

Značaj genotipizacije polimorfizma angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao molekularnog biljega trudnoćom potaknute hipertenzije

Stipoljev, Feodora

Doctoral thesis / Disertacija

2006

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:027344>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Stipoljev, Feodora (2006) *Značaj genotipizacije polimorfizma angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao molekularnog biljega trudnoćom potaknute hipertenzije [The significance of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism as a molecular marker of pregnancy-induced hypertension]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/223>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Feodora Stipoljev

**Značaj genotipizacije polimorfizma
angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao
molekularnog biljega trudnoćom
potaknute hipertenzije**

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

Disertacija je izrađena u Klinici za ginekologiju i porodništvo Opće bolnice “Sveti Duh” u suradnji s Laboratorijem za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Ana Stavljenić-Rukavina

Zahvaljujem mojoj mentorici, Prof. dr. sc. Ani Stavljenić-Rukavina na nesebičnoj pomoći koju mi je pružila tijekom izrade disertacije.

Svim članovima Laboratorija za molekularnu dijagnostiku, posebice Prof. dr. sc. Jadranki Sertić i mojim kolegama s Klinike za ginekologiju i porodništvo posebno sam zahvalna za iznimnu stručnu potporu.

Mojoj obitelji, jer su cijelo vrijeme bili uz mene.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	5
1. UVOD	7
1.1 Angiotenzin I-konvertirajući enzim	10
<i>1.11. Somatski oblik angiotenzin I-konvertirajućeg enzima</i>	<i>12</i>
<i>1.12. Germinativni oblik angiotenzin II-konvertirajućeg enzima</i>	<i>15</i>
1.2. Alu slijedovi	16
1.3. Insercijsko-delecijski polimorfizam	21
<i>1.31. Povezanost insercijsko/delecijskog polimorfizma i preeklampsije</i>	<i>23</i>
1.4. Monogeni oblici hipertenzije	27
1.5. Posteljica i reninsko-angiotenzinski sustav	30
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3. ODABIR ISPITANICA I METODE ISTRAŽIVANJA	36
3.1. Odabir ispitanica	36
3.2. Metode istraživanja	37
<i>3.21. DNA analiza angiotenzin I-konvertirajućeg enzima</i>	<i>37</i>
3.211. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	37
3.212. Analiza PCR-produkata	39
<i>3.22. Statistička raščlamba</i>	<i>42</i>
4. REZULTATI	43
4.1. Raspodjela D i I alela	48
4.2. Pojavnost insercijsko-delecijskih genotipova	49
4.3. Raspodjela genotipova prema porodnoj gestacijskoj dobi	52
4.4. Rizik ponavljanja preeklampsije	55

4.5. Zastupljenost insercijsko-delecijskih genotipova kod intrauterinog zastoja rasta ploda	57
5. RASPRAVA	61
6. ZAKLJUČCI	69
7. SAŽETAK	71
8. SUMMARY	73
9. POPIS LITERATURE	75
10. ŽIVOTOPIS	89

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE	angiotensin I-converting enzyme	angiotenzin I-konvertirajući enzim
BRCA2	breast cancer 2 gene	gen za karcinom dojke 2
BTK	Bruton agamaglobulinemia tyrosine kinase	tirozinska kinaza za Brutonovu agamaglobulinemiju
C1	activated first component of complement	aktivirana prva komponenta komplementa
CYP11B1	cytochrome P450, subfamily XIB, polypeptide 1	polipeptid 1 citokroma P450 podobitelji XIB
CYP11B2	cytochrome P450, subfamily XIB, polypeptide 2	polipeptid 2 citokroma P450 podobitelji XIB
DNA	Deoxyribonucleic acid	deoksiribonukleinska kiselina
DMD	Duchenne muscular dystrophy	Duchennova mišićna distrofija
EYA1	eyes absent Drosophila homolog of 1	gen 1 homolog Drosophila genu za nedostatak očiju
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	receptor 2 za fibroblastni čimbenik rasta
GALNS	galactosamine-6-sulfate sulfatase	galaktozamin-6-sulfat sulfataza
GK	glycerol kinase	glicerol kinaza
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	hipoksantin gvaninska fosforiboziltransferaza
IL2RG	interleukin 2 receptor gama	gama receptor za interleukin 2
NF1	neurofibromin gene	neurofibrominski gen

RNA	ribonucleic acid	ribonukleinska kiselina
SINE	short interspersed nuclear element	kratki DNA ponavljajući slijed
SNP	single nucleotide polymorphism	polimorfizmi koji se razlikuju u jednom nukleotidu
WNK1	protein kinase, lysine-deficient 1	proteinska kinaza 1, lizinski nedostatna
WNK4	protein kinase, lysine-deficient 4	proteinska kinaza 4, lizinski nedostatna
XSCID	X-linked severe combined immunodeficiency	X-vezani teški oblik kombinirane imunodeficijencije

1. UVOD

Krvni tlak je multifaktorijsko svojstvo koje se regulira mnogim genskim mehanizmima i okolišnim čimbenicima. Malo se zna o genima koji su uključeni u mehanizme regulacije krvnog tlaka, a time i razvoja humane hipertenzije. Istraživanja na obiteljskom modelu i modelu blizanaca, koja su ispitivala svezu između vrijednosti krvnog tlaka među srodnicima, pokazala su da se oko 30% promjena vrijednosti krvnog tlaka pripisuje genetičkim, dok oko 50% otpada na okolišne čimbenike¹. Otkriće pozitivne sveze između određenog genskog lokusa i visokog krvnog tlaka može usmjeriti istraživanja ka određivanju funkcionalnih genskih varijanti, koje definiraju fenotipske osobitosti nositelja specifičnih promjena².

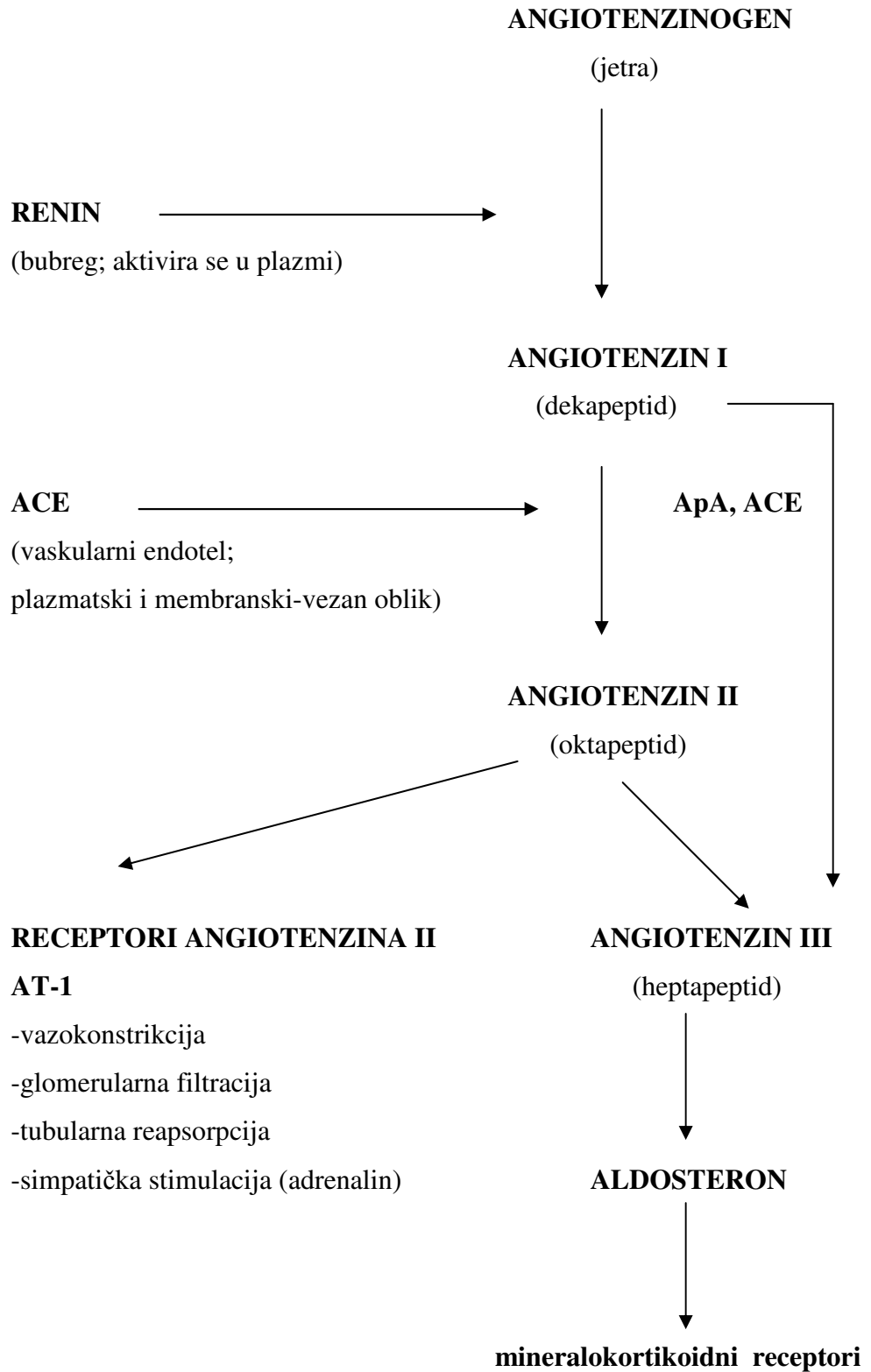
Hipertenzija u trudnoći javlja se u oko 5-7% žena i uzrokuje povišen maternalni i perinatalni pobol i pomor³. Ovaj pojam obuhvaća tri oblika bolesti: povećanje arterijskog krvnog tlaka bez proteinurije u trudnoći, preeklampsiju i eklampsiju. Minimalni kriteriji za preeklampsiju su povećanje krvnog tlaka iznad 140/90 mmHg nakon 20 tjedana trudnoće, kod dva uzastopna mjerenja u razmaku od 6 sati, uz istodobnu proteinuriju >300mg tijekom 24 sata. Patogeneza preeklampsije još je uvijek nedovoljno poznata. Općenito su prihvaćeni stavovi da je preeklampsija povezana s abnormalnom implantacijom i razvojem posteljice tijekom prvog tromjesečja trudnoće, dok se klinički znaci ove bolesti javljaju u kasnom drugom ili trećem tromjesečju trudnoće⁴. Uzimajući u obzir složenost preeklampsije na hemodinamskoj, biokemijskoj i imunološkoj razini, malo je vjerojatno da se radi o djelovanju jednog gena. Pretpostavlja se da se radi o skupini polimorfizama koji udruženi s okolišnim čimbenicima pridonose razvoju ovog

stanja. Predispozicijski geni mogu povećati rizik razvoja hipertenzije pod djelovanjem određenih vanjskih čimbenika.

Geni reninsko-angiotenzinskog sustava su dobar primjer kandidatnih gena, jer je poznata njihova uloga u kontroli krvnog tlaka i patogenezi nekoliko oblika eksperimentalne i humane hipertenzije². Sustav sadrži četiri glavna proteina: renin, angiotenzinogen, angiotenzin I-konvertirajući enzim i receptor tipa 1 za angiotenzin II (slika 1). Sniženje krvnog tlaka potiče lučenje renina, prvog enzima kaskadnog slijeda uzrokujući oslobađanje aldosterona, vazokonstrikciju i povišenje krvnog tlaka. Renin kida angiotenzinogen i nastaje angiotenzin I. Angiotenzin I-konvertirajući enzim hidrolizira razgradnju dekapeptida angiotenzina I u oktapeptid angiotenzin II. Angiotenzin II ciljno djeluje putem svojih receptora. Angiotenzin II može kidati aminopeptidaza A (angiotenzinaza) u angiotenzin III, peptid koji izrazito potiče koru nadbubrežne žlijezde na lučenje aldosterona. Genske varijante svake komponente ovog sustava mogle bi imati učinak na nastajanje različitih kliničkih fenotipova hipertenzije.

Istraživanja mehanizama nastanka preeklampsije mogu se provesti tek tijekom kasnog drugog ili trećeg tromjesečja trudnoće, kada majka pokaže kliničke simptome ove bolesti. Smatra se da predispoziciju razvijanja kliničke slike preeklampsije određuju većinom majčinski geni, čiju ekspresiju moduliraju, djelujući sinergistički, geni trofoblasta i prisutni okolišni čimbenici. Nalaženje predispozicijskih gena u ovom slučaju predstavlja težak problem, međutim otkrivanje genetskog profila visokog rizika za preeklampsiju omogućilo bi preventivni probir populacije trudnica i provođenje terapijskih postupaka u svrhu liječenja ove bolesti u veoma ranoj fazi⁵.

Slika 1. **RENINSKO-ANGIOTENZINSKI SUSTAV**

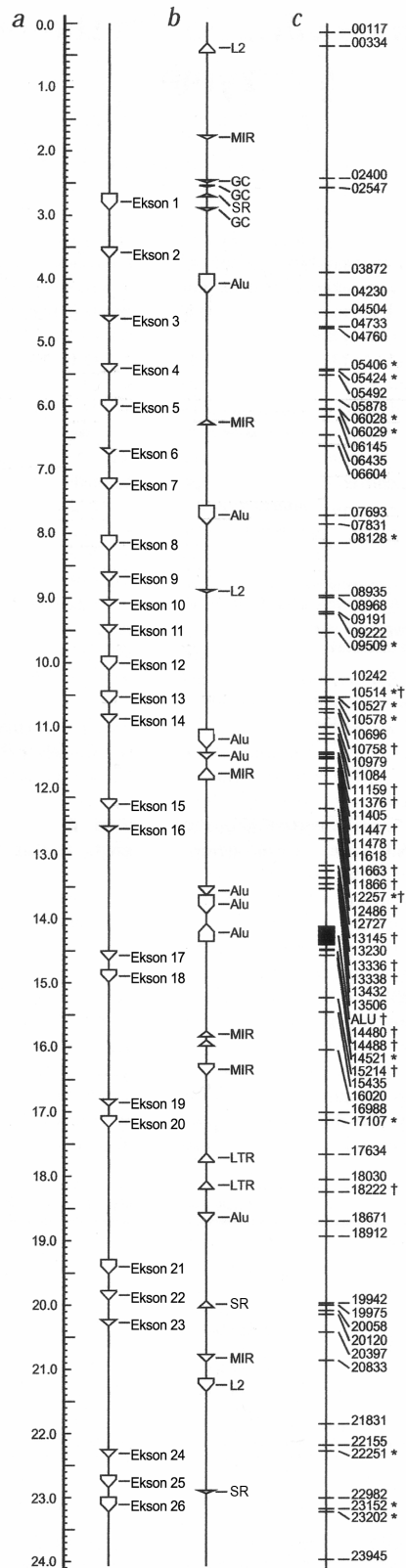


ACE, angiotenzin I-konvertirajući enzim; ApA, aminopeptidaza A; AT-1, receptor tipa 1 angiotenzina II

1.1 ANGIOTENZIN I-KONVERTIRAJUĆI ENZIM

Angiotenzin I-konvertirajući enzim (ACE) odnosno dipeptidil karboksipeptidaza I (EC 3.4.15.1) je cinkova metaloproteaza koja hidrolizira angiotenzin I u angiotenzin II, snažan vazokonstriktorski hormon i stimulator lučenja aldosterona. ACE može inaktivirati djelovanje vazodilacijskog peptida bradikininina. Angiotenzin II i bradikinin djeluju na moduliranje tonusa žila, proliferaciju glatkih mišićnih stanica i porast sinteze izvanstaničnog kolagenskog matriksa. ACE je ključni enzim reninsko-angiotenzinskog (RA) i kalikreinskog sustava⁶. Ima veoma važnu ulogu kod reguliranja krvnog tlaka, elektrolitske ravnoteže i proliferacije matičnih stanica. ACE može kidati i mnoge druge supstrate, pokazujući endopeptidaznu ili aminopeptidaznu aktivnost. Enzimska aktivnost ovog enzima ovisi o prisutnosti kloridnih iona, što ga čini jedinstvenim u obitelji metaloproteinaza.

ACE gen se nalazi unutar kromosomske regije 17q23, dužine je 21 kb i sadrži 26 egzona koji variraju u veličini od 88 pb do 481 pb (slika 2). Kodirajuća DNA sastoji se od 4020 pb. Zreli transkript sadrži samo 25 egzona, jer se egzon 13 procesiranjem (*engl. splicing*) izdvaja iz primarnog transkripta. Struktura gena pokazuje visoki stupanj podudarnosti između dviju velikih domena, ukazujući na mehanizam postanka udvostručenjem ancestornog gena. ACE gen nalazi se u samo jednoj kopiji u humanom haploidnom genomu⁷. Prisutna su dva ACE promotorska mjesta: somatski promotor koji se nalazi na 5' kraju prvog egzona i germinalni intrageniski promotor smješten na 5' kraju specifične testikularne glasničke ACE RNA (slika 3). Dva alternativna promotora pokazuju visoku staničnu specifičnost. Somatski promotor aktivan je u endotelnim, epitelnim i živčanim stanicama, dok je germinalni promotor aktivan samo u određenom stadiju razvoja muških spolnih stanica⁸.



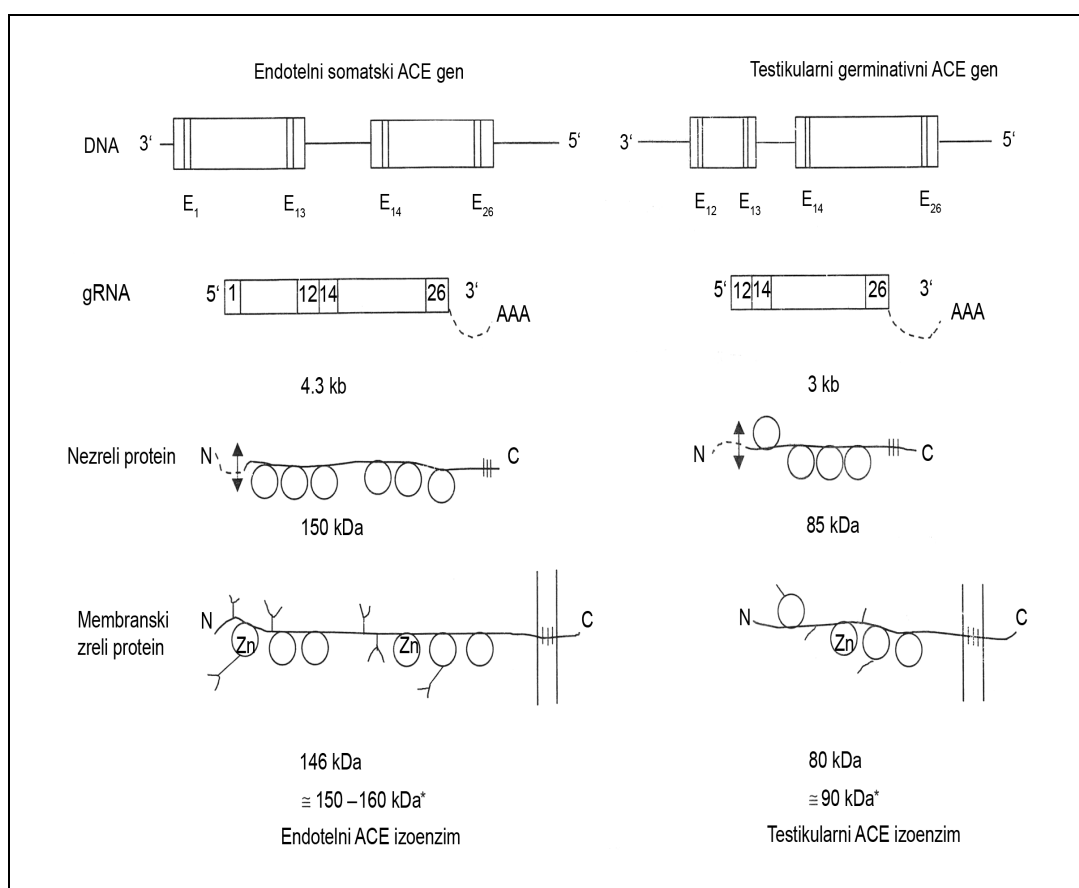
Slika 2. ACE gen; a) *genomska struktura*; b) *ponavljajući slijedovi*; c) *nukleotidne varijante*⁹.

