

## بررسی فراوانی جهش ۳۵delG ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت های ناشنوای استان های چهارمحال و بختیاری، گیلان و آذربایجان شرقی با استفاده از روش Nested-PCR

محمد تقی مرادی\*، عفت فرخی\*\*، فاطمه آزادگان\*\*\*، دکتر محسن بنی مهدی†، معصومه دولتی††، دکتر سوسن کشاورز†††،

دکتر داریوش فرهود♦، دکتر اعظم حسین پور†††، شاهین منصوری♦♦، دکتر مرتضی هاشم زاده چالستری♦♦♦

\*کارشناس ارشد حشره شناسی-مرکز تحقیقات گیاهان دارویی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*کارشناس ارشد بیوشیمی-مرکز تحقیقات سلولی،

مولکولی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*\*کارشناس ژنتیک-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †پزشک عمومی-

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††کارشناس ارشد ژنتیک-دانشگاه علوم پزشکی قم، †††پزشک عمومی-سازمان آموزش و پرورش استثنایی

کشور، ♦استاد گروه ژنتیک پزشکی-دانشگاه علوم پزشکی تهران، ♦♦کارشناس ارشد آمار حیاتی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ♦♦♦استاد ژنتیک

انسانی-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۱ تاریخ تایید: ۸۹/۴/۳

### چکیده:

زمینه و هدف: ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی-عصبی است. حداقل ۵۰٪ از ناشنوایی ها ارثی بوده و تقریباً نیمی از ناشنوایی های ارثی به صورت اتوزومال مغلوب غیر سندرومی می باشد. جهش در ژن کانکسین ۲۶ (Gap Junction beta2=GJB2) شایع ترین دلیل ناشنوایی غیر سندرومی مغلوب می باشد. جهش نقطه ای ۳۵delG شایع ترین جهش در ژن کانکسین ۲۶ می باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی شایع ترین جهش ژن GJB2 به نام ۳۵delG در افراد ناشنوای استان های آذربایجان شرقی، گیلان و چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۲۴۰ بیمار با اختلال ناشنوایی ژنتیکی غیر سندرومی با الگوی توارث مغلوب از استان های چهارمحال و بختیاری (۹۸ نفر) آذربایجان شرقی (۹۷ نفر) و گیلان (۴۵ نفر) وارد مطالعه شدند. پس از اخذ ۵ میلی لیتر خون از بیماران، DNA با استفاده از روش استاندارد فنل کلر فرم استخراج شد. جهش های ۳۵ delG در این بیماران با استفاده از روش Nested-PCR و ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از ۲۴۰ نفر (۴۸۰ کروموزوم) بررسی شده ۲۴ نفر بصورت هموزیگوت (۴۸ کروموزوم) و ۱۰ نفر بصورت هتروزیگوت (۱۰ کروموزوم) دارای جهش ۳۵delG بودند. فراوانی آلل های جهش یافته در بیماران مورد بررسی برابر با ۱۲/۰۸٪ بود که این نسبت در استان گیلان ۱۸/۸۸٪، در استان آذربایجان شرقی ۱۸/۰۴٪ و در استان چهارمحال و بختیاری ۳/۰۶٪ بدست آمد.

نتیجه گیری: در این مطالعه در مقایسه با جمعیت های اروپایی برخی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی جهش ۳۵ delG پایین است و نشان می دهد ژنها و یا جهش های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب در جمعیت این استان ها به خصوص استان چهارمحال و بختیاری دخیل هستند. لذا ضروری است که جهش های دیگر در لوکوس های دیگر شناسایی و تشخیص داده شوند.

واژه های کلیدی: جهش ۳۵delG، کانکسین ۲۶، Nested-PCR، ناشنوایی.

### مقدمه:

سندرومی می شود که ناشنوایی یکی از علایم آنهاست. در ناشنوایی غیر سندرومی تقریباً ۸۰ درصد اتوزوم مغلوب (DFNB)، ۲۰ درصد اتوزوم غالب (DFNA)، ۱ درصد وابسته به X (DFN) و کمتر از یک درصد میتوکندریایی گزارش شده است (۱-۳).

