

Polimorfizm insercyjno-delecyjny genu kodującego konwertazę angiotensyny u chorych z udarem mózgu

Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme encoding gene in stroke patients

Barbara Gawel¹, Andrzej Wajgt¹, Sabina Gałka², Joanna Głogowska-Ligus², Urszula Mazurek², Joanna Pilsch-Kowalczyk³

¹Klinika Neurologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

²Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

³Zakład Radiodiagnostyki SPCSK Katedry Radiologii Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Streszczenie

Wstęp. Celem badań autorów było określenie i porównanie częstości występowania wariantów polimorficznych insercji/delecji genu kodującego konwertazę angiotensyny u chorych z niedokrwiennym i krwotocznym udarem mózgu, z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia.

Materiał i metody. Analizie poddano DNA z krwi obwodowej 87 pacjentów z ostrym udarem mózgu, niedokrwiennym i krwotocznym, w wieku 30–65 lat. Udar mózgu rozpoznawano na podstawie ogniskowych objawów neurologicznych trwających ponad 24 godziny, potwierdzonych w badaniu radiologicznym obrazowania tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego głowy. Grupę kontrolną tworzyli ochotnicy — 45 osób, w wieku 30–65 lat. Genotyp ACE badano metodą polimerazy łańcuchowej (PCR, *polimerase chain reaction*).

Wyniki. Badając polimorfizm insercyjno/delecyjny genu kodującego konwertazę angiotensyny, autorzy uzyskali następujące wyniki — w grupie udarów niedokrwiennych: II — 18,2%; ID — 60,6%; DD — 21,2% w grupie udarów krwotocznych: II — 23,8%; ID — 42,9%, DD — 33,3% oraz w grupie kontrolnej: II — 24,5%; ID — 42,2%, DD — 33,3%.

Wnioski. Zarówno wyniki autorów, jak i wnioski większości badaczy wskazują na brak korelacji między typem polimorfizmu ACE a występowaniem udaru mózgu. Polimorfizm ten nie odgrywa znaczącej roli w patogenezie udarów mózgu.

Słowa kluczowe: udar mózgu, konwertaza angiotensyny, ACE, polimorfizm genu

Abstract

Background. The objective of the study was to determine and compare the frequency of occurrence of polymorphic insertion/deletion (I/D) variants of the angiotensin-converting encoding gene in patients with ischemic and haemorrhagic stroke, with or without arterial hypertension.

Material and methods. DNA from peripheral blood of 87 patients with recent cerebral stroke, aged 30 to 65, was analysed. The cerebral stroke was diagnosed on the basis of focal neurological symptoms persisting for more than 24 hours, confirmed by CT or NRM imaging. The control group consisted of 45 volunteers aged 30 to 65. ACE genotype was examined using PCR.

Results. Investigation of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting encoding gene gave the following results: in the ischemic stroke group: II — 18.2%, ID — 60.6%, DD — 21.2%, in haemorrhagic stroke: II — 23.8%, ID — 42.9%, DD — 33.3%, in the control group: II — 24.5%, ID — 42.2%, DD — 33.3%.

Conclusions. Our results, like the conclusions of most researchers, point to absence of relationship between the type of ACE polymorphism and the prevalence of cerebral stroke. This polymorphism plays no major role in the pathogenesis of cerebral stroke.

Key words: cerebral stroke, angiotensin-converting enzyme, ACE, gene polymorphism

Wstęp

Udary mózgu od wielu lat są priorytetowym tematem badawczym. W ostatnim 10-leciu szczególne zainteresowanie budzi podłoże genetyczne udarów, między innymi rola polimorfizmu genów, których produkty białkowe są zaangażowane w mechanizmy działania układu renina-angioten-

Adres do korespondencji:

Dr med. Barbara Gawel
Klinika Neurologii SIAM
ul. Medyków 14, 40–578 Katowice
e-mail: barbara.111150@wp.pl; Barbara1316177@yahoo.pl
Praca wpłynęła do Redakcji: 7 lutego 2007 roku
Zaakceptowano do druku: 14 czerwca 2007 roku

syna. Szczególne zainteresowanie wzbudził polimorfizm insercyjno-delecyjny (I/D) genu kodującego konwertazę angiotensyny (ACE, *angiotensin-converting enzyme*). Enzym ten jest dipeptydylokarboksypeptydazą przekształcającą angiotensynę I (Ang I) w angiotensynę II (Ang II) oraz inaktywującą bradykininę [1].

