** The possible association of I/D polymorphism of ACE gene with pulmonary arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension due to chronic obstructive pulmonary disease was investigated in the current study. Genotypes for the ACE gene were determined in 88 patients with pulmonary arterial hypertension and 88 healthy subjects from the “Attikon” hospital. The genotyping was determined by polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis. A GWAR analysis and a meta-analysis, using the results of the current study and additional studies was performed in order to identify any global statistical significant correlation between the ACE gene I/D polymorphism and the above diseases. Analysis was performed by using both the random effects model and the fixed effects model. The analysis was performed with STATA, using OR (Odds Ratio) as the effect size. The tests CATT and MAX have been used for the GWAR analysis.

**Results:** The association between the ACE I/D gene and pulmonary arterial hypertension was statistical significant in the meta-analysis for genotypes ID+DD versus II genotype with the OR equal to 3.19 and 95% confidence interval (95% CI: 1.26 8.03) in the population from “Attikon” hospital. A significant association of the ACE I/D gene with pulmonary arterial hypertension was revealed in the statistical analysis using the MAX test ( $p=0.0026$ ). Furthermore, there was no association of the I/D polymorphism of the ACE gene with chronic obstructive pulmonary disease neither with pulmonary hypertension in COPD patients.

**Key words:** PH (Pulmonary Hypertension), COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), ACE I/D polymorphism, PCR, meta-analysis, GWAR

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PULMONARY HYPERTENSION).....</b>	<b>9</b>
1.1.1. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	9
1.1.2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ.....	9
1.1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	10
1.1.4. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION).....	10
1.1.5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	11
<b>1.2. ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE).....</b>	<b>12</b>
1.2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ.....	12
1.2.2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	12
1.2.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	13
<b>1.3. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PH) ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD).....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ACE (ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME).....</b>	<b>15</b>
1.4.1. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ I/D (Insertion/Deletion) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ACE.....	15
<b>1.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION).....</b>	<b>18</b>
1.5.1. ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR.....	18
1.5.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR.....	18
1.5.3. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (AGAROSE GEL).....	19
<b>1.6. ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>20</b>
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ.....</b>	<b>23</b>
2.1.1. ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ (ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΕΙΣ).....	23
2.1.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA.....	23
2.1.3. ΕΥΡΕΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ.....	23
2.1.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	25
<b>2.2. ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	26
2.2.2. ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	26

2.2.3.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA.....	26
2.2.4.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	26
2.2.5.ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	30
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....</b>	<b>50</b>
3.2.1.ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ.....	50
3.2.2.ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (ΡΗ).....	51
3.2.3.ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD).....	57
3.2.4.ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (ΡΗ) ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD).....	68
<b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>71</b>
<b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>75</b>
<b>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>81</b>

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## 1.1 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PULMONARY HYPERTENSION)

### 1.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η πνευμονική υπέρταση (ΠΥ) είναι μία προοδευτική ανίατη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από αυξημένη πίεση στο αγγειακό σύστημα των πνευμόνων. Η δεξιά πλευρά της καρδιάς, η οποία είναι υπεύθυνη να προωθεί το αίμα στους πνεύμονες συναντά μεγαλύτερη αντίσταση ειδικότερα όταν ο ασθενής ασκείται. Σύμφωνα με την Nice classification 2013, η ΠΥ χωρίζεται σε έξι διαφορετικούς τύπους [1].

### 1.1.2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ [1]

- I. Πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH)
  - a. **Ιδιοπαθής πνευμονική αρτηριακή υπέρταση**
  - b. **Κληρονομική**
    - o **BMPR2**
    - o ALK1, endoglin (με ή χωρίς κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία)
    - o Άγνωστο
  - c. Προκαλούμενη από τοξίνες και φάρμακα
  - d. Σχετιζόμενη με:
    - o Ασθένειες του συνδετικού ιστού
    - o Μόλυνση από HIV
    - o Πυλαία υπέρταση (Portal hypertension)
    - o Συγγενείς καρδιοπάθειες
    - o Σχιστοσωμίαση
    - o Χρόνια αιμολυτική αναιμία
    - o Επίμονη πνευμονική υπέρταση νεογνών
- II. Πνευμονική φλεβοαποφρακτική νόσος (Pulmonary veno-occlusive disease) και/ ή Αιμαγγειώματωση πνευμονικών τριχοειδών αγγείων (Pulmonary capillary hemangiomatosis)
- III. Πνευμονική υπέρταση (Pulmonary Hypertension) που οφείλεται σε νόσο της αριστερής κοιλίας της καρδιάς
  - a. Συστολική δυσλειτουργία
  - b. Διαστολική δυσλειτουργία
  - c. Βαλβιδική νόσος
- IV. Πνευμονική υπέρταση (PH) που οφείλεται σε πνευμονικές νόσους και/ ή υποξία
  - a. **Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD)**
  - b. Διάμεση πνευμονοπάθεια
  - c. Άλλες πνευμονοπάθειες με μικτά περιοριστικά και αποφρακτικά μοτίβα
  - d. Διαταραχές της αναπνοής κατά την διάρκεια του ύπνου
  - e. Διαταραχές κυψελιδικού υποαερισμού
  - f. Χρόνια έκθεση σε μεγάλο υψόμετρο
  - g. Αναπτυξιακές ανωμαλίες

- V. Χρόνια θρομβοεμβολική αρτηριακή υπέρταση (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension)
- VI. Πνευμονική υπέρταση με ασαφείς πολλαπλούς μηχανισμούς
  - a. Αιματολογικές διαταραχές: μυελουπερπλαστικές διαταραχές, σπληνεκτομή
  - b. Συστηματικές διαταραχές: σαρκοείδωση, ιστιοκύτωση πνευμονικών κυττάρων Langerhans
  - c. Λεμφαγγειολειομυομάτωση, νευροϊνωμάτωση, αγγειίτιδα
  - d. Μεταβολικές διαταραχές: νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου, η νόσος Gaucher, διαταραχές του θυρεοειδούς
  - e. Άλλα: απόφραξη όγκων, ίνωδης μεσοθωρακίτιδα, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που απαιτεί αιμοκάθαρση

Στην παρούσα πτυχιακή θα ασχοληθούμε με τις κατηγορίες I(a,b) και IV(a), δηλαδή με την κληρονομική και ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση καθώς και με την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε πνευμονικές νόσους όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ).

### 1.1.3 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Τα αρχικά συμπτώματα της πνευμονικής υπέρτασης είναι δύσκολο να εξακριβωθούν. Οι ασθενείς συχνά αναφέρουν δυσκολία στην αναπνοή, κόπωση, πόνο στο στήθος, αδυναμία και δύσπνοια κατά την άσκηση, ταχυκαρδίες, ανορεξία, ζάλη κ.α. Αποδίδουν συνήθως τα συμπτώματα στον τρόπο ζωής, την γήρανση, την κακή φυσική κατάσταση και άλλες συνυπάρχουσες ασθένειες. Οι ασθενείς ζητούν ιατρική φροντίδα όταν πια τα συμπτώματα εξελιχθούν τόσο ώστε να έχουν περιοριστεί ακόμα και οι βασικές τους δραστηριότητες [2].

### 1.1.4 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION)

Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) είναι υποκατηγορία της ΠΥ και χαρακτηρίζεται από την αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες και φλέβες. Η διαφορά με την ΠΥ είναι ότι στην ΠΑΥ δημιουργούνται σοβαρές αλλαγές στα τοιχώματα των αρτηριών με αποτέλεσμα την αύξηση της αντίστασης στη ροή του αίματος και την απόφραξη του αγγειακού αυλού του πνεύμονα.

#### **Κληρονομική και ιδιοπαθής πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH /IPAH)**

Έχει βρεθεί ότι ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ΠΑΥ (70% περίπου των περιπτώσεων) φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BMPR2 (morphogenetic protein receptor type 2), το οποίο ανήκει στην οικογένεια των transforming growth factor receptor (TGFR superfamily), [3], [4]. Επιπλέον, ασθενείς που εμφανίζουν μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού παρουσιάζουν πιο σοβαρά συμπτώματα της ασθένειας σε σχέση με ασθενείς που δεν φέρουν μεταλλάξεις. Ασθενείς φορείς των μεταλλάξεων εμφανίζουν την ασθένεια νεότεροι και με μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με ασθενείς που δεν είναι φορείς αυτών των μεταλλάξεων [5]. Στην περίπτωση



της ιδιοπαθούς πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (ΠΠΑΥ) η νόσος δεν έχει γνωστά παθολογικά αίτια. Σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχουν ούτε κληρονομικά στοιχεία ούτε ο ασθενής είναι εκτεθειμένος σε παράγοντες κινδύνου. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι μόνο στο 20.5% των περιπτώσεων της ιδιοπαθούς ΠΠΑΥ παρουσιάζονται μεταλλάξεις του BMPR2 γονιδίου [5]. Η ΠΠΑΥ είναι υπεύθυνη για περίπου 125-150 θανάτους το χρόνο στις ΗΠΑ και έχει συχνότητα εμφάνισης 2-6 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ετησίως [6].

#### 1.1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα συμπτώματα της ΠΠΑΥ είναι παρόμοια με αυτά της ΠΥ. Τα συμπτώματα της νόσου δεν είναι συγκεκριμένα και συνήθως περιλαμβάνουν δύσπνοια, αδυναμία και λιποθυμικά επεισόδια. Περαιτέρω εξετάσεις δείχνουν ακόμη δυσλειτουργίες στην δεξιά καρδιά, φύσημα στην τριγλώχινια βαλβίδα, οίδημα κ.α. Η διάγνωση της ΠΠΑΥ είναι αντίστοιχη με την διάγνωση της ΠΥ που φαίνεται παρακάτω.

Υπάρχουν διάφορες εξετάσεις για την επιβεβαίωση παρουσίας ΠΥ. Τα συμπτώματα της νόσου μπορεί να παραπέμπουν σε διαφορετικές ασθένειες, έτσι είναι σημαντικό να εξακριβωθεί η αιτία των συμπτωμάτων.

Εξετάσεις για τη διάγνωση της νόσου:

- Φυσική εξέταση (έλεγχος αρτηριακής πίεσης, περιφερικής αγγειοδιαστολής και καρδιακής λειτουργίας)
- Εργαστηριακές εξετάσεις (ανίχνευση αυξημένων αιμοπεταλίων)
- Ακτινογραφία θώρακος (ανίχνευση διεύρυνσης της πνευμονικής αρτηρίας)
- Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ανίχνευση δεξιάς κοιλιακής υπερτροφίας)
- Ηχοκαρδιογράφημα (διεύρυνση της δεξιάς κοιλίας)
- Εξέταση της πνευμονικής λειτουργίας
- Σπινθηρογράφημα πνεύμονα (έλεγχος αιμάτωσης)
- Αξονική τομογραφία (οπτικοποίηση θρομβώσεων)
- Μαγνητική τομογραφία καρδιάς
- Έλεγχος κατά την διάρκεια άσκησης (6-minute walk test)

Η ΠΠΑΥ δεν έχει θεραπεία παρά όλα αυτά η σωστή αντιμετώπιση μπορεί να καθυστερήσει την πορεία της νόσου και να συμβάλει στην βελτίωση των συμπτωμάτων. Η ιατρική φροντίδα μπορεί να περιλαμβάνει φαρμακευτική αγωγή και θεραπείες που διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο της νόσου. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή για την διευκόλυνση της κυκλοφορίας του αίματος, σε πιο δύσκολες περιπτώσεις όπου για παράδειγμα παρουσιάζονται θρομβώσεις μπορεί να συσταθεί ακόμα και χειρουργική επέμβαση. Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να απαιτείται αλλαγή των καθημερινών συνηθειών του ασθενή ή συγκεκριμένο είδος άσκησης. Γενικά, απαιτείται αξιολόγηση της νόσου και διαχείριση των συμπτωμάτων με ανάλογο τρόπο [7].

## 1.2 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE)

### 1.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) πρόκειται για μια ασθένεια που αν και είναι αποτρέψιμη εμφανίζει σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Αποτελεί πλέον την πέμπτη αιτία πρόωρης θνησιμότητας[8]. Η νόσος χαρακτηρίζεται από αναπνευστικά συμπτώματα και έλλειψη πνευμονικής λειτουργικότητας τα οποία χειροτερεύουν με τη πάροδο του χρόνου. Οι εξάρσεις της νόσου εγκυμονούν τον μεγαλύτερο κίνδυνο πρόωρης θνησιμότητας. Αν και η ιατρική φροντίδα μπορεί να καθυστερήσει την πορεία της νόσου δεν υπάρχει οριστική θεραπεία και ο περιορισμός της ροής του αέρα στους πνεύμονες είναι μη αναστρέψιμος. Τα συμπτώματα της ΧΑΠ εμφανίζονται σταδιακά. Τα πιο σημαντικά συμπτώματα είναι η δύσπνοια, η κόπωση και ο βήχας, με ή χωρίς φλέγμα. Συνήθως εμφανίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα και χειροτερεύουν με την εξέλιξη της ασθένειας. Υπάρχει σημαντική απώλεια στην ποιότητα ζωής και λειτουργικής απόδοσης του ασθενή.

### 1.2.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η έκθεση σε χημικά καύσιμα και σκόνη (επαγγελματικός κίνδυνος) καθώς και γενετικοί παράγοντες.

#### **Κάπνισμα**

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας είναι το κάπνισμα ενεργητικό και παθητικό. Η διακοπή του καπνίσματος μπορεί να αποτρέψει τις δυσλειτουργίες που προκαλεί η νόσος καθώς και την πρόωρη θνησιμότητα [9]. Οι καπνιστές παρουσιάζουν περισσότερα αναπνευστικά συμπτώματα και ανωμαλίες της πνευμονικής λειτουργίας. Σχεδόν το 50% των καπνιστών πρόκειται να εμφανίσει απόφραξη των αεραγωγών των πνευμόνων ενώ το 10-20% θα εμφανίσει χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια [10]. Βέβαια η νόσος μπορεί να εμφανιστεί ακόμα και σε μη καπνίζοντες οι οποίοι πάσχουν από άλλα αναπνευστικά προβλήματα.

#### **Ατμοσφαιρική ρύπανση**

Η ατμοσφαιρική ρύπανση είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της λειτουργίας των πνευμόνων. Συνεπώς μπορεί να οδηγήσει και στην εμφάνιση χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Η έκθεση εργαζομένων σε οργανικές και ανόργανες σκόνες και σε αναθυμιάσεις αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου[11]. Πηγές έκθεσης αποτελούν οι εργασίες σε ορυχεία, λατομεία ή σήραγγες που απαιτούν τον διαχωρισμό στερεών υλικών, μεταλλουργικές εργασίες ή χρήση άμμου για την παραγωγή γυαλιού, χειρισμός χημικών ουσιών σε βιομηχανίες φαρμάκων και φυτοφαρμάκων, γεωργικές εργασίες και κτηνοτροφία [12].

## Γενετικοί παράγοντες

Πολλά είναι τα γονίδια που φαίνεται να είναι υποψήφια για την παθογένεια της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Η ομοζυγωτία της Z ισομορφής της πρωτεΐνης αλφα-1 αντιθρυψίνης μπορεί να προέλθει από μεταλλάξεις στο γονίδιο Alpha-1-antitrypsin (AAT). Ο γονότυπος ZZ σχετίζεται με σημαντική δυσλειτουργία των πνευμόνων· άτομα με φαινότυπο ZZ έχουν αυξημένο ρυθμό δυσλειτουργίας των πνευμόνων και κατά συνέπεια ΧΑΠ [13]. Επιπλέον, πολυμορφισμοί του γονιδίου endothelial nitric oxide synthase (NOS3) συμβάλουν στην ανάπτυξη ΧΑΠ σε άτομα με τον φαινότυπο ZZ [14]. Η οικογένεια των ενζύμων Glutathione S-transferases (GSTs) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση από διάφορους αρωματικούς υδρογονάνθρακες που βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου. Η ισομορφή GSTM1 εκφράζεται στο ήπαρ και τους πνεύμονες. Η ανεπάρκεια της GSTM1 έχει συσχετιστεί με άλλες ασθένειες δυσλειτουργίας όπως με την ύπαρξη εμφυσήματος σε άτομα με καρκίνο του πνεύμονα καθώς και με σοβαρή χρόνια βρογχίτιδα σε καπνιστές [13]. Οι κυτταροκίνες tumour necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση και συνδέονται με την παθογένεια της ΧΑΠ [13].

Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της ασθένειας είναι ανωμαλίες στην ανάπτυξη των πνευμόνων, γήρανση κ.α.

### 1.2.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Άτομα που αντιμετωπίζουν δύσπνοια, χρόνια βήχα με ή χωρίς φλέγμα και είναι εκτεθειμένα σε οποιοδήποτε παράγοντα κινδύνου προτείνεται να εξετάζονται για την διάγνωση της νόσου. Διαγνωστικό κριτήριο της ασθένειας αποτελεί η σπιρομέτρηση η οποία είναι η πιο αντικειμενική μέθοδος μέτρησης της ροής του αέρα στους πνεύμονες [11]. Πρόσθετος έλεγχος περιλαμβάνει την ακτινογραφία θώρακος καθώς και την διάγνωση συνοδών νοσημάτων. Είναι σημαντικό κατά την διάγνωση να εκτιμηθούν το αντίκτυπο της ασθένειας στην υγεία του ασθενή, το μέγεθος της βλάβης στην ροή του αέρα, η πιθανότητα για μελλοντικές παροξύνσεις και τελικά η πορεία της θεραπείας.

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα χρόνια νοσήματα η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια δεν είναι ιάσιμη. Η θεραπεία στοχεύει κυρίως στην επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου, την βελτίωση της ποιότητας ζωής των νοσούντων και τη μείωση της συχνότητας των παροξυσμών. Σε συνδυασμό με την θεραπεία ο ασθενής οφείλει να αποφύγει την έκθεση σε οποιοδήποτε παράγοντα κινδύνου, όπως το κάπνισμα. Κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή μπορεί να μειώσει δραστικά τα συμπτώματα και τη σοβαρότητα τους, να βελτιώσει της κατάσταση της υγείας του ασθενή, την αντοχή του κατά την άσκηση και την συνολική ποιότητα ζωής [11].

### 1.3 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PH) ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD)

Η πνευμονική υπέρταση είναι μια συχνή επιπλοκή της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Φαίνεται ότι η πνευμονική υπέρταση όλο και περισσότερο

αναγνωρίζεται ως παράγοντας που συμβάλει στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Ο επιπολασμός της πνευμονικής υπέρτασης σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι δύσκολο να εκτιμηθεί λόγω του ρίσκου που απαιτεί ο δεξιός καρδιακός καθετηριασμός [15]. Η παθογένεση αγγειακών ανωμαλιών σε ασθενείς με ΧΑΠ φαίνεται ότι σχετίζεται με υποξία, θρόμβωση των αγγείων και δυσχέρεια στην ροή του αέρα στους πνεύμονες, πολυκυτταραιμία, τοξικές παρενέργειες του καπνίσματος και γενετικούς παράγοντες [15].

### **Υποξία**

Η υποξία είναι μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία το σώμα στερείται επαρκούς οξυγόνωσης. Η υποξία προκαλεί αγγειοσυστολή και αυξημένη αγγειακή αντίσταση στους πνεύμονες [16]. Η υποξία επηρεάζει άμεσα τα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών μέσω του κύκλου του καλίου και του ασβεστίου [17]. Η εισροή του ασβεστίου στα πνευμονικά κύτταρα τονώνει την σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων. Σε ασθενείς με υποξία, παρατηρείται υπερέκφραση του παράγοντα HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) και απελευθέρωση πολλών ενδογενών ουσιών συμπεριλαμβανομένης της αγγειοτενσίνης II, ενδοθηλίνης-1 και αυξητικών παραγόντων, που έμμεσα συμβάλουν στην πνευμονική αγγειοσυστολή [16].

### **Γενετικοί παράγοντες**

Υπάρχουν διάφοροι πολυμορφισμοί γονιδίων που φαίνεται ότι σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών στις αρτηρίες των πνευμόνων σε άτομα με ΠΥ και ΧΑΠ. Το γονίδιο ACE (Angiotensin Converting Enzyme) με τους πολυμορφισμούς I (insertion) και D (deletion) παρουσιάζει τρεις γονότυπους (DD, II και ID). Ο πολυμορφισμός D έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης [18]. Ο γονότυπος ID σχετίζεται με την ανάπτυξη ΠΥ στους καυκάσιους πληθυσμούς με ΧΑΠ [19] και μπορεί να δημιουργήσει ευαισθησία κατά την άσκηση σε άτομα με ΧΑΠ [20]. Πολυμορφισμοί του γονιδίου eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) εξίσου παρουσιάζονται σε ασθενείς με ΧΑΠ. Ο πολυμορφισμός BB του γονιδίου eNOS σχετίζεται με την ΠΥ σε ασθενείς με ΧΑΠ [21]. Η πρωτεΐνη μεταφορέας της σεροτονίνης 5-HTT παίζει ρόλο στην υπερπλασία λείων μυών και στη αναδιαμόρφωση των αγγείων. Το αλληλόμορφο L προκαλεί υπερέκφραση της 5-HTT, ενώ οι γονότυποι LL και LS συναντώνται σε άτομα με ιδιοπαθή ΠΑΥ [22]. Σε άτομα με ΧΑΠ ο πολυμορφισμός LL σχετίζεται με την παρουσία ΠΥ και με την σοβαρότητα της ΠΥ. Τέλος, ο πολυμορφισμός GG την ιντερλευκίνης-6 (IL-6) οδηγεί σε ανεβασμένα επίπεδα IL-6 και συναντάται συχνότερα σε ασθενείς με ΠΥ και ΧΑΠ σε σχέση με ασθενείς με μόνο ΧΑΠ [21].

Η αντιμετώπιση ασθενών που πάσχουν από ΠΥ και ΧΑΠ είναι αντίστοιχη με όσα περιγράφηκαν παραπάνω. Απαιτεί πολύπλευρη προσέγγιση η οποία θα περιλαμβάνει την διαχείριση των συμπτωμάτων και της ΠΥ και της ΧΑΠ.

## 1.4 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ACE (ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME)

Το γονίδιο ACE έχει εντοπιστεί στην περιοχή 17q23.3 (NC\_000017.11) (63,477,060..63,498,380) του χρωμοσώματος 17 με μήκος 21,320 bp και αποτελείται από 26 εξώνια.



Εικόνα 1: Με κόκκινη γραμμή φαίνεται η θέση του γονιδίου στο χρωμόσωμα 17 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly).

Το γονίδιο ACE κωδικοποιεί ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην κατάλυση της μετατροπής της αγγειοτενσίνης I σε ένα φυσιολογικώς δραστικό πεπτίδιο την αγγειοτενσίνη II. Η αγγειοτενσίνη II είναι ένα πεπτίδιο με ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση και ικανότητα διέγερσης της αλδοστερόνης και ελέγχει την πίεση του αίματος και την ισορροπία των υγρών-ηλεκτρολυτών. Αυτό το ένζυμο παίζει βασικό ρόλο στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Οι αγγειοτενσίνες είναι πεπτίδια που λειτουργούν ως αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες (Εικόνα 3). Η συστολή της διαμέτρου των αγγείων ανεβάζει την πίεση του αίματος. Οι λειτουργίες του ενζύμου ACE το καθιστούν ιδανικό στόχο για τη μελέτη της εμπλοκής του στη δημιουργία χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD) και πνευμονικής υπέρτασης (PH) καθώς και για τη μελέτη θεραπευτικής προσέγγισης σχετιζόμενης με το γονίδιο ACE.

### 1.4.1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ I/D (Insertion/Deletion) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ACE

#### **Alu αλληλουχίες**

Οι αλληλουχίες Alu μήκους ~300 bp είναι τα πιο άφθονα μεταθετά στοιχεία και ενθέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι αλληλουχίες αυτές είναι παρούσες σε περισσότερα από ένα εκατομμύριο αντίτυπα που συνολικά εκπροσωπούν το 10% του συνόλου της μάζας του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ανήκουν στην οικογένεια Short Interspersed Nuclear Elements (SINE) των επαναλαμβανόμενων στοιχείων. Οι Alu ενθέσεις μπορούν να βρεθούν σε αντίστοιχες θέσεις στα γονιδιώματα θηλαστικών αλλά περίπου 7,000 εισαγωγές Alu είναι ξεχωριστές για κάθε άνθρωπο. Οι Alu ενθέσεις έχουν ενοχοποιηθεί για πολλές ανθρώπινες κληρονομικές ασθένειες και για πολλά ήδη καρκίνου[23].

#### **Πολυμορφισμός I/D (Insertion/Deletion)**

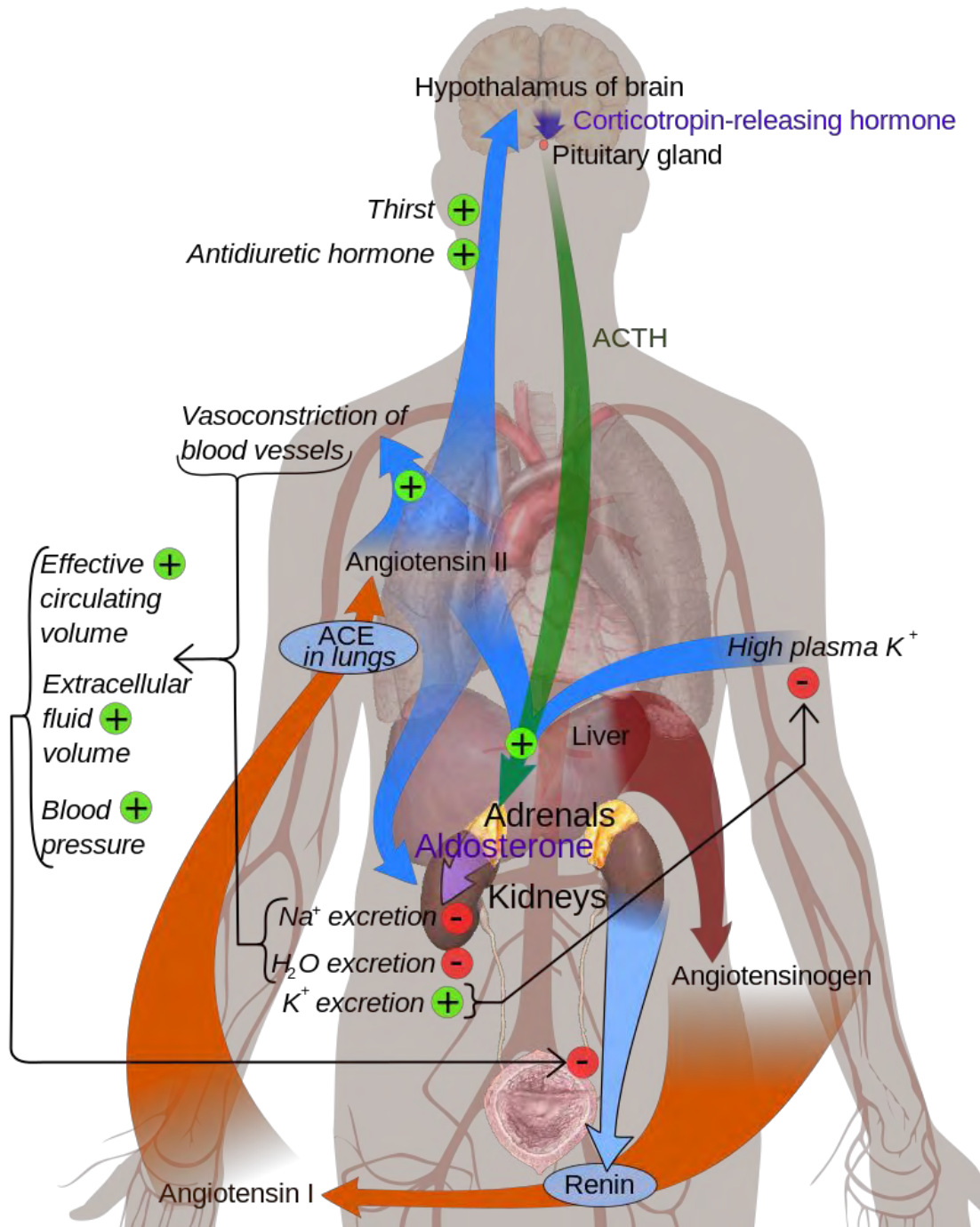
Η κύρια επίδραση του γονιδίου ACE σχετίζεται με τον πολυμορφισμό Insertion/Deletion που αποτελεί μια Alu επαναληπτική ακολουθία μήκους 287 bp που βρίσκεται στο ιντρόνιο 16 του γονιδίου ACE και είναι γνωστός ως ACE I/D πολυμορφισμός [18].



Εικόνα 2: Ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE στο ιντρόνιο 16 (UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly).

Πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την συσχέτιση του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με ασθένειες που επηρεάζουν την αρτηριακή πίεση. Βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός ACE I/D συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα του αντίστοιχου ενζύμου στο αίμα. Άτομα με γονότυπο DD είχαν διπλάσια ποσότητα του ενζύμου ACE σε σχέση με τα άτομα με γονότυπο II [18]. Ακόμη, ο γονότυπος DD αποτελεί δείγμα υψηλού κινδύνου για υπερτροφία της δεξιάς καρδιάς σε μεσήλικους άνδρες [24].

## Renin-angiotensin-aldosterone system



Εικόνα 3: Το σύστημα ρενίνης αγγειοτενσίνης [25]. Η ρενίνη εκκρίνεται από νεφρικά κύτταρα και σε συνδυασμό με το αγγειοτενσινογόνο που παράγεται στο ήπαρ σχηματίζει την αγγειοτενσίνη I. Στην συνέχεια, η αγγειοτενσίνη I με την βοήθεια του ενζύμου ACE στους πνεύμονες μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II και III. Οι αγγειοτενσίνες II και III έχουν ισχυρή αγγειοσυσπαστική δράση και με τη σειρά τους διεγείρουν την αλδοστερόνη στον φλοιό των επινεφριδίων με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η αλδοστερόνη είναι επίσης υπεύθυνη για την ελάττωση των ιόντων καλίου K<sup>+</sup> στο αίμα.

## 1.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας με εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο.

Ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis και βραβεύτηκε με βραβείο Νόμπελ χημείας το 1993. Πρόκειται για έναν τρόπο πολλαπλασιασμού κατά εκατομμύρια φορές συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού[26].

### 1.5.1 ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Οι θερμοκοί κυκλοποιητές (Thermal Cycler) PCR εναλλάσσουν την θερμοκρασία γρήγορα και με ακρίβεια επιτρέποντας έτσι την αποδιάταξη των κλώνων του DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση του προϊόντος της PCR.

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA αναδιατάσσονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94°-98° C η οποία εξαρτάται από το περιεχόμενο της αλληλουχίας του γονιδιώματος σε GC βάσεις, για όχι περισσότερο από 3 λεπτά.

2. Υβριδισμός εκκινητών: Η θερμοκρασία της υβριδοποίησης των εκκινητών εξαρτάται συνήθως από την θερμοκρασία αποδιάταξης ( $T_m$ ) τους ενώ, στο στάδιο της σύνθεσης του νέου DNA η θερμοκρασία εξαρτάται από την DNA πολυμεράση που έχει επιλεγεί για το εκάστοτε πείραμα.

3. Επιμήκυνση: Το τελευταίο αυτό στάδιο επιτρέπει την σύνθεση και την τελειοποίηση του DNA. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας την συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα τρία παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται διαδοχικά 25-35 φορές μέχρις ότου επιτευχθεί επαρκής αριθμός αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας [26], [27].

### 1.5.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR

Για τη διενέργεια μιας αντίδρασης PCR απαιτούνται διάφορα συστατικά και αντιδραστήρια τα οποία περιλαμβάνουν:

1. Γενετικό υλικό: Μπορεί να είναι αλληλουχία DNA ή RNA και πρέπει να περιέχει την αλληλουχία στόχο.

2. DNA πολυμεράση: Είναι ένζυμο που συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Η DNA πολυμεράση συνθέτει μια νέα συμπληρωματική αλυσίδα χρησιμοποιώντας ένα μόριο DNA ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή στο σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας είναι 5'-3'. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης φθίνει με την πάροδο του χρόνου [26].

3. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές: Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Το



μέγεθος, η αλληλουχία και η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών είναι πολύ σημαντικά για την επιτυχία της αντίδρασης.

4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και  $Mg^{2+}$ : Η παρουσία ιόντων  $Mg^{2+}$  και ρυθμιστικού διαλύματος δημιουργούν το ιδανικό περιβάλλον για την διενέργεια της αντίδρασης. Η ποσότητα των ιόντων  $Mg^{2+}$  επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, περίσσεια  $Mg^{2+}$  μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της πολυμεράσης. Ενώ, χαμηλές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος

5. Νουκλεοτίδια (dNTPs): Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Χαμηλές συγκεντρώσεις dNTPs μπορούν να αυξήσουν την ακρίβεια και την πιστότητα της αντίδρασης ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορούν να την αναστείλουν [27].

### **Πρόσθετα συστατικά της αντίδρασης PCR**

Dimethylsulfoxide (DMSO): Σε αντιδράσεις PCR στις οποίες ή αλληλουχία στόχος είναι πλούσια σε G-C βάσεις (>60%), η προσθήκη DMSO μπορεί να ενισχύσει την αντίδραση καθώς διαταράσσει τους δεσμούς μεταξύ των G-C βάσεων και μειώνει αποτελεσματικά την θερμοκρασία αποδιάταξης ( $T_m$ ) [27].

Tris-HCL: Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου το pH ποικίλει ανάλογα με την θερμοκρασία και έτσι κατά την διάρκεια της αντίδρασης PCR το pH μπορεί να κυμανθεί από περίπου 6, 8 έως 8, 3. Στην πραγματικότητα η Taq DNA πολυμεράση λειτουργεί με μεγαλύτερη πιστότητα σε χαμηλότερες τιμές pH δηλαδή σε υψηλότερες θερμοκρασίες της αντίδρασης PCR.

#### **1.5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (AGAROSE GEL)**

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης των προϊόντων της αντίδρασης PCR είναι η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης. Ανάλογα με το αναμενόμενο μέγεθος της αλληλουχίας DNA που πολλαπλασιάστηκε κατά την αντίδραση PCR, ένα μέρος της φορτώνεται σε γέλη αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8- 3 % η οποία περιέχει επίσης GelRed nucleic acid gel stain (10.000 x in water). Η χρήση της χρωστικής bromophenol blue συμβάλει στην οπτικοποίηση της μετανάστευσης των δειγμάτων πάνω στη γέλη. Τα θραύσματα που ενισχύθηκαν κατά την αντίδραση PCR θα πρέπει να είναι ορατά κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και η γέλη μπορεί να φωτογραφηθεί χρησιμοποιώντας ψηφιακή κάμερα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, γέλη αγαρόζης με περιεκτικότητα 1% δίνει αρκετά καλή ανάλυση αλληλουχιών DNA μεταξύ 500 και 10000 ζευγών βάσεων. Εάν οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ιδανικές και η αντίδραση είναι επιτυχής, η οπτικοποίηση του αποτελέσματος στη γέλη αγαρόζης θα πρέπει να δίνει μία μεμονωμένη μπάνα στο επιθυμητό μέγεθος.

## 1.6 ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετα-ανάλυση είναι η στατιστική ανάλυση μιας συλλογής δεδομένων από ξεχωριστές μελέτες, με στόχο την εξαγωγή πορισμάτων. Πρόκειται για μία συστηματική ανασκόπηση ενός συγκεκριμένου θέματος στην βιβλιογραφία, που παρέχει μια ποσοτική εκτίμηση της επίδρασης μιας θεραπείας, παρέμβασης ή έκθεσης σε κάποιο χαρακτηριστικό [28]. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην μετα-ανάλυση παρέχουν μια δομημένη προσέγγιση για ένα συγκεκριμένο θέμα και τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό νέων κλινικών δοκιμών ή την σύσταση θεραπειών [28]. Αποτελεί αναγκαίο και χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των μελετητών για την εξαγωγή συμπερασμάτων από μεγάλο όγκο μελετών αντιφατικών και μη, με υπόβαθρο τη στατιστική θεωρία.

## 1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια είναι μια ασθένεια που εμφανίζει σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Αποτελεί πλέον την πέμπτη αιτία πρόωρης θνησιμότητας [8]. Η πνευμονική υπέρταση είναι μια συνήθης επιπλοκή της ΧΑΠ. Η αναζήτηση γενετικών παραγόντων μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των δυο αυτών ασθενειών. Η εύρεση της επίδρασης ενός πολυμορφισμού στην ανάπτυξη και εξέλιξη μιας ασθένειας μπορεί να προσφέρει νέες δυνατότητες για την γενετική διάγνωση, την πρόληψη, την αντιμετώπιση και τη θεραπεία της νόσου. Οι γονοτυπικές αναλύσεις πολυμορφισμών αποτελούν την βάση των μελετών συσχέτισης, για τον εντοπισμό γονιδιακών παραγόντων που εμπλέκονται σε ανθρώπινες νόσους.

Ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE φαίνεται πως σχετίζεται με την αύξηση της αρτηριακής πίεσης και πιθανόν κατά συνέπεια με τις παραπάνω ασθένειες. Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση-καταρχήν σε Έλληνες ασθενείς. Για το σκοπό αυτό γίνεται καθορισμός γονοτύπων του γονιδίου σε δείγματα 88 ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και 88 υγιών διενεργώντας PCR και ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.

