



## بررسی ارتباط پلیمورفیسم‌های rs10244884 و rs1049305 با منوراژی نوجوانان

صفورا معدنی<sup>۱</sup>، شیرین شهبازی<sup>۲\*</sup>، رضا مهدیان<sup>۳</sup>، جواد علیزاده<sup>۴</sup>، زیور صالحی<sup>۵</sup>

- ۱- کارشناس ارشد زیست شناسی- ژنتیک، پردیس بین الملل، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- ۲- استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار گروه پزشکی مولکولی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، انتستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۵

### چکیده

**مقدمه:** آکواپورین‌ها کانال‌های آبی هستند که امکان عبور آب و دیگر مولکول‌ها را از غشا فراهم می‌کنند. بیان آکواپورین-۱ تحت تأثیر هورمون‌های جنسی بوده و باعث تغییر الگوی خونریزی‌های قاعده‌گی در زنان می‌شود. از آنجا که چند گونگی‌های ژنتیکی بر پروتئین‌های کدشونده تأثیرگذار هستند، مطالعه حاضر به بررسی ارتباط ۲ پلیمورفیسم ژن AQP-1 در بیماران مبتلا به منوراژی پرداخته است.

**روش بررسی:** در این تحقیق میزان و شدت خونریزی در ۳۷ نوجوان مبتلا به منوراژی در مقایسه با ۲۰ نوجوان سالم به عنوان گروه کنترل توسط پرسشنامه‌های استانداردسازی شده، ارزیابی گردید. پس از کسب رضایت و انجام خونگیری، DNA ژنومی استخراج و با روش‌های ARMS-PCR و PCR-RFLP ژنوتایپ گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرمافزار SPSS و آزمون آنالیز یک طرفه و آنالیز کای مرربع صورت گرفت.

**نتایج:** در آلل rs1049305 C minor فراوانی بیشتری در گروه بیماران نشان داد ( $0/37$  vs  $0/47$ ). با در نظر گرفتن ژنوتایپ CC به عنوان ژنوتایپ مرجع، مشخص شد که افراد هموژیگوت GG از شانس خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند (OR =  $0/482$ ). فراوانی rs10244884 تقریباً الگوی توزیع فراوانی مشابه‌ای داشته و مشخص شد افراد هموژیگوت TT و همچنین افراد هتروژیگوت CT شانس خطر کمتری (به ترتیب  $0/408$  و  $0/519$ ) برای ابتلا به منوراژی دارند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد هر دو پلیمورفیسم ژن AQP-1 در شانس ابتلا به منوراژی مؤثر می‌باشند که تأیید‌کننده نقش مهم این کانال انتقال آب در فیزیولوژی آندومتر و قاعده‌گی است.

**واژه‌های کلیدی:** آندومتر، آکواپورین-۱، ژن AQP-1، منوراژی، پلیمورفیسم

\* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۸۲۸۸۴۵۵۶-۰۲۱، پست الکترونیکی: sh.shahbazi@modares.ac.ir

## مقدمه

تمام انواع اندامها و بافت‌ها در سرتاسر بدن انسان بیان می‌گرددند. سوء عملکرد این پروتئین‌ها می‌تواند باعث ایجاد اختلال در بافت و نشانه‌های بالینی شود(۹).

آکواپورین-1 توسط زن AQP-1 که بر روی 7p14.3 دارد، رمز می‌گردد(۱۰). این پروتئین به صورت یک هموترامر بوده که شامل ۶ دومین Bilayer-spanning و ۲ ناحیه Exofacial potential N-glycosylation می‌باشد(۱۱). بر روی زن AQP-1 پلی‌مورفیسم‌های متعددی قرار دارد که در بیماران آنماقی‌های معده‌داری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در بیماران آنماقی‌سیکل سل که به عوارض عروقی دستگاه تناسلی مبتلا هستند، ارتباط معنی‌داری بین بروز اختلال و پلی‌مورفیسم rs10244884 مشاهده گردید(۱۲). این پلی‌مورفیسم به صورت تغییر C/T بوده که در اغلب جوامع، نسبت دو آلل تقریباً برابر می‌باشد. این تغییر تک نوکلوتیدی در پایین دست زن AQP-1 قرار گرفته است. پلی‌مورفیسم rs1049305 نیز تغییر تک نوکلوتیدی C/G می‌باشد که توزیع فراوانی وابسته به جمعیت داشته و میزان Minor Allele Frequency آن از ۰/۲۰ تا ۰/۵۰ متغیر بوده است. این پلی‌مورفیسم که در ناحیه ۳'-UTR زن قرار گرفته است، اخیراً در تحقیقات سیروز کبدی مطالعه گردیده است. مشاهده شد که افراد با ژنتیپ CC به طور معنی‌داری سطح پلاسمایی سدیم پایین‌تری نسبت به ژنتیپ‌های دیگر دارند(۱۳). همچنین مطالعات Sport Medicine نشان داد که ورزشکاران واجد ژنتیپ CC از ورزشکاران ژنتیپ‌های دیگر بیشتر در هنگام تعریق آب از دست می‌دهند(۱۴).