1.11. SOMATSKI OBLIK ANGIOTENZIN I KONVERTIRAJUĆEG ENZIMA

Endotelni tip ACE molekule sadrži dvije homologne domene od kojih svaka ima aktivno mjesto za vezivanje jednog atoma cinka. Endotelni oblik angiotenzin I-konvertirajućeg enzima nalazi se u obliku membranski-vezanog ektoenzima i kao slobodni plazmatski enzim. Primarno se nalazi kao stanični integralni transmembranski glikoprotein s amino-krajem i katalitičkim mjestom na izvanstaničnoj strani, posebice na luminalnoj površini svih vaskularnih endotelnih stanica, koje luče i slobodni oblik ove molekule. Posebno bogate enzimom su mikrovaskularne i kapilarne stanice pluća i mozga. ACE se također nalazi u sjemenim i epididimalnim kanalićima, i luči se u spermu. Plazmatski enzim imunološki je istovjetan membranski-vezanom enzimu, ali za razliku od endotelnog oblika nema hidrofobno sidro na svom karboksi-terminalnom kraju. Prve postavke o nastanku topivog oblika uključivale su mehanizme post-translacijske modifikacije ovog enzima proteolitičkim cijepanjem membranski vezanom hidroksilazom^{8,9}. Međutim, Sugimura i suradnici¹⁰ izolirali su dvije vrste endotelne glasničke RNA različite veličine: jedna veličine 4.3 kb koja odgovara somatskoj ACE i druga 800 nukleotida kraća. Postupak sekvenciranja pokazao je da je kraća glasnička RNA istovjetna endotelnoj do pozicije 3432 iza koje slijedi 3' netranslatirajući slijed testikularne glasničke ACE RNA od nukleotidne pozicije 2386 do 3' kraja. Alternativnim procesiranjem endotelne glasničke RNA izrezuje se 3' slijed koji kodira karboksi-terminalnu hidrofobnu transmembransku domenu. Alternativno mjesto kidanja predloženo ovim istraživanjem zadovoljava osnovna pravila pre-glasničkog RNA procesiranja, jer sadrži GT dinukleotide na donorskom mjestu i pirimidinom bogate regije iza kojih slijede AG ponavljajući slijedovi na akceptorskom intronskom mjestu. Ova molekula sadrži dva katalitička

mjesta i prema tome je funkcionalna. Proteolitičkim post-translacijskim procesiranjem može se osloboditi topivi oblik djelovanjem metaloproteinaze iz ADAM obitelji (*engl. A Disintegrin And Metalloprotease*) usidrenoj u membrani endotelnih stanica. Treba istaknuti da su mehanizmi kontrole ekspresije još nedovoljno poznati, te veoma vjerojatno može biti prisutno više razina regulacije sinteze topivog oblika ACE molekule.

Slika 3. Shematska struktura angiotenzin I-konvertirajućeg enzima; tijekom transkripcije dolazi do alternativnog procesiranja i stvaranja dvije vrste glasničke RNA, jedna specifična za somatski, a druga za testikularni oblik ovog enzima; transkripcijom glasničke RNA stvaraju se nezreli oblici enzima; tijekom translacijskog koraka skraćuju se peptidni lanci i cijepa se signalni peptid; na kraju procesa sazrijevanja atom cinka vezuje se za aktivno mjesto, te dolazi do sidrenja zrelog izoenzima u plazmatskoj membrani i tkivno-specifične glikozilacije¹¹.



E-egzon; AAA- poliadenilni rep; gRNA- glasnička RNA;

1.12. GERMINATIVNI OBLIK ANGIOTENZIN I-KONVERTIRAJUĆEG ENZIMA

Testis sadrži dvije izoforme angiotenzin I-konvertirajućeg enzima. Testikularni izoenzim nastaje samo tijekom spermatogeneze, a nalazi se u postmejotičkim spermatogenim stanicama i spermatozoidima. Njegova razina raste tijekom procesa daljnje diferencijacije, oslobađa se tijekom kapacitacije, i ima važan učinak na pokretljivost spermija. Somatski oblik se eksprimira u Leydigovim stanicama, endotelnim stanicama testikularnog intestinuma, duž luminalne površine epitelnih stanica ductusa deferensa, epididimisa i vas deferensa¹². Ehlers i suradnici¹³ sekvencirali su testikularni izoenzim i utvrdili istovjetnost amino kiselina od pozicije 37 do karboksi-terminalnog kraja drugoj polovici karboksi-terminalne domene endotelnog ACE slijeda. Amino-terminalni kraj ove izoforme sadrži testis-specifični egzon. Howard i suradnici¹⁴ otkrili su vlastitu promotersku regiju testikularnog oblika dužine 91 bp unutar introna 12. Testikularni transkript se prepisuje od egzona 13 do egzona 26. Zreli polipeptid ima molekularnu težinu 80 073 daltona, sadrži jedno od dva cink-vezujuća mjesta prisutna u endotelnoj ACE. Katalitička uloga ove dvije izoforme je slična. Od nukleotidne pozicije 222, testikularna DNA postaje istovjetna drugoj polovici endotelne ACE DNA, osim u promjeni timidina na poziciji 3409 endotelnog oblika s citidinom na nukleotidu 1687 testikularne ACE DNA. Testikularni izoenzim hormonski se regulira, što nije slučaj s endotelnim oblikom¹⁵.

1.2. ALU SLIJEDOVI

Transpozonski elementi nalaze se u kodirajućoj regiji 4% humanih gena, i oko trećina njih pripada *Alu* obitelji¹⁶. *Alu* ponavljajući slijedovi zauzimaju oko 5% haploidnog humanog genoma, dugi su od 150 do 300 pb, i najraširenija su vrsta kratkih DNA ponavljajućih slijedova prisutnih u oko 700.000 kopija (*engl. SINE-short interspersed nuclear element*). Naziv dolazi od imena enzima koji cijepa DNA unutar specifičnih slijedova smještenih unutar *Alu* elementa. Tipični *Alu* slijed ima 282 nukleotida i sadrži dvije homologne, ali različite podjedinice nastale od 7SL RNA gena internim delecijama i točkastim mutacijama¹⁷. Većina *Alu* slijedova ima unutarnje promoterske elemente za RNA polimerazu III¹⁸. Podjedinice sadrže veliki broj GC elemenata i povezane su regijom bogatom adeninom. Slijed završava poliadenilnim repom. Kada se jednom ugrade u specifičnu kromosomsku regiju postaju stabilni genski biljezi veoma korisni u populacijskim istraživanjima.

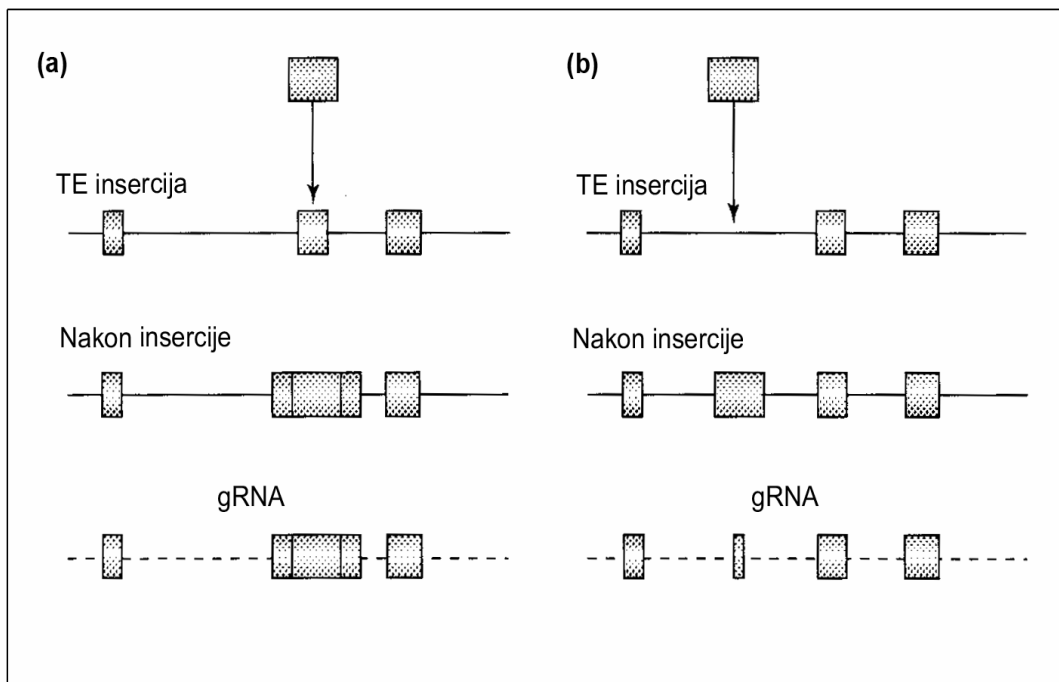
Alu slijedovi se nalaze u intronima mnogih strukturnih gena. Njihova prava biološka uloga nije još uvijek poznata. Dosadašnja istraživanja pokazuju da inicijacijska mjesta DNA replikacije sadrže evolucijski veoma očuvane slijedove koji su prisutni i u *Alu* obitelji. Stoga, *Alu* elementi mogu predstavljati evolucijski očuvane kandidatne regije za inicijaciju DNA replikacije i regulaciju genske aktivnosti. Tome u prilog ide činjenica da se transkripcija oko polovine *Alu* elemenata odvija pomoću RNA polimeraze III. Kratki RNA transkripti mogli bi djelovati kao RNA početnice (*engl. primer*) u procesu početka DNA replikacije. *Alu* elementi sadrže slijedove duge 14 pb, koji su također prisutni u mjestima inicijacije replikacije velikog broja DNA virusa. Neki od *Alu* elemenata se prepisuju kao male RNA molekule koje mogu djelovati kao početnice sinteze DNA. Novija istraživanja pokazuju da se plazmidi koji sadrže prepisane *Alu*

slijedove repliciraju u kultiviranim stanicama majmuna, dok se isti plazmidi kada im se isjeku *Alu* elementi ne repliciraju¹⁹.

Slika 4. Dva moguća mehanizma umetanja transpozonskih elemenata (TE) u kodirajuću regiju:

a) *direktno umetanje* gdje dolazi do rušenja strukture egzona i delecijskog učinka transpozonskog elementa koji sadrži višestruke stop kodone;

b) *umetanje u intronsku regiju* gdje dolazi do formiranja novog egzona iz dijela transpozonskog elementa. Novi egzon se alternativno procesira, i dolazi do nastajanja više vrsta glasničke RNA, čime se čuva funkcionalnost gena²⁰.



Mutageneza posredovana *Alu* slijedovima pridonosi otprilike u oko 0.4% slučajeva nastajanju novih humanih genetskih bolesti. Dokazana je kod karcinoma dojke²¹, akutne mijeloidne leukemije²², neurofibromatoze²³, hipertenzije^{24,25} i Ehlers-Danlosovog sindroma tipa VI²⁶. Umetanje *Alu* sljeda u zrelu glasničku RNA može uzrokovati genetsku bolest, ali isto tako može pridonijeti i proteinskoj različitosti (slika 4)²⁷. Primjerice, alternativnim procesiranjem gena koji kodira bilijarni glikoprotein, nastaju tri oblika glasničke RNA koji sadrže *Alu* fragmente egzona ili jednog od dva skoro istovjetna intronska *Alu* elementa²⁸. Ugrađivanje *Alu* elementa u zrelu glasničku RNA moguće je, jer oba *Alu* lanca sadrže konsezusna mjesta kidanja. Nekoliko genskih bolesti uzrokuju mutacije koje vode nastajanju jakog mjesta kidanja u intronskom *Alu* elementu. U genu za ornitin δ -aminotransferazu (OAT), mutacija aktivira kriptičko donorsko mjesto unutar desne podjedinice intronskog elementa. G→C mutacija u *Alu* slijedu unutar introna 3 vodi konstitutivnoj inserciji novog *Alu* egzona između trećeg i četvrtog egzona. Insercija uzrokuje pomak okvira čitanja s preranim nastankom stop kodona uzrokujući OAT deficijenciju²⁹.

U pravilu, *Alu* egzoni koji se konstitutivno umeću u transkript imaju negativan učinak na funkciju proteina, dok egzoni nastali alternativnim procesiranjem proizvode slabo akceptorsko mjesto, te se toleriraju, pogotovo ako je retencijski omjer nizak (broj glasničkih RNA koje sadrže alternativno procesiran egzon/ ukupan broj glasničkih RNA)³⁰. Osim što mogu postati dio strukturnog gena integrirajući se u egzon, *Alu* slijedovi mogu sudjelovati u različitim regulacijskim mehanizmima. Mogu modulirati replikaciju DNA kao pozitivni ili negativni pojačivači, regulatori pojačivača, modulatori alternativnog procesiranja ili imati ulogu u genomskom imprintingu³¹.

Alu slijedovi sadrže izrazito metilirane CpC otoke koji su mjesta visokog rizika nastajanja točkastih mutacija procesom deaminacije 5' metil-deoksicitidina. Bogati su CpG dinukleotidima koji predstavljaju 30% svih metilacijskih mjesta u humanom genomu. GpC dinukleotidi su uključeni u gensku regulaciju, kao i regulaciju imprinting gena, i sadrže funkcionalne promoterske elemente za nekoliko steroidnih hormonskih receptora³².

Alu slijedovi se nalaze u blizini nekoliko različitih gena koji su uključeni u patogenezu humanih bolesti³³. Učestalost umnožavanja *Alu* elemenata u humanom genomu događa se jednom na 200 poroda, međutim ona može biti puno veća nego što postojeći podaci govore, zbog njihovog delecijuskog učinka tijekom rane embriogeneze³². To ipak predstavlja značajno visoku vrijednost ukazujući na *Alu* slijedove kao važan čimbenik rizika humane mutageneze (tablica 1). *Alu* elementi mogu posredovati mehanizmima nejednake homologne rekombinacije koji rezultiraju delecijom ili duplikacijom određenih slijedova, čime mogu nastati nove proteinske varijante. Ugrađivanje novog *Alu* elementa može dovesti do promjene regulacije genskog transkripta uvođenjem novog transkripcijskog čimbenika za vezujuće mjesto. S obzirom na njihovu zastupljenost, *Alu* slijedovi smatraju se potencijalnim mjestima rekombinacije i prema tome prijetnja genomske stabilnosti³⁴.

Tablica 1. Alu ponavljajući slijedovi i humane bolesti.

Lokus	Raspodjela	Poremećaj	Mehanizam
NF1 ²³	de novo	neurofibromatoza	AI
IL2RG ³⁵	obiteljski	XSCID	AI
ACE ³⁶	oko 50%	predispozicija za srčane bolesti	AI
BRCA2 ²¹	de novo	karcinom dojke	AI
Btk ²³	obiteljski	X-vezana agamaglobulinemija	AI
Faktor IX ³⁷	obiteljska	hemofilija	AI
EYA1 ³⁸	de novo	branhio-oto-renalni sindrom	AI
C1 inhibitor ³⁹	de novo	angioedem	AI
GK ⁴⁰	de novo	glicerol-kinazna deficijencija	AI
2XFGFR2 ⁴¹	de novo	Apertov sindrom	AI
Antitrombin ⁴²	jedan pacijent	trombofilija	AR
DMD ⁴³	srodnici	Duchennova mišićna distrofija	AR
HPRT ⁴⁴	jedan pacijent	Lesch-Nyhanov sindrom	AR
GALNS ⁴⁵	jedan pacijent	mukopolisaharidoza tip IVA	AR
Apo B ⁴⁶	jedan pacijent	hipo-betalipoproteinemija	AR

AI= Alu insercija; AR=Alu/Alu rekombinacija

1.3. INSERCIJSKO-DELECIJSKI POLIMORFIZAM

Rigat i suradnici⁴⁷ prvi su identificirali polimorfni DNA biljeg, insercijsko/delecijski (I/D) polimorfizam, koji se nalazi unutar introna 16 ACE gena. Prisutnost (I) ili odsutnost (D) 287-pb *alu* ponavljajućeg slijeda unutar introna 16 određuje tri različita genotipa: nositelje DD, II i ID alela. Srednja vrijednost aktivnosti plazmatskog ACE u osoba s DD genotipom je oko dva puta viša od osoba s II genotipom, dok ID nositelji imaju srednju vrijednost između DD i II homozigota. Oko 50% ukupne individualne razlike aktivnosti cirkulirajućeg ACE u općoj populaciji objašnjava se genskim učinkom ACE I/D polimorfizma³⁶. Razina angiotenzin I konvertirajućeg enzima u T limfocitima također je značajno viša u osoba homozigota za D alel⁴⁸.

Inhibicija ACE aktivnosti u trudnoći ima veliku važnost u održavanju fiziološke ravnoteže između krvnog tlaka i povećanog protoka krvi prema posteljici i materištu. Serumska aktivnost angiotenzin I-konvertirajućeg enzima smanjuje se u normotenzivnih trudnica, u odnosu na vrijednosti prije trudnoće. Dolazi do dodatnog pada ACE aktivnosti dva dana po porodu. Neposredno nakon toga, razina serumskog ACE ponovo počima rasti dostižući vrijednosti prije trudnoće šest tjedana nakon poroda⁴⁹.

Razina aktivnosti slobodnog ACE značajno je povišena kod hipertenzivnih trudnica (*engl. pregnancy induced hypertension, PIH*) u odnosu na trudnice s normalnim vrijednostima krvnog tlaka. Vrijednost aktivnosti ACE kod trudnica s kroničnom hipertenzijom koje nisu nakalemile preeklampsiju kreće se u veoma sličnom rasponu kao i kod normotenzivnih trudnica. Razlike u aktivnosti ACE neovisne su o dobi trudnice i gestacijskoj dobi⁵⁰. Značajno povišenu serumsku vrijednost ACE utvrdili su Goldkrand i suradnici⁵¹ u trudnica koje su razvile hipertenziju i trudnica s kroničnom hipertenzijom koje su nakalemile

preeklampsiju u odnosu na trudnice s normalnim vrijednostima krvnog tlaka. Cugini i suradnici⁵² utvrdili su cirkadijalni ritam promjene aktivnosti serumskog ACE u normalnih trudnica i žena prije trudnoće. Hipertenzivne trudnice nisu pokazale cirkadijalne promjene, već su imale stalno povišene vrijednosti serumskog ACE u odnosu na trudnice s normalnim vrijednostima krvnog tlaka. Istraživanje Li i suradnika⁵³ veoma osjetljivom kolorimetrijskom mikrometodom potvrdilo je značajno povišenu aktivnost serumskog ACE u skupini hipertenzivnih trudnica. Srednja vrijednost arterijskog tlaka pozitivno je korelirala s razinom serumskog ACE kod svih trudnica neovisno o gestacijskoj dobi.

