



بررسی ارتباط پلی مورفیسم های rs1049305 و rs10244884 ژن AQP-1 با منوراژی نوجوانان

صفورا معدنی^۱، شیرین شهبازی^{۲*}، رضا مهدیان^۳، جواد عزیزاده^۴، زیور صالحی^۵

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، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، انستیتو 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: آکواپورین ها کانال های آبی هستند که امکان عبور آب و دیگر مولکول ها را از غشا فراهم می کنند. بیان آکواپورین-۱ تحت تأثیر هورمون های جنسی بوده و باعث تغییر الگوی خونریزی های قاعدگی در زنان می شود. از آنجا که چند گونه های ژنتیکی بر پروتئین های کدشونده تأثیرگذار هستند، مطالعه حاضر به بررسی ارتباط ۲ پلی مورفیسم 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 پرسشنامه های استانداردسازی شده، ارزیابی گردید. پس از کسب رضایت و انجام خونگیری، DNA ژنومی استخراج و با روش های ARMS-PCR و PCR-RFLP ژنوتایپ گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز یک طرفه و آنالیز کای مربع صورت گرفت.

نتایج: در rs1049305 آلل C minor فراوانی بیشتری در گروه بیماران نشان داد (۰/۴۷ vs ۰/۳۷). با در نظر گرفتن ژنوتیپ CC به عنوان ژنوتیپ مرجع، مشخص شد که افراد هموزیگوت GG از شانس خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند (OR=۰/۴۸۲). فراوانی rs10244884 تقریباً الگوی توزیع فراوانی مشابهی داشته و مشخص شد افراد هموزیگوت TT و همچنین افراد هتروزیگوت CT شانس خطر کمتری (به ترتیب ۰/۴۰۸ و ۰/۵۱۹) برای ابتلا به منوراژی دارند. نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد هر دو پلی مورفیسم ژن AQP-1 در شانس ابتلا به منوراژی مؤثر می باشند که تأییدکننده نقش مهم این کانال انتقال آب در فیزیولوژی آندومتر و قاعدگی است.

واژه های کلیدی: آندومتر، آکواپورین-۱، ژن AQP-1، منوراژی، پلی مورفیسم

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

مقدمه

دیواره رحمی از سه لایه تشکیل شده که آندومتر (بافت مخاطی رحم) داخلی ترین قسمتی است که با حفره رحمی در ارتباط است و آن را می پوشاند. آندومتر تغییرات ساختاری را در طی سیکل قاعدگی متحمل می شود. این تغییرات توسط هورمون های استروژن و پروژسترون، به عنوان یک آماده سازی برای لانه گزینی تخمک لقاح یافته، القا می شود (۱). در صورت عدم لانه گزینی در انتهای هر سیکل قاعدگی، آندومتر تکثیر شده با قطع هورمون ها ریزش کرده و باعث بروز خونریزی می شود (۲،۳).

منوراژی به سیکل های 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 می گردد. این عارضه یکی از شایع ترین (۷۴/۴٪) علل کم خونی فقر آهن در زنان است که باعث کاهش کیفیت و تهدیدی برای زندگی فردی و اجتماعی آنان محسوب می شود (۴).

عوامل مختلفی در پاتوژنز منوراژی مطرح می باشند که تغییرات هورمونی عمده این عوامل را تشکیل می دهد. تغییرات در روند آنژیوژنز که در رشد و ترمیم آندومتر نقش اساسی دارد نیز از دیگر عوامل مطرح شده می باشد. آکوپورین -۱، یک کانال آب است که در اندوتلیوم عروقی بیان شده و اهمیت آن در اختلالات آنژیوژنز تومورها مشخص شده است (۵). این پروتئین همچنین در مهاجرت سلولی که علاوه بر آنژیوژنز در پدیده های بیولوژیک دیگر مثل بهبود زخم و انتشار تومور نیز دیده می شوند، نقش ایفا می کند (۶). از آنجا که یک مکانیسم احتمالی برای منوراژی ایدیوپاتیک می تواند یک آنژیوژنز ناقص و معیوب و فقدان تمامیت ساختاری مویرگ ها باشد، بررسی ها بر روی عملکرد آکوپورین -۱ در آنژیوژنز آندومتریال متمرکز شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که بیان ژن AQP-1 در منوراژی ایدیوپاتیک کاهش می یابد (۷).