همانگونه که اشاره شد، برای اولین بار Mints و همکاران نشان دادند که در آندومتریوم انسان، AQP1 در آنژیوژنر و تغییر رگ‌های خونی شرکت کرده و در پاتوژنر خونریزی‌های شدید ایدیوپاتیک نیز دخالت دارد(۷). از آنجا که تحقیقات بر نقش بیان زن AQP-1 در فیزیولوژی آندومتر تأکید داشته‌اند و با توجه به مطالعات ذکر شده که برای پلی‌مورفیسم‌های این زن عملکرد تأثیرگذار گزارش کرده‌اند، ضرورت انجام تحقیقی در

دیواره رحمی از سه لایه تشکیل شده که آندومتر (بافت مخاطی رحم) داخلی‌ترین قسمتی است که با حفره رحمی در ارتباط است و آن را می‌پوشاند. آندومتر تغییرات ساختاری را در طی سیکل قاعدگی متحمل می‌شود. این تغییرات توسط هورمون‌های استروژن و پروژسترون، به عنوان یک آماده‌سازی برای لانه گرینی تخمک لقادح یافته، القا می‌شود(۱). در صورت عدم لانه گرینی در انتهای هر سیکل قاعدگی، آندومتر تکثیر شده با قطع هورمون‌ها ریزش کرده و باعث بروز خونریزی می‌شود(۲،۳).

منوراژی به سیکل‌های قاعدگی سنگین برای چندین دوره پی در پی که طی آن مقدار خونریزی افزایش یافته یا بیش از ۸۰ سی سی در هر سیکل باشد، اطلاق می‌گردد. این عارضه یکی از شایع‌ترین (۷۴/۴٪) علل کم خونی فقر آهن در زنان است که باعث کاهش کیفیت و تهدیدی برای زندگی فردی و اجتماعی آنان محسوب می‌شود(۴).

عوامل مختلفی در پاتوژنر منوراژی مطرح می‌باشند که تغییرات هورمونی عمدۀ این عوامل را تشکیل می‌دهد. تغییرات در روند آنژیوژنر که در رشد و ترمیم آندومتر نقش اساسی دارد نیز از دیگر عوامل مطرح شده می‌باشد. آکواپورین-1، یک کانال آب است که در آندوتلیوم عروقی بیان شده و اهمیت آن در اختلالات آنژیوژنر تومورها مشخص شده است(۵). این پروتئین‌های همچنین در مهاجرت سلولی که علاوه بر آنژیوژنر در پدیده‌های بیولوژیک دیگر مثل بھبود زخم و انتشار تومور نیز دیده می‌شوند، نقش ایفا می‌کند(۶). از آنجا که یک مکانیسم احتمالی برای منوراژی ایدیوپاتیک می‌تواند یک آنژیوژنر ناقص و معیوب و فقدان تمامیت ساختاری مویرگ‌ها باشد، بررسی‌ها بر روی عملکرد آکواپورین-1 در آنژیوژنر آندومتریال متمرکز شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که بیان زن AQP-1 در منوراژی ایدیوپاتیک کاهش می‌یابد(۷).

به طور کلی آکواپورین‌ها وظیفه نگهداری از محیط داخل سلولی به وسیله تنظیم تعادل آب و یون‌ها به عهده دارند(۸) تاکنون ۱۳ آکواپورین در پستانداران شناخته شده است که در

پلکس با پرایمرهای اختصاصی خارجی جهت تکثیر قطعه کنترل به طول ۶۷۵ جفت باز و پرایمرهای اختصاصی داخلی آلل C به طول ۲۳۲ جفت باز و آلل G به طول ۴۷۶ جفت باز انجام گردید(۱۴). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با ۱/۵ میلی مolar MgCl<sub>2</sub>, ۰/۲ میلی مolar dNTPs و ۱ واحد آنزیم Taq Polymerase می‌باشد، صورت پذیرفت. همچنین ۴ پرایم هر کدام در حجم نهایی ۰/۴ میلی مolar و ۴۰ نانوگرم PCR DNA الگو، به واکنش اضافه گردید. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مورد بررسی و آشکارسازی باندها توسط دستگاه Gel Documentation شرکت VILBER (VILBER Gel Documentation) انجام شد.

ژنتایپینگ rs10244884 نیز با روش جهت بررسی پلی مورفیسم تک نوکلوتیدی C/T انجام گردید. ابتدا ناحیه مورد نظر از نظر وجود آنزیم برش دهنده در سایت Webcutter 2.0 مورد بررسی قرار گرفت و آنزیم TaqI برای برش انتخاب گردید. سپس پرایمها با استفاده از نرم افزار Oligo express Blast طراحی گردید و اختصاصی بودن آنها در وب سایت مورد تأیید قرار گرفت.

پرایمراهای مستقیم و معکوس تکثیر پلی مورفیسم rs10244884 به شرح ذیل می‌باشد.

