

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Son Dönem Böbrek Yetmezliği Hastalarında ACE Gen Polimorfizmi Prevalansı

Prevalance of ACE Gene Polymorphism in Patients with End Stage Kidney Disease in Southeastern Turkey

Avşar Zerman¹, Dede Şit², Ali Kemal Kadiroğlu¹, Hasan Kayabaşı¹, Metin Budak³,
Zülfükar Yılmaz¹, M. Emin Yılmaz¹

¹Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Diyarbakır

²Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji BD, Diyarbakır

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik AD, Edirne

ÖZET

Amaç: Diyaliz tedavisi gören hasta popülasyonunda renin anjiyotensin aldosteron sisteminden, anjiyotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizm frekansını değerlendirmek.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya diyaliz tedavisi gören 87 hasta ve kontrol grubu olarak 38 sağlıklı gönüllü alındı. Çalışma kapsamındaki hasta ve kontrol grubunun demografik bilgileri, kan basıncı değerleri, vücut kitle indeksi (VKI), hematolojik ve biyokimyasal parametreler ve EDTA'lı tüplere alınan periferik kanda steril polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile incelenen ACE gen polimorfizmi sonuçları kayıt edildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan hastaların 49'u HD, 38'i SAPD programında idi. Hasta grubunda erkek/kadın 48/39, yaş ortalaması 41.1±13.6 iken, kontrol grubunda 14/24 ve 38.0±1.41 idi. Hasta grubunda SDBY nedenleri olarak %28 diyabet, %24 hipertansiyon, %23 kronik glomerulonefrit ilk üç sırayı almaktaydı. Sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı, hasta grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. ACE gen (I/D) polimorfizmi prevalansı hasta grubunda, II/ID/DD için sırasıyla %0.9, %44.8, %45.9; kontrol grubunda ise %31.5, %39.4, %28.9 bulundu ve istatistiksel farklılık tespit edildi (p=0.006). Hasta grubu ve kontrol grubu ACE D allel dağılımları açısından hasta grubunda %68.4, kontrol grubunda %48.7 olarak bulundu (p=0.001).

Sonuç: SDBY hasta popülasyonunda ACE genotip dağılımı ve D allel sıklığında kontrol grubundan farklılık tespit ettik.

Anahtar sözcükler: son dönem böbrek yetmezliği, ACE gen polimorfizmi

ABSTRACT

Aim: To evaluate the frequency of angiotensin converting enzyme gene polymorphism from renin angiotensin aldosterone system in patients undergoing chronic dialysis.

Materials and Methods: Eighty-seven patients undergoing dialysis treatment and 38 healthy volunteers were enrolled in the study. Demographic features, arterial blood pressure, body mass index (BMI), hematological and biochemical parameters were recorded. ACE gene polymorphism was studied using sterile polymerase chain reaction (PCR) method from blood samples taken into tubes containing EDTA.

Results: Of the 87 patients, 49 were undergoing hemodialysis and 38 were on peritoneal dialysis programme. In the patient group male/female ratio was 48/39 and the mean age was 41.1±13.6 years; in controls male/female ratio was 14/24 and the mean age was 38.0±1.41 years. Diabetes mellitus, hypertension, chronic glomerulonephritis were the first three causes of ESRD with percentages of 28, 24, and 23% respectively. Systolic and diastolic blood pressures were higher in patients than controls. ACE gene (I/D) polymorphism prevalence was found as 0.9%, 44.8%, 45.9% among patients, and 31.5%, 39.4%, 28.9% among controls for II/ID/DD respectively, and statistical significance was found (p=0.006). ACE D allele frequency was 68.4% among patients, and 48.7% among controls (p=0.001).

Conclusion: We found difference in dispersion of ACE genotype and frequency of D allele between patients and controls.

