Archive of SID

مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹، شماره‌ی ۷۶، پاییز ۱۳۹۰، صفحات ۳۹ تا ۴۹

فراوانی جهش‌های M34T، 167delT، 235delC و 35delG در ژن GJB2 در ناشنوایی حسی- عصبی غیر سندرمی با وراثت جسمی مغلوب در جمعیت استان آذربایجان غربی

دکتر عیسی عبدی‌راد[۱]، مرتضی باقری[۲]، دکتر فریناز فرهودی[۳]

نویسنده‌ی مسئول: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی isaabdirad@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۴/۱۲ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *جهش در ژن GJB2 شایع‌ترین علت ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی با الگوی توارث جسمی در بسیاری از جمعیت‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان جهش‌های 35delG، 167delT، M34T و235delC در جمعیت استان آذربایجان غربی بود.*

روش بررسی: *۱۲۹ بیمار از ۹۶ خانواده وارد مطالعه شدند. تکنیک‌های ASO-PCR و PCR-RFLP برای تعیین کردن جهش‌ها اجرا شد.*

یافته‌ها: *در کل ۶۵/۸۹ درصد از بیماران به صورت تک‌گیر و بقیه (۳۴/۱۱ درصد) به‌صورت فامیلی بودند. ۶ بیمار از ۸ بیمار با جهش 35delG و ۱ بیمار با جهش 235delC، حاصل ازدواج فامیلی بودند. جهش 35delG در ۸، جهش‌های 167delT و M34T در هیچکدام و جهش 235delC در ۱ خانواده مشاهده شد. به عبارت دیگر ۱۳ کروموزوم از ۲۵۸ کروموزوم، حاوی جهش 35delG بودند. برای جهش 35delG، ۵ نفر هموزیگوت و سه نفر هتروزیگوت بودند. یعنی در حدود ۵/۰۴ درصد از بیماران جهش 35delG علت اصلی ناشنوایی می‌باشد. ۱کروموزوم از ۲۵۸ کروموزوم (۰/۳۹ درصد) جهش هتروزیگوت 235delC را داشت.*

نتیجه‌گیری: *می‌توان نتیجه گرفت که ژن و یا جهش‌های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیر سندرمی جسمی مغلوب در جمعیت استان آذربایجان‌غربی دخیل می‌باشند.*

واژگان کلیدی: ناشنوایی غیر سندرمی، 35delG، 167delT، M34T، 235delC، ژن GJB2

مقدمه

اختلال شنوایی شایع‌ترین اختلال حسی عصبی است (۱). به‌طور تقریبی ۱ در هر ۱۰۰۰ کودک متولد شده دچار ناشنوایی پیش کلامی می‌باشد (۱). پیش از اجرای برنامه‌های بررسی شنوایی و مداخله‌ی زودهنگام، میانگین سنی در هنگام تشخیص ۱/۵تا ۳ سال بود که خیلی دیرتر از شروع زمان بحرانی فراگیری زبان و تکلم بود (۲). عدم تشخیص اختلال شنوایی و تاخیر در تشخیص اثر عمیقی بر مهارت زبانی و ارتباطی و همچنین بر تکامل شناختی و روانی دارد (۲). شناخت تاخیری ممکن است در آینده منجر به گوشه‌گیری و انزوا در زندگی شود (۲). کودکان با اختلال دایمی شنوایی،

۱- دکترای تخصصی ژنتیک، دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۲- کارشناس ارشد ژنتیک، مربی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۳- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

www.SID.ir

Archive of SID

در معرض خطر بالاتری از مشکلات رفتاری و تاخیر در فراگیری زبان و خواندن هستند (۲). اختلال شنوایی می‌تواند ناشی از فاکتورهای محیطی، نقایص ژنتیکی یا ترکیبی از این دو باشد (۳). نیمی از اختلالات شنوایی زمینه‌ی ژنتیکی دارند (۴). اختلال شنوایی ژنتیکی دلایل گوناگونی دارد و تقریبا ۱ درصد از تمام ژن‌های انسان در فرآیند شنوایی درگیرند (۴). اختلال شنوایی غیر سندرمیک در حدود ۸۰ درصد موارد ژنتیکی این اختلال را شامل می‌شود و می‌تواند به اشکال زیر باشد (۵)

