

Henoch-Schonlein Purpuralı Çocuklarda Angiotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizmi

Hasan DURSUN *, Aytül NOYAN *, Aysun KARABAY BAYAZIT *, Selçuk MATYAR **, Mithat BÜYÜKÇELİK *, Behçet ŞİMŞEK *, Gülen ATTILA **, Nurcan CENGİZ ***, Ali ANARAT *

Henoch-Schonlein Purpuralı Çocuklarda Angiotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizmi

Amaç: Henoch-Schönlein purpuralı (HSP) 54 çocukta anjiotensin konverting enzim (ACE) gen polimorfizminin hastalığın kliniği, prognozu ve klinik seyri ile olan ilişkisini araştırmak amacıyla ACE geninin insersiyon (I) ve delesyon (D) polimorfizmini araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Hasta kan örnekleri EDTA'lı tüpe alındı. Lökosit DNA'sı elde edilerek PCR yöntemiyle ACE I/D polimorfizmleri belirlendi.

Bulgular: Hastaların tümünde ACE genotipleri II, ID ve DD'nin oranları sırasıyla % 4, % 74 ve % 22 olarak saptandı. Hastalar HSP nefriti olanlar (n=14), HSP'li ve hafif idrar bulguları olanlar (n=18) ve böbrek tutulumu olmayanlar (n=22) olmak üzere üç gruba ayrıldı. ACE genotipleri II, ID ve DD'nin dağılımları sırasıyla HSP nefritinde % 7, % 57, % 36; hafif idrar bulguları olanlarda % 0, % 89, % 11; böbrek tutulumu olmayanlarda % 5, % 72, % 23 olarak saptandı. Renal tutulum varlığı ile ACE genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($\chi^2=4.39$, $p=0.356$). ACE allelleri I ve D'nin dağılımları sırasıyla HSP nefritinde % 36 ve % 64, hafif idrar bulguları olanlarda % 44 ve % 56, böbrek tutulumu olmayanlarda ise % 41 ve % 59 olarak saptandı. Böbrek tutulumu ile ACE allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($\chi^2=0.500$, $p=0.780$).

Sonuç: Bu veriler HSP'li çocuklarda böbrek tutulumu ile DD genotipi veya D alleli arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiyi desteklememektedir. Bununla birlikte D alleli hastaların % 96'sında saptandı ve DD genotipi de HSP nefritli hastalarda böbrek tutulumu olmayanlara göre daha yüksek bulundu. Bu sonuçlara göre hastalığın oluşumunda ve renal tutulumda D allelinin kolaylaştırıcı ve I allelinin ise koruyucu faktör olduğunu gösterdik, fakat bu bulguları destekleyen daha büyük çalışmalar gereklidir.

Anahtar kelimeler: ACE gen polimorfizmi, Henoch-Schönlein purpuru

Çocuk Dergisi 2013; 13(1):11-15

Alındığı tarih: 06.11.2012

Kabul tarihi: 12.02.2013

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı

** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

*** Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Hasan Dursun, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi, 01150 Adana

e-posta: dursunhs@yahoo.com

Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphism in Children with Henoch-Schonlein Purpura

Objective: We examined the insertion (I) and deletion (D) polymorphism of angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism in 54 children with HSP to investigate the associated with presentation, prognosis and progression of children with Henoch-Schönlein purpura (HSP).

Material and Methods: Blood samples were collected from patients and obtained into EDTA. Genomic DNA from peripheral blood lymphocytes was purified. The ACE I/D gene polymorphism was detected by PCR with primer sequences derived.

Results: The percent of ACE genotypes II, ID and DD in all patients was detected 4 %, 74 % and 22 % respectively. Patients were divided into 3 groups as HSP nephritis (n=14), HSP with minor urinary anomaly (n=18) and HSP without renal involvement (n=22). The distribution of ACE genotypes II, ID and DD respectively in HSP nephritis was 7 %, 57 %, 36 %; in HSP with minor urinary anomaly was 0 %, 89 %, 11 %; and in HSP without renal involvement was 5 %, 72 %, 23 % detected. No association was found between the ACE genotypes and the presence of renal involvement ($\chi^2=4.39$, $p=0.356$). The distribution of ACE alleles I and D respectively in HSP nephritis was 36 % and 64 %; in HSP with minor urinary anomaly was 44 % and 56 % and in HSP without renal involvement was 41 % and 59 % detected. No association was found between the ACE alleles and the presence of renal involvement ($\chi^2=0.500$, $p=0.780$).