Taq-F: ATA GGT GCC ACC CAT GCT CC

Taq-R: GCC TCT GCT CTG CTG ACT CG

واکنش PCR با مقادیر زیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر صورت پذیرفت: (GenetBio 2X PCR master mix) ۱/۵ میلی مolar، dNTPs با غلظت MgCl<sub>2</sub> با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مolar و ۱ واحد آنزیم Taq polymerase. پرایمراهای Forward و Reverse هر کدام با غلظت نهایی ۰/۴ میلی مolar و ۴۰ نانوگرم DNA الگو. برنامه PCR با واسرشنتسازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد سیکل با برنامه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۱ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه PCR محصول شرکت ABI ترتیب گردید. سپس محصولات حاصل از

خصوص توزیع پلی مورفیسم‌های این ژن در بیماران منوراژی احساس گردید. به این ترتیب در مطالعه حاضر پلی مورفیسم‌های ژن AQP-1 در بیماران منوراژی بررسی شد که در نوع خود برای اولین بار انجام گرفته است.

### روش بررسی

در این مطالعه که به صورت مورد - شاهدی طراحی گردیده بود، ۳۷ نوجوان با شکایت منوراژی و ۴۰ نوجوان سالم به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند و تعدادی از آنها واحد شرایط شرکت در مطالعه شناخته نشده و از مطالعه کنار گذاشته شدند. دلایل خروج از مطالعه شامل: گزارش مشکلات دیگر قاعده‌گی مانند ابتلا به بیماری‌های دیگر، تأخیر قاعده‌گی در چند ماه اخیر، سندروم پیش از قاعده‌گی و قاعده‌گی دردناک بود.

بیماران با همکاری مریبان بهداشت دبیرستان محل تحصیل‌شان در تهران شناسایی و جهت بررسی‌های بیشتر با همکاری والدین به مراکز درمانی ارجاع داده شدند. محدوده سنی در بیماران و گروه شاهد دختران ۱۵-۱۸ سال بود. برای همسان‌سازی نمونه‌ها، گروه کنترل از میان همکلاسی‌های گروه بیماران انتخاب شدند. حجم نمونه با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۸۰٪ و با کمک نرم افزار EPI Info تعیین گردید.

با کمک پرسشنامه‌ای که به تأیید متخصص زنان و هماتولوژی رسیده بود، اطلاعات اولیه از هر دو گروه جمع‌آوری گردید. پرسشنامه با محوریت طول دوره، میزان و فواصل خونریزی طراحی شده بود.

موضوع تحقیق به تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه گیلان رسید و فرم رضایت نامه کتبی از بیماران تهیه و تنظیم شد. پس از کسب رضایت، ۳-۲ میلی لیتر خون افراد در لوله‌های استریل حاوی EDTA جهت استخراج DNA جمع‌آوری شد. استخراج DNA توسط روش Salting-out و بر اساس پروتکل مربوطه صورت گرفت.

سپس غلظت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودرایپ و الکتروفورز آگارز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین ژنتیک rs1049305 با استفاده از واکنش PCR Tetra Primer ARMS- PCR مولتی

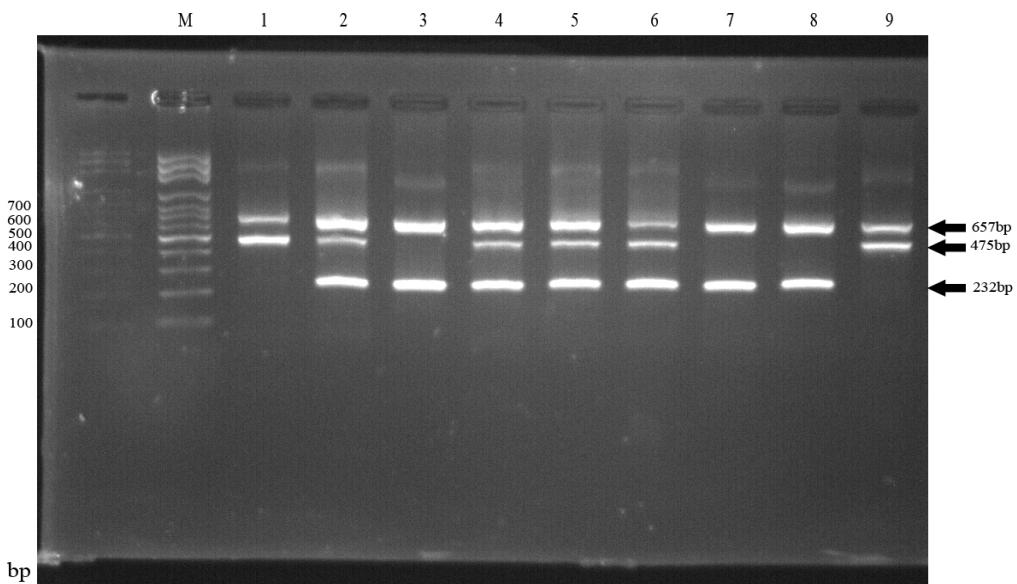
C/G با کمک روش Tetra Primer ARMS تکثیر گردید(۱۴). همانگونه که در شکل ۱ مشخص شده است. همه افراد دارای باند کنترل ۶۷۵ جفت بازی بودند و افراد هموژیگوت GG باند ۴۷۶ و افراد هموژیگوت CC باند ۲۳۲ و افراد هتروژیگوت دو باند ۴۷۶ و ۲۳۲ را نشان دادند. به طور تصادفی تعدادی از نمونه‌ها جهت انجام تعیین تولی انتخاب گردیدند. قطعات با طول FIPC و ROP و قطعات FOP است و قطعات تکثیر شده با طول RIPG ۶۵۷bp مربوط به ناحیه تکثیر شده با پرایمرهای FOP و ROP است که در Master mix مولتی پلکسی از هر ۴ پرایمر استفاده شده است. نمودار الکتروفوروگرام ژنوتیپ‌های مختلف در شکل ۲ قابل مشاهده است.

PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید جهت انجام RFLP با آنزیم TaqI (Metabion)، محصولات PCR طبق دستور راهنمای صورت Overnight با آنزیم انکوبه شده سپس بر روی ژل آگارز ۳٪ مشاهده گردیدند. به منظور تأیید تشخیص، تعدادی از نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی گردیدند.

توزیع ژنوتیپی به طور متوسط ۵۰٪ برای هر ال در نظر گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند. جهت مقایسه گروه‌ها در مورد داده‌های کمی از آنالیز واریانس یکطرفه و در مورد داده‌های کیفی از آنالیز کای مرربع استفاده شد.

## نتایج

ناحیه حاوی پلیمورفیسم rs1049305 تک نوکلئوتیدی

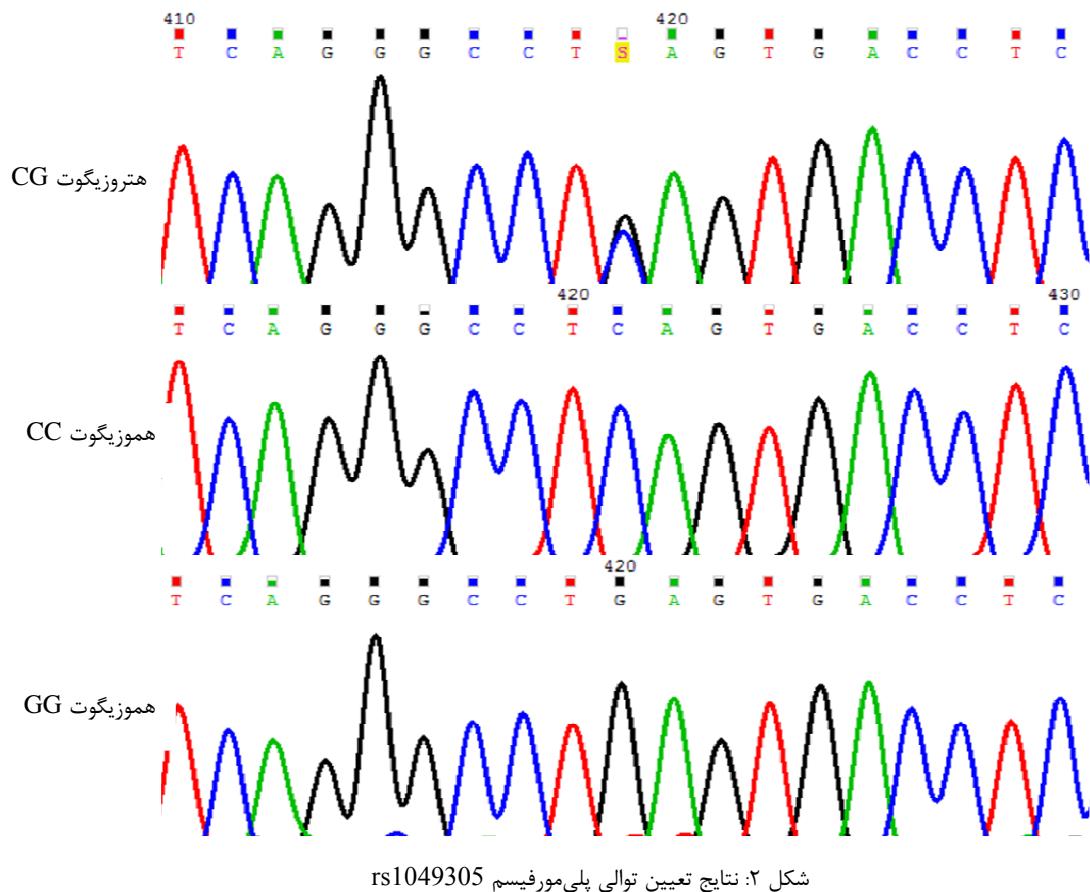


شکل ۱) ژل اگارز ۱/۵٪ مربوط به الکتروفورز محصولات واکنش ARMS-PCR

ستون M نشان دهنده مارکر ۱۰۰bp است. ستون‌های ۱ و ۹ مربوط به نمونه هموژیگوت با ژنوتیپ GG و ستون‌های ۲ و ۴ و ۵ و ۶ مربوط به نمونه هتروژیگوت با ژنوتیپ GC و ستون‌های ۳ و ۷ و ۸ مربوط به نمونه هموژیگوت با ژنوتیپ CC است.