Σε δεύτερο στάδιο διεξάγεται μετα-ανάλυση ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη της συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με την ΠΑΥ με στατιστικά σημαντικό τρόπο, χρησιμοποιώντας δεδομένα από όλη την σχετική επιστημονική βιβλιογραφία παγκοσμίως. Επιπλέον, ελέγχεται με μετα-ανάλυση και η συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με την ΧΑΠ αλλά και με την εμφάνιση της ΠΥ σε ασθενείς που ήδη πάσχουν από ΧΑΠ.

Συνοψίζοντας η συγκεκριμένη εργασία στοχεύει στο να διευκρινίσει το αν ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE συσχετίζεται με την ανάπτυξη της ΠΑΥ, της ΧΑΠ και της ΠΥ σε ΧΑΠ και στο αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη, διάγνωση και πρόληψη αυτών των ασθενειών. Τέλος, στοχεύει στην καλύτερη κατανόηση των νόσων αυτών ώστε να βοηθήσει στην δημιουργία νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και στρατηγικών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



## 2.1 ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ

### 2.1.1 ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ (ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΕΙΣ)

88 ασθενείς με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH) και 88 υγιή άτομα που προέρχονταν από τη δεύτερη μονάδα εντατικής θεραπείας του νοσοκομείου “Αττικόν” (2nd Critical Care Department, “Attikon”), συμμετείχαν στην έρευνα. Ο επίκουρος καθηγητής του πανεπιστημίου Αθηνών, Ηρακλής Τσαγκάρης συνέλλεξε τα δείγματα, ενώ η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε από την επίκουρη καθηγήτρια του πανεπιστημίου Αθηνών, Αργύρη Γιαλεράκη. Στη συλλογή των δειγμάτων συμμετείχαν και ο αναπληρωτής καθηγητής Αργύρης Τσαντές και η κα. Βρίγκου Ελένη.

### 2.1.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση γονιδιωματικού DNA έγινε με το kit NucleoSpin® Blood της Macherey Nagel. Η ανασύσταση έγινε σε 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης, που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων DNA έγινε με φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000 στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής στη Λάρισα. Έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260, 280 και 230nm καθώς και προσδιορισμός των λόγων απορρόφησης 260/280 and 260/230 για εκτίμηση της καθαρότητας των δειγμάτων DNA (Πίνακας Παραρτήματος 2). Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν σε Tris-HCL 1x (Tris (hydroxymethyl) aminomethane 10 mM) pH8 και σε τελική συγκέντρωση 10 (ng/μl), για την αποφυγή αποικοδόμησης του DNA κατά τη διάρκεια των συνεχών κύκλων παγώματος-ξεπαγώματος.

### 2.1.3 ΕΥΡΕΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ

Τα δείγματα DNA πολλαπλασιάστηκαν με PCR με τη χρήση της πολυμεράσης KAPA HiFi (KAPA Biosystems) (1 unit/μl) χρησιμοποιώντας τα παρακάτω σετ εκκινητών (Πίνακας Παραρτήματος 1):

Oligo Name	Sequence (5'→3')
ACE-F	GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT (24)
ACE-R	GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC (24)
ACE-Ins-F	TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC (24)
ACE-Ins-R	TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA (24)

Οι παραπάνω εκκινητές επιλέχθηκαν ύστερα από εκτενή μελέτη βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων PubMed του NCBI [29]. Μια επαναληπτική αντίδραση PCR έγινε με το δεύτερο σετ εκκινητών για την επιβεβαίωση του γονότυπου DD των δειγμάτων καθώς όταν έχουμε τον γονότυπο ID η αντίδραση PCR επιλεκτικά ενισχύει το D αλληλόμορφο, δηλαδή το μικρότερο τμήμα [29].

Για την επιλογή κατάλληλης θερμοκρασίας για την αντίδραση PCR με το πρώτο σετ εκκινητών πραγματοποιήθηκε Gradient PCR σε 12 διαφορετικές θερμοκρασίες (62, 62.6, 63.3, 64.6, 66.1, 67.7, 69.2, 70.8, 72.4, 73.7, 74.3 και 75° C) για δυο

διαφορετικά δείγματα υγιών ατόμων (C1-C2). Τα συστατικά της αντίδρασης υπολογίστηκαν για τελική ποσότητα 20μl σε κάθε ένα από τα 12 eppendorf και φαίνονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

<b>Πίνακας 1: Συστατικά της αντίδρασης gradient PCR.</b>			
	Our Final Concentration	20μl reaction	Master Mix for 26 samples
H <sub>2</sub> O			306.8
5x buffer	1x	4 μl	104
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 mM	0	0
dNTPs (10mM each in mix)	0.3 mM each	0.6 μl	15.6
Forward primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.6 μl	15.6
Reverse primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.6 μl	15.6
Genomic DNA 10ng/μl	10-100 ng	2 μl	
KAPA HiFi (1unit/ μl)	1 U/50μl reaction	0.4 μl	10.4

Το πρόγραμμα για όλα τα στάδια του gradient PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

<b>Πίνακας 2: Πρόγραμμα gradient PCR.</b>		
95°C	3 min	
98°C	20 sec	30 cycles
62-75°C	20 sec	
72 °C	<b>15sec</b>	
72 °C	1 min	

Σε κάθε eppendorf με τα προϊόντα της αντίδρασης προστέθηκε 2 μl Loading Buffer 10x και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης με περιεκτικότητα 1.5% του οποίου η διαχωριστική ικανότητα για τμήματα DNA είναι 200 bp – 4000 bp. Η μετανάστευση των δειγμάτων πάνω στην γέλη οπτικοποιήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε αρχικά φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 3).

<b>Πίνακας 3: Πρόγραμμα 1<sup>ου</sup> PCR.</b>		
95°C	3 min	
98 °C	20 sec	30 cycles
72 °C	17 sec	
72 °C	<b>15sec</b>	
72 °C	1 min	

Αφότου έγινε καταγραφή όλων των αποτελεσμάτων για τα δείγματα που παρουσίαζαν ασάφεια κατά την ηλεκτροφόρηση, επαναλήφθηκε η 1<sup>η</sup> αντίδραση PCR και η ηλεκτροφόρηση.

Τα δείγματα με γονότυπο DD υποβλήθηκαν ξανά σε PCR με το δεύτερο σετ εκκινητών. Για την επιλογή βέλτιστης θερμοκρασίας με αυτό το σετ εκκινητών διεξήχθη gradient PCR. Έγιναν δοκιμές με τις εξής πολυμεράσες : KAPA HiFi (1 unit/μl) και KAPA Taq DNA KR0352 (KAPA Biosystems) (5 unit/μl). Επιλέχθηκε η KAPA Taq DNA KR0352 ως αυτή που δίνει την πιο καθαρή ζώνη DNA και τη βέλτιστη εικόνα στην ηλεκτροφόρηση. Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε είναι T=73°C. Ο παρακάτω πίνακας συγκεντρώνει όλα τα συστατικά της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα που επιλέξαμε για το δεύτερο PCR:

<b>Πίνακας 4: Συστατικά της αντίδρασης 2<sup>ης</sup> PCR.</b>			
	Our Final Concentration	20 μl reaction	Master Mix for 21 samples
H <sub>2</sub> O		11.92	250.32
5x buffer	1x	2 μl	42
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 mM	0	0
dNTPs (10mM each in mix)	0.3 mM each	0.4 μl	8.4
Forward primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.8 μl	16.8
Reverse primer (10 pmol/μl) (10μM)	0.3 μM	0.8 μl	16.8
Genomic DNA (10ng/μl)	10-100 ng	4 μl	
KAPA Taq KR0352 (5unit/ μl)	1 U/50μl reaction	0.08 μl	1.68

Το πρόγραμμα για όλα τα στάδια του PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

<b>Πίνακας 5: Πρόγραμμα 2<sup>ου</sup> PCR.</b>		
95°C	3 min	30 cycles
95 °C	20 sec	
73 °C	45 sec	
72 °C	<b>60</b> sec	
72 °C	10 min	

#### 2.1.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης. Για τη δημιουργία του πηκτώματος 1,5 % αγαρόζης αναμίχθηκαν 2.25gr αγαρόζης σε σκόνη με 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris Acetate Acid/EDTA (TAE 1x) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη. Σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν στο μίγμα 12μl χρωστικής (GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000x). Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο και προστέθηκαν τα εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά βοηθία υποδοχής του δείγματος (τα λεγόμενα στη γλώσσα του

εργαστηρίου «πηγαδάκια»). Το μίγμα αφέθηκε για 20-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να κρυώσει και να σχηματιστεί η γέλη. Έπειτα αφαιρέθηκαν τα «χτενάκια» και η γέλη τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris Acetate Acid/EDTA (TAE 1x).

Στα δείγματα DNA μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης PCR έγινε προθήκη 2μl χρωστικής (Loading Buffer, Takara 10x). Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις εσοχές της γέλης με τη βοήθεια πιπέτας. Ανάμεσα στα δείγματα DNA τοποθετήθηκε DNA marker (100 bp DNA ladder, Nippon Genetics, Cat. No. MWD100). Η τάση που εφαρμόστηκε στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης ήταν 8V/cm ανάλογα με το μήκος του gel, δηλαδή 64 V για την περίπτωση του μικρού gel. Όταν επιτεύχθηκε ο επιθυμητός διαχωρισμός των μορίων DNA του δείγματος έγινε τερματισμός της ηλεκτροφόρησης και η γέλη φωτογραφήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

## 2.2 META-ANALΥΣΗ

### 2.2.1 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Πραγματοποιήθηκε μια λεπτομερής αναζήτηση στη βάση δεδομένων PubMed του NCBI με λέξεις κλειδιά: ACE (Angiotensin Converting Enzyme), PAH (Pulmonary Arterial Hypertension) και COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) για την αναζήτηση άρθρων βιβλιογραφίας που σχετίζονται με τους πολυμορφισμούς του γονιδίου και την πάθηση της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και της πνευμονικής υπέρτασης.

### 2.2.2 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Συγκεντρώθηκαν 45 άρθρα από τα οποία απορρίψαμε μελέτες οι οποίες αναφέρονταν σε διαφορετικά γονίδια ή άλλες ασθένειες και μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια. Ύστερα από την ολοκλήρωση της αναζήτησης της βιβλιογραφίας επιλέχθηκαν τελικά 15 μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην μετα-ανάλυση. Καταγράφηκαν δεδομένα των μελετών όπως, ο συγγραφέας (AUTHOR), η χρονολογία που πραγματοποιήθηκε η μελέτη (YEAR), η χώρα (COUNTRY), ο συνολικός αριθμός των ασθενών (CASES), ο συνολικός αριθμός των υγιών (CONTROLS) και υπολογίστηκε και ο συνολικός αριθμός κάθε αλληλόμορφου σε υγιείς και ασθενείς. Οι έρευνες διαχωρίστηκαν με βάση την ασθένεια, δηλαδή άτομα με ΧΑΠ, άτομα με ΠΥ ή άτομα και με τις δύο ασθένειες. Όλα τα δεδομένα των μελετών αναλύθηκαν από το πρόγραμμα Stata για την διεξαγωγή αποτελεσμάτων.

### 2.2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA

Το στατιστικό πακέτο Stata είναι ένα λογισμικό στατιστικής ανάλυσης. Διαθέτει έτοιμες εντολές για την πραγματοποίηση μετα-αναλύσεων όπως η «metan», η «metacum», και η «metatrend» που εμφανίζουν αποτελέσματα σε διαγράμματα και πίνακες χωρίς τη χρήση επιπλέον πράξεων. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία όλες οι μετα-αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο Stata 13 [30].



## 2.2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Αφού συγκεντρώθηκαν όλα τα δεδομένα πραγματοποιήθηκαν μετα-αναλύσεις είτε με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effects model) είτε με το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects model).

### Μέγεθος επίδρασης (effect size)

Το μέγεθος επίδρασης είναι ένα ποσοτικό μέτρο που προσδιορίζει το μέτρο της διαφοράς δυο ομάδων [31].

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ερευνάται η συσχέτιση του πολυμορφισμού ACE I/D με την εμφάνιση των ασθενειών της ΧΑΠ και ΠΥ. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μελέτες που συνδυάζουν αποτελέσματα από δυο ομάδες ανθρώπων, ασθενών και υγιών. Ως κατάλληλο μέγεθος επίδρασης για την συσχέτιση αυτών των δυο ομάδων επιλέχθηκε το odds ratio (OR). Αν συμβολίσουμε με  $p$  τους ασθενείς και με  $q$  τους υγιείς μάρτυρες το odds ratio διαμορφώνεται ως εξής:

$$OR = \frac{\frac{p}{1-p}}{\frac{q}{1-q}} = \frac{p(1-q)}{q(1-p)}$$

Πραγματοποιήθηκαν τρεις συγκρίσεις. Η πρώτη σύγκριση αφορά τα αλληλόμορφα I και D η οποία θεωρητικά αναφέρεται στον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Πίνακας 7). Η δεύτερη σύγκριση γίνεται για τους γονότυπους DD+ID έναντι του γονότυπου II που εκπροσωπεί τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Πίνακας 8) και τέλος η τρίτη σύγκριση γίνεται για τον γονότυπο DD έναντι των γονοτύπων II+ID που εκπροσωπεί τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (Πίνακας 9).

	DD	ID	II
Ασθενείς	x	y	z
Υγιείς	e	f	h

	D	I
Ασθενείς	2x+y	2z+y
Υγιείς	2e+f	2h+f

	Γονότυποι	
	DD+ID	II
Ασθενείς	x+y	z
Υγιείς	e+f	h

Πίνακας 9: Σύγκριση γονοτύπων DD vs II+ID		
	Γονότυποι	
	DD	II+ID
Ασθενείς	x	y+z
Υγιείς	e	f+h

Το OR, ως μέγεθος επίδρασης, υπολογίστηκε για όλες τις συγκρίσεις. Για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων II+ID το OR υπολογίζεται ως εξής:

$$OR = \frac{x * (f + h)}{e * (y + z)}$$

Αν το OR είναι ίσο με τη μονάδα τότε οι δύο ομάδες έχουν ίσες πιθανότητες να εμφανίσουν την ίδια νόσο. Αν το OR είναι μεγαλύτερο της μονάδας τότε αυτό σημαίνει ότι ο πολυμορφισμός είναι πιθανότατα υπεύθυνος παράγοντας για την εμφάνιση της νόσου. Τέλος, αν η τιμή του OR βρεθεί μικρότερη της μονάδας δείχνει ότι ο πολυμορφισμός μάλλον λειτουργεί προστατευτικά για την εμφάνιση της νόσου.

Ακόμη, η σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων απαιτεί τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης. Αν μέσα στο διάστημα εμπιστοσύνης περιέχεται η μονάδα τότε το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Ο τύπος του διαστήματος εμπιστοσύνης είναι ο ακόλουθος:

$$95\% CI = \log OR \pm 1.96 * SE_{\log OR}, CI(\text{Confidence Interval})$$

Όπου  $SE_{\log OR}$  το τυπικό σφάλμα, που δίνεται από τον τύπο με τη χρήση της σύγκρισης των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II:

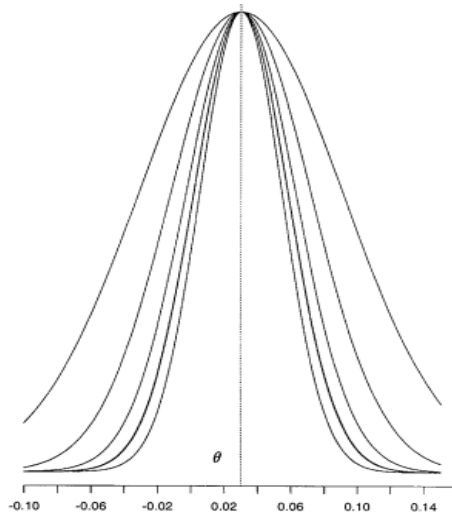
$$SE_{\log OR} = \sqrt{\frac{1}{x + y} + \frac{1}{z} + \frac{1}{e + f} + \frac{1}{h}}$$

Υπάρχουν δυο τρόποι διεξαγωγής της μετα-ανάλυσης. Στην μία περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο σταθερών επιδράσεων, ενώ στην δεύτερη περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.

**Μοντέλο σταθερών επιδράσεων**

Το odds ratio της κάθε μελέτης (Yi) ακολουθεί την κανονική κατανομή γύρω από ένα κοινό μέγεθος επίδρασης θ, με μια διακύμανση (si<sup>2</sup>). Το odds ratio της κάθε μελέτης διαφέρει όπως φαίνεται από το άνοιγμα της καμπάνας αλλά εκτιμά ένα κοινό μέγεθος επίδρασης. Ο τύπος της στατιστικής ανάλυσης του μοντέλου σταθερών επιδράσεων διαμορφώνεται ως εξής:

$$Yi \sim N(\theta, si^2) \text{ για } i=1, 2, 3 \dots k$$



Εικόνα 4: Η κατανομή πέντε υποθετικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας το μοντέλο σταθερών επιδράσεων. Το  $\theta$  είναι ένα κοινό μέγεθος επίδρασης ενώ η κάθε μελέτη έχει διαφορετική διακύμανση ανάλογα με το πόσο απέχει από το  $\theta$ .

Όταν έχουμε ετερογένεια δηλαδή διασπορά των εκτιμητών γύρω από κάθε μελέτη δεν υπάρχει νόημα στην χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων το οποίο προϋποθέτει τα δείγματα να έχουν μια ομοιογένεια.

### Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων

Σε αντίθεση με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων δεν απαιτεί τα δείγματα να προέρχονται από έναν ενιαίο πληθυσμό και να υπάρχει ομοιογένεια. Στην περίπτωση αυτή, κάθε μελέτη ( $Y_i$ ) εκτιμά έναν πληθυσμιακό μέσο  $\theta$  με μια συγκεκριμένη διακύμανση ( $s_i^2$ ).

$$Y_i | \theta, s_i^2 \sim N(\theta, s_i^2)$$

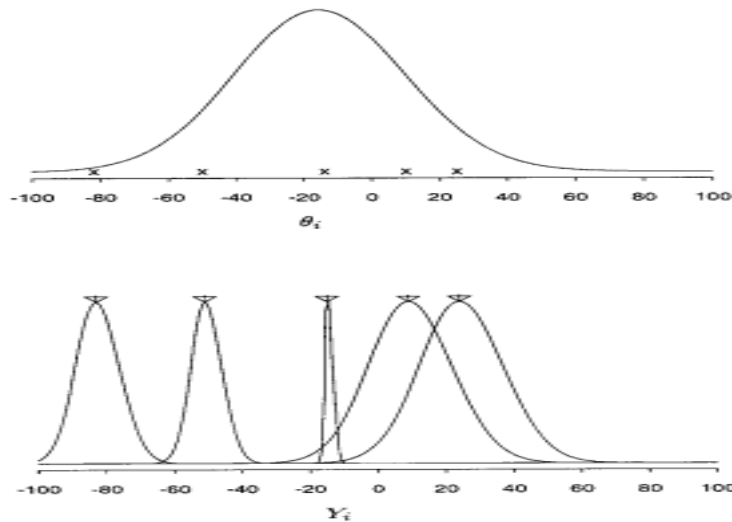
Αν υπάρχουν πολλοί πληθυσμοί στις μελέτες με μέση τιμή μεγεθών επίδρασης  $\theta$  και  $\tau^2$  την διακύμανση τότε:

$$\theta_i | \theta, \tau^2 \sim N(\theta, \tau^2)$$

όπου  $\theta$  και  $\tau^2$  υπερπαραμέτροι οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το κοινό μέγεθος επίδρασης και την διακύμανση. Ο τελικός τύπος διαμορφώνεται ως εξής:

$$\theta_i | y, \theta, \tau^2 \sim N(B_i \theta + (1 - B_i) Y_i, s_i^2 (1 - B_i))$$

όπου  $y = (Y_1, Y_2, \dots, Y_k)$  και  $B_i = s_i^2 / (s_i^2 + \tau^2)$  με  $B_i$  να κυμαίνεται από 0 έως 1. Δηλαδή όταν το  $B_i$  πάρει την μεγαλύτερη τιμή του ίση με 1, τότε το  $\tau^2$  είναι ίσο με 0 και  $\theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_k = \theta$  και άρα το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων είναι ίσο με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων[32].



Εικόνα 5: Η κατανομή πέντε δειγμάτων με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων. Κάθε μέγεθος επίδρασης προέρχεται από τον υπερπληθυσμό με μέγεθος επίδρασης  $\theta$  και διακύμανση  $\tau^2$ .

## 2.2.5 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Ο υπολογισμός του odds ratio και του standard error, γίνεται πολύ εύκολα με την χρήση των εντολών του στατιστικού πακέτου Stata ως εξής:

- ***generate odr=log((Dallelesinpatients\*Iallelesincontrols)/( Iallelesinpatients\* Dallelesincontrols))***

Η εντολή «generate» δημιουργεί μία μεταβλητή odr η οποία αντιπροσωπεύει το odds ratio σε λογαριθμική κλίμακα.

- ***replace odr=log(((0.5+DDpatients)\*(0.5+IIDControls))/((0.5+DDControls) \*(0.5+ IIDPatients))) if DDpatients==0| IIDControls==0| DDControls==0| IIDControls==0***

Σε περίπτωση που κάποια πιθανότητα είναι μηδενική για την αποφυγή μηδενισμού του OR, η παραπάνω εντολή προσθέτει τον αριθμό 0.5 σε όλες τις συχνότητες.

- ***generate std=sqrt(1/Dallelesinpatients + 1/Iallelesinpatients + 1/ Dallelesincontrols +1/ Iallelesincontrols)***

Η εντολή «generate» δημιουργεί μία μεταβλητή std η οποία αντιπροσωπεύει το standard error.

- ***replace std=sqrt(1/( DDpatients+0.5)+1/( IIDPatients+0.5)+1/( DDControls+0.5)+1/( IIDControls+0.5)) if DDpatients==0|IIDControls==0| DDControls==0| IIDPatients==0***

Αντίστοιχα προστίθεται το 0.5 σε όλες τις πιθανότητες στον υπολογισμό του standard error.

## Μονομεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης

Μετά την συλλογή όλων των δεδομένων και την κατάλληλη ομαδοποίηση τους μπορούν να γίνουν τρεις συγκρίσεις ελέγχου συσχέτισης του γονιδίου με τη νόσο της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Για κάθε σύγκριση υπολογίζεται το odds ratio. Η μετα-ανάλυση στο στατιστικό πακέτο Stata πραγματοποιείται με τις ακόλουθες εντολές:

- *metan Dallelesinpatients Dallelesincontrols Iallelesinpatients Iallelesincontrols, or random sortby(DATE) label(namevar= AUTHOR, yearvar= DATE) xlab(0.1,1,3)*

ή

- *metan odr std, eform random by(COUNTRY) label(namevar= AUTHOR, yearvar= DATE) xlab(0.1,1,3)*

Στις παραπάνω εντολές πιο συγκεκριμένα (Πίνακας 2):

*Dallelesinpatients*: ο αριθμός ( $2x+y$ ) των ασθενών που έχουν το αλληλόμορφο D

*Dallelesincontrols*: ο αριθμός ( $2e+f$ ) των υγιών που έχουν το αλληλόμορφο D

*Iallelesinpatients*: ο αριθμός ( $2z+y$ ) των ασθενών που έχουν το αλληλόμορφο I

*Iallelesincontrols*: ο αριθμός ( $2h+f$ ) των υγιών που έχουν το αλληλόμορφο I

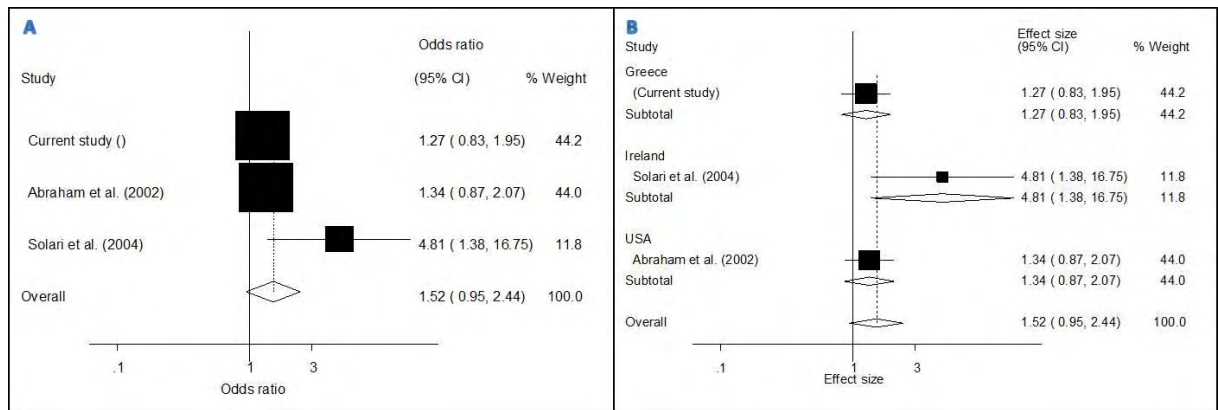
*random*: δηλώνει τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

*sortby(DATE)*: ταξινόμηση των μελετών με βάση την χρονιά που δημοσιεύτηκαν.

*label(namevar= AUTHOR, yearvar= DATE)*: προσθέτει ετικέτες στο διάγραμμα του forest plot, όπου κάθε μελέτη θα αντιπροσωπεύεται από το όνομα του συγγραφέα και τη χρονιά δημοσίευσης.

*xlab(0.1,1,3)*: ορίζει τις τιμές που εμφανίζονται στον άξονα  $\chi^2$  του forest plot.

*eform*: χρησιμοποιείται για να αλλάξει πίσω στην αρχική κλίμακα την μεταβλητή του odds ratio καθώς για τον αρχικό υπολογισμό του χρησιμοποιούμε την λογαριθμική κλίμακα.



Εικόνα 6: Τα διαγράμματα forest plot που παράγονται από την δύο εντολές της μετα-ανάλυσης. Α) Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα κάθε μελέτης και η χρονολογία ενώ στα δεξιά το odds ratio (OR), τα διαστήματα εμπιστοσύνης CI 95% και το βάρος της κάθε μελέτης. Β) Στα αριστερά παρουσιάζεται το όνομα του συγγραφέα, η χρονολογία και η φυλή. Δεξιά είναι το διάστημα εμπιστοσύνης CI 95% και το OR. Οι ρόμβοι αντιπροσωπεύουν τα επιμέρους OR για κάθε ομάδα πληθυσμού. Η σταθερή κατακόρυφη γραμμή αντιστοιχεί σε OR=1, ενώ η διακεκομμένη γραμμή διέρχεται από το συνολικό OR της μετα-ανάλυσης.

### Δείκτες ετερογένειας

Με την εντολή metan υπολογίζονται και οι δείκτες ετερογένειας:

1. Ο δείκτης  $Q$  της στατιστικής συνάρτησης του Cochran ο οποίος ακολουθεί την κατανομή  $\chi^2$  με  $k-1$  βαθμούς ελευθερίας, όπου  $k$  ο αριθμός των μελετών. Το  $Q$  δίνεται από τον τύπο:

$$Q = \sum w_i (y_i - y_w)^2,$$

με  $y_i$  την εκτίμηση του αποτελέσματος κάθε μελέτης και  $y_w$  την συνολική εκτίμηση του αποτελέσματος με τύπο:

$$y_w = \frac{\sum w_i y_i}{\sum w_i},$$

όπου  $w_i$  το αντίστροφο της διακύμανσης ( $s^2$ ) με  $i=1 \dots n$

2. Ο δείκτης  $I^2$  της στατιστικής συνάρτησης του Higgins και Thompson, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό της ετερογένειας. Το  $I^2$  δίνεται από τον τύπο:

$$I^2 = \frac{Q - k + 1}{Q} * 100\%,$$

όπου  $Q$  ο δείκτης του Cochran και  $k$  αριθμός μελετών

3. Ο δείκτης  $\tau^2$  που χρησιμοποιείται όταν εφαρμόζεται το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων και υπολογίζει την ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Ο δείκτης  $\tau^2$  δίνεται από τον τύπο:

$$\tau^2 = \frac{Q - (k - 1)}{\sum w_i - \frac{\sum w_i^2}{\sum w_i}}$$

όπου  $Q$  ο δείκτης του Cochran και  $k$  αριθμός μελετών.

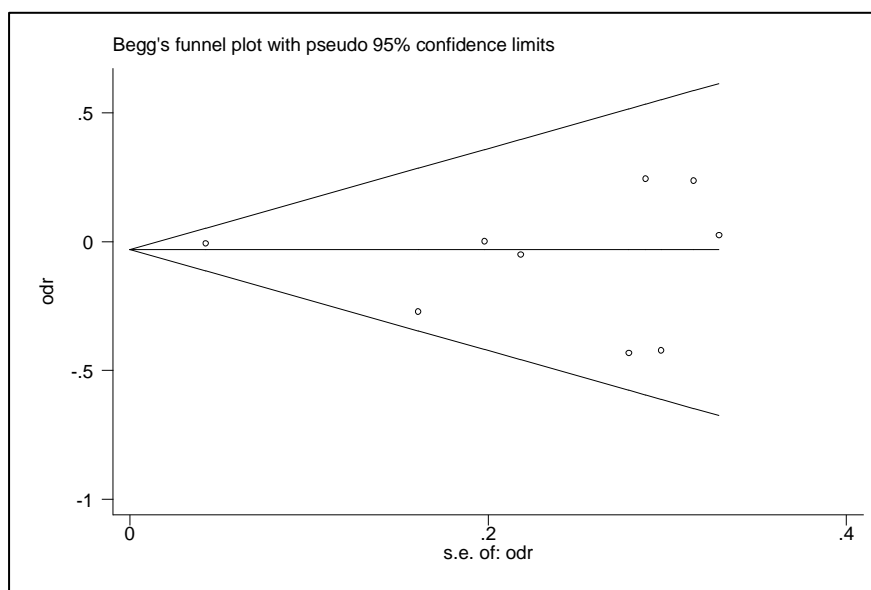
## Προβλήματα βιβλιογραφίας

Σε μια συστηματική ανασκόπηση είναι σημαντικό να ερευνηθούν όλες οι διαθέσιμες πηγές, ωστόσο αυτό τις περισσότερες φορές δεν είναι δυνατό. Πρόκειται για ένα γενικό πρόβλημα που ονομάζεται «σφάλμα δημοσίευσης» (publication bias) και συναντάται κατά την διεξαγωγή μίας μετα-ανάλυσης. Το σφάλμα δημοσίευσης μπορεί να εμφανιστεί είτε από μελέτες που δεν δημοσιεύονται λόγω μη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων (grey literature bias), είτε από ξενόγλωσσες μελέτες που δεν είναι διαθέσιμες στην αγγλική γλώσσα, είτε με το φαινόμενο του Πρωτέα (Proteus phenomenon).

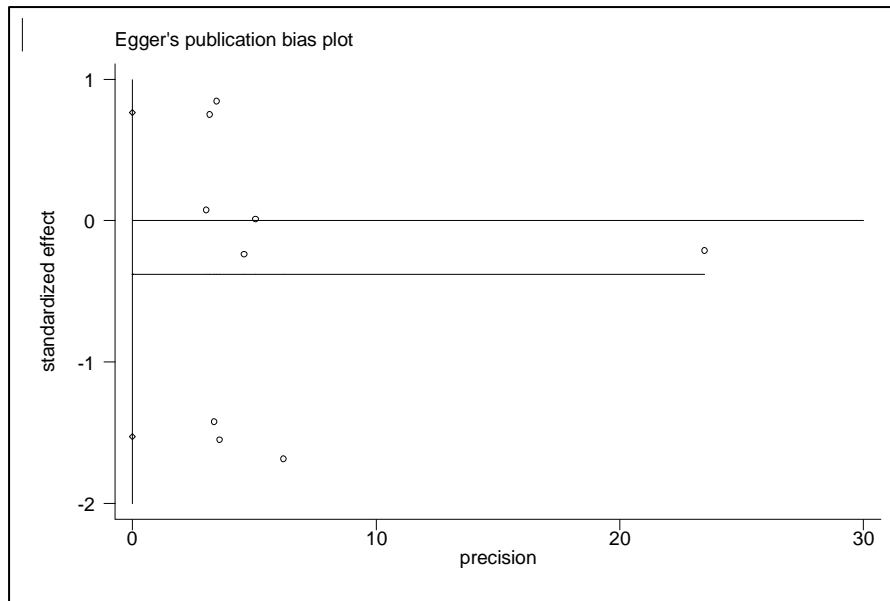
Για τον εντοπισμό σφάλματος δημοσίευσης (publication bias) χρησιμοποιήθηκε η εντολή *metabias* με παράμετρο «*gr(b)*» για τον έλεγχο του Begg και παράμετρο «*gr(e)*» για τον έλεγχο του Egger, όπου παράγονται τα διαγράμματα του Begg και του Egger αντίστοιχα. Τέλος χρησιμοποιήθηκε ένας επιπλέον τρόπος με την μέθοδο της μετα-παλινδρόμησης με την εντολή *metareg*.

- *metabias odr std,gr(b)*
- *metabias odr std,gr(e)*
- *metareg odr std, level(95) wsse(std)*

όπου *odr* το odds ratio και *std* το σφάλμα δημοσίευσης.



Εικόνα 7: Το funnel plot για τον έλεγχο του Begg που παράγεται από την εντολή *metabias odr std,gr(b)*. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται το  $\log(\text{odds ratio})$  ενώ στον οριζόντιο το *standard error*. Μια ομοιόμορφη κατανομή των μελετών στο γράφημα δείχνει την απουσία σφάλματος δημοσίευσης.



Εικόνα 8: Το γράφημα για τον έλεγχο του Egger που παράγεται από την εντολή `metabias odr std,gr(e)`.

### Αθροιστική μετα-ανάλυση

Η πραγματοποίηση αθροιστικής μετα-ανάλυσης γίνεται προσθέτοντας διαδοχικά μια μια μελέτη με σκοπό την παρατήρηση της συνεισφοράς κάθε μελέτης στο τελικό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιήθηκε η εξής εντολή:

- `metacum odr std, eff(r)gr xlab(0.5,1,1.5) id(AUTHOR) eform`

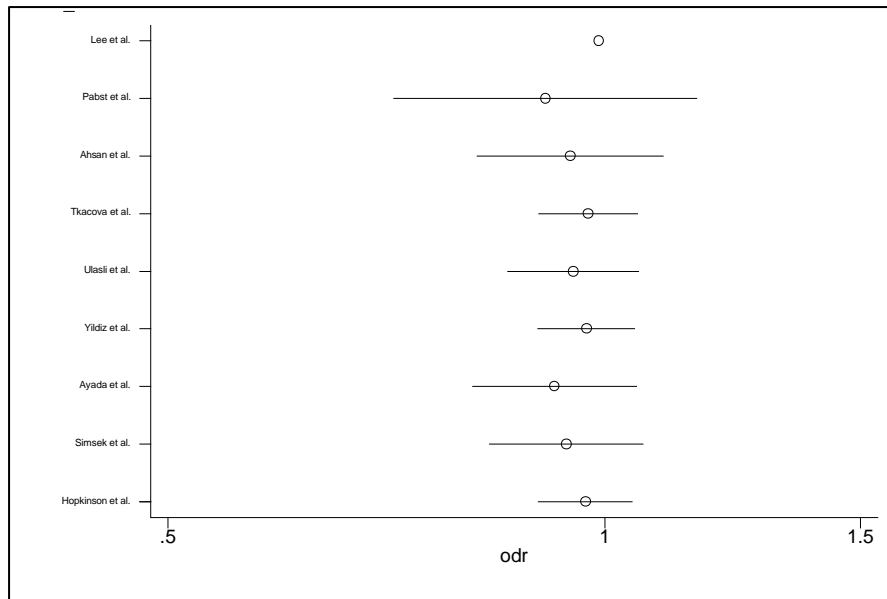
Όπου odr το odds ratio, std το σφάλμα δημοσίευσης, eff(r)gr η παράμετρος, η οποία καθορίζει το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων και το id(AUTHOR) η παράμετρος που ταξινομεί την κάθε μελέτη συμφωνά με τον συγγραφέα της στο διάγραμμα.

Η αθροιστική μετα-ανάλυση που αφαιρεί τη πρώτη μελέτη και δρα συμπληρωματικά της εντολής «metacum» είναι η ακόλουθη:

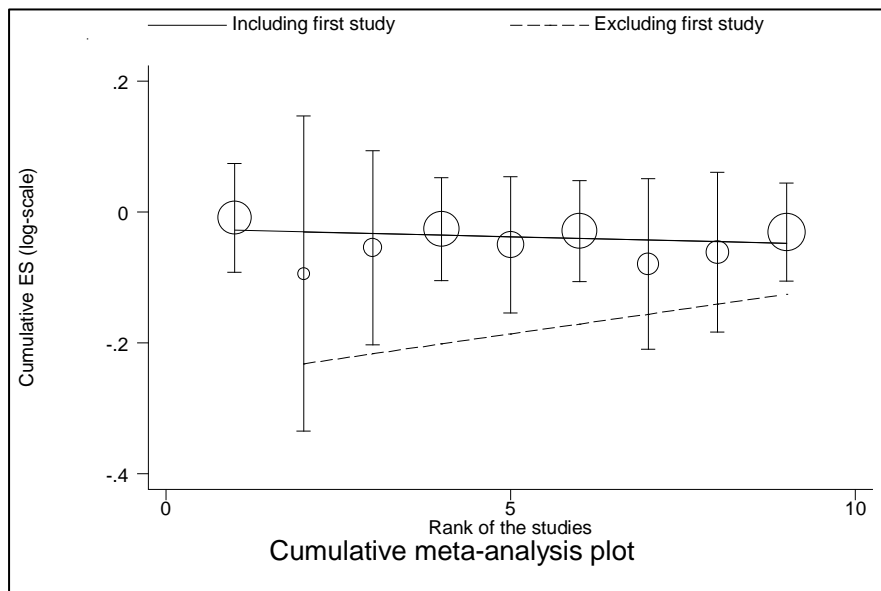
- `metatrend odr std`

όπου odr το odds ratio και std το σφάλμα δημοσίευσης.