Insercijsko-delecijski polimorfizam, koji predstavlja nepromjenjivu gensku osobitost pojedinca, mogao bi direktno ili što je vjerojatnije posredno putem još uvijek nepoznatog molekularnog mehanizma modificirati stabilnost ili efikasnost izrezivanja prekursora glasničke ACE RNA. Vjerojatno se genska kontrola razine serumskog ACE odvija na transkripcijskoj razini, iako polimorfizam ne djeluje direktno regulirajući transkript, već ukazuje na neravnotežu među regulacijskim mehanizmima ekspresije ACE gena. Do sada nije dokazano diferencijalno izrezivanje koje bi moglo ugraditi ovaj slijed u primarni transcript, i u tom slučaju modificirati aktivnost ovog enzima. Postavlja se pitanje da li *Alu* insercijski slijed može na neki način kontrolirati izrezivanje primarnog transkripta koji vodi nastajanju zrele glasničke RNA. Nadalje, polimorfizam može biti “vezni” biljeg (*engl. linkage*), koji može imati kritičan učinak na konformaciju aktivnog mjesta enzima, prepoznavanje supstrata, katalizu, ali i na još neprepoznate DNA elemente koji kontroliraju proces transkripcije. Druga mogućnost uključuje postojanje “pojačivača” (*engl. enhancer*) u insercijskom slijedu koji regulira transkripcijsku aktivnost. Kako se insercijski slijed nalazi u intronu 16 koji zauzima ~1.9 kb DNA, takav pojačivač mogao bi pogoditi ili proksimalni promoter smješten 2.2-4.1 kb,

uzvodno ili drugi smješten 9.9-11.8 kb na 5' kraju. Ovu hipotezu podržava otkriće manjeg oblika ACE prisutnog samo u testisima koji nastaje uključivanjem promotora u intronu 12¹².

Dosadašnja istraživanja pokazala su značajno višu zastupljenost delecijских homozigota u skupinama ispitanika s infarktom miokarda³⁶, lijevom ventrikularnom hipertrofijom⁵⁴, stanjenom stijenkou karotide⁵⁵, esencijalnom hipertenzijom⁵⁶, dijabetском нефропатијом i dijabetesom melitusom⁵⁷, i cerebrovaskularnim bolestima⁵⁸.

1.31. POVEZANOST INSERCIJSKO/DELECIJSKOG POLIMORFIZMA I PREEKLAMPSIJE

Nekoliko autora istraživalo je značaj insercijsko/delecijского polimorfizma u probiru trudnica s rizikom razvoja hipertenzije u trudnoći (slika 5). Tamura i suradnici⁵⁹ prvi su htjeli odrediti zastupljenost ACE I/D genotipova u općoj populaciji trudnica afričko-američkog podrijetla i njihov učinak na ishod trudnoće, pojavnost hipertenzije i promjene vrijednosti krvnog tlaka tijekom trudnoće. Nisu dobili statistički značajnu razliku korelirajući ACE genotipove s prethodno navedenim parametrima. Međutim, treba naglasiti da je od ukupno 191 trudnice uključene u ovo istraživanje samo njih 12 razvilo hipertenziju što je veoma mali uzorak za donošenje zaključaka o svezi ovog polimorfizma i hipertenzije u trudnoći.

Istraživanje Zhu i suradnika⁶⁰ pokazalo je značajnu zastupljenost DD genotipa (65.7%) i D alela (0.76) u 35 kineskih trudnica s hipertenzijom u odnosu na 25 trudnica iz kontrolne skupine (8%, 0.28). Zhou i suradnici⁶¹ pokazali su značajno povećanu učestalost DD genotipa (65%) u skupini 60 kineskih trudnica s preeklampsijom u odnosu na 76 normotenzivnih trudnica (10.5%). Choi i

suradnici⁶² odredili su značajno višu pojavnost DD genotipa kod 90 korejskih pacijentica s preeklampsijom (0.36) u usporedbi s 98 zdravih trudnica (0.14). Wang i suradnici⁶³ potvrdili su značajno veću zastupljenost DD genotipa u 54 preeklamptične kineske trudnice. Iznijeli su postavku da bi genetska varijabilnost ACE gena mogla biti uključena u patogenezu ove bolesti, a sam gen može predstavljati jedan od čimbenika rizika razvoja hipertenzije u trudnoći u populaciji azijskog podrijetla.

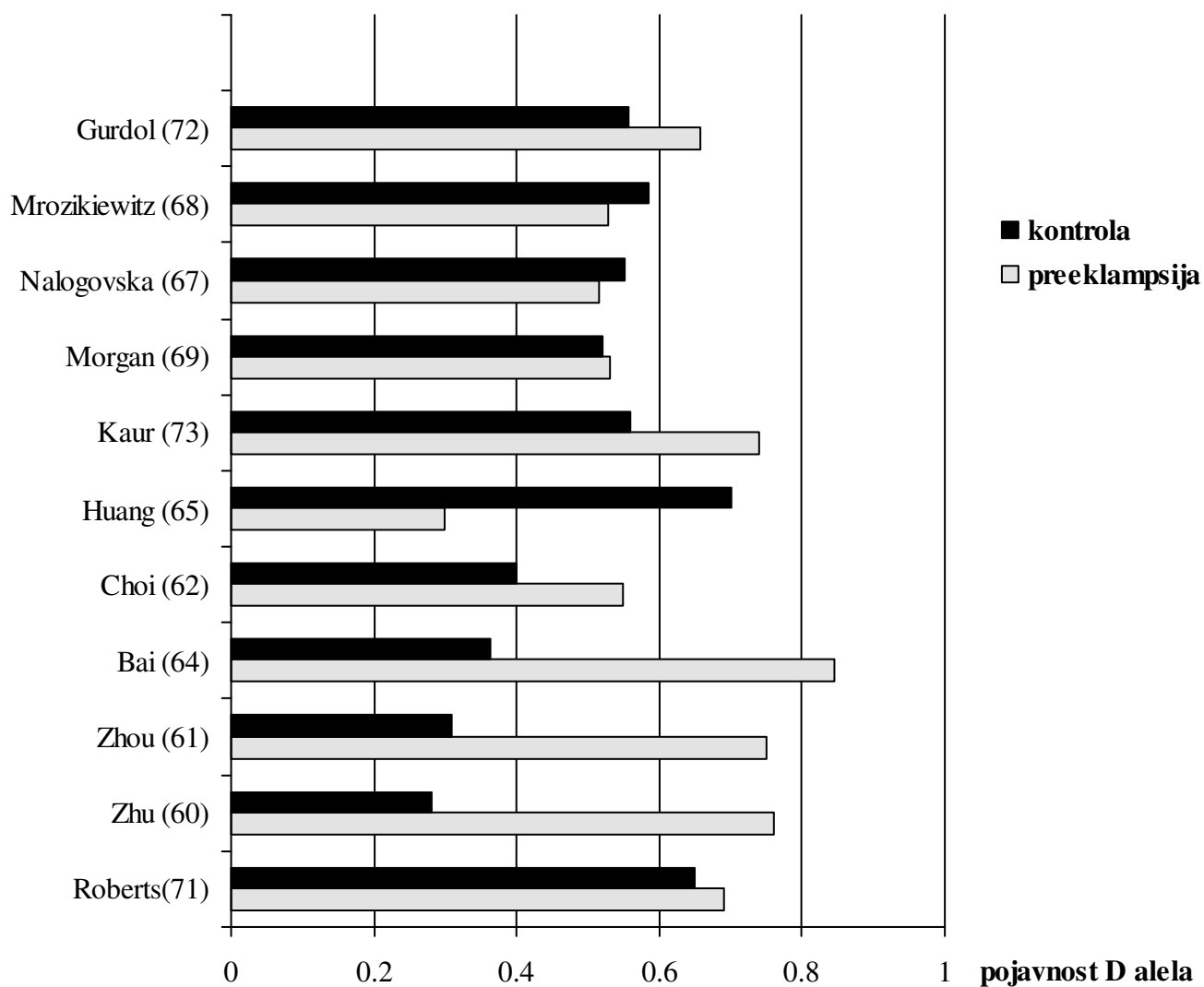
Za razliku od prethodno navedenih istraživanja, Bai i suradnici⁶⁴ nisu dokazali vezu između insercijsko-delecijskog polimorfizma i hipertenzije kod kineskih trudnica, dok je Huang⁶⁵ dobio značajno veću zastupljenost insercijskog alelotipa kod kineskih trudnica koje su razvile preeklampsiju u trudnoći. Kim i suradnici⁶⁶ također nisu dokazali vezu između insercijsko-delecijskog polimorfizma i preeklampsije kod 104 trudnice iz južne Koreje.

Nalogowska-Glosnicka i suradnici⁶⁷ htjeli su ispitati važnost insercijsko-delecijskog polimorfizma kao potencijalnog genetskog biljega za predispoziciju razvoja hipertenzije kod poljskih trudnica. Istraživanje su uključili 116 hipertenzivnih trudnica, uspoređujući ih sa 130 zdravih trudnica. Usporedba ispitivanih skupina prema raspodjeli genotipova i pojavnosti alela nije se pokazala statistički značajnom. Naprotiv, Seremak-Mrozikiewitz i suradnici⁶⁸ dobili su značajno veću zastupljenost I alela u skupini 87 hipertenzivnih poljskih trudnica, i iznijeli postavku o mogućem probirnom značaju insercijskog alela, naglasivši važnost daljnjeg istraživanja. Morgan i suradnici⁶⁹ su u svoje istraživanje uključili 72 preeklamptične trudnice i 83 zdrave trudnice iz Velike Britanije. Raspodjela I/D genotipova i pojavnost I i D alela nisu se statistički značajno razlikovali. Bouba i suradnici⁷⁰ nisu dokazali vezu insercijsko-delecijskog polimorfizma i preeklampsije kod 41 trudnice iz Grčke.

Istraživanje Roberta i suradnika⁷¹ uključilo je 204 trudnice iz Zulu plemena u južnoj Africi, koje su razvile preeklampsiju. Pojavnost D alela bila je neznatno viša, i nije se pokazala statistički značajnom. Gurdol i suradnici⁷² su dobili značajno veću učestalost D alela u skupini 98 preeklamptičnih turskih trudnica (maloazijska populacija), u usporedbi sa 50 zdravih trudnica. Istraživanje Kaura i suradnika⁷² pokazalo je suvišak D alela i DD genotipa (60%) kod 50 hipertenzivnih trudnica u odnosu na kontrolnu skupinu (30%) iz Indije.

Dosadašnja istraživanja pokazala su kontradiktorne rezultate^{61-63,68,70,71}. Stoga je naša namjera bila istražiti raspodjelu DD genotipa i D alela u preeklamptičnih trudnica naše populacije, i utvrditi značaj insercijsko-delecijskog polimorfizma u etiologiji preeklampsije. Rezultate treba svakako treba usporediti i sagledati s aspekta populacijskog (europskog, afro-američkog ili azijskog) podrijetla ispitanica.

Slika 5. Pojavnost D alela u skupinama preeklampsičnih trudnica različitog populacijskog podrijetla.



1.4. MONOGENSKI OBLICI HIPERTENZIJE

Molekularna osnova rijetkih monogenских oblika, u pravilu autosomno dominantnog tipa nasljeđivanja s jakom izraženom penetrantnošću gena, poznata je kod nekoliko tipova hipertenzije. Genetska varijacija krvnog tlaka u ovakvih pacijenata može biti ukupan zbroj međudjelovanja “hipertenzivnih gena” i “hipotenzivnih gena”, što potvrđuje i izrazita fenotipska varijabilnost unutar iste obitelji. Drugi geni, koji su također uključeni u regulaciju krvnog tlaka, naslijeđeni od nositelja mutacije ili zdravih osoba mogu dodatno modificirati obiteljski fenotip. Mehanizmi nastanka monogenских oblika hipertenzije mogu biti modeli koji će poslužiti razjašnjavanju određenih oblika hipertenzije veoma sličnog kliničkog fenotipa².

Obiteljski hiperaldosteronizam tipa I (glukokortikoidima suprimirani hiperaldosteronizam, *engl. glucocorticoid-remediable aldosteronism*) je autosomno dominantan oblik hipertenzije uzrokovan pojačanom sekrecijom aldosterona i urinarnim izlučivanjem 18-hidroksikortizola i 18-oksokortizola, što se može regulirati supresijom kortikotropina deksametazonom. Aldosteron sintetaza (cytochrome P450, subfamily XIB, polypeptide 2, CYP11B2) je enzim koji prevodi kortikosteron u aldosteron. Kod pacijenata s ovom bolešću prisutan je novi kimerni gen u kromosomskoj regiji 8q21 nastao nehomolognim sparivanjem i nejednakim križanjem (*engl. crossing over*) između egzona 4 aldosteron sintetaze i egzona 2 11 β -hidroksilaze, pri čemu kodirajuća regija aldosteron sintaze dolazi pod regulaciju promoterske regije hidroksilaze. Različite točke križanja između CYP11B1 (cytochrome P450, subfamily XIB, polypeptide 1) i CYP11B2 gena uzrokuju genetsku heterogenost ove bolesti⁷⁴. Kimerni gen uzrokuje povećanu proizvodnju aldosterona s hipertenzijom kao posljedicom poremećaja ravnoteže

vode i soli. Promotorska regija hidroksilaze je pod kortikotropinskom kontrolom i može se regulirati egzogenom primjenom glukokortikoida koji suprimiraju ACTH lučenje, a time i ekspresiju mutantnog gena. Aktivnost plazmatskog renina i angiotenzina II je smanjena, dok aldosteron ostaje pod kontrolom ACTH i nije suprimiran. Jednostavna primjena glukokortikoida suprimira ACTH lučenje a time i ekspresiju mutantnog gena.

Liddleov sindrom (pseudoaldosteronizam) se manifestira ranom pojavom teškog oblika hipertenzije s hipokaliemijom, niskom aktivnošću renina u plazmi i suprimiranim lučenjem aldosterona. Pacijenti imaju mutacije u genima koji kodiraju ili β ili γ podjedinice amilorid-senzitivnih epitelnih natrijevih kanalića uzrokujući konstitutivnu aktivaciju i značajno povećanje reapsorpcije natrija u distalnim epitelnim natrijevim kanalićima⁷⁵. Najčešće se radi o mutacijama pomicanja okvira čitanja s posljedičnim preranim stop kodonom. Geni uključeni u patogenezu ovog sindroma nalaze se u kromosomskoj regiji 16p13-p12.

Deficijencija kortizol 11- β -ketoreduktaze (sindrom očiglednog suviška mineralokortikoida) je autosomno recesivna bolest sa srednjim do teškim oblikom hipertenzije, veoma niskom razinom aldosterona, hipokaliemijom i niskom aktivnošću plazmatskog renina. Hipertenziju uzrokuje stimulacija mineralokortikoidnih receptora kortizolom koji je prisutan u mnogo većim količinama nego aldosteron. Izoformni Tip 2 enzima 11- β -hidroksisteroid dehidrogenaze metabolizira kortizol u kortizon koji ne može stimulirati receptore, rezultirajući selektivnom aktivacijom aldosteronom. Mutacije u genu za 11- β -hidroksisteroid dehidrogenazu tipa 2 koji se nalazi u kromosomskoj regiji 16q22 vodi gubitku enzimatske aktivnosti⁷⁶.

Pseudohipoaldosteronizam tipa II (Gordonov sindrom, PHA) je autosomno dominantni oblik hipertenzije s izraženom hiperkalijemijom usprkos normalnoj glomerularnoj filtraciji, koji je osjetljiv na terapiju tiazidnim diureticima. Blago izražena hiperkloremija, metabolička acidoza i suprimirana plazmatska aktivnost renina mogu varirati. Smatra se da je specifični defekt mehanizma bubrežnog izlučivanja natrija. PHA tipa IIB može biti uzrokovan mutacijama u WNK4 (protein kinase, lysine-deficient 4) genu smještenom unutar kromosomske regije 17q21 (Wilson, 2001). Kod PHA tipa IIC opisana je 41-kb delecija unutar introna 1 WNK1 (protein kinase, lysine-deficient 1) gena koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 12p⁷⁷. Obje delecijske točke loma dogodile su se unutar *Alu* slijeda. Dodatni lokus za PHA tipa IIA nalazi se unutar 1q31-q42 kromosomske regije⁷⁸.

1.5. POSTELJICA I RENINSKO-ANGIOTENZINSKI SUSTAV

Tijekom trudnoće, uterine spiralne arterije se remodeliraju u dilatirane maternično-posteljice krvne žile nepoznatim fiziološkim mehanizmima i čimbenicima koji im posreduju. U trudnica koje su razvile preeklampsiju, trofoblastna invazija u stijenke spiralnih materničnih arterija i njihovo remodeliranje je nepotpuno ili izostaje, čime se smanjuje protok maternične i intravilusne krvi, a time i perfuzija posteljice⁷⁹. Morgan i suradnici⁸⁰ prvi su pokazali na humanom modelu da se sve komponente krvožilnog reninsko-angiotenzinskog sustava eksprimiraju u i oko materničnih spiralnih arterija. Ekspresija renina i angiotenzinskog receptora je stalna između 5. i 13. tjedna trudnoće, dok ekspresija ACE pada nakon 10. tjedna trudnoće. *In situ* hibridizacija pokazuje lokalizaciju renina u stijenci materničnih vena i još nepromijenjenih spiralnih arterija. U prvom tromjesečju trudnoće, aktivni oblik angiotenzin I-konvertirajućeg enzima nalazi se u endotelnim stanicama spiralnih arterija i perivaskularnim stromalnim stanicama. Receptori tipa 1 za angiotenzin II eksprimiraju se na perivaskularnim stromalnim stanicama i u mišićnom sloju spiralnih arterija. Nekoliko istraživanja dokazalo je svezu između povišene aktivnosti ACE u plazmi ili serumu i razvoja hipertenzije u trudnoći ili preeklampsije^{2,50,51,53}.

Djelovanje posteljičnog reninsko-angiotenzinskog sustava je izuzetno važno tijekom procesa remodeliranja spiralnih arterija. Decidualizacija započinje oko spiralnih arterija i širi se kroz endometrij, čime posteljica i fetalni ovoji postaju veoma aktivno mjesto lokalnog djelovanja reninsko-angiotenzinskog sustava u trudnoći. Korion obilno luči aktivni renin, prorenin i angiotenzin I-konvertirajući

enzim. Posteljica je važno mjesto proizvodnje angiotenzinogena i angiotenzina II i sadrži visoke koncentracije tipa 1 receptora za angiotenzin II. Angiotenzin II stimulira lučenje humanog posteljičnog laktogena (hPL), trudnoćom potaknutog β 1-glikoproteina (*engl. pregnancy-specific β 1-glycoprotein-SP1*) i estradiola (E_2) posredovanjem AT_1 receptora⁸¹. *In vivo* i *in vitro* istraživanja na štakorima ustanovila su važnost angiotenzina II za decidualizaciju. Inhibicija angiotenzin I-konvertirajućeg enzima spriječava, dok lučenje angiotenzina II potiče decidualizaciju⁸².