۱- ناشنوایی جسمی غالب ۱۵تا۲۰ درصد (DFNA) (Deafness A) ۲- ناشنوایی جسمی مغلوب ۸۰ درصد (DFNB) (Deafness B) ۳- ناشنوایی وابسته به X ۱ درصد (DFN) (Deafness) ۴- ناشنوایی میتوکندریال ۱ درصد جهش‌های ژن کانکسین شایع‌ترین علت اختلال شنوایی غیر سندرمیک جسمی مغلوب می‌باشد (۶). جهش 35delG شایع‌ترین جهش از بین بیش از ۹۰ جهش گزارش شده در بین اکثر جوامع مطرح می‌باشد (۶). جهش 167 del T به‌عنوان شایع‌ترین جهش شناخته شده در جمعیت یهودی‌های اشکنازی آمریکا می‌باشد و فراوانی افراد ناقل جهش 167 del T در جمعیت یهودی‌های اشکنازی آمریکا معادل ۴ درصد است و فراوانی افراد ناقل جهش 235delC به عنوان شایع‌ترین جهش در آسیای جنوب شرقی، تقریبا معادل ۱ نفر در هر ۱۰۰ نفر بیمار می‌باشد (۸ و۷). در مطالعات انجام شده، جهشM34T با اختلال شنوایی پیش کلامی متوسط تا شدید مرتبط است (۹). ناشنوایی تنها اختلال حسی است که حتی در صورت ناشنوایی کامل می‌تواند درمان شود. کودکانی که در ژن GJB2 جهش دارند، تغییر مثبت واضحی را در شناخت و خواندن پس از کاشت حلزون نشان می‌دهند (۱۰). تجزیه و تحلیل ژنتیکی برای ناشنوایی، به‌طور عمده برای تشخیص و درمان انجام می‌شود (۱۰). شناسایی تمامی ژن‌های درگیر در اختلال شنوایی وراثتی به درک مکانیسم اولیه‌ی شنوایی طبیعی و همچنین به تشخیص زود هنگام و درمان کمک می‌کند و باعث می‌شود تا با تست‌ها و هزینه‌ی کمتر بتوان به تشخیص رسید. با توجه به متفاوت بودن توزیع جهش‌ها در کشورها و نژادهای مختلف بر طبق تحقیقات انجام شده و نامعین بودن میزان آن در ایران و استان آذربایجان غربی، تصمیم به انجام این پژوهش گرفتیم تا بتوانیم تست غربالگری مناسب را در جمعیت مورد مطالعه یافته، از این اطلاعات در روند مشاوره‌ی ژنتیک و ارزیابی خطر استفاده کنیم.

روش بررسی

۱۲۹ بیمار از میان ۹۶ خانواده با ناشنوایی حسی عصبی جسمی مغلوب برای جهش‌های 35delG، 167delT، 235delC و M34T در ژن GJB2 بررسی شدند. بیماران از میان مراجعه کنندگان به بخش ژنتیک و پزشکی مولکولی بیمارستان شهید مطهری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، به‌صورت تصادفی و دسترس انتخاب شدند. نقص شنوایی غیر پیش‌رونده مادر زادی حسی- عصبی (پیش از تکلم)، عدم وجود یافته‌های غیر طبیعی مرتبط با اختلال شنوایی در معاینات بالینی و تست‌های پاراکلینیکی از جمله سوابق آزمایشگاهی در دوران شیر خوارگی برای عفونت سرخجه و نیز یافته‌های سی‌تی‌اسکن برای اختلالات احتمالی گوش میانی و داخلی در سابقه‌ی پزشکی، وجود نقص شنوایی بر اساس الگوی توارث جسمی مغلوب در سابقه‌ی فامیلی از شرایط ورود به مطالعه بود. از بیماران و یا خانواده‌های ایشان رضایت نامه‌ی کتبی اخذ شد. ۳ تا ۵ سی‌سی خون محیطی برای استخراج DNA از افراد بیمار اخذ شده، به لوله‌های فالکون ۱۵ سی‌سی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر EDTA به عنوان ماده‌ی ضد انعقاد خون منتقل گردید. DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع که قبلا توسط میلر و همکاران توصیف شده استخراج شد (۱۱). تکنیک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

(Allele-Specific Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction) ASO-PCR و (Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction) PCR-RFLP برای تعیین کردن جهش‌ها در ژنوم افراد بیمار اجرا شد.

