

# Akut poststreptokokkal glomerulonefritli Türk çocuklarında ACE gen polimorfizmi

## ACE gene polymorphism in Turkish children with acute post streptococcal glomerulonephritis

Ümit Çelik<sup>1</sup>, Aytül Noyan<sup>2</sup>, Gülen Atıla<sup>3</sup>, Selcuk Matyar<sup>4</sup>, Aysun K. Bayazıt<sup>5</sup>, Mithat Büyükçelik<sup>6</sup>, Hasan Dursun<sup>7</sup>, Ali Anarat<sup>2</sup>

**Amaç:** 1990'lu yılların başlarından itibaren birçok böbrek ve kalp hastalığının genetik zemininde, ACE geni ve polimorfizmleri başta olmak üzere birçok gen çalışılmaktadır. Akut poststreptokokkal glomerulonefrit (APSGN) beta hemolitik streptokokların neden olduğu iyi huylu bir böbrek hastalığıdır. Bu çalışmada ACE gen polimorfizminin APSGN patojenezindeki yeri araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya ortalama yaşları 97±33 ay arasında değişen 29'u (%56) erkek, 23'ü (%44) kız toplam 52 APSGN tanılı hasta ile, ortalama yaşları 42±13 yıl olan 83'ü (59%) erkek, 57'si (%41) kız olmak üzere toplam 140 sağlıklı kişi alınmıştır.

**Bulgular:** Hasta ve kontrol grupları ACE genotipi esas alınarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p<0,05). Ortalama sistolik kan basıncı ve ortalama diyastolik kan basıncı Z skoru D/D genotipine sahip hastalarda, D/D genotipi taşımayan hastalara göre daha düşük bulunurken (p<0,05), hastalığın başlangıç yaşı, cinsiyet, C<sub>3</sub> düzeyi, glomerül filtrasyon hızı, kan üre azotu, serum kreatinin, makroskopik hematüri, proteinüri düzeyi, ödem ve oligüride kalma süresi açısından gruplar arasında fark yoktu (p>0,05).

**Çıkarımlar:** Akut poststreptokokkal glomerulonefrit seyrinde görülen hipertansiyonda ve klinik değişkenlerde, D/D polimorfizmi bir risk etmeni olarak saptanmadı.

**Anahtar kelimeler:** ACE gen polimorfizmi, akut poststreptokokkal glomerulonefrit, hipertansiyon

**Aim:** The role of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in various renal and cardiac diseases have been discussed since 1990s. Acute poststreptococcal glomerulonephritis (APSGN) is a benign inflammatory renal disease of beta hemolytic streptococcus. The aim of this study is to investigate whether the ACE gene polymorphism is associated with susceptibility to APSGN and it's clinical and laboratory features.

<sup>1</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Enfeksiyon Bilim Dalı, Adana

<sup>2</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji, Adana

<sup>3</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Adana

<sup>4</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Adana

<sup>5</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji, Adana

<sup>6</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji, Adana

<sup>7</sup> Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nefroloji, Adana

**Yazışma adresi:** Ümit Çelik, Çukurova Üniversitesi Tıp Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, 01330, Adana

Tel: (0322) 338 69 35

Faks: (0322) 338 68 32

e-mail:ucelik@cu.edu.tr

Alındığı tarih: 3. 08. 2006 , kabul tarihi: 28. 08. 2006

**Material and Method** The study comprised 52 pediatric patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis; 29 males (56%) and 23 females (44%) with a mean age of  $97\pm33$  months. The control group consisted of 140 healthy individuals including 83 males (59%) and 57 females (41%) with a mean age of  $42\pm13$  years.

**Results:** ACE genotypes were significantly different between the patients and the control group ( $p<0.05$ ). Mean systolic blood pressure, mean diastolic blood pressure z scores were significantly lower in D/D genotype group compared to non- D/D genotype group ( $p<0.05$ ). There were no statistically significant difference among groups in terms of age at onset of disease, sex, C3 level, GFR, BUN, creatinine, macroscopic hematuria, edema, and duration of the oliguric period.

**Conclusions:** Our results show that D/D polymorphism of ACE gene is not a risk factor for APSGN and hypertension of APSGN.