Istraživanja na primatima pokazala su da infuzija malih doza angiotenzina II povećava prostaglandinsku sintezu, dilataciju spiralnih arterija i maternično-posteljični protok. Hipertenziju u trudnoći ne uzrokuje povećana razina angiotenzina II, već povećana osjetljivost arteriola za angiotenzin II kao posljedica neravnoteže između komponenti reninsko-angiotenzinskog sustava. Visoke doze angiotenzina II smanjuju maternično-posteljični protok zbog relativnog porasta otpornosti žilja. Angiotenzin II je snažan angiogeni čimbenik čija abnormalno povišena razina može uzrokovati poremetnju procesa angiogeneze remodelirajućih spiralnih arterija⁸³.

U istraživanjima na modelu transgeničnog miša s konstitucijski aktiviranim genima za rennin i angiotenzinogen, ženke koje nose transgen za angiotenzinogen su križane s mužjacima koji nose transgen za rennin. Trudne ženke razvile su hipertenziju uzrokovanu konstitucijskom ekspresijom posteljičnog renina. Također se razvila proteinurija i glomeruloskleroza, što ukazuje na činjenicu da hipertenzija može predstavljati inicijalni događaj u patofiziologiji preeklampsije. Veoma je zanimljivo istaći da su transgenične mišice za reninski i angiotenzinogeni gen imale proteinuriju i glomerulosklerozu i kada nisu bile trudne⁸⁴.

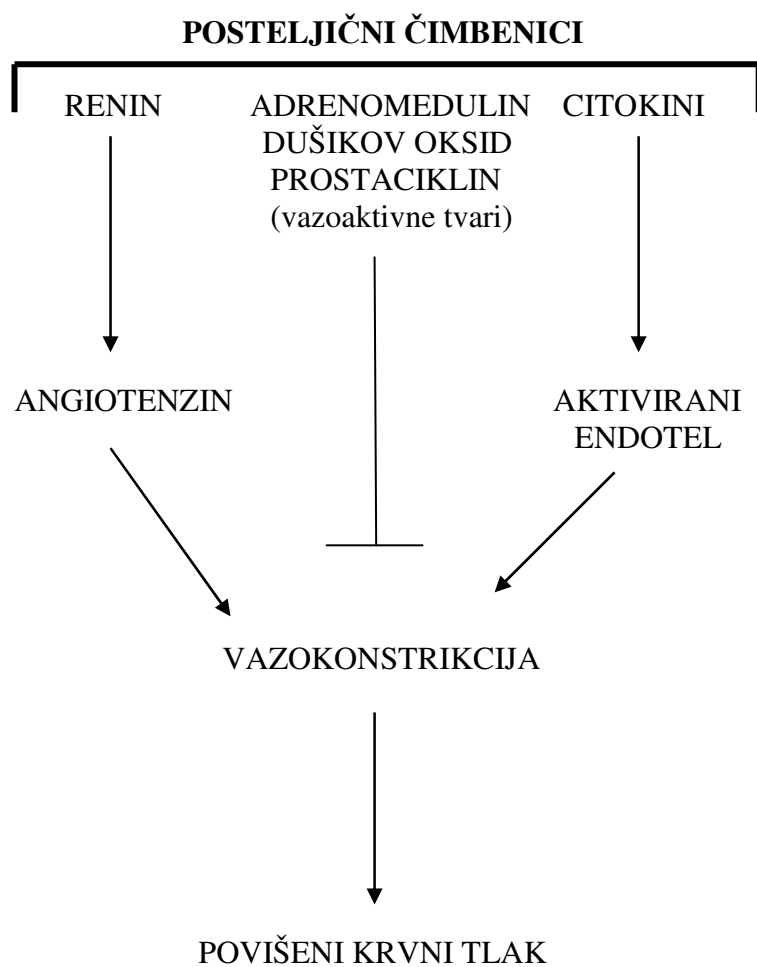
Aktivnost korionsko-posteljičnog reninsko-angiotenzinskog sustava terminskih posteljica ostaje u pravilu u okviru normalnih vrijednosti kod normotenzivnih trudnica i trudnica s blagom hipertenzijom⁸⁵. Posteljica luči vazoaktivne tvari (adrenomedulin, dušikov oksid, prostaciklini) koje sudjeluju u regulaciji fizioloških procesa tijekom trudnoće (slika 6). Posteljica luči i komponente reninsko-angiotenzinskog sustava, renin koji pokreće kaskadni mehanizam nastanka angiotenzina II, veoma snažnog vazokonstriktora.

Angiotenzin I-konvertirajući enzim predstavlja jedan od najvažnijih regulatornih čimbenika prostaglandinskog sustava i kontrola nad njegovom aktivnošću mogla bi utjecati na pojavu kliničkih simptoma hipertenzije u trudnoći⁸⁶. Ovaj enzim može inaktivirati bradikinin koji je snažan vazodilatator. Bradikinin predstavlja svezu između reninsko-angiotenzinskog i prostaglandinskog sustava u fiziološkim mehanizmima kontrole trudnoćom potaknute hipertenzije djelujući na metabolizam prostaciklina. Prostaglandin I₂ je snažan vazodilatator, inhibitor agregacije trombocita i uterine kontraktilnosti. Kod trudnica koje su razvile hipertenziju, razina prostaciklina je snižena uslijed čega dolazi do povećanja razine vazokonstriktorskog hormona tromboksana A₂. Rezistencije na vazoaktivne tvari u preeklampsiji nema, te dolazi do vazospazma i oštećenja endotelnog sloja krvnih žila. Kod težih oblika preeklampsije, poremećeni odnosi među komponentama reninsko-angiotenzinskog sustava posteljice i fetalnih ovoja vjerojatno izmiču regulacijskoj sprezi⁸⁷.

Knock i suradnici⁸⁸ pokazali su značajno snižen kapacitet i afinitet posteljičnog angiotenzinskog (AT1) receptora za angiotenzin II u trudnica s preeklampsijom i intrauterinim zastojem rasta ploda u odnosu na normotenzivne trudnice. Smanjena mogućnost vezivanja angiotenzina II na receptorsko mjesto vjerojatno je posljedica aktivacije posteljičnog reninsko-angiotenzinskog sustava, a

time i regulacije aktivnosti AT1 receptora. To ukazuje na poremećenu regulaciju ovog sustava kod preeklampsije, te važnost posteljice kao kompenzacijskog sustava u svrhu zaštite ploda. Poremećeno djelovanje aktivnog angiotenzin I-konvertirajućeg enzima na tonus krvnih žila i staničnu proliferaciju može imati deletorne posljedice u patološkim stanjima kao što je preeklampsija.

Slika 6. Čimbenici koje luči posteljica, a reguliraju vaskularnu funkciju.



2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Reninsko-angiotenzinski sustav ima veoma važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka. Angiotenzin I-konvertirajući enzim zauzima središnju ulogu katalizirajući hidrolizu angiotenzina I u najjači prirodni vazokonstriktor angiotenzin II. Oko 50% ukupne individualne razlike u aktivnosti cirkulirajućeg ACE u općoj populaciji pridaje se genskom učinku delecijско-insercijskog polimorfizma unutar introna 16 ACE gena³⁶. Dosadašnja istraživanja o povezanosti delecijско-insercijskog polimorfizma s pojavnošću trudnoćom potaknute hipertenzije pokazala su kontroverzne rezultate, osobito sagledavajući ih s gledišta populacijskog podrijetla ispitanica.

Cilj našeg istraživanja je utvrditi:

1. probirni značaj genotipizacije delecijско-insercijskog polimorfizma unutar introna 16 angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao molekularnog biljega razvoja hipertenzije u trudnoći u našoj populaciji trudnica,
2. pojavnost I i D alela u ispitivanoj i usporednoj skupini,
3. pojavnost delecijско-insercijskih genotipova u ispitivanoj i usporednoj skupini
4. moguću svezu između pojedinog genotipa i D ili I alela na razvoj preeklampsije
5. učinak pojedinog genotipa i D ili I alela na ishod trudnoće u ispitivanoj skupini trudnica.

3. ODABIR ISPITANICA I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. ODABIR ISPITANICA

Nakon vaginalnog porođaja ili carskog reza uzeti su uzorci krvi 60 preeklampsičnih žena kojima je trudnoća vođena u Odjelu za patologiju trudnoće Klinike za ginekologiju i porodništvo OB "Sveti Duh". Etičko povjerenstvo Opće bolnice "Sveti Duh" odobrilo je provođenje ovog istraživanja. Kriteriji definiranja preeklampsije određeni su novom klasifikacijom poremećaja u trudnoći praćenih hipertenzijom radne skupine Nacionalnog društva za naučavanje o hipertenziji u trudnoći 2000⁸⁹. Minimalni kriteriji su krvni tlak viši od 140/90 mm Hg nakon 20 tjedana trudnoće mjeren najmanje dva puta u razmaku od 6 sati u odnosu na vrijednosti prije trudnoće i proteinurija >300mg bjelančevina/24h ili najmanje 1+ na traci za pretragu urina. U istraživanje su uključene samo žene kod kojih se bolest razvila nakon 20 tjedana trudnoće, te iščezla unutar šest tjedana po porodu. Iz istraživanja smo isključili trudnice koje boluju od kroničnih bubrežnih bolesti ili bolesti jetre, dijabetesa, kronične hipertenzije, hipertireoze, sarkoidoze i kolagenskih bolesti. Nadalje, isključili smo trudnice s višeploidnom trudnoćom i kromosomski abnormalnim plodom.

Usporedna skupina obuhvatila je 50 žena s normalnim krvnim tlakom i barem jednim urednim porodom u svojoj anamnezi. Iz usporedne skupine isključene su žene koje imaju pozitivnu anamnezu za kroničnu hipertenziju i preeklampsiju u obitelji.

3.2 METODE ISTRAŽIVANJA

3.21. DNA analiza angiotenzin I-konvertirajućeg enzima

Genotipizacija insercijsko-delecijskog polimorfizma napravljena je u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ACE genotipizacija provela se tehnikom lančane reakcije polimeraze (*engl PCR-polymerase chain reaction*) na instrumentu za umnožavanje DNA (PCR sustav Gene Amp 2400, Applied Biosystems) i elektroforezom u gelu agaroze. Metoda otkriva DD homozigote (190 pb), II homozigote (490 pb) i ID heterozigote (190/490 pb). Nalaz heterozigota potvrđuje se regenotipizacijom koristeći insercijsko specifične početnice (335 pb).

Genomska DNA izolirana je iz pune krvi uzete na EDTA (Vacutainer) i izdvojena metodom isoljavanja⁹⁰.

3.211. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Reagensi:

1. 10x PCR pufer s MgCl₂ (Roche)
2. Deoksiribonukleotidi (dNTP, Roche)

dATP	10mM
dGTP	10mM
dCTP	10 mM
dTTP	10mM
3. DNA Taq/polimeraza, 5 IU/μL (Roche)
4. Sterilna voda (Zavod za transfuzijsku medicinu)

5. Početnice (Tib MolBiol)

ACE-1 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT -3'

ACE-2 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA -3'

ACE-1RE 5'-TGG GAC CAG AGC GCC CGC CAC TAC-3'

ACE-2RE 5'- TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženi su odsječci DNA duljine 490 pb i 190 pb u postupku genotipizacije insercijsko-delecijskog polimorfizma ACE gena i 335 pb kod regenetipizacije. Reakcija umnažanja izvodi se u ukupnom volumenu od 50 μ L. Sastojci reakcijske smjese navedeni su u tablici 2 i tijekom pripreme drže se na ledu.

Tablica 2. Sastojci reakcijske smjese.

SASTOJAK	KONAČNA KONCENTRACIJA
10x PCR pufer s MgCl ₂	1x pufer, 1,5 mM MgCl ₂
DNTP	0,2 mM
ACE-početnica	0,2 μ M
ACE-početnica	0,2 μ M
Taq-polimeraza	1 U
DNA	0,3 μ g

Reakcija se odvija u uređaju za lančanu reakciju polimerazom (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). Umnažanje odsječaka odvijalo se u 25 ciklusa prema uvjetima prikazanim u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti umnažanja odsječaka.

	ACE genotipizacija		ACE regenotipizacija	
Početna denaturacija	94°C	7 min	94°C	5 min
Denaturacija	94°C	1 min	94°C	1 min
Lijepljenje početnica	58°C	1 min	58°C	1 min
Produžavanje	72°C	2 min	72°C	1 min
Završno produžavanje	72°C	7 min	72°C	7 min

3.212. Analiza PCR-produkata

Reagensi:

1. 1,5% agarozni gel
 agaroz (Applied Biosystems) 0,75 g
 destilirana voda 50 mL
 50x TAE-pufer 1 mL
 etidijev bromid (10 mg/mL) 1,2 µL
2. 50x TAE-pufer
3. 1xTAE-pufer
4. Etidijev bromid (10mg/mL)

5. Boja za nanošenje uzoraka

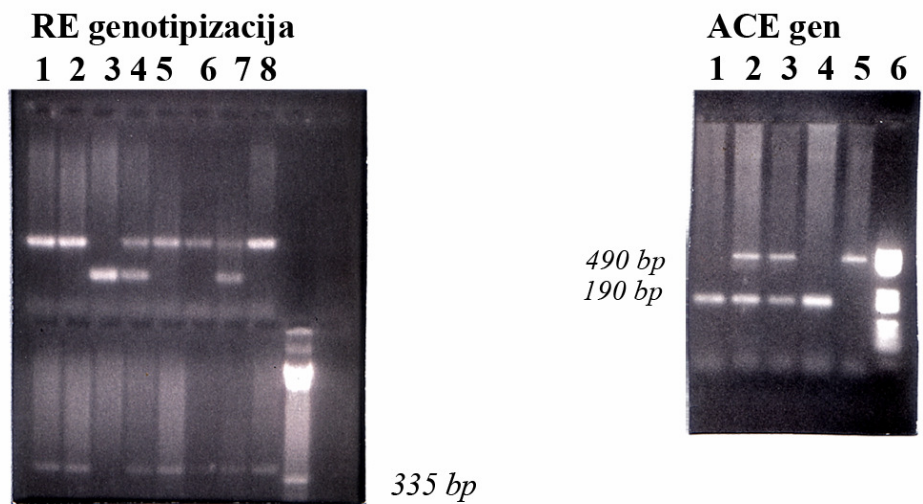
6. Molekularni biljeg

Molecular Weight marker VIII, (MWM VIII,19-1114 pb, Roche)

Analiza rezultata umnažanja lančanom reakcijom polimeraze napravljena je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Izvarena agarozna se otopi u destiliranoj vodi zagrijavanjem do vrenja, doda se 50x TAE-pufer i etidijev bromid. Nakon hlađenja do oko 50°C izlije se gel u kadu za elektroforezu i ostavi skrnuti. U jažice gela se nanese uzorci koji sadrže 8 μ L PCR-produkata i 3 μ L boje za nanošenje uzoraka. Također se u jažicu nanese 1 μ L molekularnog biljega razrijeđenog u 3 μ L boje i 6 μ L destilirane vode. Elektroforeza se odvija pri struji jakosti 100 V tijekom 30 minuta. Rezultati se očitaju pod ultraljubičastom svjetlošću, a gel fotografira (slika 7).

Slika 7. Gel elektroforeza: *ACE* genotipizacija (desno)-DD homozigot (190 pb, linije 1,4); ID heterozigot (490/190 pb, linije 2,3); II homozigot (490 pb, linija 5) ; biljeg (linija 6)

ACE regenotipizacija (lijevo)- PCR početnica unutar I alela (335 pb)



3.22. Statistička raščlamba

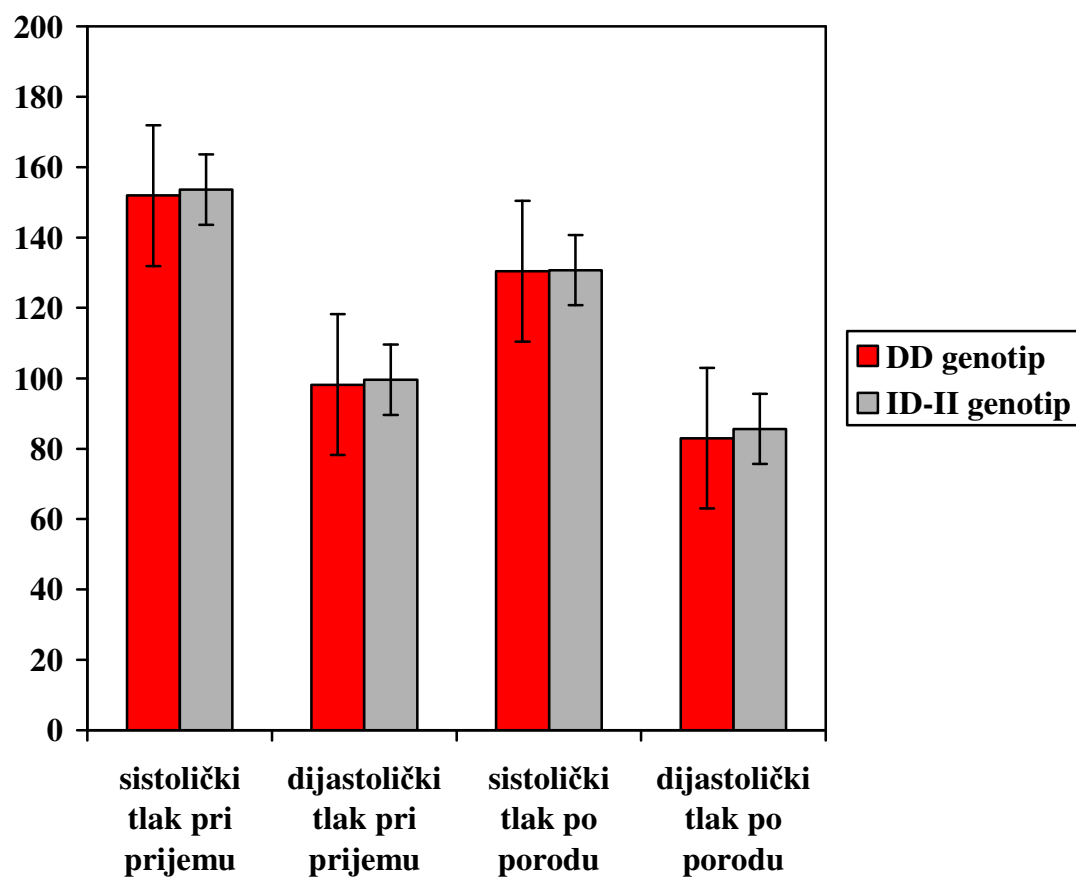
Usporedba učestalosti alela i raspodjele genotipova između preeklampsičnih trudnica i usporedne skupine provedla se χ^2 testom. Studentovim t-testom ispitala su se razlike prema dobi majke, porodnoj težini djeteta, porodnoj gestacijskoj dobi, graviditetu, paritetu i indeksu tjelesne težine između preeklampsične skupine i usporedne skupine. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Razlike u redukciji krvnog tlaka između skupina su analizirane jednosmjernom analizom varijance. Usporedba genotipa s kliničkim parametrima provedena je Mantel-Haenszel χ^2 testom ili Fisherovim testom egzaktnosti kada se očekivala mala skupina uzoraka. Razlika između skupina se izražava u terminu omjera izgleda i 95% intervala pouzdanosti. Omjer izgleda (*engl. odds ratio*) se definira kao omjer vjerojatnosti posjedovanja svojstva u ispitivanoj skupini i vjerojatnosti posjedovanja svojstva u usporednoj skupini. Sveze među genotipovima su izražene logističkim modelom. Rezultati su se smatrali statistički značajnima ako je $P < 0.05$. Podaci su analizirani korištenjem SAS softwera (V8 SAS institute, Cary, NC).