Keywords: end stage kidney disease, ACE gene polymorphism

2007;16 (2) 68-72

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Dede Şit
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Nefroloji Bilim Dalı, 21280, Diyarbakır
Tel: 0 (412) 248 80 01/0 (532) 646 22 97
Faks: 0 (412) 248 81 71
E-posta: drdede75@hotmail.com

Giriş

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanan farklı böbrek hastalıklarının etiolojide rol oynadığı kompleks bir durumdur. SDBY'nin gelişim ve progresyon hızını etkileyen sorumlu genler yakın zamanlarda tanım-

lanmıştır. Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) ve gen polimorfizmleri, hem SDBY popülasyonunda hem de genel popülasyonda sol ventrikül hipertrofisi, hipertansiyon ve renal fonksiyonların hızlı bozulması gibi sağkalımı etkileyebilecek bazı etkenlerle ilişkili bulunmuştu (1-3). Yapılan araştırmalarda anjiyotensinojen (AGT)-1T, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)-DD ve anjiyotensin II tip 1 ve 2 (ATR1 ve ATR2) reseptör- AA genotiplerinde RAAS aktivitesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir (4,5).

RAAS son ürünlerinden olan anjiyotensin II, böbrekler dahil, hemen hemen tüm organlarda önemli fonksiyonlara katılır (6). Anjiyotensin II, kronik böbrek hastalığına (KBH) ilişkin hemodinamik ve non-hemodinamik mekanizmalarda merkezi rol oynamakta, kronik nefropatilerin oluşumunu ve SDBY'ye ilerlemesinde anahtar işlevi görmektedir (7). ACE gen ekspresyonu hâlâ büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, dokuya özgü olabileceği düşünülmektedir (8). ACE geni 17. kromozomun uzun kolu üzerinde (17q23) yerleşiktir. Bu genin 16. intronunda 287 baz çiftlik bir Alu tekrar bölgesinin varlığı veya yokluğuna göre insersiyon/delesyon (ID) polimorfizmi meydana gelmektedir. Bu polimorfizm, sonuçta üç genotipe (homozigot DD veya II genotipi ve heterezigot ID) neden olmaktadır (9).

ACE genindeki 'insersiyon' ACE ekspresyonunu azaltır, böylece II homozigotlara göre DD homozigotlar %65, ID heterozigotlar ise %31 daha fazla ACE'ye sahiptir. ACE D alleli kişilerde plazma ACE aktivitesi, I alleli kişilere göre daha yüksek bildirilmiştir. I allelilerde düşük ACE aktivitesi, bradikininin yarı ömrünün artması ve anjiyotensin II üretimiindeki azalma gibi ACE genotipinin fizyolojik önemini ortaya koymaktadır (10).

Bu çalışmada amacımız diyaliz tedavisi görmekte olan hastalarda ACE gen polimorfizm frekanslarının dağılımını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Çalışma, Dicle Üniversitesi Diyaliz Merkezi'nde Aralık 2005'ten beri takip edilen Hemodiyaliz (HD) ve Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi (SAPD) tedavisi gören hastalarda yapıldı. Çalışmaya 49 HD ve 38 SAPD hastası olmak üzere toplam 87 hasta katıldı.

Otuz sekiz sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak alındı. Kontrol grubunda gerek kendilerinde gerekse birinci dereceden akrabalarında diabetes mellitus, kronik böbrek hastalığı, hipertansiyon, iskemik kalp

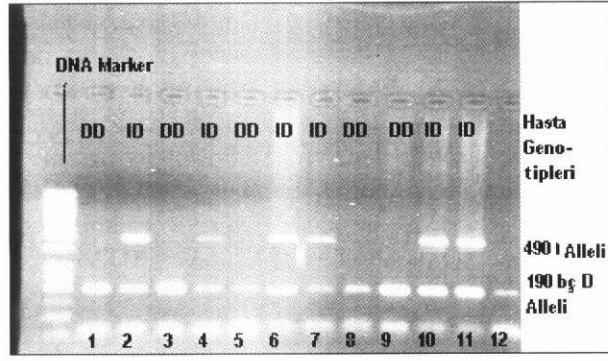
hastalığı, periferik damar hastalığı bulunanlar çalışmaya dışı bırakıldı. Çalışmaya alınan hastaların demografik bilgileri, JNC 7 (Ulusal Birleşik Komite) raporunda belirtildiği gibi ölçülen kan basıncı değerleri, vücut kitle indeksi (VKİ), hematolojik parametreler, serum glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, LDL, VLDL, HDL kolesterol, trigliserit, elektrolitler; kalsiyum, fosfor, total protein, albümin, EDTA'lı tüplere alınan periferik kanda steril polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelenen ACE gen polimorfizmi çalışıldı.

