

# Preeklampşik Olgularda ACE Gen Polimorfizmi ve Hiperhomosisteinemi

## The Association of Preeclampsia with Angiotensin-Converting Enzyme I/D Gene Polymorphism and Hyperhomocysteinemia

Elif İşbilen\* Yeşim Ünlüçerçi\* Figen Gürdöl\* Hülya Yılmaz\*\*  
Turgay İsbir\*\* Yavuz Ceylan\*\*\* Recep Has\*\*\*\*

\*İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

\*\*İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Merkezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

\*\*\*SSK Bakırköy Hastanesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Kliniği

\*\*\*\*İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Anabilim Dalı

### ÖZET

Bu çalışmada ACE gen polimorfizminin preeklampsi etiyopatogenezindeki rolü ile serum ACE aktivitesinin genotip dağılımıyla bağıntısı araştırıldı ve plazma homosistein konsantrasyonunun preeklampşik olgulardaki değerlendirilmesi yapıldı. Deney ve kontrol gruplarımızı üçüncü trimesterlerindeki preeklampşik gebeler (n=95), sağlıklı gebeler (n=50) ve sağlıklı normotensif olgular (n=39) oluşturdu. Her üç çalışma grubunda plazma homosistein düzeyi ve serum ACE aktivitesi ölçüldü. Lökositlerden DNA izole edilerek ACE geninin insersiyon/delesyon polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tayin edildi.

Preeklampşik grupta DD genotipinin daha sık olduğu ve D alleli dağılımının kontrol grubundaki dağılımla kıyaslandığında anlamlı bulunduğu (p=0.0457; Odds Ratio 1.535; 95% CI=1.007-2.338), plazma ACE aktivitesinin preeklampside yükseldiği (p<0.05), bu yüksekliğin genotiple bağıntı gösterdiği ve D allelini taşıyanlarda belirgin olduğu, preeklampşik olgularda hafif fakat anlamlı hiperhomosisteineminin bulunduğu (p<0.001) ve bu parametrenin ACE aktivitesiyle korelasyon vermediği saptandı.

Sonuç olarak, elde edilen olgular ACE gen delesyon allelinin dolaşımdaki ACE aktivitelerinde yüksekliği yol açtığını ve gebelikte preeklampsinin ortaya çıkışı ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Preeklampsi, ACE geni, polimorfizm, hiperhomosisteinemi

### ABSTRACT

Hyperhomocysteinemia and increased ACE activity due to the deletion polymorphism of the ACE gene are two common features in a wide variety of pathological conditions that exhibit endothelial disturbances. In this study, we examined both the I/D genotype distribution and the activity of ACE in preeclamptic pregnant, and we evaluated the plasma homocysteine level whether it has any relation with the above-mentioned parameters. 95 preeclamptic, and 50 normotensive pregnant patients in their third

trimester consisted the study groups. 39 healthy individuals with no history of pregnancy complications were included in the study as normotensive controls. ACE I/D gene polymorphism was studied in all subjects, and the prevalence of deletion polymorphism was found significant in the preeclamptics ( $p=0.0457$ ; Odds Ratio 1.535; 95% CI=1.007-2.338). ACE activity in the sera of preeclamptics was found increased with regard to both normotensive controls and healthy pregnant (p<0.05). The influence of the allelic distribution on the enzyme activity was detected significantly in the preeclamptics bearing II genotype, whose exhibited lower activity than the patients with the other genotypes (p<0.02) in spite of the presence of hypertension. Plasma homocysteine concentrations were also elevated in preeclamptics (p<0.001), but this was not correlated with the ACE activity.

Our data indicate that ACE gene deletion allele, which causes high enzyme activity in circulation, may be associated with the occurrence of preeclampsia during pregnancy.

**Key Words:** Preeclampsia, ACE gene, polymorphism, hyperhomocysteinemia

## GİRİŞ

Vasküler endotel hücrelerinde genellikle ektoenzim olarak bulunan Anjiotensin I- konverting enzim (ACE, EC 3.4.15.1) anjiotensin I'ın anjiotensin II'ye dönüşümünü ve endotel yüzeyinde bradikininin yıkımını sağlar (1). Normal popülasyonda ACE genindeki delesyon/insersiyon (D/I) polimorfizmi sonucunda enzim aktivitesinde değişiklik görüldüğünden plazma ve doku ACE aktivitelerinin genetik kontrol altında olduğuna inanılmaktadır (2, 3). Homozigot D alleli varlığında endotel disfonksiyonunun ve hipertansiyonun görüldüğü bildirilmiştir (4-6). Ancak bazı çalışmalar bunu doğrulamamaktadır (7,8).