4. REZULTATI

Kliničke osobitosti trudnica u preeklamptičnoj i usporednoj skupini navedene su u tablici 4. Srednja dob trudnica u preeklamptičnoj skupini iznosila je 32.1 ± 6.1 godina, a u usporednoj skupini 31.38 ± 5.59 godina. Nije bilo statistički značajne razlike kod usporedbe dobi majke ($p=0.524$), paritetu ($\chi^2=3.897$, $df=3$, $p=0.273$) i graviditetu ($\chi^2=0.509$, $df=3$, $p=0.917$) između preeklamptične i usporedne skupine. Trajanje trudnoće (slika 9) i porodna težina djeteta (slika 10) kod preeklamptičnih trudnica bile su statistički značajno manje u odnosu na usporednu skupinu ($p<0.001$). Kod dvije preeklamptične trudnice porodna težina ploda bila je manja od 1000 g (570g i 700g), pa ovi podaci nisu navedeni u histogramskom prikazu (slika 10).

Srednja vrijednost sistoličkog/dijastoličkog tlaka znatno je viša i iznosila je $153,05 \pm 9.45 / 77.13 \pm 4.77$ mmHg u preeklamptičnih trudnica, dok je u skupini normotenzivnih trudnica iznosio $121.63 \pm 4.18 / 77.13 \pm 4.77$ mmHg. U preeklamptičnoj skupini sistolički tlak pri prijemu nije ovisio o genotipu majke. Kod nositelja DD genotipa srednja vrijednost sistoličkog tlaka pri prijemu iznosila je 151.93 ± 8.92 mmHg, a kod nositelja II i ID genotipa 153.58 ± 9.74 mm Hg. Srednja vrijednost dijastoličkog tlaka pri prijemu iznosila je 98.16 ± 7.09 mmHg kod DD nositelja, a 99.59 ± 8.49 mm Hg kod DI i II nositelja. Srednja vrijednost sistoličkog tlaka po porodu iznosila je 130.44 ± 7.75 mmHg kod DD nositelja, a 130.73 ± 7.12 mmHg kod DI i II nositelja. Srednja vrijednost dijastoličkog tlaka po porodu iznosila je 82.98 ± 4.66 mmHg kod DD nositelja, a 85 ± 6.11 mmHg kod DI i II nositelja (slika 8).

Slika 8. Raspodjela srednjih vrijednosti sistoličkog/dijastoličkog tlaka pri prijemu i po porodu u preeklamptičnoj skupini s obzirom na genotip majke (mmHg).



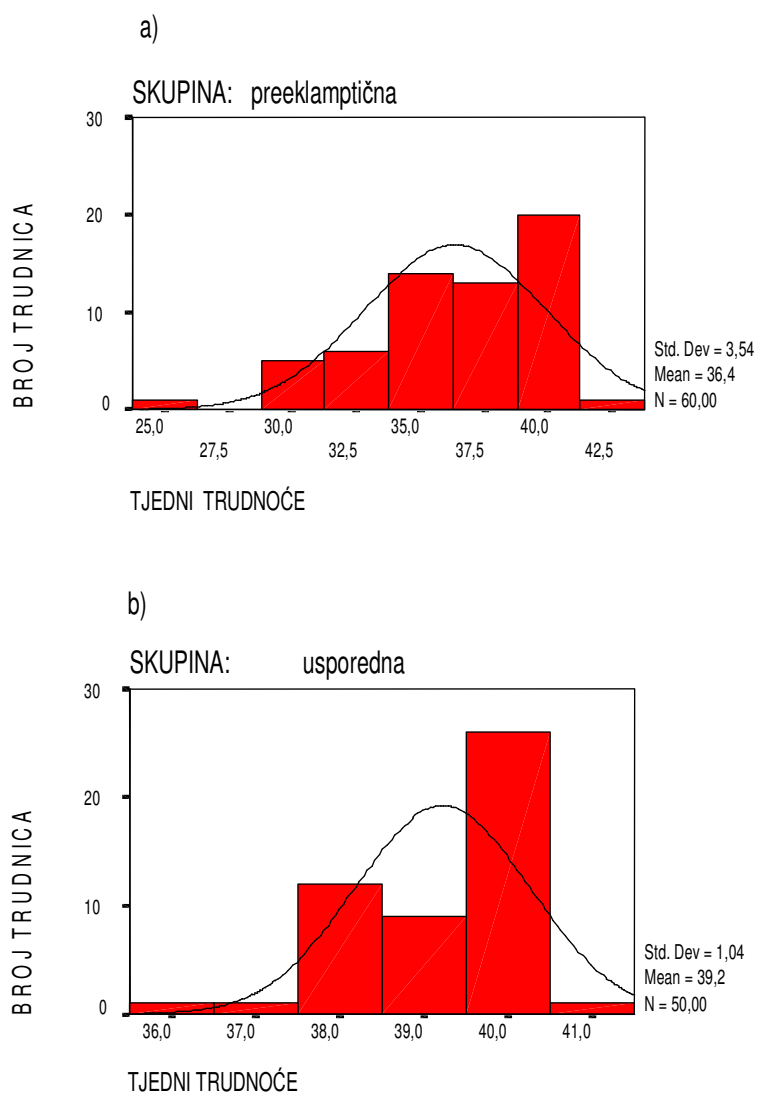
Tri trudnoće u preeklamptičnoj skupini završile su intrauterinom smrću ploda. Dvije trudnice imale su II genotip, a jedna DD genotip. Dvije trudnice, kod kojih je došlo do abrupcije posteljice, imaju insercijski genotip. U preeklamptičnoj skupini 68.3% poroda završilo je carskim rezom, u odnosu na 14% u usporednoj skupini ($\chi^2=32.735$, $df=1$, $p<0.001$). Udio prvotokinja iznosio je 38.3% u preeklamptičnoj i 38% u usporednoj skupini.

Tablica 4. Kliničke osobitosti pacijentica (srednja vrijednost \pm SD).

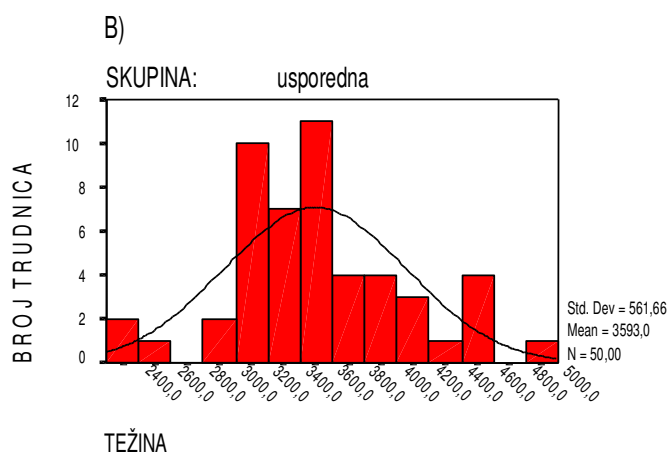
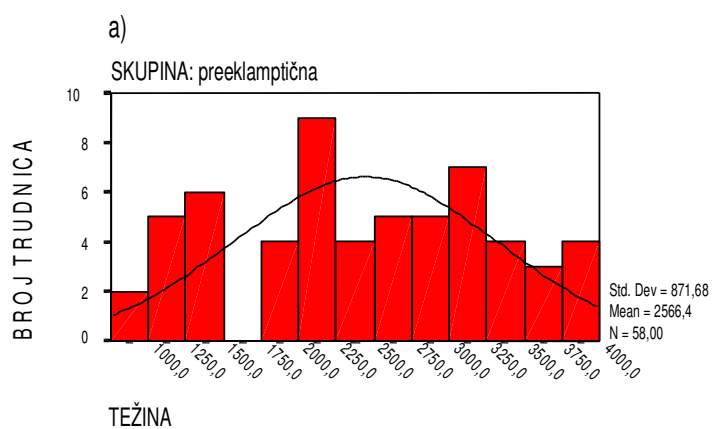
	Usporedna skupina	Preeklamptična skupina
Broj pacijentica	50	60
Dob trudnica (godine)	31.38 \pm 5.59 [19-45]	32.1 \pm 6.1 [19-45]
Porodna gestacijska dob (tjedni)*	39.22 \pm 1.04 [36-41]	36.46 \pm 3.42 [26-42]
Porodna težina djeteta (kg)*	3.59 \pm 0.56	2.50 \pm 0.93
Sistolički tlak pri prijemu (mmHg)	121.63 \pm 4.18	153.05 \pm 9.45
Sistolički tlak nakon poroda (mmHg)	119.7 \pm 5.19	130.64 \pm 7.26
Dijastolički tlak pri prijemu (mmHg)	77.13 \pm 4.77	99.14 \pm 8.05
Dijastolički tlak nakon poroda (mmHg)	75.15 \pm 5.43	98.72 \pm 7.86
Proteinurija pri prijemu (g/l)	—	1.28 \pm 0.94
Graviditet	2 [1-4]	2 [1-4]
Paritet	0-3	0-3
Način poroda (V/CR)	43/7	19/41
Indeks tjelesne mase (kg/m²)	24.51 \pm 2.79	26.22 \pm 4.31

V-vaginalno;CR- carskim rezom, *P<0.05

Slika 9. Histogramski prikaz trajanja trudnoće u a) preeklamptičnoj i b) usporednoj skupini



Slika 10. Histogramski prikaz porodne težine djeteta u a) preeklampsičnoj i b) usporednoj skupini.



4.1 Raspodjela D i I alela

Raspodjela I i D alela ACE polimorfizma između usporedne i preeklampsične skupine nije se statistički razlikovala (tablica 5). Ukupna pojavnost D alela je 0.633 u preeklampsičnoj i 0.54 u kontrolnoj skupini. ($\chi^2 = 1.273$, $df=2$, $P=0.529$).

Tablica 5. Raspodjela D i I alela i pojavnost I/D genotipova u preeklampsičnoj i usporednoj skupini.

	N	POJAVNOST GENOTIPOVA			RASPODJELA ALELA	
		DD (%)	ID (%)	II (%)	D	I
PREEKLAMPSIJA	60	26 (43.33)	24 (40)	10 (16.67)	0.636	0.364
KONTROLA	50	14 (28)	26 (52)	10 (20)	0.54	0.46

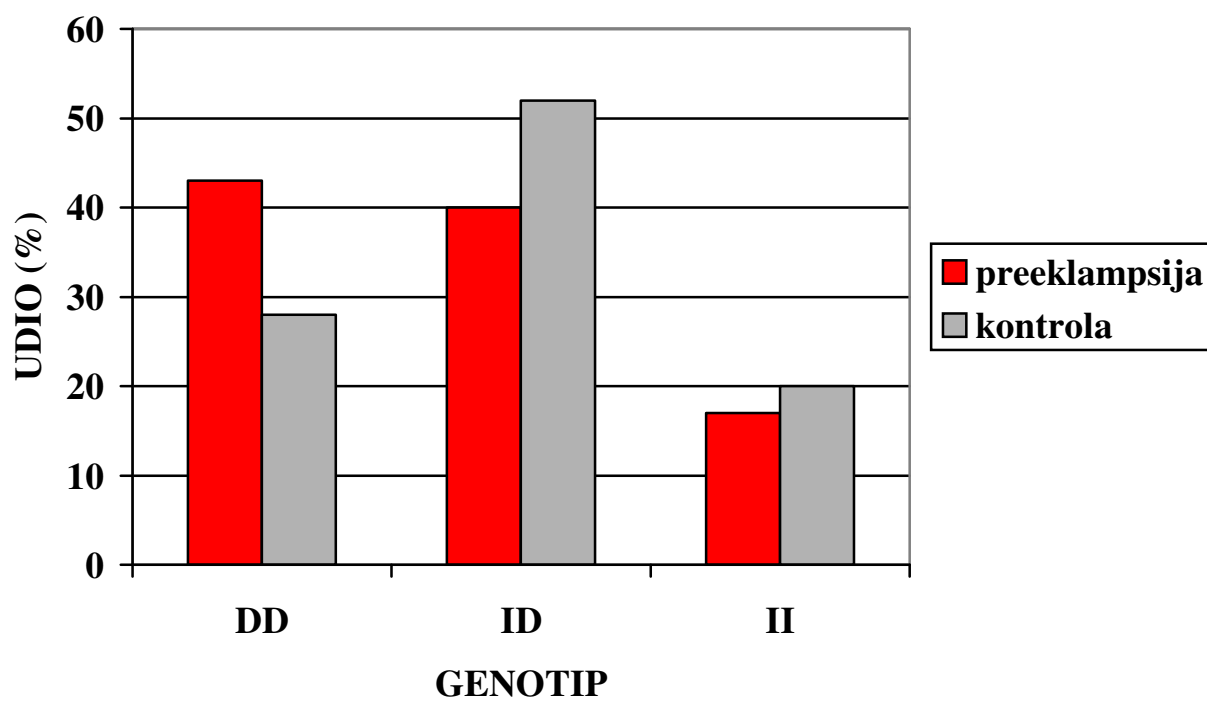
N, broj trudnica; DD, delecijski homozigot; ID, heterozigot; II insercijski homozigot

Mantel-Haenszelov $\chi^2 = 1.8378$; $p=0.1752$; $df=1$

4.2 Pojavnost insercijsko-delecijskih genotipova

Kod genotipske analize, sve ispitanice su podijeljene u tri skupine prema broju D alela; genotip II koji sadrži samo insercijske allele, genotip ID koji sadrži jedan delecijski i jedan insercijski alel i genotip DD koji sadrži dva delecijska alela. Cochran-Mantel-Haenszelova statistička obrada primjenom višestruke logističke regresijske analize, nije pokazala statistički značajnu razliku u raspodjeli genotipova između preeklamptične i usporedne skupine ($\chi^2 = 1.8378$; $p=0.1752$; $df=1$). Zastupljenost trudnica sa DD genotipom u preeklamptičnoj skupini iznosi 43,3%, dok 28% normotenzivnih trudnica ima isti genotip (tablica 6). Udio ID genotipa iznosi 40% u preeklamptičnoj i 52% u usporednoj skupini. Udio II genotipa u preeklamptičnoj skupini iznosi 16.67%, a kod normalnih trudnica 20% (slika 11). Iako je učestalost DD genotipa nešto veća u preeklamptičnoj skupini, ona nije bila statistički značajna ($\chi^2 = 2.7458$; $p=0.0975$; $df=1$, slika 10). Dvije trudnice kod kojih je trudnoća završila intrauterinom smrću ploda imaju II genotip, dok jedna trudnica ima ID genotip.

Slika 11. Pojavnost insercijsko-delecijskih genotipova u preeklamptičnoj i usporednoj skupini.



Omjer izgleda (*engl. odds ratio*), koji predstavlja omjer vjerojatnosti da trudnica nosi DD genotip u preeklamptičnoj skupini u odnosu na ID ili II genotip, iznosi 1.9664 sa 95% intervalom pouzdanosti od 0.8825 do 4.3813. Stoga, trudnice koje nose DD genotip imaju skoro dva puta veću vjerojatnost razvoja preeklampsije u trudnoći u odnosu na trudnice s II ili ID genotipom. Vjerojatnost da trudnica koja je razvila preeklampsiju ima DD genotip iznosi 1.3328 s 95% intervalom pouzdanosti od 0.9608 do 1.8640. Izgled da trudnica koja je razvila preeklampsiju ima ID ili II genotip iznosi 0.6806 sa 95% intervalom pouzdanosti od 0.4212 do 1.0996.

Tablica 6. Raspodjela DD genotipa u preeklamptičnoj i usporednoj skupini.

Pojavnost Udio (%)	SKUPINA		Ukupno
	preeklampsija	usporedna	
DD	26 43.33	14 28.00	40 36.36
DI+II	34 56.67	36 72.00	70 63.64
Ukupno	60 54.55	50 45.45	110 100.00

DD, delecijski homozigot; ID, heterozigot; II insercijski homozigot

Mantel-Haenszelov $\chi^2 = 2.7458$; $p = 0.0975$; $df = 1$

4.3 Raspodjela genotipova prema trajanju trudnoće

Kod trudnica koje su rodile prije 34. tjedna trudnoće (17/110), raspodjela D alela bila je statistički značajno viša i iznosila je 0.735 u odnosu na ostale (93/110) kod kojih je iznosila 0.56. Raspodjela I alela iznosila je 0.265 u usporedbi sa 0.435 kod onih trudnica koje su imale porod nakon 34. tjedna trudnoće (tablica 7). Omjer izgleda dobiven logaritamskom regresijom za preeklampsičnu trudnicu da ima DD genotip i porodi se prije 34. tjedna trudnoće iznosi 2.5 sa 95% intervalom pouzdanosti od 1.0325 do 6.0533 u odnosu na trudnicu koja ima ID ili II genotip. Naši rezultati pokazuju da trudnice koje nose DD genotip i razviju preeklampsiju u trudnoći, imaju 2,5x veći rizik poroda prije 34. tjedna trudnoće, u odnosu na trudnice s DI i II genotipom koje su također razvile preeklampsiju (slika 12).

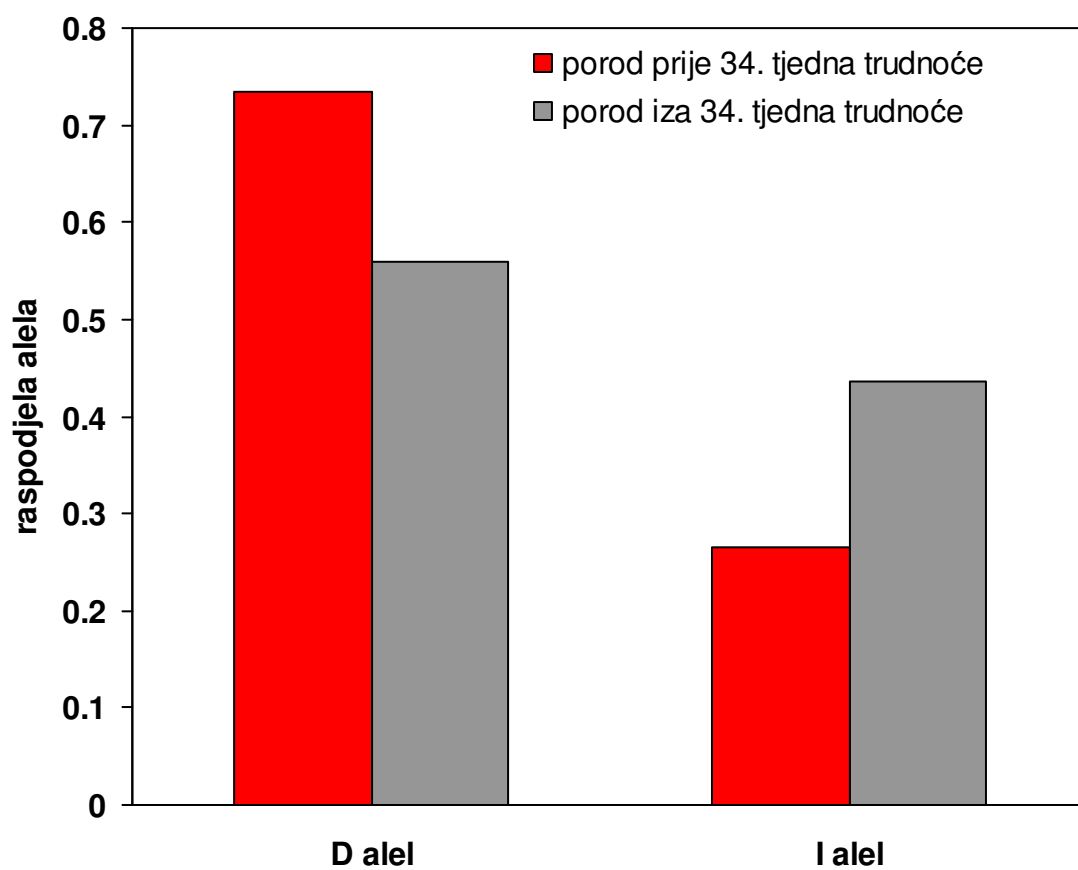
Raspodjela D alela u preeklampsičnih trudnica koje su se porodile prije 34. tjedna trudnoće iznosi 0.735, u odnosu na 0.593 kod ostalih preeklampsičnih trudnica. Raspodjela I alela iznosila je 0.265 u odnosu na 0.407 kod preeklampsičnih trudnica koje su se porodile poslije 34. tjedna trudnoće. U preeklampsičnoj skupini, 10 od 17 trudnica koje su se porodile prije 34. tjedna trudnoće, ima delecijски genotip, njih 5 su heterozigoti, a dvije nose insercijski genotip (tablica 7).