Çalışma kapsamına alınan tüm hastaların serum glukoz, BUN, kreatinin, total kolesterol, LDL, VLDL, HDL kolesterol, trigliserit, elektrolitler; kalsiyum, fosfor, total protein, albümin, Abbot'un Aeroset cihazı ile bakıldı. Hemogram CELL-DYN 3700 oto analizatörü ile bakıldı.

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Gen Polimorfizminin Belirlenmesi

ACE gen polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelendi. Bunun için her hastadan periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındı ve Trakya Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı'na ulaştırıldı.

Polimorfik bölgelerin analizi için kullandığımız primerler (11); ACE DD Polimorfizmi için F: 5'TGG GAC CAC AGC GCC CGC CCG CCA CTA 3', R: 5'TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3' ve ACE ID Polimorfizmi için F: 5'CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3', R: 5'GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3' şeklindedir. DNA örneklerinden ACE gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışım her bir örnek için, 5 µl 10 X Taq polimeraz tamponu, 2 mM'lik 5 µl dNTP karışımı 25 mM'lik 3 µl MgCl₂, 5 µl primer çifti, 0.2 µl Taq polimeraz enzimi ve 31.8 µl ddH₂O içerecek şekilde hazırlandı. Karışım daha sonra yaklaşık olarak 2 µl (100-150 ng) DNA eklendi. Buharlaştırmanın önlenmesi için her bir PCR karışımının üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak Techne Cyclogene Thermal Cycler'da PCR'ları yapıldı. ACE DD genotipindeki örneklerle yanlış DD genotiplendirmeyi önlemek için 2. kez PCR uygulandı. PCR koşulları 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika olmak üzere 30 döngü şeklinde gerçekleştirildi. PCR sonrası amplifikasyonun incelenmesi için örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp etidium bromid ile boyandıktan sonra dijital kamera ile fotoğrafları çekildi. Amplifikasyon sonucu agaroz



Şekil 1. ACE I/D polimorfizminin PCR amplifikasyon bantları (1: DD, 2: ID, 3: DD, 4: ID, 5: DD, 6: ID, 7: ID, 8: DD, 9: DD, 10: ID, 11: ID, 12: DD).

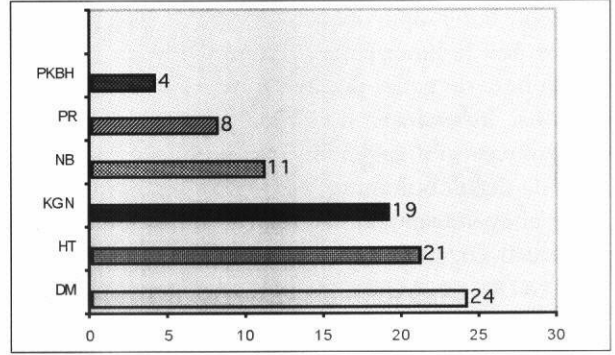
jelde DD genotipine sahip örneklerde 190 baz çiftlik, ID genotipine sahip 490 ve 190 baz çiftlik ve II genotipine sahip örneklerde 490 baz çiftlik amplifikasyon bandı gözlemlendi (Şekil 1).

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS/11.0 PC programında Student's t testi, chi square testi ve Pearson's correlation yöntemleriyle yapıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama \pm standart sapma ile gösterildi. Prevalans değerleri (ACE gen polimorfizmi etiyolojik nedenler) yüzde (%) olarak ifade edildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan hasta grubunun kadın/erkek oranı 39/48, kontrol grubunda ise 24/14 olarak tespit edildi. Hasta grubunun yaş ortalaması 41.1 ± 13.6 yıl, kontrol grubunun 38.0 ± 1.41 yıl tespit edildi. Olguların 49'u (%56.3) HD, 38'i (%43.7) SAPD hastası idi. Çalışma grubundaki hastaların böbrek yetmezliği nedenleri olarak 24 (%27.6) diabetes mellitus, 21 (%24.1) HT, 19 (%21.8) kronik glomerülonefrit,



Şekil 2. Hasta grubunun etiyolojik dağılımı.