Εικόνα 9: Το γράφημα που παράγεται από την εντολή *metacum*.



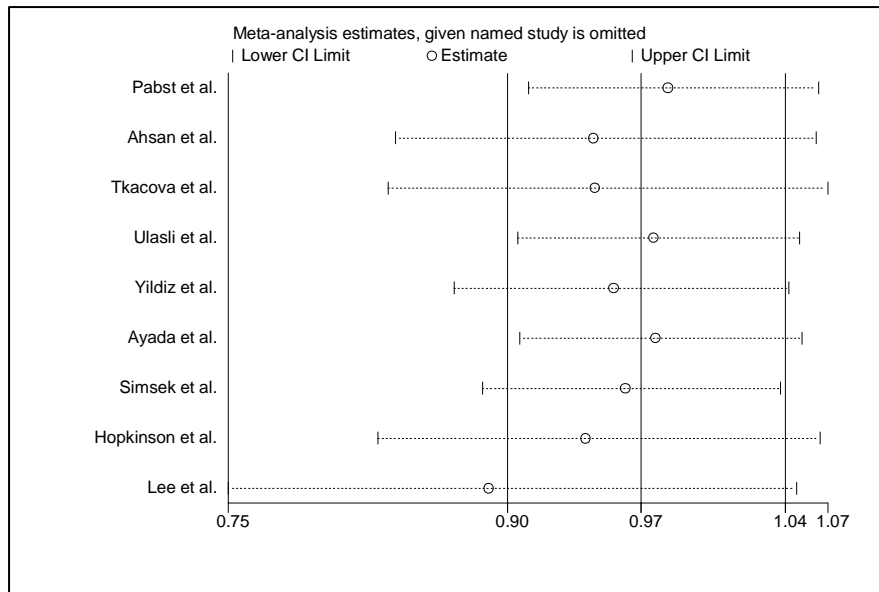
Εικόνα 10: Το γράφημα που παράγεται από την εντολή *metatrend*.

## Αφαιρετική μέτα-ανάλυση

Στην αφαιρετική μέτα-ανάλυση γίνεται μέτα-ανάλυση αλλά κάθε φορά απομακρύνεται μία μελέτη. Αυτή η μέθοδος είναι ικανή να εντοπίσει τυχόν μελέτες που όταν συμπεριλαμβάνονται αλλάζουν δραματικά το συνολικό αποτέλεσμα.

- *metaninf odr std, random eform label(namevar= AUTHOR)*

Όπου odr το odds ratio, std το σφάλμα δημοσίευσης, random η παράμετρος η οποία καθορίζει το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων και το label (namevar=AUTHOR) η παράμετρος που ταξινομεί την κάθε μελέτη σύμφωνα με το συγγραφέα της στο διάγραμμα.



Εικόνα 11: Το γράφημα που προκύπτει με την εκτέλεση της εντολής *metaninf*. Στα αριστερά φαίνεται ο συγγραφέας της κάθε μελέτης που αφαιρείται από το συνολικό odds ratio και προκύπτει η τιμή που δείχνει κάθε κύκλος. Η μεσαία κάθετος αντιπροσωπεύει το συνολικό odds ratio και οι δυο κάθετες γραμμές (αριστερά και δεξιά) το συνολικό διάστημα εμπιστοσύνης.

## Ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE)

Ο νόμος Hardy-Weinberg ερμήνευσε τα αίτια της σταθερότητας των γονιδιακών συχνοτήτων σε βάθος χρόνου σε έναν πληθυσμό εφαρμόζοντας το διωνυμικό θεώρημα. Υποθέτοντας ότι η συχνότητα του ενός αλληλομόρφου (A) στον πληθυσμό είναι  $p$  και η συχνότητα του άλλου αλληλομόρφου (a) είναι  $q$  τότε εφαρμόζοντας το διωνυμικό θεώρημα προκύπτει ότι  $p^2+2pq+q^2=1$ . Ταυτίζοντας το αποτέλεσμα του διωνυμικού αποτελέσματος με τους γονοτύπους στους πληθυσμούς συμπεραίνουμε ότι  $AA=p^2$ ,  $Aa=2pq$ ,  $aa=q^2$ . Υπάρχουν όμως ορισμένοι παράγοντες που διαφοροποιούν τις γονιδιακές συχνότητες με αποτέλεσμα η ισορροπία Hardy-Weinberg να μην ισχύει. Για να ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg απαραίτητο είναι:

1. Το πλήθος των ατόμων στους πληθυσμούς να είναι μεγάλο.
2. Οι συζεύξεις που πραγματοποιούνται να είναι τυχαίες και να τηρούν κάποια κριτήρια (όχι σε υποπληθυσμούς π. χ. κωφοί ή αιμομιξία).
3. Δεν πρέπει να υπάρχει επιλογή αλληλομόρφων
4. Τα αλληλόμορφα πρέπει να μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην άλλη χωρίς την δημιουργία κάποιου νέου (μετάλλαξη γονιδίων) .
5. Τα αλληλόμορφα πρέπει να μεταβιβάζονται χωρίς να απομακρύνεται κάποιο (μετανάστευση γονιδίων).

Ο έλεγχος της ισορροπίας πραγματοποιείται για κάθε μελέτη ξεχωριστά με την εντολή.

- *genhwi DDControls IDControls IIControls*

όπου DDControls, IDControls, IIControls οι αντίστοιχες μεταβλητές για κάθε γονότυπο των υγιών ατόμων.

### Πολυμεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης (Bivariate meta-analysis)

Η πραγματοποίηση της μονομεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης έγινε για να εκτιμηθεί η ύπαρξη συσχέτισης ή μη του πολυμορφισμού ACE I/D, με τις νόσους της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Για τον προσδιορισμό όμως του τρόπου κληρονομικότητας του γονιδίου απαιτείται η πραγματοποίηση της πολυμεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης. Με την μέθοδο αυτή μπορεί να εκτιμηθεί ο τρόπος κληρονομικότητας του γονιδίου αλλά ταυτόχρονα και οι τιμές odds ratio. Για τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας, δηλαδή την σύγκριση του γονότυπου DI έναντι του γονότυπου II ο τύπος του odds ratio διαμορφώνεται ως εξής:

$$b_1 = y_{1i} = \log OR = \left( \frac{ID_1 * II_0}{ID_0 * II_1} \right)$$

Για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, δηλαδή την σύγκριση του γονότυπου II έναντι του γονότυπου DD το odds ratio είναι:

$$b_2 = y_{2i} = \log OR = \left( \frac{DD_1 * II_0}{DD_0 * II_1} \right)$$

Η συνδιακύμανση των δύο odds ratio δίνεται από τον τύπο:

$$Cov(y_{1i}, y_{2i}) = \frac{1}{II_0} + \frac{1}{II_1}$$

Όπου ο δείκτης 1 αντιστοιχεί στο πλήθος των ασθενών, ενώ το 0 στο πλήθος των υγιών ατόμων με αντίστοιχους γονότυπους.

Ο λόγος  $b_1$  προς  $b_2$  ονομάζεται  $\lambda$  (λάμδα) και αποτελεί τον εκτιμητή του γενετικού τρόπου κληρονομικότητας. Εάν το  $\lambda$  προσεγγίζει την μονάδα τότε πιθανόν ισχύει ο επικρατής τρόπος κληρονομικότητας, αν το  $\lambda$  είναι μικρότερο της μονάδας ( $b_2 > b_1$ ) τότε ο τρόπος πιθανότατα είναι συνεπικρατής. Τέλος, για  $\lambda$  που προσεγγίζει το μηδέν είναι πιθανό να πρόκειται για υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας [33].

Οι υπολογισμοί της πολυμεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης γίνονται με την βοήθεια των ακολουθιών εντολών του στατιστικού πακέτου Stata όπου οι δυο εντολές για τον υπολογισμό των odds ratio είναι:

- **gen b1=log( (DDpatients/ Ipatients)/( IDControls/ IIControls ) )**
- **gen b2=log(( DDpatients / Ipatients )/( DDControls / IIControls ))**

Οι εντολές για το υπολογισμό των δυο διακυμάνσεων είναι:

- **gen V11=1/ IIControls+ 1/ IDControls+ 1/ Ipatients+ 1/ IDpatients**
- **gen V22=1/ IIControls+ 1/ Ipatients+ 1/ DDControls+ 1/ DDpatients**

Η εντολή για το υπολογισμό της συνδιακύμανσης είναι:

- $gen\ V12=1/IIControls+1/IIpatients$

Η εντολή για πραγματοποίηση της πολύ-μεταβλητής μετα-ανάλυσης είναι:

- $mymeta\ b\ V,\ vars(b1\ b2)$

Η ανάκτηση του πίνακα συνδιακύμανσης γίνεται με την εντολή:

- $matrix\ v=e(V)$

Ο υπολογισμός του  $\lambda$  εμφανίζεται με την εντολή:

- $di\_b[b1]/\_b[b2]$

### Μέθοδος στατιστικής ανάλυσης GVAR (Genome Wide Association Robust Analysis)

Η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης GVAR χρησιμοποιείται για την διεξαγωγή ισχυρής (robust) ανάλυσης και εύρεσης του τρόπου κληρονομικότητας σε μελέτες γενετικής συσχέτισης (GAS: genetic association studies, GWAS: genome-wide association studies). Η ανάλυση των μελετών πραγματοποιείται με την χρήση του Cochran-Armitage trend test (CATT) χρησιμοποιώντας τον εκάστοτε γενετικό τρόπο κληρονομικότητας. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διεξαγωγή ισχυρής (robust) μετα-ανάλυσης σε περιπτώσεις που ο τρόπος κληρονομικότητας δεν είναι γνωστός. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν τρεις διαθέσιμες μέθοδοι: MAX (maximum), MIN2 (minimum) και MERT (maximum efficiency robust test) από τις οποίες θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος MAX [34].

Πίνακας 10: Κατανομή γονοτύπων σε υγιείς και ασθενείς.

	II	ID	DD	Σύνολο
Ασθενείς	r <sub>0</sub>	r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>	r
Υγιείς	s <sub>0</sub>	s <sub>1</sub>	s <sub>2</sub>	s
Σύνολο	n <sub>0</sub>	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n

### CATT τεστ

Το CATT χρησιμοποιείται στην ανάλυση δεδομένων όπου στόχος είναι η εκτίμηση της παρουσίας συσχέτισης μιας μεταβλητής με δύο κατηγορίες και μιας μεταβλητής με κ κατηγορίες. Είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στατιστικό τεστ και μπορεί να πραγματοποιηθεί για όλους τους τρόπους κληρονομικότητας (επικρατής, υπολειπόμενος, συνεπικρατής) σε μελέτες με δεδομένα υγιών και ασθενών. Ο τύπος του Z-test διαμορφώνεται ως εξής:

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

Όπου  $U_x$  το στατιστικό σκορ και  $var_{H_0}(U_x)$  η διακύμανση του με βάση το  $H_0$ . Το τεστ για την γραμμική τάση των γονοτύπων του πίνακα 10 εκφράζεται ως  $x_i=(x_0, x_1, x_2)$  για τους γονότυπους II, ID και DD αντίστοιχα. Για  $x_i=(0, 1/2, 1)$  ελέγχεται ο συνεπικρατής τρόπος κληρονομικότητας με  $Z_{CATT(1/2)}$ , για  $x_i=(0, 1, 1)$  ο επικρατής τρόπος κληρονομικότητας με  $Z_{CATT(1)}$  και για  $x_i=(0, 0, 1)$  ο υπολειπόμενος τρόπος με  $Z_{CATT(0)}$  [34].

### MAX τεστ

Η ιδέα του MAX τεστ βασίζεται στην δοκιμή και των τριών πιθανών τρόπων κληρονομικότητας και στην επιλογή του μεγαλύτερου σκορ. Ο τύπος του Z είναι ο εξής:

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

Για την πραγματοποίηση των δύο παραπάνω αναλύσεων ( $CATT_{(1/2)}$ ,  $CATT_{(1)}$ ,  $CATT_{(0)}$ , MAX) χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εντολές αντίστοιχα στο στατιστικό πακέτο Stata:

- *gwar IIControls IDControls DDControls Hpatients IDpatients DDpatients, snp(snp) method(add) effect(r),*

έλεγχος συνεπικρατούς τρόπου κληρονομικότητας με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων

- *gwar IIControls IDControls DDControls Hpatients IDpatients DDpatients, snp(snp) method(add) effect(f),*

έλεγχος συνεπικρατούς τρόπου κληρονομικότητας με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων

- *gwar IIControls IDControls DDControls Hpatients IDpatients DDpatients, snp(snp) method(dom) effect(r),*

έλεγχος επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων

- *gwar IIControls IDControls DDControls Hpatients IDpatients DDpatients, snp(snp) method(rec) effect(r),*

έλεγχος υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων

- *gwar IIControls IDControls DDControls Hpatients IDpatients DDpatients, snp(snp) method(max) effect(r),*

χρήση max τεστ.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

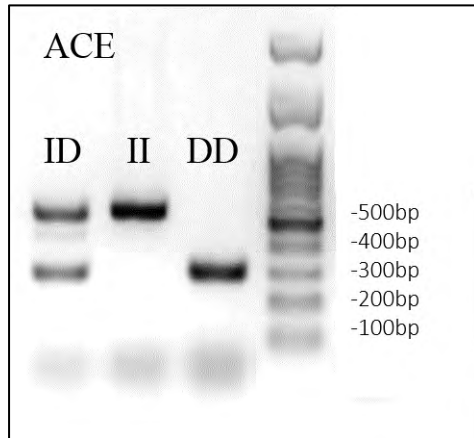
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ





### 3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ

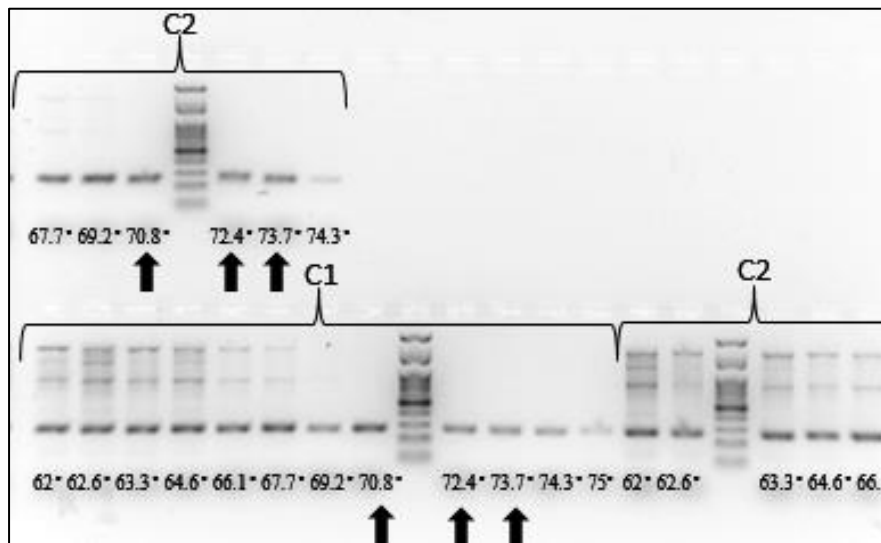
Ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE αναλύθηκε με την χρήση της τεχνικής PCR. Η αντίδραση παράγει ένα τμήμα 319 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στον γονότυπο D και ένα τμήμα 597 ζευγών βάσεων που αντιστοιχεί στον γονότυπο I (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Οι πιθανές εικόνες ύστερα από την εκτέλεση και οπτικοποίηση της PCR για τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου ACE.

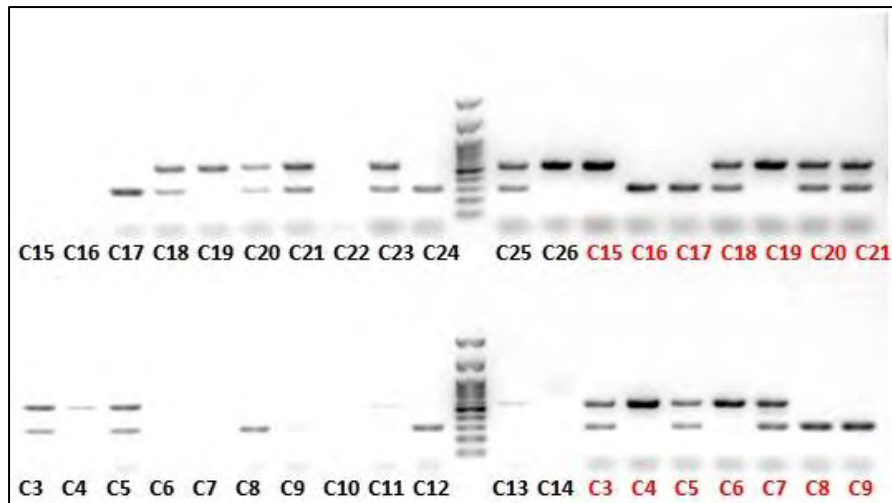
Ο προσδιορισμός γονοτύπων έγινε σε δυο στάδια με PCR. Στο πρώτο στάδιο όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR με το πρώτο σετ εκκινητών. Η επιλογή βέλτιστων συνθηκών της αντίδρασης απαιτεί διεξαγωγή gradient PCR για την εύρεση της κατάλληλης θερμοκρασίας σε κάθε ένα από τα δύο στάδια αντιδράσεων.

Στο πρώτο στάδιο διεξήχθη gradient PCR το οποίο έδειξε ότι στις θερμοκρασίες 70.8°, 72.4°, 73.7° C έχουμε τα πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα. Τελικά, επιλέχθηκε ως ιδανική θερμοκρασία για την συνέχεια των πειραμάτων μας T=72°C. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαία τα δύο πρώτα δείγματα υγιών ατόμων (C1, C2).

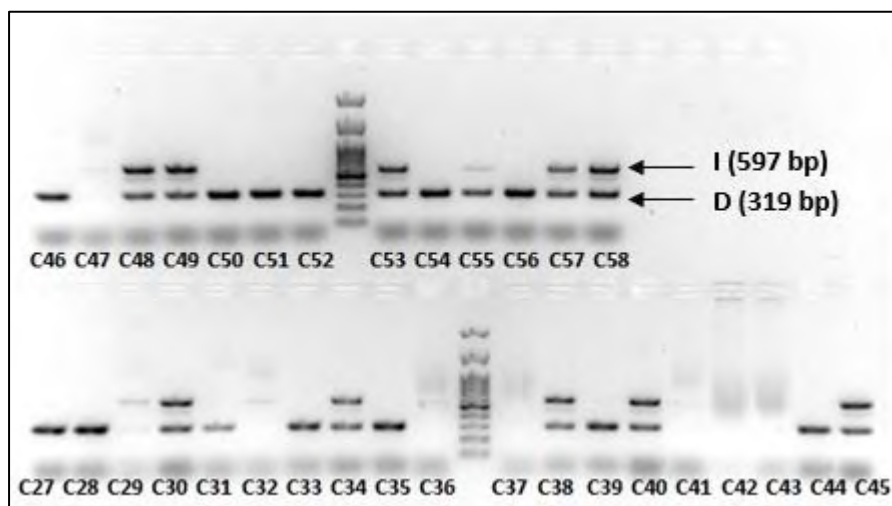


Εικόνα 13: Gradient PCR για τους γονότυπους C1 και C2 σε 12 διαφορετικές θερμοκρασίες.

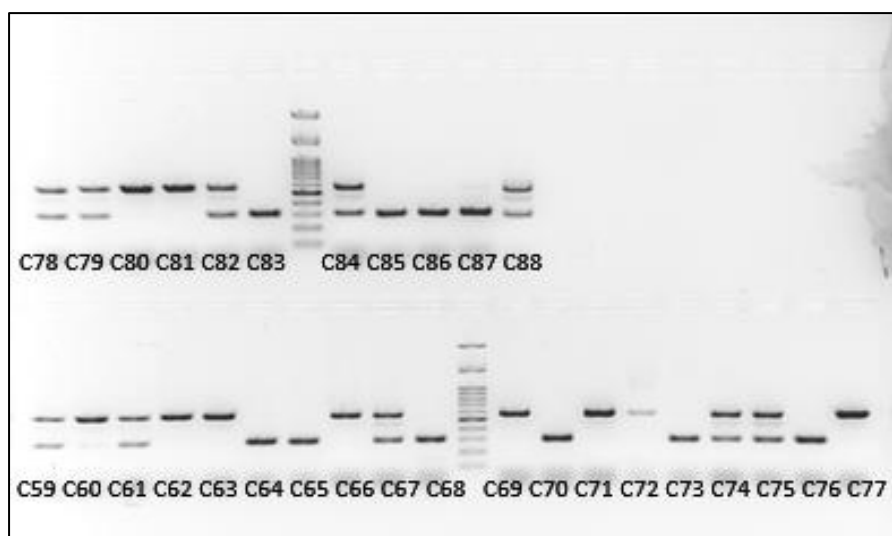
Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την εξακρίβωση των γονοτύπων όλων των υπόλοιπων διαθέσιμων δειγμάτων.



Εικόνα 14: Αντίδραση PCR για τα δείγματα C3 έως C26. Στα δεξιά φαίνονται δείγματα που υποβλήθηκαν σε επαναληπτική PCR. Το γράμμα 'C' αντιπροσωπεύει την λέξη Controls.

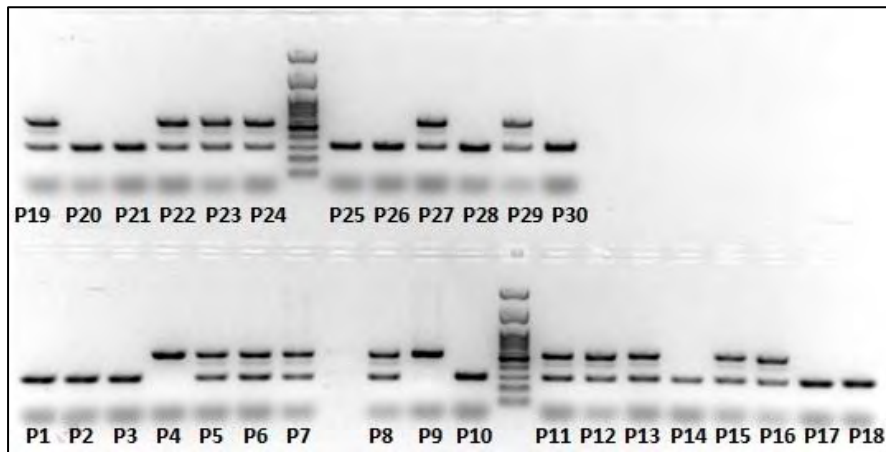


Εικόνα 15 Αντίδραση PCR για τα δείγματα υγιών ατόμων από C27 έως C58.

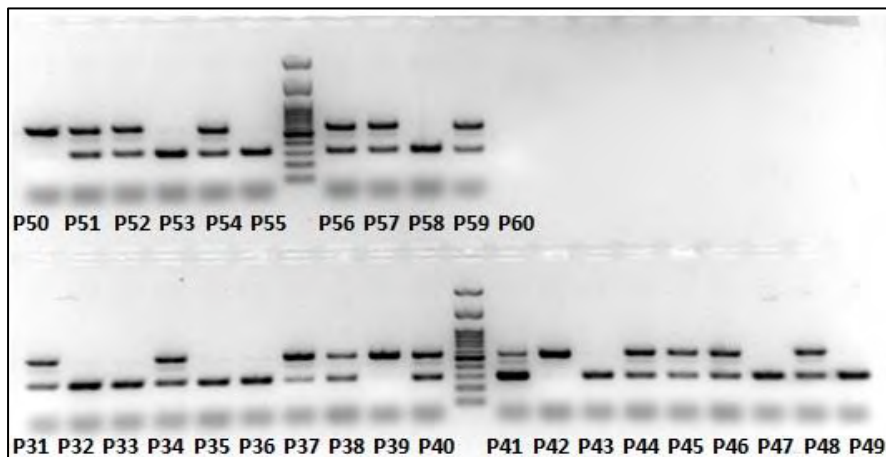


Εικόνα 16: Αντίδραση PCR για τα δείγματα υγιών ατόμων από C59 έως C88.

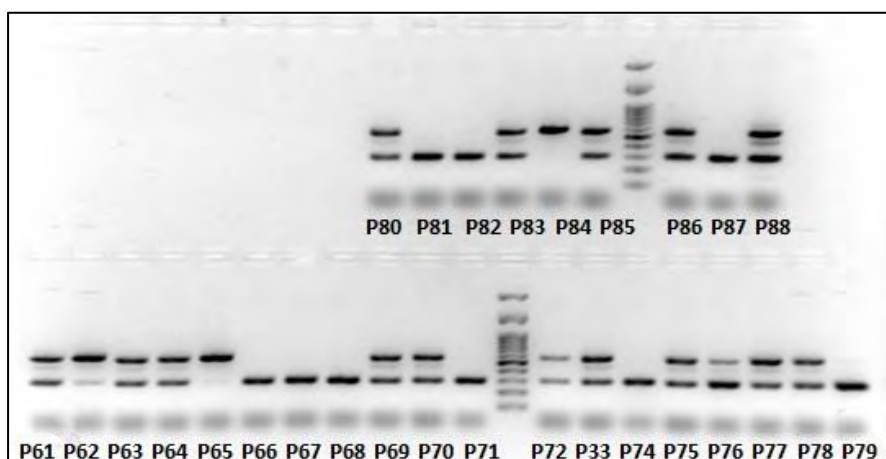
Αφού ολοκληρώθηκαν όλα τα δείγματα υγιών ατόμων συνεχίστηκαν οι αντιδράσεις PCR για τα δείγματα ασθενών.



Εικόνα 17: Αντίδραση PCR για τα δείγματα ασθενών από P1 έως P30. Το γράμμα 'P' αντιπροσωπεύει την λέξη Patients.



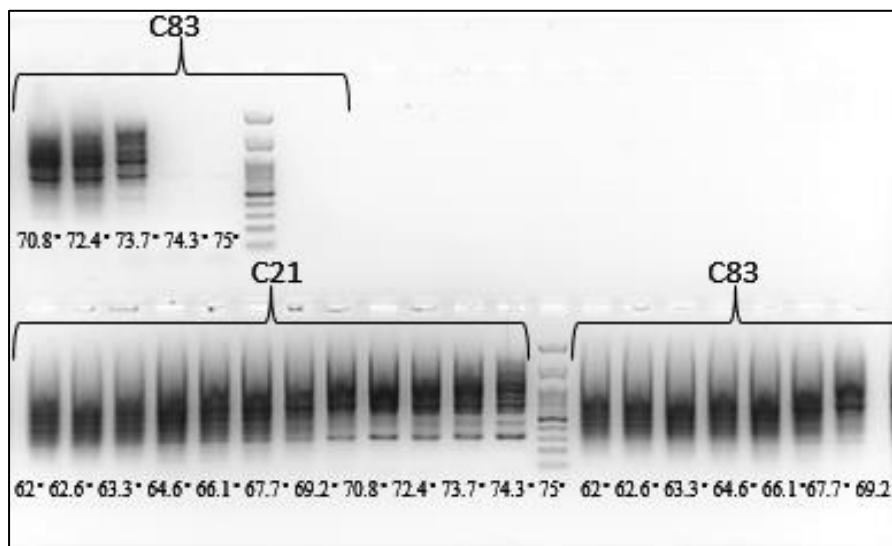
Εικόνα 18: Αντίδραση PCR για τα δείγματα ασθενών P31 έως P60.



Εικόνα 19: Αντίδραση PCR για τα δείγματα ασθενών από P61 έως P88.

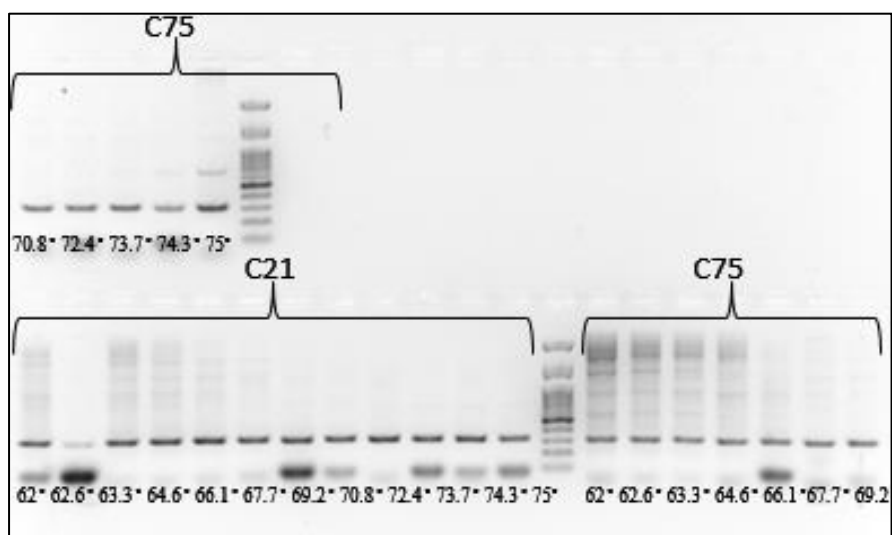
Όσα δείγματα δεν έδωσαν ξεκάθαρη εικόνα εξεταστήκαν σε επαναληπτική PCR.

Σε δεύτερο στάδιο σε PCR υποβλήθηκαν μόνο τα δείγματα που είχαν βρεθεί με γονότυπο DD επειδή για ετερόζυγα άτομα η αντίδραση επιλεκτικά ενισχύει το D αλληλόμορφο καθώς είναι μικρότερο [29]. Η πρώτη δοκιμή με την χρήση της KAPA HiFi πολυμεράσης δεν έδωσε ξεκάθαρα αποτελέσματα. Τα δείγματα C83 και C21 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα έλεγχου επειδή το C83 στην πρώτη PCR έδωσε γονότυπο DD ενώ το C21 γονότυπο ID.



Εικόνα 20: Gradient PCR για τα δείγματα C21 και C83. Τα αποτελέσματα όπως φαίνεται δεν είναι ξεκάθαρα με τη χρήση της KAPA HiFi DNA πολυμεράσης.

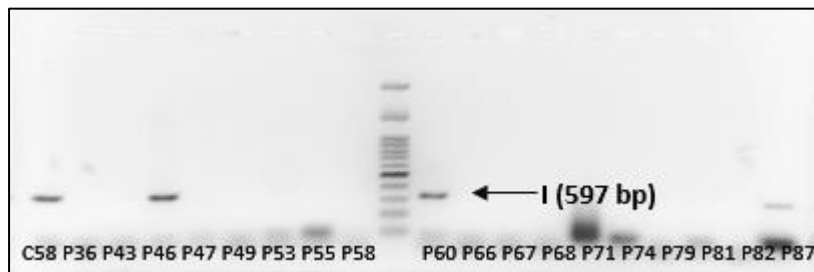
Έγινε δεύτερη gradient PCR αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας την KAPA Taq DNA KR0352 πολυμεράσης και επιλέχθηκε ως καταλληλότερη θερμοκρασία η  $T=73^{\circ}\text{C}$ . Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου τα δείγματα C21, C75 με γονότυπο ID.



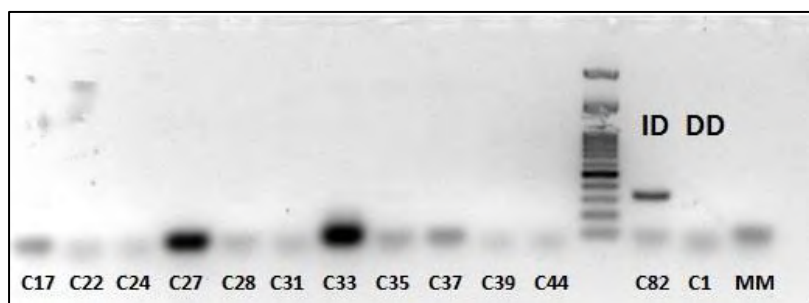
Εικόνα 21: Δεύτερη gradient PCR για τα δείγματα C21 και C75 με την πολυμεράση KAPA Taq DNA KR0352 σε 12 διαφορετικές θερμοκρασίες.

Έγιναν επιπλέον δοκιμές με δυο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα Buffer A και B καθώς και DMSO (Dimethylsulfoxide) με στόχο την επίτευξη ξεκάθαρων και έντονων ζωνών στη γέλη αγαρόζης. Τελικά επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα A ενώ

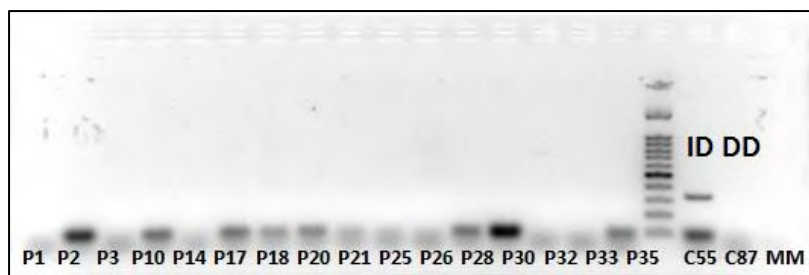
η χρήση DMSO δεν βελτίωσε την εικόνα οπότε και δεν χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα πειράματα (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα της 2<sup>ης</sup> αντίδρασης PCR φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα τις δεύτερης αντίδρασης PCR με ετερόζυγα δείγματα ελέγχου τα P46, P60.



Εικόνα 23: Αντίδραση PCR για τα επόμενα δείγματα με γονότυπο DD. Τα δείγματα C82 και C1 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Ενώ το τελευταίο δείγμα αντιστοιχεί στο Master Mix (MM).



Εικόνα 24: Αντίδραση PCR για τα επόμενα δείγματα με γονότυπο DD. Τα δείγματα C55, C87 και MM χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου.

Τα τελικά αποτελέσματα όλων των γονότυπων φαίνονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11: Αποτελέσματα των γονοτύπων όλων των δειγμάτων.**

Controls	Genotype	Controls	Genotype	Patients	Genotype	Patients	Genotype
C1	DD	C45	ID	P1	DD	P45	ID
C2	DD	C46	DD	P2	DD	P46	ID
C3	ID	C47	ID	P3	DD	P47	DD
C4	II	C48	ID	P4	II	P48	ID
C5	ID	C49	ID	P5	ID	P49	DD
C6	II	C50	DD	P6	ID	P50	II
C7	ID	C51	DD	P7	ID	P51	ID
C8	DD	C52	DD	P8	ID	P52	ID
C9	DD	C53	ID	P9	II	P53	DD
C10	II	C54	DD	P10	DD	P54	ID
C11	ID	C55	ID	P11	ID	P55	DD
C12	DD	C56	DD	P12	ID	P56	ID
C13	II	C57	ID	P13	ID	P57	ID
C14	ID	C58	ID	P14	DD	P58	DD
C15	II	C59	ID	P15	ID	P59	ID
C16	DD	C60	II	P16	ID	P60	ID
C17	DD	C61	ID	P17	DD	P61	ID
C18	ID	C62	II	P18	DD	P62	ID
C19	II	C63	II	P19	ID	P63	ID
C20	ID	C64	DD	P20	DD	P64	ID
C21	ID	C65	DD	P21	DD	P65	II
C22	DD	C66	II	P22	ID	P66	DD
C23	ID	C67	ID	P23	ID	P67	DD
C24	DD	C68	DD	P24	ID	P68	DD
C25	ID	C69	II	P25	DD	P69	ID
C26	II	C70	DD	P26	DD	P70	ID
C27	DD	C71	II	P27	ID	P71	DD
C28	DD	C72	II	P28	DD	P72	ID
C29	ID	C73	DD	P29	ID	P73	ID
C30	ID	C74	ID	P30	DD	P74	DD
C31	DD	C75	ID	P31	ID	P75	ID
C32	II	C76	DD	P32	DD	P76	ID
C33	DD	C77	II	P33	DD	P77	ID
C34	ID	C78	ID	P34	ID	P78	ID
C35	DD	C79	ID	P35	DD	P79	DD
C36	II	C80	II	P36	DD	P80	ID
C37	DD	C81	II	P37	ID	P81	DD
C38	ID	C82	ID	P38	ID	P82	DD
C39	DD	C83	DD	P39	II	P83	ID
C40	ID	C84	ID	P40	ID	P84	II
C41	ID	C85	DD	P41	ID	P85	ID
C42	ID	C86	DD	P42	II	P86	ID
C43	ID	C87	DD	P43	DD	P87	ID
C44	DD	C88	ID	P44	ID	P88	ID

Συγκεντρωτικά βρεθήκαν 64 αλληλόμορφα I στους ασθενείς και 74 στους υγιείς και 112 αλληλόμορφα D στους ασθενείς ενώ 102 στους υγιείς.