W 1990 roku Rigat i wsp. wykryli istnienie polimorfizmu w okolicy 3' 16 intronu genu dla ACE, zlokalizowanego w prążku q23 chromosomu 17. Homozygoty DD wykazują 2-krotnie wyższą aktywność enzymu w osoczu niż homozygoty II, natomiast heterozygoty ID wykazują pośrednie wartości aktywności. Odsetek osób z wysoką aktywnością konwertazy w surowicy (> 40 nmol/min) jest znacząco większy u chorych na nadciśnienie tętnicze niż u osób zdrowych [2]. Wyniki uzyskane przy oznaczaniu aktywności enzymu w hodowlach komórkowych i homogenatach fragmentów serc ludzkich wskazują, że allel D warunkuje podwyższoną aktywność ACE nie tylko w osoczu, ale również w tkankach [3].

Celem badań autorów było określenie i porównanie częstości występowania wariantów polimorficznych insercji/delecji (I/D) genu kodującego ACE u chorych z niedokrwinnym i krwotocznym udarem mózgu, z nadciśnieniem tętniczym i bez tego schorzenia oraz odpowiedzi na pytanie, czy polimorfizm genu kodującego ACE może mieć znaczenie w patogenezie udarów mózgu.

Materiał i metody

Materiał do badań oraz dane dotyczące choroby zebrano od pacjentów leczonych w Klinice Neurologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach Ligocie. Analizie poddano DNA z krwi obwodowej chorych, u których udar mózgu rozpoznawano na podstawie ogniskowych objawów neurologicznych trwających ponad 24 godziny, potwierdzonych w badaniu radiologicznym obrazowania tomografii komputerowej lub rezonansu magnetycznego. Przebadano 87 pacjentów, 34 kobiety i 53 mężczyzn, w wieku 37–65 lat. Chorych podzielono na 2 grupy — z udarem niedokrwinnym oraz z udarem krwotocznym, a każdą z nich na 2 podgrupy — z nadciśnieniem tętniczym i bez nadciśnienia. Grupa osób z udarem niedokrwinnym i nadciśnieniem tętniczym liczyła 46 chorych, w tym 20 kobiet oraz 26 mężczyzn, w wieku 41–65 lat, zaś bez nadciśnienia tętniczego — 20 osób, 6 kobiety i 14 mężczyzn, w wieku 47–65 lat. Grupa chorych z udarem krwotocznym i nadciśnieniem tętniczym liczyła 16 osób, 7 kobiet i 9 mężczyzn, w wieku 38–65 lat, zaś bez nadciśnienia tętnicze-

go — 5 chorych, 2 kobiety i 3 mężczyzn, w wieku 37–65 lat. Grupę kontrolną tworzyli ochotnicy — 45 osób, 27 kobiet i 18 mężczyzn, w wieku 31–65 lat, wybrani losowo z rejonu zamieszkania chorych z udarem mózgu. Warunkiem włączenia do grupy kontrolnej był negatywny wywiad w kierunku schorzeń neurologicznych, przede wszystkim brak przebytych udarów mózgu i zespołów przemijającego niedokrwienia mózgu. W grupie tej było 12 osób z nadciśnieniem tętniczym — 3 kobiety i 8 mężczyzn.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA, *deoxyribose nucleic acid*) z krwi obwodowej ekstrahowano metodą enzymatyczną przy użyciu zestawu do izolacji DNA z krwi: "Blood DNA Prep Plus" firmy Biotechnology. Badanie polimorfizmu wykonano techniką PCR (*polymerase chain reaction*), czyli łańcuchowej reakcji syntezy specyficznych fragmentów DNA z polimerazą termostabilną. Skład mieszaniny do reakcji PCR był następujący: $1 \times$ bufor PCR (200 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH+8,4), 1,5 mM chlorku magnezu, $1 \times$ wzmacniacz, po 200 μ M dNTP, po 100 pmol ACE *starter forward* (5' ctag gag acc act ccc atc ctt tct 3') i *reverse* (5' atg tgg cca tca cat tcg tca gat3'), 2,5 U polimeraza DNA Tfl.