تعیین جهش‌های 35delG و M34T: جهش 35delG در توالی ژن GJB2 شامل حذف باز گوانوزین در موقعیت ۳۵ بوده و باعث می‌شود اسید آمینه‌ی گلایسین در مکان ۱۲ حذف شود و به این ترتیب در چارچوب مولکول تغییر ایجاد می‌شود. برای یافتن جهش 35delG پرایمرها و برنامه ASO-PCR مطابق آنچه قبلا گفته شده بکار رفتند (۱۲). بنابراین مشاهده یا عدم مشاهده‌ی محصول ۲۰۲ بازی نشان‌دهنده‌ی حضور یا عدم حضور آن آلل می‌باشد. چنانچه فردی هر دو آلل نرمال و جهش‌دار را داشته باشد، هتروزیگوت می‌نامند و اگر فردی فقط دارای آلل نرمال (باند محصول ۲۰۲ بازی) باشد، ژنوتیپ هموزیگوت نرمال و اگر فردی فقط دارای آلل جهش‌دار (باند محصول ۲۰۲ بازی) باشد. ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار می‌گویند. جهش M34T در توالی ژن GJB2 باعث تغییر باز تیمین به سیتوزین در موقعیت ۱۰۱ می‌شود. برای یافتن جهش M34T پرایمرها و برنامه‌ی PCR مطابق آنچه قبلا گفته شده، بکار رفتند (۱۳). بنابراین مشاهده یا عدم مشاهده محصول ۱۹۹ بازی نشان‌دهنده‌ی حضور یا عدم حضور آن آلل می‌باشد. چنانچه فردی هر دو آلل نرمال و جهش‌دار را داشته باشد، هتروزیگوت می‌نامند و اگر فردی فقط دارای آلل نرمال (باند محصول ۱۹۹ بازی) باشد، ژنوتیپ هموزیگوت نرمال واگر فردی فقط دارای آلل جهش‌دار (باند محصول ۱۹۹ بازی) باشد، ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار می‌گویند. برای تعیین کردن حضور یا عدم حضور آلل‌های نرمال و جهش‌دار از طریق ASO-PCR به ترتیب جفت پرایمرهای عمومی- اختصاصی آلل نرمال و عمومی - اختصاصی آلل جهش‌دار به کار رفتند. به‌منظور مشاهده‌ی حضور و یا عدم حضور قطعات تکثیر یافته، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز می‌شود. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید ژل حاصله روی لامپ Transilluminator و اشعه UV قرار گرفته و عکس‌برداری می‌شود. در این تصویر نوع باندها و محصولات تکثیر یافته در مقایسه با باند مارکر مشخص گردیده است. سپس نتایج PCR ثبت و تفسیر گردید.

تعیین جهش‌های 167delT و 235delC: جهش 167delT در توالی ژن GJB2 شامل حذف باز تیمین در موقعیت ۱۶۷ بوده، باعث می‌شود کدون توقف UAG در هشتاد و یکمین اسید آمینه از توالی ژن کد کننده‌ی GJB2 ایجاد شود و به این ترتیب درچارچوب مولکول تغییر ایجاد می‌شود. حضور جهش 167delT منجر به حذف جایگاه شناسایی آنزیم برش دهنده‌ی PstI می‌گردد. برای تعیین کردن جهش 167delT پرایمرها و برنامه‌ی PCR مطابق آنچه قبلا گفته شده بکار رفتند (۱۴). برای تعیین حضور یا عدم حضور آلل‌های نرمال و جهش‌دار از روش PCR-RFLP و آنزیم برش دهنده‌ی PstI استفاده گردید (۱۴). در ابتدا ناحیه‌ی مورد نظر مشخص و تکثیر یافت. برای برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر PstI در حدود ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش های PCR ضروری است. لذا در حدود ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل را به درون تیوب اپندورف ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل کرده، مجموعه را در حدود ۱۰ تا ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه کردیم. بعد از سپری شدن زمان لازم به‌منظور مشاهده‌ی حضور و یا عدم حضور قطعات برش یافته و محصولات PCR روی ژل آگاروز ۳ درصد الکتروفورز گردید. پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید ژل حاصله تحت اشعه‌ی UV قرار گرفته، عکس‌برداری شد. بنابراین مشاهده‌ی باندهای ۶۹/۹۱/۱۱۲ نشان‌دهنده‌ی ژنوتایپ نرمال و طبیعی و مشاهده‌ی باندهای ۹۱/۱۸۱ نشان‌دهنده‌ی حضور جهش 167delT می‌باشد. چنانچه فردی باندهای ۶۹/۹۱/۱۱۲/۱۸۱ را داشته باشد، هتروزیگوت می‌نامند.

www.SID.ir

Archive of SID

محصولات PCR بدون برش آنزیمی قطعه‌ای به‌طول ۲۷۲ باز می‌باشد. جهش 235delC شامل حذف باز سیتوزین در موقعیت ۲۳۵ بوده، حضور جهش 235delC منجر به حذف جایگاه شناسایی آنزیم برش دهنده‌ی ApaI می‌گردد. بنابراین در افرادی که جهش مورد نظر وجود نداشته باشد، محصولات PCR برش می‌یابند و از افراد دیگر با ژنوتایپ‌های دیگر قابل تمایز می‌گردند. برای تعیین کردن جهش 235delC پرایمرها و برنامه‌ی PCR مطابق آنچه قبلا گفته شده به‌کار رفتند (۱۵). برای تعیین کردن حضور یا عدم حضور آلل‌های نرمال و جهش‌دار از روش PCR-RFLP و آنزیم برش‌دهنده‌ی ApaI استفاده گردید (۱۵). در ابتدا ناحیه‌ی مورد نظر مشخص و تکثیر یافت. برای برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر ApaI در حدود ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش‌های PCR ضروری است. لذا در حدود ۱۰ میکرولیتر محصول PCR و ۱۸ میکرولیتر آب مقطر استریل را به درون تیوب اپندورف ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل می‌کنیم. مجموعه را در حدود ۲ تا ۳ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. بعد از سپری شدن زمان لازم به منظور مشاهده حضور و یا عدم حضور قطعات برش یافته و محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم برماید ژل حاصله تحت اشعه‌ی UV قرار گرفته، عکس‌برداری می‌شود. بنابراین مشاهده باندهای ۲۶۶/۴۵۹ نشان‌دهنده‌ی ژنوتیپ نرمال و طبیعی و مشاهده باند ۷۲۵ نشان‌دهنده‌ی حضور جهش 235delC می‌باشد. چنانچه فردی باندهای ۲۶۶/۴۵۹/۷۲۵ را داشته باشد، هتروزیگوت می‌نامند.