ژن های مختلفی باعث این اختلال می شوند که در

ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی-عصبی در انسان است. بر اساس آمارهای جهانی از هر ۱۰۰۰ نوزاد زنده یک تا دو نوزاد در هنگام تولد دارای نقص شنوایی شدید می باشد (۲،۱). ۵۰ درصد از موارد ناشنوایی ناشی از اختلالات ژنتیکی است. تقریباً ۳۰ درصد از موارد ناشنوایی ژنتیکی سندرومی است که شامل صدها

کانکسین ۲۶ ناشنوایان در جامعه قفقازی و شیوع ناقلین ۴-۲ درصدی در جمعیت اروپایی است (۱۵). بر اساس مطالعه مروری هاشم زاده و فرهود جهش ۳۵delG شایع ترین جهش (۷۴/۵٪) را در بین جهش های ژن کانکسین ۲۶ در کشور دارا می باشد (۱۲). همچنین میزان این جهش در بین ناقلین ۱/۸ درصد بوده که استان گیلان با ۲/۸ درصد بیشترین شیوع را داشته است (۱۶).

۳۵delG در بیشتر جمعیت های جهان با شیوع قومی متفاوتی دیده می شود با توجه به اینکه فراوانی این جهش در بین اقوام مختلف ایران متفاوت گزارش شده است (۱۲). لذا این مطالعه با هدف تعیین فراوانی ۳۵delG در افراد ناشنوی استان های آذربایجان شرقی، گیلان و چهارمحال و بختیاری انجام گردید.

### روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، ۲۴۰ بیمار با اختلال ناشنوایی ژنتیکی غیر سندرمی با الگوی توارث مغلوب از استان های چهارمحال و بختیاری (۹۸ نفر) آذربایجان شرقی (۹۷ نفر) و گیلان (۴۵ نفر) باروش نمونه گیری آسان وارد مطالعه شدند. این بیماران شامل ۱۱۳ نفر مونث و ۱۲۷ نفر مذکر با میانگین سنی  $28/47 \pm 13/61$  سال بودند. از شرایط ورود به مطالعه داشتن ناشنوایی ژنتیکی و غیر سندرومی بوده و افراد ناشنوا با علل سندرومی، غیر ژنتیکی و ناشناخته از مطالعه حذف شدند.

پس از اخذ رضایت نامه کتبی از بیماران و والدین افراد زیر سن قانونی، اطلاعات دموگرافی و بالینی آنها از طریق پرسشنامه جمع آوری و سپس از هر بیمار به میزان ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات مولکولی در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ۰/۵ مولار گرفته شد. DNA نمونه های خون با روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج (۱۷) و میزان DNA حاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر Unico 2100 (USA) اندازه گیری گردید. در این مطالعه که به روش Nested PCR انجام شد از پرایمرهای طراحی شده توسط Hashemzadeh و همکاران استفاده (۱۶) و از

نهایت ۱۰۰ لوکوس برای آن تخمین زده شده است. از میان آنها DFNB1 به تنهایی مسئول ۵۰ درصد از ناشنوایی های جسمی مغلوب می باشد که به واسطه جهش در دو ژن GJB2 (کانکسین ۲۶) و GJB6 (کانکسین ۳۰) واقع در لوکوس DFNB1 کروموزوم ۱۲-۱۱q۱۱ ایجاد می شود (۴).

کانکسین ۲۶، ژن کوچکی است که بر روی کروموزوم شماره ۱۳ قرار گرفته است. طول این ژن، ۵/۵ کیلو باز بوده و از ۲ آگرون تشکیل شده است که فقط آگرون شماره ۲ کد کننده پروتئین کانکسین ۲۶ می باشد (۶،۵). پروتئین کانکسین ۲۶، عضوی از خانواده کانال اتصال باز بتا ۲ (Gap Junction Beta 2 [GJB2]) می باشد. این پروتئین، مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است که اجازه انتقال به مولکول های کوچک می دهد. تا کنون بیش از ۹۰ جهش در ژن کانکسین ۲۶ و ۲ جهش در ژن کانکسین ۳۰ گزارش شده است (۶،۲). گزارش های گوناگون از سراسر جهان نشان داده اند که شیوع جهش های ژن GJB2 در مناطق جغرافیایی و اقوام مختلف، متفاوت است (۷-۱۱).

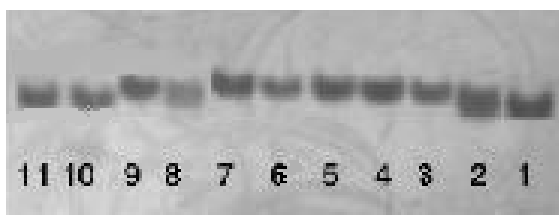
در ایران بیشترین جهش در ژن کانکسین ۲۶ در استان گیلان و آذربایجان شرقی با بیش از ۲۷/۵ درصد و کمترین میزان در استان سیستان و بلوچستان با ۳/۶ درصد و به طور متوسط در کل کشور میزان این جهش ۱۴/۶ درصد گزارش شده است (۱۲).