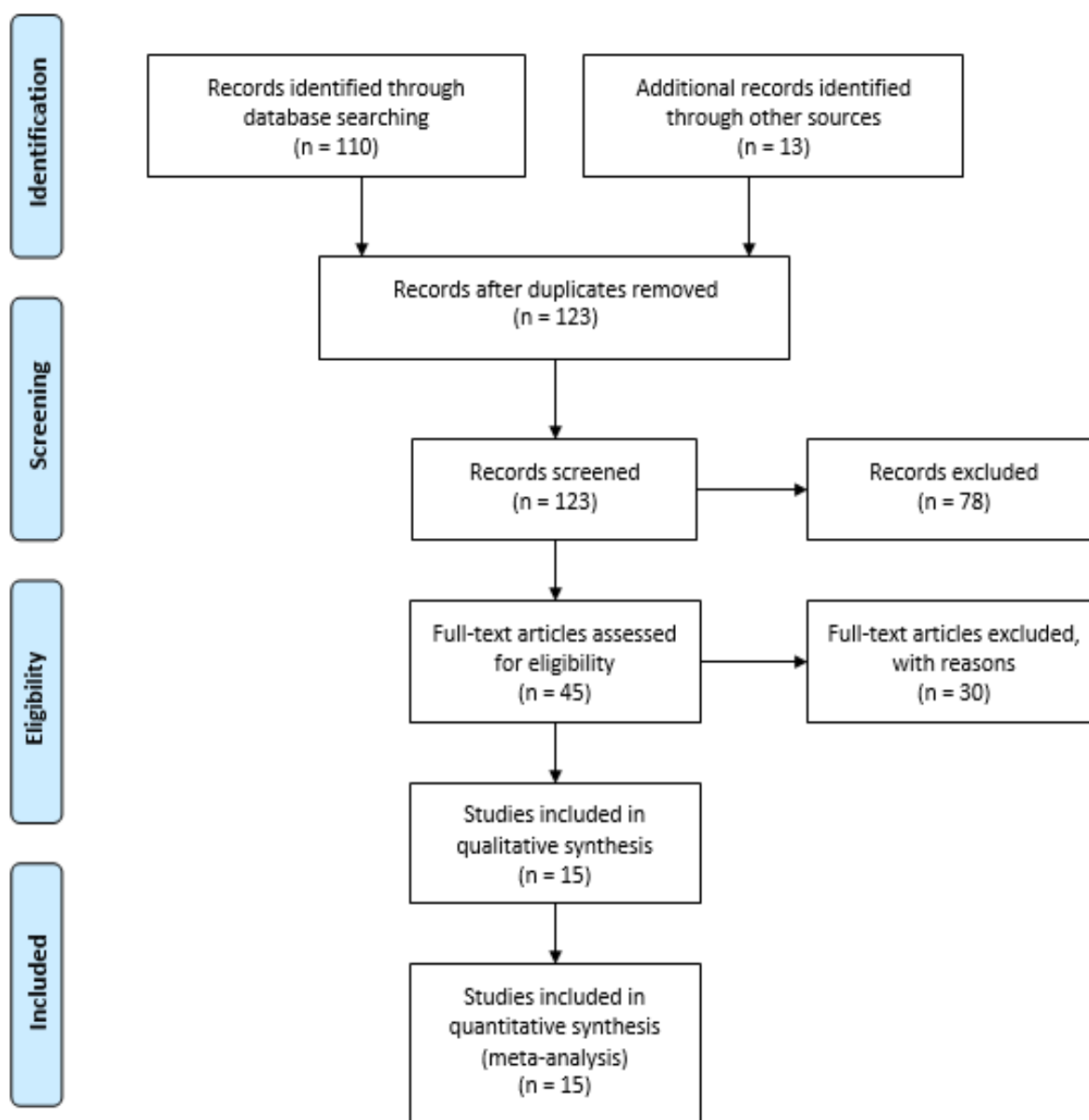
Όλα τα αποτελέσματα φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 12).

<b>Πίνακας 12 : Γονότυποι ασθενών-υγιών της μελέτης.</b>		
	<b>Patients</b>	<b>Controls</b>
<b>Genotype</b>		
<b>II</b>	7	19
<b>ID</b>	50	36
<b>DD</b>	31	33
<b>Allele</b>		
<b>I</b>	64	74
<b>D</b>	112	102

## 3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### 3.2.1 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ

Για την μετα-ανάλυση συγκεντρώθηκαν συνολικά 45 μελέτες, συμπεριλαμβανόμενης και της παρούσας μελέτης από τις οποίες 15 χρησιμοποιήθηκαν τελικά για μετα-ανάλυση. Οι μελέτες ομαδοποιήθηκαν ως εξής, άτομα που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), άτομα που πάσχουν από πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH) και τέλος άτομα με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και πνευμονική υπέρταση. Διεξήχθη μετα-ανάλυση για τις μελέτες υγιών-ασθενών ΧΑΠ και ξεχωριστή μετα-ανάλυση για τις μελέτες που είχαν μόνο ασθενείς μάρτυρες στις οποίες προστέθηκαν δεδομένα υγιών την ίδιας φυλής.



Εικόνα 25: Διάγραμμα ροής [33] (Πίνακας Παραρτήματος 4).



### 3.2.2 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (ΡΑΗ).

Η πρώτη μετα-ανάλυση αφορά τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου ACE για την ασθένεια της **πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (ΡΑΗ)**. Τα δεδομένα υγιών-ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης G<sub>W</sub>A<sub>R</sub> και πιο συγκεκριμένα τα τεστ CATT και MAX για τον έλεγχο ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ του γονιδίου ACE και της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης (ΡΑΗ). Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το τεστ CATT για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας με την χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων (Πίνακας 14). Οι μελέτες όμως παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 15), ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση με την χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων (Πίνακας 14). Το τεστ CATT δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τον έλεγχο του επικρατούς και του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης με το γονίδιο ACE έδειξε η παρούσα μελέτη με  $p=0,0107968$  κατά τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας με την μέθοδο CATT. Τέλος, το MAX τεστ έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης με τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου ACE με  $p=0,0026$ .

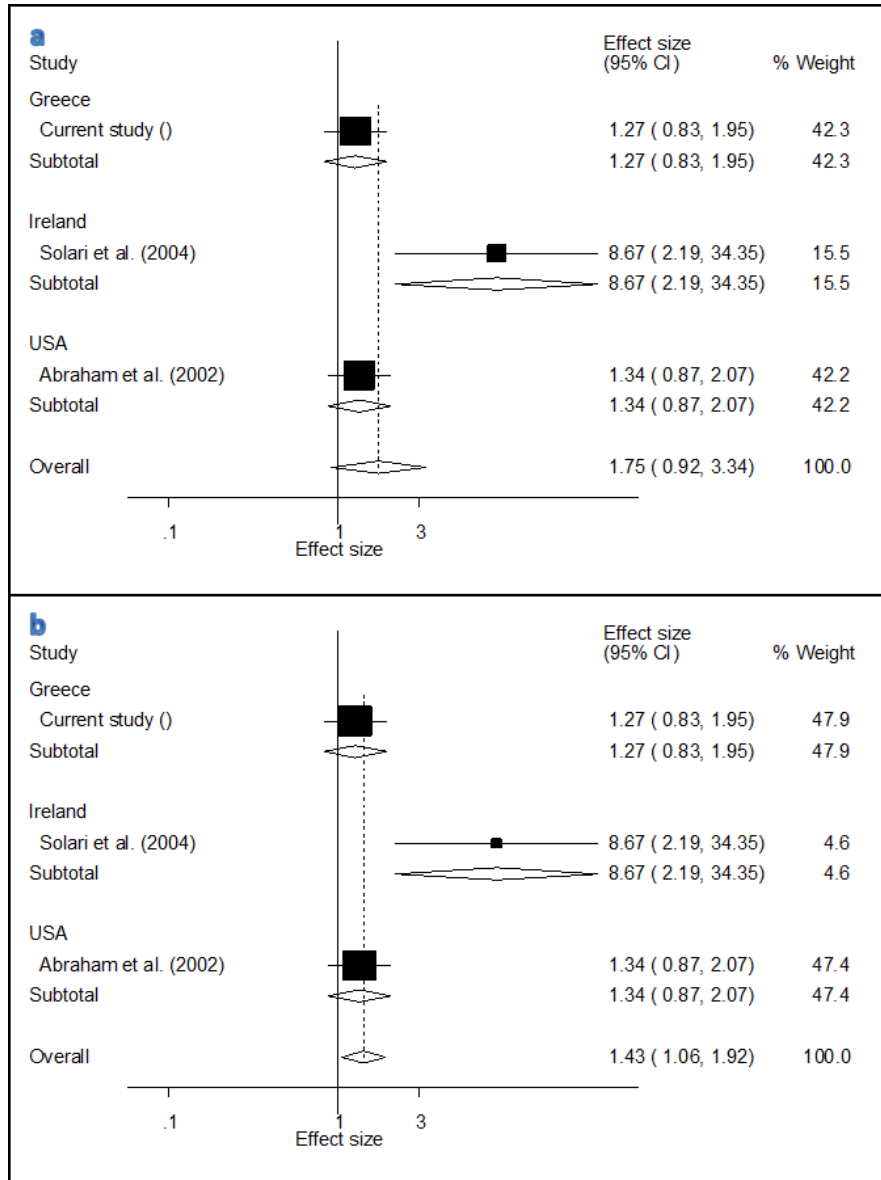
**Πίνακας 13: Μελέτες υγιών- ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH) που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη μετα-ανάλυση.**

AUTHOR	COUNTRY	RACE	DATE	CONTROLS	CASES	II Patients	ID Patients	DD Patients	II Controls	ID Controls	DD Controls
Abraham et al.[35]	Colorado, USA	Caucasian	2003	158	60	12	21	27	27	87	44
Solari et al.[36]	Dublin, Ireland	Caucasian	2004	9	13	2	2	9	5	3	1
Current Study	Greece	Caucasian	2016	88	88	7	50	31	19	36	33
<b>Total</b>				255	161	21	73	67	51	126	78

**Πίνακας 14: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης GVAR με τις μεθόδους CATT και MAX για την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (PAH).**

AUTHOR	COUNTRY	DATE	z1	z2	z3	Additive			Dominant		Recessive		MAX test	
						pz2	pz2_meta (random)	pz2_meta (fixed)	pz3	pz3_meta	pz1	pz1_meta	pmax	pmax_meta
Solari et al.[36]	Ireland	2004	2.6917	2.6102	1.9889	0.0090			0.0467		0.0071		0.0143	
Abraham et al.[35]	USA	2003	2.4136	1.3512	-0.5009	0.1766			0.6164		0.0158		0.0353	
Current study	Greece	2016	-0.3134	1.1057	2.5492	0.2689	0.0554	<b>0.0149</b>	<b>0.0108</b>	0.2002	0.7540	0.1528	<b>0.0246</b>	<b>0.0026</b>

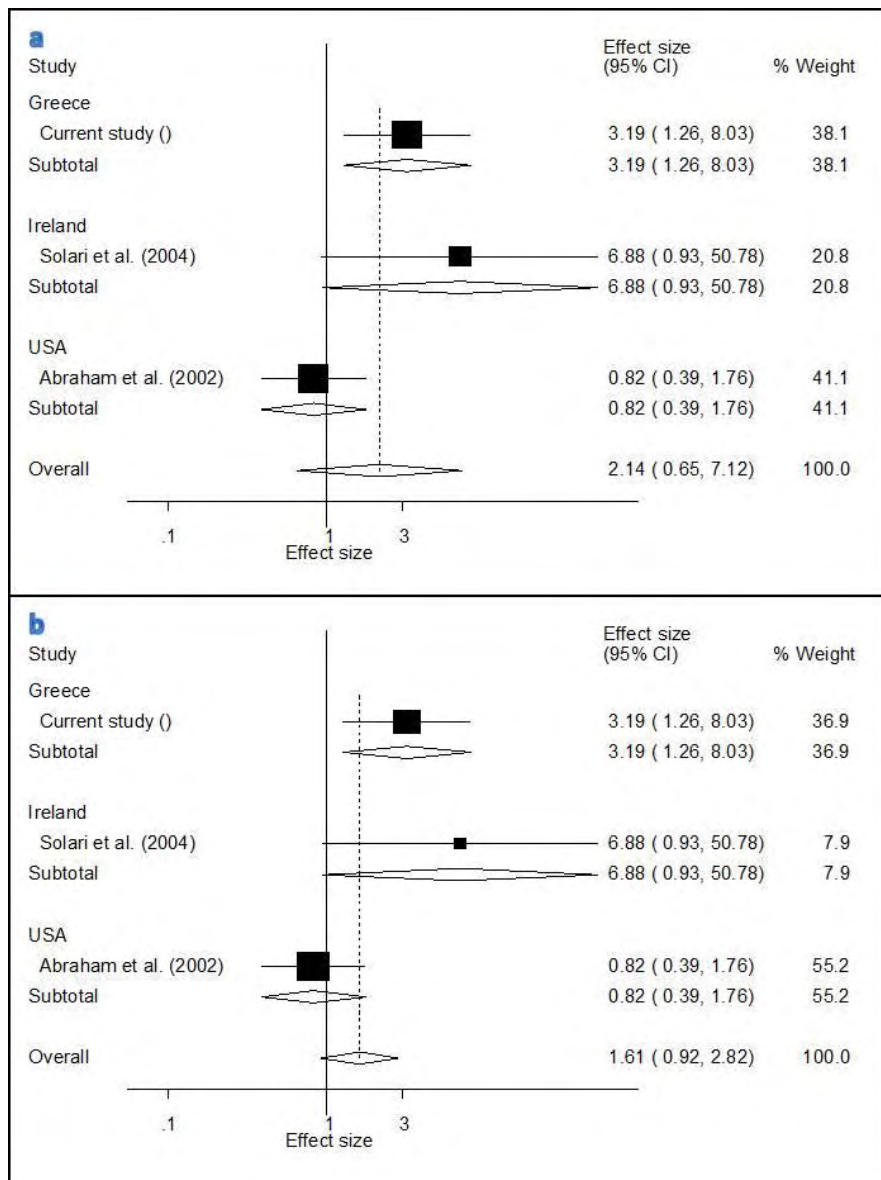
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D στην οποία βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με  $p=0.015$  και OR ίσο με 1.43 (95% CI: 1.06 1.92). Τα δεδομένα εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 15) επομένως λαμβάνουμε υπόψη τα αποτελέσματα από την χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, όπου δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με OR ίσο με 1.75 (95% CI: 0.92 3.34).



Εικόνα 26: Συσχέτιση του αλληλόμορφου D με την νόσο της πνευμονικής υπέρτασης. α) Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, β) Υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων.

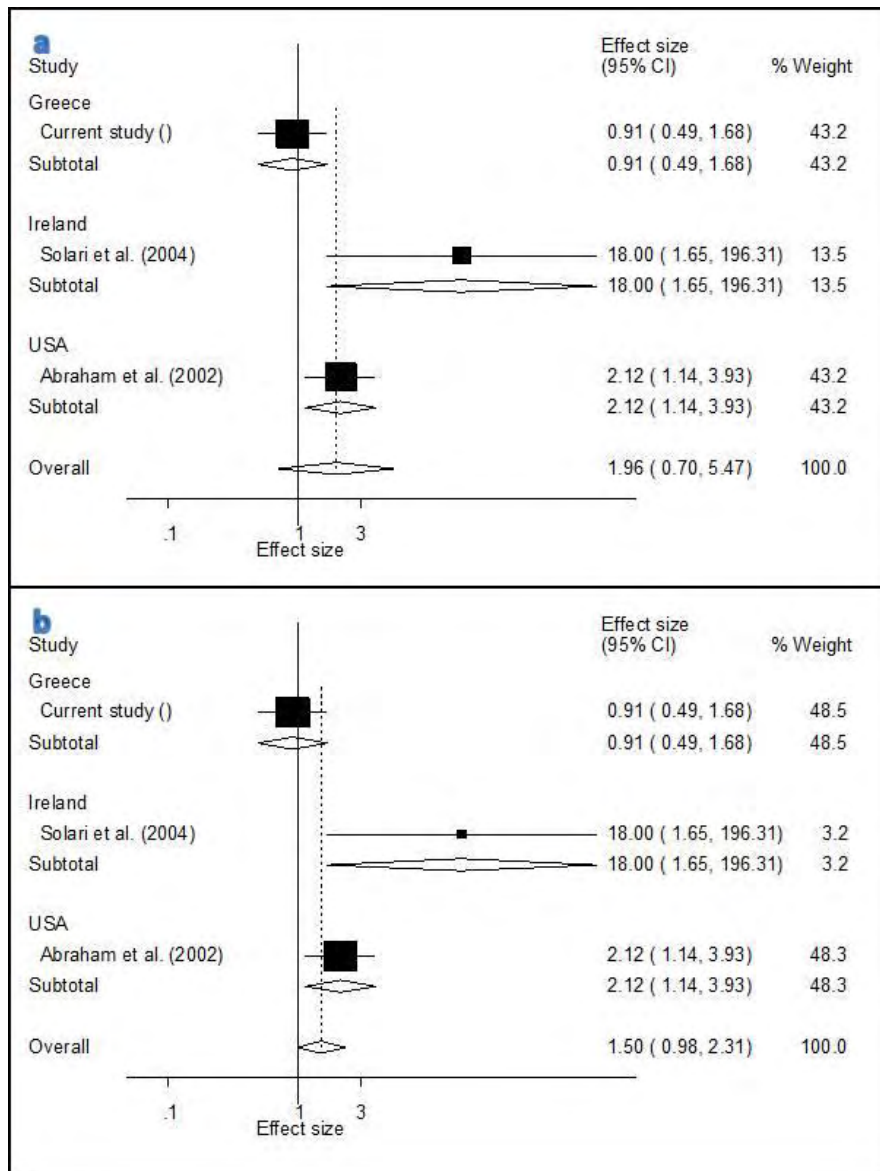
Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος για τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας για την σύγκριση των γονοτύπων ID+DD έναντι του γονότυπου II. Τα αποτελέσματα δεν έδωσαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων με OR ίσο με 2.14 (95% CI: 0.65 7.12) όσο και με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων με effect size ίσο με 1.61 (95% CI: 0.92 2.82). Παράλληλα, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του

αλληλόμορφου D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση στην παρούσα μελέτη με OR: 3.19 (95% CI: 1.26 8.03).



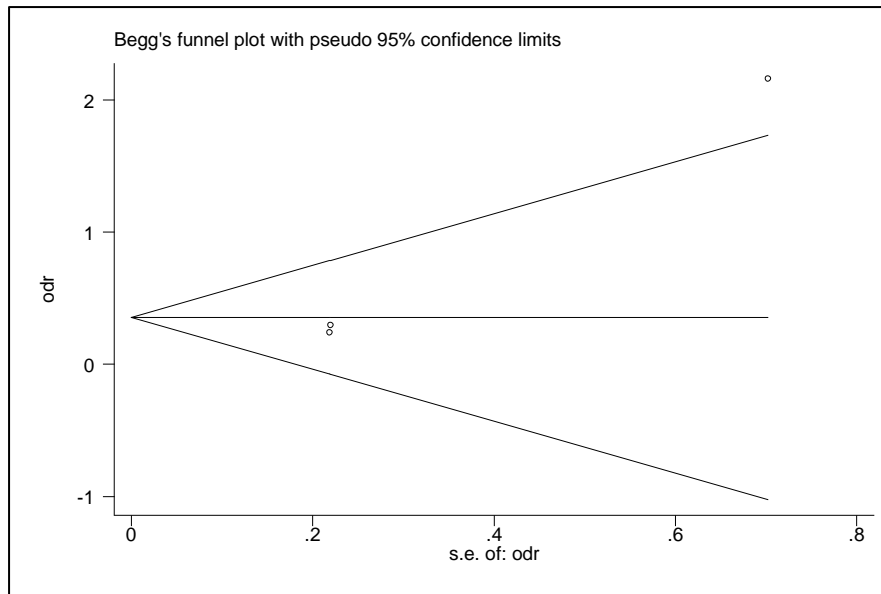
Εικόνα 27: Ο πολυμορφισμός D δεν συσχετίζεται με την πνευμονική υπέρταση κατά τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας (a: μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, b: μοντέλο σταθερών επιδράσεων).

Τέλος, έγινε έλεγχος για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας δηλαδή για την σύγκριση των γονοτύπων DD versus ID+II. Τα αποτελέσματα δεν έδωσαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων με OR ίσο με 1.96 (95% CI: 0.70 5.47) όσο και με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων με effect size ίσο με 1.50 (95% CI: 0.98 2.31) .



Εικόνα 28: Ο πολυμορφισμός D δεν συσχετίζεται με την πνευμονική υπέρταση κατά τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας (a: μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, b: μοντέλο σταθερών επιδράσεων).

Οι συγκρίσεις που έγιναν παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 15). Ο έλεγχος του σφάλματος δημοσίευσης τόσο με το τεστ του Begg όσο και με αυτό του Egger έδειξε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς τα p-value είναι μεγαλύτερα από το 0.05, εκτός από την περίπτωση της σύγκρισης των αλληλόμορφων όπου εμφανίζεται συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης με  $p=0.040$  (Πίνακας Παραρτήματος 5, Εικόνα 29). Από τις 3 μελέτες όλες βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg (Πίνακας Παραρτήματος 6).

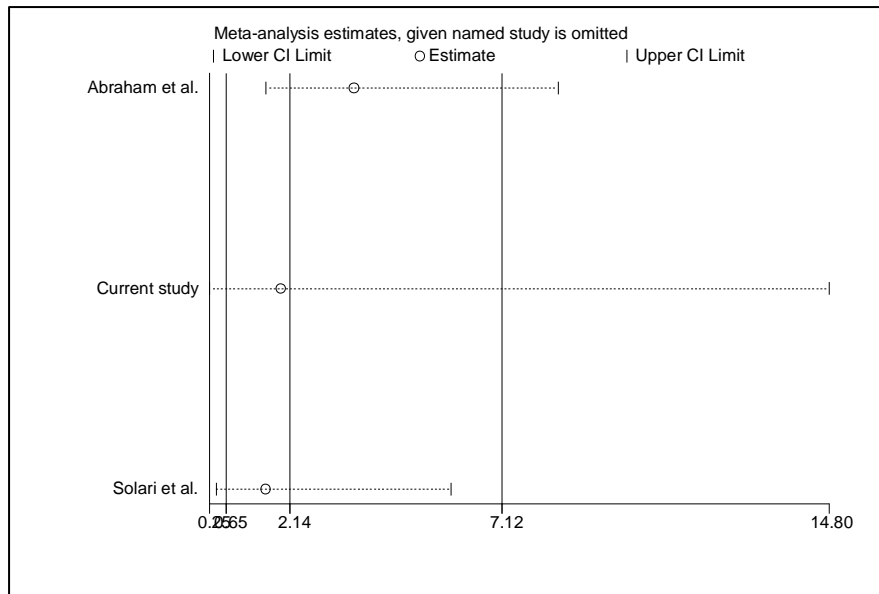


Εικόνα 29: Το funnel plot που προκύπτει από το τεστ του Begg και δείχνει την ύπαρξη συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

Επίσης, για την εκτίμηση του γενετικού τρόπου κληρονομικότητας πραγματοποιήθηκε πολύ-μεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης σύμφωνα με τις εντολές που προαναφέρθηκαν. Ο υπολογισμός του λάμδα που προκύπτει από την εντολή  $di\_b[b1]/\_b[b2]$  έχει ως αποτέλεσμα τον αριθμό .6742702 που βρίσκεται πολύ κοντά στο 0.5. Αν το λάμδα βρίσκεται κοντά στο 0, θεωρούμε υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Όταν βρίσκεται κοντά στο 1, επικρατή τρόπο, ενώ όταν η τιμή βρίσκεται κοντά στο 0.5 θεωρούμε ότι ο πολυμορφισμός και συνεπώς η εμφάνιση της ασθένειας κληρονομείται με συνεπικρατές τρόπο.

Άρα, από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο γενετικός τρόπος κληρονομικότητας είναι πιθανώς συνεπικρατής.

Ακόμη, πραγματοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση για να διαπιστωθεί πόσο αλλάζουν τα αποτελέσματα με τη προσθήκη κάθε μίας μελέτης στο χρόνο και περισσότερο πόσο επηρέασε η πρώτη μελέτη τα αποτελέσματα. Βρέθηκε ότι δεν εμφανίζετε το φαινόμενο του Πρωτέα δηλαδή δεν υπάρχει διαχρονική τάση (Πίνακας Παραρτήματος 7). Τέλος, πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετα-ανάλυση για να ελεγχθεί πόσο μεγάλη είναι η επιρροή κάθε μελέτης ξεχωριστά στο odds ratio, αν αφαιρεθεί μια μελέτη από το σύνολο των μελετών. Βρέθηκε ότι και στις τρεις αφαιρετικές μετα-αναλύσεις των αλληλόμορφων και των γονοτύπων δεν υπάρχει κάποια μελέτη, η οποία να οδηγεί σε ακραίες τιμές το συνολικό OR (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Γράφημα αφαιρετικής μετα-ανάλυσης για τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15: Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης για την ασθένεια της Πνευμονικής Υπέρτασης.**

Contrast	Number of studies	Odds Ratio (random/fixed effect)	95 % Confidence Interval		Cochran's Q	Between Studies variance ( $t^2$ )	P value for heterogeneity	I <sup>2</sup> (%)
<b>I allele versus D allele</b>	3	1.750/	0.917	3.340/	6.95	0.2094	0.031	71.2
		1.426	1.059	1.918				
<b>ID+DD versus II</b>	3	2.144/	0.646	7.115/	7.13	0.7619	0.028	72.0
		1.606	0.916	2.816				
<b>ID+II versus DD</b>	3	1.961/	0.703	5.469/	7.95	0.5346	0.019	74.8
		1.503	0.980	2.307/				

### 3.2.3 ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD)

Η δεύτερη μετα-ανάλυση αφορά τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου ACE για την ασθένεια της **χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD)**.

**Πίνακας 16: Μελέτες υγιών- ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) που χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη μετα-ανάλυση.**

AUTHOR	COUNTRY	RACE	DATE	CONTROLS	CASES	II Patients	ID Patients	DD Patients	II Controls	ID Controls	DD Controls
Ulasli et al.[37]	Turkey	Caucasian	2013	49	80	16	17	47	6	10	33
Tkáčová et al.[19]	Slovakia	Caucasian	2005	118	66	15	31	20	19	68	31
Ahsan et al.[38]	India	Caucasian	2004	66	27	10	12	5	23	33	10
Yildiz et al.[21]	Turkey	Caucasian	2003	40	42	7	21	14	10	18	12
Ayada et al.[39]	Turkey	Caucasian	2014	64	47	8	26	13	8	28	28
Simsek et al.[40]	Turkey	Caucasian	2013	40	66	15	20	31	8	19	13
Pabst et al.[41]	Germany	Caucasian	2009	158	152	43	76	33	39	69	50
Lee et al.[42]	Denmark	Caucasian	2009	9034	1259	314	609	336	2175	4485	2374
Hopkinson et al.[43]	U.K.	Caucasian	2004	101	103	29	49	25	28	49	24
<b>Total</b>				9670	1842	457	861	524	2316	4779	2575

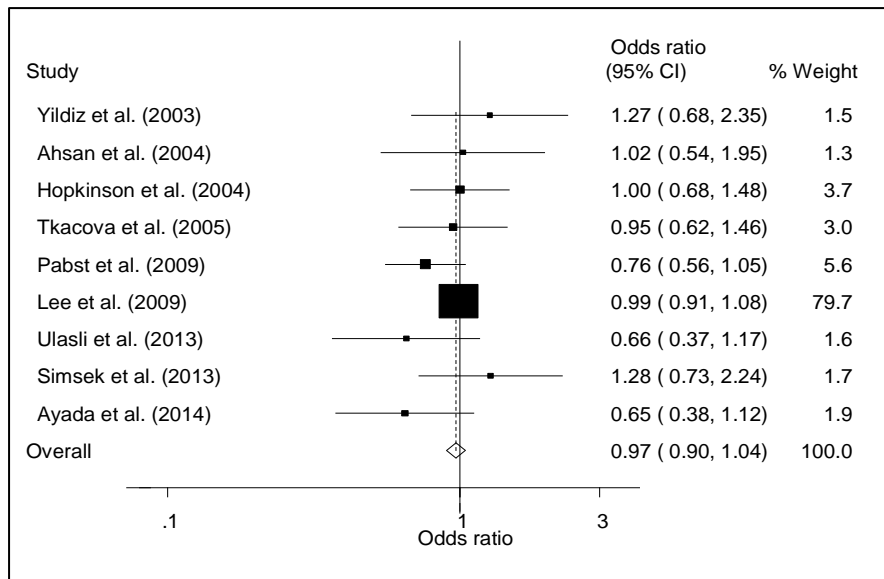


**Πίνακας 17: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης GVAR με τις μεθόδους CATT και MAX για την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD).**

AUTHOR	COUNTRY	DATE	Additive			Dominant		Recessive		MAX test			
			z1	z2	z3	pz2	pz2_meta	pz3	pz3_meta	pz1	pz1_met a	pmax	pmax_meta
Pabst et al. [41]	Germany	2009	-1,9749	-1,6337	-0,7196	0,1023		0,4718		0,0483		0,0994	
Ahsan et al. [38]	India	2004	0,4007	0,0746	-0,2002	0,9406		0,8413		0,6886		0,9014	
Tkacova et al. [19]	Slovakia	2005	0,5860	-0,2506	-1,1106	0,8021		0,2667		0,5579		0,4672	
Ulasli et al. [37]	Turkey	2013	-0,9764	-1,1750	-1,1366	0,2400		0,2557		0,3289		0,3886	
Yildiz et al. [21]	Turkey	2003	0,3242	0,7378	0,9305	0,4607		0,3521		0,7458		0,5768	
Ayada et al. [39]	Turkey	2014	-1,7355	-1,5773	-0,6701	0,1147		0,5028		0,0827		0,1658	
Simsek et al. [40]	Turkey	2013	1,4655	0,7611	-0,3302	0,4466		0,7412		0,1428		0,2594	
Hopkinson et al. [43]	United Kingdom	2004	0,0852	0,0076	-0,0688	0,9939		0,9451		0,9321		0,9952	
Lee et al. [42]	Denmark	2009	0,3090	-0,2131	-0,6713	0,8313	0,4175	0,5020	0,2496	0,7573	0,5909	0,7487	0,3758

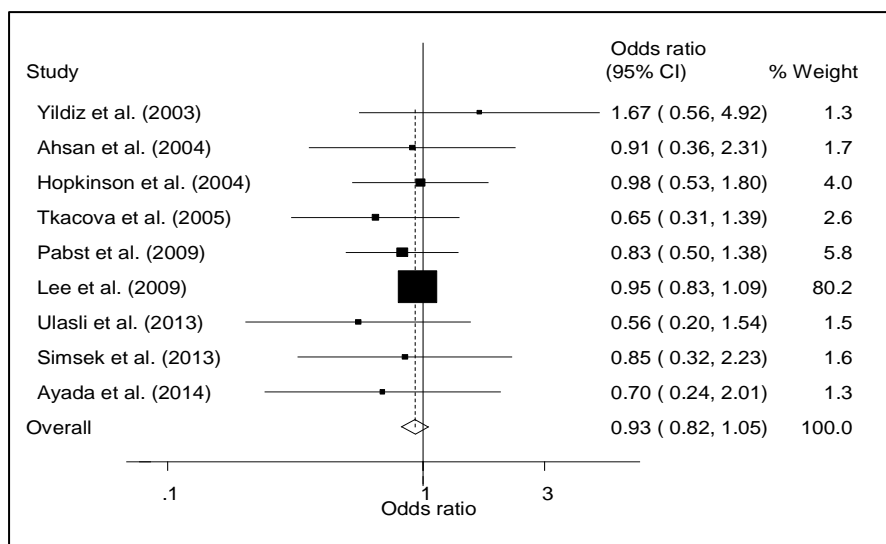
Από την χρήση της μεθόδου στατιστικής ανάλυσης GVAR και πιο συγκεκριμένα των τεστ CATT και MAX έγινε έλεγχος για την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του γονιδίου ACE και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD). Τόσο τα τεστ CATT για κάθε έναν από τους τρόπους κληρονομικότητας (επικρατής, συνεπικρατής, υπολειπόμενος), όσο και το τεστ MAX δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με την νόσο (Πίνακας 17).

Πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης για την σύγκριση του αλληλόμορφου D έναντι του I στην οποία δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 0.97 (95% CI: 0.90 1.05).



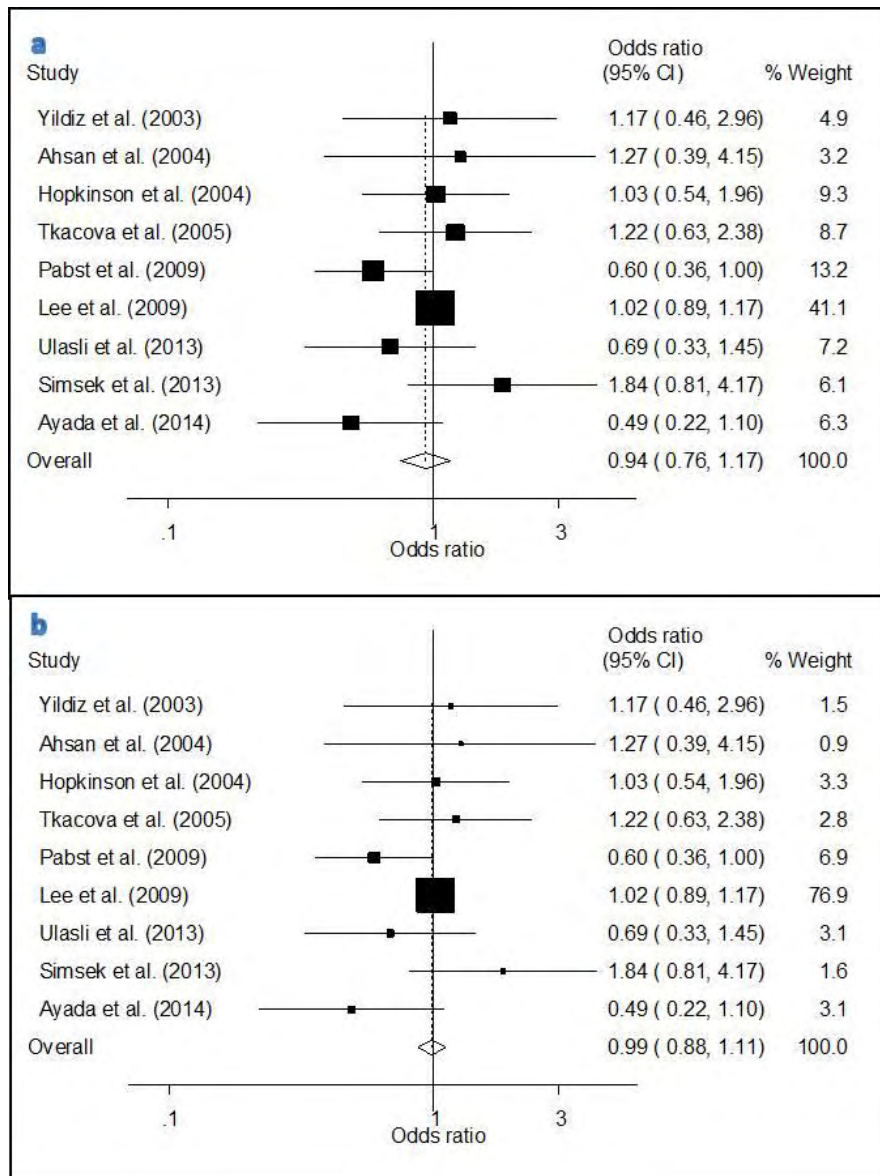
Εικόνα 31: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αλληλόμορφου D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Επειδή η ετερογένεια είναι πολύ μικρή (Πίνακας 18) τα αποτελέσματα με τη χρήση και του μοντέλου σταθερών και αυτού των τυχαίων επιδράσεων είναι ίδια. Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Έπειτα, διεξήχθη μετα-ανάλυση για τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας, δηλαδή την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 0.93 (95% CI: 0.82 1.05).



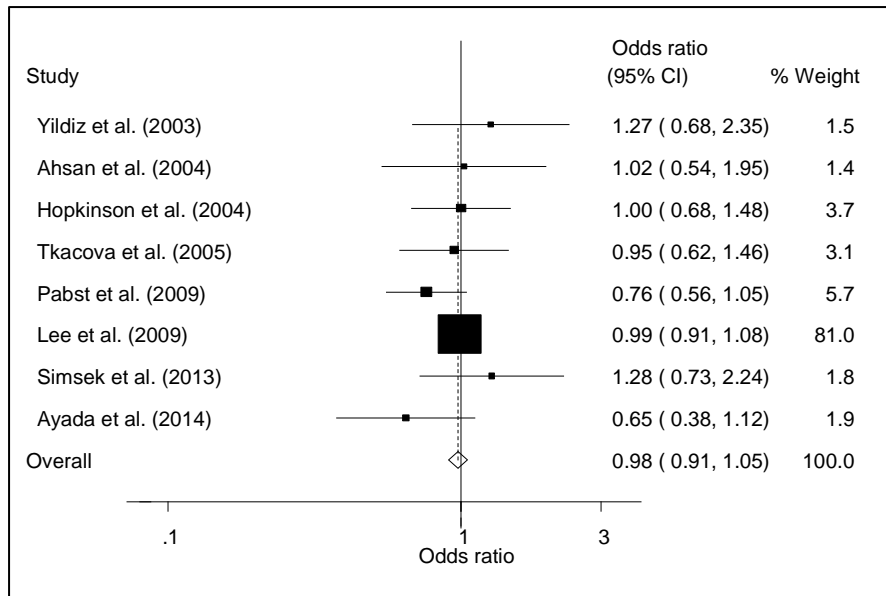
Εικόνα 32: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας κατά τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας. Επειδή η ετερογένεια είναι πολύ μικρή (Πίνακας 18) τα αποτελέσματα με τη χρήση και του μοντέλου σταθερών και αυτού των τυχαίων επιδράσεων είναι ίδια. Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Τέλος, έγινε μετα-ανάλυση για τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας δηλαδή την σύγκριση των γονοτύπων DD versus ID+II. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων με OR: 0.94 (95% CI: 0.76 1.17) όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 0.99 (95% CI: 0.88 1.11).