Conclusion: In conclusion these results does not support a statistically significantly association between renal involvement and DD genotype or D allele in children with HSP. However D allele was detected in 96 % patients and DD genotype was higher in patients with HSP nephritis than patients without renal involvement. According these results we showed that D allele is a facilitative and I allele is a protective factor for development and renal involvement of disease. However larger studies are required to confirm these results.

Key words: ACE gene polymorphism, Henoch-Schönlein purpura

J Child 2013; 13(1):11-15

GİRİŞ

Henoch-Schönlein purpurası (HSP), küçük damarları tutan, etiyojisi tam olarak bilinmeyen, çocuklarda

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları; HSP nefriti olan grup (Grup 1), HSP'li ve hafif idrar bulguları olan grup (Grup 2) ve HSP'li fakat böbrek tutulumu olmayan grup (Grup 3).

Parametreler	Tüm hastalar	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Hasta sayısı	54	14	18	22
Erkek/Kadın	31/23	10/4	8/10	13/9
Tanı yaşı (yıl±SS7)	9.15±3.8	11.96±3.5	8.89±3.4	7.57±3.4
Deri tutulumu (%)	100	100	100	100
GİS tutulumu (%)	43	50	44	36
Eklem tutulumu (%)	37	36	39	36
Böbrek tutulumu (%)	59	100	100	0
Hafif proteinüri	33	0	100	0
Nefrotik sınırdaki proteinüri	26	100	0	0
Mikroskopik hematüri	33	0	100	0
Makroskopik hematüri	26	100	0	0
Böbrek yetersizliği	2	7	0	0
Başlangıçta hipertansiyon	7	29	0	0
Böbrek biyopsisinde kresent olması	26	100	0	0

HSP: Henoch Schönlein Purpurası, GİS: Gastrointestinal sistem, SS: Standart sapma.

en sık görülen lökositoklastik bir vaskülitir. Birçok sistemi tutan bir hastalık olmasına karşın en sık cilt, eklemler ve gastrointestinal sistemi tutar. Bununla birlikte böbrek tutulumu da sık görülür ve böbrek tutulum derecesi uzun dönemde prognozu etkileyen en önemli bulgudur ^(1,2).

Angiotensin konverting enzim (ACE), çinko metalopeptidaz enzim ailesinden olup, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünden sorumludur. 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 ^(2,3). Dolayısıyla ACE düzeyi daha yüksek olan kişiler yani D aleli için homozigot bireyler anjiyotensin II'ye bağlı risklere daha fazla maruz kalırlar.

Son yıllarda ACE gen polimorfizminin hastalıklarla ilişkisini araştıran çok sayıda yayın bulunmaktadır. ACE geni DD polimorfizmi ile diyabetik nefropati, fokal segmental glomerülosklerozis ve Immunglobulin A nefropatisi gibi hastalıkların kapsayan çok sayıda böbrek hastalığı ile pozitif bir ilişki saptanmıştır ⁽⁴⁻⁶⁾. HSP'li çocuklarda DD genotipi ile kronik böbrek yetmezliği ve proteinüri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ^(7,8). Özkaya ve ark. ⁽⁹⁾ HSP ve HSP nefriti ile ACE gen polimorfizmi arasında anlamlı bir