جهش ۳۵delG، شایع ترین جهش در ژن کانکسین ۲۶ (در حدود ۷۰٪) می باشد که با حذف یکی از ۶ باز گوانین در موقعیت ۳۰ تا ۳۵ منطقه کد کننده، باعث تغییر در قالب خواندن پروتئین کانکسین ۲۶ و ایجاد کدون خاتمه زودرس در موقعیت اسید آمینه شماره ۱۳ می شود (۱۳،۲). این جهش برای اولین بار توسط Zelante و همکارانش گزارش شد و علت عمده ناشنوایی های مادرزادی تک موردی و ارثی در جمعیت های سفید پوست می باشد (۱۳). بطوری که این جهش مسئول ۱۰ درصد ناشنوایی کودکان و ۲۰ درصد ناشنوایی ارثی در کودکان جامعه قفقازی آمریکا و مناطق جنوب اروپا است (۱۴). علاوه بر این جهش ۳۵delG مسئول ۷۰ درصد جهش های ژن

نهایت به منظور تایید جهش های شناسایی شده با روش Nested PCR از روش تعیین توالی استفاده گردید.

### یافته ها:

از ۲۴۰ بیمار مورد بررسی ۴۵ نفر مربوط به استان گیلان، ۹۷ نفر استان آذربایجان شرقی و ۹۸ نفر استان چهارمحال و بختیاری بودند. پس از انجام الکتروفورز مرحله دوم PCR در نمونه های دارای جهش ۳۵delG باندی به طول ۴۲bp و در نمونه های بدون جهش ۴۳bp تشکیل گردید (تصویر شماره ۱) که بر این اساس از ۲۴۰ نفر (۴۸۰ کروموزوم) بررسی شده ۲۴ نفر بصورت هموزیگوت (۴۸ کروموزوم) و ۱۰ نفر بصورت هتروزیگوت (۱۰ کروموزوم) دارای جهش ۳۵delG بودند. به طور کلی جهش ۳۵delG در ۳۴ نفر (۱۴/۱۶٪) یافت شد و فراوانی آلل های جهش یافته در بیماران مورد بررسی برابر با ۱۲/۰۸ درصد (۵۸/۴۸۰) بود (جدول شماره ۱). این نسبت در استان گیلان ۱۸/۸۸ درصد



تصویر شماره ۱: محصولات PCR جهش ۳۵delG بر روی ژل آکریل آمید ۱۵٪

شماره ۱: کنترل هتروزیگوت، شماره ۲: کنترل هموزیگوت، شماره ۳: کنترل منفی، شماره های ۷-۴ و ۹: نمونه فاقد جهش ۳۵delG (wild type)، شماره ۱: نمونه هتروزیگوت، شماره ۱۰ و ۱۱: نمونه هموزیگوت

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی جهش ۳۵delG در مبتلایان به ناشنوایی غیر سندرمی مورد بررسی به تفکیک استان

| کل | چهارمحال و بختیاری | آذربایجان شرقی | گیلان | استان ژنوتیپ |
|----|--------------------|----------------|-------|--------------|
| ۲۴ | ۳                  | ۱۴             | ۷     | هموزیگوت     |
| ۱۰ | ۰                  | ۷              | ۳     | هتروزیگوت    |
| ۳۴ | ۳                  | ۲۱             | ۱۰    | کل           |

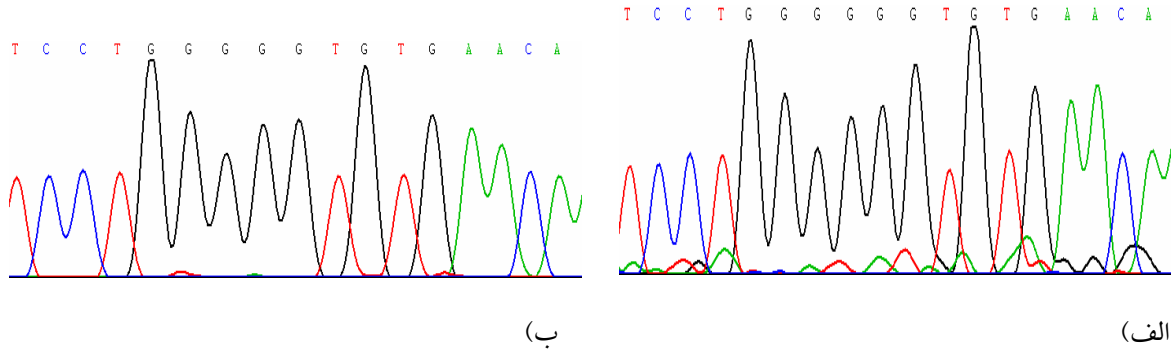
شرکت ژن فن آوران خریداری شدند. در مرحله اول با استفاده از پرایمرهای زیر قطعاتی به اندازه 806bp تکثیر گردید.