Kısaltmalar: DM, diabetes mellitus; HT, hipertansiyon; KGN, kronik glomerülonefrit; NB, nedeni bilinmeyen; PR, BPH, mesane tümörü, üreter taşları gibi ürolojik hadiseler; PKBH, polikistik böbrek hastalığı

8 (%9.2) postrenal böbrek hastalığı, 4 (%4.5) polikistik böbrek hastalığı, 11 (%12.7) nedeni bilinmeyen böbrek yetmezliği olduğu görüldü (Şekil 2).

Hasta grubu, kontrol grubu ile yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi (VKİ), sistolik kan basıncı ve diastolik kan basıncı açısından karşılaştırıldı. Hasta grubunun vücut kitle indeksi (VKİ) 22.1 ± 4.2 kg/m², kontrol grubunda 23.4 ± 2.4 kg/m² idi. Sistolik kan basıncı hasta grubunda 136.5 ± 18.4 mmHg, kontrol grubunda 116.3 ± 14.4 mmHg olarak ölçüldü. Diastolik kan basıncı hasta grubunda 81.3 ± 8.6 mmHg, kontrol grubunda 69.2 ± 10.2 mmHg olarak ölçüldü. Sistolik kan basıncı ($p=0.001$) ve diastolik kan basıncı ($p=0.001$) hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0.001$) (Tablo I).

ACE gen (I/D) polimorfizmi prevalansı hasta grubunda, II, ID, DD için sırasıyla 8 (%0.9), 39 (%44.8), 40 (%45.9) kontrol grubunda ise 12 (%31.5), 15 (%39.4), 11 (%28.9) bulundu ve istatistiksel farklılık tespit edildi ($p=0.006$) (Tablo II).

Hasta grubu ve kontrol grubu ACE allel dağılımları

Tablo I. Grupların cinsiyet, yaş, VKİ ve kan basınçlarının karşılaştırılması

Parametreler	Hasta grubu n = 87	Kontrol grubu n = 38	p
Cinsiyet (E/K)	48/39	14/24	0.059
Yaş (yıl)	41.1 ± 13.6	38.0 ± 1.41	0.162
VKİ (kg/m ²)	22.1 ± 4.2	23.4 ± 2.4	0.065
SKB (mmHg)	136.5 ± 18.4	116.3 ± 14.4	0.001
DKB (mmHg)	81.3 ± 8.6	69.2 ± 10.2	0.001

Tablo II. Grupların ACE gen polimorfizm dağılımının karşılaştırılması

Parametreler	Hasta grubu n = 87	Kontrol grubu n = 38	p
GENOTİP			
II (ins/ins)	8 (%0.9)	12 (%31.5)	0.006
ID (ins/del)	39 (%44.8)	15 (%39.4)	
DD (del/del)	40 (%45.9)	11 (%28.9)	
ALLELLER			
I (insersiyon)	55 (%31.6)	39 (%51.3)	0.001
D (delesyon)	119 (%68.4)	37 (%48.7)	

gen sayma metodu kullanılarak yapılmıştır. Hasta grubunda D allel dağılımı %68.4, kontrol grubunda %48.7 bulundu. D alleli hasta grubunda daha yüksekti. İstatistiksel farklılık tespit edildi ($p=0,001$) (Tablo II).

Tartışma

KBH, nefron sayı ve fonksiyonlarında azalma ile sonuçlanan ve sıklıkla SDBY'ye götüren patofizyolojik bir süreçtir (12). İster genetik sebepli, ister akkiz böbrek hastalığı olsun, karakteristik bulgu, altta yatan etiyojiye bağlı olmaksızın SDBY gelişmesinde kişiden kişiye değişkenlik görülmesidir. Bu kişisel değişkenlik önemli bir genetik özelliktir (7). Kronik böbrek yetmezliği gelişmesine katkıda bulunan pek çok gen lokusu belirlenmiştir. Bunlardan biri de ACE genindeki nükleotitlerde nokta mutasyonu (insersiyon/delesyon) ile ortaya çıkan bir polimorfizmdir. Diyabetik nefropati, glomerülonefritler, polikistik böbrek hastalığı, ürolojik anomalilerle oluşan kronik böbrek yetmezliği dahil, geniş bir grup hastalıkta yapılan çalışmalar, renal fonksiyonun progresif olarak bozulmasında bu genin önemli bir katkısının olduğunu açığa çıkarmıştır (13,14).