Endotel hasarının görüldüğü hastalıklar aynı zamanda preeklampsi için predispozan bir faktör oluşturmaktadır. Bu nedenle, endotel hücre aktivasyonu veya disfonksiyonu preeklampsi patogenezinin ana sebebi olarak gösterilmektedir (9). Homosisteinin endotel hücre hasarındaki rolünün gösterilmiş olması, preeklampsideki endotel disfonksiyonunda hiperhomosisteineminin rol alabileceğini de düşündürmüştür (10). Plazma homosistein konsantrasyonu, enzim değişiklikleri, beslenme, çeşitli ilaçlar, yaş ve gebelik gibi faktörlere bağlı olarak düzenlenir. Bunların arasında plazma homosistein konsantrasyonunu düşüren tek faktör gebeliktir (11). Gebeliğin 3. trimesterindeki yüksek plazma homosistein düzeylerinin preeklampsi ve/veya diğer gebelik komplikasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir (12,13).

Endotel disfonksiyonunun eşlik ettiği birçok hastalıkta hiperhomosisteinemi ve ACE enzim aktivitesindeki artış birlikte görülmektedir. Preeklampsinin etiyopatogenezine yönelik çalışmalarda genetik yatkınlık olduğu gözlenmiş ve ACE I/D polimorfizmi ile preeklampsi arasındaki bağıntının önemli olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda, preeklampsi gebelerde ACE genotip dağılımının plazma enzim aktivitesi ile bağıntısını ve plazma homosistein düzeylerinin bu parametrelerle ilişkisini incelemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Olgular

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği ile Bakırköy Doğumüne müracaat eden, gebeliğin son trimesterinde olan ve yapılan klinik ve laboratuvar tetkikleri sonucu preeklampsi tanısı konulan 95 hasta preeklampsi deney grubunu oluşturdu. Preeklampsi, gebelikle uyarılmış hipertansiyon ve 24 saatte 300 mg.ın üzerinde proteinürinin varlığı ile tanımlandı. Aynı trimesterdeki 50 normotensif gebe ise sağlıklı gebe grubunu oluşturdu. Daha önceki gebeliklerinde preeklampsi hikayesi bulunmayan 39 normotensif olgu kontrol grubunu oluşturdu. Olguların özellikleri Tablo 1'de görülmektedir.

### Yöntemler

Tüm olgulardan alınan EDTA'lı kan örnekleri, DNA ekstraksiyonu (14) ve homosistein ölçümleri için kullanıldı. Genotip tayini, poli-

meraz zincir reaksiyonu (PCR, MJ Research Tecne) ve %2'lik agaroz jel elektroforezi (LKB 2013 Miniphor Electrophoresis) ile yapıldı (15). Plazma total homosistein ölçümleri tri-n-butilfosfinin indirgeyici olarak kullanıldığı HPLC yöntemi ile gerçekleştirildi (16). HPLC sistemi, 2 pompa içeren Waters 600 controller olup, Waters 474 floresans dedektör ve Novo Pock C18 4x150 mm, 5 µm partikül çaplı kolon ile çalışıldı. Florokromofor olarak amonyum 7-fluorobenzo-2-okza-1,3-diazol-4-sülfonat, internal standart olarak N-asetil sistein, standart olarak D,L-homosistein kullanıldı.

ACE aktivitesi ölçümleri için olguların serumları çalışılana kadar -80°C'de saklandı. Enzim aktivitesi, N-(3-(2-furil) akrilolil)-L-fenilalanil glisilglisin substrat olarak kullanıldığı Sigma ticari kiti (Sigma, St Louis, MO, USA) ile ölçüldü (17).

**İstatistik:** <sup>2</sup> testi ile allel dağılımı, Student's t testi ile biyokimyasal parametrelerin anlamlılığı analiz edildi. Korelasyon analizleri için Pearson testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS 11.0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

## BULGULAR

Kontrol ve preeklampitik olgulardaki ACE genotip dağılımı Tablo II'de görülmektedir. Normo-

tensif olgularda (kontrol + sağlıklı gebe, n=89), DD, ID ve II genotiplerinin dağılımları sırasıyla %34.8, %41.6 ve %23.6 olarak bulundu. 95 preeklampitik olguda ise DD genotipi 47 (%49.5), ID genotipi 31 (%32.6) ve II genotipi 17 (%17.9) olguda görüldü. Bu olgularda D ve I allellerinin dağılımı Tablo II'de görülmektedir. Allel dağılımına göre D allelinin yüzdesi preeklampitik olgularda normotensif olgulara göre anlamlı olarak yüksekti ( $\chi^2=3.992$ , d.f. 1,  $p=0.0457$ ; Odds ratio 1.535; %95 Confidence interval= 1.007-2.338).

