

## تواتر أليل التعدد الشكلي غرز/خبين في الجين المرمزة الإنزيم المحول للأنجيوتنسين في سوريين أصحاء ومرضى خثار وريدي وارتفاع توتر شرياني: دراسة حالة - شاهد

لمى علي يوسف<sup>1</sup>، مجد محمد نصوح الجمالي<sup>2</sup>

<sup>1</sup> قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق. lama.youssef@damascusuniversity.edu.sy  
<sup>2</sup> قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة دمشق. m.aljamali@damascusuniversity.edu.sy

### المُلخَص:

**خلفية البحث:** يُعدّ الإنزيم المحول للأنجيوتنسين (ACE) منظماً مشتركاً بالغ الأهمية بين جملتي كالبيرين-كينين (KKS) ورينين-أنجيوتنسين-ألدوستيرون (RAS). تخضع الجين المرمزة لهذا الإنزيم لتعددات شكلية أهمها التعدد الشكلي غرز/insertion/deletion (I/D)، الذي يؤثر في بنية الـ ACE ومستوياته المصلية والنسجية. يعزى للتعدد الشكلي D انخراطه في الفيزيولوجيا المرضية للعديد من الأمراض.

**الهدف:** هدفت هذه الدراسة إلى تحري تواتر التعدد الشكلي ((I/D rs4646994 في جمهرة من الأفراد السوريين الأصحاء ومقارنتها مع تلك العائدة لمرضى ارتفاع ضغط الدم و/أو خثار وريدي عميق لتحري علاقة الارتباط المفترضة بين الأليل D وهاتين الحالتين المرضيتين لدى السوريين.

مواد البحث وطرائقه: شملت هذه الدراسة من نمط حالة-شاهد أفراداً أصحاء (ذراع الشواهد) ومرضى ارتفاع ضغط شرياني وخثار وريدي (ذراع الحالات) من محافظات دمشق وريف دمشق وحمص. استخلص الـ DNA الجينومي وأجريت تفاعلات البوليمراز التسلسلي PCR باستعمال مشرعين نوعيين للمنطقة الحاوية على التعدد الشكلي I/D في جين الـ ACE. استعرفت الألائل والأنماط الجينية بناءً على أطوال منتجات التضخيم بعد الترحيل على هلامه الأغاروز .

**النتائج:** بلغ عدد المشاركين المحققين لمعايير التضمين 146 فرداً، تراوحت أعمارهم بين 21-86 عاماً بمتوسط حسابي (±انحراف معياري) قدره 49.68 (±17.56) عاماً، وكانت غالبيتهم (60.69%) من الذكور، وتوزعوا بين أصحاء (n=98) ومرضى ارتفاع ضغط شرياني (n=27) وخثار وريدي (n=20). بلغ العدد الكلي للألائل 292 أليلاً، وكان أليل الخبن D مهيمناً في كامل أفراد الجمهرة بنسبة بلغت 64.73% مقابل نسبة لم تتجاوز 35.27% للأليل I ، وتوزع أفراد جمهرة الدراسة وفق الأنماط الجينية (13.01%) II ، ID (44.52%)، و (42.47%) DD، وبلغت نسبة حملة نسخة واحدة على الأقل من أليل الخبن 86.99% (ID+DD) بلغ تواتر الأليل D 62.50% لدى مرضى الخثار الوريدي (n=20) و 66.67% لدى مرضى ارتفاع الضغط الشرياني (n=27) بالمقارنة مع 64.29% لدى الأصحاء، دون وجود فوارق معنوية إحصائية (p < 0.05 لجميع المقارنات).

**الاستنتاجات:** تكشف هذه الدراسة انتشاراً كبيراً نسبياً لأليل الخبن D. قاربت نسبة حملة نسخة واحدة على الأقل من الأليل D (ID+DD) في دراستنا نسب الانتشار الأعلى عالمياً والمسجلة في أفريقيا (86.4%) [83.6-94.7%] والشرق الأوسط (84.5%) [78.3-89.8%]، وكانت تواترات انتشار الأليل D متقاربة بين الأصحاء ومرضى ارتفاع التوتر الشرياني والخثار الوريدي، الأمر الذي قد يقترح أسباباً أخرى للاستعداد لهذه الأمراض لدى السوريين.  
**الكلمات المفتاحية:** الإنزيم المحول للأنجيوتنسين، تعددات شكلية، التعدد الشكلي I/D rs4646994، سورية.

تاريخ القبول: 2023/2/28

تاريخ الإيداع: 2023/12/6

حقوق النشر: جامعة دمشق - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب CC BY-NC-SA

ISSN: 2789-7214 (online)

<http://journal.damascusuniversity.edu.sy>



## The Frequency of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Gene Insertion/Deletion (I/D) Polymorphism in Healthy Syrians and Thrombosis and Hypertensive Patients: a Case-Control Study

Lama Ali Youssef<sup>1</sup>, Majd Mhd Nassouh Aljamali<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutics & Pharmaceutical Technology - Faculty of Pharmacy - Damascus University.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Microbiology - Faculty of Pharmacy - Damascus University .

### Abstract:

**Background:** Angiotensin-converting enzyme (ACE) is a critical co-regulator of the kallikrein-kinin (KKS) and renin-angiotensin-aldosterone (RAS) systems. The gene encoding this enzyme is subject to polymorphisms, the most important of which is the insertion/deletion (I/D) polymorphism, which affects the serum and tissue levels of ACE, its structure and functions. The D polymorphism is attributed to its involvement in the pathophysiology of several diseases.

**Objective:** This study aimed to investigate the frequency of the rs4646994 (I/D) polymorphism in a Syrian cohort of healthy individuals in comparison with patients with high blood pressure and/or venous thrombosis to assess the assumed association between the I allele and these disease states.

**Methods:** In this case-control study, we included healthy individuals (control arms) and patients with hypertension and/or thrombosis from the governorates of Damascus, Rural Damascus, and Homs. We extracted genomic DNA and performed PCR using primer pairs specific for the region containing the ACE I/D gene polymorphism. Alleles and genotypes were identified based on the lengths of the amplicons after migration on an agarose gel.

**Results:** One hundred forty-six individuals met the inclusion criteria; their ages ranged from 21-86 years, with an arithmetic mean ( $\pm$ standard deviation) of 49.68 ( $\pm$ 17.56) years, and a majority (60.69%) of males. The total number of alleles was 292 alleles, with the D allele being dominant (64.73%), compared to a percentage did not exceed 35.27% for the I allele. The study subjects were distributed according to the genotypes to: II (13.01%), ID (44.52%), DD (42.47%). Thus, the percentage of carriers of at least one copy of the deletion allele (ID+DD) was 86.99%. The frequency of the D allele was 62.50% in patients with venous thrombosis (n= 20) and 66.67% in patients with arterial hypertension (n= 27), compared to 64.29% in healthy controls ( $p >> 0.05$ ).

**Conclusions:** This study reveals a relatively high prevalence of the deletion allele D. The percentage of carriers of at least one copy of the deletion allele (ID+DD) was comparable to prevalence rates reported in Africa (86.4 (%[83.6-%94.7%]) and the Middle East (84.5 (%[78.3-%89.8%]). The prevalence of the D allele was almost identical in healthy individuals and patients with arterial hypertension and venous thrombosis, which may suggest other reasons for predisposition to these diseases in Syrians.