Tablica 7. Raspodjela insercijsko-delecijskih genotipova kod trudnica koje su rodile prije 34. tjedna trudnoće.

DD	porod<34. tjedna trudnoće	
	ne	Da
POJAVNOST		
UDIO (%)		
DA	30	10
	32.26	58.82
NE	63	7
	67.74	41.18
UKUPNO	93	17
	84.55	15.45

DD, delecijski homozigot; $\chi^2 = 4.3833$; $p = 0.0363$; $df = 1$

Slika 12. Raspodjela D i I alela kod preeklampsičnih trudnica koje se rodile prije 34. tjedna trudnoće.



4.4 Rizik ponavljanja preeklampsije

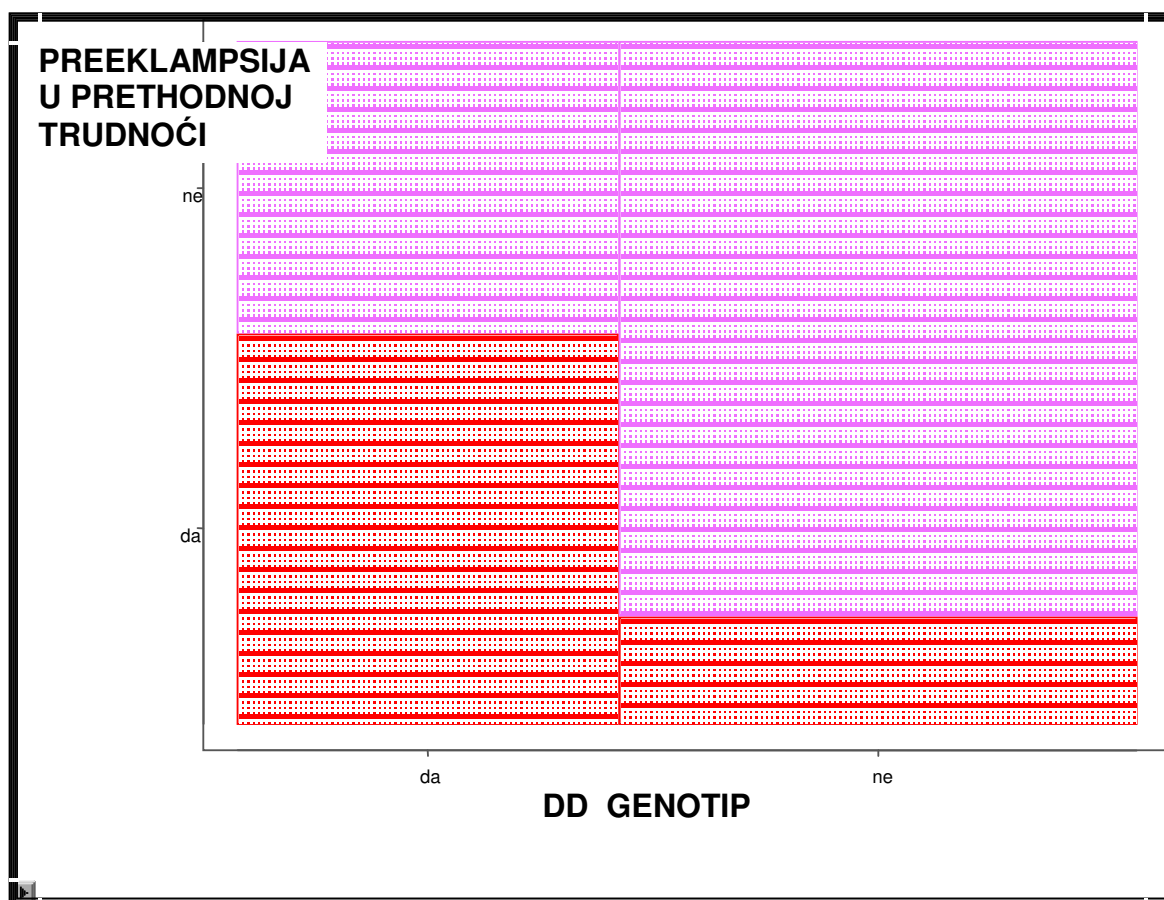
Od 60 trudnica u preeklamptičnoj skupini, njih 12 imalo je preeklampsiju i u prethodnoj trudnoći. Njih 72.7% nositelj je DD genotipa, a 27.3% II ili ID genotipa (slika 13). Udio D alela iznosio je 0.83, a i alela 0,16. Pojavnost DD genotipa u skupini trudnica koje su imale preeklampsiju u prošloj trudnoći bila je statistički značajna (tablica 8). Oko 41% (5/12) trudnica porodilo se prije 34. tjedna trudnoće. Omjer izgleda da trudnica koja je imala preeklampsiju u prethodnoj trudnoći da je razvije ponovo, a nosi DD genotip iznosi 7.11 sa 95% intervalom pouzdanosti od 1.4 do 36.117 u odnosu na trudnice koje imaju II ili ID genotip. Rizik ponavljanja preeklampsije kod trudnice koja nosi DD genotip je oko sedam puta veći, u odnosu na trudnice koje nose II ili ID genotip.

Tablica 8. Pojavnost DD genotipa u preeklamptičnih trudnica koje su i u prethodnoj trudnoći imale preeklampsiju.

DD	Prethodna trudnoća s preeklampsijom		Ukupno
	Da	ne	
Pojavnost Udio (%)			
DD	9 72.73	7 27.27	16 42.42
DI+II	3 27.27	16 72.73	21 57.58
Ukupno	12 33.33	25 66.67	37 100.00

DD, delecijski homozigot; $\chi^2 = 6.2030$; $p = 0.0128$; $df = 1$

Slika 13. Zastupljenost DD genotipa u preklampičnih trudnica koje su imale preeklapsiju u prošloj trudnoći.



4.6 Raspodjela insercijsko-delecijskih genotipova u trudnica s intrauterinim zastojem rasta ploda

Kod 24 trudnice detektiran je intrauterini zastoj rasta ploda. Njih 12 imalo je DD genotip, 9 ID genotip, a 3 II genotip (tablica 9, slika 14). Nije nađena statistički značajna razlika između pojavnosti određenog genotipa i intrauterinog zastoja rasta ploda ($\chi^2 = 0.8894$; $p = 0.6410$; $df = 1$). Udio D i I alela u trudnica s intrauterinim zastojem rasta ploda iznosio je 0.6875 i 0.3125, u odnosu na 0.5972 i 0.4028 kod trudnica koje su rodile normalnu djecu za određenu gestacijsku dob. Omjer izgleda da trudnica sa DD genotipom razvije intrauterini zastoj ploda iznosi 1.5714 sa 95% intervala pouzdanosti od 0.5534 do 4.4623, u odnosu na II i ID genotip. Udio slučajeva s intrauterinim zastojem rasta kretao se od 12.5% kod nositelja II genotipa, do 50% kod trudnica koje imaju DD genotip u preeklamptičnoj skupini.

Kod svih 12 trudnica koje su se porodile prije 34. tjedna trudnoće, detektiran je intrauterin zastoj rasta ploda (tablica 10). Njih 6 ima DD genotip, tri insercijski i tri ID genotip. Pojavnost D alela iznosi 0.625, a I alela 0.375. Nije nađena statistički značajna razlika između pojavnosti DD genotipa i razvoja intrauterinog zastoja rasta ploda i poroda prije 34. tjedana trudnoće. Omjer izgleda da trudnica koja nosi DD genotip porodi prije 34. tjedna trudnoće plod sa zastojem u rastu iznosi 1.4 sa 95% intervala pouzdanosti od 0.3937 do 4.979, u odnosu na II i ID genotip. Vjerojatnost da preeklamptična trudnica koja je rodila dijete sa intrauterinim zastojem rasta prije 34. tjedna trudnoće, ima DD genotip iznosi 1.3077 sa 95% intervala pouzdanosti od 0.4746 do 3.589.

Tablica 9. Raspodjela genotipova kod preeklamptičnih trudnica kod kojih je detektiran intrauterini zastoje rasta ploda.

GENOTIP	porodna težina < 5%		Ukupno
	da	ne	
Pojavnost			
Udio (%)			
DD	12 50.00	14 38.89	26 43.33
ID	9 37.50	15 41.67	24 40.00
II	3 12.50	7 19.44	10 16.67
Ukupno	24 40.00	36 60.00	60 100.00

DD, delecijski homozigot; ID, heterozigot; II insercijski homozigot

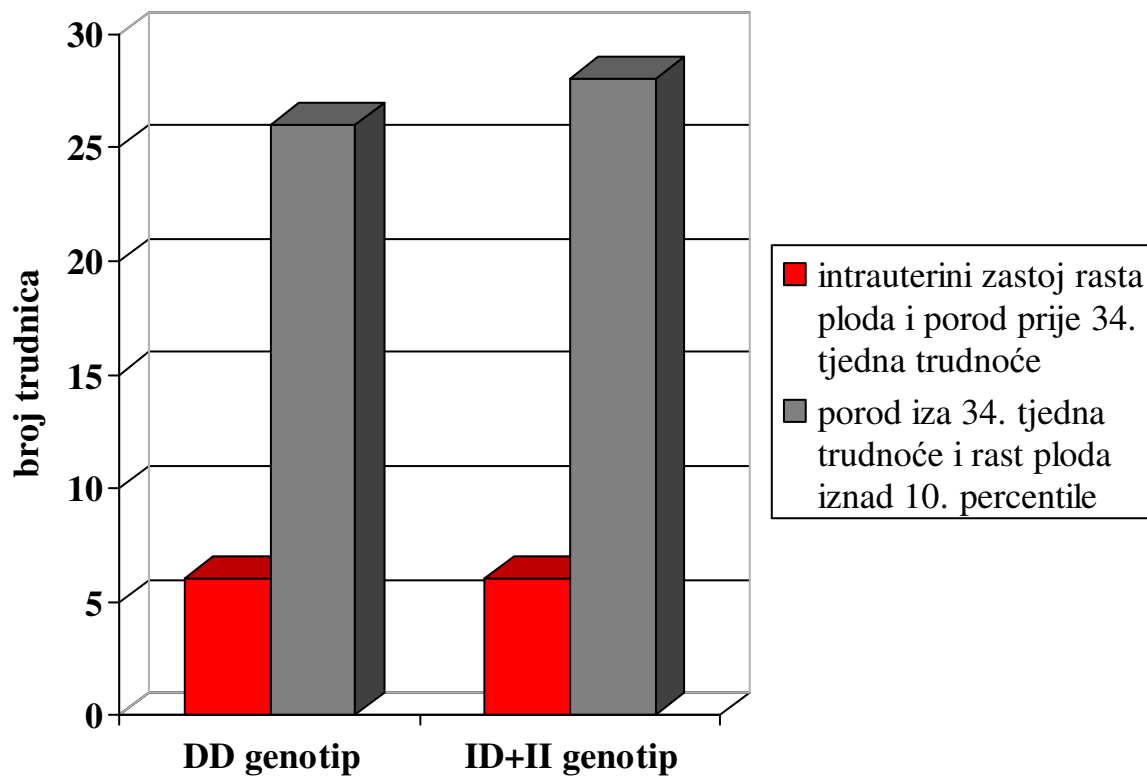
Mantel-Haenszelov $\chi^2 = 0.8894$; $p = 0.6410$; $df = 1$

Tablica 10. Zastupljenost DD genotipa u preeklamptičnih trudnica koje su rodile dijete sa zastojem rasta i prije 34 tjedna trudnoće.

DD	<5% < 34 tjedna trudnoće		Ukupno
Pojavnost	da	ne	
Udio (%)			
da	6	20	26
	10.00	33.33	43.33
ne	6	28	34
	10.00	46.67	56.67
Ukupno	12	48	60
	20.00	80.00	100.00

DD, delecijski homozigot; Mantel-Haenszelov $\chi^2 = 0.2715$; $p = 0.6023$; $df = 1$

Slika 14. Zastupljenost insercijsko-delecijskih genotipova u preeklamptičnih trudnica koje su rodile dijete sa zastojem rasta i prije 34. tjedna trudnoće.



5. RASPRAVA

U našem istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku raspodjele određenog insercijsko-delecijskog genotipa između preeklampsične i usporedne skupine, što je u skladu s autorima koji su svoja istraživanja uključili trudnice europskog podrijetla^{67,69}.

Međutim pokazali smo statistički značajnu svezu između DD genotipa i trudnica koje su i u prošloj trudnoći razvile preeklampsiju. Od 12 trudnica koje su razvile preeklampsiju u prošloj trudnoći, čak 72.3% njih ima DD genotip. Omjer izgleda da je trudnica koja je imala preeklampsiju u prethodnoj trudnoći razvije ponovo, a nosi DD genotip iznosi 7.11 sa 95% intervalom pouzdanosti od 1.4 do 36.117 u odnosu na trudnice koje imaju II ili ID genotip. Prema tome, rizik ponavljanja preeklampsije kod trudnice koja nosi DD genotip je oko sedam puta veći, u odnosu na trudnice koje nose II ili ID genotip. U ovakvim slučajevima delecijski genotip mogao bi biti dodatni čimbenik rizika razvoja preeklampsije, djelujući sinergistički sa drugim čimbenicima koji pridonose njezinom nastanku. Razvoj preeklampsije u prethodnoj trudnoći može uzrokovati nepovratne latentne promjene koje pojačavaju učinak angiotenzina II, veoma snažnog vazokonstriktorskog peptida.

Naše istraživanje pokazalo je i povećan broj nositelja delecijskih alela (0.735) u skupini preeklampsičnih trudnica koje su se porodile prije 34. tjedna trudnoće. Istraživanje Mello i suradnika⁹¹ pokazuje sličnu pojavnost D alela (0.73) u skupini preeklampsičnih trudnica s intrauterinim zastojem rasta ploda. Od devet trudnica s DD genotipom, koje su razvile preeklampsiju i intrauterini zastoj rasta ploda, njih 7 porodilo (77.8%) se prije 34. tjedna trudnoće. U našoj skupini preeklampsičnih trudnica, koje su i u prošloj trudnoći razvile preeklampsiju, njih

72.3% nosi DD genotip, a kod 41.7% porod se dovršio prije 34. tjedna trudnoće. Naše istraživanje u skladu s istraživanjem Mello i suradnika⁹¹ pokazuje da žene s DD genotipom i pozitivnom anamnezom za preeklampsiju imaju značajno povišen rizik i od prijevremenog poroda. Naši rezultati pokazuju da trudnice koje nose DD genotip i razviju preeklampsiju u trudnoći, imaju 2,5x veći rizik poroda prije 34. tjedna trudnoće, u odnosu na trudnice s DI i II genotipom koje su također razvile preeklampsiju.

S obzirom da se pojavnost D alela u populaciji europskog podrijetla kreće između 50%-62%, rezultati našeg istraživanja mogli bi se koristiti za savjetovanje žena, koje su u prethodnoj trudnoći razvile preeklampsiju u pogledu rizika ponavljanja i mogućih komplikacija u sljedećim trudnoćama. Posebice za probir onih koje zahtijevaju pozorno praćenje i stalnu procjenu dinamike fetalnog rasta.

Veoma je vjerojatno da učinak ACE genotipa određuju neki drugi mehanizmi neovisni o aktivnosti serumskog ACE. Tome u prilog idu podaci da terapija ACE inhibitorima ima pozitivan učinak na dijabetisku retinopatiju koja nije povezana s povišenim vrijednostima serumskog ACE⁵⁷.

Abnormalna placentacija je svojstvena hipertenziji u trudnoći. Abnormalnosti u posteljničnom reninsko-angiotenzinskom sustavu mogle bi biti povezane s njenim defektnim razvojem. Proliferacija viloznog citotrofoblasta je povećana, sinciotrofoblast pokazuje nedostatak sekretorne aktivnosti u mikrovilima i područja fokalne nekroze. Trofoblastna invazija u uterine spiralne arterije i njihovo remodeliranje je neodgovarajuće⁹² Klinički čimbenici rizika i patogeneze esencijalne hipertenzije i hipertenzije u trudnoći se preklapaju. Nekoliko polimorfizama unutar gena koji kodiraju reninsko-angiotenzinski sustav mogu pridonijeti razvoju povišenog krvnog tlaka, te mogu utjecati na terapijski odgovor antihipertenzivnim lijekovima^{93,94}.

Jedan od glavnih predloženih mehanizama preeklampsije je utero-placentarna hipoperfuzija gdje je opskrba hranjivim tvarima i kisikom poremećena. Jedan od uzroka može biti deficijencija fiziološkog remodeliranja uterinih spiralnih arterija. Bez dovoljno promjena uterine vaskularizacije u ranoj trudnoći, posteljica može postati hipoksična kako trudnoća napreduje, s nedovoljnim transportom kisika na staničnoj razini. Makris i suradnici⁹⁵ ustanovili su vezu ACE DD genotipa s poremećajem hemostatske ravnoteže odražavajući se na hiperkoagulabilnost i oštećenje endotelnog sloja u pacijenata s neliječenom hipertenzijom.

Ito i suradnici⁹⁶ ispitali su da li se ekspresija glasničke ACE RNA mijenja u preeklampsiji. Pokazali su da je njena ekspresija trostruko uvećana kod preeklampsičnih trudnica u odnosu na normotenzivne trudnice. Razina glasničke RNA uvećana je 1.5x, te su izolirana dva oblika glasničke RNA; jedan somatskog podrijetla dužine 4.3 kb i drugi dužine 3.5 kb. Primarna glasnička ACE RNA lokalizirana je venoznim endotelnim stanicama matičnog tkiva resica. Prema autorima, endotelne stanice krbnih žila posteljice i pupkovine trebale bi biti glavno mjesto pretvorbe angiotenzina I u angiotenzin II regulirajući optok ploda i posteljice, u stanjima kao što je stresom uzrokovana hipoksija. Sposobnost ploda da preusmjeri krvni optok kao odgovor na smanjenu količinu kisika je od velike važnosti za njegov razvoj i preživljenje. Na modelu ovce pokazano je da razina angiotenzina II raste tijekom perioda hipoksije⁹⁷. Kod ploda koji pati od hipoksije uzrokovane stresom, razina angiotenzina II u umbilikalnoj veni raste. Nadalje, kao odgovor na hipoksične promjene fetoplacentarni optok krvi će se preusmjeriti prema organima koji su jako osjetljivi na nedostatak kisika⁹⁸.