یافته‌ها

۱۲۹ بیمار از ۹۶ خانواده با ناشنوایی حسی عصبی غیر سندرمی جسمی مغلوب برای جهش‌های 35delG, 167delT M34T, 235delC در ژن GJB2 بررسی شدند. نتایج و یافته‌های این مطالعه در جدول ۱ و ۲ خلاصه شده است.

جدول ۱: میزان فراوانی جهش‌های 35delG، 167delT، 235delC و M34T در ژن GJB2

نوع جهش	تعداد کلی	تعداد آلل‌ها	تعداد هموزیگوت	تعداد هتروزیگوت	درصد فراوانی
35delG	۸	۱۳	۵	۳	۵/۰۴
235delC	۱	۱	۰	۱	۰/۳۹
167delT	۰	۰	۰	۰	۰
M34T	۰	۰	۰	۰	۰

در کل ۶۵/۸۹ درصد از بیماران به صورت تک‌گیر و بقیه (۳۴/۱۱ درصد) به صورت فامیلی بودند. ۶ نفر از ۸ بیمار با جهش 35delG و ۱ بیمار با جهش 235delC حاصل ازدواج فامیلی بودند. جهش 35delG در ۸، جهش‌های 167delT و M34T در هیچکدام و جهش 235delC در ۱ خانواده مشاهده شدند. به عبارت دیگر ۱۳ کروموزوم از ۲۵۸ کروموزوم، حاوی جهش 35delG بودند. برای جهش 35delG، ۵ نفر هموزیگوت و سه نفر

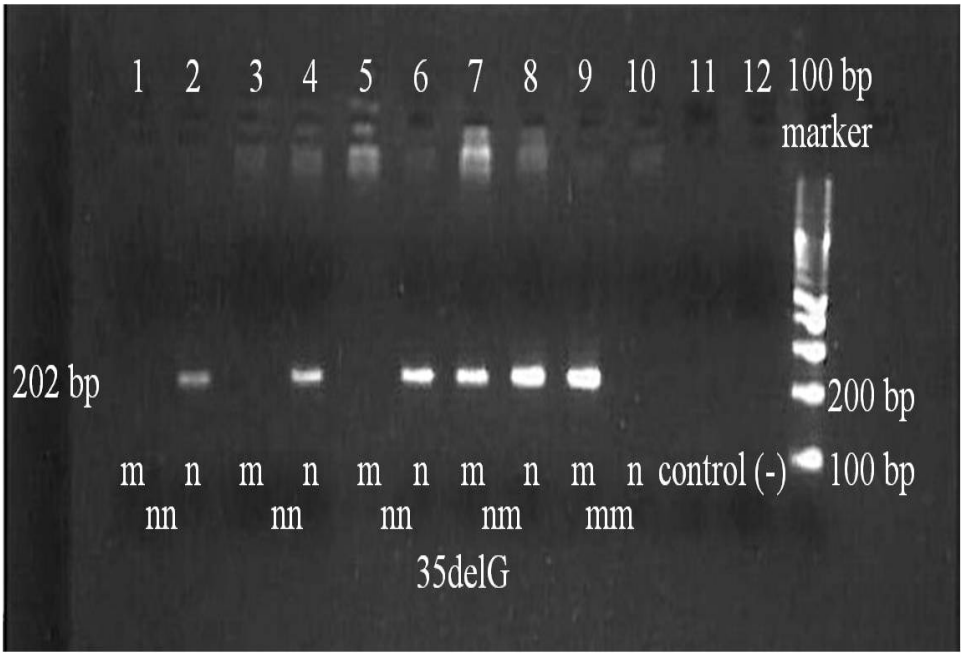
www.SID.ir

Archive of SID

هتروزیگوت بودند. یعنی در حدود ۵/۰۴ درصد از بیماران جهش 35delG علت اصلی ناشنوایی می‌باشد. ۱ کروموزوم از ۲۵۸ کروموزوم (۰/۳۹ درصد) جهش هتروزیگوت 235delC را داشت. ۷۸/۱۳ درصد یعنی ۷۵ از ۹۶ خانواده ازدواج فامیلی با ضریب هم خونی ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ داشتند (جدول ۲).