ژنوتیپ rs1049305 با در نظر گرفتن ژنوتیپ CC به عنوان ژنوتیپ مرجع، افراد هموژیگوت GG از شانس خطر کمتری برای ابتلاء به منوراژی برحوردارند ( $Odds = ۰/۰۹۲$ ,  $CI = ۰/۰۹۰ - ۰/۱۰۰$ ) و افراد هتروژیگوت GC شانس خطر مشابه‌ای برای ابتلاء به منوراژی دارند ( $Odds Ratio = ۱$ ,  $CI = ۰/۲۱۰ - ۰/۲۱۰$ ).

آنالیزهای آماری نشان داد فرکانس آل G در گروه بیمار ۰/۵۳٪ و در گروه کنترل ۰/۶۳٪ بوده است. همچنین فرکانس آل C در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۰/۴۷٪ و ۰/۳۷٪ بودند. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های سه گانه این پلیمورفیسم در جدول ۱ آورده شده است. با آنالیز آماری مرربع کای مشخص شد که در

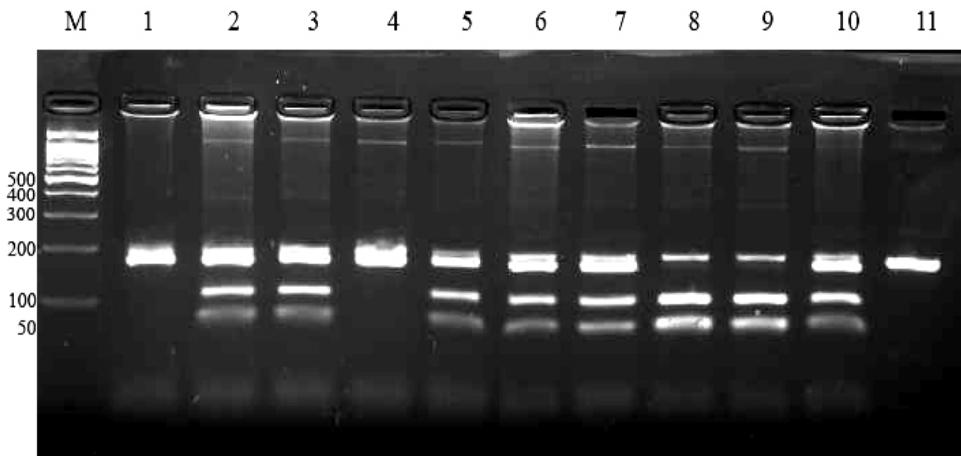


جدول ۱: فراوانی انواع ژنوتیپ در بررسی پلی مورفیسم rs1049305

کل	rs1049305			تعداد کل
	CC	GC	GG	
تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
۳۷ (۱۰۰)	۷ (۱۸/۹)	۲۱ (۵۶/۸)	۹ (۲۴/۳)	انواع ژنوتیپ برای نمونه‌های بیمار
۲۰ (۱۰۰)	۳ (۱۵)	۹ (۴۵)	۸ (۴۰)	انواع ژنوتیپ برای نمونه‌های کنترل
۵۷	۱۰	۳۰	۱۷	

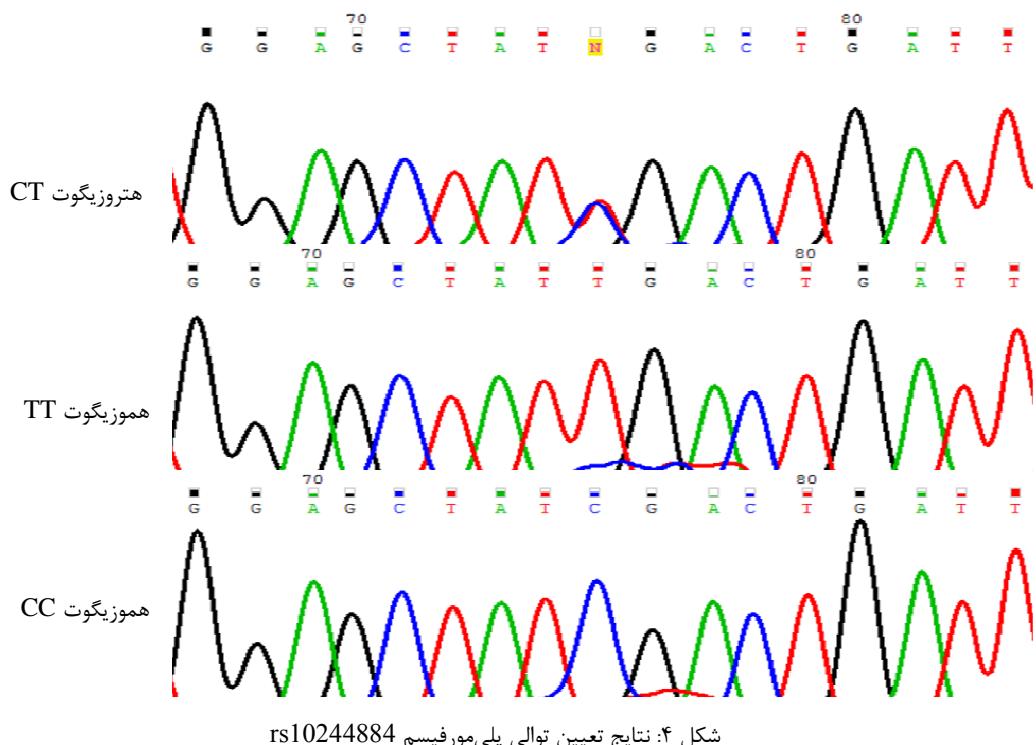
بازی، هموزیگوت‌های CC دو باند برش خورده حدوداً ۱۰۶ و ۶۶ جفت بازی و هتروزیگوت‌ها هر سه باند را نشان دادند. لازم به ذکر است بعد از هضم آنزیمی یک قطعه ۲۰ جفت بازی هم ایجاد می‌شود که بر روی ژل قابل شناسایی نیست و حذف می‌گردد. به طور تصادفی تعدادی از نمونه‌ها جهت انجام تعیین تولی انتخاب گردیدند. نمودار الکتروفوروگرام ژنوتیپ‌های مختلف این پلی مورفیسم در شکل ۴ مشاهده می‌شود.