Najnovija istraživanja iznose pretpostavku da *Alu elementi* reguliraju translaciju kao odgovor na stanični stres i virusnu infekciju adenovirusom, HIV-

om ili, herpes simplex virusom djelujući kao antagonisti kinaze koju aktivira dvolančana RNA⁹⁹. Ova primarna *Alu* RNA sadrži dimernu ponavljajuću strukturu i ima citoplazmatsko životno vrijeme od 30 minuta. Dio primarnog transkripta se procesira u stabilniju, malu citoplazmatsku *Alu* RNA koja odgovara lijevom monomeru dimerne strukture. Virusna infekcija uzrokuje znatno povećanje primarne *Alu* RNA. Stanični stres uzrokuje prolazno povećanje količine primarne *Alu* RNA, dok je količina citoplazmatske, koja je post-transkripcijski regulirana, neznatno povećana. Mehanizmi djelovanja staničnog stresa na početak translacijske su veoma složeni. Primarna *Alu* RNA je potencijalno jaki antagonist, jer može istovremeno vezati dvije molekule proteinske kinaze, inhibirajući njezino djelovanje. Virusni geni djeluju kao pojačivači *Alu* transkripta. Endogena primarna *Alu* RNA potiče translacijsku ekspresiju inhibirajući aktivnost kinaze koju aktivira dvolančana RNA¹⁰⁰.

Istraživanja koja govore o povezanosti određenih DNA polimorfizama s većom pojavnosću neke bolesti predstavljaju važan izvor informacija o kandidatnim genima. Vezna analiza korištenjem DNA polimorfizama predstavlja epidemiološku podlogu istraživanja genetske osnove humanih bolesti, kao što su predispozicije za određene bolesti, učinkovitost medikamentozne terapije te starenje¹⁰¹. Najveći broj polimorfizama humanog genoma javlja se kao polimorfizam u jednom nukleotidu (SNPs-single nucleotide polymorphisms). Drugi polimorfizmi kao insercijsko-delecijski polimorfizam koji sadrže promjene većih segmenata DNA su rjeđi. Prisutno je preko 3 miliona SNP-ova u humanom genomu, međutim svaka promjena neće rezultirati funkcionalnim poremećajem. Polimorfizmi koji se razlikuju u jednom nukleotidu, a nalaze se u genima reninsko-angiotenzinskog sustava, mogu modulirati odgovor na antihipertenzivne lijekove, odnosno odabir onih koje će djelovati¹⁰². Veoma je zanimljivo najnovije

istraživanje Mello i suradnika¹⁰³ koji su pokazali da heparin niske molekularne težine smanjuje rizik ponavljanja preeklampsije i negativnog ishoda trudnoće, te djeluje povoljno na održavanje vrijednosti krvnog tlaka kod trudnica koje imaju delecijski genotip i pozitivnu anamnezu za preeklampsiju.

Polimorfizmi djeluju kvantitativno u ranom stadiju na gensku ekspresiju, ACE transkript ili stabilnost glasničke RNA. Insercijsko-delecijski polimorfizam se nalazi unutar introna, i ne utječe na aktivnost ovog enzima i njegovu topivost proteolitičkim cijepanjem, ali bi mogao biti uključen u transkripcijsku regulaciju ili procesiranje glasničke ACE RNA¹⁰.

Alu obitelji podjeljene su u različite podskupine na osnovu evolucijskog razdoblja kada su nastale: Alu J (najstarija) koja obiluje Alu elementima, dok Alu S (srednje razdoblje), i AluY (najmlađa) imaju manji broj Alu elemenata. Mali broj *Alu* slijedova je još aktivan i umnožava se u humanom genomu. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su složeni fenotipski poremećaji uzrokovani ne samo genima i okolišnim čimbenicima, već i nasljednim epigenetskim modifikacijama gena retrotranspozona¹⁰⁰. Norris i suradnici¹⁰⁴ opisuju novu podskupinu unutar *Alu* obitelji DNA ponavljajućih slijedova koji su se odvojili od poznatih *Alu* slijedova i stekli sposobnost funkcioniranja kao pojačivaci transkripcije ovisni o estrogenskim receptorima. Oni mijenjaju estrogensku osjetljivost preko promotora unutar kojeg su smješteni, regulirajući genski transkript. Kako su estrogeni ključni međustanični modulatori ženskog reproduktivnog sustava koji održavaju kardiovaskularni tonus i reguliraju diferenciranje koštanih stanica, ne može se reći da su *Alu* elementi inertni. Samo noviji članovi klase HS i CS mogu se retropozicijom kretati po genomu, što nije slučaj sa skupinom ovih pojačivača (tablica 11). Estrogenski pojačivači pripadaju staroj klasi i mogu se kretati samo procesom rekombinacije. S obzirom na sličnost slijeda većine hormonskih

receptorskih elemenata, mogu postojati druge klase *Alu* elemenata koje posjeduju pojačivačke sljedove koji će odgovarati na druge jezgrine hormonske receptore.

Da li *Alu* polimorfizam može uzrokovati destabilizaciju DNA sparivanja uzrokujući nestabilnost ili dodatne mutacije? Brojna istraživanja pokazala su učinak nekodirajućih varijacija na nastajanje mendelijeviskih bolesti, kao što su cistična fibroza ili fenilketonurija¹⁰⁵.

Tablica 11. *Alu* podskupine i njihova povezanost s mendelijeviskim bolestima¹⁰⁹.

<i>Alu</i> podskupina	Broj kopija u haploidnom humanom genomu	Umetnuti elementi vezani uz bolest
J,Sx, Sg1	> 1,000,000	0
Y	> 200,000	1
Ya5	2640	7
Ya5a2	40	1
Ya8	70	0
Yb8	1852	3
Yb9	80	0
Yc1	400	3
Yc2	ND	0

ND=nije detektirano

Brojna istraživanja pokazala su egzonizaciju *Alu* slijedova gdje procesiranjem dolazi do umetanja djelova *Alu* slijedova u zrelu glasničku RNA. Preko 84% egzona koji sadrže *Alu* slijedove, a koji se pojavljuju unutar kodirajuće regije glasničke RNA, u pravilu uzrokuju delecijски učinak. Interni egzoni koji sadrže *Alu* slijedove se u pravilu alternativno procesiraju. Transpozonski elementi se nalaze u 4% kodirajućih regija humanih gena, a *Alu* elementi obuhvaćaju više od trećine tih elemenata. *Alu* elementi mogu umetanjem uzrokovati genetske poremećaje, ali i također pridonijeti proteinskoj raznolikosti, čuvajući na taj način integritet molekule DNA¹⁰⁶.

Rezultate prethodnih i našeg istraživanja treba svakako sagledati u okviru populacijskog podrijetla ispitanica, zbog već poznatih razlika u pojavnosti insercijsko-delecijских genotipova u različitim demografskim skupinama. Većina istraživanja na populaciji trudnica azijskog podrijetla pokazuje značajno višu zastupljenost delecijского genotipa među trudnicama koje su razvile hipertenziju ili preeklampsiju u trudnoći⁶⁰⁻⁶⁶. Istraživanje Roberts i suradnika⁷¹ na populaciji trudnica afričkog podrijetla nije našlo vezu između delecijского genotipa i razvoja preeklampsije. Istraživanja na populaciji europskog podrijetla nisu također uspjela utvrditi povezanost D alela s razvojem preeklampsije⁶⁷⁻⁶⁹. Jain i suradnici¹⁰⁷ su htjeli utvrditi učestalost hipertenzije i mogućih komplikacija kod žena afričkog i europskog podrijetla. Žene afričkog podrijetla imaju veću pojavnost hipertenzije nego žene europskog podrijetla. Međutim žene europskog podrijetla imaju veći rizik prijevremenog poroda, niske porodne težine djeteta, razvoja intrauterinog zastoja rasta i perinatalne smrti. Mathew i suradnici¹⁰⁸ su htjeli odrediti pojavnost insercijsko-delecijского polimorfizma u skupinama različitog populacijskog podrijetla. Kod ispitanika afričko-američkog podrijetla, pojavnost DD genotipa iznosila je 29%, ID genotipa 60%, a II genotipa 11%. U ispitanika europskog

podrijetla, pojavnost DD genotipa iznosila je 29%, ID genotipa 40%, a II genotipa 31%. Pojavnost D alela iznosila je 0.50 kod ispitanika europskog podrijetla, a 0.59 kod ispitanika afričko-američkog podrijetla. Populacijski uvjetovana pojavnost delecijско-insercijskog polimorfizma reninsko-angiotenzinskog sustava zasigurno pridonosi razlikama učestalosti javljanja nekih bolesti u određenoj skupini ispitanica. Rieder i suradnici⁹ pokazali su visoki stupanj vezne ravnoteže u 18 varirajućih mjesta, uključujući i Alu insercijsko-delecijски polimorfizam. Genetska podjela u delecijскоj skupini H1 i H7 u Europsko-američkoj populaciji, omogućila bi generaciju haplotipova i dodatnu analizu genotipsko- fenotipskih odnosa.

Malo je vjerojatno da postoji jedan gen odgovoran za preeklampsiju, već vjerojatnije da se radi o skupini različitih polimorfizama koji u međudjelovanju s okolišnim čimbenicima prednose razvoju ovog stanja^{109,110}. Veoma je teško odrediti pravilnu fenotipizaciju, jer do razvoja kliničke slike dolazi najčešće tek krajem drugog tromjesečja trudnoće. Također, poznata je važnost genetskog profila trofoblasta u etiopatogenezi preeklampsije. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da bi u određenim podskupinama preeklamptičnih trudnica, genotipiziranje insercijsko/ delecijскоg polimorfizma moglo imati važnu kliničku i znanstvenu vrijednost. Također, nas usmjeravaju ka razvijanju novih istraživačkih modela razjašnjavanja etiopatogeneze preeklampsije zasnovanim na dobivenim rezultatima, i mogućeg testiranja određenih terapijskih postupaka. Određivanje genetskih čimbenika razvoja preeklampsije zahtijeva fenotipiziranje velike baze podataka. Uvođenje čip tehnologije omogućiti će genomsko pretraživanje odabranih uzoraka. Sakupljanje podataka u jedinstvenu bazu različitih fenotipova preeklampsije omogućilo bi bolje razumijevanje genetskih uzroka ovog poremećaja, te vjerojatno jednog dana uvođenja čip tehnologije za genomsko pretraživanje predispozicijskih gena.

6. ZAKLJUČCI

U našem istraživanju htjeli smo utvrditi probirni značaj insercijsko/delecijskog polimorfizma angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao mogućeg čimbenika rizika razvoja hipertenzije u trudnoći, odrediti pojavnost I i D alela i delecijsko-insercijskih genotipova angiotenzin I-konvertirajućeg enzima u preeklamptičnoj i usporednoj skupini trudnica, te pokušati povezati raspodjelu genotipova u preeklamptičnoj skupini s ishodom trudnoća. Rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

1. Raspodjela I i D alela između usporedne i preeklamptične skupine nije se statistički razlikovala. Ukupna pojavnost D alela iznosila je 0.633 u preeklamptičnoj i 0.54 u usporednoj skupini.
2. Zastupljenost trudnica s DD genotipom u preeklamptičnoj skupini je veća, ali ne statistički značajna, i iznosi 43.3%, dok 28% normotenzivnih trudnica ima isti genotip ($p=0.096$).
3. Srednje vrijednosti sistoličkog/dijastoličkog tlaka pri prijemu i po porodu nisu se značajno razlikovale ovisno o genotipu majke u preeklamptičnoj skupini.
4. Trajanje trudnoće i porodna težina djeteta bile su statistički značajno manje u preeklamptičnoj odnosu na usporednu skupinu.

5. Kod preeklampptičnih trudnica koje su rodile prije 34. tjedna trudnoće, raspodjela D alela bila je statistički značajno viša i iznosila je 0.735 u odnosu na ostale kod kojih je iznosila 0.56 ($p=0.036$).
6. Preeklampptične trudnice koje nose DD genotip, imaju oko 2.5x veći rizik poroda prije 34. tjedna trudnoće, u odnosu na trudnice s DI i II genotipom.
7. Pojavnost DD genotipa u skupini trudnica koje su imale preeklampsiju u prethodnoj trudnoći bila je statistički značajna, a udio D alela iznosio je 0.83 ($p=0.01$).
8. Rizik ponavljanja preeklampsije kod trudnice koja nosi DD genotip je oko sedam puta veći, u odnosu na trudnice koje nose II ili ID genotip.
9. Nismo našli statistički značajnu svezu između pojavnosti određenog genotipa i intrauterinog zastoja rasta ploda u preeklampptičnoj skupini.

Delecijski polimorfizam angiotenzin I-konvertirajućeg enzima nema direktnu značajnu ulogu u razvoju preeklampsije, međutim određene pozitivne sveze se ne mogu u potpunosti isključiti. Naše istraživanje pokazalo je statistički značajnu pozitivnu svezu između pojavnosti D alela i delecijskog genotipa i rizika razvoja opetovane preeklampsije i poroda prije 34. tjedna trudnoće kod preeklampptičnih trudnica. U ovakvim slučajevima delecijski genotip mogao bi biti dodatni čimbenik rizika, koji djeluje sinergistički s drugim genskim polimorfizimima, povećavajući rizik razvoja preeklampsije.

7. SAŽETAK

ZNAČAJ GENOTIPIZACIJE POLIMORFIZMA ANGIOTENZIN I-KONVERTIRAJUĆEG ENZIMA KAO MOLEKULARNOG BILJEGA TRUDNOĆOM POTAKNUTE HIPERTENZIJE

Uvod. Abnormalni procesi nastajanja i modeliranja krvnih žila vode razvoju preeklampsije. Moduliranje genske ekspresije mogu uzrokovati polimorfizmi kandidatnih gena koji sudjeluju u reguliranju krvnog tlaka, kao što su geni reninsko-angiotenzinskog sustava. Insercijsko/delecijski polimorfizam angiotenzin I-konvertirajućeg enzima, ima značajnu ulogu u patogenezi velikog broja poremećaja funkcije endotelnih žila i patogenezi nekoliko oblika eksperimentalne i humane hipertenzije.

Cilj istraživanja bio je utvrditi probirni značaj insercijsko/delecijskog polimorfizma angiotenzin I-konvertirajućeg enzima kao mogućeg čimbenika rizika razvoja hipertenzije u trudnoći; odrediti pojavnost I i D alela u preeklamptičnoj i usporednoj skupini trudnica i usporediti ove dvije skupine prema ishodu, trajanju trudnoće, paritetu, dobi, indeksu tjelesne težine, porodnoj gestacijskoj dobi i porodnoj težini djeteta.

Metode. Genomska DNA izolirana je iz pune krvi 60 preeklamptičnih trudnica i 50 normotenzivnih trudnica. Preeklampsija se definira kao krvni tlak viši od 140/90 mmHg u odnosu na vrijednosti prije trudnoće i proteinurija >300mg/l tijekom 24 sata nakon 20 tjedana trudnoće. Genotipizacija insercijsko/delecijskog polimorfizma unutar introna 16 ACE gena provela se metodom lančane reakcije polimeraze i vizualizacijom elektroforezom u gelu agaroze. Usporedba genotipova i pojavnosti alela provela se Mantel-Haenszelovim χ^2 testom.

Rezultati. Raspodjela I i D alela ACE polimorfizma između usporedne i preeklampsijske skupine nije se statistički razlikovala. Zastupljenost trudnica s DD genotipom u preeklampsijskoj skupini je veća, ali ne statistički značajna, i iznosi 43.3%, dok 28% normotenzivnih trudnica ima isti genotip ($p=0.096$). Kod preeklampsijskih trudnica koje su rodile prije 34. tjedna trudnoće, raspodjela D alela bila je statistički značajno viša i iznosila je 0.735 u odnosu na ostale ($p=0.036$). U preeklampsijskoj skupini trudnica koje su i u prethodnoj trudnoći imale preeklampsiju udio D alela iznosio je 0.83 ($p=0.01$). Nismo našli statistički značajnu razliku između pojavnosti određenog genotipa i intrauterinog zastoja rasta ploda u preeklampsijskoj skupini.

Zaključci. Delecijski polimorfizam nema direktnu ulogu u razvoju preeklampsije, međutim određene pozitivne sveze se ne mogu u potpunosti isključiti. Naše istraživanje je pokazalo statistički značajnu pozitivnu svezu između pojavnosti D alela I rizika razvoja preeklampsije u sljedećoj trudnoći kod trudnica koje su u prethodnoj trudnoći imale preeklampsiju i poroda prije 34. tjedna trudnoće kod preeklampsijskih trudnica. U ovakvim slučajevima delecijski genotip mogao bi biti dodatni čimbenik rizika, koji djeluje sinergistički s drugim genskim polimorfizmima, povećavajući rizik razvoja preeklampsije.

8. SUMMARY

THE SIGNIFICANCE OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME GENE POLYMORPHISM AS A MOLECULAR MARKER OF PREGNANCY-INDUCED HYPERTENSION

Introduction. Abnormal process of formation and remodeling of uteroplacental blood vessels contribute to the development of preeclampsia. Deficient placentation can be caused by polymorphism-induced altered expression in renin-angiotensin system genes, which are the main factors regulating blood pressure and fluid and electrolyte balance. Insertional/deletional polymorphism of angiotensin I-converting enzyme has an important role in pathogenesis of wide variety of diseases that exhibit endothelial dysfunction and several forms of experimental and human hypertension.

Aim of this study was to determine the significance of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme as a contributing factor in the development of preeclampsia, the D and I allele frequencies in preeclamptic and control group, and to compare them according to the pregnancy outcome, duration of pregnancy, parity, maternal age, body mass index, gestational age at delivery and birth weight.

Methods. Genomic DNA was extracted from whole blood of 60 preeclamptic and 50 normotensive pregnant women. Preeclampsia was defined as the development of blood pressure exceeding 140/90 mmHg in a previously normotensive woman with proteinuria >300mg/l in a 24-hour collection after 20 weeks of pregnancy. Gene polymorphism was studied by the polymerase chain

reaction followed by the agarose electrophoresis. Genotype and allele frequencies were compared by Mantel-Haenszel χ^2 testing.

Results. The D and I allele frequency between preeclamptic and control group was not statistically significant. The rate of DD genotype was slightly increased but not significantly in preeclampsia (43.3%) compared with 28% in controls ($p=0.096$). The D allele frequency was 0.735 in preeclamptic patients who required delivery before 34 weeks of pregnancy, which was statistically significant compared to the women in whom obstetric complications took place after 34 weeks of pregnancy ($p=0.036$). The D allele prevalence was 0.83 in women who had both in the previous and successive pregnancy preeclampsia ($p=0.01$). There was no significant difference between genotype distribution and observed fetal growth retardation in preeclamptic group.