جدول ۲: میزان ضریب هم خونی در ازدواج های فامیلی

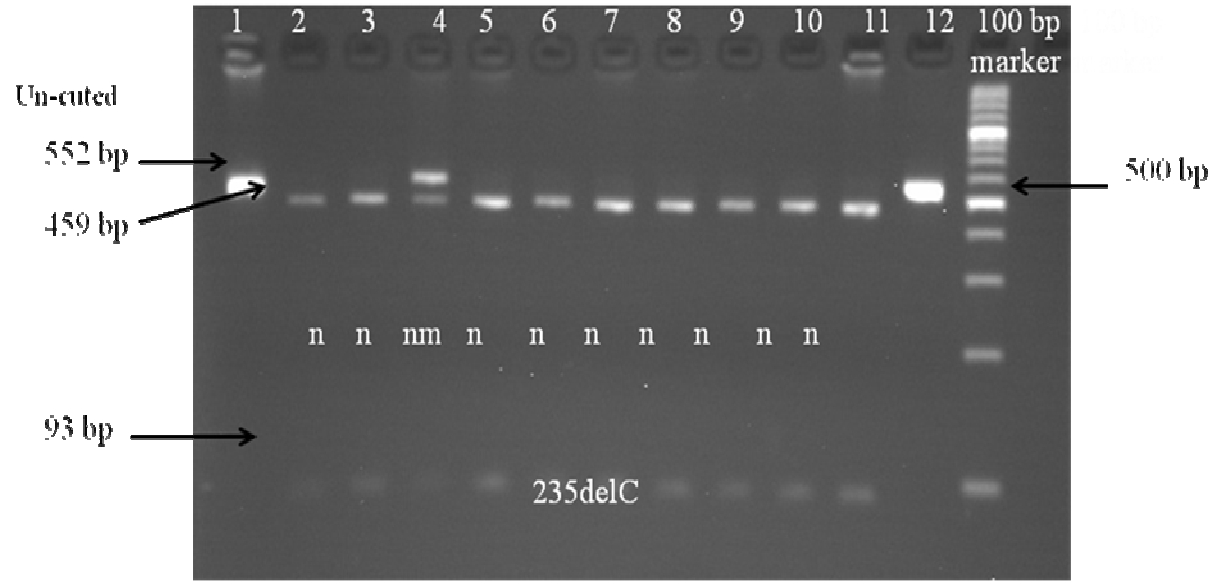
نسبت فامیلی	ضریب هم خونی	تعداد خانواده	درصد
پسر عمو – دختر عمو	۱/۱۶ (۰/۰۶۲۵)	۱۷	۲۲/۶۷
پسر خاله – دختر خاله	۱/۱۶ (۰/۰۶۲۵)	۱۹	۲۵/۳۳
پسر دایی - دختر عمه، یا پسر عمه – دختر دایی	۱/۱۶ (۰/۰۶۲۵)	۲۲	۲۹/۳۳
نوه عمو، نوه عمه، نوه دایی، نوه خاله	۱/۳۲ (۰/۰۳۱۲۵)	۸	۱۰/۶۷
دختر عمو- پسر عمو، دختر خاله - پسر خاله	۱/۸ (۰/۱۲۵)	۴	۵/۳۳
نوه‌های دو برادر یا دو خواهر یا برادر و خواهر	۱/۶۴ (۰/۰۱۵۶۲۵)	۵	۵/۶۷
جمع		۷۵	۱۰۰



شکل ۱: تصویر ژل ۱/۵ درصد حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرازی برای جهش 35delG در ۵ نمونه را نشان می‌دهد. n: باند نرمال؛ m: باند جهش‌دار؛ nn: ژنوتیپ هموزیگوت نرمال؛ mn: ژنوتیپ هتروزیگوت و mm: ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌دار

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: تصویر ژل ۱/۵ درصد حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرازی و محصولات برش آنزیمی برای جهش 235delC در ۱۰ نمونه را نشان می‌دهد. n: ژنوتیپ هموزیگوت نرمال؛ m: ژنوتیپ جهش‌دار؛ mn: ژنوتیپ هتروزیگوت نرمال- جهش‌دار

ضریب هم‌خونی، میزان احتمالی است که دو آلل در یک لوکوس، دارای جد مشترک یکسان باشند. شکل‌های ۱ و ۲ تصاویر ژل آگاروز حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر یافته توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مرازی یا برش آنزیمی را برای جهش‌های 35delG و 235delC در ژن GJB2 را نشان می‌دهد.