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

تمام انواع اندام ها و بافت ها در سرتاسر بدن انسان بیان می گردند. سوء عملکرد این پروتئین ها می تواند باعث ایجاد اختلال در بافت و نشانه های بالینی شود (۹).

آکوپورین -۱ توسط ژن AQP-1 که بر روی 7p14.3 قرار دارد، رمز می گردد (۱۰). این پروتئین به صورت یک هموترامر بوده که شامل ۶ دومین Bilayer-spanning و ۲ ناحیه Exofacial potential N-glycosylation می باشد (۱۱). بر روی ژن AQP-1 پلی مورفیسم های متعددی قرار دارد که در بیماری های معدودی مورد مطالعه قرار گرفته اند. در بیماران آئمی سیکل سل که به عوارض عروقی دستگاه تناسلی مبتلا هستند، ارتباط معنی داری بین بروز اختلال و پلی مورفیسم rs10244884 مشاهده گردید (۱۲). این پلی مورفیسم به صورت تغییر C/T بوده که در اغلب جوامع، نسبت دو آلل تقریباً برابر می باشد. این تغییر تک نوکلئوتیدی در پایین دست ژن AQP-1 قرار گرفته است. پلی مورفیسم rs1049305 نیز تغییر تک نوکلئوتیدی C/G می باشد که توزیع فراوانی وابسته به جمعیت داشته و میزان Minor Allele Frequency آن از ۰/۲۰ تا ۰/۵۰ متغیر بوده است. این پلی مورفیسم که در ناحیه 3'-UTR ژن قرار گرفته است، اخیراً در تحقیقات سیروز کبدی مطالعه گردیده است. مشاهده شد که افراد با ژنوتیپ CC به طور معنی داری سطح پلاسمایی سدیم پایین تری نسبت به ژنوتیپ های دیگر دارند (۱۳). همچنین مطالعات Sport Medicine نشان داد که ورزشکاران واجد ژنوتیپ CC از ورزشکاران ژنوتیپ های دیگر بیشتر در هنگام تعریق آب از دست می دهند (۱۴).

همانگونه که اشاره شد، برای اولین بار Mints و همکاران نشان دادند که در آندومتریوم انسان، AQP1 در آنژیوژنز و تغییر رگ های خونی شرکت کرده و در پاتوژنز خونریزی های شدید ایدیوپاتیک نیز دخالت دارد (۷). از آنجا که تحقیقات بر نقش بیان ژن AQP-1 در فیزیولوژی آندومتر تأکید داشته اند و با توجه به مطالعات ذکر شده که برای پلی مورفیسم های این ژن عملکرد تأثیرگذار گزارش کرده اند، ضرورت انجام تحقیقی در

خصوص توزیع پلی‌مورفیسم‌های این ژن در بیماران منوراژی احساس گردید. به این ترتیب در مطالعه حاضر پلی‌مورفیسم‌های 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 - شاهدهی طراحی گردیده بود، ۳۷ نوجوان با شکایت منوراژی و ۴۰ نوجوان سالم به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند و تعدادی از آنها واجد شرایط شرکت در مطالعه شناخته نشده و از مطالعه کنار گذاشته شدند. دلایل خروج از مطالعه شامل: گزارش مشکلات دیگر قاعدگی مانند ابتلا به بیماری‌های دیگر، تأخیر قاعدگی در چند ماه اخیر، سندرم پیش از قاعدگی و قاعدگی دردناک بود.

بیماران با همکاری مربیان 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، ۲-۳ میلی‌لیتر 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 نانودراپ و الکتروفورز آگارز مورد بررسی قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ rs1049305 با استفاده از واکنش PCR Tetra Primer ARMS- انجام گردید. برنامه PCR مولتی

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 2X PCR Master Mix (GenetBio) که حاوی غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۱ واحد آنزیم Taq Polymerase می‌باشد، صورت پذیرفت. همچنین ۴ پرایمر هر کدام در حجم نهایی ۰/۴ میلی مولار و ۴۰ نانوگرم 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) انجام شد.