Reakcje amplifikacji prowadzono w amplifikatorze Perkin Elmer 9600, stosując następujące warunki termiczne (*hot start*): wstępna denaturacja w 94°C przez 4 minuty, 2 trójstopniowe cykle: w 94°C przez 40 sekund, w 65°C przez minutę, w 72°C przez minutę, następnie 2 trójstopniowe cykle: w 94°C przez 40 sekund, w 63°C przez minutę, w 72°C przez minutę, następnie 2 trójstopniowe cykle: w 94°C przez 40 sekund, w 61°C przez minutę, w 72°C przez minutę, następnie 25 trójstopniowych cykli: w 94°C przez minutę, w 60°C przez minutę, w 72°C przez minutę i końcowe wydłużenie w 72°C przez 10 minut.

Detekcje produktów amplifikacji wybranego regionu genu ACE wykonano techniką elektroforetyczną w 8-procentowym żelu poliakrylamidowym i barwiono metodą srebrową. Otrzymane elektroforeogramy analizowano w systemie dokumentacji żelowej firmy Biotec-Fisher, wykorzystując program komputerowy SAS-SYS ID w celu oceny liczby par zasad produktu PCR. Fragment o długości 490 par zasad odpowiada allelowi I, natomiast prążek o długości 190 par zasad — allelowi-D. Badanie DNA heterozygoty ID uwidacznia się w postaci 2 prążków o długości 190 i 490 par zasad.

Za pomocą testu niezależności χ^2 sprawdzono hipotezy zależności występowania udarów mózgu od czynników ryzyka oraz badanych typów polimorfizmów genetycznych. Analizę statystyczną

Tabela I. Liczba i odsetek badanych z uwzględnieniem typu polimorfizmu insercyjno-delecyjnego (I/D) genu kodującego enzym konwertujący angiotensynę (ACE)

Table I. Number and percentage of subjects vs. type of insertion/deletion (I/D) polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) encoding gene

Polimorfizm I/D genu ACE <i>Polymorphism I/D of the ACE gene</i>	Liczba pacjentów oraz wartość w % <i>Number and percentage of patients</i>			
	Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Chorzy <i>Patients</i>	Udar niedokrwienny <i>Ischemic stroke</i>	Udar krwotoczny <i>Haemorrhagic stroke</i>
Polimorfizm II <i>Polymorphism II</i>	11 (24,5%)	17 (19,5%)	12 (18,2%)	5 (23,8%)
Polimorfizm ID <i>Polymorphism ID</i>	19 (42,2%)	49 (56,3%)	40 (60,6%)	9 (42,9%)
Polimorfizm DD <i>Polymorphism DD</i>	15 (33,3%)	21 (24,2%)	14 (21,2%)	7 (33,3%)
Razem <i>Total</i>	45 (100%)	87 (100%)	66 (100%)	21 (100%)

Tabela II. Liczba i odsetek badanych z nadciśnieniem tętniczym w grupie pacjentów z udarem mózgu i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem typu polimorfizmu insercyjno-delecyjnego ACE

Table II. Number and percentage of patients with arterial hypertension in the stroke and control group vs. type of ACE insertion/deletion polymorphism

Polimorfizm I/D genu ACE <i>Polymorphism I/D of the ACE gene</i>	Liczba pacjentów oraz wartość w % <i>Number and percentage of patients</i>			
	Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Chorzy <i>Patients</i>	Udar niedokrwienny <i>Ischemic stroke</i>	Udar krwotoczny <i>Haemorrhagic stroke</i>
Polimorfizm II <i>Polymorphism II</i>	1 (8,3%)	13 (21%)	10 (21,7%)	3 (18,7%)
Polimorfizm ID <i>Polymorphism ID</i>	6 (50%)	33 (53,2%)	26 (56,6%)	7 (43,8%)
Polimorfizm DD <i>Polymorphism DD</i>	5 (41,7%)	16 (25,8%)	10 (21,7%)	6 (37,5%)
Razem <i>Total</i>	12 (100%)	62 (100%)	46 (100%)	16 (100%)