**Key words:** ACE gene polymorphism, acute post streptococcal glomerulonephritis, hypertension

## Giriş

“Angiotensin converting enzyme (ACE), çinko metalopeptidaz enzim ailesinden olup anjiyotensin I’in anjiyotensin II’e dönüşümünden sorumludur. Kandaki ACE düzeylerinin genetik olarak kontrol edildiği ilk kez Rigat ve ark.(1) tarafından bildirilmiştir. ACE geni, 26 ekson içeren 17. kromozomun uzun kolu üzerinde 21 kb boyutunda bir gen olup, intron 16’da gösterilen polimorfizm 287 baz çifti parçasının olup olmaması ile ekleme (insersiyon), silme (delesyon) şeklinde polimorfizm gösterir. ACE etkinliğinin delesyon tipi polimorfizm için homozigot olan bireylerde (D/D) en yüksek, insersiyon tipi polimorfizm için homozigot olan bireylerde ise (I/I) en düşük olduğu bilinmektedir (1). Dolayısıyla ACE düzeyi daha yüksek olan kişiler yani D aleli için homozigot bireyler anjiyotensin II’ye bağlı risklere daha fazla maruz kalırlar. 1990’lı yılların başlarından itibaren, ACE D alelinin akut miyokard enfarktüsü, sol ventrikül hipertrofisi, ilerleyici diyabetik nefropati gibi birçok kalp ve böbrek hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2-7). Anjiyotensin II böbrek hastalıklarının patofizyolojisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Anjiyotensin II’nin böbrek üzerindeki tahrip edici etkileri; glomerüloskleroz, tübülointerstisyel nefrit ve vasküler sklerozdur. Akut poststreptokokkal glomerulonefrit, selim bir böbrek hastalığı olmasına rağmen kimi zaman gelişebilecek komplikasyonlar nedeniyle hastanın izleminde ciddi sıkıntılar doğurabilmektedir. Kimi zaman hipertansif ansefalopatiye kadar ilerleyebilen kan basıncı yüksekliği de bunlardan birisidir. Hipertansiyon, APSGN’li hastaların %80’inden fazlasında görülebilen bir bulgudur (8). Bugün için APSGN ilişkili hipertansiyonun patojenezini ve genini çok iyi bilmemekteyiz. Ama hipertansiyonun çok etmenli olup, daha çok hacim genişlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Akut poststreptokokkal glomerulonefritli hastalarda plazma renin ve aldosteron etkinliği genellikle normal olmasına karşın,

bu düzey böbrek içi renin etkinliği ile doğru orantılı değildir (9). Rodriguez-Iturbe ve ark. (10) akut nefriti ve orta ağır derecede hipertansiyonu olan 13 çocukta yaptığı bir çalışmada, plazma renin-anjiyotensin sistemi (RAS) düzeyinin hastalığın akut döneminde, iyileşme dönemine göre belirgin olarak baskılandığı gösterilmiştir. Akut poststreptokokkal glomerulonefritli hastaların uzun süre izlemlerinde seyirleri oldukça iyidir (11, 12). Ancak nefritojenik suşlarla enfekte olan kişilerde mikroskobik hematüri görülebilmemesine rağmen, her hastada niçin APSGN tablosunun ortaya çıkmadığı bilinmemektedir(11). Akut poststreptokokkal glomerulonefrit seyrini etkileyen etmenler net bilinmemektedir. Bu çalışmada ACE gen polimorfizmi ve APSGN klinik değişkenleri arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalı’nda yapılmış olup çalışma için üniversite etik kurul onayı ve ailelerin onamı alınmıştır. 52 hasta ve 140 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunda yaşları  $97\pm33$  ay arasında değişen 29 erkek (%56) ve 23 kız (%44), kontrol grubunda ise yaşları  $42\pm13$  yıl arasında değişen 83 erkek (%59) ve 57 kız (%41) bulunmaktaydı. Kontrol grubunun herhangi bir böbrek ve kalp hastalığı mevcut değildi. Akut poststreptokokkal glomerulonefrit tanısı, öykü, makroskobik ve/veya mikroskobik hematüri, yakın dönemde geçirilmiş streptokokkal enfeksiyon kanıtının olması (pozitif ASO veya anti-DNA’ase B titresi) ve sekiz haftayı geçmeyen hipokomplementemi ile konulurken, dört hastaya sıradışı seyir nedeniyle biyopsi yapılarak tanı konuldu. Hasta ve kontrollerin kan örnekleri EDTA’lı tüpe alındı. Lökosit DNA’sı Miller yöntemiyle elde edildi (13). Zee ve