Εικόνα 33: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας κατά τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας (a: μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, b: μοντέλο σταθερών επιδράσεων).

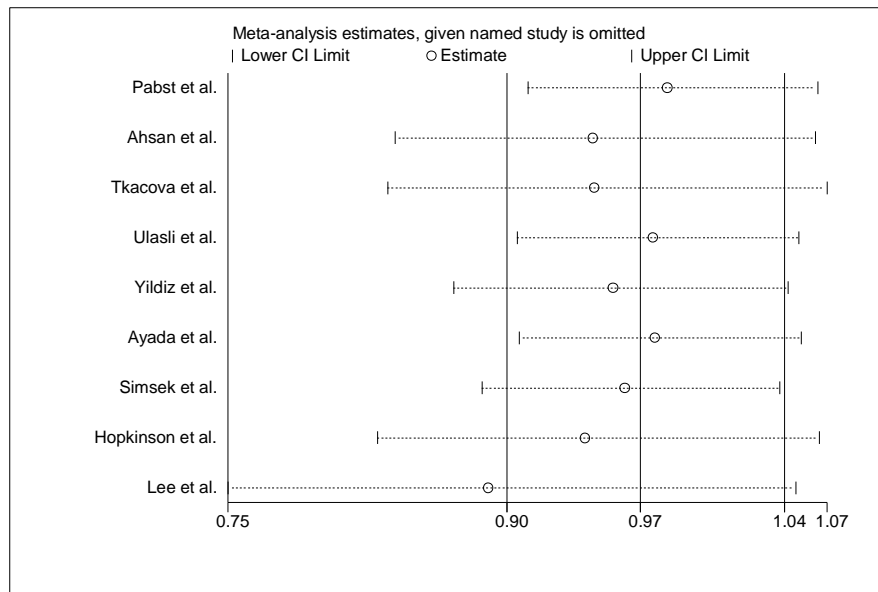
Οι συγκρίσεις που έγιναν για τα αλληλόμορφα και τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας δεν παρουσιάζουν ετερογένεια, ενώ η σύγκριση για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας έδειξε μέτριο βαθμό ετερογένειας (Πίνακας 18). Ο έλεγχος του σφάλματος δημοσίευσης τόσο με το τεστ του Begg όσο και με αυτό του Egger έδειξε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς τα p-value είναι μεγαλύτερα από το 0.05 (Πίνακας Παραρτήματος 8). Από τις 9 μελέτες μόνο μια δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg[37] (Πίνακας Παραρτήματος 9). Έτσι έγινε επανάληψη της μετα-ανάλυσης εξαιρώντας την μελέτη που δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg που όμως δεν διαφοροποίησε το αποτέλεσμα όπως φαίνεται και στην παρακάτω ενδεικτική εικόνα.



Εικόνα 34: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αλληλόμορφου D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων με OR: 0.98 (95% CI: 0.91 1.05).

Επίσης, για την εκτίμηση του γενετικού μοντέλου κληρονομικότητας πραγματοποιήθηκε πολύ-μεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης. Ο υπολογισμός του λάμδα που προκύπτει από την εντολή  $di\_b[b1]/\_b[b2]$  έχει ως αποτέλεσμα τον αριθμό 3.09 που είναι αρκετά μεγαλύτερος από το 1. Άρα, συμπεραίνουμε ότι ο γενετικός τρόπος κληρονομικότητας είναι επικρατής με πιθανότητα υπερεπικράτησης. Επιπλέον, το υπερβολικό του αποτελέσματος μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι η συσχέτιση είναι στατιστικά μη σημαντική.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση για να διαπιστωθεί πόσο αλλάζουν τα αποτελέσματα με τη προσθήκη κάθε μίας μελέτης στο χρόνο και περισσότερο πόσο επηρέασε η πρώτη μελέτη τα αποτελέσματα. Βρέθηκε ότι δεν εμφανίζεται το φαινόμενο του Πρωτέα δηλαδή δεν υπάρχει διαχρονική τάση (Πίνακας 10 Παραρτήματος). Τέλος πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετα-ανάλυση για να ελεγχθεί ποσό μεγάλη είναι η επιρροή κάθε μελέτης ξεχωριστά στο OR, αν αφαιρεθεί μια μελέτη από το σύνολο των μελετών. Βρέθηκε ότι στην περίπτωση των αλληλόμορφων υπάρχει μία μελέτη[42], η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ακραίες τιμές το συνολικό OR (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Αφαιρετική μετα-ανάλυση για τον έλεγχο των αλληλόμορφων με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18).

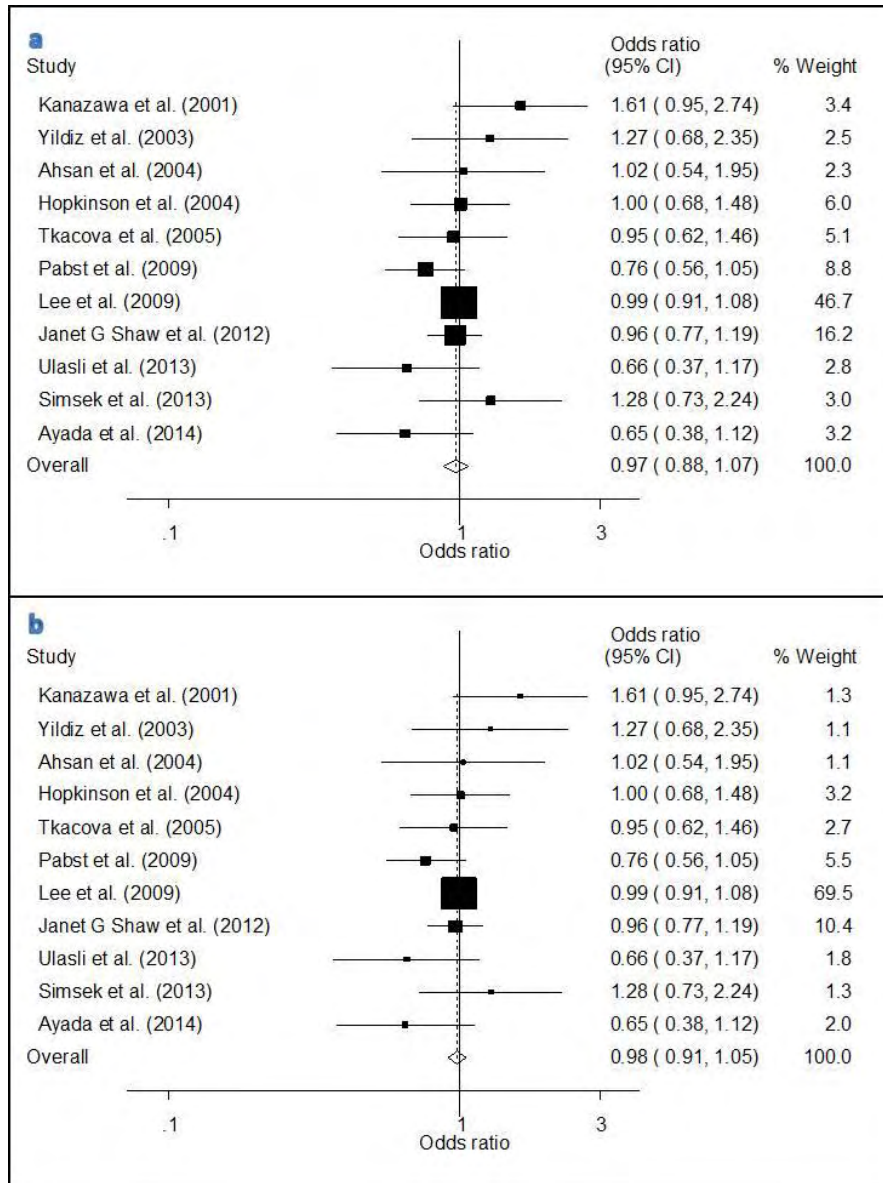
Πίνακας 18: Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης για την ασθένεια της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας.								
Contrast	Number of studies	Odds Ratio (random/fixed effect)	95 % Confidence Interval		Cochran's Q	Between Studies variance ( $t^2$ )	P value for heterogeneity	I <sup>2</sup> (%)
<b>I allele versus D allele</b>	9	0.970/	0.900	1.045/	8.00	0.0000	0.433	0.0
		0.969	0.900	1.044				
<b>ID+DD versus II</b>	9	0.931/	0.824	1.052/	3.61	0.0000	0.891	0.0
		0.931	0.824	1.051				
<b>ID+II versus DD</b>	9	0.944	0.759	1.173	10.59	0.0253	0.226	24.4

Η τρίτη μετα-ανάλυση αφορά τον πολυμορφισμό I/D του γονιδίου ACE για την ασθένεια της **χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD)** αυτή την φορά όμως με δύο έξτρα μελέτες που είχαν μόνο ασθενείς στις οποίες προστέθηκαν δεδομένα υγιών μαρτύρων από άλλες μελέτες της ίδιας φυλής.

**Πίνακας 19: Μελέτες υγιών- ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) που χρησιμοποιήθηκαν επιπρόσθετα στις αρχικές μελέτες για την τρίτη μετα-ανάλυση και οι επιπλέον μελέτες με δεδομένα υγιών της ίδιας φυλής.**

AUTHOR	COUNTRY	RACE	DATE	CONTROLS	CASES	II Patients	ID Patients	DD Patients	II Controls	ID Controls	DD Controls
<b>Kanazawa et al.[44]</b>	Japan	Caucasian	2001		39	14	12	13			
<b>J. G Shaw et al.[45]</b>	Australia	Caucasian	2012		277	69	139	69			
<b>JAPAN CONTROLS</b>											
<b>Tanabe et al.[46]</b>	Japan	Caucasian	2006	97					40	42	15
<b>AUSTRALIAN CONTROLS</b>											
<b>X.L.Wang et al.[47]</b>	Australia	Caucasian	1995	394					83	220	91
<b>Total</b>				491	316	83	151	82	123	262	106

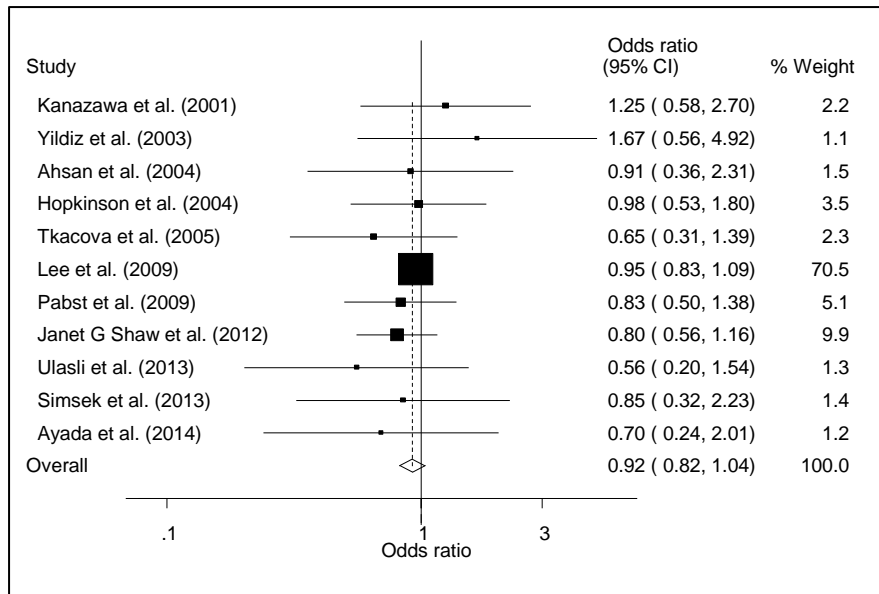
Αρχικά πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή μέθοδος μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων με OR: 0.97 (95% CI: 0.88 1.07) όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 0.98 (95% CI: 0.91 1.05).



Εικόνα 36: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αλληλόμορφου D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (a: μοντέλο τυχαίων επιδράσεων, b: μοντέλο σταθερών επιδράσεων).

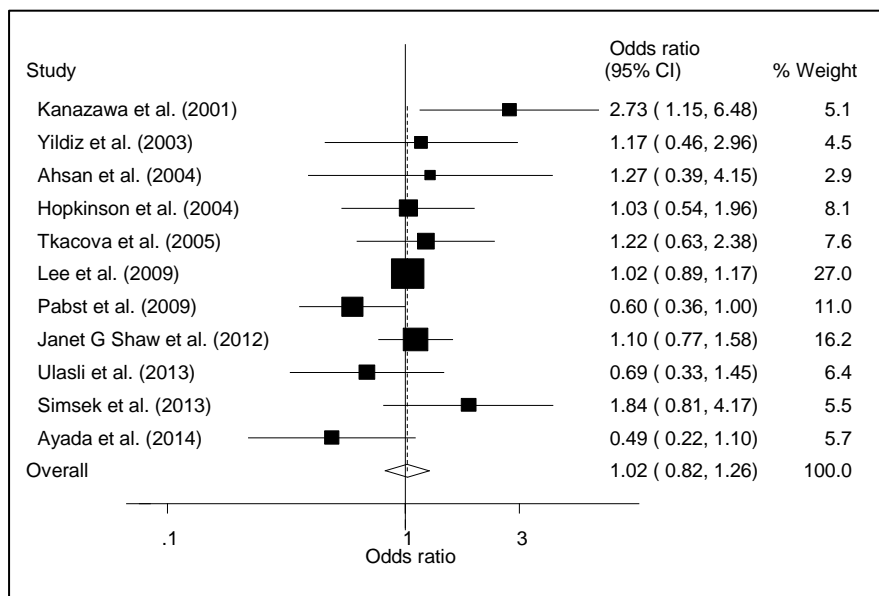
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση για τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας δηλαδή την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 0.92 (95% CI: 0.82 1.04)





Εικόνα 37: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας κατά τον έλεγχο του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας. Επειδή η ετερογένεια είναι πολύ μικρή (Πίνακας 20) τα αποτελέσματα με τη χρήση και του μοντέλου σταθερών και αυτού των τυχαίων επιδράσεων είναι ίδια. Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Τέλος, έγινε μετα-ανάλυση για τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας δηλαδή την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων, όσο και με το μοντέλο σταθερών επιδράσεων με OR: 1.02 (95% CI: 0.91 1.13).



Εικόνα 38: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας κατά τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας. Επειδή η ετερογένεια είναι πολύ μικρή (Πίνακας 20) τα αποτελέσματα με τη χρήση και του μοντέλου σταθερών και αυτού των τυχαίων επιδράσεων είναι ίδια. Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Οι συγκρίσεις που έγιναν για τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας δεν παρουσιάζουν ετερογένεια, για τα αλληλόμορφα παρουσιάζουν μικρή ετερογένεια ενώ η σύγκριση για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας έδειξε μέτριο βαθμό ετερογένειας (Πίνακας 20). Ο έλεγχος του σφάλματος δημοσίευσης τόσο με το τεστ του Begg όσο και με αυτό του Egger έδειξε ότι δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης καθώς τα p-value είναι μεγαλύτερα από το 0.05 (Πίνακας Παραρτήματος 11). Από τις 11 μελέτες μόνο οι 9 μελέτες είχαν δεδομένα υγιών-ασθενών και από αυτές μόνο μια δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [37] (Πίνακας Παραρτήματος 9).

Επίσης, πραγματοποιήθηκε αθροιστική μετα-ανάλυση για να διαπιστωθεί πόσο αλλάζουν τα αποτελέσματα με τη προσθήκη κάθε μίας μελέτης στο χρόνο και περισσότερο πόσο επηρέασε η πρώτη μελέτη τα αποτελέσματα. Βρέθηκε ότι δεν εμφανίζεται το φαινόμενο του Πρωτέα δηλαδή δεν υπάρχει διαχρονική τάση (Πίνακας Παραρτήματος 12). Τέλος πραγματοποιήθηκε αφαιρετική μετα-ανάλυση για να ελεγχθεί ποσό μεγάλη είναι η επιρροή κάθε μελέτης ξεχωριστά στο OR, αν αφαιρεθεί μια μελέτη από το σύνολο των μελετών. Βρέθηκε ότι και στις τρεις αφαιρετικές μετα-αναλύσεις των αλληλόμορφων και των γονοτύπων δεν υπάρχει κάποια μελέτη, η οποία να οδηγεί σε ακραίες τιμές το συνολικό OR.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 20).

**Πίνακας 20: Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης για την ασθένεια της Χρόνιας Αποφρακτικής Πνευμονοπάθειας με τις επιπλέον μελέτες.**

Contrast	Number of studies	Odds Ratio (random/fixed effect)	95 % Confidence Interval		Cochran's Q	Between Studies variance ( $t^2$ )	P value for heterogeneity	I <sup>2</sup> (%)
<b>I allele versus D allele</b>	11	0.967/ 0.977	0.875 0.911	1.069/ 1.047	11.46	0.0038	0.323	12.8
<b>ID+DD versus II</b>	11	0.924/ 0.924	0.824 0.824	1.036/ 1.035	4.78	0.0000	0.905	0.0
<b>ID+II versus DD</b>	11	1.017/ 1.015	0.822 0.908	1.259/ 1.135	16.03	0.0392	0.099	37.6

### 3.2.4 ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ (PH) ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (COPD)

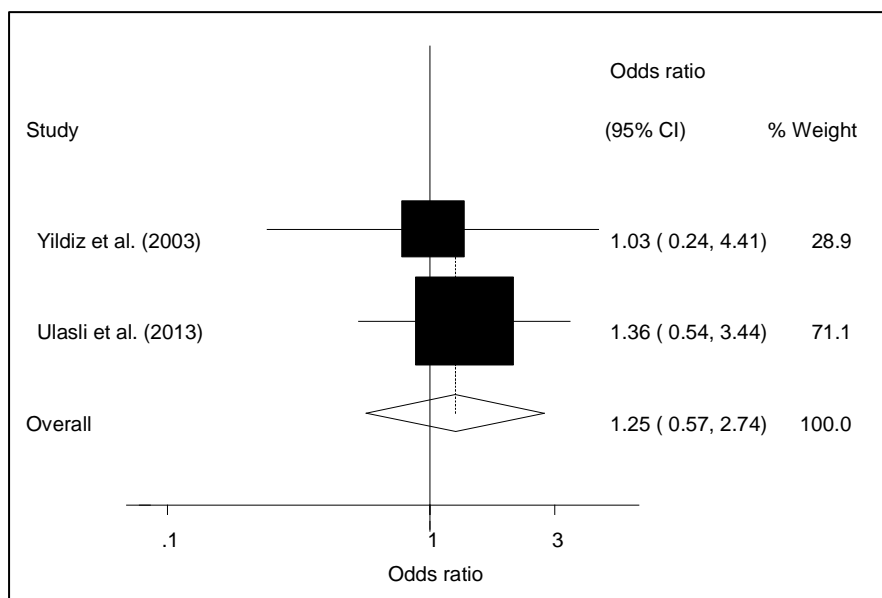
Τέλος πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE, με την εμφάνιση **πνευμονικής υπέρτασης (PH)** σε ασθενείς που πάσχουν από **χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD)**.

**Πίνακας 21: Μελέτες υγιών- ασθενών με πνευμονική υπέρταση (PH) και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) που χρησιμοποιήθηκαν στην τέταρτη μετα-ανάλυση.**

<b>AUTHOR</b>	<b>COUNTRY</b>	<b>RACE</b>	<b>DATE</b>	<b>CONTROLS (COPD)</b>	<b>CASES (PH in COPD)</b>	<b>II PH in COPD</b>	<b>ID PH in COPD</b>	<b>DD PH in COPD</b>	<b>II+ID PH in COPD</b>	<b>II COPD</b>	<b>ID COPD</b>	<b>DD COPD</b>	<b>II+ID COPD</b>
<b>Ulasli et al.[37]</b>	Turkey	Caucasian	2013	50	30	5	6	19	11	11	11	28	22
<b>Yildiz et al.[21]</b>	Turkey	Caucasian	2003	24	14			7	17			4	10
<b>Total</b>				74	44	5	6	26	28	11	11	32	32

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 21) τα δεδομένα για την μετα-ανάλυση είναι ελλιπή. Έτσι διεξήχθη μόνο ο έλεγχος για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, δηλαδή ο γονότυπος DD έναντι των γονοτύπων ID+II.

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων όσο και με τη χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων με OR: 1.25 (95% CI: 0.57 2.74).



Εικόνα 39: Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού D με την νόσο της πνευμονικής υπέρτασης σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια κατά τον έλεγχο του υπολειπόμενου τρόπου κληρονομικότητας. Τα αποτελέσματα με τη χρήση και τόσο του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων όσο και με αυτό των σταθερών επιδράσεων ήταν ίδια λόγω πολύ μικρής ετερογένειας (Πίνακας 22). Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα με τη χρήση του μοντέλου τυχαίων επιδράσεων.

Δεν παρουσιάζεται ετερογένεια κατά την σύγκριση για τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας (Πίνακας 22). Λόγω του ότι οι μελέτες που συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη μετα-ανάλυση είναι μόνο δύο δεν μπορεί να υπάρξει συμπέρασμα για την ύπαρξη συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης. Η μία από τις δύο μελέτες δεν βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [37] (Πίνακας Παραρτήματος 9).

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22).

**Πίνακας 22: Τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής μεθόδου μετα-ανάλυσης για την ασθένεια της Πνευμονικής Υπέρτασης σε ασθενείς με Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.**

Contrast	Number of studies	Odds Ratio (random/fixed effect)	95 % Confidence Interval	Cochran's Q	Between Studies variance (t <sup>2</sup> )	P value for heterogeneity	I <sup>2</sup> (%)
ID+II versus DD	2	1.25	0.57 2.74	0.10	0.0	0.754	0.0

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Η πνευμονική υπέρταση (PH) και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) είναι δύο ανίατες ασθένειες οι οποίες δυσχεραίνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών και συχνά οδηγούν στο θάνατο. Κληρονομικά αίτια σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες κινδύνου, καθορίζουν σημαντικά την παθογένεια και την πορεία των πνευμονικών αυτών νόσων. Ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE και πιο συγκεκριμένα το αλληλόμορφο D έχει συχνά συνδεθεί με αυξημένο ρίσκο για παθήσεις όπως η πνευμονική υπέρταση και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια σε μελέτες γενετικής συσχέτισης ασθενών μαρτύρων. Αυτό συμβαίνει επειδή το αλληλόμορφο D φαίνεται ότι προκαλεί αυξημένη έκφραση του ενζύμου ACE [48], το οποίο με την σειρά του αυξάνει την συγκέντρωση της αγγιοτενσίνης II, που διεγείρει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων των αρτηριών [49]. Τα διευρυμένα τοιχώματα των αρτηριών μπορεί να συμβάλουν στην περαιτέρω αύξηση της αρτηριακής πίεσης [49]. Τα παραπάνω δείχνουν ότι το γονίδιο ACE παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των πνευμονικών αυτών νόσων και το καθιστούν υποψήφιο βιοδείκτη για την διάγνωση ή και την πρόβλεψη τους. Επιπλέον, το γεγονός ότι μπορεί να εντοπιστούν αυξημένα επίπεδα του ενζύμου ACE σε ασθενείς, καθιστά την πρωτεΐνη ACE στόχο θεραπευτικής παρέμβασης [50].

Στην παρούσα μελέτη εξακριβώθηκαν οι γονότυποι 88 ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση και 88 υγιών ατόμων σε ελληνικό πληθυσμό. Τα αποτελέσματα συνδυάστηκαν με επιπλέον δεδομένα από άλλες μελέτες, για τον έλεγχο γενετικής συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE, με τις ασθένειες της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και της πνευμονικής υπέρτασης που οφείλεται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Η κατανομή των γονοτύπων DD, ID και II στους υγιείς πληθυσμούς της παρούσας μελέτης, βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

Συνολικά 15 μελέτες συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση. Τα δεδομένα όλων των μελετών ελέγχθηκαν αρχικά με τη μέθοδο GWAR και κατόπιν με μετα-ανάλυση. Με την μέθοδο GWAR και συγκεκριμένα το τεστ MAX, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση με  $p=0,025$  στον ελληνικό πληθυσμό. Όμοια, με το τεστ MAX βρέθηκε ότι στο σύνολο των μελετών παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση με  $p=0,0026$ . Επίσης, με το τεστ CATT για τον συνεπικρατή τρόπο κληρονομικότητας και την χρήση του μοντέλου σταθερών επιδράσεων, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση ( $p=0,0149$ ) που όμως λόγω μεγάλης ετερογένειας δεν μπορεί να ληφθεί υπόψιν. Όσον αφορά την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, τόσο η μέθοδος CATT για όλους τους τρόπους κληρονομικότητας, όσο και το τεστ MAX δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Η μετα-ανάλυση έδειξε ανάλογα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, για την σύγκριση των αλληλόμορφων με OR ίσο με 1,43 και διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI: 1.06 1.92) όμως, τα δεδομένα των μελετών εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την πνευμονική αρτηριακή υπέρταση,

κατά την σύγκριση του επικρατούς τρόπου κληρονομικότητας, με OR ίσο με 3,19 και διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI: 1.26 8.03). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στον ελληνικό πληθυσμό δεν έγινε έλεγχος για μεταλλάξεις του γονιδίου BMPR2 όπως έγινε στους υπόλοιπους πληθυσμούς, επομένως η αντιστροφή του στατιστικά σημαντικού τρόπου κληρονομικότητας μπορεί να οφείλεται και σε αυτό.

Τέλος, η μετα-ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση του γονιδίου ACE I/D με την νόσο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας ή με την πνευμονική υπέρταση που οφείλεται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο στατιστικός έλεγχος που αφορούσε την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έδειξε ότι υπήρχαν μελέτες με πραγματικά αντικρουόμενα αποτελέσματα [42], κάτι που προφανώς επηρέασε το συνολικό αποτέλεσμα της μετα-ανάλυσης. Έτσι δεν αποδείχθηκε με στατιστικά σημαντικό τρόπο η συσχέτιση ή μη του πολυμορφισμού I/D με την ΧΑΠ. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι ο αριθμός των ατόμων που πρέπει επιπλέον να εξεταστούν προκειμένου να έχουμε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα βρέθηκε με τη μέθοδο Barrowman [51] να είναι 56000 για τη σύγκριση αλληλόμορφων 150000 για τον υπολειπόμενο και 23000 για τον επικρατή τρόπο κληρονόμησης. Οι αριθμοί αυτοί αν και δεν είναι αρκετά μεγάλοι, είναι δύσκολο να βρεθούν δεδομένου της σπανιότητας της νόσου.

Τα αποτελέσματα για την περίπτωση της πνευμονικής υπέρτασης που οφείλεται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια δεν μπορούν να αποκλείσουν το ενδεχόμενο ότι ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης των ασθενειών μιας και ο αριθμός των μελετών που συμπεριλήφθησαν στην μετα-ανάλυση ήταν πολύ μικρός (δυο).

Εν κατακλείδι, το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο σε πνευμονοπάθειες που σχετίζονται με αυξημένη αρτηριακή πίεση. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό συμβαίνει δεν είναι ξεκάθαρος. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός I/D του γονιδίου ACE συσχετίζεται με την πνευμονική υπέρταση, ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση με την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Δεδομένου ότι οι ασθένειες αυτές είναι ανίατες και έχουν αυξημένη θνησιμότητα, ο γονότυπος του γονιδίου ACE θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη ώστε να συμβάλλει στην έγκαιρη πρόγνωση και αντιμετώπιση των συμπτωμάτων για την βελτίωση των συνθηκών υγείας των ασθενών. Περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερες ομάδες δειγμάτων απαιτούνται ώστε να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα των υπαρχόντων μελετών.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



- [1] G. Simonneau *et al.*, "Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 1, pp. S43–S54, 2009.
- [2] J. Houtchens, D. Martin, and J. R. Klinger, "Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension," *Pulm. Med.*, vol. 2011, 2011.
- [3] J. D. Cogan *et al.*, "High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 174, no. 5, pp. 590–598, 2006.
- [4] M. a Aldred *et al.*, "BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Hum. Mutat.*, vol. 27, no. May 2005, pp. 212–213, 2006.
- [5] B. Sztrymf *et al.*, "Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 177, no. 12, pp. 1377–1383, 2008.
- [6] "Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension: Practice Essentials, Background, Pathophysiology." [Online]. Available: <http://emedicine.medscape.com/article/301450-overview>.
- [7] "How Is Pulmonary Hypertension Treated? - NHLBI, NIH." [Online]. Available: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/pah/treatment>.
- [8] "World Health Organization," *WHO*, 2014.
- [9] S. D. . F. D. . H. Ramsey, "Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Risk Factors, and Outcome Trials: Comparisons with Cardiovascular Disease," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 3, no. 7, pp. 635–640, 2006.
- [10] G. Devereux, "Definition, epidemiology, and risk factors," *Bmj*, vol. 332, no. 7550, pp. 1142–1144, 2006.
- [11] J. Vestbo *et al.*, "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 187, no. 4, pp. 347–365, 2013.
- [12] "WHO | Hazard prevention and control in the work environment: Airborne dust (WHO, 1999)," *WHO*, 2010.
- [13] A. J. Sandford, T. D. Weir, and P. D. Pare, "Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease.," *Eur. Respir. J.*, vol. 10, no. 6, pp. 1380–1391, 1997.
- [14] A. Novoradovsky *et al.*, "Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 441–7, 1999.
- [15] E. J. and P. R.J., "Pulmonary hypertension associated with COPD," *Int. J. COPD*, vol. 3, no. 1, pp. 55–70, 2008.
- [16] J. Elwing and R. J. Panos, "Pulmonary hypertension associated with COPD.," *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 55–70, 2008.
- [17] W. HIDA, Y. TUN, Y. KIKUCHI, S. OKABE, and K. SHIRATO, "Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Recent advances in pathophysiology and management," *Respirology*, vol. 7, no. 1, pp. 3–13, Mar. 2002.

- [18] B. Rigat, C. Hubert, F. Alhenc-Gelas, F. Cambien, P. Corvol, and F. Soubrier, "An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels," *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 4, pp. 1343–6, 1990.
- [19] R. Tkáčová, P. Joppa, B. Stančák, J. Šalagovič, S. Mišíková, and I. Kalina, "The link between angiotensin-converting enzyme genotype and pulmonary artery pressure in patients with COPD," *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 117, no. 5–6, pp. 210–214, 2005.
- [20] H. Kanazawa, T. Okamoto, K. Hirata, and J. Yoshikawa, "Deletion polymorphisms in the angiotensin converting enzyme gene are associated with pulmonary hypertension evoked by exercise challenge in patients with chronic obstructive pulmonary disease," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 162, no. 4, pp. 1235–1238, 2000.
- [21] P. Yildiz, H. Oflaz, N. Cine, N. Erginel-Ünaltuna, F. Erzen, and V. Yilmaz, "Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase enzyme associated with pulmonary hypertension in patients with COPD," *Respir. Med.*, vol. 97, no. 12, pp. 1282–1288, 2003.
- [22] S. Eddahibi *et al.*, "Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 8, pp. 1141–50, 2001.
- [23] J. Häslér and K. Strub, "Alu elements as regulators of gene expression," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 19, pp. 5491–5497, 2006.
- [24] H. Schunkert *et al.*, "Association between a Deletion Polymorphism of the Angiotensin-Converting-Enzyme Gene and Left Ventricular Hypertrophy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 330, no. 23, pp. 1634–1638, Jun. 1994.
- [25] Wikipedia Contributors, "Angiotensin-converting enzyme," *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [Online]. Available: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Angiotensin-converting\\_enzyme&oldid=745027393](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Angiotensin-converting_enzyme&oldid=745027393).
- [26] Δ. Παλαιολόγου and Ε. Κ. Γ. Παπανικολάου, "Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης," pp. 129–152, 1983.
- [27] T. C. Lorenz, "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies," *J. Vis. Exp.*, no. 63, p. e3998, 2012.
- [28] M. W. Russo, "How to Review a Meta-analysis," *Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)*, vol. 3, 2007.
- [29] K. Lindpaintner *et al.*, "A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 11, pp. 706–711, 1995.
- [30] "Stata Statistical Software: Release 13; StataCorp LP: College Station, TX, USA, 2013."
- [31] M. Delgado-Rodríguez, "Glossary on meta-analysis," *J. Epidemiol. Community Health*, vol. 55, pp. 534–536, 2001.
- [32] S. L. Normand, "Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting," *Stat. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 321–59, Feb. 1999.
- [33] P. G. Bagos, "A unification of multivariate methods for meta-analysis of genetic

- association studies,” *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. Article31, 2008.
- [34] P. G. Bagos, “Genetic model selection in genome-wide association studies: robust methods and the use of meta-analysis,” *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 3, pp. 285–308, Jan. 2013.
- [35] W. T. Abraham *et al.*, “Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with primary pulmonary hypertension: increased frequency and association with preserved haemodynamics,” *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, vol. 4, no. 1, pp. 27–30, 2003.
- [36] V. Solari and P. Puri, “Genetic polymorphisms of angiotensin system genes in congenital diaphragmatic hernia associated with persistent pulmonary hypertension,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 39, no. 3, pp. 302-306-306, 2004.
- [37] S. S. Ulasli, F. O. Eyuboglu, H. Verdi, and F. B. Atac, “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,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 40, no. 10, pp. 5625–5633, 2013.
- [38] A. Ahsan, R. Ram, M. A. Baig, and M. A. Q. Pasha, “ACE I allele and eNOS G allele crosstalk may have a role in chronic obstructive pulmonary disease,” *Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 11, pp. 1037–1040, 2004.
- [39] C. Ayada *et al.*, “Evaluation of whether the ACE gene I/D polymorphism constitutes a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in the Turkish population,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 10427–10433, 2014.
- [40] S. Simsek *et al.*, “The insertion/deletion polymorphism in the ACE gene and chronic obstructive pulmonary disease,” *Genet Mol Res*, vol. 12, no. 2, pp. 1392–1398, 2013.
- [41] S. Pabst, B. Theis, and A. Gillissen, “Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease,” *Eur. J. Med. Res.*, vol. 14, pp. 177–181, 2009.
- [42] J. Lee, B. G. Nordestgaard, and M. Dahl, “Elevated ACE activity is not associated with asthma, COPD, and COPD co-morbidity,” *Respir. Med.*, vol. 103, no. 9, pp. 1286–1292, 2009.
- [43] N. S. Hopkinson *et al.*, “Angiotensin converting enzyme genotype and strength in chronic obstructive pulmonary disease,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 170, no. 4, pp. 395–399, 2004.
- [44] Kanazawa, O. Hiroshi, H. Toshihiro, Y. Kazuto, and Junichi, “Association Between the Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphisms and Tissue Oxygenation During Exercise in Patients With COPD\*,” *Chest*, vol. 121, no. 3, pp. 697–701, 2002.
- [45] J. G. Shaw *et al.*, “Genetic influences on right ventricular systolic pressure (RVSP) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).,” *BMC Pulm. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 25, 2012.
- [46] N. Tanabe *et al.*, “Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and prognosis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension,” *Circ. J.*, vol. 70, no. 9, pp. 1174–9, 2006.
- [47] X. L. Wang, R. M. McCredie, and D. E. Wilcken, “Genotype distribution of angiotensin-converting enzyme polymorphism in Australian healthy and coronary populations

- and relevance to myocardial infarction and coronary artery disease.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 115–9, Jan. 1996.
- [48] M. Saeed Mahmood, K. Saboohi, S. Osman Ali, A. Bokhari, and P. Frossard, "Association of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene G2350A dimorphism with essential hypertension," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 17, pp. 719–723, 2003.
- [49] E. J. Su, D. M. Lombardi, J. Siegal, and S. M. Schwartz, "Angiotensin II Induces Vascular Smooth Muscle Cell Replication Independent of Blood Pressure," *Hypertension*, vol. 31, no. 6, 1998.
- [50] L. Tiret *et al.*, "Evidence, from Combined Segregation and Linkage Analysis, That a Variant of the Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) Gene Controls Plasma ACE Levels," *Am. J. Hum. Genet*, vol. 51, pp. 197–205, 1992.
- [51] N. J. Barrowman, M. Fang, M. Sampson, and D. Moher, "Identifying null meta-analyses that are ripe for updating."

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. ΜΕΡΟΣ - ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΣΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

Η επιλογή εκκινήτων έγινε έπειτα από αναζήτηση στη βιβλιογραφία. Οι κύριες μελέτες που συνέβαλαν στην επιλογή συγκεντρώνονται στον ακόλουθο πίνακα του παραρτήματος.