**KeyWords:** Angiotensin-Converting Enzyme, Polymorphisms, The Rs4646994 (I/D) Polymorphism, Syria.



**المقدمة Introduction:**

يُعدّ الإنزيم المحوّل للأنجيوتنسين angiotensin converting enzyme (ACE) منظماً محورياً مشتركاً بين جملّة كالكيرين-كينين Kallikrein-Kinin system (KKS) من جهة وجملّة رينين-أنجيوتنسين-ألدوستيرون renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) من جهة أخرى. ويُصنّف الـ ACE بنويّاً على أنّه إنزيم بيتيداز فلزي مكتفٍ للزنك Zinc Metallopeptidase ينوّج بوفرة على سطوح الخلايا الظهارية والبطانية، وينسب دوره المفتاحي في تنظيم ضغط الدّم لامتلاكه نطاقين تحفيزيين متمائلين أو نديدين homologous catalytic domains هما النطاقان N- و C- اللذان يقومان بشطر ركيّزتين هما الأنجوتنسين I والبراديكينين (Purwaningroom et al., 2015).

تحافظ منظومة الرنين-أنجوتنسين على استتباب الماء والكهارل وضغط الدّم في الجسم، ويتحكّم بهذه المنظومة إنزيمان مفتاحيان هما ACE1 و ACE2. يُفرز الرينين من الخلايا المُجاورة للكبيبات في الكلى تحت شروط تشمل الخسارة في حجم الدم أو التّفعيل الودّي، ويقوم بشطر الببتيد غير الفعّال الذي يُعرف بموّلّد الأنجيوتنسين angiotensinogen (المصنّع في الكبد)، منتجاً أنجوتنسين I. يتواسط ACE تحويل الببتيد غير الفعّال أنجوتنسين I (Ang I or Ang 1-10) المكوّن من عشرة أحماضٍ أمينية إلى ببتيد فعّال حيويّاً هو أنجوتنسين II (Ang II or Ang 1-8)، وهو ببتيد ثماني الأحماض الأمينية مقبّض قويّ للأوعية، والذي يستقلّب بدوره إلى أنجوتنسين 1-7 بتواسط إنزيم ACE 2 (ACEII)، ويمانع تأثيرات محور ACE1/ angiotensin II (Kanugula et al., 2023). وفي حين يحرض أنجوتنسين II حدوث تأثيرات قويّة مقبّضة للأوعية أو داعمة للالتهابية، يبدي أنجوتنسين 1-7 خصائص مضادة لتكاثر الخلايا ومثبّطة للاستماتة مع تأثيرات خفيفة موسعة للأوعية. وتنسب للأخير تأثيرات مضادة للقصور القلبي anti-

heart failure ومضادة للخثار anti-thrombosis ومضادة لضخامة العضل القلبي anti-myocardial hypertrophy ومضادة للتليف anti-fibrosis ومضادة لـ اللانظميّات anti-arrhythmia ومضادة للتعصّد anti-atherogenesis، إضافة إلى إضعافه أو تخفيفه من الخلل الوظيفي الوعائي المرتبط بالمتلازمة الاستقلابية (Santos et al., 2018).

يُعدّ أنجيوتنسين II مقبّضاً وعائياً قويّاً، ويقوم بفعله على مستوى قشر الكظر ما ينجم عنه تحرّر الألدوستيرون aldosterone، والذي يحرض بدوره النبيبات الكلوية لفتح لها القيام بإعادة امتصاص المزيد من الصوديوم والماء من البول. تؤدّي هذه التأثيرات إلى زيادة في حجم السوائل في الدّم، بما يعوّض الخسارة الحجمية، ويرفع ضغط الدّم. يتواسط أنجيوتنسين II أيضاً نمو الخلايا وتكاثرها وذلك عن طريق تحريض سيتوكينات وعوامل نموٍ عديدة. كما أنّ من الجدير ذكره أنّ أنجوتنسين II يمكن له أن يحرض حدوث خللٍ وظيفيٍّ في البطانة وذلك عن طريق إنقاصه أو خفضه للتوافر الحيويّ لأوكسيد النترريك nitric oxide. وقد دعت هذه الخصائص إلى التأكيد على الدور الحيويّ للأنجيوتنسين II في الفيزيولوجيا الإمبراضية القلبية الوعائية وحفّزت استكشاف دور الـ RAS في التصلّب العصيديّ والمحصلات القلبية الوعائية (Brewster & Perazella, 2004; Carluccio et al., 2001).

من جهةٍ أخرى، يزيل إنزيم ACE فعّالية البروتين الموسّع للأوعية، براديكينين. ويزيد بالتالي من ضغط الدّم وهذا ما جعل منه هدفاً للمعالجات الدوائية، وعلى الأخص زمرة مثبّطات الـ ACE والتي تستطب لخفض ضغط الدّم. كما يقوم هذا الإنزيم أيضاً بدورٍ في الخصوبة عبر قدرته على شطر بروتينات GPI الزاسية في الأغشية الخلوية GPI-anchored membrane proteins في النطاف/الحيوانات المنوية (Kondoh et al., 2005).

تقع الجين المرمزة لـ ACE في الموقع q23.3 للذراع الطويلة من الكروموزوم/الصّبغي 17 وتبلغ من الطول 21 كيلو أساس

ويعدّ هذا التعدد الشكلي مسؤولاً عن 47% من التباينات في المستويات البلازمية لـ ACE، حيث يترافق النمط الجيني DD مع أعلى مستويات ACE في غالبية المجموعات الإثنية المدروسة (Verma et al., 2021).

اقترح العديد من الدراسات انخراط هذا التعدد الشكلي، إضافة إلى طفرات أخرى ضمن الجين المرمرزة لـ ACE، في الفيزيولوجيا الإيمراضية للعديد من الأمراض والتي تتنوع بين الأمراض القلبية، الصدف psoriasis، أمراض الجهاز البولي، النشبة (السكتة الدماغية) stroke وداء الزهايمر Alzheimer's disease (Nath et al., 2021; Ramezani et al., 2020; Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

يلعب إنزيم ACE دوراً مفصلياً في فيزيولوجيا الأوعية الدموية والعمليات الالتهابية، وقد كان محور اهتمام العديد من الدراسات التي هدفت لاستعراف ارتباطه بعددٍ من الأمراض القلبية الوعائية. قدّمت هذه الأبحاث أدلة دامغة على امتلاك الأفراد ذوي النمط الجيني متماثل الزيجوت DD لمستويات بلازمية من ACE أعلى بما يقارب الضعف بالمقارنة مع حملة النمط الجيني متماثل الزيجوت I/I، في حين بيّنت امتلاك الأفراد من النمط الجيني متغاير الزيجوت ID تراكيز متوسطة بين النمطين متماثلتي الزيجوت (Susilo et al., 2022).

نظراً لقلة الدراسات التي تحرّرت انتشار التعدد الشكلي rs4646994 لدى السوريين، سواء الأصحاء أم المشخصين بأدواء وثيقة الصلة إيمراضياً بجملة الـ RAS، فقد هدفت هذه الدراسة إلى تقييم تواتر التعدد الشكلي rs4646994، غرز (I) وخبين (D)، لدى جمهرة من الأفراد السوريين الأصحاء ومقارنتها مع نسب التواتر لدى مرضى مشخصين بارتفاع ضغط الدم و/أو بختارٍ وريدي عميق وذلك بهدف تحري علاقة الارتباط المفترضة بين الأليل D وهاتين الحالتين المرضيتين لدى السوريين، وكذلك مقارنة التواترات المسجلة في دراستنا مع نسب الانتشار في دول المنطقة والعالم للمساهمة في فهم أفضل للتركيب الجينية للسوريين.