CX124F: 5' CTC CCT GTT CTG TCC TAG CT 3'  
CX929R: 5' CTC ATC CCT CTC ATG CTG TC 3'  
سپس در مرحله دوم، محصول PCR مرحله اول به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردیده و به عنوان الگو در واکنش PCR دیگری با استفاده از پرایمرهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند تا قطعاتی به طول 42bp ایجاد گردند.

CX210F: 5' CAC GCT GCA GAC GAT CC 3'  
CX252R: 5' GGT GGA GTG TTT GTT CAC 3'  
مقادیر مواد مورد استفاده در آزمایش PCR (برای هر دو مرحله) به شرح زیر می باشد:

0.5µl = dNTP(10mM) 2.5µl = Buffer 2µl = MgCl2  
0.5µl = PrimerR(10pmol) 0.5µl = PrimerF(10pmol)  
1µl = DNA 0.1µl = Taq polymerase 16.5µl = ddH2O  
برنامه دمایی مورد استفاده برای PCR مرحله اول شامل واسرشت اولیه (Pre denaturation) ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۱ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن (Annealing) در ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و طولیل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود و برای پرایمرهای مرحله دوم به صورت واسرشت اولیه (Pre denaturation) ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۲۸ سیکل شامل واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن (Annealing) در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طولیل شدن (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و بالاخره طولیل شدن نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید.

محصولات PCR حاصله سپس بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد (Merck Germany) با ولتاژ ۱۵۰ ولت و شدت جریان ۲۰ میلی آمپر به مدت ۴ ساعت الکتروفورز شده و سپس توسط رنگ آمیزی نترات نقره رؤیت شدند. در



**تصویر شماره ۲: توالی جهش 35delG از ژن کانکسین ۲۶**  
(الف) نمونه سالم (ب) نمونه جهش یافته (هموزیگوت)

Nested PCR با استفاده از روش تعیین توالی مورد تایید قرار گرفتند (تصویر شماره ۲).

(۱۷/۹۰)، در استان آذربایجان شرقی ۱۸/۰۴٪ (۳۵/۱۹۴) و در استان چهارمحال و بختیاری ۳/۰۶٪ (۶/۱۹۶) بدست آمد. در نهایت جهش های شناسایی شده با روش

**جدول شماره ۲: فراوانی جهش 35delG ژن GJB2 در استان های مختلف ایران**

| استان                 | تعداد بیمار (خانواده) | تعداد کروموزوم (آلل) | تعداد آلل 35delG | نسبت جهش 35delG به کل جهش های GJB2 (درصد) | رفرانس         |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------------|---|----------------|
| کرمانشاه              | ۷۷                    | ۱۵۴                  | ۱۷               | ۵۸/۶۲                                     | ۳۳             |
| لرستان                | ۵۳                    | ۱۰۶                  | ۱۰               | ۵۵/۵                                      | ۳۴             |
| یزد                   | ۱۲۰                   | ۲۴۰                  | ۴                | ۲۵  | ۳۵             |
| خوزستان               | ۱۲۳                   | ۲۴۶                  | ۱۴               | ۶۳/۶                                      | ۳۶،۳۷*         |
| آذربایجان غربی        | ۱۰۳                   | ۲۰۶                  | ۱۰               | -   | ۳۸             |
| کرمان                 | ۶۵                    | ۱۳۰                  | ۳                | -   | ۳۹             |
| همدان                 | ۷۶                    | ۱۵۲                  | ۲۱               | ۷۵  | ۴۰             |
| گلستان                | ۵۵                    | ۱۱۰                  | ۱۰               | ۷۶/۹                                      | ۳۷             |
| کردستان               | ۵۱                    | ۱۰۲                  | ۱۵               | ۱۰۰                                       | ۳۷             |
| مازندران              | ۳۸                    | ۷۶                   | ۲۷               | ۸۴/۴                                      | ۴۱             |
| سیستان و بلوچستان     | ۱۸۴                   | ۳۶۸                  | ۰                | ۰   | ۴۲،۴۳*         |
| هرمزگان               | ۱۰۵                   | ۲۱۰                  | ۳                | ۳۳/۳                                      | ۴۳             |
| آذربایجان غربی و شرقی | ۱۳۸                   | ۲۷۶                  | ۶۲               | ۸۲/۷                                      | ۴۴             |
| تهران                 | ۱۷۳                   | ۳۴۶                  | ۴۸               | ۶۷/۶                                      | ۴۵             |
| آذربایجان شرقی        | ۹۷                    | ۱۹۴                  | ۲۶               | ۶۶/۷                                      | ۴۵             |
| چهارمحال و بختیاری    | ۹۸                    | ۱۹۶                  | ۱۰               | -   | مطالعه حاضر ۱۲ |
| گیلان                 | ۸۷                    | ۱۷۴                  | ۶                | ۸۳/۳                                      | مطالعه حاضر ۱۲ |
| خراسان                | ۴۵                    | ۹۰                   | ۷                | -   | مطالعه حاضر ۱۲ |
| کل                    | ۱۷۱۰                  | ۳۴۲۰                 | ۳۵۲              | ۸۷/۴**                                    | ۱۲ و ۳۳-۴۵     |