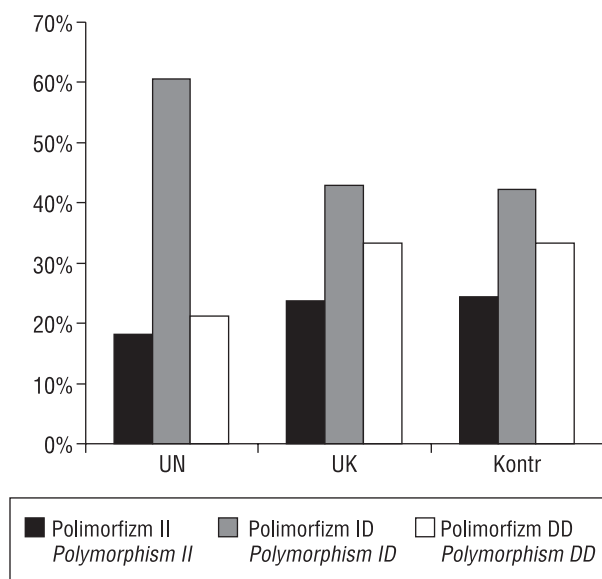
wyników przeprowadzono na poziomie istotności p mniejszego lub równego 0,05.

Wyniki

Częstość 3 typów polimorfizmu (II, ID, DD) enzymu ACE w grupie osób zdrowych (24,5%; 42,2%; 33,3%) i chorych z udarem mózgu (19,5%; 56,3%; 24,2%) nieznacznie się różniła niewielką procentową przewagą polimorfizmu DD w grupie kontrolnej (33,3%) w porównaniu z grupą pacjentów z udarem (24,2%). Częstość wszystkich 3 typów polimorfizmu genetycznego (II, ID, DD) w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym bez udaru mózgu (8,3%; 50%; 41,7%) i chorych na nadciśnienie z udarem mózgu (21%; 53,2%; 25,8%) różni się

mniejszym występowaniem polimorfizmu II (8,3%) w grupie kontrolnej z nadciśnieniem tętniczym i przewagą procentową DD (41,7%) w porównaniu z grupą pacjentów z udarami (II — 21%, a DD — 25,8%) (tab. I, II; ryc. 1, 2).

Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności między polimorfizmami II, ID, DD genu ACE a występowaniem udaru mózgu. Wykazano ponadto brak statystycznie istotnej zależności między typami polimorfizmu a rodzajem udaru mózgu, niedokrwiennym lub krwotocznym, w populacji z nadciśnieniem tętniczym, a także między występowaniem określonego typu polimorfizmu a nadciśnieniem. Częstość występowania wariantów polimorfizmu insercyjno-delecyjnego genu kodującego ACE w grupie pacjentów z udarem mózgu,



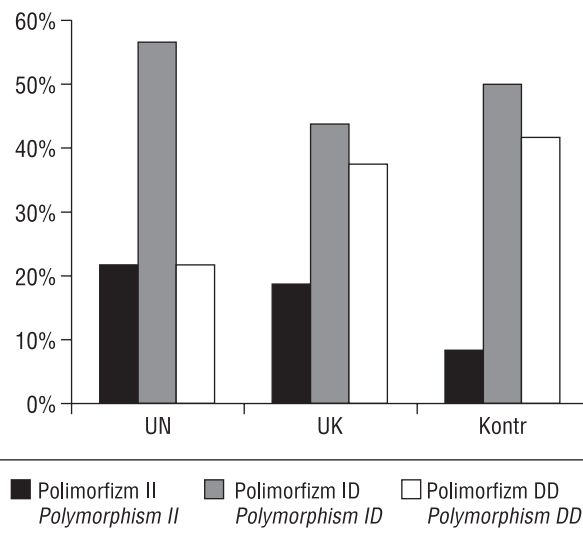
Rycina 1. Odsetek występowania polimorfizmu insercyjno-insercyjnego (II), insercyjno-delecyjnego (I/D), delecyjno-delecyjnego (DD) genu ACE w grupie pacjentów z udarem niedokrwiennym (UN), krwotocznym (UK) i w grupie kontrolnej (Kontr)

Figure 1. Occurrence of insertion/insertion (II), insertion/deletion (I/D), deletion/deletion (DD) ACE gene polymorphism in percentages in the ischemic stroke (UN), haemorrhagic stroke (UK) and control (Kontr) groups

zarówno z chorobą nadciśnieniową, jak i bez niej, nie różni się istotnie statystycznie od częstości tego polimorfizmu u osób bez udaru mózgu, z chorobą nadciśnieniową oraz bez niej.