وتتألف من 26 إكسوناً و 25 إنتروناً. تتضمن سجلات المركز القومي لمعلومات التقانة الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) أكثر من 160 تعدداً شكلياً في جين ACE، وهي في غالبيتها تعددات شكلية مفردة النوكليوتيد Single Nucleotide Polymorphism (SNPs).

اكتشف التعدد الشكلي (I/D) rs4646994 من قبل Rigat وزملاؤه عام (1990) (Rigat et al. 1990)، ويُعدّ واحداً من أربعة تعددات شكلية درست باستفاضة في الجين المرمرزة لـ ACE 1. وهو ليس بتعددٍ شكليٍّ مفرد النوكليوتيد (SNP) على الإطلاق، وإنما يعرف بأنه غرزٌ insertion أو خبنٌ/حذفٌ deletion لتسلسلٍ من تتاليات Alu بطول 287 زوج أساس في منطقة غير مرمرزة هي الإنترون السادس عشر 16 intron لهذا الجين، ممّا يتسبب بتضفيرٍ بديلٍ alternative splicing وينعكس بالحصلة على بنية بروتين ACE. من المقترح أن يؤدي التضفير البديل إلى إعطاء تنويعات منتسخة transcript variants أو منتسخات متغايرة سواءً على مستوى التعبير عن نظائر إسوية جسمية somatic isoforms (sACE) أو نظائر إسوية خصوصية نوعية بالذكور male-specific testicular isoforms (tACE)، إذ ينجم عن أليل غرز تسلسل (I) Alu (allele) رامزة إيقاف سابق لأوانه premature stop codon يؤدي لافتقار بروتين ACE للنطاق C- (C-domain) واقتصار الإنزيم على موقع فعّالٍ وحيدٍ هو النطاق N (N-domain). بالمقابل، يحتفظ بروتين ACE الناجم عن أليل الخبن أو الحذف على حيازة نطاق التحفيز C- وN-، وبالتالي يمتلك موقعين فعّالين (Laila et al. 2006; Sayed-Tabatabaei et al. 2015) (Purwaningroom et al. 2015).

برهنت دراسات سابقة على ارتباط الأليل D للتعدد الشكلي ACE1 I/D مع مستويات مصليّة ونسجيّة مرتفعة من ACE، وتزايد في إنتاج الأنجوتنسين II الزافع للضغط وتناقص في العمر النصفى للبراديكينين الخافض للضغط (Woods et al., 2000).

**المواد والطرائق Materials and Methods:**

حازت هذه الدراسة على الموافقة الأخلاقية من اللجنة الوطنية لأخلاقيات المعارف العلمية والتكنولوجية في الهيئة العليا للبحث العلمي CONEST، وكذلك موافقة لجنة أخلاقيات البحث العلمي في كلية الصيدلة-جامعة دمشق، وصُممت لتكون من نمط دراسة حالة-شاهد case-control study بهدف استعراض تواتر التعدد الشكلي I/D في الجين المرمرزة لإنزيم ACE في جمهرة من الأصحاء ومقارنته مع التواترات المسجلة في جمهرات الأصحاء عالمياً من جهة، والمقارنة من جهة أخرى مع التواترات في مجموعة من مرضى سوريين مشخصين بأمراض يُنسب لجملة الـ RAS انخراطها في آلياتها الإمبراضية (مثل ارتفاع ضغط الدم والختار). شملت معايير التضمين/الاشتمال في الدراسة أفراداً سوريين بالغين لا تربطهم صلات قرى ومن الجنسين بأعمار  $18 \leq$  عاماً من محافظات دمشق وريف دمشق وحمص. اختير أسوياء ضغط الدم للمجموعة الشاهدة بناءً على قيم طبيعية لضغط الدم الانقباضي تراوحت بين 120-129 ملم زئبق في حين كانت بين 80-84 ملم زئبقي لضغط الدم الانبساطي، وكان جميع المرضى المشخصين بارتفاع التواتر الشرياني يتداون بخافضات ضغط الدم سواء بدواء مفرد monotherapy من إحدى زمر خافضات الضغط أم بمشاركة من اثنين أو أكثر من الأدوية الخافضة لضغط الدم، في حين ضمت مجموعة الختار كلاً من مرضى ختار وريدي عميق deep venous thrombosis ومرضى صمة رئوية pulmonary embolism، وكان جميع مرضى الختار يتداون بالوارفارين.

بُزلت عينات دم محيطي من أفراد الدراسة بعد الحصول على موافقاتهم المستنيرة وجمعت في أنابيب اختبار سعة 3 مل حاوية على مانع تخثر Ethylene diamine (EDTA) وTetraacetic Acid، وحُفظت العينات في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدرجة حرارة -20 درجة سيليزيوس إلى حين

إجراء الدراسة الجزيئية. استُخلص الدنا الجينومي gDNA من العينات وفقاً للتعليمات المرفقة بعتيده الاستخلاص Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®, USA). أُجري تفاعل البوليمراز التسلسلي polymerase chain reaction (PCR) باستعمال مَشْرَعين نوعيين؛ مَشْرَع تقديمي forward primer ذي تسلسل نوكلئوتيدي 5'-CTGGAGAGCCACTCCCATCCTTCT-3 ومَشْرَع عكسي reverse primer بتسلسل نوكلئوتيدي 5'-GGGACGTGGCCATCACATTCGTCAG-3 وذلك بهدف تضخيم منطقة الـ DNA الحاوية على التعدد الشكلي المستهدف (الغرز أو الخين). وفُسِّرَت النتائج بناءً على أطوال منتجات التضخيم بالمقارنة مع عيارات بأطوال 100 شفع نوكلئوتيد، حيث بلغ طول منتج الـ PCR للأليل I 490 شفع نوكلئوتيد مقابل منتج أقصر لا يتجاوز 190 شفع نوكلئوتيد للأليل D. وبناءً عليه، استُعرف النمط الجيني متمائل الزيجوت D/D بعصابة مفردة بطول 190 شفع نوكلئوتيد، وأعطى النمط الجيني متمائل الزيجوت I/I عصابة مفردة بطول 490 شفع نوكلئوتيد، في حين تبدى النمط الجيني متغاير الزيجوت I/D بعصابتين بطولي 190 شفع نوكلئوتيد و 490 شفع نوكلئوتيد.

احتوى تفاعل الـ PCR ما يقارب 50-100 نانوغرام من الدنا المجيني المرصاف gDNA template لحجم كلي قدره 40 مكل. تضمن مزيج الـ PCR 10 بيكومول من كل من المَشْرَعين، و 20 مكل من محلول مركّز مُسَبِّق الخلط الـ OnePCRTM (GeneDireX®) حاوٍ على إنزيم بوليمراز الدنا Taq DNA polymerase ودارئة PCR وريبونوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفسفات (dNTPs) deoxyribonucleotide triphosphate وصبغ التحميل على الهلامية، وأكمل الحجم بماء مقطر معقم sterile distilled water حتى الحجم النهائي 40 مكل.

أعمارهن بين 21 و 86 عاماً، في حين كان وسيط الأعمار 55.5 عاماً للذكور ويمدى أعمار يتراوح بين 23-81 عاماً. ويدل تقارب قيمتي الوسيط والمتوسط الحسابي لأعمار الجنسين على توزع البيانات في كل مجموعة بصورة متناظرة Symmetric Distribution.