\* اطلاعات وجود اطلاعات - اطلاعات دو مطالعه جمع شده است  
\*\* درصد محاسبه شده بدون در نظر گرفتن اطلاعات استان هایی است که میزان جهش در GJB2 گزارش نشده است.

**بحث:**

در این مطالعه ۴۸۰ کروموزوم از ۲۴۰ فرد ناشنوی غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب مورد بررسی قرار گرفتند. از این میان ۵۸ کروموزوم (۲۴ نفر هموزیگوت و ۱۰ نفر هتروزیگوت) جهش ۳۵delG را نشان دادند و فراوانی جهش ۳۵delG برابر ۱۲/۰۸ درصد بدست آمد.

تاکنون جهش های ژن کانکسین ۲۶ را در اکثر جوامع جهان گزارش کرده اند. جهش های این ژن عامل ایجاد کننده نیمی از ناشنوایی ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت های مختلف است (۱۱-۲) و جهش ۳۵delG شایع ترین جهش از بین بیش از ۹۰ جهش گزارش شده برای این ژن در بین اکثر جوامع مطرح می باشد (۱۳). بیش از نصف کل افراد جمعیت شمال اروپا با دو جهش قابل شناسایی در ژن، GJB2 برای جهش نقطه ای ۳۵delG هموزیگوت هستند (۱۹،۱۸). جهش ۳۵delG در بیشتر جمعیت های جهان با شیوع قومی متفاوتی دیده می شود بطوری که در جمعیت های چین ۱/۲ درصد (۱۱)، فلسطین ۱۴ درصد (۷)، آمریکا ۷۲-۲۶ درصد (۲۱،۲۰،۱۴)، یونان ۵۳-۹۵ درصد (۲۳،۲۲)، ایتالیا ۳۹/۴-۸۹/۵ درصد (۲۵،۲۴) و در اردن ۹۴-۱۰۰ درصد (۲۷،۲۶) گزارش شده است. اگر چه مطالعات دقیقی از همسایگان ایران به غیر از ترکیه (۲۸،۲۹) در دست نیست لیکن در یک مطالعه بر روی ناشنویان پاکستان این جهش یافت نشده است (۳۰). ولی در بین جمعیت های عرب این جهش شایع گزارش شده است (۳۱).

این آلل همچنین به عنوان علت اصلی ناشنوایی ژنتیکی در خانواده های ناشنوی منطقه مدیترانه ای گزارش شده است. تصور می کنند که دلیل آن پدیده اثر بنیان گذار یا (Founder Effect) برای این جهش است، که قدمت آن را حدود ۱۰۰۰۰ سال محاسبه کرده اند.

در این مطالعه از روش nested PCR جهت تشخیص جهش ۳۵delG استفاده شد با توجه به تایید جهش های مشاهده شده به کمک روش تعیین توالی استفاده از این روش به همراه ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد روشی ساده و قابل اعتماد جهت تشخیص جهش ۳۵delG می باشد.

**نتیجه گیری:**

در مطالعه ما در مقایسه با جمعیت های اروپایی و برخی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی جهش ۳۵delG پایین است و نشان می دهد ژن ها و یا جهش های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب در جمعیت این استان ها و بخصوص استان چهارمهل و بختیاری دخیل هستند، لذا ضروری است که جهش های دیگر در لوکوس های دیگر شناسایی و تشخیص داده شوند.