Πίνακας Παραρτήματος 1: Στοιχεία από την αναζήτηση εκκινήτων στη βιβλιογραφία.							
Pmid	>Pmid	Disease	Gene	Primer F	Primer R	PCR product size(bp)	PCR
24057178		PH in COPD	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTCGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	
23603420- >1313972		HAPE	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	
21525147- >1319114		HAPE*	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	
21418104- >16356438		PPHN**	ACE I/D	5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3'	5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'	319 bp for D allele, 597 bp for I allele	1st PCR
		PPHN	ACE I/D	5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'	5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'	335	2nd PCR for DD genotype
19332265		PAH	ACE I/D	5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3'	5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'	319 bp for D allele, 597 bp for I allele	1st PCR



16936432- >1313972	PAH	ACE I/D	<b>5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'</b>	<b>5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'</b>	335	2nd PCR for DD genotype
	CTEPD***	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	
15875760	COPD	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	1st PCR
	COPD	ACE I/D	<b>5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'</b>	<b>5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'</b>	335	real-time PCR(MALDI- TOF) + primer Rd
15364762- >7854377	HAPE	ACE I/D	<b>5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT -3'</b>	<b>5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'</b>	319 bp for D allele, 597 bp for I allele	1st PCR
	HAPE	ACE I/D	<b>5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'</b>	<b>5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'</b>	335	2nd PCR for DD genotype
15233837	COPD	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	real-time PCR(MALDI- TOF) + primer Rd

15017542	PPH in CDH****	ACE I/D	5' -CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5' -GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	1st PCR
	PPH in CDH	ACE I/D	<b>5' -TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'</b>	<b>5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3'</b>	335	2nd PCR for DD genotype
14682408	COPD-PH	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	1st PCR
	COPD-PH	ACE I/D	<b>5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'</b>	<b>5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3'</b>	335	2nd PCR for DD genotype
20156752	COPD	ACE I/D	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	190 bp D allele, 490 bp I allele	
	COPD	ACE I/D	5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'	5'-TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA-3'	335	2nd PCR for DD genotype

\*High-altitude pulmonary edema

\*\*Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn

\*\*\*Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

\*\*\*\*Persistent Pulmonary Hypertension in newborns with Congenital Diaphragmatic Hernia

Β. ΜΕΡΟΣ - ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΑΡΑΙΩΣΗ

Πίνακας Παραρτήματος 2: Μέτρηση όγκου δειγμάτων και αραιώση σε τελική συγκέντρωση 10 ng/μl.

Sample ID	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Αρχικός όγκος	Τελικός όγκος	Προσθήκη H <sub>2</sub> O	Final Concentration (ng/μl)
C1	1052	ng/μl	2105	1126	187	219	4	420,8	416,8	10
C2	430	ng/μl	859	460	187	216	4	172	168	10
C3	576	ng/μl	1152	617	187	197	4	230,4	226,4	10
C4	735	ng/μl	1469	853	172	113	4	294	290	10
C5	382	ng/μl	765	418	183	201	4	152,8	148,8	10
C6	932	ng/μl	1863	1013	184	213	4	372,8	368,8	10
C7	497	ng/μl	995	533	187	203	4	198,8	194,8	10
C8	602	ng/μl	1204	651	185	169	4	240,8	236,8	10
C9	2845	ng/μl	5690	3112	183	221	4	1138	1134	10
C10	637	ng/μl	1273	675	189	205	4	254,8	250,8	10
C11	532	ng/μl	1064	615	173	140	4	212,8	208,8	10
C12	195	ng/μl	390	216	181	161	4	78	74	10
C13	752	ng/μl	1503	808	186	210	4	300,8	296,8	10
C14	563	ng/μl	1126	608	185	219	4	225,2	221,2	10
C15	536	ng/μl	1073	585	183	192	4	214,4	210,4	10
C16	469	ng/μl	938	503	187	163	4	187,6	183,6	10
C17	351	ng/μl	703	391	180	165	4	140,4	136,4	10
C18	894	ng/μl	1787	962	186	206	4	357,6	353,6	10
C19	559	ng/μl	1118	616	182	188	4	223,6	219,6	10
C20	815	ng/μl	1629	876	186	221	4	326	322	10
C21	640	ng/μl	1279	683	187	193	3	192	189	10
C22	1034	ng/μl	2067	1115	185	171	4	413,6	409,6	10
C23	439	ng/μl	879	507	173	89	4	175,6	171,6	10
C24	442	ng/μl	883	482	183	186	4	176,8	172,8	10
C25	501	ng/μl	1002	562	178	137	4	200,4	196,4	10
C26	597	ng/μl	1194	647	184	184	4	238,8	234,8	10
C27	759	ng/μl	1518	833	182	211	4	303,6	299,6	10
C28	306	ng/μl	613	322	190	219	4	122,4	118,4	10
C29	643	ng/μl	1285	710	181	169	4	257,2	253,2	10
C30	968	ng/μl	1935	1039	186	211	4	387,2	383,2	10
C31	587	ng/μl	1173	635	185	202	4	234,8	230,8	10
C32	335	ng/μl	669	370	181	201	4	134	130	10
C33	641	ng/μl	1282	686	187	215	4	256,4	252,4	10
C34	362	ng/μl	723	403	179	205	4	144,8	140,8	10
C35	351	ng/μl	702	389	181	167	4	140,4	136,4	10
C36	490	ng/μl	980	533	184	215	4	196	192	10
C37	346	ng/μl	693	386	179	181	4	138,4	134,4	10
C38	385	ng/μl	769	416	185	194	4	154	150	10
C39	388	ng/μl	775	424	183	194	4	155,2	151,2	10
C40	510	ng/μl	1019	543	188	169	4	204	200	10
C41	135	ng/μl	269	177	152	41	4	54	50	10
C42	1040	ng/μl	2079	1160	179	123	4	416	412	10
C43	486	ng/μl	972	533	182	180	4	194,4	190,4	10
C44	388	ng/μl	776	425	183	208	4	155,2	151,2	10
C45	863	ng/μl	1725	1021	169	71	4	345,2	341,2	10
C46	376	ng/μl	751	411	183	162	4	150,4	146,4	10
C47	522	ng/μl	1044	572	183	186	4	208,8	204,8	10
C48	517	ng/μl	1034	785	132	53	4	206,8	202,8	10

C49	428	ng/μl	856	469	183	196	4	171,2	167,2	10
C50	279	ng/μl	557	315	177	183	3	83,7	80,7	10
C51	410	ng/μl	820	450	182	196	4	164	160	10
C52	499	ng/μl	998	545	183	176	4	199,6	195,6	10
C53	502	ng/μl	1004	535	188	226	4	200,8	196,8	10
C54	396	ng/μl	792	426	186	223	4	158,4	154,4	10
C55	541	ng/μl	1082	582	186	214	4	216,4	212,4	10
C56	388	ng/μl	775	418	186	177	4	155,2	151,2	10
C57	274	ng/μl	548	324	169	101	4	109,6	105,6	10
C58	634	ng/μl	1267	688	184	166	4	253,6	249,6	10
C59	507	ng/μl	1013	557	182	180	4	202,8	198,8	10
C60	616	ng/μl	1233	657	188	223	4	246,4	242,4	10
C61	147	ng/μl	295	163	181	190	3	44,1	41,1	10
C62	326	ng/μl	653	374	174	125	4	130,4	126,4	10
C63	598	ng/μl	1197	671	178	186	4	239,2	235,2	10
C64	204	ng/μl	408	233	175	154	4	81,6	77,6	10
C65	1220	ng/μl	2440	1309	186	224	4	488	484	10
C66	1776	ng/μl	3552	1935	184	157	4	710,4	706,4	10
C67	387	ng/μl	774	444	175	117	4	154,8	150,8	10
C68	229	ng/μl	457	256	178	160	4	91,6	87,6	10
C69	379	ng/μl	759	425	178	141	4	151,6	147,6	10
C70	492	ng/μl	983	533	185	202	4	196,8	192,8	10
C71	1528	ng/μl	3055	1629	188	225	4	611,2	607,2	10
C72	98	ng/μl	195	111	176	188	3	29,4	26,4	10
C73	363	ng/μl	726	408	178	150	4	145,2	141,2	10
C74	59	ng/μl	117	63	186	128	4	23,6	19,6	10
C75	773	ng/μl	1547	827	187	222	4	309,2	305,2	10
C76	241	ng/μl	482	270	179	152	4	96,4	92,4	10
C77	1307	ng/μl	2613	1426	183	169	4	522,8	518,8	10
C78	603	ng/μl	1206	649	186	213	4	241,2	237,2	10
C79	396	ng/μl	792	435	182	167	4	158,4	154,4	10
C80	734	ng/μl	1468	785	187	229	4	293,6	289,6	10
C81	634	ng/μl	1267	684	185	201	4	253,6	249,6	10
C82	277	ng/μl	553	302	183	206	4	110,8	106,8	10
C83	710	ng/μl	1420	776	183	178	4	284	280	10
C84	488	ng/μl	976	539	181	175	4	195,2	191,2	10
C85	301	ng/μl	603	329	183	170	4	120,4	116,4	10
C86	323	ng/μl	647	350	185	213	4	129,2	125,2	10
C87	779	ng/μl	1558	884	176	118	4	311,6	307,6	10
C88	167	ng/μl	334	182	183	73	4	66,8	62,8	10
P1	703	ng/μl	1405	764	184	181	4	281,2	277,2	10
P2	318	ng/μl	636	342	186	87	4	127,2	123,2	10
P3	350	ng/μl	699	387	181	139	4	140	136	10
P4	358	ng/μl	716	396	181	195	4	143,2	139,2	10
P5	245	ng/μl	490	279	176	145	4	98	94	10
P6	307	ng/μl	614	345	178	140	4	122,8	118,8	10
P7	260	ng/μl	520	275	189	220	4	104	100	10
P8	204	ng/μl	407	221	185	208	4	81,6	77,6	10
P9	282	ng/μl	564	330	171	96	4	112,8	108,8	10
P10	427	ng/μl	853	467	183	186	4	170,8	166,8	10
P11	443	ng/μl	885	479	185	212	4	177,2	173,2	10
P12	209	ng/μl	417	275	152	46	4	83,6	79,6	10
P13	484	Ng/μl	967	533	182	151	4	193,6	189,6	10
P14	47	ng/μl	94	86	109	19	4	18,8	14,8	10

P15	527	ng/μl	1055	560	188	213	4	210,8	206,8	10
P16	290	ng/μl	581	313	186	175	4	116	112	10
P17	422	ng/μl	843	449	188	175	4	168,8	164,8	10
P18	364	ng/μl	727	442	164	69	4	145,6	141,6	10
P19	1975	ng/μl	3951	2132	185	180	4	790	786	10
P20	264	ng/μl	528	291	181	148	4	105,6	101,6	10
P21	204	ng/μl	409	242	169	95	4	81,6	77,6	10
P22	203	ng/μl	407	230	177	103	4	81,2	77,2	10
P23	211	ng/μl	422	231	183	150	4	84,4	80,4	10
P24	206	ng/μl	411	252	163	109	4	82,4	78,4	10
P25	583	ng/μl	1166	622	188	225	4	233,2	229,2	10
P26	316	ng/μl	631	346	182	128	4	126,4	122,4	10
P27	196	ng/μl	392	214	183	159	4	78,4	74,4	10
P28	526	ng/μl	1051	561	187	183	4	210,4	206,4	10
P29	215	ng/μl	431	254	169	111	4	86	82	10
P30	401	ng/μl	803	429	187	193	4	160,4	156,4	10
P31	110	ng/μl	221	129	172	79	4	44	40	10
P32	358	ng/μl	715	414	173	104	4	143,2	139,2	10
P33	211	ng/μl	422	262	161	58	4	84,4	80,4	10
P34	823	ng/μl	1646	909	181	162	4	329,2	325,2	10
P35	204	ng/μl	408	219	187	172	4	81,6	77,6	10
P36	635	ng/μl	1270	723	176	109	4	254	250	10
P37	387	ng/μl	774	424	183	136	4	154,8	150,8	10
P38	428	ng/μl	856	451	190	235	4	171,2	167,2	10
P39	216	ng/μl	433	238	182	137	4	86,4	82,4	10
P40	897	ng/μl	1793	1029	174	116	4	358,8	354,8	10
P41	196	ng/μl	392	204	192	188	4	78,4	74,4	10
P42	539	ng/μl	1077	584	185	162	4	215,6	211,6	10
P43	728	ng/μl	1456	772	189	221	4	291,2	287,2	10
P44	286	ng/μl	573	325	176	127	4	114,4	110,4	10
P45	94	ng/μl	188	156	121	27	4	37,6	33,6	10
P46	546	ng/μl	1092	593	184	192	4	218,4	214,4	10
P47	953	ng/μl	1905	1028	185	204	4	381,2	377,2	10
P48	170	ng/μl	340	227	150	41	4	68	64	10
P49	465	ng/μl	929	503	185	218	4	186	182	10
P50	389	ng/μl	778	437	178	138	4	155,6	151,6	10
P51	377	ng/μl	753	399	189	202	4	150,8	146,8	10
P52	593	ng/μl	1186	629	189	214	4	237,2	233,2	10
P53	1077	ng/μl	2154	1177	183	170	4	430,8	426,8	10
P54	1173	ng/μl	2347	1246	188	221	4	469,2	465,2	10
P55	152	ng/μl	304	162	188	197	4	60,8	56,8	10
P56	332	ng/μl	665	398	167	92	4	132,8	128,8	10
P57	173	ng/μl	345	188	183	182	4	69,2	65,2	10
P58	638	ng/μl	1275	687	186	190	4	255,2	251,2	10
P59	171	ng/μl	342	205	167	81	4	68,4	64,4	10
P60	297	ng/μl	593	348	170	87	4	118,8	114,8	10
P61	323	ng/μl	646	362	179	143	4	129,2	125,2	10
P62	309	ng/μl	618	340	182	162	4	123,6	119,6	10
P63	348	ng/μl	696	379	184	125	4	139,2	135,2	10
P64	217	ng/μl	434	236	184	157	4	86,8	82,8	10
P65	191	ng/μl	383	213	180	125	4	76,4	72,4	10
P66	342	ng/μl	683	469	146	48	4	136,8	132,8	10
P67	493	ng/μl	985	551	179	150	4	197,2	193,2	10
P68	202	ng/μl	403	220	183	208	4	80,8	76,8	10

P69	526	ng/μl	1052	615	171	87	4	210,4	206,4	10
P70	285	ng/μl	569	336	169	101	4	114	110	10
P71	225	ng/μl	450	258	175	124	4	90	86	10
P72	108	ng/μl	216	185	117	12	4	43,2	39,2	10
P73	313	ng/μl	626	343	182	172	4	125,2	121,2	10
P74	150	ng/μl	301	165	183	112	4	60	56	10
P75	403	ng/μl	806	448	180	190	4	161,2	157,2	10
P76	331	ng/μl	663	356	186	167	4	132,4	128,4	10
P77	471	ng/μl	942	519	181	160	4	188,4	184,4	10
P78	408	ng/μl	816	439	186	190	4	163,2	159,2	10
P79	382	ng/μl	764	420	182	156	4	152,8	148,8	10
P80	686	ng/μl	1372	745	184	174	4	274,4	270,4	10
P81	488	ng/μl	976	542	180	181	4	195,2	191,2	10
P82	556	ng/μl	1113	599	186	228	4	222,4	218,4	10
P83	336	ng/μl	671	375	179	211	4	134,4	130,4	10
P84	405	ng/μl	810	452	179	155	4	162	158	10
P85	419	ng/μl	837	454	184	219	4	167,6	163,6	10
P86	346	ng/μl	691	371	186	219	4	138,4	134,4	10
P87	291	ng/μl	582	318	183	187	4	116,4	112,4	10
P88	734	ng/μl	1469	781	188	217	4	293,6	289,6	10

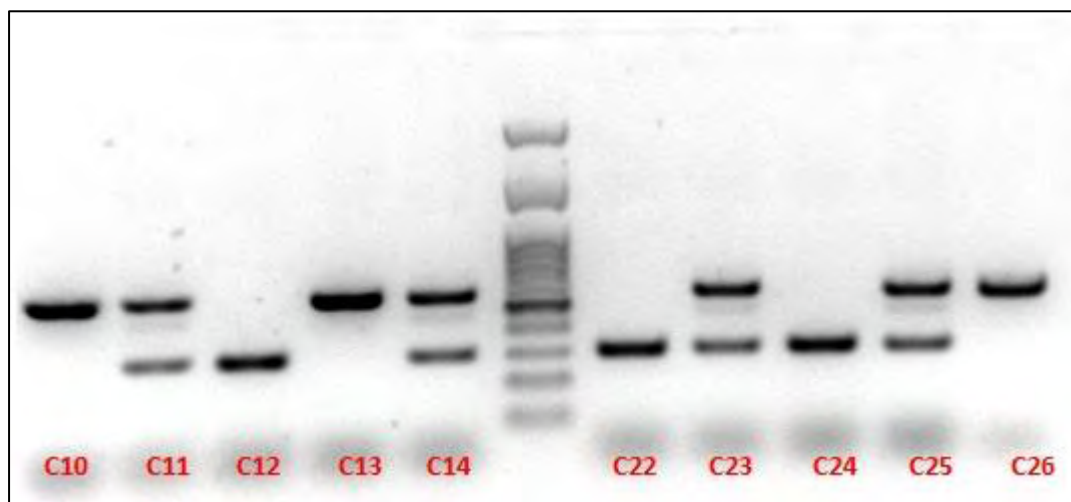
## Γ. ΜΕΡΟΣ - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ PCR ΚΑΙ ΕΥΡΕΣΗ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ

Για την εύρεση των γονοτύπων όλων των δειγμάτων έγιναν επαναληπτικές αντιδράσεις PCR. Η προετοιμασία και τα αποτελέσματα αυτών των αντιδράσεων φαίνονται σε αυτό το μέρος του παραρτήματος.

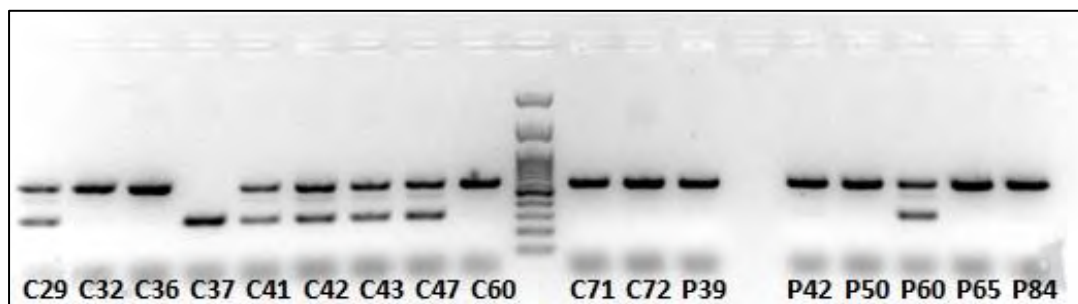
1<sup>ος</sup> κύκλος αντιδράσεων PCR με τη χρήση της πολυμεράσης KAPA HiFi (1 unit/μl) και τους εξής εκκινητές:

ACE-F: GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT

ACE-R: GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC



Εικόνα Παραρτήματος 1: Αντίδραση PCR με τα υπόλοιπα μολυσμένα δείγματα.

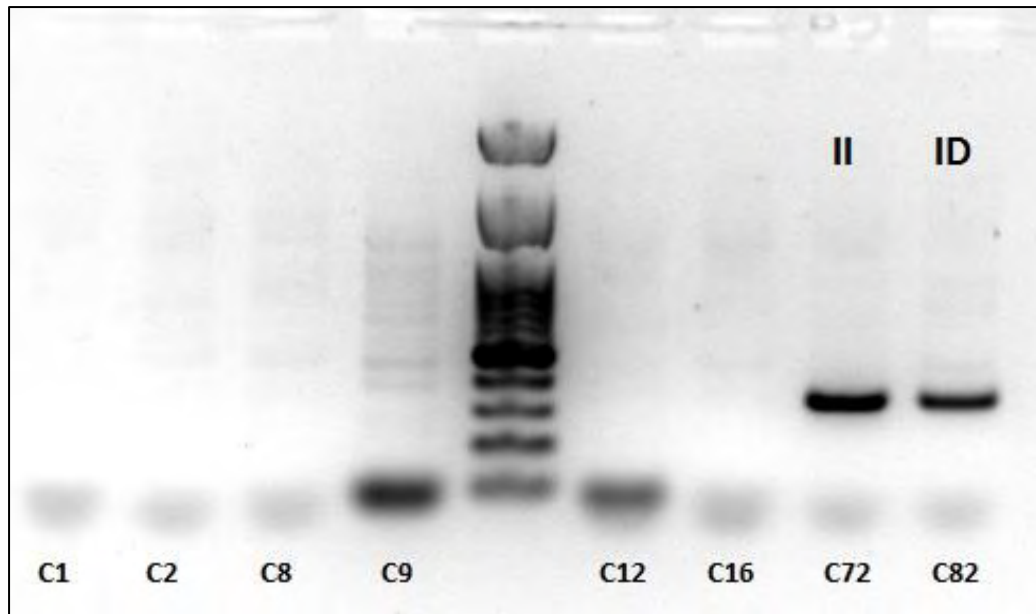


Εικόνα Παραρτήματος 2: Αντίδραση PCR για όσα δείγματα έδωσαν αβέβαια αποτελέσματα και έπρεπε να επαναληφθούν.

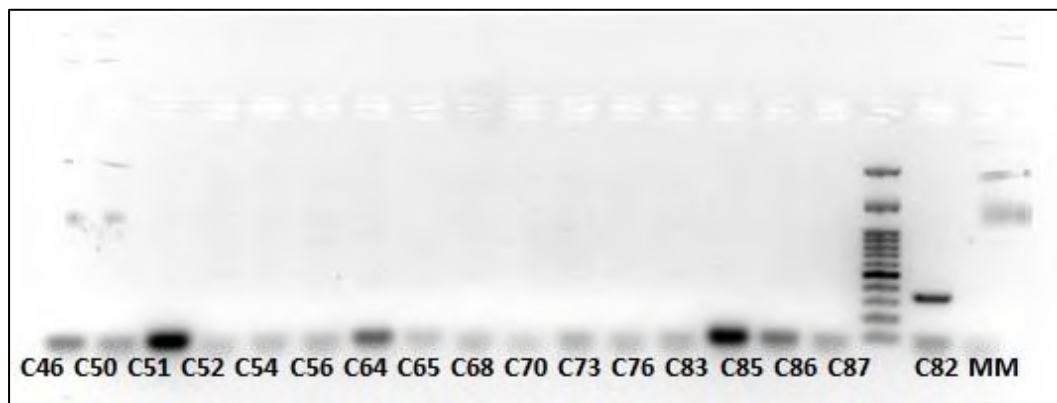
2<sup>ος</sup> κύκλος αντιδράσεων PCR για τα δείγματα που εμφάνισαν γονότυπο DD με τη χρήση της πολυμεράσης KAPA Taq KR0352 (5unit/ μl) και τους εξής εκκινητές:

ACE-Ins-F: TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC

ACE-Ins-R: TCGCCAGCCCTCCCATGCCATAA



Εικόνα Παραρτήματος 3: Αντίδραση PCR για τα δείγματα με γονότυπο DD. Τα δείγματα C72 και C82 χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου.



Εικόνα Παραρτήματος 4: Αντίδραση PCR για τα επόμενα δείγματα με γονότυπο DD. Τα δείγματα C82 και MM χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου.



Δ. ΜΕΡΟΣ- ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Πίνακας Παραρτήματος 3: Καταγραφή γονοτύπων.											
Sample ID	GENOTYPE 1st PCR	NEED REPEAT	NEED 2nd PCR	GENOTYPE 2ND PCR	FINAL GENOTYPE	Sample ID	GENOTYPE 1st PCR	NEED REPEAT	NEED 2nd PCR	GENOTYPE 2ND PCR	FINAL GENOTYPE
C1	DD		x	DD	DD	P1	DD		x	DD	DD
C2	DD		x	DD	DD	P2	DD		x	DD	DD
C3	ID				ID	P3	DD		x	DD	DD
C4	II				II	P4	II				II
C5	ID				ID	P5	ID				ID
C6	II				II	P6	ID				ID
C7	ID				ID	P7	ID				ID
C8	DD		x	DD	DD	P8	ID				ID
C9	DD		x	DD	DD	P9	II				II
C10	II				II	P10	DD		x	DD	DD
C11	ID				ID	P11	ID				ID
C12	DD		x	DD	DD	P12	ID				ID
C13	II				II	P13	ID				ID
C14	ID				ID	P14	DD		x	DD	DD
C15	II				II	P15	ID				ID
C16	DD		x	DD	DD	P16	ID				ID
C17	DD		x	DD	DD	P17	DD		x	DD	DD
C18	ID				ID	P18	DD		x	DD	DD
C19	II				II	P19	ID				ID
C20	ID				ID	P20	DD		x	DD	DD
C21	ID				ID	P21	DD		x	DD	DD
C22	DD		x	DD	DD	P22	ID				ID
C23	ID				ID	P23	ID				ID
C24	DD		x	DD	DD	P24	ID				ID
C25	ID				ID	P25	DD		x	DD	DD
C26	II				II	P26	DD		x	DD	DD
C27	DD		x	DD	DD	P27	ID				ID
C28	DD		x	DD	DD	P28	DD		x	DD	DD
C29	ID	ID			ID	P29	ID				ID
C30	ID				ID	P30	DD		x	DD	DD
C31	DD		x	DD	DD	P31	ID				ID
C32	I-	II			II	P32	DD		x	DD	DD
C33	DD		x	DD	DD	P33	DD		x	DD	DD

C34	ID			ID	P34	ID		ID					
C35	DD		x	DD	DD	DD		x	DD	DD			
C36	I-	II			II	P36	DD		x	DD	DD		
C37	-	DD		x	DD	DD	P37	ID			ID		
C38	ID				ID	P38	ID				ID		
C39	DD			x	DD	DD	P39	I-	II		II		
C40	ID				ID	P40	ID				ID		
C41	ID	ID			ID	P41	ID				ID		
C42	-	ID			ID	P42	I-	II			II		
C43	D-	ID			ID	P43	DD			x	DD	DD	
C44	DD			x	DD	DD	P44	ID			ID		
C45	ID				ID	P45	ID				ID		
C46	DD			x	DD	DD	P46	ID			ID	ID	
C47	-	ID			ID	P47	DD			x	DD	DD	
C48	ID				ID	P48	ID				ID		
C49	ID				ID	P49	DD			x	DD	DD	
C50	DD			x	DD	DD	P50	I-	II		II		
C51	DD			x	DD	DD	P51	ID			ID		
C52	DD			x	DD	DD	P52	ID			ID		
C53	ID				ID	P53	DD			x	DD	DD	
C54	DD			x	DD	DD	P54	ID			ID		
C55	ID	x			ID	P55	DD			x	DD	DD	
C56	DD			x	DD	DD	P56	ID			ID		
C57	ID				ID	P57	ID				ID		
C58	ID				ID	ID	P58	DD			x	DD	DD
C59	ID				ID	P59	ID				ID		
C60	ID	II			II	P60	-	ID			ID	ID	
C61	ID				ID	P61	ID				ID		
C62	II				II	P62	ID				ID		
C63	II				II	P63	ID				ID		
C64	DD			x	DD	DD	P64	ID			ID		
C65	DD			x	DD	DD	P65	ID	II		II		
C66	II				II	P66	DD			x	DD	DD	
C67	ID				ID	P67	DD			x	DD	DD	
C68	DD			x	DD	DD	P68	DD			x	DD	DD
C69	II				II	P69	ID				ID		
C70	DD			x	DD	DD	P70	ID			ID		
C71	II	II			II	P71	DD			x	DD	DD	
C72	I-	II			II	P72	ID				ID		
C73	DD			x	DD	DD	P73	ID			ID		
C74	ID				ID	P74	DD			x	DD	DD	

C75	ID			ID	P75	ID			ID
C76	DD	x	DD	DD	P76	ID			ID
C77	II			II	P77	ID			ID
C78	ID			ID	P78	ID			ID
C79	ID			ID	P79	DD	x	DD	DD
C80	II			II	P80	ID			ID
C81	II			II	P81	DD	x	DD	DD
C82	ID			ID	P82	DD	x	DD	DD
C83	DD	x	DD	DD	P83	ID			ID
C84	ID			ID	P84	II	II		II
C85	DD	x	DD	DD	P85	ID			ID
C86	DD	x	DD	DD	P86	ID			ID
C87	DD	x	DD	DD	P87	DD	x	ID	ID
C88	ID			ID	P88	ID			ID

#### E. ΜΕΡΟΣ - ΑΠΟΡΡΙΦΘΕΙΣΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Πίνακας Παραρτήματος 4: Απορριφθείσες μελέτες			
Pmid	Year	Country	Rejection Reason
23702088	2012	China	Χωρίς πρόσβαση
23272666	2013	China	Χωρίς πρόσβαση
22876865	2012	China	Χωρίς πρόσβαση
18713090	2008	China	Χωρίς πρόσβαση
18229571	2007	UK	Χωρίς πρόσβαση
23603420	2013	China	Ασθένεια HAPE
22508396	2012	China	Review
22156739	2012	India	Ασθένεια HAPE
21756232	2011	Greece	Χωρίς πρόσβαση
21525147	2011	China	Ασθένεια HAPE
21418104	2011	USA	Ασθένεια PPHN
20581171	2010	USA	Έρευνα σε ποντίκια
19332265	2013	USA	Χωρίς δεδομένα για μετα- ανάλυση
19051722	2008	Japan	Άρθρο στα ιαπωνικά
16936432	2006	Japan	Ασθένεια CTEPH
15364762	2004	Japan	Δεδομένα που συμπεριλήφθηκαν σε πιο πρόσφατη μελέτη
15233837	2004	Japan	Δεδομένα που συμπεριλήφθηκαν σε πιο πρόσφατη μελέτη
12832683	2003	Japan	Δεδομένα που συμπεριλήφθηκαν σε πιο πρόσφατη μελέτη
11029323	2000	Japan	Δεδομένα που συμπεριλήφθηκαν σε πιο πρόσφατη μελέτη
1313972	1992	France	Χωρίς δεδομένα για PCR

1319114	1992	France	Χωρίς δεδομένα για μετα- ανάλυση
16356438	2005	USA	Ασθένεια BPD
7854377	1995	Massachusetts	Ασθένεια CHD
1976655	1990	France	Χωρίς δεδομένα για μετα- ανάλυση
21928698	2011	Japan	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη
17035401	2006	Japan	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη
14504630	2003	Japan	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη
11317203	2000	Australia	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη
7554183	1995	Australia	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη
8083349	2006	Australia	Δεδομένα υγιών επιλέχθηκαν από άλλη μελέτη

## Z. ΜΕΡΟΣ- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ

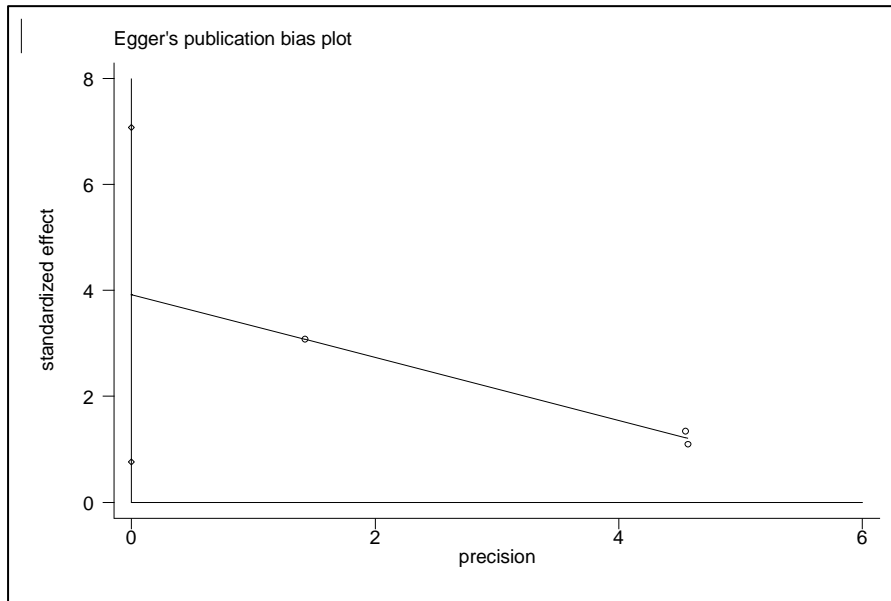
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μετα-ανάλυση για τον έλεγχο της συσχέτισης του πολυμορφισμού I/D του γονιδίου ACE με την ασθένεια της πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και της πνευμονικής υπέρτασης που οφείλεται σε χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Τα υπόλοιπα αποτελέσματα από τις μετα-αναλύσεις για κάθε μία από αυτές τις ασθένειες συμπεριλαμβάνονται σε αυτό το μέρος του παραρτήματος.

### 1. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ

#### Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης

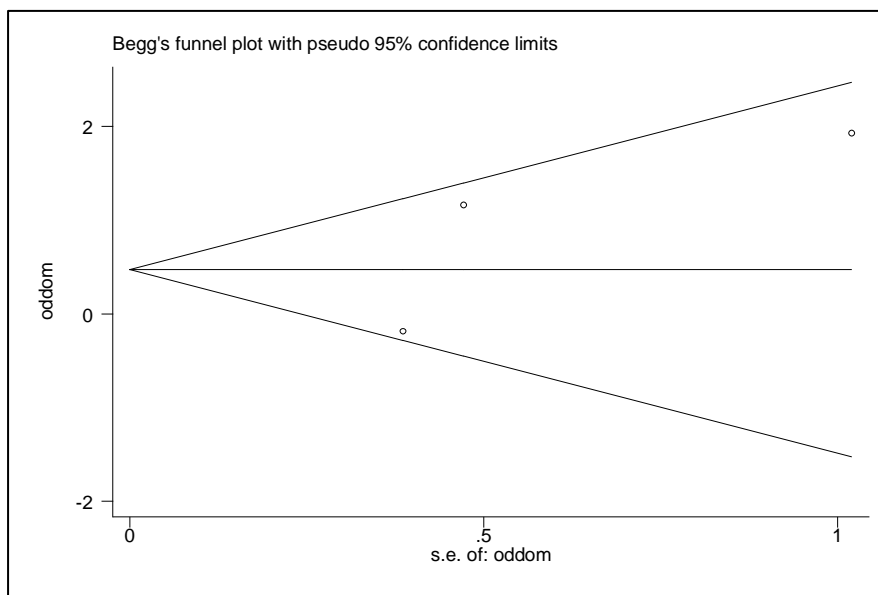
Πίνακας Παραρτήματος 5: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από τον έλεγχο του συστηματικού σφάλματος με τα test του Begg και Egger.		
Σύγκριση	Begg's test P-value	Egger's test P-value
<b>D vs I</b>	0.296	0.040
<b>DD+ID vs II</b>	1.000	0.469
<b>DD vs ID+II</b>	0.296	0.473

### Αλληλόμορφα I vs D

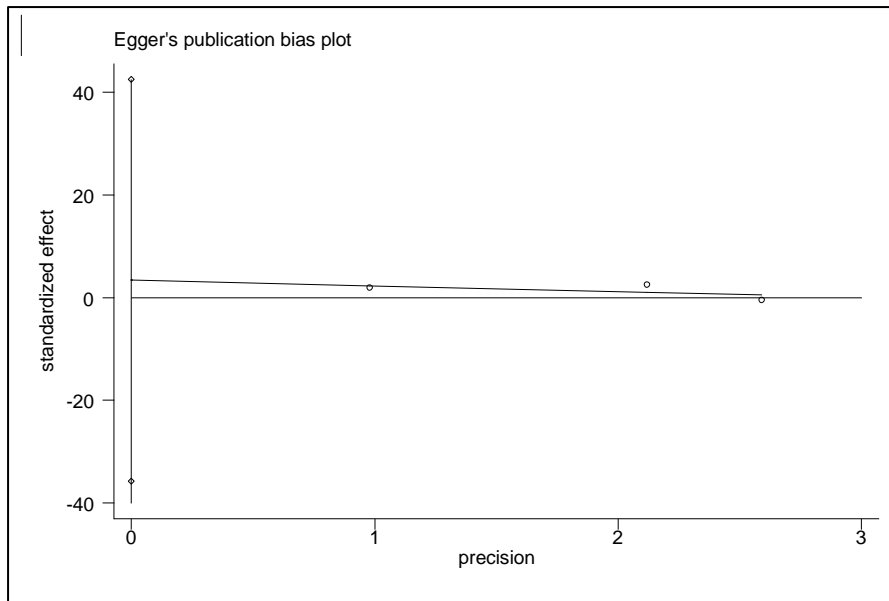


Εικόνα Παραρτήματος 5: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

### Γονότυπος DD+ID vs II

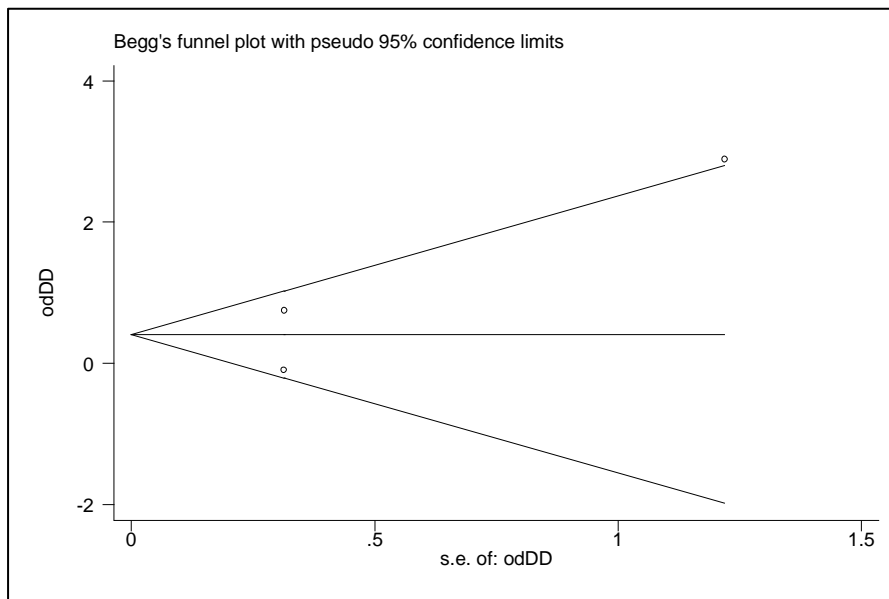


Εικόνα Παραρτήματος 6: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

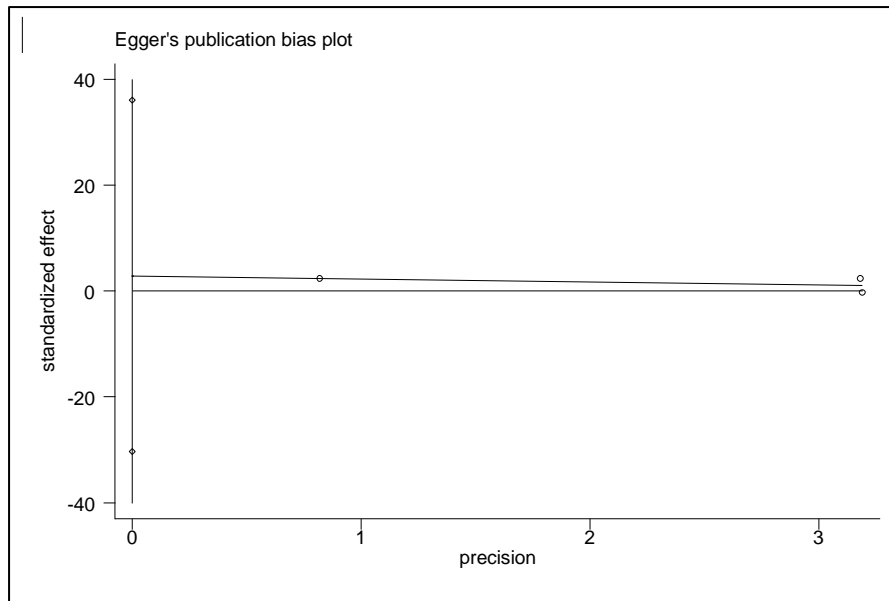


Εικόνα Παραρτήματος 7: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

### Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 8: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II.