ACE aktivitesi, sağlıklı gebe ve kontrol gruplarına kıyasla preeklampitik gebelerde anlamlı olarak yükselmiş bulundu ( $p<0.05$ ; Şekil 1). Olgular allelik polimorfizme göre gruplandırıldığında en düşük ACE aktivitesi II genotipindeki olgularda bulundu ( $p<0.02$ ; Tablo III).

Plazma homosistein düzeyleri, preeklampitik gebelerde hafif olmakla beraber anlamlı bir yükselme gösterdi ( $p<0.001$ ). Sağlıklı gebelerdeki ortalama değer ( $7.66 \pm 2.74$  µmol/L) ise kontroldekine ( $8.80 \pm 2.25$  µmol/L) göre biraz düşük bulundu (Şekil 2).

ACE aktivitesi ile homosistein düzeyi arasında korelasyon saptanmadı.

**Tablo I.** Olguların klinik özellikleri.

	Preeklampsi	Sağlıklı gebe	Kontrol
Olgu sayısı	95	50	39
Median yaş (min-maks) (yıl)	28 (18-43)	24 (19-34)	38 (20-52)
Gestasyonel periyod (hafta)	28-40	28-40	-
Sistolik kan basıncı	>140 mm Hg	<140 mm Hg	<140 mm Hg
Diastolik kan basıncı	> 110 mm Hg	70-90 mm Hg	60-80 mm Hg
Proteinüri	+ / ++++	- / trace	-
Vücut kütle indeksi (kg/m <sup>2</sup> )	26.36 ± 4.37	23.96 ± 3.02	24.87 ± 4.07

**Tablo II.** Preeklampsi ve kontrol grubunda ACE genotip ve allel dağılımı.

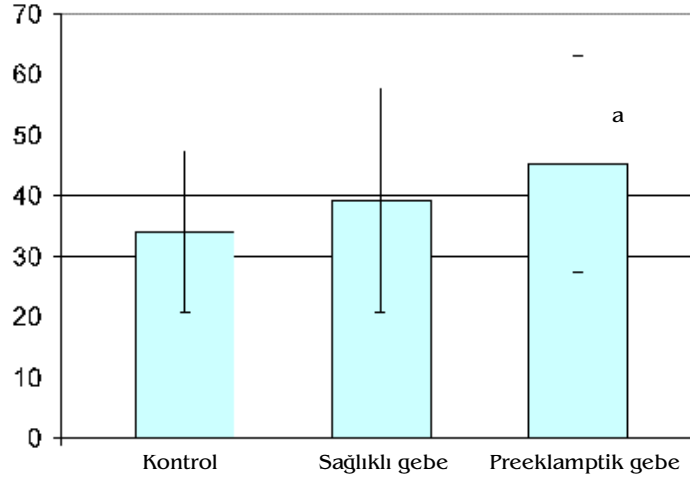
	Preeklampsi n= 95	Kontrol n= 89
DD genotipi	47 (% 49.5)	31 (% 34.8)
ID genotipi	31 (% 32.6)	37 (% 41.6)
II genotipi	17 (% 17.9)	21 (% 23.6)
D alleli	125 (% 65.8)	99 (% 55.6)
I alleli	65 (% 34.2)	79 (% 44.4)

**Tablo III.** Preeklampitik ve sağlıklı gebelerde ACE aktivitesi ve homosistein konsantrasyonu (Ort ± SD).

Genotip	Preeklampitik gebe		Sağlıklı gebe	
	t-homosistein (µmol/L)	ACE aktivitesi (IU/L)	t-homosistein (µmol/L)	ACE aktivitesi (IU/L)
DD	10.37 ± 3.99 (n= 28)	48.24 ± 16.80 (n= 26)	7.80 ± 2.55 (n= 17)	43.98 ± 19.65 (n= 14)
ID	10.50 ± 3.83 (n= 21)	47.90 ± 15.46 (n= 22)	7.97 ± 3.09 (n= 19)	38.17 ± 18.49 (n= 17)
II	10.45 ± 3.17 (n= 9)	30.21 ± 19.90 <sup>a</sup> (n= 9)	7.08 ± 2.56 (n= 14)	35.45 ± 17.59 (n= 13)