Conclusions. Deletion polymorphism is unlikely to play a major role in the development of preeclampsia, although moderate positive associations cannot be rule out. This study found a significantly positive correlation between D allele frequency and risk of recurrent preeclampsia and required delivery before 34 weeks of pregnancy in preeclamptic women. In such cases, the deletion genotype could be an additional risk factor, acting synergistically with other gene polymorphisms to increase the risk of preeclampsia.

9. POPIS LITERATURE

1. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. U: Laragh JH, Brenner BM: Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management, pp. 81-100. New York, Raven Press, 1990.
2. Corvol P, Soubrier F, Jeunemaitre X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *Path Biol* 1997;45:229-39.
3. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group On Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension* 2003;41:437-45.
4. Broughton Pipkin F. What is the place of genetics in the pathogenesis of pre-eclampsia? *Biol Neonate*. 1999 Dec;76(6):325-30.
5. Lachmeijer AMA, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 2002;105:94-113.
6. Von Thun AM, El-Dahr SS, Vari RC, Navar LG. Modulation of renin-angiotensin and kallikrein gene expression in experimental hypertension. *Hypertension* 1994;23 (suppl 1):I131-6.
7. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme: two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377-83.
8. Soubrier F, Alhenc-Gelas, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:9386-90.

9. Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet* 1999;22:59-62.
10. Sugimura K, Tian X-L, Hoffmann S, Ganten D, Bader M. Alternative splicing of the mRNA coding for the human endothelial angiotensin-converting enzyme: A new mechanism for solubilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:466-72.
11. Baudin B. New aspects of angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(3):256-265.
12. Pauls K, Metzger R, Steger K, Klonisch T, Danilov S, Franke FE. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia* 2003;35(1):32-43.
13. Ehlers MRW, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: The testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7741-45.
14. Howard TE, Shai S-Y, Langford KG, Martin BM, Bernstein KE. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol Cell Biol* 1990;1990:4294-4302
15. Hagan JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2552-7.
16. Shen M, Batzer M, Deininger P. Evolution of the master Alu gene(s). *J Mol Evol* 1991;33:311-20.
17. Novick GE, Batzer MA, Deininger PL, Herres RJ. The mobile genetic element Alu in the human genome. *Bio Science* 1996;46:32-41.

18. Liu W-M, Maraia RJ, Rubin CM, Schmid CW. Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation of DNA methylation. *Nucleic Acids* 1994;22:1087-95.
19. Li W-H, Gu Z, Wang H, Nekrutenko A. Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 2001;409:847-9.
20. Nekrutenko A, Li W-H. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet* 2001;17(11):619-21.
21. Miki Y, Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto T, Nakamura Y. Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat genet* 1996;13:815-7.
22. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caliguri MA. The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:2390-5.
23. Wallace MR, Anderson LB, Saulino AM, Gregory PE, Glover TW, Collins FS. A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 1991;353:864-6.
24. Muratani K, Hada T, Higashino K. Gene analysis of human cholinesterase variants. *Nippon Rinsho* 1993;51:495-500.
25. Kitamura H, Moriyama T, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E. Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: Potential significance in nephrology. *Kidney Int Suppl* 1996;55:S101-S103.
26. Pousi B, Hautala T, Heikkinen J, Pajunen L, Kivirikko KI, Myllyla R. Alu-Alu recombination results in a duplication of seven exons in the lysyl hydroxylase gene in a patient with the type VI variant of Ehlers-Danlos syndrome. *Am J Hum genet* 1994;55:899-906.

27. Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet* 1994;10:188-93.
28. Barnett TR, Drake L, Pickle W. Human biliary glycoprotein gene: Characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:1273-82.
29. Makalowski W. Genomic scrap yard: How genomes utilize all that junk. *Gene* 2000;259:61-7.
30. Sorek R, Ast G, Graur D. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Gen Res* 2002;12(7):1060-7.
31. Stenger JE, Lobachev KS, Gordenin D, Darden TA, Jurka J, Resnick MA. Biased distribution of inverted and direct Alus in the human genome: Implications for insertion, exclusion, and genome stability. *Gen Res* 2001;11(1):12-27.
32. Deininger PL, McDonnell DP. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers. *JBC* 1995;270:22777-82.
33. Britten RJ. Mobile elements inserted in the distant past have taken on important functions. *Gene* 1997;205:177-82.
34. Roy-Engel AM, Carroll ML, Vogel E, Garber RK, Nguyen SV, Salem A-H, Batzer MA, Deininger PL. Alu insertion polymorphisms for the study of human genomic diversity. *Genetics* 2001;159:279-90.
35. Lester T, McMahon C, Van Regenmortel N, Jones A, Genet S. X-linked immunodeficiency caused by insertion of Alu repeat sequences. *J Med Gen* 1997; 34(Suppl 1):S81.

36. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambon JP, Arvelier D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S. Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
37. Vidaud D, Vidaud M, Bahnak BR, Siguret V, Gispert Sanchez S, Laurian Y, Meyer D, Goossens M, Lavergne JM. Haemophilia B due to a de novo insertion of a human-specific Alu subfamily member within the coding region of the factor IX gene. *Eur J Hum Genet* 1993;1:30-6.
38. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Sampson D, Vincent C, Levi-Acobas F, Cruaud C, Le Merrer M, Mathieu M, König R, Vigneron J, Weissenbach J, Petit C, Weil D. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. *Hum Mol Genet* 1997;6:2247-55.
39. Stoppa-Lyonnet D, Carter PE, Meo T, Tosi M. Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:1551-5.
40. Zhang Y-H, Huang B-L, Finlayson G, Deininger PL, McCabe ERB. Alu Sx insertion in a patient with benign glycerol kinase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998;68(Suppl):A995.
41. Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AO. De novo Alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1999;65:446-61.
42. Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, De SV, Leone G, Thein SL. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: Evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* 1993;82:4216-4224.

43. Hu XY, Ray PN, Worton RG. Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 1991;10:2471-7.
44. Marcus S, Hellgran D, Laumbert B, Fallstrom SP, Wahlstrom J. Duplication in the hypoxanthine phosphoribosyl-transferase gene caused by Alu-Alu recombination in a patient with Lesch Nyhan syndrome. *Hum genet* 1993;90:477-82.
45. Hori T, Tomatsu S, nakashima Y, Uchiyama A, fukuda S, Sukegawa K, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Horiuchi T. Mucopolysaccharidosis type IVA: Common double deletion in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (GALNS). *Genomics* 1996;26:585-642.
46. Huang LS, Ripps ME, Korman SH, Deckelbaum RJ, Brealow JL. Hypobetalipoproteinemia due to an apolipoprotein B gene exon 21 deletion derived by Alu-Alu recombination. *J Biol Chem* 1989;264:11394-400.
47. 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 the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343-6.
48. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells. Genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993;290:33-40.
49. Gast MJ, Rigg LA, Amyx CL, Kessler G. Constancy of serum angiotensin-converting enzyme activity in normal and complicated pregnancy. *J Perinat Med* 1987;15:263-9.
50. Lee MI, Bottoms SF, Sokol RJ, Todd HM. Angiotensin converting enzyme activity in hypertensive pregnancy. *J Perinat Med.* 1987;15:258-62.

51. Goldkrand JW, Fuentes AM. The relation of angiotensin-converting enzyme to the pregnancy-induced hypertension-preeclampsia syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1986 Apr;154:792-800.
52. Cugini P, Letizia C, Di Palma L, Battisti P, Caserta D, Moscarini M, Scavo D. Serum angiotensin-converting enzyme activity in pre-eclamptic pregnancy: evidence for a relative hypermesorACEemia. *Enzyme.* 1990;43:113-21.
53. Li J, Hu HY, Zhao YN. Serum angiotensin-converting enzyme activity in pregnancy-induced hypertension. *Gynecol Obstet Invest.* 1992;33:138-41.
54. Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, LorellBH, Riegger GAJ. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994;330:1634-8.
55. Arnett DK, Borecki IB, Ludwig EH, Pankow JS, Myers R, Evans G, Folsom AR, Heiss G, Higgins M. Angiotensinogen and angiotensin converting enzyme genotypes and carotid atherosclerosis: the atherosclerosis risk in communities and the NHLBI family heart studies. *Atherosclerosis* 1998;138:111-6.
56. Morris BJ, Zee RY, Shrader AP. Different frequencies of angiotensin-converting enzyme genotypes in older hypertensive individuals. *J Clin Invest* 1994;94:1085-9.
57. Penno G, Chaturvedi N, Talmud PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M, Luong LA, Fuller JH. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients: findings from the EUCLID Randomized Controlled Trial. *EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in IDDM. Diabetes* 1998;47:1507-11.

58. Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens* 1998;16:37-44.
59. Tamura T, Johanning GL, Goldenberg RL, 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.
60. Zhu M, Xia Y, Cheng W. [Study on a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in pregnancy induced hypertension]. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih*. 1998 Feb;33(2):83-5 (Abstract).
61. Zhou N, Yu P, Chen J, Huang H, Jiang S. [Detection of insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in preeclampsia]. *Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih* 1999;16:29-31 (Abstract).
62. Choi H, Kang Y, Yoon HS, Han SS, Whang CS, Moon IG, Shin H-H, Park JB. Association of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphism with preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2004;19:253-7.
63. Wang HY, Li CM, Wang Z, Yang F. Relationships between polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase genes and genetic susceptibility to pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004;39(6):369-72 (Abstract).
64. Bai H, Liu X, Liu R, Liu Y, Li M, Liu B. Angiotensinogen and angiotensin I-converting enzyme gene variations in Chinese pregnancy induced hypertension. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue BAo* 2002;33(2);233-7 (Abstract).

65. Huang Y, Liao B, Sun X. Study on the relationship between the angiotensin converting enzyme gene and pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2001;36(1):15-7.
66. Kim YJ, Park MH, Park HS, Lee KS, Ha EH, Pang MG. Associations of polymorphisms of the angiotensinogen M235 polymorphism and angiotensin-converting enzyme intron 16 insertion/deletion polymorphism with preeclampsia in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 2004;116:48-53.
67. Nalogowska-Glosnicka K, Lacka B, Zychma M, Grzeszczak W, Michalski B, Poreba R, Kniazewski B, Rzempoluch J. [Lack of relationship between angiotensinogen gene m235t polymorphism and gene insertion/deletion (I/D-intron 16) and Pst I RFLP (P/M-intron 7) polymorphisms of the angiotensin I converting enzyme(ACE) gene and the development of H-gestosis. Preliminary results]. *Pol Arch Med Wewn* 1998;100:19-26 (Abstract).
68. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Chmara E, Mrozikiewicz A. Polymorphism of gene angiotensin converting enzyme in pregnancy induced hypertension. *Ginecol Pol* 2001;72(8):605-10.
69. Morgan L, Foster F, Hayman R, Crawshaw S, Baker PN, Pipkin FB, Kalsheker N. Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *J Hypertens* 1999;17:765-8.
70. Bouba I, Makrydimas G, Kalaitzidis R, Lolis DE, Siamopoulos KC, Georgiou I. Interaction between the polymorphisms of the rennin-angiotensin system in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 2003;110:8-11.
71. Roberts CB, Rom L, Moodley J, Pegoraro RJ. Hypertension-related gene polymorphisms in pre-eclampsia, eclampsia and gestational hypertension in Black South African women. *J Hypert* 2004;22:945-8.

72. Gurdol F, Isbilen E, Yilmaz H, Isbir T, Dirican A. The association between preeclampsia and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Chim Acta* 2004;341:127-31.
73. Kaur R, Jain V, Khuller M, Gupta I, Sherawat BS. Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with pregnancy-induced hypertension. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005. 84. 929-33.
74. MacConnachie AA, Kelly KF, McNamara A, Loughlin S, Gates LJ, Inglis GC, Jamieson A, Conell JMC, Haites NE. Rapid diagnosis and identification of crossover sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. *J Clin Endocr Metab* 1998;83:4328-31.
75. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nature Genet* 1995;11:76-82.
76. Carvajal CA, Gonzales AA, Romero DG, Gonzales A, Mosso LM, Lagos ET, Hevia MP, Rosati MP, Perez-Acle TO, Gomez-Sanchez CE, Montero JA, Fardella CE. Two homozygous mutations in the 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocr Metab* 2003;88:2501-7.
77. Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard J-M, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001;293:1107-12.
78. Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton

- RP. Multilocus linkage of familial hyperkalaemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosome 1q31-42 and 17p11-q21. *Nature Genet* 1997;16:202-5.
79. Cross JC. The genetics of preeclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003;64:96-103.
80. Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998;32:683-7.
81. Cross JC. Trophoblast function in normal and preeclamptic pregnancy. *Fet Mat Med Rev* 1996;53-6.
82. Squires P, Kennedy T. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. *J Reprod Fertil* 1992;95:791-802.
83. Roberts JM, Lain KY. Recent insights into pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002;23:359-72.
84. Caron KM, James LR, Kim HS, Morham SG, Sequeira LML, Gomez RA, Reudelhuber TL, Smithies O. A genetically clamped renin transgene for the induction of hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8248-52.
85. Kalenga MK, Thomas K, De Gasparo M, De Hertogh R. Determination of renin, angiotensin converting enzyme and angiotensin II levels in human placenta, chorion and amnion from women with pregnancy induced hypertension. *Clin Endocrinol* 1996;44:429-33.
86. Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:335-40.
87. Israel A, Peceno A. Renin-angiotensin-aldosterone system in pregnancy-induced hypertension. *J Hum Hypertens* 2000;14 Suppl 1:S36-9.
88. Knock GA, Sullivan MHF, McCarthy A, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Angiotensin II (AT₁) vascular binding sites in human placentae from normal-

term preeclamptic and growth retarded pregnancies. *J Pharmacol Exp Therap* 1994;271:1007-15.

89. National high blood pressure education program: Working group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:51-60.
90. Sertić J, Hebrang D, Januš D, Salzer B, Nikšić M, Čvorišec D, Stavljenić-Rukavina A. Association between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cerebral atherosclerosis. *Eur J Clin Chem Biochem* 1996;34:301-4.
91. Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli Gianfranco, Genuardi M, Abbate Rossana, Fatini C. Maternal-fetal flow, negative events and preeclampsia: Role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension* 2003;41: 932-7.
92. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. *J Clin Invest* 1993;91:2058-64.
93. Shotan A, Widexhorn L, Hurst A. Risks of angiotensin converting enzyme inhibition during pregnancy, experimental and clinical evidence, potential mechanisms, and recommendations for use. *Am J Med* 1994;96:451-6.
94. Lowe SA, Rubin PC. The pharmacological management of hypertension in pregnancy. *J Hypertens*. 1992 Mar;10(3):201-7.
95. Makris TK, Stavroulakis GA, Dafni UG, Gialeraki AE, Krespi PG, Hatzizacharias AN, Tsoukala CG, Vythoulkas JS, Kyriakidis MK. ACE/DD genotype is associated with hemostasis balance disturbances reflecting hypercoagulability and endothelial dysfunction in patients with untreated hypertension. *Am Heart J* 2000;140:760-5.

96. Ito M, Itakura A, Ohno Y, Nomura M, Senga T, Nagasaka T, Mizutani S. Possible activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 87 1871-8.
97. Wallenburg HCS, Visser W. Pregnancy-induced hypertensive disorders. *Curr Opin Obstetr Gynecol* 1994;6:19-29.
98. Baudin B. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(9):853-6.
99. Chu W-M, Ballard R, Carpick BW, Williams BRG, Schmid CW. Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol Cell Biol* 1998;18(1):58-68.
100. Comas D, Plaza S, Calafell F, Sajantila A, Bertranpetit J. Recent insertion of an Alu element within a polymorphic human-specific alu insertion. *Mol Biol Evol* 2001;18(1):85-8.
101. Roden DM, Brown NJ. Prescription genotyping. *Circulation* 2001;103:1608-10.
102. Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. Clinical pharmacokinetics of vasodilators.. *Clin Pharmacokinet* 1998;34(6):457-82.
103. Mello G, Parretti E, Fatini C, Riviello C, Gensini F, Marchionni M, Scarselli GF, Gensini GF, Abbate R. Low-molecular-weight heparin lowers the recurrence rate of preeclampsia and restores the physiological vascular changes in angiotensin-converting enzyme DD women. *Hypertension* 2005;45:86-91.
104. Norris J, Fan D, Aleman C, Marks JR, Futreal PA, Wiseman RW, Iglehart JD, O'Byrne S, Caulfield M. Genetic of hypertension: therapeutic implications. *Drugs* 1998;56(2):203-14.
105. Deininger P, Batzert MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metabol* 1999;67:183-98.

106. McInnes RR, Michaud J. Developmental biology; Frontiers for clinical genetics. Clin Genet 2003;64:96-103.
107. Jain L, Ferre C, Vidyasagar D. Racial differences in outcome of pregnancies complicated by hypertension. J Matern Fet Med 1998;7:23-7.
108. Mathew J, Basheeruddin K, Prabhakar S. Differences in frequency of the deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in different ethnic groups 2001;;52:375-9.
109. Peters J. Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1995 Jul;9(3):657-78.
110. Steeds RP, Toole LO, Channer KS, Morice AH. Human vascular reactivity and polymorphisms of the angiotensin converting enzyme and the angiotensin type 1 receptor genes. J Vasc Res 1999;36:445-55.

Dostupne baze podataka na internetu:

Angiotensin-converting enzyme (Genebank accession #X62855 and #J04144)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

www.dgkc-online.de

www.medizinische-genetic.de

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Feodora Stipoljev

Datum rođenja: 6. 8. 1969.

Mjesto rođenja: Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: A. Stipančića 24, Zagreb

Tel. 3851 3833 277

Adresa (posao): Odsjek za citogenetiku

Zavod za patologiju, citologiju i citogenetiku

Opća bolnica "Sveti Duh"

Sveti Duh 64, Zagreb

Tel. (385)1 3712273

Fax. (385)1 374 55 34

NAOBRAZBA

1994-1999

Poslijediplomski studij medicinske genetike na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Obrana magistarskog rada na poslijediplomskom studiju medicinske genetike Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom "Učinak folikularne

tekućine na rast, klonsku raznolikost i pojavu pseudomozaicizma u kulturi stanica plodove vode”, mentor. Prof. dr. Višnja Latin

svibanj 1996-...

sudjelovanje na projektu “Posteljica i intrauterini zastoj rasta ploda”, voditelj projekta Prof. dr. Đ: Grbeša, Zavod za histologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao stručni suradnik

1. studeni 1995- 1. prosinac 1995

jednomjesečno stručno usavršavanje u Općoj bolnici u Beču na Zavodu za prenatalnu dijagnostiku zahvaljujući stipendiji Ministarstva znanosti Republike Austrije. U laboratoriju se pored rutinskih citogenetskih metoda rabe i tehnike molekularne genetike za otkrivanje genskih bolesti. Radila sam na izolaciji DNA iz korionskih resica, stanica plodove vode i krvi , te sam naučila PCR-tehniku detekcije Rh čimbenika i Y kromosoma iz kulture stanica plodove vode. Uz to sam radila na izolaciji RNA i metodi Northern blotting koja se koristi za detekciju nositelja i oboljelih od tuberozne skleroze.

1988- 1993

Studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

prosinac 1993- lipanj 1994

volonterski rad na međunarodnom projektu “Subspecifične metode izolacije kožnih patogena” u okviru ALIS programa (The Academic Links and Interchange Scheme) na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

1994- ...

radno mjesto Voditelja Odsjeka za citogentiku, Zavoda za patologiju, citologiju i citogenetiku Opće bolnice “Sveti Duh”