Εικόνα Παραρτήματος 9: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II .

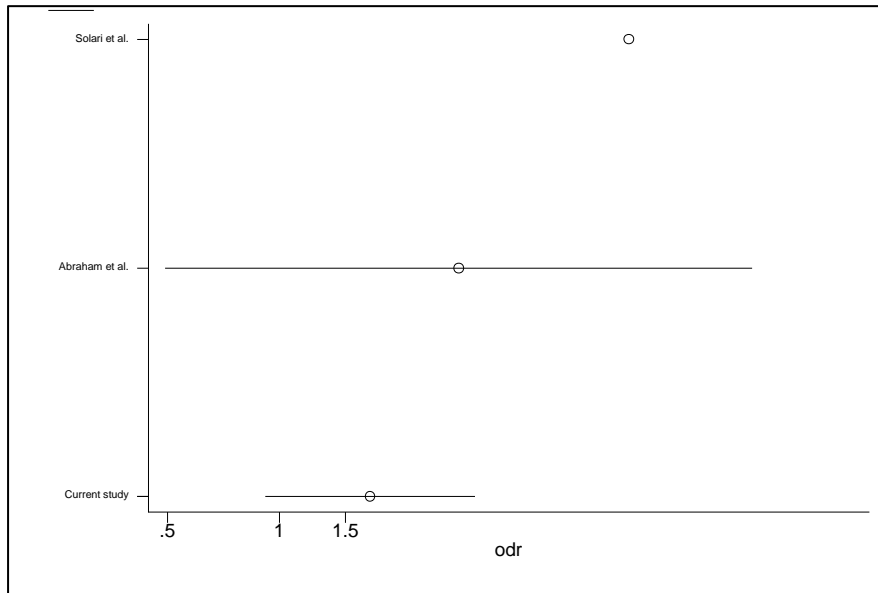
### Ισορροπία Hardy Weinberg (HWE)

Πίνακας Παραρτήματος 6: Αποτελέσματα έλεγχου HWE.		
Συγγραφέας	P-value	Ισορροπία HWE
Abraham et al.	0.1976	ναι
Solari et al.	1.0000	ναι
Current Study	0.1307	ναι

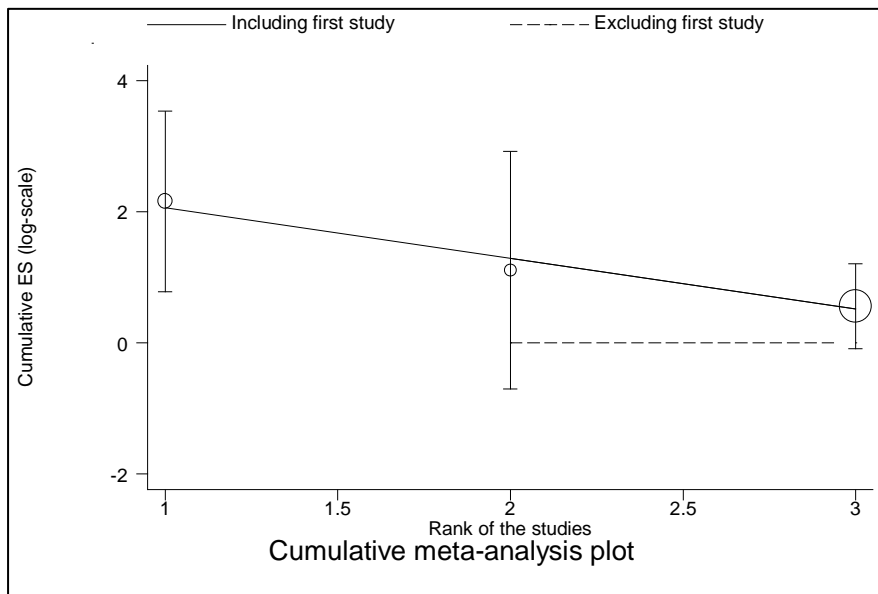
### Αθροιστική μετα-ανάλυση

Σύγκριση	P-value	Regression Approach's P-value	
		Including all studies	Excluding first study
<b>D vs I</b>	0.090	0.000	-
<b>DD+ID vs II</b>	0.213	-	-
<b>DD vs ID+II</b>	0.198	0.000	-

## Αλληλόμορφα I vs D



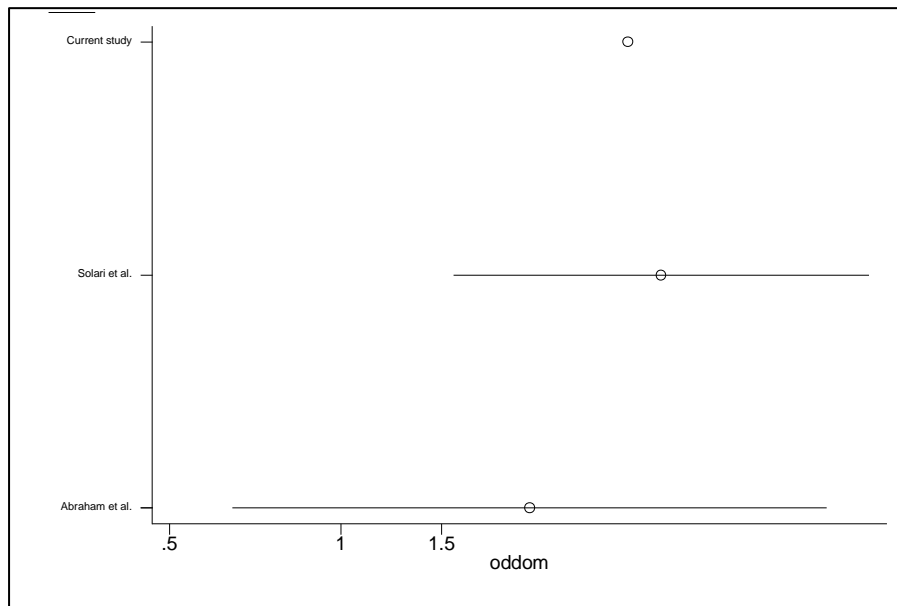
Εικόνα Παραρτήματος 10: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.



Εικόνα Παραρτήματος 11: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή *metatrend* που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων.

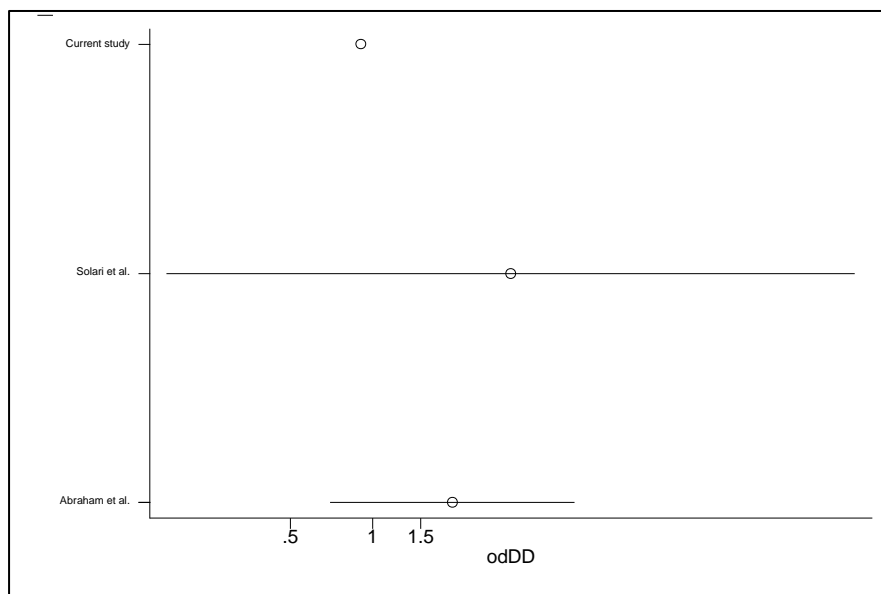


### Γονότυπος DD+ID vs II

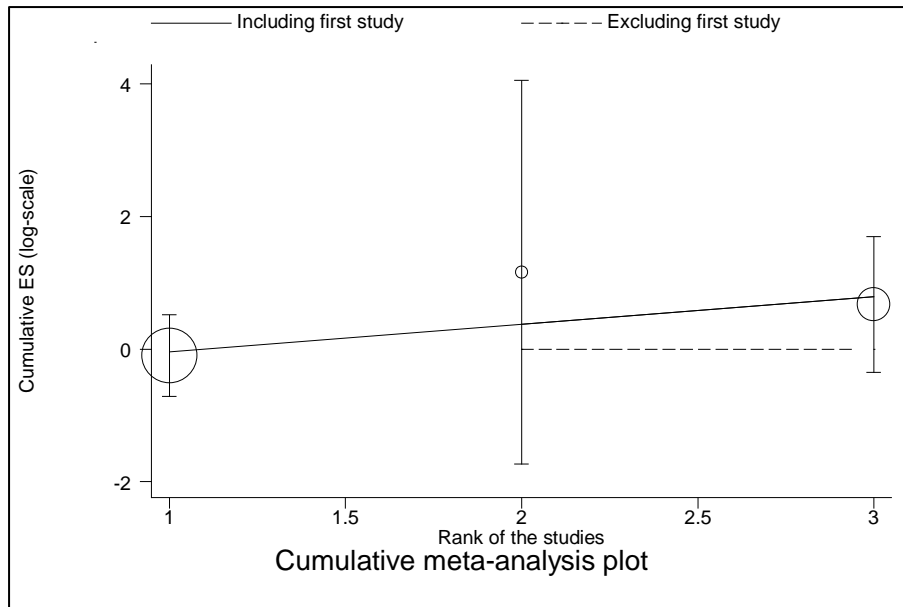


Εικόνα Παραρτήματος 12: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

### Γονότυπος DD vs ID+II



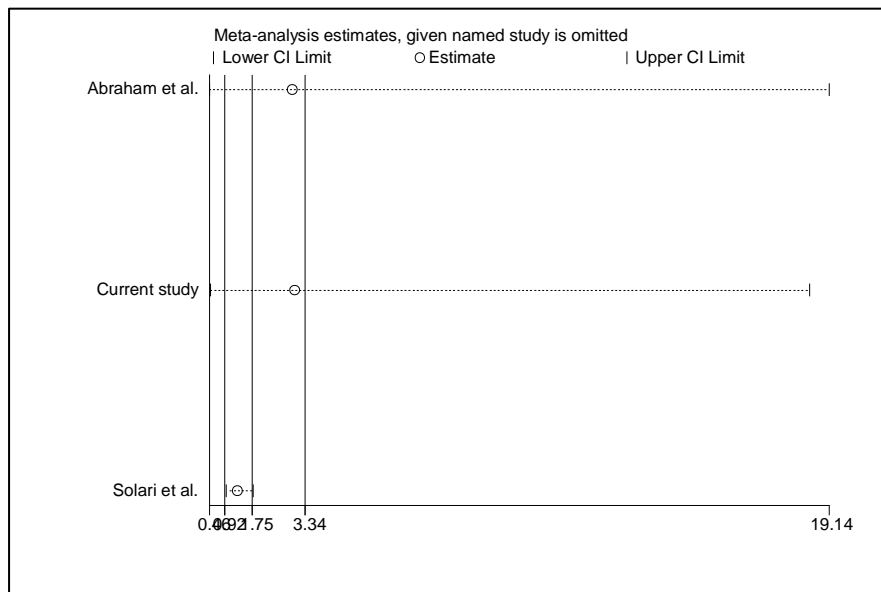
Εικόνα Παραρτήματος 13: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.



Εικόνα Παραρτήματος 14: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή *metatrend* που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση του γονότυπου *DD* έναντι των γονότυπων *ID +II*.

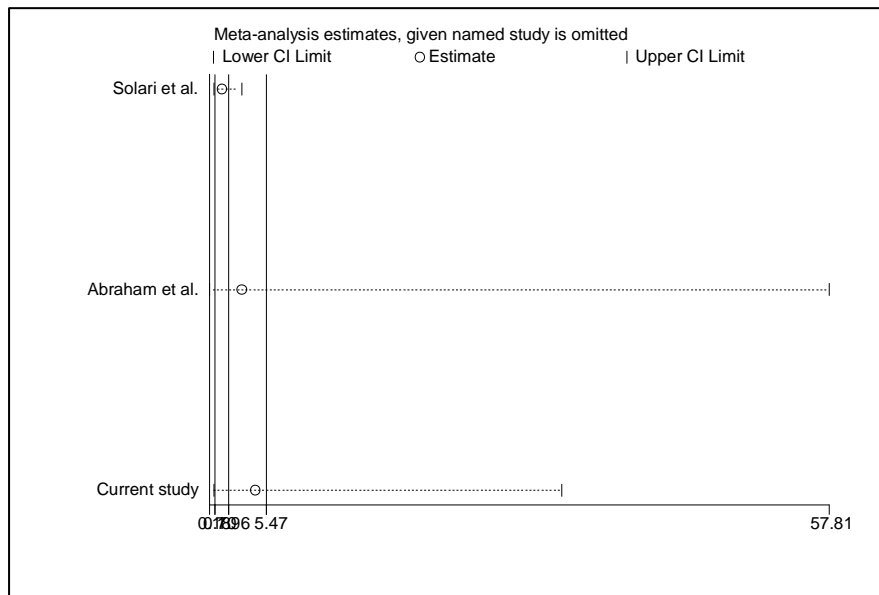
## Αφαιρετική μετα-ανάλυση

### Αλληλόμορφα *I* vs *D*



Εικόνα Παραρτήματος 15: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των αλληλόμορφων *I* και *D*.

## Γονότυπος DD vs ID+II



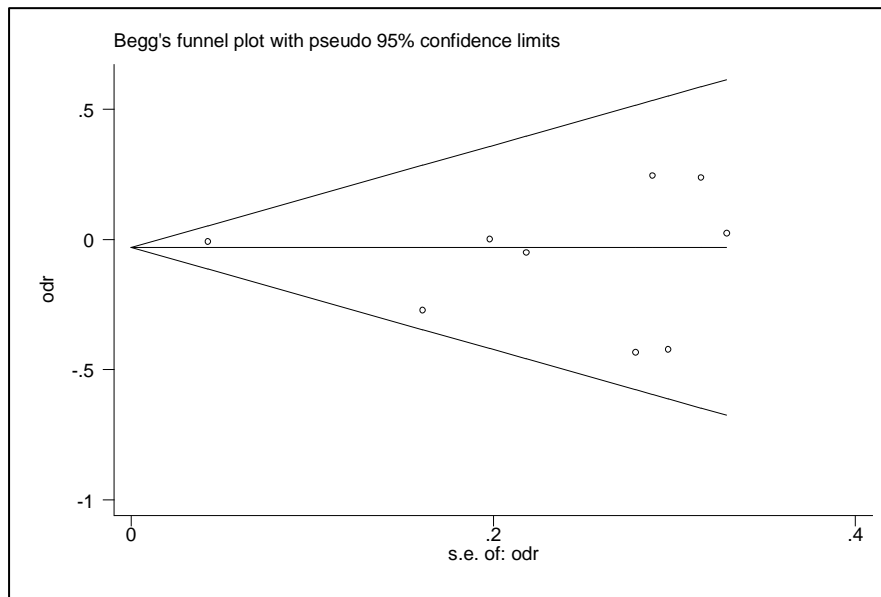
Εικόνα Παραρτήματος 16: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.

## 2. ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

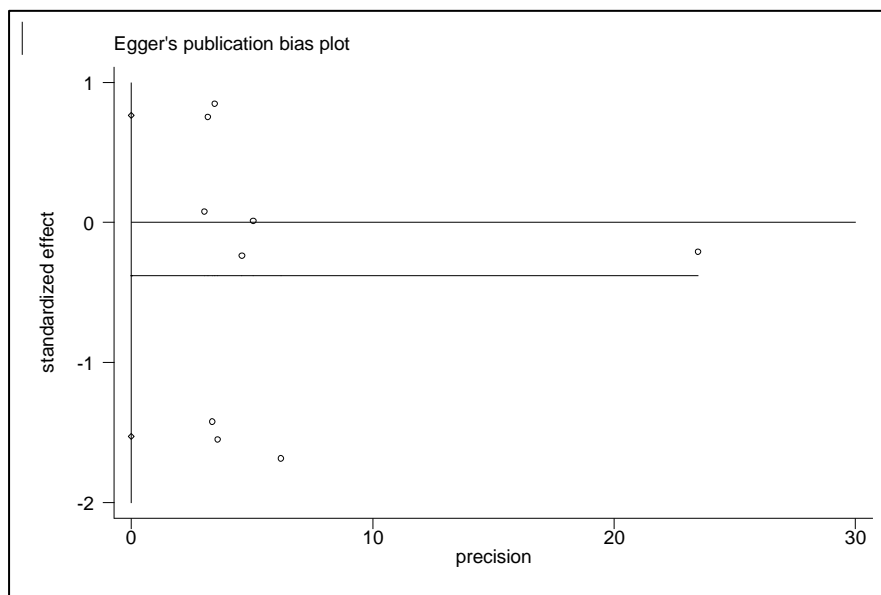
### Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης

Πίνακας Παραρτήματος 8: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από τον έλεγχο του συστηματικού σφάλματος με τα test του Begg και Egger.		
Σύγκριση	Begg's test P-value	Egger's test P-value
D vs I	0.917	0.456
DD+ID vs II	0.602	0.308
DD vs ID+II	0.754	0.671

### Αλληλόμορφα I vs D

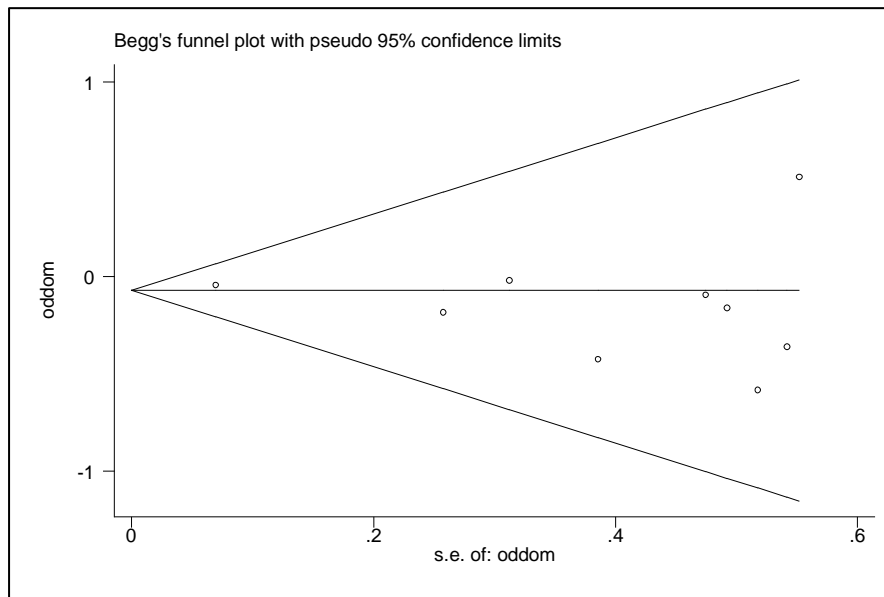


Εικόνα Παραρτήματος 17: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

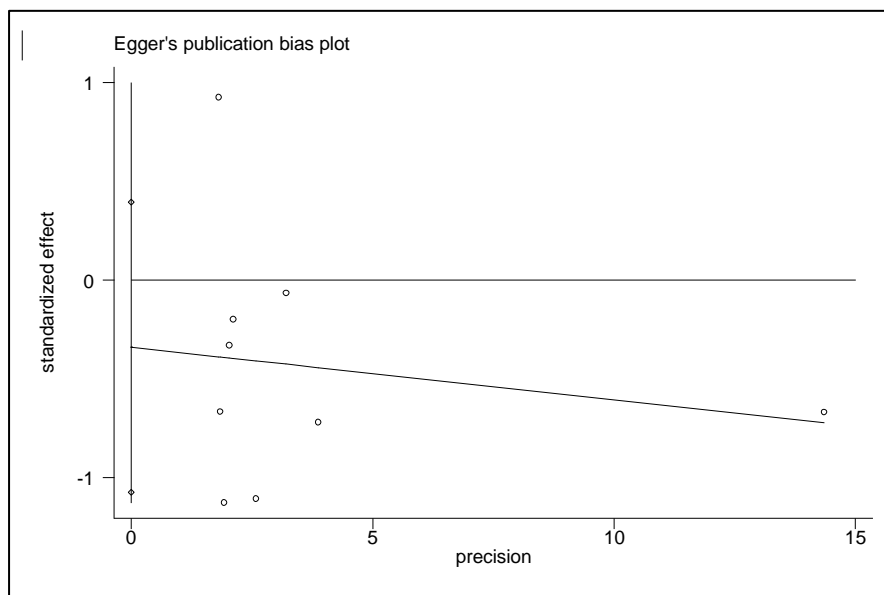


Εικόνα Παραρτήματος 18: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

Γονότυπος DD+ID vs II

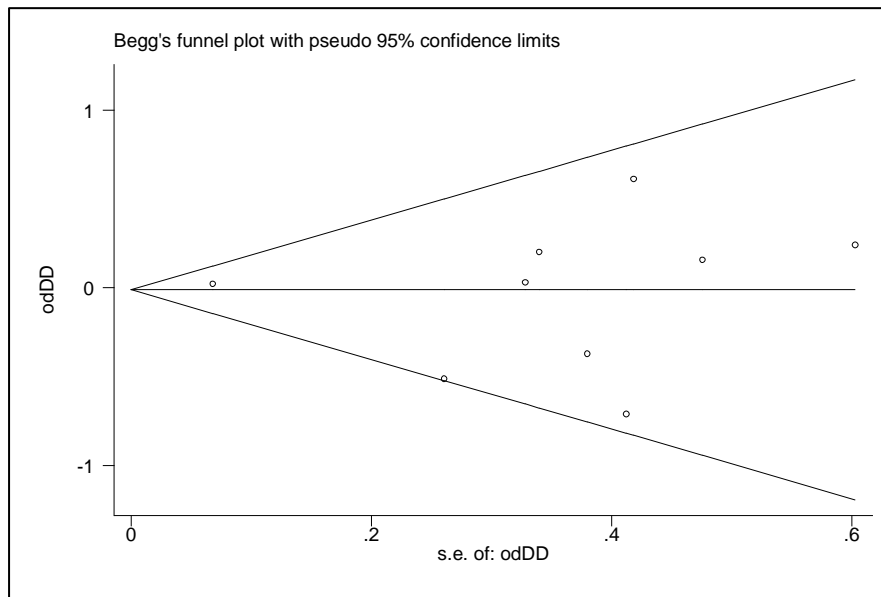


Εικόνα Παραρτήματος 19: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

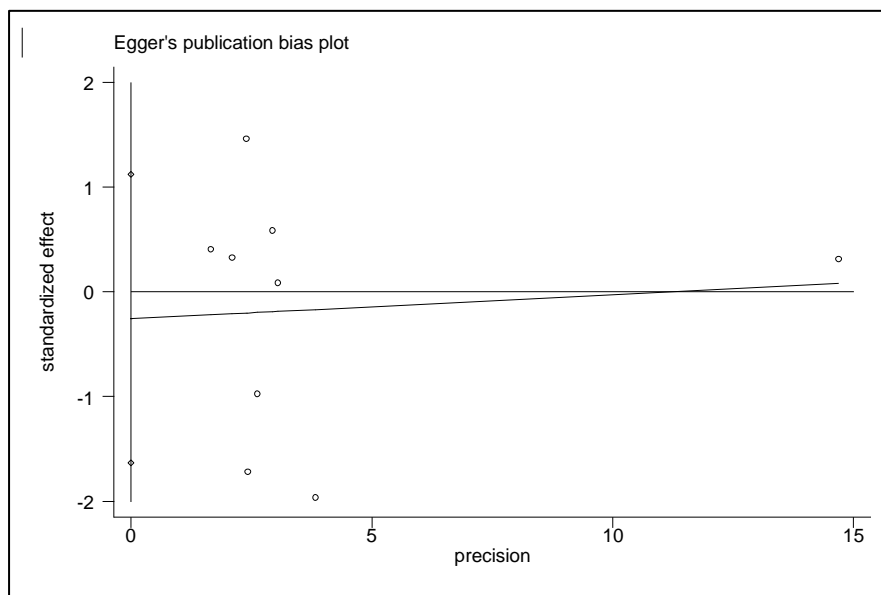


Εικόνα Παραρτήματος 20: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 21: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II .



Εικόνα Παραρτήματος 22: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II .

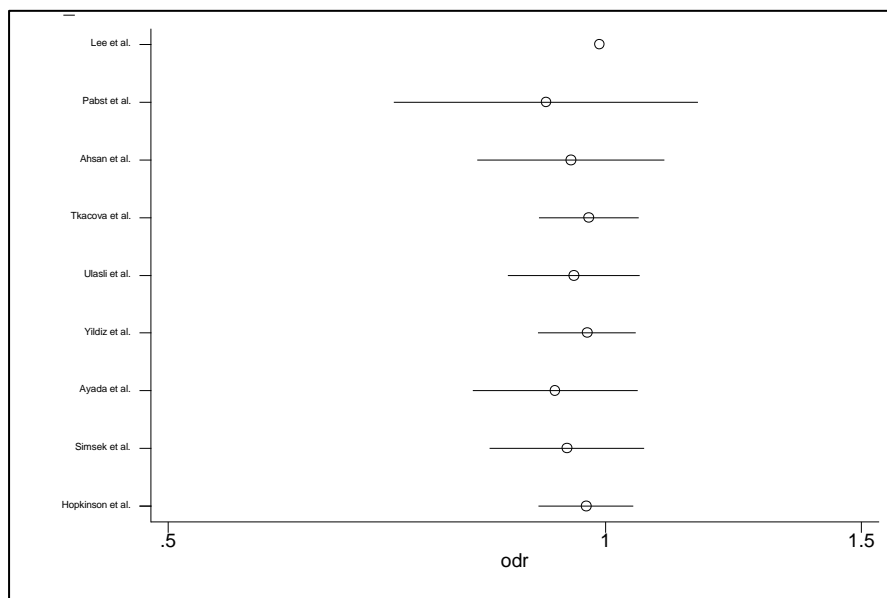
## Ισορροπία Hardy Weinberg (HWE)

Πίνακας Παραρτήματος 9: Αποτελέσματα έλεγχου HWE.		
Συγγραφέας	P-value	Ισορροπία HWE
Ulasli et al.	0.0068	όχι
Τκάcovά et al.	0.0952	ναι
Ahsan et al.	0.8037	ναι
Yildiz et al.	0.5371	ναι
Ayada et al.	0.7862	ναι
Simsek et al.	1.0000	ναι
Pabst et al.	0.1494	ναι
Lee et al.	0.5277	ναι
Hopkinson et al.	0.8421	ναι

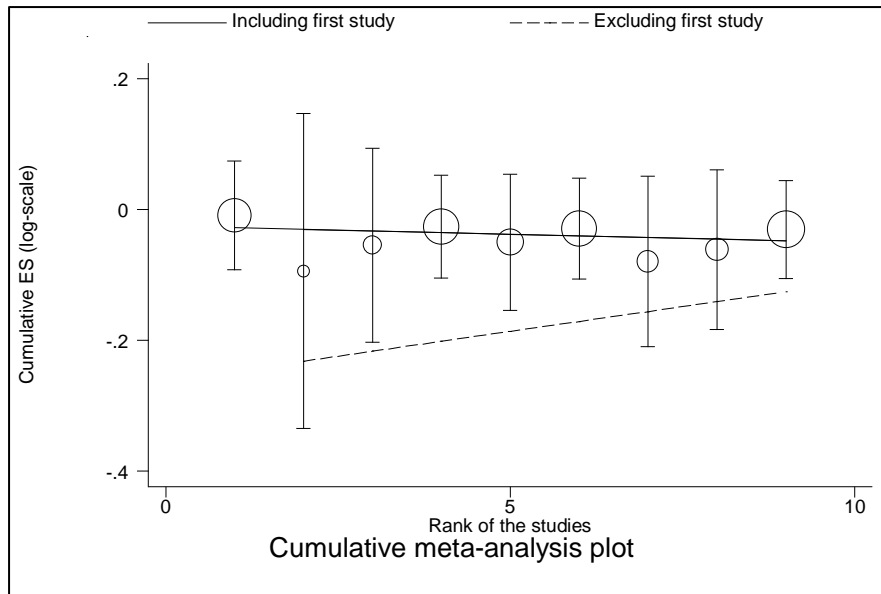
## Αθροιστική μετα-ανάλυση

Σύγκριση	P-value	Regression Approach's P-value	
		Including all studies	Excluding first study
<b>D vs I</b>	0.417	0.243	0.000
<b>DD+ID vs II</b>	0.253	0.000	0.438
<b>DD vs ID+II</b>	0.601	0.021	0.001

## Αλληλόμορφα I vs D

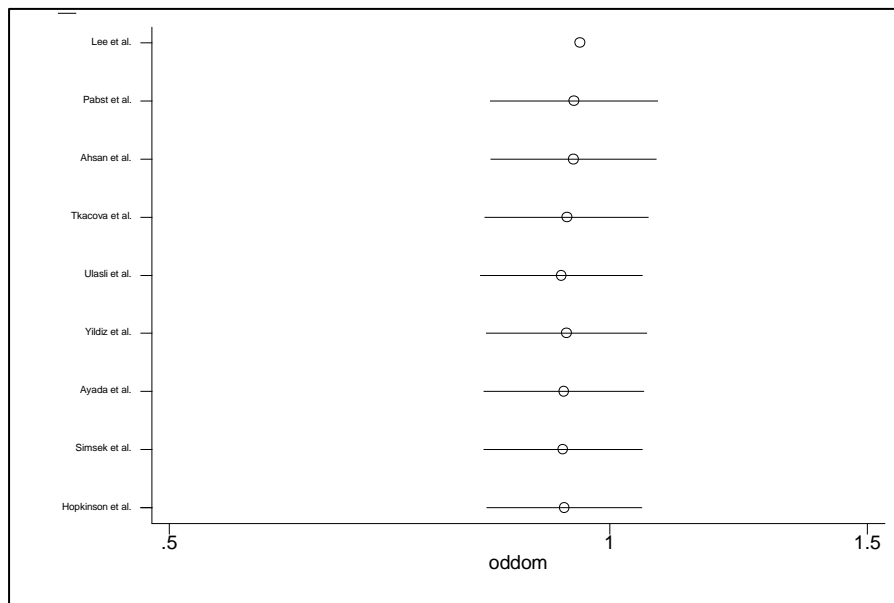


Εικόνα Παραρτήματος 23: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.



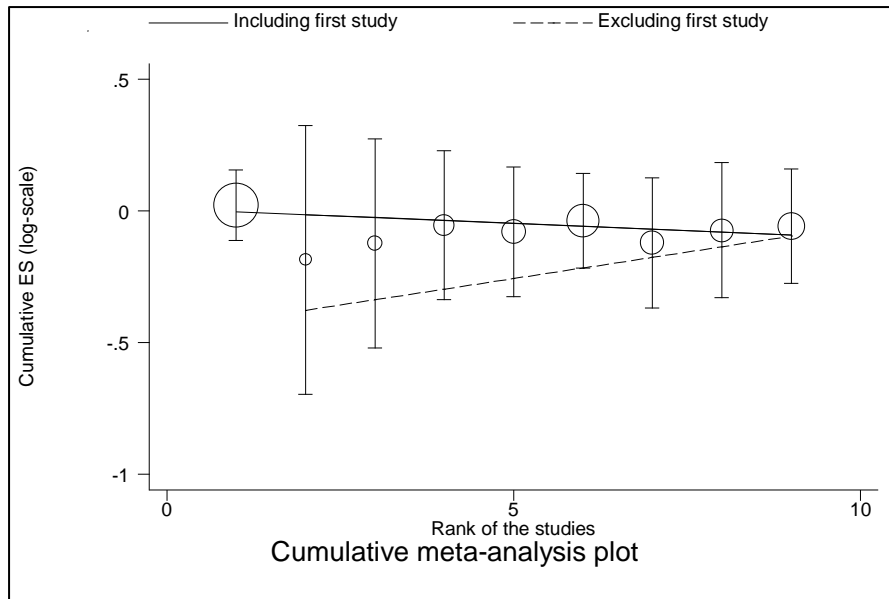
Εικόνα Παραρτήματος 24: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή metatrend που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων.

Γονότυπος DD+ID vs II



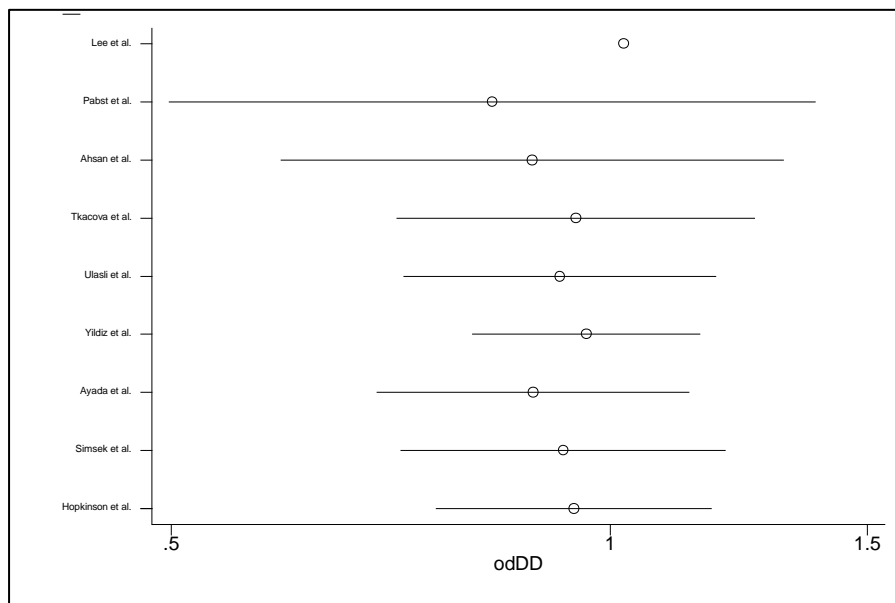
Εικόνα Παραρτήματος 25: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.