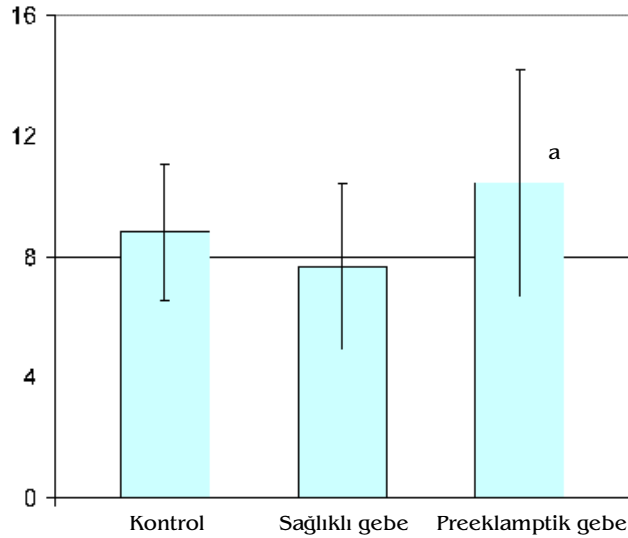
Preeklampitik gebelerde ID ve DD genotipleri ile karşılaştırıldığında: <sup>a</sup> p<0.02

**ACE aktivitesi (IU/L)**



**Şekil 1.** Olguların serum ACE aktiviteleri. <sup>a</sup>: p<0.05 diğer gruplarla karşılaştırıldığında.

**t-Hcy ( µmol/L)**



**Şekil 2.** Olguların plazma total homosistein düzeyleri sağlıklı gebelerle karşılaştırıldığında <sup>a</sup>: p<0.001.

## TARTIŞMA

ACE geni delesyon polimorfizminin preeklampsi ile ilişkisini inceleyen çalışmalarda popülasyona ve yerleşim bölgesine göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Uzakdoğuda, DD genotip sıklığı ile gebeliğe bağlı hipertansiyon arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (18). Avrupa'da 72 preeklampşik gebede yapılan bir çalışmada ise allel dağılımında anlamlı bir fark görülmemiştir (19). Tamura ve arkadaşları da buna benzer sonuçlar elde etmişlerdir (20). Bizim popülasyonumuzda, preeklampsinin gelişimi ile I/D polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Kontrol popülasyonumuzda D alleli sıklığı (%55.6), Japonlardan daha yüksek (%33) iken, Alman popülasyonu (%50) ile hemen hemen aynıdır (6,8). Daha önceki çalışmalarda, ACE genotipinin serum ACE aktivitesini etkilediği ve DD genotipi taşıyan kişilerin ACE aktivitelerinin II genotipini taşıyanlara göre iki kat fazla olduğu gösterilmiştir (3). Yine serum ACE aktivitesinin kan basıncı ile bağıntılı olduğu bildirilmiştir (21).

Bu çalışmada gözlenen preeklampşik gebelerdeki yüksek serum enzim aktiviteleri daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (21-23). Yine sağlıklı gebelerin ACE aktivitelerinin gebe olmayan kontrol grubuyla aynı düzeylerde olması Parente ve ark. çalışmasıyla benzeşmektedir (24). Ayrıca çalışmamızda ACE II genotipinde serum ACE aktivitesinin preeklampşik gebelerde de düşük olduğu saptanmıştır. Ancak düşük ACE aktivitesine rağmen hipertansiyonun görülmesi ilginçtir. Bu durum, dokularda anjiotensin II oluşumunu katalizleyen katapsin G, kimosatin-duyarlı enzim ve kimaz gibi enzimlerin varlığı ile açıklanabilir (25). Bir çok dokuda bulunan ve bir serin proteaz olan -kimaz insan kalbinden izole edilmiş ve anjiotensin II-oluşturan kimaz olarak adlandırılmıştır (26). Renin-anjiyotensin sistemine etkili bu alternatif enzimlerin endotel hasarından sonra ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (25, 27).

Preeklampside yüksek plazma homosistein düzeyleri biri hariç (28) olmak üzere birçok

çalışmanın ortak bulgusudur (9,29-32). Plazma homosistein düzeylerinin ılımlı artışının endotel disfonksiyonunun sebebinden çok sonucu olduğu yönünde görüşler vardır (33). Çalışmamızda görülen yüksek homosistein düzeyleri, yüksek ACE aktivitesi sonucu gelişen endotel hasarına bağlı olabilir.