Dyskusja

Według niektórych badaczy genotyp DD, któremu towarzyszy wyższa aktywność enzymu ACE, może być niezależnym czynnikiem ryzyka zawału serca [4], kardiomiopatii przerostowej i rozrzeniowej, nagłego zgonu sercowego [5] oraz niektórych powikłań nadciśnienia tętniczego [6]. Odmienną częstość poszczególnych alleli — wariantów polimorficznych genu ACE — obserwuje się w różnych grupach etnicznych i wiekowych. Camben (1992) jako pierwszy zauważył, że polimorfizm genu ACE może być czynnikiem ryzyka zawału serca. Mężczyzn będących homozygotami DD cechowało wyższe ryzyko wystąpienia zawału w porównaniu z innymi genotypami. Allel D okazał się czynnikiem ryzyka niezależnym od hiperlipidemii, palenia tytoniu, otyłości, nadciśnienia tętniczego i stężenia fibrynogenu w osoczu [4]. Jednak Lindpainter [7] nie potwierdził takiej zależności. W badaniach przeprowadzonych przez Gruchałę [8] u osób poniżej 50. roku życia nie potwier-



Rycina 2. Odsetek występowania polimorfizmu I/D genu ACE u osób z nadciśnieniem tętniczym w grupie pacjentów z udarem niedokrwiennym (UN), krwotocznym (UK) i w grupie kontrolnej (Kontr)

Figure 2. Occurrence of ID polymorphism of the ACE gene in the group of persons with arterial hypertension within the ischemic stroke (UN), haemorrhagic stroke (UK) and control groups (Kontr)

dowano powiązania genotypu delecyjnego genu ACE z występowaniem miażdżycy tętnic wieńcowych i nadciśnienia tętniczego oraz przebytego zawału serca. Jednak Ruiz [9] zaobserwował częstszy genotyp delecyjny u chorych z miażdżycą i cukrzycą. Varda [10] podjął próbę odpowiedzi na pytanie, czy rodzinne występowanie chorób naczyniowych serca w następnym pokoleniu jest rezultatem predyspozycji genetycznych czy raczej wynika z kontynuacji określonego stylu życia. Wyniki nie potwierdziły hipotezy, że polimorfizm ACE jest czynnikiem ryzyka chorób naczyniowych serca u dzieci, których rodzice przebyli udar w stosunkowo młodym wieku.

Celem badań autorów było określenie częstości występowania wariantów polimorficznych insercji/delecji (I/D) genu kodującego ACE w grupie chorych z udarem mózgu, niedokrwiennym i krwotocznym, oraz wyselekcjonowanie grupy wysokiego ryzyka. Wyniki autorów nie potwierdziły zależności między występowaniem udaru mózgu a polimorfizmem genu kodującego ACE. Częstość polimorfizmu I/D w grupie pacjentów z udarem wynosiła 0,52/0,48, zaś w grupie kontrolnej — 0,39/0,61. Podobne wyniki uzyskał Sharma [11], który badał grupę 100 pacjentów z udarem mózgu i porównał ją z odpowiednio dobraną pod względem płci i wieku grupą 70 osób. Częstość polimorfizmu I/D w grupie pacjentów z udarem wynosiła 0,57/0,43, natomiast w grupie kontrolnej — 0,48/0,52 i nie