ناحیه حاوی پلی مورفیسم rs10244884 تک نوکلئوتیدی C/T با کمک روش PCR-RFLP تکثیر گردید. بعد از بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز و اطمینان از وجود باند تکی ۱۹۲ جفت بازی محصولات تحت اثر آنزیم قرار گرفتند. محصولات برش خورده بر روی ژل آگارز ۳٪ مورد بررسی قرار گرفتند. همانگونه که در شکل ۳ مشخص است نمونه‌های هموزیگوت TT یک باند برش نخورده ۱۷۲ جفت



شکل ۳: نتایج PCR-RFLP بر روی ژل آگارز٪/۳

ستون M مارکر bp ۱۰۰-ستون های ۱ و ۴ و ۱۱ هموزیگوت TT با باند برش نخورده ۱۷۲ جفت باز-ستون های ۸ و ۹ هموزیگوت CC با باندهای ۱۰۶ و ۶۶ جفت باز - ستون های ۲ و ۳ و ۵ و ۶ و ۷ و ۱۰ هتروزیگوت CT با هر سه باند



شکل ۴: نتایج تعیین توالی پلی‌مورفیسم

مشخص شد که در ژنتیپ rs10244884 با در نظر گرفتن ژنتیپ CC به عنوان ژنتیپ مرجع، افراد هموزیگوت TT خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند (Odds Ratio=۰/۰۶۵, CI=۰/۰۴۰-۰/۰۸), و هتروزیگوت CT از شانس خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند (Odds Ratio=۰/۰۵۱۹, CI=۰/۰۹۲-۰/۰۵۱).

آنالیزهای آماری نشان داد فرکانس آلل G در گروه بیمار ۰/۵۴ و در گروه کنترل ۰/۶۳ بوده است. همچنین فرکانس آلل C در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۳۷ بودند. توزیع فراوانی ژنتیپهای سه گانه این پلی‌مورفیسم در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از آزمون آماری مربع کای

جدول ۲: فراوانی انواع ژنوتیپ در بررسی پلی‌مورفیسم rs10244884

کل	rs1024484			
	CC	CT	TT	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
انواع ژنوتیپ برای نمونه‌های بیمار	۳۷ (۱۰۰)	۷ (۱۸/۹)	۲۰ (۵۴/۱)	۱۰ (۲۷)
انواع ژنوتیپ برای نمونه‌های کنترل	۲۰ (۱۰۰)	۲ (۱۰)	۱۱ (۵۵)	۷ (۳۵)
تعداد کل	۵۷	۹	۳۱	۱۷

### بحث و نتیجه گیری

با استناد به این مطالب و فرضیات در نظر گرفته شده، بررسی انتشار آکواپورین-۱ در آندومتریوم منوراژیک در مقایسه با آندومتریوم نرمال صورت پذیرفته است. در مطالعات اخیر مشخص شد که بیان AQP-1 در فاز تولید مثلی و ترشحی آندومتریوم مشابه است(۲۱). اگرچه مطالعات بر روی تنظیم هورمونی آکواپورین-۱ با هم مغایر است؛ بعضی وابستگی به استروژن را نشان می‌دهند در حالی که سایر آنها اینطور نیستند(۲۲). مطالعه‌ای نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بیان AQP-1 نزدیک به انتهای سیکل و وابسته به تنظیم پروژسترون افزایش پیدا می‌کند. در این مطالعه Richards و همکاران متوجه شدند که بیان AQP-1 در لایه سلولی داخلی میومتریوم در رحم موش بعد از اثر استروژن، افزایش پیدا کرده است(۲۳). بیان AQP-1 هم در رحم انسان و هم در رحم موش گزارش شده که این بیان تنها در سلول‌های اندوتیال اتفاق می‌افتد. در اخیرین مطالعات انجام شده، نمونه‌های بیوپسی‌ای که در طی سطوح مختلف فاز ترشحی به دست آمده بودند، نشان‌دهنده هیچ تفاوت معنی‌دار آماری در رنگ‌آمیزی آکواپورین-۱ نبودند. جالب است که سطوح mRNA AQP-1 در طی فاز ترشحی افزایش یافته بود(۷).