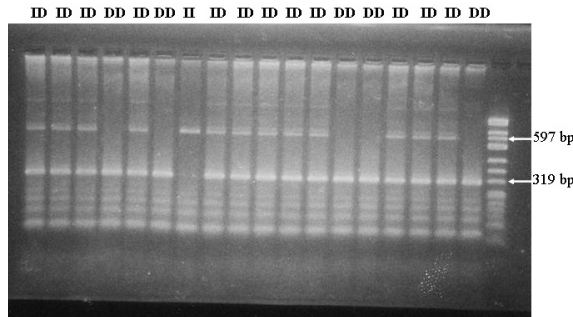
ilişki olabileceğini göstermişlerdir. Buna karşın Amoroso ve ark. ⁽¹⁰⁾ HSP'li çocuklarda renal fonksiyonlarda progressif bozulma ile ACE I/D polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptamamıştır. Bu çalışmanın amacı HSP'li çocuklarda ACE gen polimorfizminin hastalığın kliniği, prognozu ve klinik bulgularla olan ilişkisini araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yaşları 1.5-17 yıl arasında (ortalama 9.15±3.82) olan toplam 54 (31 erkek, 23 kız) HSP'li çocuk çalışmaya alındı. Çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu onayı alındı. Hastaların anne veya babalarından çalışmaya katılan çocuklar için bilgilendirilmiş onam formu alındı. Hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir. HSP tanısı Amerikan Romatoloji Derneği'nin önerilerine göre kondu ⁽¹¹⁾. Tüm hastalarda cilt tutulumu mevcuttu. ACE genotipi, idrarda protein, kreatinin ve kan analizleri yapıldı ve kreatinin klirensi hesaplandı. Tüm hastalarda başvuru sırasında kan basıncı ölçüldü. Hastalar hematüri ve proteinürisi olanlar (HSP nefriti) (n=14), mikroskopik hematürisi olan ama proteinürisi olmayanlar (hafif böbrek tutulumu) (n=18) ve hiç idrar bulgusu olmayanlar (böbrek tutulumu olmayanlar) (n=22) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Çalışma öncesi ve çalışma sırasında hiçbir hastaya ACE inhibitörü verilmedi.

Hasta kan örnekleri EDTA'lı tüpe alındı. Lökosit DNA'sı Miller yöntemiyle elde edildi ⁽¹²⁾. Zee ve ark. ⁽¹³⁾ tarafından geliştirilen PCR yöntemiyle

ACE I/D polimorfizimleri belirlendi. Primer dizile-ri, 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 AGA T 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 polyme-rase (Perkin Elmer Cetus) içeren karışım ekle-nerek son hacim 50 ml'ye ayarlandı. Bu örnekler otomatik PCR cihazında (Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler); 94 C'de 1 dakika denatürasyon, 58 C'de 1 dk. "annealing" ve 72 C'de 1 dk. primer uzaması işlemi toplam 30 döngü olacak şekilde çoğaltıldı. ACE gen lokusu PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde (% 3 agaroz) 150V'da, 60 dk. süreyle yürütüldü ve oda ısısında "ethidium bromid" ile boyandıktan sonra UV altında görünür hale getirildi (Şekil 1). Serum kreatinin Jaffe's alkalen pikrat yöntemi ile, kan üre nitrojeni ise üreaz UV test ile çalışıldı.



Şekil 1. ACE geninin (17q23) intron 16'da polimorfizm. % 3 agaroz jelde PCR ile ayrıştırıldı ve ethidium bromid boyama ile gösterildi (60 dk. ve 150 v).

Tablo 2. HSP'li çocuklarda ACE geninin genotip ve allel sıklık-ları; HSP nefriti (Grup 1), HSP'li ve hafif idrar bulguları olanlar (Grup 2) ve HSP'li ve böbrek tutulumu olmayanlar (Grup 3).

	Tüm hastalar (n=54)	Grup 1 (n=14)	Grup 2 (n=18)	Grup 3 (n=22)
ACE genotipi				
II	2 (% 4)	1 (% 7)	0 (% 0)	1 (% 5)
ID	40 (% 74)	8 (% 57)	16 (% 89)	16 (% 72)
DD	12 (% 22)	5 (% 36)	2 (% 11)	5 (% 23)
ACE alleli				
I	44 (% 41)	10 (% 36)	16 (% 44)	18 (% 41)
D	64 (% 59)	18 (% 64)	20 (% 56)	26 (% 59)

HSP: Henoch Schönlein Purpurası, ACE: Anjiotensin konverting enzim.

Tüm istatistiksel incelemeler SPSS 16.0 istatistik programında çalışıldı. Genotipler, alel frekansı kli-nik özellikler ki-kare testi ile değerlendirildi. Odds oranı ve güven aralıkları hesaplandı. Yaş, biyokim-yasal değişkenler ve sistolik ve diyastolik kan basıncı Z-skoru, Mann Whitney U testi ile değeren-dirildi. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

ACE geninin genotip ve allel oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar incelendi-ğinde; hastaların 2 (% 4)'sinde II, 40 (% 74)'ında ID ve 12 (% 22)'sinde DD genotipi saptandı. Genel ola-rak HSP'li hastalarda II genotipinin çok düşük oran-da olduğu saptandı. HSP nefriti olan grupta 1 (% 7) hastada II, 8 (% 57) hastada ID ve 5 (% 36) hastada DD genotipi saptandı. Hafif böbrek tutulumu olan grupta 0 (% 0) hastada II, 16 (% 89) hastada ID ve 2 (% 11) hastada DD genotipi saptandı. Böbrek tutulu-mu olmayan grupta ise 1 (% 5) hastada II, 16 (% 72) hastada ID ve 5 (% 23) hastada DD genotipi saptandı. Böbrek tutulumu ile ACE genotipi arasında istatistik-sel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($\chi^2=4.39$, p=0.356). Buna karşın DD genotipi olan HSP nefritli hastalarda DD genotipi olmayanlara göre istatistiksel bir anlamlılık olmamakla birlikte proteinürinin kay-bolmasının daha geç düzeldiği gözlemlendi.

HSP nefriti olan grupta 10 (% 36) hastada I ve 18 (% 64) hastada D alleli saptandı. Hafif böbrek tutulu-mu olan grupta 16 (% 44) hastada I ve 20 (% 56) hastada D alleli saptandı. Böbrek tutulumu olmayan

Tablo 2. HSP'li çocukların ACE genotipine göre demografik özellikleri ve klinik bulguları.

Parametreler	I/I genotipi	I/D genotipi	D/D genotipi
Hasta sayısı	14	18	22
Erkek/kız	10/4	8/10	13/9
Tanı sırasında yaşı (yıl±SS)	11.96±3.5	8.89±3.4	7.57±3.4
Cilt tutulumu (%)	100	100	100
GİS tutulumu (%)	50	44	36
Eklemler tutulumu (%)	36	39	36
Böbrek tutulumu (%)	100	100	0
Hafif proteinüri	0	100	0
Nefrotik sınırdaki proteinüri	100	0	0
Mikroskopik hematüri	0	100	0
Makroskopik hematüri	100	0	0
Böbrek yetersizliği	7	0	0
Başlangıçta hipertansiyon	29	0	0
Böbrek biyopsisinde kresent olması	100	0	0

GİS: Gastrointestinal sistem, HSP: Henoch Schönlein Purpurası.

grupta ise 18 (% 41) hastada I ve 26 (% 59) hastada D alleli saptandı. Böbrek tutulumu ile ACE allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($\chi^2=0.500$, $p=0.780$).

Kan basıncı ve kreatinin klirensi her üç grupta da farklılık göstermedi ($p>0.05$). Tüm hasta gruplarının hastalığın başlangıcındaki klinik bulguları, laboratuvar bulguları ve histopatolojik özellikleri ACE genotipine göre Tablo 3'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarının patogeneğinde renin-anjiyotensin sisteminin özellikle anjiyotensin II'nin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığında hipertansiyon, diyabet, vezikoüreteral 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⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Bu çalışmada ACE gen polimorfizmi ile çocukluk çağında HSP'nin klinik seyri arasındaki ilişki araştırıldı. Literatürde ACE gen D/I polimorfizmi ile IgA nefropatisi ve diğer bazı real hastalıkların klinik seyri arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır⁽¹⁰⁻¹⁶⁾. HSP nefriti ile IgA nefropatisinin bazı histopatolojik özelliklerinin aynı olması nedeniyle IgA nefropatisinde yapılmış çalışmalara benzer bir çalışmayı bu hasta grubunda yaptık. HSP'li hastalarda ID genotipi % 74 ile en yüksek oranda saptandı, II genotipi ise sadece 2 hastada gösterildi (Tablo 2). Gruplara bakıldığında ise DD genotipi HSP nefritli hastalarda diğer gruplara göre daha yüksek oranda (% 36) saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı bir bulgu saptanmamasına karşın, bu çalışmanın önemli bir sonucu da persistan proteinüri olan HSP nefritli hastaların büyük oranda DD genotipi taşımalarıdır. Proteinüri oranı DD genotipli hastalarda II genotipli hastalara oranla 5 kat daha fazla saptandı, buna karşın ID fenotipli hastalarda proteinüri oranı DD ve II genotipi arasında bir oarana sahipti. Çalışmaya alınan hastaların sadece 2'sinde II genotipi saptandı. Bu nedenle II genotipine sahip olmanın HSP için koruyucu bir faktör olduğu söylenebilir. Bu çalışmanın başka bir sonucu proteinürinin DD genotipli hastalar-