była to różnica znamienista statystycznie. Nie wykazano również zależności między stężeniem ACE a genotypem DD chorych z udarem mózgu [12]. Inne wyniki uzyskał Sertic [13], który, badając polimorfizm ACE I/D w grupie pacjentów z miażdżycą naczyń mózgowych, wykazał korelację genotypu DD z wysokimi stężeniami cholesterolu frakcji LDL i triglicerydów w surowicy. W związku z tym wnioskował, że genotyp DD jest znaczącym czynnikiem rozwoju miażdżycy naczyń mózgowych. Kario w 1997 roku [14], analizując 228 przypadków udaru mózgu u Japończyków z nadciśnieniem tętniczym oraz u 104 bez nadciśnienia, stwierdził, że genotyp DD częściej występował u chorych z nadciśnieniem i udarem — aż w 138 (47%) przypadkach. Nie wykazał znamiennej różnicy między grupą z nadciśnieniem i bez udaru a kontrolną grupą osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego. Badacz ten wnioskował, że ACE DD jest znamienisty dla chorych na nadciśnienie z udarem mózgu i może być czynnikiem ryzyka rozwoju naczyniowych zespołów mózgowych w nadciśnieniu tętniczym. Tiret i wsp. [15] badali możliwości związku polimorfizmu układu renina–angiotensyna i predyspozycji do umiarkowanego i ciężkiego nadciśnienia w powiązaniu z wywiadem rodzinnym zawału serca i udaru mózgu. Nie wykazano zależności między polimorfizmem I/D genu ACE a nadciśnieniem tętniczym. Pacjentów z nadciśnieniem, dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku zawału serca i przed 60. rokiem życia cechowała częstsza delecja ACE niż pacjentów z ujemnym wywiadem (0,68 vs. 0,56; $p = 0,01$). Również częstszy polimorfizm delecyjny ACE notowano u osób z dodatnim wywiadem rodzinnym udaru mózgu w wieku poniżej 65 lat (0,66 vs. 0,57; $p = 0,05$). Według Tireta polimorfizm ACE ma znaczenie w predyspozycji do ostrego udaru mózgu. Moliaka i wsp. [16] w grupie Rosjan z niedokrwiennym udarem mózgu i bez nadciśnienia nie stwierdzili znamiennej statystycznie różnicy w występowaniu poszczególnych typów polimorficznych DD/II/ID. Sugerują, że polimorfizm I/D genu ACE nie jest czynnikiem ryzyka dla udaru mózgu u osób bez nadciśnienia tętniczego.

Seino i wsp. [17] badali inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*) oraz polimorfizm I/D w grupie 26 chorych na udar mózgu i porównywali wyniki z danymi dotyczącymi 28-osobowej grupy kontrolnej. Częstość DD była znamienne wyższa w grupie pacjentów z udarem (DD — 46,2%, ID — 34%, II — 19,2%;) niż w grupie kontrolnej (DD — 14,3%, ID — 50%, II — 35,7%). Surowicze stężenie PAI-1 nie różniło się między tymi grupami. Nie stwierdzono

zależności między polimorfizmem ACE a stężeniem PAI-1. Autorzy pracy wnioskowali, że typ polimorficzny DD jest czynnikiem ryzyka w udarach mózgu, niezależnym od surowiczego stężenia PAI-1. Kostulas i wsp. [18] badali występowanie alleli polimorfizmu I/D w udarze mózgu i zespołach sercowo-naczyniowych w grupie 68 pacjentów z udarem mózgu i stenozą tętnicy szyjnej wewnętrznej przekraczającą 50%. Wykazali znaczącą statystycznie różnicę pod względem występowania homozygot DD, zarówno w grupie chorych ze zwężoną tętnicą szyjną, jak i w grupie pacjentów z udarem. Wnioskowali, że polimorfizm DD jest czynnikiem ryzyka w rozwoju zwężenia tętnicy oraz w udarach mózgu. Peterlin i wsp. [19] nie stwierdzili znamiennych różnic i wnioskowali, że polimorfizm I/D ACE nie jest czynnikiem ryzyka dla grupy Słowian z udarem mózgu. Jiang [20] badał polimorfizm angiotensynogenu (AGT) i ACE I/D u 257 pacjentów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym oraz u 218 chorych na nadciśnienie z udarem mózgu, w tym u 131 z udarem krwotocznym i u 87 z niedokrwiennym. Wykazano częstszy polimorfizm delecyjny ACE DD w udarze niedokrwiennym niż w udarze krwotocznym i nadciśnieniu. Wyniki wskazywały, że polimorfizm DD jest jednym z czynników ryzyka niedokrwiennego udaru mózgu u osoby z nadciśnieniem tętniczym w populacji Chińczyków. Nie wykazano różnicy pod względem występowania polimorfizmu genu AGT. Lin i wsp. [21] badali zależność polimorfizmu delecyjnego ACE w chorobach naczyniowych mózgu w populacji japońskiej i kaukaskiej na Tajwanie. Nie wykazali oni znamiennej statystycznie różnicy w zakresie występowania genotypu DD w grupie pacjentów z udarem mózgu w porównaniu z grupą kontrolną i wnioskowali, że polimorfizm DD nie odgrywa znaczącej roli w patogenezie chorób naczyniowych mózgu.