به علاوه فرض می‌شود که سطوح کاهش یافته آکواپورین-۱ در مطالعات دلیلی بر انتقال ترنس اندوتیال تغییر یافته بر اساس تغییرات در نفوذپذیری است(۲۴). حضور آکواپورین-۱ در رگ‌های خونی اندوتیال، درگیری در تنظیم آنژیوژن در آندومتریوم انسانی را پیشنهاد می‌کند. بنابراین، آنژیوژن ناجا و ناقص در بیماران با خونریزی شدید رحمی می‌تواند مربوط به

آکواپورین-۱ در رگ‌ها و شرایط بحرانی برای آنژیوژن بیان می‌شود و به همین دلیل نقص و سوء عملکرد آن در آنژیوژن، یک دلیل محتمل برای بروز منوراژی ایدیوپاتیک می‌باشد(۷). آنژیوژن بیشترین اهمیت را برای بازسازی آندومتر دارد، اگرچه هنوز اطلاعات کمی راجع به اینکه Timing و مکانیسم تشکیل رگ‌های جدید چیست، وجود دارد(۱۵). برای مطالعه آنژیوژن در محیط In Vivo، غشاء کوریوآلاتئیک جنین جوجه بررسی شد با این نتیجه که پتانسیل آنژیوژنیک در سرتاسر سیکل قاعدگی وجود دارد(۱۶). رگ‌های خونی قطع شده در طی فاز قاعدگی و بعد از آن در طی فاز تولید مثلی ترمیم می‌شوند و رشد آندومتریوم توسط تشکیل رگ‌های جدید حمایت می‌شود. فاز ترشحی به وسیله تمایز مشخص می‌شود، که شامل تشکیل شریان‌های مارپیچی و شبکه مؤین زیر اپی‌تلیال است. مهاجرت سلول‌های اندوتیال طی فاز اولیه و میانه‌انتها به اوچ می‌رسد(۱۷). باید توجه داشت تراکم رگی هم در گروه خانم‌ها با خونریزی نرمال و هم در بیمارانی که با خونریزی قاعدگی شدیدی مواجه‌اند در سرتاسر سیکل پایدار است(۱۸). خونریزی شدید رحمی با آنژیوژن ناجا ارتباط دارد که به عنوان مثال با افزایشی در تکثیر سلول‌های اندوتیال خود را نشان می‌دهد. یکی از مطالعات قبلی مشخص کرد که ارتباطی بین ناهنجاری عروقی آندومتریوم و منوراژی وجود دارد(۱۹). مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد آکواپورین-۱ نقشی در فرآیند آنژیوژن ایفا می‌کند، به عنوان مثال در موش‌های knock-out AQP-1 برای، مشخص شده که این پروتئین در آنژیوژن و مهاجرت سلولی اندوتیال دخالت دارد(۲۰).

شانس خطر بالاتر ابتلا به منوراژی را در بعضی ژنتیک‌ها نشان دادند. برای تأیید دقیق این نتایج پیشنهاد می‌شود مطالعه با حجم نمونه بالاتر و به همراه مطالعات عملکردی صورت پذیرد تا نقش اساسی این پلی‌مورفیسم‌ها بهتر روشن گردد.

#### سپاسگزاری

از تمام عزیزانی که در انجام این پروژه ما را یاری کردند قدردانی می‌شود.

آکوپورین-1 باشد.

پلی‌مورفیسم‌های ژنی بر میزان بیان و عملکرد آنها تأثیرگذار هستند. در خصوص ژن AQP-1 مطالعات بسیار ناقص و کم صورت گرفته است. با توجه به روشن شدن نقش این کانال آب در روند آنژیوژنی و منوراژی، برای اولین بار در مطالعه حاضر دو پلی‌مورفیسم این ژن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر ارتباطی بین منوراژی و این چندگانگی‌ها مشاهده کرد. اگرچه این نتایج از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار نبودند، اما

#### References:

- 1- Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. *The normal menstrual cycle in women*. Anim Reprod Sci 2011; 124(3-4):229-36.
- 2- O'Connor KA, Holman DJ, Wood JW. *Menstrual cycle variability and the perimenopause*. Am J Hum Biol 2001; 13(4): 465-78.
- 3- Shirtcliff EA, Reavis R, Overman WH, Granger DA. *Measurement of gonadal hormones in dried blood spots versus serum: verification of menstrual cycle phase*. Horm Behav 2001; 39(4): 258-66.
- 4- Gallagher JR. *Dysmenorrhea and menorrhagia in adolescence*. Conn State Med J 1955; 19(6): 469-71.
- 5- Agre P, Kozono D. *Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases*. FEBS Lett 2003; 555(1): 72-8.
- 6- Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P. *Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine*. J Clin Invest 2002; 109(11): 1395-99.
- 7- Mints M, Hildenbrand A, Lalitkumar LP, Andersson S, Nielsen S, Gemzell-Danielsson K, et al. *Expression of aquaporin-1 in endometrial blood vessels in menorrhagia*. Int J Mol Med 2007; 19(3): 407-11.
- 8- Knepper MA. *The aquaporin family of molecular water channels*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(14): 6255-58.
- 9- Knoers NV, Deen PM. *Aquaporin molecular biology and clinical abnormalities of the water transport channels*. Curr Opin Pediatr 1998; 10(4): 428-34.
- 10- Deen PM, Weghuis DO, Geurs van Kessel A, Wieringa B, van Os CH. *The human gene for water channel aquaporin 1 (AQP1) is localized on chromosome 7p15->p14*. Cytogenet Cell Genet 1994; 65(4): 243-46.
- 11- Campbell EM, Birdsall DN, Yool AJ. *The activity of human aquaporin 1 as a cGMP-gated cation channel is regulated by tyrosine phosphorylation in the carboxyl-terminal domain*. Mol Pharmacol 2012; 81(1): 97-105.