ark. (14) tarafından geliştirilen PCR yöntemiyle ACE I/D polimorfizmleri belirlendi. Primer dizileri, ACE geninin (17q23) intron 16. bölümü hedef alınarak seçildi. DNA örnekleri (0.4g), (forward) 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3', ve (reverse) 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGAT 3' primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Bu primerlerin her birinden 10 pmol alındı ve 5l 10X Cetus buffer (pH 8.3), 0.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve 1.0 unite Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) içeren karışım eklenerek son hacim 50 l'ye ayarlandı. Bu örnekler otomatik PCR cihazında (Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler); 94 C' de 1 dakika denatürasyon, 58 C' de 1 dakika "annealing" ve 72 C' de 1 dakika primer uzaması işlemi toplam 30 döngü olacak şekilde çoğaltıldı. ACE gen lokusu PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde (%3 agaroz) 150V' da, 60 dakika süreyle yürütüldü ve oda ısısında "ethidium bromid" ile boyandıktan sonra UV altında görünür hale getirildi.

Serum kreatininin Jaffe's alkale pikrat yöntemi ile, kan üre nitrojeni ise üreaz UV test ile çalışıldı.

### İstatistiksel Yöntem

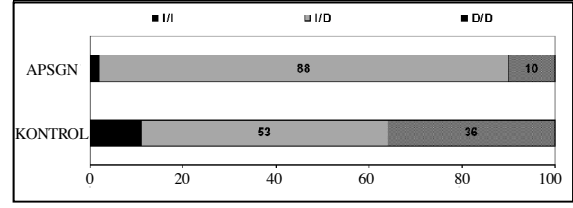
Tüm istatistiksel incelemeler SPSS 11.0 istatistik programında çalışıldı. Genotipler, alel frekansı klinik özellikler ki kare testi ile değerlendirildi. Odds oranı ve güven aralıkları hesaplandı. Yaş, biyokimyasal değişkenler ve sistolik ve diyastolik kan basıncı Z- skoru, Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

### Bulgular

#### Hasta ve kontrol grubunda genotip ve alel dağılımı

APSGN'li hastanın 45'i (%86) ID, 6'sı (%12) DD, 1'i II (%2) olup, kontrol grubundaki 140 hastanın 15'i (%11) II, 74'ü (%53) ID, 51'i (%36) DD idi. Hasta ve kontrol grubu genotipleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark vardı ( $\chi^2 = 18,3$   $p = 0,004$ ) (Şekil 1). I aleli frekansı %46 ve D aleli frekansı %54 iken, kontrol grubunun I aleli frekansı %37,5 ve D aleli frekansı %62,5 idi. Alel frekansları açısından değerlendirildiğinde gruplar arası fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

D/D genotipine sahip 57 kişinin sadece 6'sı hasta olurken, D/D genotipi taşımayan 135 kişinin (119=I/D, 16=I/I), 46'sı hastalanıyordu. (OR=5,17 95% CI 2,05-13,01  $p = 0,001$ ).



Şekil 1: Hasta ve kontrol grubunda ACE genotip dağılımı

#### APSGN'li hastaların klinik incelemesi ve ACE geni dağılımları

Hasta grubu D/D genotipine sahip olanlar ve olmayanlar olarak ayrıldıklarında hastalığın başlangıç yaşı, cinsiyet, C<sub>3</sub> düzeyi, glomerül filtrasyon hızı, kan üre azotu, serum kreatinin, makroskopik hematüri, proteinüri, ödem ve oligüride kalma süresi açısından fark yoktu ( $p > 0,05$ ). Ortalama sistolik kan basıncı Z skoru D/D grubunda  $-0,03 \pm 0,97$  iken, D/D olmayan grupta ise  $1,62 \pm 1,92$  idi. ( $Z = -2,05$   $p = 0,041$ ). Ortalama diyastolik kan basıncı z skoru ise D/D grubunda  $0,26 \pm 0,74$  iken, D/D olmayan grupta ise  $1,81 \pm 1,52$  idi. ( $Z = -2,43$   $p = 0,13$ ) (Tablo I).