ژنوتایپینگ rs10244884 نیز با روش جهت بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی 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 پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo express طراحی گردیده و اختصاصی بودن آنها در وب سایت Blast مورد تأیید قرار گرفت.

پرایمرهای مستقیم و معکوس تکثیر پلی‌مورفیسم 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: 2X PCR master mix (GenetBio) حاوی MgCl₂ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، dNTPs با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار و ۱ واحد آنزیم Taq polymerase، پرایمرهای Forward و Reverse هر کدام با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌مولار و ۴۰ نانوگرم DNA الگو. برنامه PCR با واسرشته‌سازی 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 تنظیم گردید. سپس محصولات حاصل از

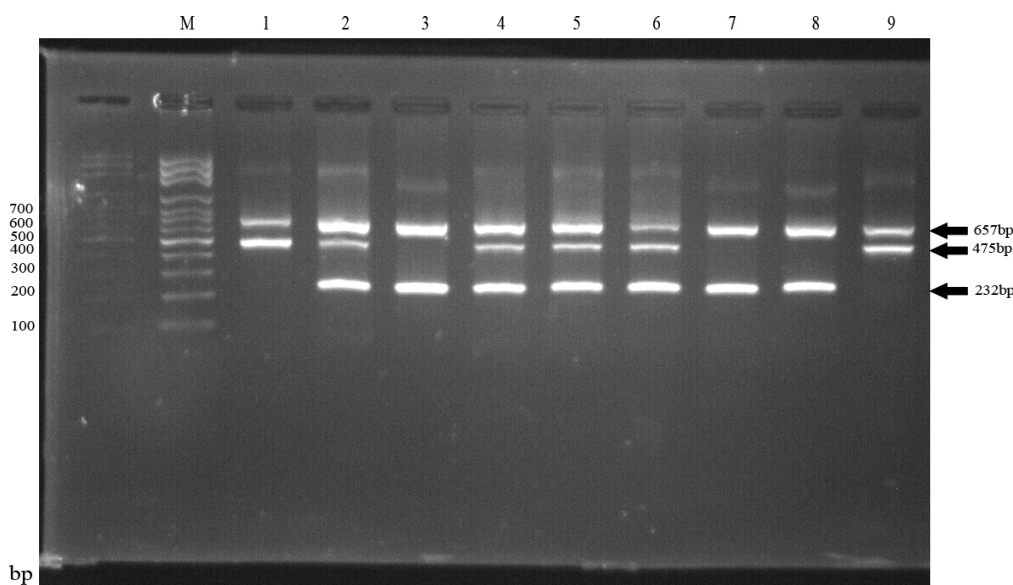
PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید جهت انجام RFLP با آنزیم TaqI (Metabion)، محصولات PCR طبق دستور راهنما به صورت Overnight با آنزیم انکوبه شده سپس بر روی ژل آگارز ۳٪ مشاهده گردیدند. به منظور تأیید تشخیص، تعدادی از نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و تعیین توالی گردیدند.

توزیع ژنوتیپی به طور متوسط ۵۰٪ برای هر آلل 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 مربع استفاده شد.

نتایج

ناحیه حاوی پلی‌مورفیسم rs1049305 تک نوکلئوتیدی

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 هموزیگوت GG باند ۴۷۶ و افراد هموزیگوت CC باند ۲۳۲ و افراد هتروزیگوت دو باند ۴۷۶ و ۲۳۲ را نشان دادند. به طور تصادفی تعدادی از نمونه‌ها جهت انجام تعیین توالی انتخاب گردیدند. قطعات با طول ۲۳۲ bp مربوط به ناحیه تکثیر شده با پرایمرهای FIPC و ROP و قطعات ۴۷۵ bp مربوط به ناحیه تکثیر شده با پرایمرهای RIPG و FOP است و قطعات تکثیر شده با طول ۶۵۷ bp 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 الکتروفروگرام ژنوتیپ‌های مختلف در شکل ۲ قابل مشاهده است.

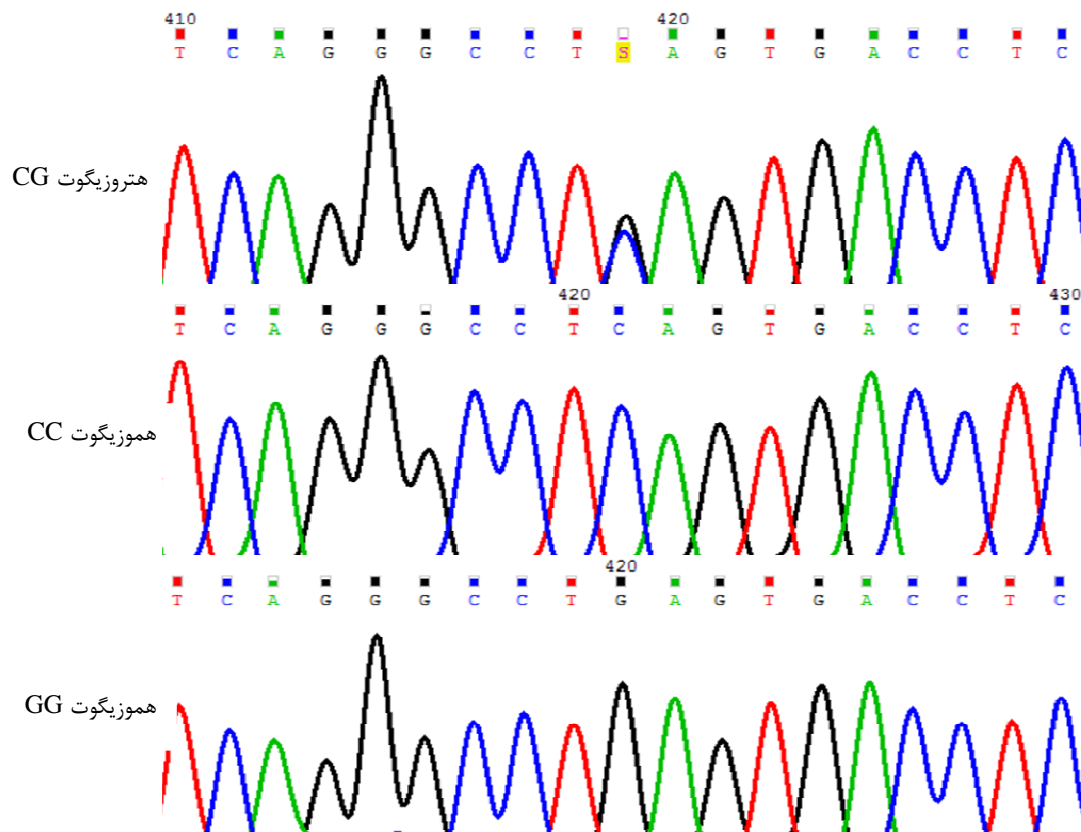


شکل ۱) ژل آگارز ۱/۵٪ مربوط به الکتروفورز محصولات واکنش ARMS-PCR

ستون M نشان دهنده مارکر 100bp. ستون‌های ۱ و ۹ مربوط به نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ GG و ستون‌های ۲ و ۴ و ۵ و ۶ مربوط به نمونه هتروزیگوت با ژنوتیپ GC و ستون‌های ۳ و ۷ و ۸ مربوط به نمونه هموزیگوت با ژنوتیپ CC است.

ژنوتیپ rs1049305 با در نظر گرفتن ژنوتیپ CC به عنوان ژنوتیپ مرجع، افراد هموزیگوت GG از شانس خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند ($Odds = 0.482$, $CI = 0.092$) و افراد هتروزیگوت GC شانس خطر مشابهی برای ابتلا به منوراژی دارند ($Odds Ratio = 1$, $CI = 0.210$).

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



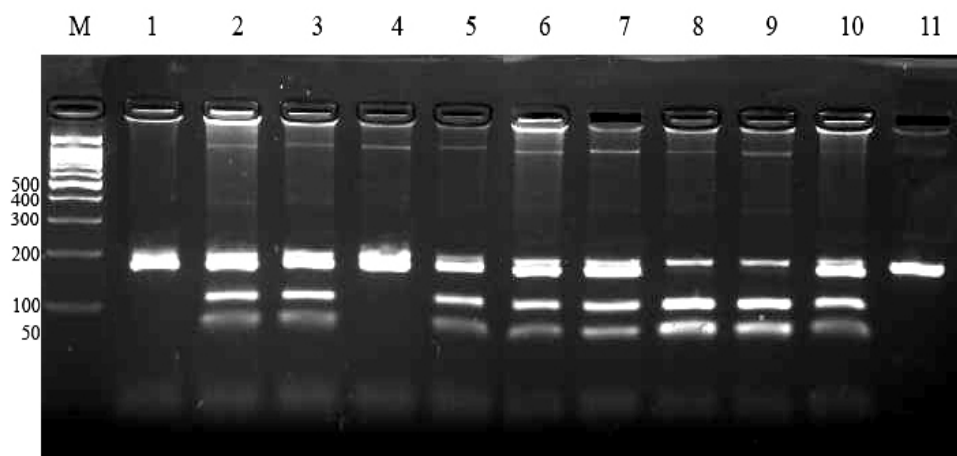
شکل ۲: نتایج تعیین توالی پلی مورفیسم rs1049305

جدول ۱: فراوانی انواع ژنوتیپ در بررسی پلی مورفیسم rs1049305

کل	rs1049305				
	CC	GC	GG		
تعداد (درصد)	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		تعداد کل

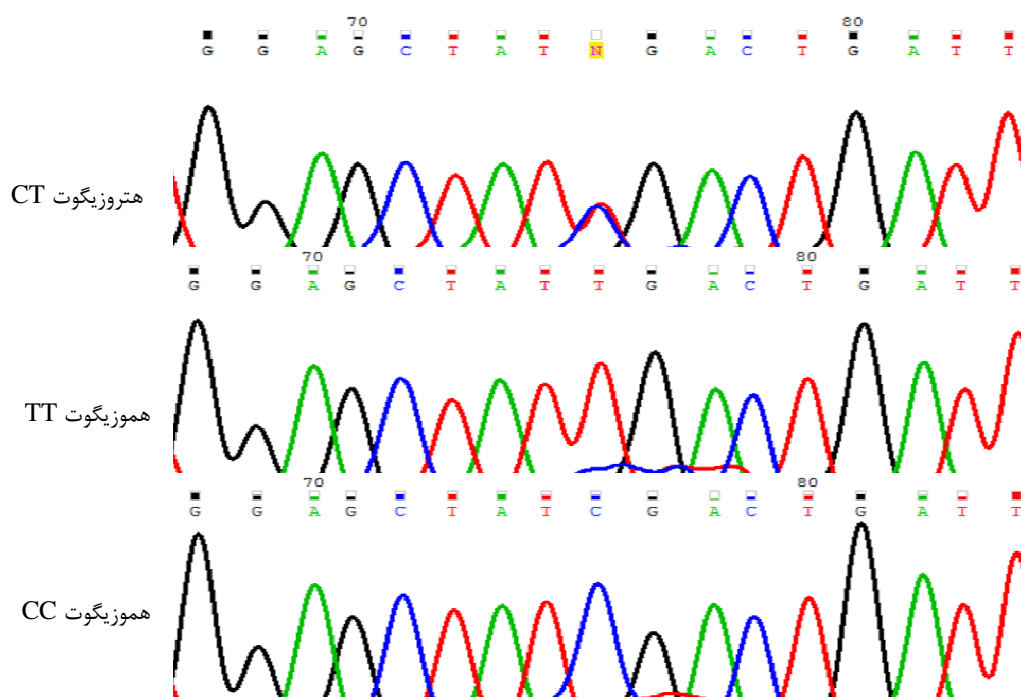
بازی، هموزیگوت‌های CC دو باند برش خورده حدوداً ۱۰۶ و ۶۶ جفت بازی و هتروزیگوت‌ها هر سه باند را نشان دادند. لازم به ذکر است بعد از هضم آنزیمی یک قطعه ۲۰ جفت بازی هم ایجاد می‌شود که بر روی ژل قابل شناسایی نیست و حذف می‌گردد. به طور تصادفی تعدادی از نمونه‌ها جهت انجام تعیین تولی انتخاب گردیدند. نمودار الکتروفروگرام 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 ۱۰۰bp - ستون‌های ۱ و ۴ و ۱۱ هموزیگوت TT با باند برش نخورده ۱۷۲ جفت باز - ستون‌های ۸ و ۹ هموزیگوت CC با باندهای ۱۰۶ و ۶۶ جفت باز - ستون‌های ۲ و ۳ و ۵ و ۶ و ۷ و ۱۰ هتروزیگوت CT با هر سه باند



شکل ۴: نتایج تعیین توالی پلی مورفیسم rs10244884

مشخص شد که در ژنوتیپ rs10244884 با در نظر گرفتن ژنوتیپ CC به عنوان ژنوتیپ مرجع، افراد هموزیگوت TT ($Odds\ Ratio=0/408$, $CI=0/065$) و هتروزیگوت CT از شانس خطر کمتری برای ابتلا به منوراژی برخوردارند ($CI=0/092$, $Odds\ Ratio=0/519$).

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 ژنوتیپ‌های سه گانه این پلی مورفیسم در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از آزمون آماری مربع کای

جدول ۲: فراوانی انواع ژنوتیپ در بررسی پلی‌مورفیسم rs10244884

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

بحث و نتیجه گیری

آکوپورین-۱ در رگ‌ها و شرایط بحرانی برای آنژیوژنز بیان می‌شود و به همین دلیل نقص و سوء عملکرد آن در آنژیوژنز، یک دلیل محتمل برای بروز منورازی ایدیوپاتیک می‌باشد (۷). آنژیوژنز 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 آنژیوژنز در محیط In Vivo، غشاء کوریوآلانتوئیک 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 آندومتر توسط تشکیل رگ‌های جدید حمایت می‌شود. فاز ترشخی به وسیله تمایز مشخص می‌شود، که شامل تشکیل شریان‌های مارپیچی و شبکه موئین زیر اپی‌تلیال است. مهاجرت سلول‌های اندوتلیال طی فاز اولیه و میانه/انتهایی به اوج 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 آنژیوژنز نابجا ارتباط دارد که به عنوان مثال با افزایشی در تکثیر سلول‌های اندوتلیال خود را نشان می‌دهد. یکی از مطالعات قبلی مشخص کرد که ارتباطی بین ناهنجاری عروقی آندومتر و منورازی وجود دارد (۱۹). مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد آکوپورین-۱ نقشی در فرآیند آنژیوژنز ایفا می‌کند، به عنوان مثال در موش‌های knock-out برای AQP-1، مشخص شده که این پروتئین در آنژیوژنز و مهاجرت سلولی اندوتلیال دخالت دارد (۲۰).

با استناد به این مطالب و فرضیات در نظر گرفته شده، بررسی انتشار آکوپورین-۱ در آندومتر میوم نورائیک در مقایسه با آندومتر میوم نرمال صورت پذیرفته است. در مطالعات اخیر مشخص شد که بیان AQP-1 در فاز تولید مثلی و ترشخی آندومتر میوم مشابه است (۲۱). اگرچه مطالعات بر روی تنظیم هورمونی آکوپورین-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 اندوتلیال اتفاق می‌افتد. در آخرین مطالعات انجام شده، نمونه‌های بیوپسی‌ای که در طی سطوح مختلف فاز ترشخی به دست آمده بودند، نشان‌دهنده هیچ تفاوت معنی‌دار آماری در رنگ‌آمیزی آکوپورین-۱ نبودند. جالب است که سطوح AQP-1 mRNA در طی فاز ترشخی افزایش یافته بود (۷).

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

آکواپورین-۱ باشد.

پلی مورفیسم‌های 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 آنژیوژنز و منوراژی، برای اولین بار در مطالعه حاضر دو پلی مورفیسم 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

شانس خطر بالاتر ابتلا به منوراژی را در بعضی ژنوتیپ‌ها 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 پلی مورفیسم‌ها بهتر روشن گردد.

سپاسگزاری

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

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, Birdsell 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, Carrion 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)¹, Shahbazi Sh(PhD)^{*2}, Mahdian R(MSc)³, Alizadeh J(MSc)⁴, Salehi Z(PhD)⁵

¹⁻⁵*Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran*

²*Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

³*Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute, Tehran, Iran*

⁴*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***