تاکنون جهش های ژن کانکسین ۲۶ را در اکثر جوامع جهان گزارش کرده اند. جهش های این ژن عامل ایجاد کننده نیمی از ناشنوایی ها از نوع خفیف تا شدید در جمعیت های مختلف است (۱۱-۲) و جهش ۳۵delG شایع ترین جهش از بین بیش از ۹۰ جهش گزارش شده برای این ژن در بین اکثر جوامع مطرح می باشد (۱۳). بیش از نصف کل افراد جمعیت شمال اروپا با دو جهش قابل شناسایی در ژن، GJB2 برای جهش نقطه ای ۳۵delG هموزیگوت هستند (۱۹،۱۸). جهش ۳۵delG در بیشتر جمعیت های جهان با شیوع قومی متفاوتی دیده می شود بطوری که در جمعیت های چین ۱/۲ درصد (۱۱)، فلسطین ۱۴ درصد (۷)، آمریکا ۷۲-۲۶ درصد (۲۱،۲۰،۱۴)، یونان ۵۳-۹۵ درصد (۲۳،۲۲)، ایتالیا ۳۹/۴-۸۹/۵ درصد (۲۵،۲۴) و در اردن ۹۴-۱۰۰ درصد (۲۷،۲۶) گزارش شده است. اگر چه مطالعات دقیقی از همسایگان ایران به غیر از ترکیه (۲۸،۲۹) در دست نیست لیکن در یک مطالعه بر روی ناشنویان پاکستان این جهش یافت نشده است (۳۰). ولی در بین جمعیت های عرب این جهش شایع گزارش شده است (۳۱).

این آلل همچنین به عنوان علت اصلی ناشنوایی ژنتیکی در خانواده های ناشنوی منطقه مدیترانه ای گزارش شده است. تصور می کنند که دلیل آن پدیده اثر بنیان گذار یا (Founder Effect) برای این جهش است، که قدمت آن را حدود ۱۰۰۰۰ سال محاسبه کرده اند.

مطالعات انجام یافته در ایران حاکی از متفاوت بودن فراوانی این جهش در بین اقوام مختلف بوده است و بیانگر کاهش فراوانی این جهش از شمال به جنوب و از غرب به شرق می باشد (جدول شماره ۱). با توجه به این الگو و نیز وفور نسبی این جهش در کشور همسایه ی شمال غرب یعنی ترکیه (۲۸،۲۹). این جهش در شمال غرب ایران از فراوانی نسبتاً بالایی برخوردار می باشد. که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. متفاوت بودن فراوانی این جهش در اقوام ایرانی می تواند ناشی از اختلاف نژادی، فرهنگ متفاوت، عوامل اقتصادی، جغرافیایی و غیره باشد.

در این مطالعه از روش nested PCR جهت تشخیص جهش ۳۵delG استفاده شد با توجه به تایید جهش های مشاهده شده به کمک روش تعیین توالی استفاده از این روش به همراه ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد روشی ساده و قابل اعتماد جهت تشخیص جهش ۳۵delG می باشد.

نتیجه گیری:

در مطالعه ما در مقایسه با جمعیت های اروپایی و برخی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی جهش ۳۵delG پایین است و نشان می دهد ژن ها و یا جهش های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب در جمعیت این استان ها و بخصوص استان چهارمهل و بختیاری دخیل هستند، لذا ضروری است که جهش های دیگر در لوکوس های دیگر شناسایی و تشخیص داده شوند.

**تشکر و قدردانی:**

پرورش استثنایی استان های چهارمحال و بختیاری، آذربایجان شرقی و گیلان صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

از کلیه بیماران و خانواده های آنها که در این مطالعه شرکت نمودند صمیمانه تشکر می نمایم. از ریاست و پرسنل محترم سازمان بهزیستی، ریاست و پرسنل محترم آموزش و

**منابع:**

1. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith RJH. Genetic testing for hereditary hearing loss: Connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafnesscausing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Human Mutation*. 2000; 16: 502-8.
2. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*. 2005; 77: 945-57.
3. Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet*. 2006; 69: 371-92.
4. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med*. 2002; 4: 258-74.
5. Lefebvre PP, Van De Water TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Rev*. 2000; 32(1): 159-62.
6. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 475-502.
7. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet*. 2002 Mar; 110(3): 284-9.
8. Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, et al. Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet*. 2003 Jul; 113(1):18-23.
9. Lopponen T, Vaisanen ML, Luotonen M, Allinen M, Uusimaa J, Lindholm P, et al. Connexin 26 mutations and nonsyndromic hearing impairment in northern Finland. *Laryngoscope*. 2003 Oct; 113(10): 1758-63.
10. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH, Chiang YL, Oong JL, et al. Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. *Genet Med*. 2003 May-Jun; 5(3): 161-5.
11. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum Genet*. 2002 Oct; 111(4-5): 394-7.
12. Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD. Familial and sporadic GJB2-related deafness in Iran: review of gene mutations. *Iranian J Pub Health*. 2007; 36(1): 1-14.
13. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, et al. Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet*. 1997 Sep; 6(9): 1605-9.
14. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 792-9.
15. Lucotte G, Diéterlen F. The 35delG mutation in the connexin 26 genes (GJB2) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence for its origin in ancient Greece. *Genet Test*. 2005 Spring; 9(1): 20-5.