كان المتوسط الحسابي لأعمار الإناث في مجموعة الشواهد (الأصحاء) والبالغ 41.64 ± 16.67 سنة أقل وبفارق معتد به إحصائياً (p= 0.0023) من مقابله لدى الذكور 18.88 ± 52.84، في حين كان المتوسط الحسابي للأعمار متقارباً بين الجنسين في مجموعة حالات ارتفاع التوتّر الشرياني (16.00 ± 59.22 مقابل 61.22 ± 8.34 لدى مريضات ومرضى ارتفاع ضغط الدم، على الترتيب) وبقيمة دلالة قدرها (p= 0.73). وعلى الرغم من أن مريضات الخثار كن أصغر عمراً (9.75 ± 37.16 سنة) بالمقارنة مع المرضى الذكور (12.71 ± 47.43 سنة)، غير أن الفارق بين متوسطي أعمار مرضى الخثار من الجنسين لم يكن معتداً به إحصائياً (p= 0.07).

**نتائج التمييط الجيني** أفضل ترحيل لمنتجات تضخيم الـ PCR وتظهرها ومقارنة أطوالها بالاستعانة بسلم معياري بأطوال 100 شفع نوكلوتيد إلى تمييز ثلاثة أنماط جينية اعتماداً على طول العصابات، حيث ظهرت عصابة وحيدة بطول 490 شفع نوكلوتيد مميزة للنمط الجيني متماثل الزيجوت I/I، وبالمقابل تميّزت عينات النمط الجيني متماثل الزيجوت D/D بوجود عصابة مفردة بطول 190 شفع نوكلوتيد، في حين ظهرت عصابتان بطولي 190 شفع نوكلوتيد و 490 شفع نوكلوتيد للأفراد ذوي النمط الجيني متغاير الزيجوت I/D. يبين الشكل 1 الموقع الجيني لـ ACE على الصبغي 17q23 وبنية الجين المرمرزة ومنتجي التعددين الشكليين غرز (I) وخبين (D).

**تواتر أليلي الغرز I والحذف D في جمهرة الدراسة** قمنا بتمييط 146 عينة جزيئياً، كان أليل الخبن (D) مهيمناً في مجمل جمهرة الدراسة وبعده الأليل قدره (n= 193) من أصل العدد

أمثلت شروط تفاعل الـ PCR لتشمل الخطوات التالية؛ تمسخاً بدئياً لطاقي الدنا بدرجة الحرارة 94 °C لمدة 5 دقائق تليه 35 دورة شملت (تمسخاً بدرجة الحرارة 94 °C لمدة 30 ثانية وارتباطاً للمشارع بالتسلسلات المتممة لها بدرجة الحرارة 68.3 °C لمدة 30 ثانية ومن ثم إطالة بدرجة الحرارة 72 °C لمدة 30 ثانية) وينتهي التفاعل بإطالة نهائية لطاقي الدنا الجديد بدرجة حرارة 72 °C لمدة 10 دقائق. رُحلت منتجات تضخيم الـ PCR ضمن هلامة أغاروز (1.5%) وظُهرت بتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultraviolet بوجود بروميد الإيثيديوم، ورُحّل عياري حمض نووي 100 bp DNA ladder (GeneDireX®) بموازاة منتجات التفاعلات لتقدير طول العصابات الناتجة.

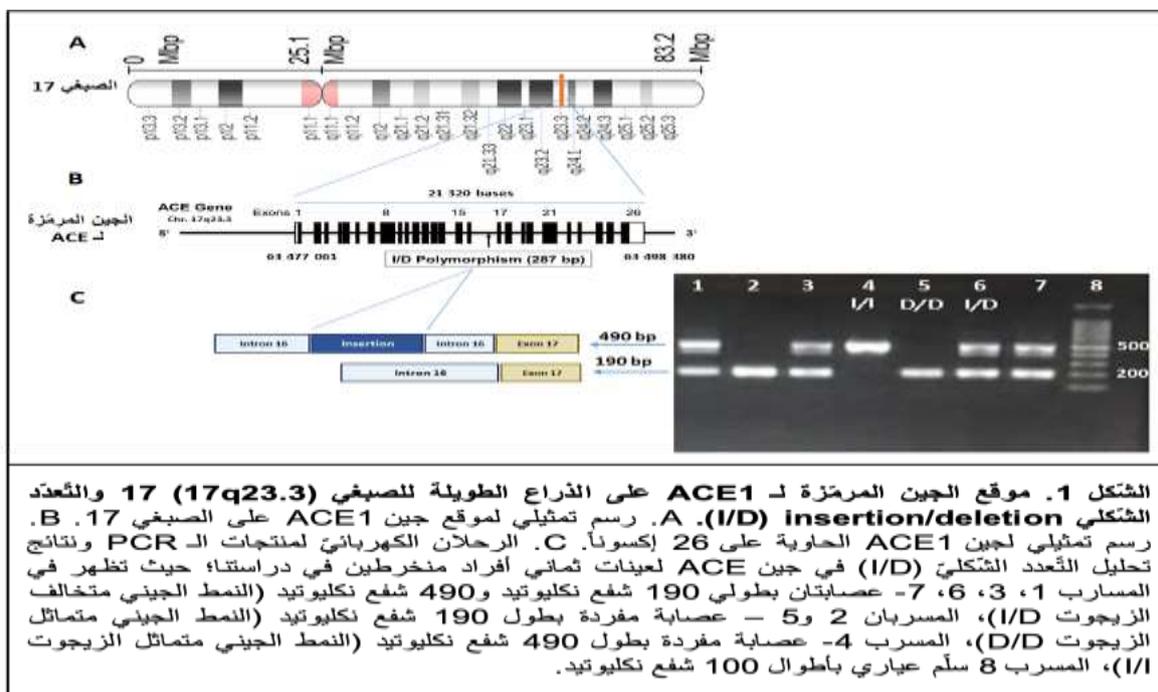
حُسبت تواترات الأنماط الجينية والألائل بطريقة gene counting، وقرنت نسب الانتشار الفعلية مع النسب محسوبة بناءً على معادلة هاردي واينبرغ Hardy-Weinberg equilibrium واعتمد اختبار كاي مربع لجودة التطابق Chi square goodness of fit للتحقق من وجود فروقات معتدلاً بها إحصائياً في تواتر الألائل والأنماط الجينية، واعتمدت قيمة الدلالة  $p < 0.05$ .

## النتائج: Results

### الخصائص الديموغرافية لعينة الدراسة:

تضمنت دراستنا 146 فرداً محققين لمعايير التضمين، توزعوا حسب الجنس بين 57 (39.04%) أنثى و 89 (60.96%) ذكراً. تراوحت أعمار المشاركين بين 21-86 عاماً، وبلغ متوسط الأعمار لمجمل أفراد الدراسة (المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري) 49.68 ± 17.56 عاماً. كان المتوسط الحسابي لأعمار الإناث 43.95 ± 17.17 عاماً أقل وبفارق معتد به إحصائياً (p= 0.001) من مقابله 53.39 ± 16.88 عاماً للذكور. وقد بلغ وسيط أعمار الإناث 42 عاماً وتراوحت

الكلي للألائل والبالغ 292 أليلاً، وبنسبة بلغت 65.2% مقابل نسبة 34.8% لأليل الغرز (I). تقاربت نسب انتشار أليلي (39.47%) والذكور (67.42% مقابل 32.58%) (p= 0.229).



الجدول (1): البيانات الديموغرافية و تواتر أليلي الغرز I والحذف D والأنماط الجينية في كامل جبهة الدراسة

(I/D) rs4646994 ACE1						العمر (mean ±SD)	الجنس (%) n
تواتر الألائل n (%)		تواتر الأنماط الجينية n (%)					
I الأليل	D الأليل	II	ID	DD	(ID + DD)		
(39.47) 45	(60.53) 69	(15.52) 9	(46.55) 27	(36.8) 21	(84.21) 48	(43.95 ±17.17)	إناث (39.04) 7
(32.58) 58	(67.42) 120	(11.24) 10	(42.70) 38	(46.07) 41	(88.76) 79	(53.39 ±16.88)	ذكور (60.96) 89
(35.27) 103	(64.73) 189	(13.01) 19	(44.52) 65	(42.47) 62	(86.99) 127	(53.62 ±16.52)	المجموع (100)146

المتوسط الحسابي لأعمار الإناث أقل ويفارق معنًاً به إحصائياً (p= 0.001) من مقابلته لدى الذكور (اختبار t-test). لم تلحظ أية فروقات معنًاً بها إحصائياً لدى عقد المقارنات بين تواترات الألائل والأنماط الجينية لدى الإناث مقابل الذكور (p >> 0.05) (اختبار كاي للتربيع Chi-square).

**المناقشة Discussion:**

تكشف دراستنا الحالية تواتراً منخفضاً نسبياً (35.27%) لأليل الغرز I وانتشاراً كبيراً (64.73%) لأليل الخبن D، حيث يُنظر إلى الأخير بوصفه أليل خطورة للإصابة بالأمراض ذات الصلة باضطراب جملة الـ RAS. بلغت نسبة الحمله لنسخة واحدة على الأقل من أليل الخبن (أي النمطين الجينيين ID/DD) 86.99% من كامل جمهرة هذه الدراسة. وتعدّ هذه النسبة من أعلى نسب الانتشار عالمياً؛ إذ أنها تفوق انتشار النمطين الجينيين ID/DD معبراً عنه بالوسيط في القارات والأقاليم المعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO). حيث سُجّل الانتشار الأدنى لدى شعوب جنوب شرق آسيا وذلك بوسيط يبلغ 55% ومدى يتراوح بين 49.5-67.8%، يليه وسيط الانتشار المسجّل للشعوب الأوروبية والمقدّر بـ 79.2% (76.1-82.0%)، في حين قارب وسيط الانتشار لدى كل من شعوب القارة الإفريقية 86.4% (83.6-94.7%) وإقليم الشرق الأوسط 84.5% (78.3-89.8%) (Kenyon & Rosanas, 2020).

وتوزّع أفراد جمهرة الدراسة وفق الأنماط الجينية II (13.01%)، ID (44.52%)، DD (42.47%)، وبهذا بلغت نسبة حملة نسخة واحدة على الأقل من أليل الخبن (DD+ID) 86.99%. بلغ تواتر الأليل D 62.50% لدى مرضى الخثار الوريدي (n=20) و 66.67% لدى مرضى ارتفاع الضغط الشرياني (n=27) بالمقارنة مع 64.29% لدى الأصحاء.

تحقق توازن هاردي-واينبرغ Hardy-Weinberg Equilibrium للألائل والأنماط الجينية؛ حيث تطابقت النسب المتوقعة والمحسوبة وفق المعادلة مع التواترات الفعلية للأنماط الجينية genotype frequencies والألائل allelic frequencies سواء في الجمهرة الكلية لأفراد الدراسة أم في كل من مجموعتي الإناث والذكور كل على حدة (الجدول 1).

كان لافتاً من الملاحظ انقلاب تواتر الأليلين I و D بين الإناث والذكور المصابين بالخثار الوريدي، حيث كانت نسبة المريضات الحاملات لنسخة واحدة على الأقل من الأليل I (66.66%) وللنمط الجيني متماثل الزيجوت II (50%) أعلى ويفارق معتدً به إحصائياً (p= 0.028 و p= 0.013، على الترتيب) بالمقارنة مع التواترات المسجلة لدى الذكور، وكذلك بالمقارنة مع الإناث في مجموعتي الأصحاء (p=0.0192) ومع مريضات ارتفاع التوتّر الشرياني (p= 0.0952). لم تلحظ فروقات معتدً بها إحصائياً لدى عقد المقارنات بين تواترات الألائل والأنماط الجينية لدى الإناث مقابل الذكور (p1 < 0.05) (اختبار كاي للتربيع Chi-square) في جميع المقارنات الأخرى (الجدول 2).

الجدول(2): البيانات الديموغرافية وتواتر أليلي الغرز I والحذف D والأنماط الجينية في جمهرة الأصحاء ومرضى ارتفاع التوتّر الشرياني والختار

rs4646994 ACE1 (I/D)						العمر Age (سنة)	الجنس Sex	النّوع
تواتر الألائل n (%)		تواتر الأنماط الجينية n (%)				المتوسط الحسابي SD±	n (%)	
I الأليل	D الأليل	II	ID	DD	(ID+DD)			
(38.10) 32	(60.91) 52	(11.9) 5	(52.38) 22	(35.71) 15	(88.09) 37	16.67± 41.64	إناث n=42 (%41.6)	الأصحاء n=101
(33.06) 39	(66.95) 79	(11.86) 7	(42.37) 25	(45.76) 27	(88.14) 52	18.88± 52.84	ذكور n= 59 (58.4%)	
0.459		0.57				0.995	0.0023*	
(27.78) 5	(72.22) 13	(11.11) 1	(33.33) 3	(55.56) 5	(88.89) 8	16.00± 59.22	إناث n= 9 (33.33)	ارتفاع التوتّر الشرياني n= 27
(36.11) 13	(63.89) 23	(11.11) 2	(50) 9	(38.89) 7	(88.89) 16	8.34± 61.22	ذكور (66.66 n= 18)	
0.540		0.687				1	0.73	
(66.67) 8	(33.33) 4	(50.00) 3	(33.33) 2	(16.67) 1	(50) 3	9.75± 37.16	إناث n= 6 (30.00)	ختار وريدي n= 20
(25) 7	(75) 21	(7.14) 1	(35.71) 5	(57.14) 8	(92.86) 13	12.71± 47.43	ذكور (70.00) n= 14	
0.013*		0.0674				0.028*	0.07	

المتوسط الحسابي لأعمار الإناث في مجموعة الشواهد (الأصحاء) أقل ويفارق معتدً به إحصائياً (p= 0.0023) من مقابله لدى الذكور (اختبار t-test)، في حين غابت الفروقات المعتد بها إحصائياً لدى مقارنة أعمار الجنسين في مجموعتي ارتفاع التوتّر الشرياني والختار الوريدي. من الملاحظ انقلاب تواتر الأليلين I وD بين الإناث والذكور المصابين بالختار الوريدي، حيث كانت نسبة المريضات الحاملات لنسخة واحدة على الأقل من الأليل I والأليل الجيني II أعلى ويفارق معتدً به بالمقارنة مع التواترات المسجلة لدى الذكور (p= 0.028 و p= 0.13)، ولوحظ وجود فارق معتدً به إحصائياً بالمقارنة مع الإناث في مجموعة الأصحاء (p=0.0192) لكن لم يلحظ هذا الفرق بالمقارنة مع مريضات ارتفاع التوتّر الشرياني (p= 0.0952). لم تلحظ فروقات معتدً بها إحصائياً لدى عقد المقارنات بين تواترات الألائل والأنماط الجينية لدى الإناث مقابل الذكور (p < 0.05) (اختبار كاي للتربيع Chi-square) في جميع المقارنات الأخرى.

الذي توصلنا إليه في دراستنا الحالية (p= 0.397) (Salem).  
(Batzer, 2009) وتبين الخريطة في الشكل 2 مقارنةً لنسب انتشار الأليل D في دول منطقة الشرق الأوسط بناءً على نتائج مراجعتنا للأدبيات ذا الصلة.

كانت تواترات انتشار الأليل D متقاربة بين الأصحاء ومرضى ارتفاع التوتّر الشرياني و/أو الخثار الوريدي في دراستنا ودون وجود فوارق معتدً بها إحصائياً، الأمر الذي قد يقترح أسباباً أخرى جينية و/أو بيئية للاستعداد لهذه الأمراض أو مساهمة ليست حصريّة للتعدد الشكلي المدروس (I/D) للاستعداد لهذه الأمراض لدى السوريين. كما قد يكون الحجم الصغير نسبياً لجمهرة دراستنا دوراً في غياب العلاقة بين الأليل D والإصابة

كما قارب تواتر الأليل D الذي وثقناه في دراستنا النسب المسجلة في غالبية دول منطقة الشرق الأوسط، والتي تراوحت بين 58.86% لدى مجموع جمهرات سكانية لإثنيات مختلفة في إيران (Saadat, 2015) وصولاً إلى نسبٍ فاقت 70% في كلّ من الإمارات وعمان (71%) (Bayoumi et al., 2006) والسعودية (72%) (Algasham et al., 2009) ولبنان (73%) (Saab et al., 2007) الذي تتماثل تركيبته السكانية حدّ التّطابق مع سورية بحكم التاريخ المشترك والجوار وصلات القربى (الجدول 3). كما تبين لنا وجود دراسة سابقة على جمهرة أصغر من السوريين (n= 70) أفضت إلى تواترٍ نسبته (60.0%) للأليل D، بفارقٍ ليس معتدًاً به إحصائياً مع التواتر

التي سبقت انخراطهم في الدراسة دون وجود استنطاب أو مانع استنطاب لاستعمالهم أدوية من زمرة مثبّطات الـ ACE. وبينت نتائج الدراسة السابقة عدم وجود علاقة بين النمط الجيني لـ ACE والمرضى الدماغية الوعائية أو عوامل الاختطار لقصة مرض القلب الوعائي بما في ذلك ارتفاع ضغط الدم. ولم يترافق النمط الجيني لـ ACE بالاختطار طويل الأمد للسكتة الدماغية أو الحداثيات القلبية أو المواتة mortality أو العتاهة dementia أو تراجع القدرات الإدراكية cognitive decline، كما لم يكن النمط الجيني لـ ACE مُنبئاً بانخفاض ضغط الدم المرافق لاستعمال بعض مثبّطات الـ ACE (Harrap et al., 2003). وكان لافتاً في دراسة إماراتية قام بها Alsafar وزملاؤه (2015) وتحرّت هذه الارتباطات وعلاقتها مع حالة السمنة لدى أفراد جمهرة من الإماراتيين (n= 564) الذين توزّعوا بين 277 مريض سكري و/أو ارتفاع ضغط الدم و297 شاهد سليم، أنّ فريق الدراسة لم يجد لدى تحليل البيانات بشكل مستقل عن حالة السمنة علاقة ارتباط بين النمط الجيني للتعدّد الشكلي المدروس مع ارتفاع ضغط الدم [odds ratio (OR) = 1.02, p = 0.93] أو داء السكري [odds ratio (OR) = 1.34, p = 0.086].

لكن حين تمّ تحليل التتويجات الجينية ضمن البدناء وغير البدناء في كلّ مجموعة على حدة، تبين أنّ النمط الجيني متماثل للزيجوت DD (أي المتضمّن نسختين من أليل الخطورة D) يزيد اختطار ارتفاع ضغط الدم لدى غير البدناء [odds ratio (OR) = 1.80, p = 0.02]. وعلى النقيض من ذلك، وُجد أنّ لأليل D دوراً وقائياً ضد ارتفاع ضغط الدم في مجموعة البدناء (OR = 0.54, p = 0.01)، لكن دون وجود تأثير للسمنة من عدمها في ارتباط الأنماط الجينية لـ ACE مع T2DM. وبالتالي، فإنّ اختطار النمط الجيني ACE DD يتأثر بالسمنة، وهذا ما يوجب أخذها بعين الاعتبار في تفسير النتائج للدراسات المستقبلية التي تتحرى علاقات الأنماط الجينية بمثل هذه

بارتفاع ضغط الدم أو إمرضيات أخرى ذات صلة بمنظومة الـ RAS، رغم وجود عددٍ من الدراسات التي تدعم دوراً للأليل D في ازدياد المستويات البلازمية من ACE، حيث يمتلك الأفراد ذوو النمط الجيني DD تراكيز بلازمية أعلى بما يقارب الضعف من ACE بالمقارنة مع حملة النمط الجيني متماثل الزيجوت I/I، في حين تقع تراكيز ACE في مجالٍ وسطي لدى الأفراد من النمط الجيني ID (Susilo et al., 2022).

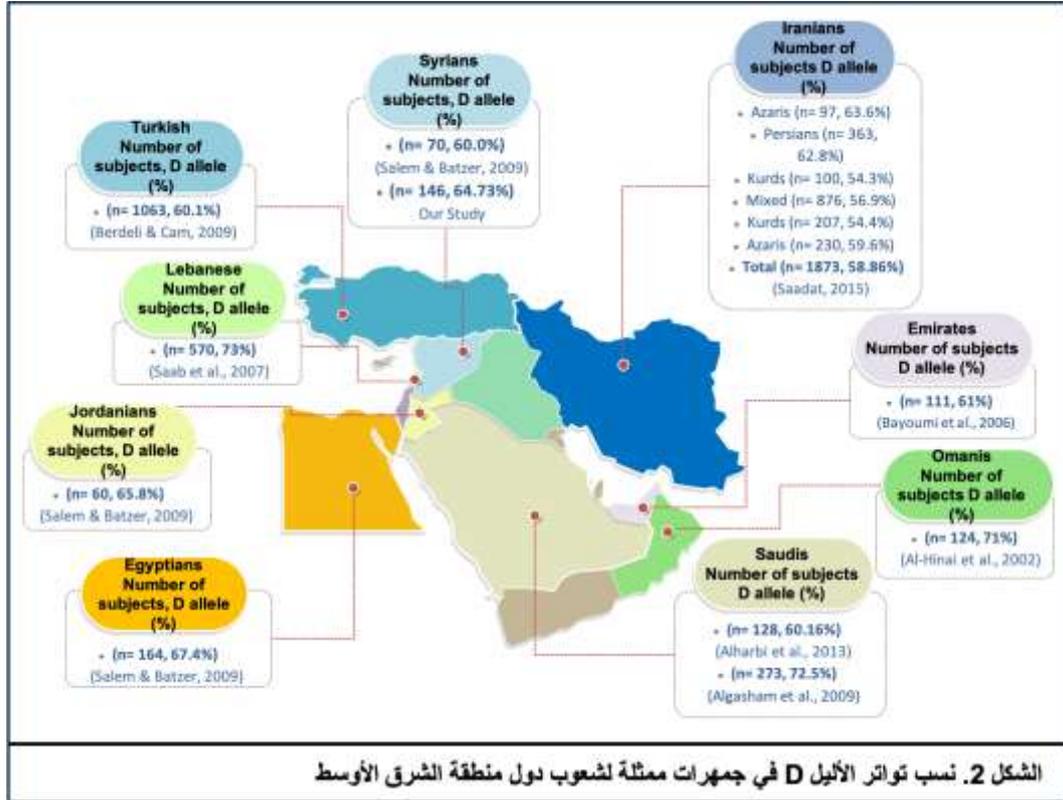
الجدول (3): انتشار النمطين الجينيين ID/DD معيراً عنه بالوسيط حسب توزع المناطق والأقاليم في العالم وفق منظمة الصحة العالمية (Kenyon & Rosanas, 2020)