Wnioski

Zarówno wyniki autorów, jak i wnioski większości badaczy wskazują na brak korelacji między typem polimorfizmu ACE a występowaniem udaru mózgu. Polimorfizm ten nie odgrywa znaczącej roli w patogenezie udarów mózgowych.

Piśmiennictwo

1. Takada J., Ibayashi S., Nagao T., Ooboshi H., Kitazono T., Fujishima M. Bradikinin mediates the acute effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke* 2001, 32, 1216–1219.
2. Adamska-Dyniewska H., Zdrojewicz Z., Pieloch Z. Aktywność konwertazy angiotensyny u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze w zależności od współistniejącej niewydolności krążenia. *Nadciśnienie Tętnicze* 1997, 1, 46–50.

3. Jin H., Yang R., Award T.A. i wsp. Effects of early angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Circulation* 2001, 103, 736–742.
4. Cambien F., Poirier O., Lecerf L. i wsp. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992, 359, 641–644.
5. Marian A.J., Yu Q.T., Workman R., Greve G., Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *Lancet* 1993, 342, 1085–1086.
6. Schunkert H., Hense H.W., Holmer S.R. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330, 1634–1638.
7. Lindpaintner K., Pfeffer M.A., Kreutz R. i wsp. A prospective evaluation of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 706–711.
8. Gruchała M., Cieciewicz D., Targoński R. i wsp. Polimorfizm genu enzymu konwertującego angiotensynę I u osób poniżej 50. roku życia, z chorobą wieńcową i nadciśnieniem tętniczym lub bez. *Nadciśnienie Tętnicze* 1998, 2, 27–33.
9. Ruiz J., Blanche H., Cohen N. i wsp. Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is strongly associated with coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 3662–3665.
10. Varda N.M., Peterlin B., Bradac S.U., Gregoric A., Milanez T. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism as a cardiovascular risk factor in children. *Eur. J. Physiol.* 2000, 439 (supl.), R34–R35.
11. Sharma P., Carter N.D., Barley J., Brown M.M. Molecular approach to assessing the genetic risk of cerebral infarction: deletion polymorphism in the gene encoding angiotensin 1-converting enzyme. *J. Hum. Hypertens.* 1994, 8, 645–648.
12. Sharma P., Carter N.D., Barley J., Lunt R., Seymour C.A., Brown M.M. Polymorphism in the gene encoding angiotensin 1-converting enzyme and relationship to its post-translational product in cerebral infarction. *J. Hum. Hypertens.* 1994, 8, 633–634.
13. Sertic J., Hebrang D., Janus D. i wsp. Association between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cerebral atherosclerosis. *Euro. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996, 34, 3001–304.
14. Kario K., Kanai N., Saito K., Nago N., Matsuo T., Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1997, 95, 281–284.
15. Tiret L., Blanc H., Ruidavets J.B. i wsp. Gene polymorphism of renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke. The PEGASE study. *J. Hypertens.* 1998, 16, 37–44.
16. Moliaka I.K., Petruk S.V., Kirianov S.A. i wsp. Association analysis of polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene in ischemic stroke. *Zh. Nevrol. Psichiatr. Im S. S. Korsakova* 1998, 98, 35–37.
17. Seino Y., Ikeda U., Maeda Y., Haga Y., Yashima H., Shimada K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and plasminogen activator inhibitor levels in subjects with cerebral infarction. *J. Thromb. Thrombolysis* 1998, 5, 263–267.
18. Kostulas K., Huang W.X., Crisby M. i wsp. An angiotensin-converting enzyme gene polymorphism suggests a genetic dysfunction between ischaemic stroke and carotid stenosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999, 29, 478–483.
19. Peterlin B., Milanez T., Kobal J., Peterlin-Potisk K., Petrovic D., Pogacnik T. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene and stroke in Slovenian population. *Eur. J. Physiol.* 2000, 439 (supl.), 38–39.
20. Jiang C. Association between hypertensive cerebrovascular stroke and renin-angiotensin system gene polymorphism from Chinese cohort Shanghai. *Chin. J. Med. Genet.* 2000, 17, 256–258.
21. Lin J.J., Yueh K.C., Lin G.Y. i wsp. Lack of association between angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism and cerebrovascular disease in Taiwanese. *J. Formos. Med. Assoc.* 2001, 99, 895–901.