Sonuç olarak, ACE gen I/D polimorfizminin gebelikte preeklampsi görülme sıklığına eşlik ettiğini söyleyebiliriz. Bu olgularda görülen hiperhomosisteineminin bağımsız bir faktör olmaktan çok hipertansiyonun bir sonucu olduğu ileri sürülebilir. Bunu aydınlatmak için de gebeliğin başından itibaren ve doğumdan sonra plazma homosistein düzeylerinin takibi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Ehlers RWM, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme. New concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 1989; 28: 5311-5317.
2. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas MF, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
3. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F. 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* 1992; 51: 197-205.
4. Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers A. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* 1999; 33: 1164-1168.
5. Cambien F, Poirer O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arvelier D. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644.
6. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202.
7. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1992; 19: 72-75.
8. Burg M, Mene J, Ostendorf T, Kliem V, Floege J. Gene-polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase in

- patients with primary glomerulonephritis. Clin Nephrol 1997; 48: 205-211.
9. Dekker GA, de Vries JIP, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BME, Jakobs C, van Geijn HP. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1042-1048.
  10. Dekker GA, van Geijn HP. Endothelial dysfunction in preeclampsia. Part II: Reducing the adverse consequences of endothelial cell dysfunction in preeclampsia; therapeutic perspectives. J Perinat Med 1996; 24: 119-39.
  11. Andersson A, Hultberg B, Brattsrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30: 377-379.
  12. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, preeclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. Placenta 1999; 20: 519-529.
  13. Wang J, Trudinger BJ, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. Elevated circulating homocysteine levels in placental vascular disease and associated preeclampsia. Br J Obstet Gynaecol 2000; 107: 935-938.
  14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HS. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1998; 16: 1215.
  15. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCPI) (dipeptidyl carboxypeptidase I). Nucleic Acids Res 1992; 20: 1435.
  16. Ubbink JB, Vermaak WHJ, Bissbort S. Rapid high performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. J Chromatography 1991; 565: 441-446.
  17. Holmquist B, Bunning, Riordan JF. A continuous monitoring spectrophometric assay for angiotensin converting enzyme. Anal Biochem 1979; 95: 540.
  18. Zhou N, Yu P, Chen J, Huang H, Jiang S. Detection of insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in preeclampsia. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 1996; 16: 29-31.
  19. Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Pipkin FB, Kalsheker N. Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and preeclamptic pregnancies. J Hypertens 1999; 17: 765-8.
  20. Tamura T, Johanning GL, Goldenberg GL, Johnston KE, DuBard MB. Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on pregnancy outcome, enzyme activity, and zinc concentration. Obstet Gynecol 1996; 88:497-502.
  21. Li J, Hu HY, Zhao YN. Serum angiotensin-converting enzyme activity in pregnancy-induced hypertension. Gynecol Obstet Invest 1992; 33: 138-141.
  22. Lee MI, Bottoms SF, Sokol RJ, Todd HM. Angiotensin converting enzyme activity in hypertensive pregnancy. J Perinat Med 1987; 15: 258-262.
  23. Goldkrand JW, Fuentes AM. The relation of angiotensin-converting enzyme to the pregnancy-induced hypertension-preeclampsia syndrome. Am J Obstet Gynecol 1986; 792-800.
  24. Parente JV, Franco JG Jr, Grene LJ, Meirelles RS, Martinez AR. Angiotensin converting enzyme: serum levels during normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1979; 135: 586- 589.
  25. Weir MR, Dzau VJ: The renin-angiotensin-aldosterone system: A specific target for hypertension management. American J Hypertension 1999; 12: 205S-213S.
  26. Urata H. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. J Biol Chem 1990; 265: 22348-22357.
  27. Guo C, Ju H, Leung D, Massaeli H, Shi M, Rabinovitch M. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. J Clin Invest 2001; 107: 703-715.
  28. Mayerhofer K, Hefler L, Zeisler H, Tempfer C, Bodner K, Stockler-Ipsiroglu S, Muhl A, Kaider A, Schatten C, Leodolter S, Husslein P, Kainz C. Serum homocysteine levels in women with preeclampsia. Wien Klin Wochenschr 2000; 112: 271 - 275.
  29. Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocysteine levels with preeclampsia. Obstet Gynecol 1997; 90: 168-71.
  30. Sorensen TK, Malinow MR, Williams MA, King IB, Luthy DA. Elevated second-trimester serum homocysteine levels and subsequent risk of preeclampsia. Gynecol Obstet Invest 1999; 48: 98-103.
  31. Rajmakers TMA, Zusterzeel PLM, Steegers APE, Peters HMW. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for preeclampsia? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 95: 226-228.
  32. Hogg BB, Tamura T, Johnston KE, Dubard MB, Goldeberg RL. Second-trimester plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: 805-809.
  33. Brattstrom L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? Am J Clin Nutr 2000; 72: 315-323.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Figen Gürdöl  
İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çapa-34390, İstanbul  
Tel: 0212 631 13 23-118  
Fax: 0212 631 13 23-115  
e-posta: figur@istanbul.edu.tr

---