عدد الدراسات	وسيط الانتشار Median Prevalence	المنطقة Region
1	%86.99	دراستنا
15	%84.5 -78.3) (%89.8)	شرق المتوسط Eastern Mediterranean
26	%79.2 -76.1) (%82.0)	أوروبا Europe
8	%86.4 -83.6) (%94.7)	أفريقيا Africa
7	%74.0 -64.1) (%79.2)	الأمريكتان Americas
5	%55 -49.5) (%67.8)	جنوب شرق آسيا South East Asia
10	%61.1 -55.0) (%67.2)	غرب المحيط الهادي Western Pacific

درست العلاقة بين ارتفاع ضغط الدم والتعدّد الشكلي I/D على نطاقٍ واسع في العديد من الإثنيات، لكن افتقرت النتائج للالتساق بشكلٍ كبير. أجريت دراسة كبرى متعددة المراكز (27 مركزاً) من عشرة بلدان من قارات أوروبا وآسيا وأستراليا، وتُعرف اختصاراً بـ PROGRESS study وضمّت 6105 مشاركاً لديهم قصّة مرضية لمرض وعائي دماغي إقفاري (سكتة دماغية stroke أو هجمات إقفارية عابرة TIA) في الأعوام الخمس

وتمزقها المفضي إلى التقرح ulceration وحدوث الخثار thrombosis (Cambien et al., 1994; Chen et al., 2013). في دراسة تحرت الارتباط بين احتشاء العضلة القلبية الحاد (AMI) والمستويات المصلية لكل من الأنجوتنسين II (AngII) وكالبيكرين 1 (KLK1) والتعدّات الشكلية في كل من جينتي ACE/KLK1، وبعد أخذ العوامل المتوهمة المحتملة potential confounding factors بعين الاعتبار، تبين أنّ الأفراد الذين لديهم مستويات مرتفعة من AngII و KLK1 يمتلكون معدّلات اختطار أعلى للإصابة بـ AMI. وسجّلت نتيجة مماثلة لدى حملة النمطين الجينيين ACE DD و KLK1 GG، إذ تبين امتلاكهم لأرجحية اختطار أعلى لـ AMI بما يقارب التسعة أضعاف وذلك بالمقارنة مع أقرانهم الذين يحملون النمطين الجينيين ACE II و KLK1 AA (OR=)

الأدواء (Alsafar et al., 2015). على النقيض، أفضى تحليل تلوي meta analysis لـ 57 دراسة بحثية ذات صلة شملت مجموع عدد مرضى بلغ 32862 مريضاً إلى وجود ارتباط بين أليل الحذف D لجين ACE وارتفاع الأهبة لارتفاع الضغط الشرياني. وتتناقض نتائج هذه الدراسة التي تُعدّ الأقوى من حيث البيّنة مع استنتاجاتنا بعدم وجود علاقة بين التعدد الشكلي I/D وارتفاع ضغط الدّم لدى جمهرة من السوريين (Liu et al., 2021; Silveira et al., 2019). يُعدّ ارتفاع الضغط الشرياني والميل للخثار عاملي خطورة بالغتي الأهمية في تطوّر احتشاء العضلة القلبية الحادّ acute myocardial infarction (AMI). ربط كل من Cambeir وزملائه (1994) و Chen وزملائه (2013) التعدد الشكلي I/D بالآلية الإراضية لتطوّر AMI وذلك نظراً لتعديلته فعالية ACE ومساهمته في الاستعداد لتشكّل العصيدة plaque



8.77، بفواصل موثوقية تتراوح بين 1.7-44.16 (Dai et al., 2016).

**الاستنتاجات Conclusions:**

(16.67%)، غير أنّ صغر حجم جمهرة مريضات الخثار، والذي اقتصر على ستة مريضات فحسب، يجعل من الضّروري التّروي في تفسير النتائج وعدم التّعميم قبل إجراء دراسةٍ مماثلة على جمهرة أكبر من مريضات ومريضى الخثار الوريدي. لم نلاحظ أي فروقات إحصائية هامة لدى مقارنة تواتر الأليلين D أو I بين جمهري الذكور الأصحاء والمريضى، الأمر الذي قد يقترح أسباباً أخرى للاستعداد لهذه الأمراض لدى الرجال. ونكمن المحدودية الأساس لدراستنا في صغر حجم العينة، الأمر الذي قد يحول دون ظهور الفروق الجوهرية في نسب انتشار الأليلين بين الجنسين وبين الجمهرات الفرعية المدروسة.

تبين دراستنا انتشاراً كبيراً نسبياً للأليل D في جمهرة من السوريين سواء الأصحاء أم مريضى ارتفاع التوتر الشرياني والخثار الوريدي، وذلك بالمقارنة مع نسب الانتشار العالمية. وعلى الرغم من التفاوت الملحوظ في نسبة انتشار الأليل D بين الذكور والإناث، إلا أنّ الفارق لم يكن معتدلاً به إحصائياً في جميع المقارنات عدا الفارق الذي سجّله دراستنا في مجموعة مريضات الخثار الوريدي، واللواتي انفردن بغلبةٍ للأليل I (66.67%) على الأليل D (33.33%) وللنمطين الجينيين II و ID (83.33%) بالمقارنة مع النمط الجيني DD

**التمويل:** هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

## References:

1. Algasham, Abdullah, Hisham Ismail, Moataz Dewaidar, and Ahmad A. Settin. 2009. "Methylenetetrahydrofolate Reductase and Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphisms Among Saudi Population from Qassim Region." *Https://Home.Liebertpub.Com/Gtmb* 13 (6): 817–20. <https://doi.org/10.1089/GTMB.2009.0019>.
2. Al-Hinai, Ali T., Mohammed O. Hassan, Mehmet Simsek, Hameeda Al-Barwani, and Riad Bayoumi. 2002. "Genotypes and Allele Frequencies of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Insertion/Deletion Polymorphism among Omanis." *SQU Journal for Scientific Research - Medical Sciences* 4 (1–2): 25. [/pmc/articles/PMC3174717/](https://doi.org/10.1089/GTMB.2009.0019).
3. Alsafar, Habiba, Ahmed Hassoun, Shaikha Almazrouei, Wala Kamal, Mustafa Almaini, Unini Odama, and Naushad Rais. 2015. "Association of Angiotensin Converting Enzyme Insertion-Deletion Polymorphism with Hypertension in Emiratis with Type 2 Diabetes Mellitus and Its Interaction with Obesity Status." *Disease Markers* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/536041>.
4. Bayoumi, Riad A., M. Simsek, Taher M. Yahya, Sheela Benedict, Ali Al-Hinai, Hameeda Al-Barwani, and M. O. Hassan. 2006. "Insertion-Deletion Polymorphism in the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Gene among Sudanese, Somalis, Emiratis, and Omanis." *Human Biology* 78 (1): 103–8. <https://doi.org/10.1353/HUB.2006.0022>.
5. Berdeli, Afig, and F. Sirri Cam. 2009. "Prevalence of the Angiotensin I Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in a Healthy Turkish Population." *Biochemical Genetics* 47 (5–6): 412–20. <https://doi.org/10.1007/S10528-009-9240-8>.
6. Brewster, Ursula C., and Mark A. Perazella. 2004. "The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney Disease." *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.09.034>.
7. Cambien, F, ; O Costerousse, ; L Tiret, ; O Poirier, ; L Lecerf, ; M F Gonzales, ; A Evans, et al. 1994. "Plasma Level and Gene Polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme in Relation to Myocardial Infarction." <http://circ.ahajournals.org/>.
8. Carluccio, M, M Soccio, and R De Caterina. 2001. "Aspects of Gene Polymorphisms in Cardiovascular Disease: The Renin-Angiotensin System The Renin-Angiotensin System(s) (RAS)." *Eur J Clin Invest*. Vol. 31.
9. Chen, Yu, Shiyang Dong, Mingfeng He, Tao Qi, and Wei Zhu. 2013. "Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism and Risk of Myocardial Infarction in an Updated Meta-Analysis Based on 34993 Participants." *Gene* 522 (2): 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.076>.
10. Dai, Shu Hong, Ji Fu Li, Jin Bo Feng, Rui Jian Li, Chuan Bao Li, Zhuo Li, Yun Zhang, and Da Qing Li. 2016. "Association of Serum Levels of AngII, KLK1, and ACE/KLK1 Polymorphisms with Acute Myocardial Infarction Induced by Coronary Artery Stenosis." *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 17 (2). <https://doi.org/10.1177/1470320316655037>.
11. Harrap, Stephen B., Christophe Tzourio, François Cambien, Odette Poirier, Segolene Raoux, John Chalmers, Neil Chapman, et al. 2003. "The ACE Gene I/D Polymorphism Is Not Associated with the Blood Pressure and Cardiovascular Benefits of ACE Inhibition." *Hypertension* 42 (3): 297–303. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000088322.85804.96>.
12. Kanugula, Ashok Kumar, Jasleen Kaur, Jaskaran Batra, Anvitha R Ankireddypalli, and Ravikanth Velagapudi. 2023. "Renin-Angiotensin System: Updated Understanding and Role in Physiological and Pathophysiological States." *Cureus*, June. <https://doi.org/10.7759/cureus.40725>.