بحث

اختلال شنوایی غیر سندرمی جسمی مغلوب در لوکوس DFNB1 روی کروموزوم 13q11-12 قرار دارد. این لوکوس حاوی ۲ ژن می‌باشد: GJB6 و GJB2. GJB2 کانکسین ۲۶ را کد می‌کند که یک پروتئین کانال یونی از گروه بتا با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون می‌باشد (۱۶). کانکسین‌ها ارتباط با سلول‌های مجاور را امکان‌پذیر ساخته و در تعداد زیادی از عملکردهای سلولی نظیر رشد سلولی، تمایز، پاسخ به سیگنال‌ها و هوموستاز شرکت دارند (۱۶). هر چند عملکرد دقیق و نقش کانکسین‌های Gap Junction در اختلال شنوایی در حال حاضر ناشناخته است، چنین مطرح می‌شود که این کانکسین‌ها به‌وسیله‌ی ارتباطات بین سلولی، روی محیط یونی سلول‌های اپیتلیال حلزون و گردش مجدد پتاسیم اثر می‌گذارند (۱۶). اختلال عملکرد کانال‌های یونی طبیعی باعث مرگ سلول‌های مویی و ناشنوایی دایم می‌گردد (۱۶). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۴ بر روی ۲۱۰ خانواده از جمعیت تهران (۱۳۹خانواده) و تبریز (۷۱ خانواده) انجام شد، ۲۵/۲ درصد (۵۳/۲۱۰ خانواده) حاوی جهش در ژن GJB2 برای جهش‌های 35delG، T8M، 67delT، R143W، W24X، V27I+E114G،E47X،delE120،R32H، 235delC، 136X، R184P و V37I بودند که ۱۳/۳ درصد خانواده‌ها برای جهش 35delG هموزیگوت بودند (۱۲/۲ درصد در تهران و ۱۵/۵ درصد در تبریز) بود. جهش 35delG، ۲۲/۳ درصد در

www.SID.ir

Archive of SID

تهران و ۳۱ درصد در تبریز گزارش شد (۱۷). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۴ در استان سیستان و بلوچستان بر روی ۱۰۰ خانواده از دو قوم بلوچ و سیستانی (۴۷ خانواده‌ی بلوچ و ۵۳ خانواده‌ی سیستانی) با اختلال ناشنوایی غیرسندرمی با توارث مغلوب انجام شد، جهش‌های GJB2 شامل W24X, 167delT, R127H, M93I, K112I در ۹ درصد (۱۸ کروموزوم از ۲۰۰ کروموزوم) یافت شد که جهش W24X دارای بالاترین فراوانی بود و جهش 35delG که شایع‌ترین جهش در بین سفید پوستان و اکثر نقاط ایران است در هیچیک از نمونه‌ها یافت نشد (۱۸). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۴ بر روی ۲۶۰ بیمار با اختلال ناشنوایی غیر سندرمی با توارث جسمی مغلوب از ۱۹۹ خانواده از استان‌های گیلان و خراسان انجام شد، ۲۷ درصد خانواده‌ها (۵۵ از ۱۹۹ خانواده) حاوی جهش‌های 35delG ، 235delC، W77X، R127H، M34T، V27I+E114G ، L90P و delE120 در ژن GJB2 بودند که 35delG با ۷۸/۲ درصد (۴۳ از ۵۵ خانواده) شایع‌ترین جهش بود. فراوانی جهش در ژن GJB2 در گیلان ۲۷ درصد و در خراسان ۱۱/۲ درصد بود (۱۹). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۵ در آذربایجان شرقی بر روی ۱۲۹ بیمار مبتلا به ناشنوایی غیر سندرمیک با توارث جسمی مغلوب از ۱۰۰ خانواده‌ی غیرخویشاوند انجام شد، از ۲۰۰ کروموزوم مطالعه شده، ۳۶ کروموزوم (۱۸ درصد) حاوی جهش 35delG بودند (۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر روی ۱۰۰ بیمار چینی که تحت کاشت حلزون قرار گرفته بودند انجام شد، نتایج زیر به دست آمد. جهش GJB2 در ۳۴ نفر از ۱۰۰ نفر (۳۴ درصد) از بیماران که همه اختلال شنوایی پیش کلامی داشتند، شناسایی شد و از میان آن‌ها ۲۷ نفر یعنی ۷۹/۴۰ درصد از بیماران جهش 235delC را داشتند (۲۰). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در چین بر روی ۲۱۴ بیمار ناشنوا انجام شد، ۱۵۷ نفر (۷۳ درصد) حاوی جهش در ژن‌های کانکسین (GJB2، GJB6، GJB3) بودند. فراوانی بیماران با اختلال شنوایی پیش کلامی ۶۶ نفر (۱۱/۷ درصد) و فراوانی جهش 235delC در این افراد ۱۱ عدد (۱۶/۷ درصد) بود (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۰۷ در چین انجام شد، نشان داد از ۴۸۸ بیمار ۱۶/۳ درصد حداقل یک آلل جهش یافته 235delC داشتند. ۲۳۳ نفر (۷/۸ درصد) هموزیگوت و ۲۵۵ نفر (۸/۵ درصد) هتروزیگوت بودند. فراوانی 235delC در هموزیگوت‌ها ۱۴/۷ درصد و در هتروزیگوت‌ها ۱۶/۱ درصد بود (۲۲). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ در ترکیه بر روی ۱۵۱ بیمار با اختلال ناشنوایی غیرسندرمیک با توارث جسمی مغلوب انجام شد، تمام ناحیه‌ی کد شونده‌ی ژن GJB2 تحت برررسی قرار گرفت و نتایج زیر به‌دست آمد. ۳۵ نفر یعنی ۲۳/۲ درصد بیمار حاوی جهش در ژن GJB2 بودند. هفت جهش متفاوت شناسایی شد که پنج عدد از آن‌ها شناخته شده بودند delE120، R184P، 163V، L90P، 35delG و دو عدد از آن‌ها جدید بودند (M34V و L205V). شایع‌ترین جهش مربوط به 35delG بود (۱۷/۱ درصد) (۲۳). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ در کلمبیا بر روی ۱۱۲ بیمار با اختلال ناشنوایی غیرسندرمیک با توارث جسمی مغلوب انجام شد، توالی ژن GJB2 تحت بررسی قرار گرفت و جهش S199F با ۱۷/۹ درصد شایع‌ترین جهش بود و جهش‌های 35delG (۱۷ درصد) و 67delT (۰/۴ درصد) در مراتب بعدی قرار داشتند (۲۴). جهش در ژن GJB2 به‌عنوان عامل اصلی علت اختلال شنوایی غیرسندرمیک جسمی مغلوب شناخته شده است (۶). جهش 35delG شایع‌ترین جهش از بین بیش از ۹۰ جهش گزارش شده در بین اکثر جوامع مطرح می‌باشد (۶). جهش 35delC شایع‌ترین جهش در آسیای جنوب شرقی و جهش 67delT شایع‌ترین موتاسیون شناخته شده در جمعیت یهودی‌های اشکنازی آمریکا است (۸و ۷). بر اساس برخی مطالعات انجام شده جهش M34T با اختلال

www.SID.ir

Archive of SID

شنوایی پیش کلامی متوسط تا شدید مرتبط است (۹). فراوانی این جهش‌ها در بین اقوام و جمعیت‌ها متفاوت است. طبق مطالعات انجام شده فراوانی جهش 35delG در گیلان ۲۷ درصد، در تبریز ۱۸ درصد، در تهران ۱۲/۲ درصد، در خوزستان ۶ درصد، در خراسان ۱۱/۲ درصد، در سیستان و بلوچستان ۰ درصد، در ترکیه ۱۷/۱ درصد، در کلمبیا ۱۷ درصد گزارش شده است (۲۴-۱۹و۶). الگوی توزیع این جهش در ایران بر کاهش فراوانی این جهش از شمال به جنوب و از شرق به غرب حکایت دارد (۶). جهش‌های شایع در منطقه‌ی مطالعه حاضر به ترتیب عبارتند از: 35delG، R184P، delE120، R127H، Y136X، V153I، V27I، G130V، H16R، M163V، R143W، V37I، 167delT، V27I+E114G (۲۵). در برخی مطالعات انجام شده در ایران جهش‌های 167delT و 235delC با میزان نه چندان قابل توجه گزارش شده‌اند. بر اساس الگوی توزیع جهش 35delG و همچنین وفور نسبی این جهش در استان آذربایجان شرقی و کشور ترکیه انتظار نتیجه‌ی مشابه در استان آذر بایجان غربی را داشتیم، اما برخلاف انتظار فراوانی مربوط به جهش 35delG تنها ۵/۰۴ درصد می‌باشد که مغایر با تحقیقات انجام شده در آذربایجان شرقی و ترکیه است. این امر می‌تواند به سبب ناهمگن بودن جمعیت استان آذربایجان غربی و وجود اقوام مختلف از جمله کردها و مسیحیان در این استان باشد. میزان فراوانی جهش‌های167delT, 235delC, M34T به‌طور تقریبی مشابه سایر تحقیقات انجام شده در ایران می‌باشد. میزان ازدواج فامیلی در این مطالعه ۷۸/۱۳ درصد بوده که از میانگین کشوری (۷۱ درصد) بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه، ژن یا جهش‌های دیگری در ایجاد ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی جسمی مغلوب در آذربایجان غربی دخیل می‌باشند که مطالعات بیشتر و گسترده‌تری را می‌طلبد. همچنین با توجه به میزان بالای ازدواج فامیلی در بین ناشنوایان که زمینه‌ی اصلی افزایش تولد افراد ناشنوا می‌باشد، نقش فرهنگ سازی در این زمینه و همچنین مشاوره‌ی ژنتیک بسیار بارز می‌گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل تقبل هزینه‌های پژوهشی، و نیز از همکاران محترم و خانواده‌های عزیز شرکت کننده در این طرح کمال تشکر و قدردانی را می‌نماید.

References

1- Birkenhäger R, Aschendorff A, Schipper J, Laszig R. Non-syndromic hereditary hearing impairment. *Laryngorhinootol.* 2007; 86: 299-309.

2- Yoshinaga-Itano C, Sedey AL, Coulter DK, Mehl AL. Language of early- and later-identified children with hearing loss. *Pediatr.* 1998; 102: 1161-71.

3- Marres HA, Congenital abnormalities of the inner ear. *London: Arnold & Oxford University Press.* 1998.

4- Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003; 4: 341-402.

5- Hone SW, Smith RJ. Medical evaluation of pediatric hearing loss: laboratory, radiographic,

www.SID.ir

Archive of SID

and genetic testing. *Otolaryngol Clin North Am.* 2002; 35: 764-51.

6- JabbarpourBonyadi M, Esmaeili M, Younespour R, Lotfalizadeh N, Absavaran A. Analysis of common mutations in gjb2 and gjb6 genes in patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Eastern Azarbaijan. *J Zanjan Uni Med Sci.* 2006; 14: 30-8.

7- Cohn ES, Kelley PM. Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet.* 1999; 89: 130-6.

8- Yan D, Park HJ, Ouyang XM, et al. Evidence of a founder effect for the 235delC mutation of GJB2 (connexin 26) in east Asians. *Hum Genet.* 2003; 114: 44-50.

9- Houseman MJ, Ellis LA, Pagnamenta A, et al. Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J Med Genet*. 2001; 38: 20-5.

10- Bauer PW, Geers AE, Brenner C, Moog JS, Smith RJ. The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation. *Laryngoscope*. 2003; 113:2135-40.

11- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 11; 16: 1215.

12- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat.* 1998; 11: 387-94.

13- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA.* 1999; 281: 2211-6.

14- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 1605-9.

15- Wang YC, Kung CY, Su MC, et al. Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10: 495-8.

16- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum Mutat.* 2000; 16: 190-202.

17- Hashemzadeh Chaleshtori M, Hoghooghi Rad L, Dolati M, et al. Frequencies of mutations in the connexin 26 gene (GJB2) in two populations of Iran (Tehran and Tabriz). *Iranian J Pub Health.* 2005; 34: 1-7.

18- Naghavi A, Nishimura C, Kahrizi K, et al. GJB2 mutations in Baluchi population. *J Genetics*. 2008; 87: 195-7.

19- Hashemzadeh Chaleshtori M, Dowlati M, Farhud DD, et al. Two novel mutations and predominant 35 delG mutation in the Connexin 26 gene (GJB2) in Iranian populations. *Iranian J Pub Health.* 2004; 2: 14-9.

www.SID.ir

Archive of SID

20- Tian YS, Chen XW, Cao KL, Chen DY, Zuo J, Fang FD. Analysis of genetic mutation in patients with nonsyndromic hearing loss received cochlear implant. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007; 87: 1093-6.

21- Li QZ, Wang QJ, Chi FL, et al. The roles of connexin genes in sporadic hearing loss population. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007; 87: 1097-101.

22- Dai P, Yu F, Han B, et al.The prevalence of the 235delC GJB2 mutation in a Chinese deaf population. *Genet Med.* 2007; 9: 283-9.

23- Yilmaz A, Menevse S, Bayazit Y, Karamert R, Ergin V, Menevse A. Two novel missense mutations in the connexin 26 gene in Turkish patients with nonsyndromic hearing loss. *Biochem Genet.* 2010; 48: 248-56.

24- Tamayo ML, Olarte M, Gelvez N, et al. Molecular studies in the GJB2 gene (Cx26) among a deaf population from Bogotá, Colombia: results of a screening program. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73: 97-101.

25- Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: Review of gene mutations. *Iranian J Pub Health.* 2007; 36: 1-14.

www.SID.ir

Archive of SID

The Frequency of M34T, 167delT, 235delC and 35delG Mutations in GJB2 Gene in Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss Patients in West Azarbaijan

Abdi Rad I[1], Bagheri M[2], Farhoudi F[3]

[1]Center for Cellular and Molecular Research, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

[2]Faculty of Medicine, Dept. of Genetics, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

[3]Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Corresponding Author: Abdi Rad I, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

E-mail: isaabdirad@yahoo.com

Received: 3 Jul 2010 **Accepted:** 13 Mar 2011

Background and Objective: Mutations in GJB2 gene is the most common cause of autosomal recessive non-syndromic hearing loss in many populations. The aim of this study was to determine the frequency of 35delG, 167delT, M34T, 235delC mutations in West Azarbaijan population.

Materials and Methods: 129 patients from 96 families were studied. Mutations were detected using ASO-PCR and PCR-RFLP methods.

Results: Totally, 65.89% of cases were sporadic and the remaining (34.11%) were familial. Six out of 8 cases with 35delG mutation and one case with 235delC mutation were offspring of consanguineous union. Mutations of 35delG were detected in 8 families. 167delT and M34T mutations were not found but 235delC was detected only in one family. On the other hand, 13 out of 258 chromosomes had 35delG mutations. Five patients were homozygous and 3 were heterozygous for 35delG mutation. It means that, in 5.04% of the patients the major reason for hearing loss was 35delG mutation. One out of 258 (0.39%) chromosomes had heterozygous 235delC mutation.

Conclusion: It can be concluded that the other genes or mutations could result in autosomal recessive non-syndromic hearing loss in West Azerbaijani population.

Keywords: M34T, 167delT, 235delC, 35delG, GJB2 gene, Non-syndromic hearing loss

www.SID.ir