16. Chaleshtori MH, Farrokhi E, Shahrani M, Kheiri S, Dolati M, Rad LH, et al. High carrier frequency of the GJB2 mutation (35delG) in the north of Iran. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Jun; 71(6): 863-7.
17. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid. In: Dale JW, Schantz MV. *From Genes to genomes*. Chichester: John Wiley; 2002. p: 31-3.
18. Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat*. 1998; 11: 387-94.
19. Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJH. Connexin mutations and hearing loss. *Nature*. 1998; 391: 32.
20. Lin D, Goldstein JA, Mhatre AN, Lustig LR, Pfister M, Lalwani AK. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2). *Hum Mut*. 2001; 18: 42-51.
21. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith R. Genetics testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two noval deafness causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mut*. 2000; 16: 502-8.
22. Pampanos A, Neou P, Iliades T, Apostolopoulos N, Voyiatzis N, Grigoriadou M. Pseudodominant inheritance of DFNB1 deafness due to common 35delG mutation. *Clin Genet* 2000; 57: 232-4.
23. Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, PetMezakis J, et al. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet*. 1999; 55: 381-2.
24. Gualandi F, Ravani A, Berto A, Sensi A, TrabANELLI C, Falciano F, et al. Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2- linked deafness. *Am J Med Genet*. 2002; 112: 38-45.
25. D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio, et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296: 685-91.
26. Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, ParronauD J, Salem N, et al. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 391-4.
27. Mustapha M, Salem N, Delague V, Chouery E, Ghassibeh M, Rai M, et al. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet*. 2001; 38: E36.
28. Kalay E, Caylan R, Kremer H, De Brouwer AP, Karaguzel A. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res*. 2005; 203: 88- 93.
29. Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Ilhan I, et al. Spectrum of GJB2 mutations in Turkey comprises both Caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating. *Hum Mutat*. 2003 May; 21(5): 552-3.
30. Santos RL, Wajid M, Pham TL, Hussan J, Ali G, Ahmad W, et al. Low prevalence of Connexin 26 (GJB2) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet*. 2005 Jan; 67(1): 61-8.
31. Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*. 2005 Dec; 77(6): 945-57.

32. Mahdieh N, Rabbani B. Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol.* 2009; 48(6): 363-70.
33. Mahdieh N, Nishimura C, Ali Madadi K, Yazdan H, Kazemi S, Riazal Hosseini Y, et al. [Frequency of connexin 26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness in Kermanshah, 2002-04. *J Kermanshah Univ of Med Sci (Behbood).* 2005; 9(2): 32-40.]Persian
34. Sepahvand M, Kahrizi K, Daneshi A, Riaz Alhosseini Y, Mohseni Marzieh, Bazazzadegan N, et al. [Relative frequency of GJB2 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) patients in lorestan population. *Yaft-e.* 2006 Summer; 8(2): 89-95.]Persian
35. Moghani bashi M, Khodaei H, Seifati M, Mirab M, Kahrizi K, Riaz Alhosseini Y, et al. [pectrum of GJB2 gene mutations in non-syndromic autosomal recessive deaf patients in Yazd. *J Shahid Sadoughi Univ of Med Sci and Health Services.* 2005; 13(4): 64-70.]Persian
36. Kahrizi K, Sajjadi A, Mohseni M, Riazalhosseini Y, Bazazzadegan N, Najmabadi H. [GJB2 mutations screening in autosomal recessive non-syndromic deaf patients of Khoozestan province. *J Rehabilitation.* 2006; 7(3-26): 34-7.]Persian
37. Hoseinipour A, Hashemzadeh Chaleshtori, Sasanfar R, Farhud DD, Toloui A, Dowlati M, et al. Report of a new mutation and frequency of connexin 26 gene (GJB2) mutations in patints from three provinces of Iran. *Iranian J Public Health.* 2005; 34 (1): 47-50.
38. Abdirad I, Omrani MD, Bagheri M, Parvaresh A. [Frequency of 35delG mutation in GJB2 gene in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL). *J Urmia Univ of Med Sci.* 2009 Spring; 20(1): 34-9.]Persian
39. Bazazzadegan N, Mohseni M, Riaz Alhosseini Y, Kahrizi K, Arzhangi S, Jalalvand Kh, et al. [Relative frequency of 35delg mutation in GJB2 gene in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) patients in kerman population. *J Kerman Univ of Med Sci.* 2004 Summer; 11(3): 136-40.]Persian
40. Shafeghati Y, Ebrahimi A, Mohseni M, Ostadi F, Habibi H, Pourjafari H, et al. [Connexin 26 gene 'mutations in non-syndromic hearing loss in hamadan province. *Scientific J Hamadan Univ of Med Sci and Health Services.* 2006 Winter; 12(4-SN 38): 23-7.]Persian
41. Khoshayeen A, Pourfatemi F, Kahrizi K, Mohseni M, Riaz Alhosseini Y, Nikzat N, et al. [screening of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss for GJB2 mutations. *J Rehabilitation.* 2004 Spring-Summer; 5(16-17): 27-31.]Persian
42. Naghavi A, Nishimura C, Kahrizi K, Riaz Alhosseini Y, Suraki Aliabadi H, Mahdieh N, et al. [Prevalence of GJB2 mutations among patients with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Sistan and Baloochestan province. *Tabib-E-Shargh.* 2005 Summer; 7(2): 85-92.]Persian
43. Sasanfar R, Toloui A, Hoseinipour A, Farhud DD, Dowlati M, Hoghooghi Rad L, et al. Frequency of a very rare 35delG mutations in two ethnic groups of Iranian populations. *Iranian J Publ Health.* 2004; 33(4): 26-30.
44. Rayhanifar F, Kahrizi K, Daneshi A, Mohseni M, Zamani M, Riazalhosseini Y, et al. [Screening for autosomal recessive nonsyndromic hearing loss(DFNB1)Among deaf patients of east and west azarbaijan provinces. *J Iran Univ of Med Sci.* 2005; 12(49): 71-6.]Persian
45. Hashemzadeh Chaleshtori M, Montazer Zohour M, Farhoud DD, Hoghooghi Rad L, Doulati M, Sasanfar R, et al. Frequencies of mutations in the connexin 26 gene (GJB2) in two populations of iran (Tehran and Tabriz). *Iranian J Public Health.* 2005; 34(1): 1-7.