Delesyon ve insersiyon mutasyonları kodlanan ve ACE gen polimorfizmi olarak tanımlanan süreç, ACE enziminin aktivitesinde değişikliklere yol açar. Homozigot delesyon, endojen ACE aktivitesini en yüksek seviyede ekspresyona ederek kronik böbrek yetmezliği gelişimine zemin hazırlar (12). Ayrıca hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda, ACE DD genotipinin hemodiyaliz için yüksek risk taşıdığı da başka bir çalışmanın sonucu olarak bildirilmektedir (15).

Bazı çalışmalarda renal hasarın ilerleme hızıyla RAAS'nin genleri arasında lanjiyotensinojen (AGT)-TT, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)-DD ve

anjiyotensin II tip 1 ve tip 2 (ATR1, ATR2) reseptör AA genotiplerli ilişki gösterilmiş olmasına rağmen (14), tersini iddia eden çalışma (17,23) sonuçları da literatürde mevcuttur.

Çalışmamızda, ACE gen (ID) polimorfizmi prevalansı ve hasta grubunda DD genotip dağılımı kontrol grubuna göre ($p=0.006$); DD polimorfizmi II polimorfizmine göre anlamlı düzeyde yüksek saptandı ($p=0.006$). Çalışmamızda, D allel sıklığı, hasta grubunda %68.4, I alleli %31.6, kontrol grubunda D alleli %48.7, I alleli %51.3 bulundu ($p=0.001$). Hasta grubunda, kontrol grubuna göre D alleli I allele göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulundu ($p=0.001$). Bu bulgularımız, Schmidt ve arkadaşları (14) ile Fujisawa ve arkadaşlarının (16) yaptıkları metaanaliz sonuçları ile paralellik arz ederken, değişik ülkelerde yapılan Pfohl ve arkadaşları (17), Buraczynska ve arkadaşları (18), Yoshida ve arkadaşları (19), Bloem ve arkadaşları (20), Hsieh ve arkadaşlarının (21) çalışmaları ile benzer bulundu.

Ülkemizde hipertansiyon ve diyabetik hasta popülasyonunda yapılan çalışmalar olmasına karşın diyaliz tedavisi gören hasta popülasyonunda yapılmış bir çalışma bulamadık. Pozitif aile öyküsü olan ciddi hipertansif hastalarda ise DD genotipinin predispozan bir faktör olduğu ve ACE ID polimorfizminin hipertansiyon üzerine bağımsız faktörlerden biri olarak etki edebileceği ortaya konulmuştur (22). Ancak, toplumumuzda yapılan başka bir çalışmada ise tip 2 diyabetik hastalarda hipertansiyon ile ACE ID polimorfizmi arasında bir ilişki saptanmamıştır (23).

ACE gen polimorfizmi büyük etnik farklılıklar içermektedir. Ayrıca etnik grup içinde de heterojenite göstermektedir. Afrika kökenli Amerikalılarda D alleli sıklığı %48-64, I alleli sıklığı ise %36-52 arasında değiş-

mektedir. Avrupalılarda ve Amerikalı beyazlarda daha az varyasyon görülmektedir. Avrupa ile karşılaştırıldığında, Amerika'da yaşayan siyahılarda D alleli yüksek, Japonlarda ise D alleli daha düşük (%33) saptanmıştır (24-27). Genel olarak beyazlarda D alleli sıklığı %55, I alleli sıklığı %45 olarak bulunmuştur (19).

Schmidt ve arkadaşları (14) D allelinin prevalansını %54 bulmuşlardır. Bizim bulgularımız, mensubu olduğumuz Kafkas ırkında Schmidt ve arkadaşlarının %56.2 olarak buldukları D allelinin prevalansı verileriyle örtüşmektedir.