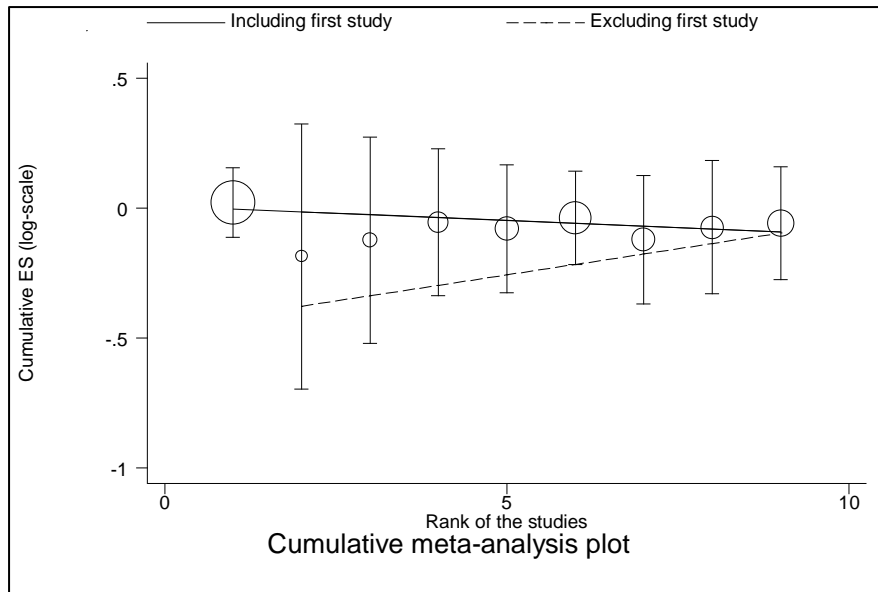


Εικόνα Παραρτήματος 26: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή *metatrend* που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των γονοτύπων *DD+ID* έναντι του γονότυπου *II*.

### Γονότυπος *DD* vs *ID+II*



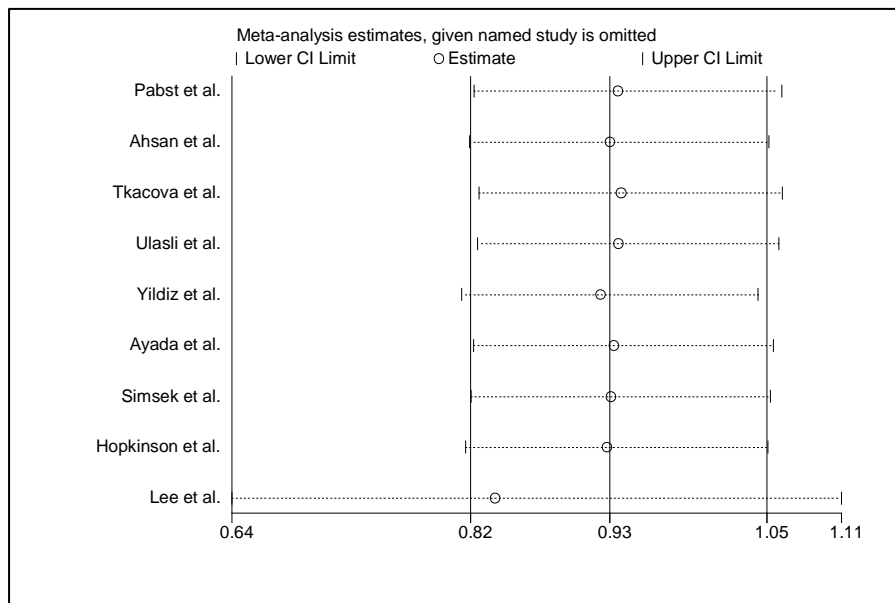
Εικόνα Παραρτήματος 27: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου *DD* έναντι των γονοτύπων *ID+II*.



Εικόνα Παραρτήματος 28: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή metatrend που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονότυπων ID+ II.

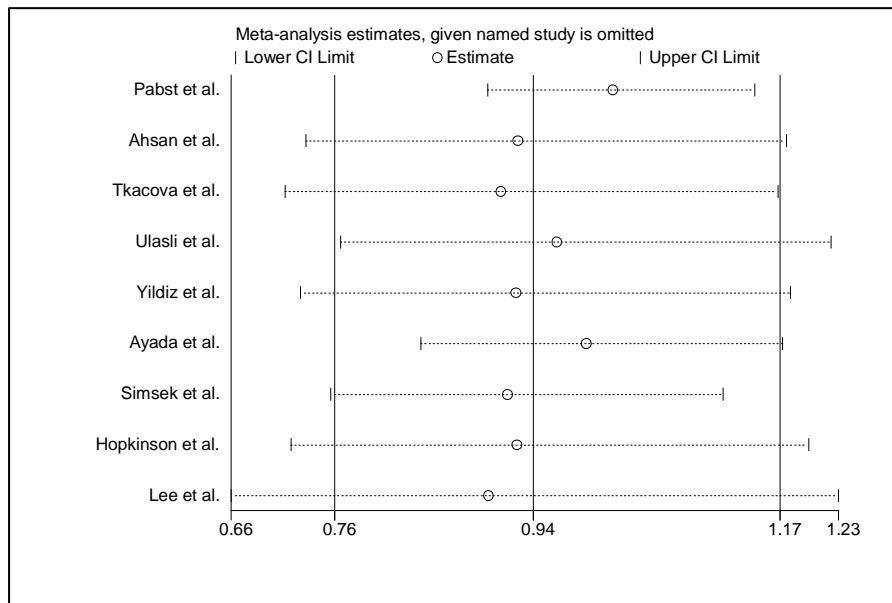
## Αφαιρετική μετα-ανάλυση

### Γονότυπος DD+ID vs II



Εικόνα Παραρτήματος 29: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονότυπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

### Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 30: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.

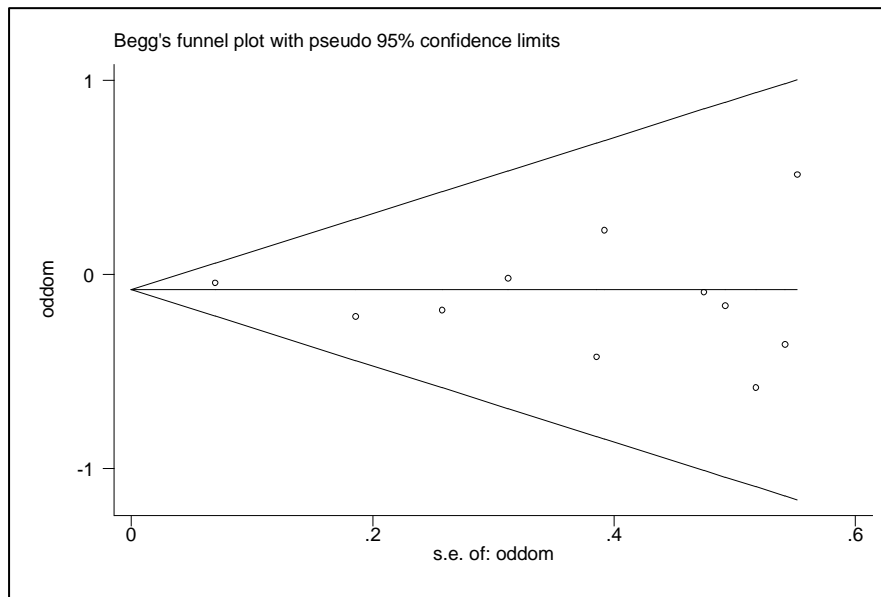
### 3. ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ (2 Επιπρόσθετες μελέτες)

#### Έλεγχος συστηματικού σφάλματος δημοσίευσης

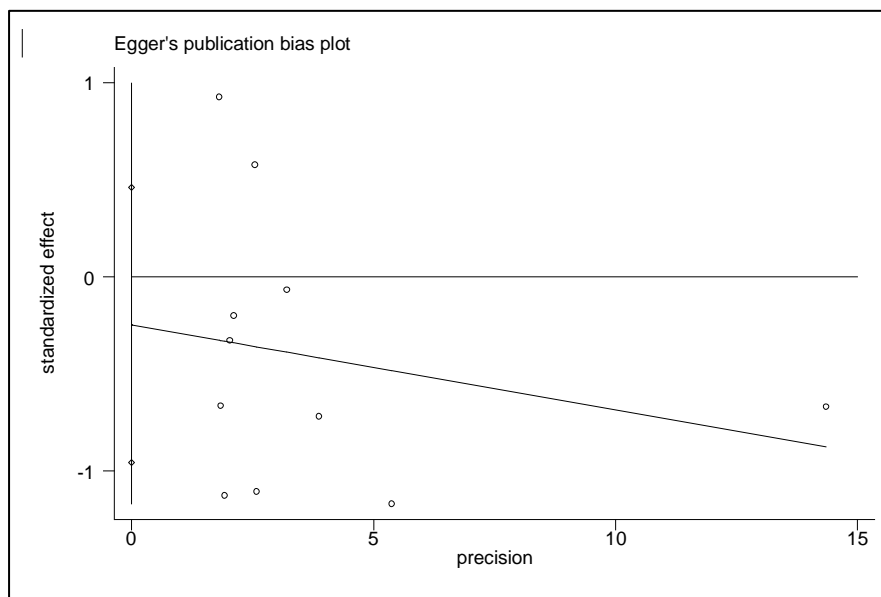
Πίνακας Παραρτήματος 11: Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από τον έλεγχο του συστηματικού σφάλματος με τα test του Begg και Egger.		
Σύγκριση	Begg's test P-value	Egger's test P-value
D vs I	0.640	0.860
DD+ID vs II	0.876	0.447
DD vs ID+II	0.350	0.845



Γονότυπος DD+ID vs II

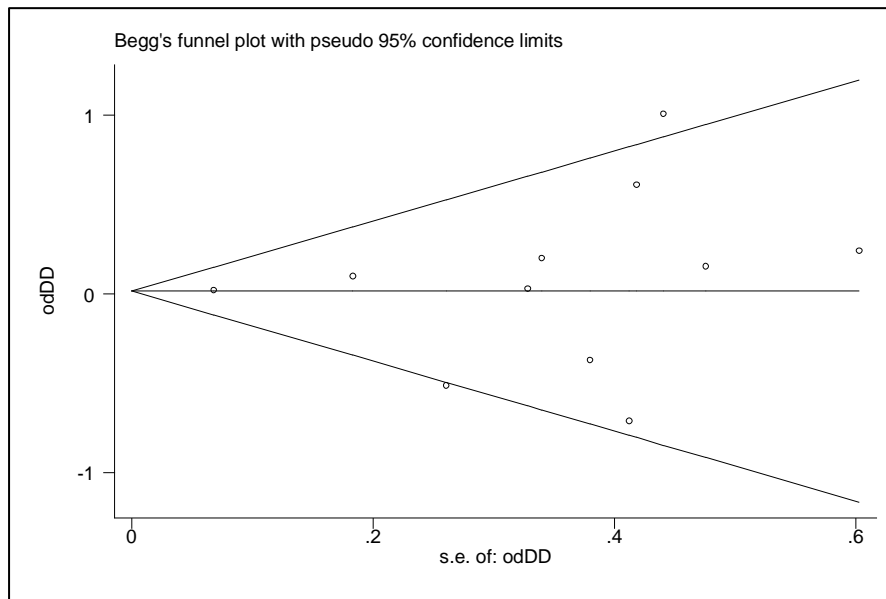


Εικόνα Παραρτήματος 33: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

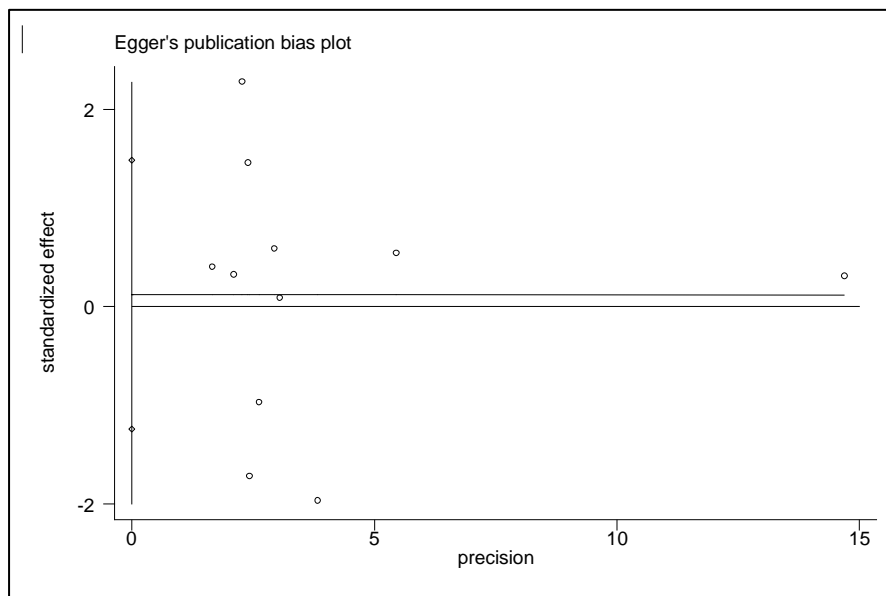


Εικόνα Παραρτήματος 34: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 35: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II .



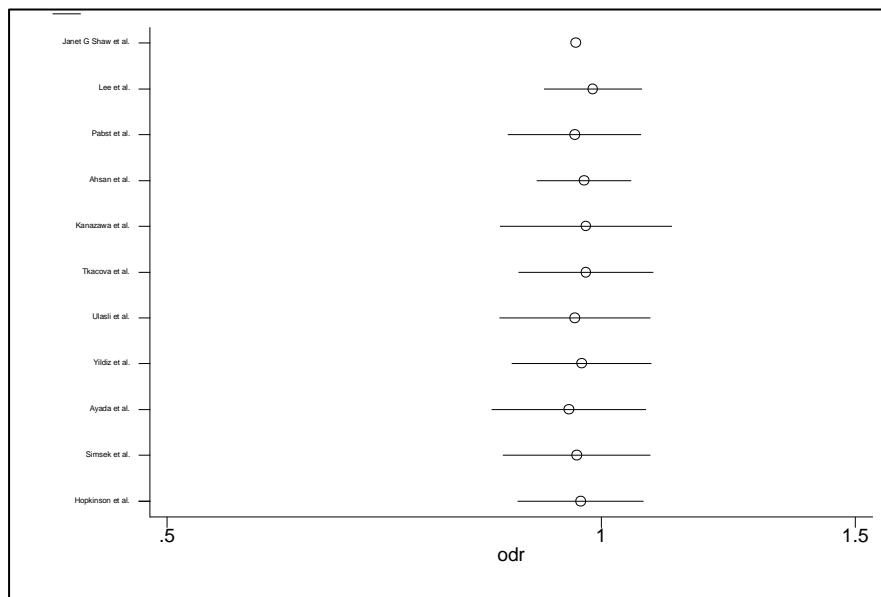
Εικόνα Παραρτήματος 36: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση του γονότυπου DD έναντι των γονοτύπων ID+II .

## Αθροιστική μετα-ανάλυση

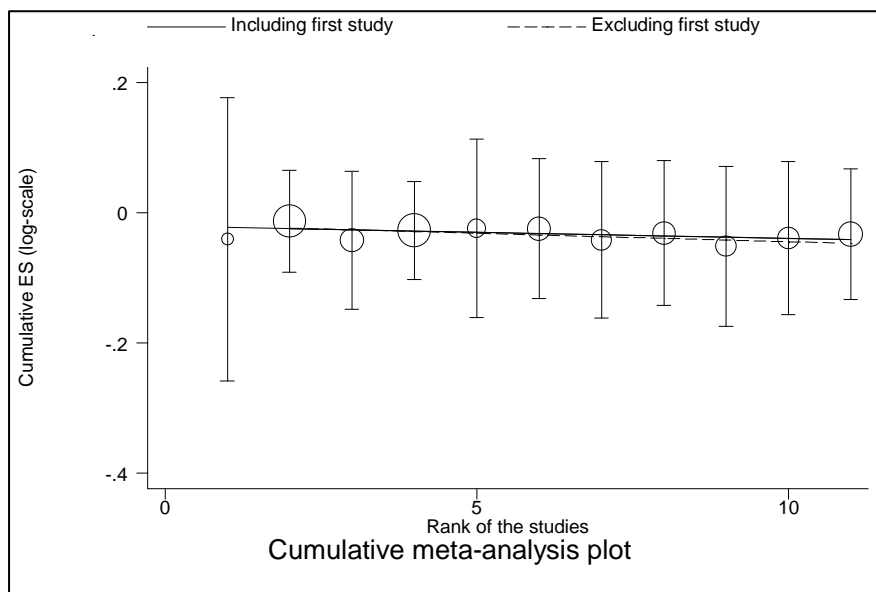
Πίνακας Παραρτήματος 12: Αποτελέσματα της αθροιστικής μετα-ανάλυσης.

Σύγκριση	P-value	Regression Approach's P-value	
		Including all studies	Excluding first study
<b>D vs I</b>	0.517	0.000	0.144
<b>DD+ID vs II</b>	0.176	0.945	0.000
<b>DD vs ID+II</b>	0.874	0.590	0.696

### Αλληλόμορφα I vs D

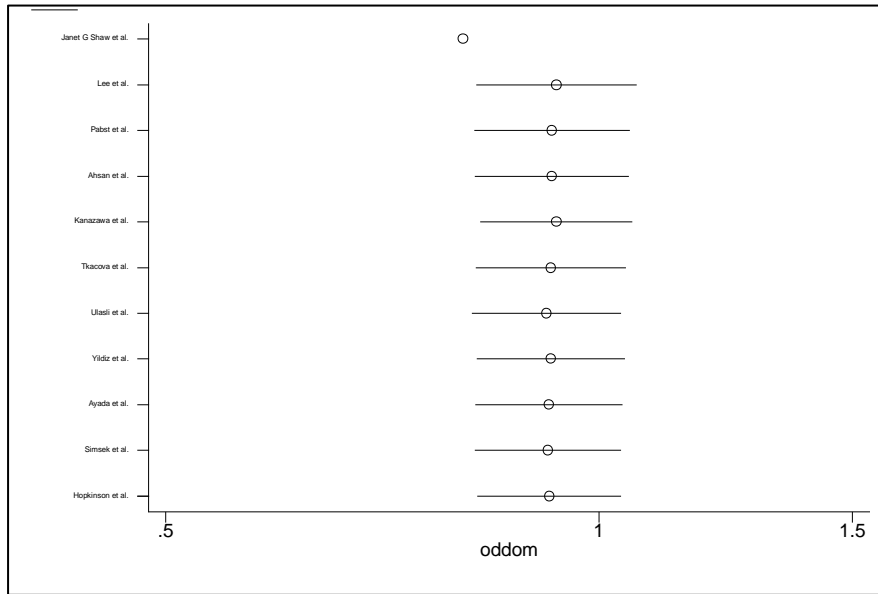


Εικόνα Παραρτήματος 37: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

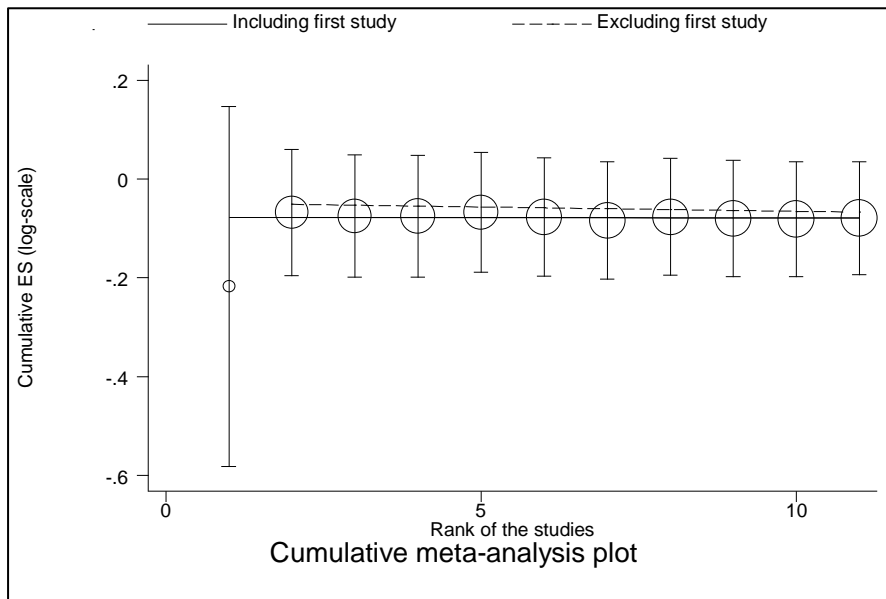


Εικόνα Παραρτήματος 38: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή *metatrend* που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

Γονότυπος DD+ID vs II



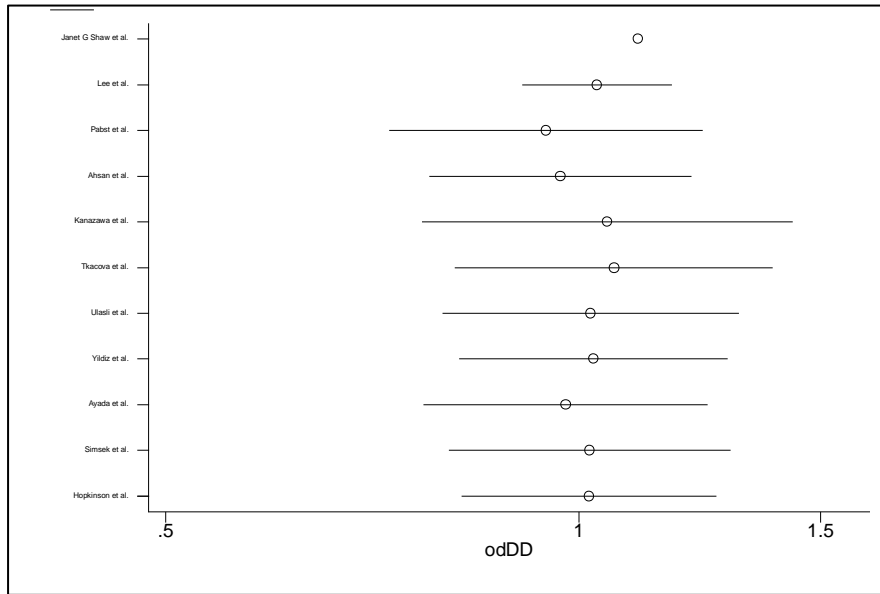
Εικόνα Παραρτήματος 39: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.



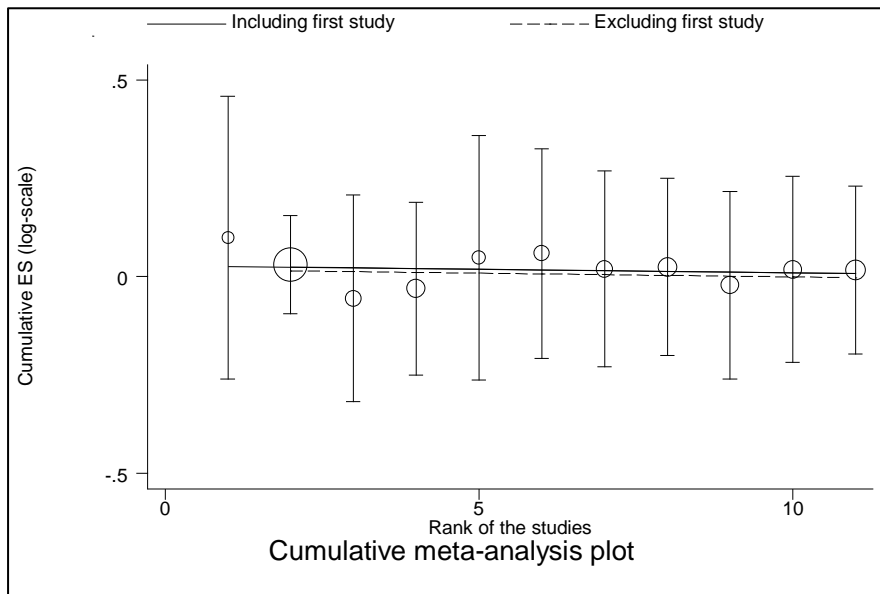
Εικόνα Παραρτήματος 40: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή metatrend που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.



Γονότυπος DD vs ID+II



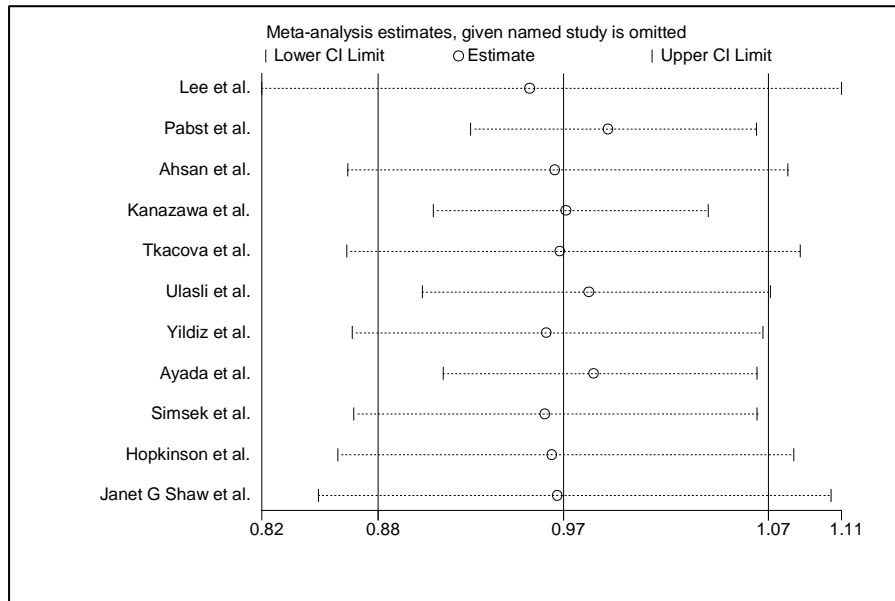
Εικόνα Παραρτήματος 41: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονότυπων ID+ II.



Εικόνα Παραρτήματος 42: Το γράφημα που προκύπτει από την εντολή metatrend που δρα συμπληρωματικά της αθροιστικής μετα-ανάλυσης για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονότυπων ID+ II.

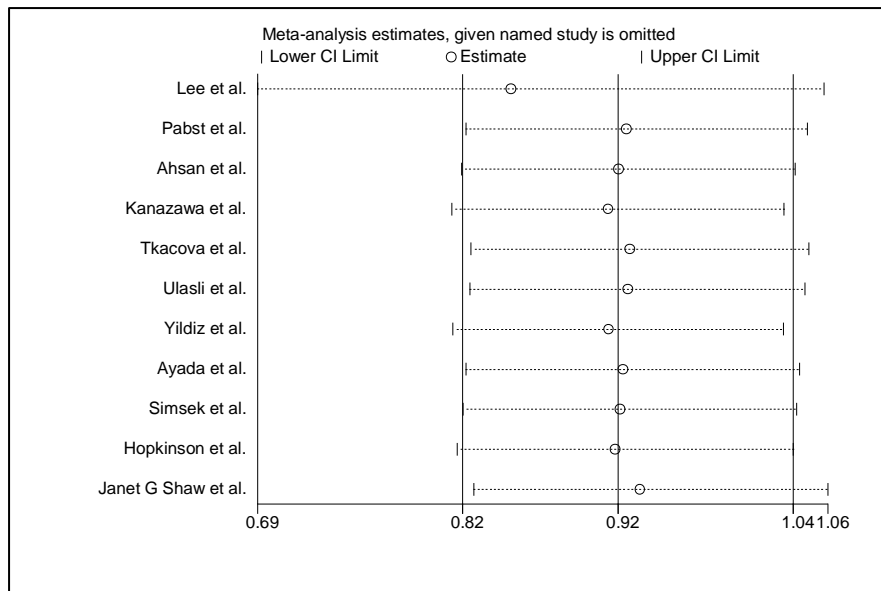
## Αφαιρετική μετα-ανάλυση

### Αλληλόμορφα I vs D



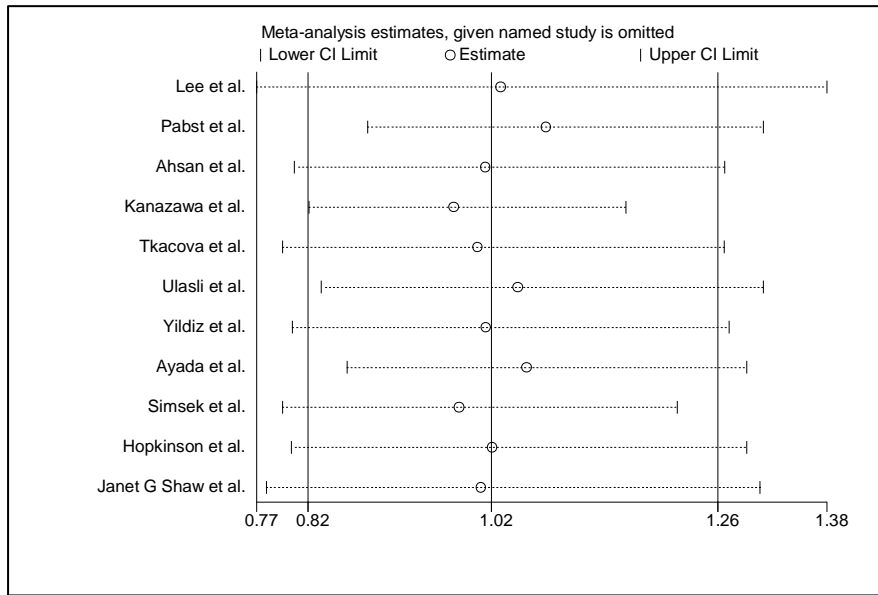
Εικόνα Παραρτήματος 43: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των αλληλόμορφων I και D.

### Γονότυπος DD+ID vs II



Εικόνα Παραρτήματος 44: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση των γονοτύπων DD+ID έναντι του γονότυπου II.

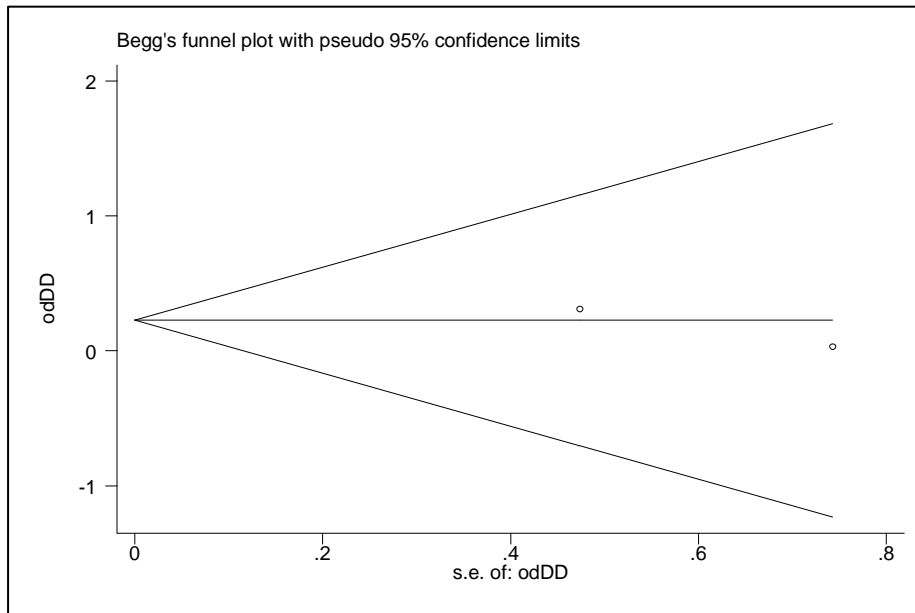
### Γονότυπος DD vs ID+II



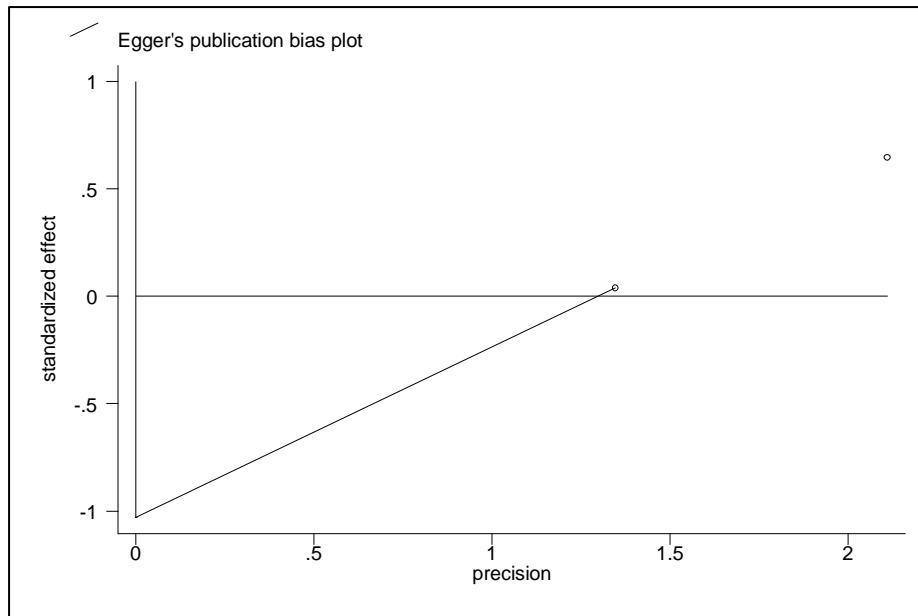
Εικόνα Παραρτήματος 45: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID+ II.

## 4. ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΡΤΑΣΗ ΣΕ ΧΡΟΝΙΑ ΑΠΟΦΡΑΚΤΙΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΑ

### Γονότυπος DD vs ID+II



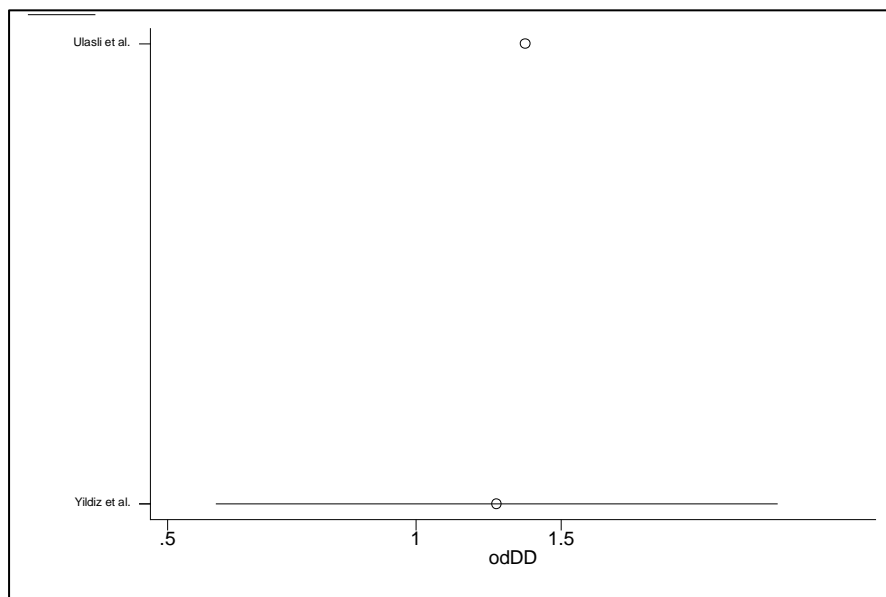
Εικόνα Παραρτήματος 46: Το funnel plot που προκύπτει από τον έλεγχο του Begg για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.



Εικόνα Παραρτήματος 47: Το γράφημα που προκύπτει από τον έλεγχο του Egger για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.

## Αθροιστική μετα-ανάλυση

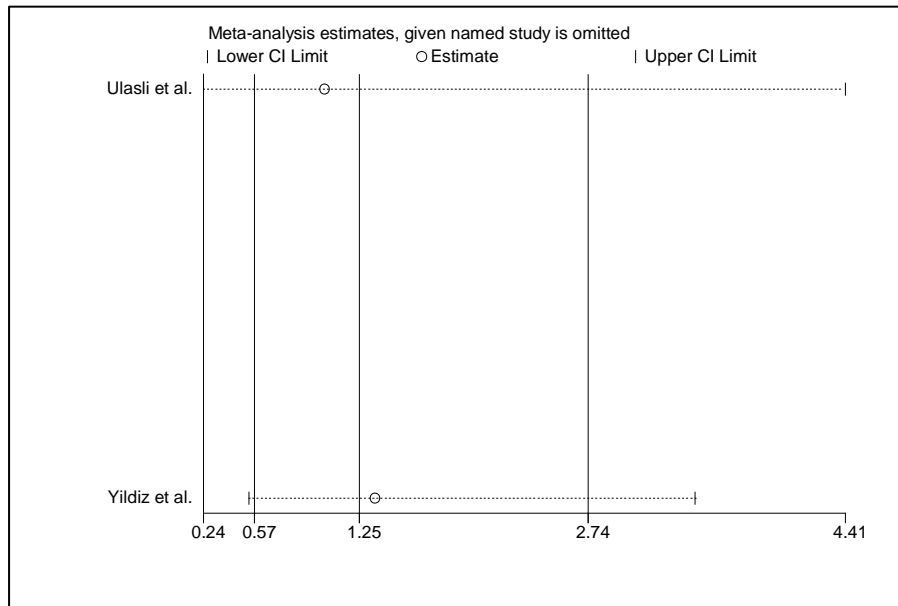
### Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 48: Το γράφημα που προκύπτει από την αθροιστική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.

## Αφαιρετική μετα-ανάλυση

### Γονότυπος DD vs ID+II



Εικόνα Παραρτήματος 49: Το γράφημα που προκύπτει από την αφαιρετική μετα-ανάλυση για την σύγκριση του γονοτύπου DD έναντι των γονοτύπων ID +II.