Tablo I: Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı

	Kız n (%)	Erkek n (%)
APSGN	23 (%44)	29 (%56)
Kontrol	57 (%41)	83 (%59)

Tablo II: D/D genotipi taşıyıcılığına göre hastaların biyokimyasal ve klinik değişkenleri

	D/D genotipi taşıyanlar (n=6) Ortalama $\pm$ SD	D/D genotipi taşımayanlar (n= 46) Ortalama $\pm$ SD	p değeri*
Yaş (ay)	97,8 $\pm$ 24,7	97,3 $\pm$ 34,4	0,9
C <sub>3</sub> (mg/dl)	24,8 $\pm$ 12,3	43,6 $\pm$ 41,5	0,2
Kan üre azotu (mg/dl)	20,3 $\pm$ 11,5	31,7 $\pm$ 26,9	0,3
Kreatinin (mg/dl)	0,85 $\pm$ 0,42	1,1 $\pm$ 1,3	0,6
Proteinüri (mg/m <sup>2</sup> /sa)	3,3 $\pm$ 8,1	8,4 $\pm$ 18,6	0,5
Sistolik Z skoru	-0,03 $\pm$ 0,97	1,6 $\pm$ 1,9	0,04
Diyastolik Z skoru	0,26 $\pm$ 0,74	1,8 $\pm$ 1,5	0,01

\*Mann Whitney U test

### Tartışma

1990'lı yılların başlarından itibaren, kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarının patojenezinde RAS sisteminin özellikle anjiyotensin II'nin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığında hipertansiyon, diyabet, veziköüretal reflü gibi birçok böbrek hastalığının ilerlemesi ACE genotipi

ile ilişkilendirilmiştir. ACE genotipi ırklar arasında farklı dağılımlar gösterir. I/D polimorfizminin beyaz ırkta en sık görülen genotip olduğu bildirilmiştir (15-17). Birçok çalışmada hastalıkların sıklığı ve/veya ilerlemesi ile ilişki bildirilmesine rağmen az sayıda çalışmada da zıt sonuçlar bildirilmiştir (5-7). Literatür tarandığında APSGN ile ACE genotipi arası ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu açıdan çalışmamız APSGN ve ACE genotipi ilişkisini araştıran ilk yayındır. APSGN'nin genel olarak iyi huylu bir böbrek hastalığı olduğu ve sekelsiz iyileştiği bilinmektedir (18). Streptococcus suşlarının neden olduğu bu immün aracılı hastalıkta, klinik değişkenleri ve morfolojik farklılıkları neyin etkilediği net olarak bilinmemektedir. Akut poststreptokoksik glomerulonefrit'nin genetik zeminine bakıldığında, HLA-DR1 ve DRW4 taşıyıcılığında yatkınlığın daha fazla olduğu, oysa HLA- DRW48 ve DR-W8 olanların daha az duyarlı olduğu bilinmektedir (19, 20). Çalışmamızda ACE genotipi ve APSGN hipertansiyonu ve diğer klinik değişkenler arasında ilişki olup olmadığı da araştırılmıştır. Akut poststreptokoksik glomerulonefrit'li hasta grubunda kontrole göre I/D polimorfizmi anlamlı olarak yüksekti. D/D genotipi diğer böbrek hastalıkları için risk etmeni gibi görünse de, bizim hasta grubumuzda %10 gibi düşük oranda görüldüğünden APSGN'li hastalar için riskli genotip olduğunu söylemek güçtür. Literatürdeki ilk çalışma olduğu için de karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır. Sonuç olarak D/D polimorfizmi APSGN'de bir risk etmeni olarak bulunmamıştır, ayrıca I/D genotipine sahip kişilerin APSGN'ye yakalanma riskini 5,17 kat iken, D/D olmayan grupta bu riskin yalnızca 2,7 kat olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Ayrıca D/D genotipi taşımayan hastaların kan basınçları ve Z skorları, D/D genotipi taşıyanlara göre anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Sonuç olarak çalışmamızda D/D genotipi taşıyor olmak APSGN için seyir açısından daha iyi bir etmen olarak görülmüştür. Sıçan örneklerinde yüksek kan basıncı ve ACE bölgesi arasında yakınlık bulunmuştur (21). Literatürde ACE geni ve hipertansiyon ilişkisini gösteren çelişkili yayınlar mevcuttur. Espinel ve ark. (1) çalışmasında D/D genotipinin malin hipertansif hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak Güneş ve ark. (7) Türk toplumunda yaptıkları bir çalışmada hipertansif grupta alel frekansının kontrol grubundan farklı olmadığı belirtilirken, bir meta-analiz çalışmasında ACE I/D genotipinin, esansiyel hipertansiyonda hastalığın oluşumu