13. Kenyon, Chris, and Anna Rosanas. 2020. "Could Malaria Explain the Global Distribution of the Angiotensin Converting Enzyme I/D Polymorphism? A Systematic Review and Ecological Study." *F1000Research* 9 (October): 1205. <https://doi.org/10.12688/f1000research.26719.1>.
14. Kondoh, Gen, Hiromasa Tojo, Yuka Nakatani, Nobuyasu Komazawa, Chie Murata, Kazuo Yamagata, Yusuke Maeda, et al. 2005. "Angiotensin-Converting Enzyme Is a GPI-Anchored Protein Releasing Factor Crucial for Fertilization." *NATURE MEDICINE* 11 (2). <http://www.nature.com/naturemedicine>.
15. Laila Purwaningroom, Dian, Mohammad Saifurrohman, Jayarani Fatimah Putri, and Mifetika Lukitasari. 2015. "Alteration of Splicing Pattern on Angiotensin-Converting Enzyme Gene Due to the Insertion of Alu Elements." *International Journal for Computational Biology (IJCB)* 4 (2): 53–58. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
16. Liu, Mingyu, Jian Yi, and Wenwen Tang. 2021. "Association between Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphism and Essential Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis." *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 22 (1). <https://doi.org/10.1177/1470320321995074>.
17. Nath, Manabesh, Shubham Misra, Pumanshi Talwar, Deepti Vibha, Achal Kumar Srivastava, Kameshwar Prasad, and Pradeep Kumar. 2021. "Association between Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Polymorphism with the Risk of Hemorrhagic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis of 53 Studies." *Gene* 790 (July): 145696. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2021.145696>.
18. Purwaningroom, Dian Laila, Mohammad Saifurrohman, Nashi Widodo, Jayarani Fatimah Putri, and Mifetika Lukitasari. 2015. "ALTERATION OF SPLICING PATTERN ON ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME GENE DUE TO THE INSERTION OF ALU ELEMENTS." *International Journal for Computational Biology* 4 (2): 53. <https://doi.org/10.34040/ijcb.4.2.2015.61>.
19. Ramezani, Mazaher, Elisa Zavattaro, and Masoud Sadeghi. 2020. "Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism and Susceptibility to Psoriasis: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMC Medical Genetics* 21 (1). <https://doi.org/10.1186/S12881-019-0943-3>.
20. Rigat, Brigitte, Christine Hubert, François Alhenc-Gelas, François Cambien, Pierre Corvol, and Florent Soubrier. 1990. "An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels." *The Journal of Clinical Investigation* 86 (4): 1343–46. <https://doi.org/10.1172/JCI114844>.
21. Saab, Y. B., P. R. Gard, and A. D.J. Overall. 2007. "The Geographic Distribution of the ACE II Genotype: A Novel Finding." *Genetics Research* 89 (4): 259–67. <https://doi.org/10.1017/S0016672307009019>.
22. Saadat, Mostafa. 2015. "Distribution of ACE Insertion/Deletion (I/D) Polymorphism in Iranian Populations." *Molecular Biology Research Communications* 4 (2): 63. [/pmc/articles/PMC5019291/](https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-99).
23. Salem, Abdel Halim, and Mark A. Batzer. 2009. "High Frequency of the D Allele of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene in Arabic Populations." *BMC Research Notes* 2: 99. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-99>.
24. Santos, Robson A. S., Walkyria Oliveira Sampaio, Andreia C Alzamora, Daisy Motta-Santos, Natalia Alenina, Michael Bader, and Maria Jose Campagnole-Santos. 2018. "THE ACE2/ANGIOTENSIN-(1-7)/MAS AXIS OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM: FOCUS ON ANGIOTENSIN-(1-7)." *Physiol Rev* 98: 505–53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016.-The>.
25. Seyed-Tabatabaei, F. A., B. A. Oostra, A. Isaacs, C. M. Van Duijn, and J. C.M. Witterman. 2006. "ACE Polymorphisms." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000223145.74217.e7>.
26. Silveira, L. C., E. G. da Silva, R. M. Azevedo, L. R.B. dos Anjos, R. F. Chagas, E. C. Alcântara, R. S. Santos, and A. A.S. Reis. 2019. "ACE Insertion/Deletion Polymorphism and Diabetic

- Nephropathy: An Evidence-Based Meta-Analysis.” *Genetics and Molecular Research* 18 (3). <https://doi.org/10.4238/gmr18378>.
27. Susilo, Hendri, Budi Susetyo Pikir, Mochammad Thaha, Mochamad Yusuf Alsagaff, Satriyo Dwi Suryantoro, Citrawati Dyah Kencono Wungu, Ifan Ali Wafa, Cennikon Pakpahan, and Delvac Oceandy. 2022. “The Effect of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) I/D Polymorphism on Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Cardiovascular Mortality Risk in Non-Hemodialyzed Chronic Kidney Disease: The Mediating Role of Plasma ACE Level.” *Genes* 13 (7). <https://doi.org/10.3390/GENES13071121>.
28. Verma, Sushma, Mohammad Abbas, Shrikant Verma, Faizan Haider Khan, Syed Tasleem Raza, Zeba Siddiqi, Israr Ahmad, and Farzana Mahdi. 2021. “Impact of I/D Polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme 1 (ACE1) Gene on the Severity of COVID-19 Patients.” *Infection, Genetics and Evolution* 91 (July): 104801. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2021.104801>.
29. Woods, David R., Steve E. Humphries, and Hugh E. Montgomery. 2000. “The ACE I/D Polymorphism and Human Physical Performance.” *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 11 (10): 416–20. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00310-6).