da DD genotipi olmayanlara göre tedaviye daha geç yanıt verdiği ve zor düzeldiğidir. Bu nedenle HSP nefritli hastalarda D allelinin persistan ve bazen ciddi proteinüri ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Hastalığın D veya I allellerinin frekansları ile ilişkisine bakıldığında 52 hastada ACE geninin D alleli saptandı. Bu oran genel popülasyondaki D alleli oranına göre çok daha yüksekti. Buna karşın 42 hastada ise I alleli saptandı. Hastalığın sistem tutulumları ve özellikle nefropati ile ilişkisi hastalığın seyri açısından son derece önemlidir. Bu nedenle allellerin HSP nefriti ile ilişkisine bakıldığında D alleli nefritli hastalarda diğer hastalara göre daha yüksek oranda saptandı. HSP nefritli 14 hastanın 13'ünde D alleli saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına karşın D allelinin HSP için bir risk faktörü olabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak, her ne kadar D/D genotipi ve D alleli istatistiksel olarak HSP'de yüksek saptanmamış olsa da HSP hastalarının % 96'sında D allelinin bulunması ve DD genotipinin nefritli hastalarda daha yüksek oranda saptanması D allelinin hastalık için kolaylaştırıcı, I allelinin ise koruyucu faktör olduğu sonucuna varılabilir. Ancak, daha geniş serili çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92. <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780370206> PMID:8129773
2. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. 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. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI114844> PMID:1976655 PMCID:296868
3. Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994;90:2622-8. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.90.6.2622> PMID:7994801
4. Dorria A, Warram JH, Krowleski AS. Genetic predisposition to diabetic nephropathy: evidence for a role of the angiotensin I converting enzyme gene. *Diabetes* 1994;43:690-5. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.43.5.690>
5. Lee DY, Kim W, Kang SK, Koh GY, Park SK. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 1997;77:471-3. <http://dx.doi.org/10.1159/000190326> PMID:9434071
6. Harden PN, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RS. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 1995;345:1540-1.

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91088-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91088-3)
7. **Tatsuma N, Asano T, Yoshida J, Ohashi R, Munakata E, Ambo K, Tsuchiya M.** Angiotensin converting enzyme gene polymorphism with nephritis of Henoch-Schonlein purpura (abstract). *Pediatr Nephrol* 1998;12:C123.
 8. **Yoshioka T, Xu Y, Yoshida H, Shiraga H, Muraki T, Ito K.** Deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene predicts persistent proteinuria in Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Arch Dis Child* 1998;79:394-9. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.79.5.394> PMID:10193250 PMCid:1717731
 9. **Ozkaya O, Soylemezoglu O, Gonen S, Misirlioglu M, Tuncer S, Kalman S, Buyan N.** Renin-angiotensin system gene polymorphisms: association with susceptibility to Henoch-Schonlein purpura and renal involvement. *Clin Rheumatol* 2006;25:861-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-006-0207-4> PMID:16521052
 10. **Amoroso A, Danek G, Vatta S, Crovella S, Berrino M, Guarrera S, Fasano ME, Coppo R and Behalf of the Italian Group of Renal Immunopathology.** Polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene and severity of renal disease in Henoch-Schonlein patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3184-8. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/13.12.3184> PMID:9870486
 11. **Mills JA, Michel BA, Block D.** The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein Purpura. *Arthritis Rheum* 1990;33:1114-21. <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780330809> PMID:2202310
 12. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998;16:1215-20. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
 13. **Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, Morris BJ.** Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res* 184:9-15.
 14. **Haszon I, Friedman AL, Papp F, Bereczki C, Baji S, Bodrogi T.** ACE gene polymorphism and renal scarring in primary vesicoureteric reflux. *Pediatr Nephrol* 2002;17:1027-31. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-002-0968-1> PMID:12478352
 15. **Hohenfellner K, Hunley TE, Brezinska R, Brodhag P, Shyr Y, Brenner W.** ACE I/D gene polymorphism predicts renal damage in congenital uropathies. *Pediatr Nephrol* 1999;13:514-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s004670050649> PMID:10452281
 16. **Ozen S, Alikasifoglu M, Tuncbilek E, Bakkaloglu A, Besbas N, Aran B, Saatci U.** Polymorphism in angiotensin converting enzyme gene and reflux nephropathy: a genetic predisposition to scar formation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:2031-2. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a027788> PMID:9306373