Sonuç olarak, diyaliz programında olan SDBY hasta popülasyonunda ACE genotip dağılımı ve D allel sıklığını kontrol grubundan farklı tespit ettik. ACE insersiyon/delesyon polimorfizmi ve renal hastalık arasında ilişki olabileceğini düşündük. Ancak bu ilişkiyi açıklayabilmek için daha kapsamlı ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Asakimori Y, Yorioka N, Yamamoto I, et al. Endothelial nitric oxide synthase intron 4 polymorphism influences the progression of renal disease. *Nephron* 2001;89(2):219-23.
2. Sakka Y, Babazono T, Sato A, et al. ACE gene polymorphism, left ventricular geometry, and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 64(1):41-9.
3. Lovati E, Richard A, Frey BM, Frey FJ, Ferrari P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001;60(1):46-54.
4. Wong TY, Szeto CC, Chow KM, Chan JC, Li PK. Contribution of gene polymorphism in the renin-angiotensin system to macroangiopathy in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001;38(1):9-17.
5. Gumprecht J, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukowska-Szczec-howska E, and End-Stage Renal Disease Study Group. Angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion and angiotensinogen M235T polymorphisms: risk of chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58(2):513-9.
6. Ekmekçi A, Canberk A, Berkman K. Angiotensinler, angiotensin reseptörleri ve angiotensin antagonistleri. Ekmekçi A, Canberk A, Berkman K, editors. İstanbul. Park Matbaacılık; 2000.
7. Aros C, Remuzzi G. The renin-angiotensin system in progression, remission and regression of chronic nephropathies. *J Hypertens* 2002 (suppl):20:S45-S53.
8. Baudin B, Berard M, Carrier JL, Legrand Y, Drouet L. Vascular origin determines angiotensin I-converting expression in endothelial cells. *Endothelium* 1997;5:73-84.
9. Prasad A, Narayanan S, Waclawiw MA, Epstein N, Quyyumi AA. The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene determines coronary vascular tone and nitric oxide activity. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1579-86.
10. Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers AD. DD angioten-

sin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999;33:1164-8.

11. Evans AE, Poirter O, Kee F, et al. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. *Quart J Med* 1994;87:211-4.
12. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-56.
13. Krolewski AS. Genetics of diabetic nephropathy: evidence for and minor gene effects. *Kidney Int* 1999;55:1582-96.
14. Schmidt S, Ritz E. Genetics of the renin-angiotensin system and renal disease: a progress report. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997;6(2):146-51.
15. Nomura H, Koni I, Michishita Y, Morise T, Takeda R. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in haemodialysis patients. *Lancet* 1994;343:482.
16. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al. Metaanalysis of association of insertion/deletion polymorphism of ACE gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998;41:47-53.
17. Pfohl M, Frost D, et al. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and diabetic nephropathy in IDDM patients. *Horm Metab Res* 1998;30(5):276-80.
18. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A, et al. Genetic polymorphism of the renin angiotensin system in end stage renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):979-83.
19. Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1996;50(2):657-64.
20. Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH. Racial difference in the relationship of an ACE gene polymorphism to serum ACE activity. *Hypertension* 1996;27:62-6.
21. Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, et al. Increased frequency of angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with tip 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7): 1008-13.
22. Bedir A, Arık N, Adam B, Kılınç K, Gümüş T, Güner E. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 1999;12:1038-43.
23. Araz M, Aynacıoğlu S, Aktaran S, Alaşchirli B, Okan V. Association between polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and hypertension in Turkish type II diabetic patients. *Acta Medica* 2001;44:29-32.
24. van der Sman-de Beer F, Verhagen C, Rombach SM, Boersma P, van Manen JG, Korevaar JC, van den Bogaard R, Boeschoten EW, Krediet RT, Navis GJ, Vandenbroucke JP, Dekker FW; for the NECOSAD Study Group. ACE I/D polymorphism is associated with mortality in a cohort study of patients starting with dialysis. *Kidney Int* 2005;68(5):2237-43.
25. Barley JA, Blackwood, N.D. Carter, et al. ACE insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 1994;12:955-7.
26. Rotimi C, Puras A, Cooper R, et al. Polymorphism of renin-angiotensin genes among Nigerians, Jamaicans and African Americans. *Hypertension* 1996;27:558-63.
27. Matsubara M, Suzuki M, Fujiwara T, et al. ACE I/D polymorphism and hypertension: the Ohasama study. *J Hypertens* 2002;20:1121-26.