Received: 21/Jan/2010

Accepted: 24/Jun/2010

### Frequency of 35delG mutation in GJB2 gene in non-syndromic prelingual hearing loss in 3 provinces of Iran

Moradi MT (MSc)\*, Farrokhi E (MSc)\*\*, Azadegan F (BSc)\*\*, Bani-Mehdi M (MD)\*\*\*, Doulati M (MSc)†, Keshavarz S (MD)††, Farhood D (PhD)†††, Hosseinpoor A (MD)††, Mansouri Sh (MSc)\*\*, Hashemzadeh-Chaleshtori M (PhD)♦<sup>1</sup>

\*Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, \*\*Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, \*\*\*General physician, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, †Genetic Dept., Qom Univ. of Med. Sci. Qom, Iran ††General physician, Special education organization, Tehran, Iran, †††Professor, Human genetic Dept., Tehran Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran, ♦Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord, Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran.

**Background and aims:** Hearing loss is the most common inherited sensory disorder. At least 50% of hearing loss is inherited and about half of the genetic hearing loss is autosomal recessive non-syndromic. Mutations in GJB2 gene is the most frequent cause of autosomal recessive non-syndromic hearing loss. A single 35delG mutation is the most common allelic variant of GJB2 in most parts of the world. The aim of this study was to determine the rate of 35delG mutation in non-syndromic prelingual hearing loss in 3 provinces of Iran.

**Methods:** In this descriptive experimental study, 240 cases with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in 3 provinces of Iran, including Azarbaijan Sharghi (97 cases), Chaharmahal va Bakhtiari (98 cases) and Gilan (45 cases) were screened for 35delG mutation in the GJB2 gene. Blood samples (5 ml) were taken for genomic DNA extraction. The mutation was screened using Nested-PCR method and the positive results were confirmed by subsequent direct sequencing.

**Results:** Results of this study showed that from 240 studied patients (480 chromosomes), 35delG mutation was found in 58 chromosomes (24 patients were homozygote and 10 patients were heterozygote). The frequency of 35delG mutation was 12.08%, including 18.04% in Azarbaijan Sharghi, 3.06% in Chaharmahal va Bakhtiari and 18.88% in Gilan province.

**Conclusion:** Prevalence of 35delG mutation in Chaharmahal va Bakhtiari population was lower than other provinces studied. These results indicate that the other genes or mutations could result in autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Chaharmahal va Bakhtiari population. However, as we found a low rate of 35delG in the populations studied, the cause of deafness remains to be detected in other loci or genes.

**Keywords:** 35delG Mutation, Hearing loss, Nested-PCR.

<sup>1</sup>Corresponding author:  
Cellular and Molecular  
Research Center, Shahrekord  
Univ. of Med. Sci. Rahmatieh,  
Shahrekord, Iran.  
Tel:  
0381-3346692  
E-mail:  
mchalesh@yahoo.com