ve şiddetini etkilemediği gösterilmiştir (6).

Sonuç olarak, her ne kadar D/D genotipi APSGN oluşumunda ve hipertansiyonunda bir risk etmeni olarak bulunamamış ise de, daha fazla olgunun değerlendirildiği çalışmalara gereksinim vardır.

#### Kaynaklar

1. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990 ; 86: 1343-6.
2. Cambien F, Poirier O, Lecercf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-4.
3. Iwai N, Ohmichi N, Nakamuro Y, et al. DD genotype of the angiotensin- converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994; 90: 2622-8.
4. Ravid M, Savin H, Jutrin I, et al. Long term effect of ACE inhibition on development of nephropathy in diabetes mellitus type II. *Kidney Int Suppl* 1994; 45: 161-2.
5. Espinel E, Tovar JL, Borellas J, et al. Angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in patients with malignant hypertension. *J Clin Hypertens* 2005; 7: 11-5.
6. Mondry A, Loh M, Liu P, et al. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235TA genes and hypertension: suprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol* 2005; 6: 1.
7. Güneş H, Ata N, Değirmenci I, et al. Frequency of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Turkish hypertensive patients. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 838-43.
8. Sulyok E. Acute proliferative glomerulonephritis. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 601-13.
9. Rodriguez-Iturbe B, Braggio B, Colina CJ. Studies on the renin-aldosterone system in the acute nephritic syndrome. *Kidney Int* 1981;19: 445.
10. Rodriguez-Iturbe B, Rubio L, Garcia R. Attack rate of poststreptococcal glomerulonephritis in families. A prospective study. *Lancet* 1981; 1: 401-3.
11. Cole BR, Madrigal LS. Acute proliferative glomerulonephritis and crescentic glomerulonephritis. In: Barrat TM, Avner ED, Harmon WE (eds). *Pediatric Nephrology*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999: 669-89.

12. Lewy JE, Salinas-Madrigol L, Herdson PB, et al. Clinicopathologic correlations in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Medicine* 1971; 50: 453-501.
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.
14. Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, et al. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 9-15.
15. Haszon I, Friedman A, Papp F, et al. ACE gene polymorphism and renal scarring in primary vesicoureteric reflux. *Pediatr Nephrol* 2002;17: 1027-31.
16. Hohenfellner K, Hunley T, Brezinska R, et al. ACE I/D gene polymorphism predicts renal damage in congenital uropathies. *Pediatr Nephrol* 1999;13: 514-8.
17. Özen S, Alikasifoğlu M, Tunçbilek E, et al. Polymorphism in angiotensin converting enzyme gene and reflux nephropathy: a genetic predisposition to scar formation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2031-2.
18. Pinto Sw, Sesso R, Vasconcelos E, et al. Follow up of patients with epidemic poststreptococcal glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 249-55.
19. Layrisse Z, Rodriguez-Iturbe B, Garcia-Ramirez R, et al. Family studies of the HLA system in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Human Immunol* 1983; 7: 177-85.
20. Naito S, Hohara M, Arakawa K. Association of class II antigens of HLA with primary glomerulopathies. *Nephron* 1987; 45: 111-4.
21. Deng Y, Rapp JP. Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat Genet* 1992; 1: 267- 72.