- 12-** Elliott L, Ashley-Koch AE, De Castro L, Jonassaint J, Price J, Ataga KI, et al. *Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease.* Br J Haematol 2007; 137(3): 262-67.
- 13-** Fabrega E, Berja A, Garcia-Unzueta MT, Guerra-Ruiz A, Cobo M, Lopez M, et al. *Influence of aquaporin-1 gene polymorphism on water retention in liver cirrhosis.* Scand J Gastroenterol 2011; 46(10): 1267-74.
- 14-** Rivera MA, Martinez JL, Carrión A, Fahey TD: *AQP-1 association with body fluid loss in 10-km runners.* Int J Sports Med 2011; 32(3): 229-33.
- 15-** Gargett CE, Rogers PA. *Human endometrial angiogenesis.* Reproduction 2001; 121(2): 181-86.
- 16-** Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker Boudier HA, Evers JL. *Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle.* Hum Reprod 2001; 16(8): 1557-61.
- 17-** Rogers PA, Abberton KM, Susil B. *Endothelial cell migratory signal produced by human endometrium during the menstrual cycle.* Hum Reprod 1992; 7(8): 1061-66.
- 18-** Rees MC, Dunnill MS, Anderson AB, Turnbull AC. *Quantitative uterine histology during the menstrual cycle in relation to measured menstrual blood loss.* Br J Obstet Gynaecol 1984; 91(7): 662-66.
- 19-** Hildenbrand A, Stavreus-Evers A, Lalitkumar PG, Nielsen S, Mints M, Gemzell-Danielsson K. *Aquaporin 1 is expressed in the human endometrium during normal cycle and increases after mifepristone treatment.* Int J Mol Med 2008; 22(1): 49-53.
- 20-** Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. *Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption.* Nature 2005; 434(7034): 786-92.
- 21-** Sun CC, Feng C, Zhou CY, Huang HF. *Expression profile of aquaporin 1 in patients with menorrhagia.* Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2007; 36(5): 433-38.
- 22-** Lindsay LA, Murphy CR. *Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy.* Reproduction 2006; 131(2): 369-78.
- 23-** Richard C, Gao J, Brown N, Reese J. *Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse.* Endocrinol 2003; 144(4): 1533-41.
- 24-** Feng C, Sun CC, Wang TT, He RH, Sheng JZ, Huang HF. *Decreased expression of endometrial vessel AQP1 and endometrial epithelium AQP2 related to anovulatory uterine bleeding in premenopausal women.* Menopause 2008; 15(4 Pt 1): 648-54.

## ***Investigating the Correlation between rs1049305 and rs10244884 Polymorphisms of AQP-1 Gene and Menorrhagia in Adolescents***

**Madani S(MSc)<sup>1</sup>, Shahbazi Sh(PhD)<sup>\*2</sup>, Mahdian R(MSc)<sup>3</sup>, Alizadeh J(MSc)<sup>4</sup>, Salehi Z(PhD)<sup>5</sup>**

<sup>1-5</sup>Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran

<sup>2</sup>Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

**Received:** 15 Jun 2013

**Accepted:** 5 Dec 2013

### **Abstract**

**Introduction:** Aquaporins (AQPs) are water channels present in the cell wall, allowing water – and occasionally other molecules – to pass the cell membrane. Their function is to maintain the internal milieu cells by regulating water and ion equilibrium. The endometrium undergoes structural changes during the menstrual cycle. If implantation does not occur at the end of each menstrual cycle, amplified endometrium is shed in absence of hormones and leads to bleeding. Excessive uterine bleeding over 80 cc in each menstrual cycle called menorrhagia, is a common gynecological disorder which causes large menstrual bleedings and reduced quality of life for those affected.

**Methods:** The study included 37 patients with menorrhagia and 20 healthy individuals. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and Genotypes were determined by ARMS-PCR and PCR-RFLP .Statistical analysis was performed using the SPSS program.

**Results:** Regarding rs1049305, the C minor allele showed more frequency in patients' group (0.47 vs. 0.37). The results revealed that GG genotype presents less probable risk for menorrhagia. rs10244884 also shows the same frequency.

**Conclusion:** It can be concluded that both variants are important in pathogenesis of menorrhagia and the results confirm the important role of Aquaporin–1 channel in menstruation as well as endometrium physiology.

**Keywords:** AQP-1 gene; Endometrium; Menorrhagia; Polymorphism

**This paper should be cited as:**

Madani S, Shahbazi Sh, Mahdian R, Alizadeh J, Salehi Z. *Investigating the correlation between rs1049305 and rs10244884 polymorphisms of AQP-1 gene and menorrhagia in adolescents*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 21(6): 766-75.

**\*Corresponding author:** Tel: +98 21 82884556, Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir