

## بررسی جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ و سه حذف بزرگ ژن کانکسین ۳۰ در ۶۳ خانواده ایرانی مبتلا به ناشنوایی غیر نشانگانی با توارث اتوزومی مغلوب

عاطفه شیرکوند<sup>۱</sup>، نجات مهدیه<sup>۲،۳</sup>، حمیده باقریان<sup>۴</sup>، مریم شرفی فرزاد<sup>۵</sup>، رقیه وحیدی<sup>۶</sup>، سوده کیانفر<sup>۷</sup>، سحر قهرمانی<sup>۸</sup>،  
مریم عاشری<sup>۹</sup>، مرضیه ریسی<sup>۱۰</sup>، زهرا زینلی<sup>۱</sup>، زهرا ظفری<sup>۲</sup>، اکرم قاسمی<sup>۳</sup>، سیروس زینلی<sup>۱،۹\*</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
- ۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
- ۳- دانشجوی دکتری تخصصی، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران
- ۴- پزشک عمومی و مشاور ژنتیک، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران
- ۵- کارشناس، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران
- ۶- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه خاتم، تهران، ایران
- ۸- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، فارس، ایران
- ۹- دانشیار، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۱۰- دانشیار، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۴/۰۷

دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۲۱

### چکیده

**هدف:** ناشنوایی شایع‌ترین نقص حسی عصبی در انسان است. جهش در دو ژن GJB2 و GJB6، عامل ۵۰ درصد موارد ناشنوایی غیر نشانگانی اتوزوم مغلوب (ARNSHL) است. در این مطالعه فراوانی جهش‌های دو ژن GJB2 و GJB6 و سه حذف بزرگ (Del(GJB6-D13S1830)، Del(GJB6-D13S1854) و  $>920$  کیلوباز در ژن GJB6 در ناشنوایان غیر نشانگانی اتوزوم مغلوب مراجعه کننده به مرکز ژنتیک انسانی کوثر بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق ۹۴ بیمار از ۶۳ خانواده با ناشنوایی غیر نشانگانی اتوزوم مغلوب بررسی شدند. برای تشخیص جهش شایع 35delG، از روش ARMS-PCR استفاده شد. بیمارانی که برای جهش 35delG مثبت بودند کنار گذاشته شدند و بقیه افراد با استفاده از روش تعیین توالی ژن GJB2 و GJB6 بررسی شدند. همچنین سه حذف بزرگ ژن GJB6 با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد. **نتایج:** در این مطالعه در ۱۳ خانواده (از ۶۳ خانواده)، جهش در ژن کانکسین ۲۶ (۲۰/۶ درصد) مشاهده شد. جمعیت مورد مطالعه، شایع‌ترین جهش 35delG بود (۶۱/۵ درصد). جهش‌های دیگر ژن GJB2 عبارت بود از: delE120، R127H، W24X، V371. افراد هتروزیگوت جهش ژن GJB2 یا افراد فاقد جهش در این ژن برای جهش ژن GJB6 با روش تعیین توالی بررسی شدند و هیچ جهشی دیده نشد. سه حذف بزرگ در ژن GJB6 نیز بررسی شد و هیچ حذفی مشاهده نشد.

\*نشانی مکاتبه: تهران، خیابان ولی عصر، خیابان مجلسی، پلاک ۴۱، مرکز ژنتیک انسانی کوثر، کدپستی: ۱۵۹۵۶۴۵۵۱۳

Email: Zeinali@kawsar.ir

\*\*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

Email: Zeinali@pasteur.ac.ir

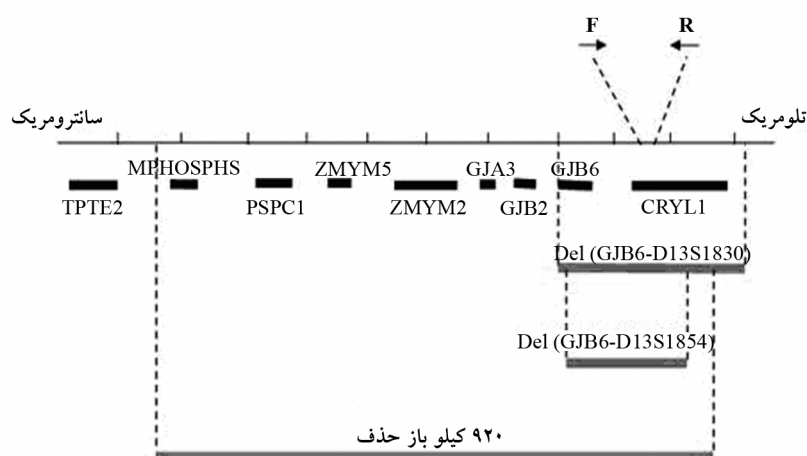
**نتیجه‌گیری:** فراوانی پایین جهش ژن GJB2 در این جمعیت احتمالاً گویای این واقعیت است که ژن‌های دیگری در بروز ناشنوایی غیرنشانگانی در کشورمان نقش دارد.

**کلیدواژگان:** ناشنوایی غیرنشانگانی، GJB2، جمعیت، PCR

## ۱- مقدمه

ناشنوایی، شایع‌ترین نقص حسی عصبی در انسان بوده که فراوانی آن حدود ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد است [۱]. عوامل مسبب این اختلال به صورت ناهمگن (Heterogenous) هستند که نیمی از موارد آن به صورت ژنتیکی و بقیه غیرژنتیکی است. موارد ژنتیکی می‌تواند به صورت اتوزوم بارز (DFNA)، اتوزوم نهفته (DFNB)، وابسته به جنس نهفته (DFNX) یا جهش در ژن‌های میتوکندری به ارث برسد؛ براساس مطالعات، حدود ۸۰ درصد موارد به صورت اتوزوم نهفته، ۱۰ درصد اتوزوم بارز و ۱-۵ درصد به صورت وابسته به جنس نهفته است. در دسته‌بندی دیگری، ناشنوایی را به دو صورت نشانگانی (Syndromic) و غیرنشانگانی تعریف می‌کنند. اگر علاوه بر ناشنوایی علامت یا نشانه دیگری در فرد ناشنوا دیده شود، در گروه نشانگانی و در صورتی که ناشنوایی تنها عارضه فرد مبتلا باشد، در گروه ناشنوایی‌های غیرنشانگانی قرار می‌گیرد [۲]. ناشنوایی‌های غیرنشانگانی با توارث اتوزومی مغلوب (Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss: ARNSHL)، شایع‌ترین شکل ناشنوایی است (۷۰ درصد موارد). تاکنون حداقل ۴۶ ژن مسبب ناشنوایی گزارش شده است [۳]. علاوه بر جهش‌های ژن GJB2 یا کانکسین ۲۶ (Connexin 26)، حذف‌های بزرگ در ژن GJB6 (Cx30) واقع در لوکوس DFNB1، در مجاورت ژن کانکسین ۲۶، روی کروموزوم 13q نیز گزارش شده‌اند [۴]. ژن کانکسین ۲۶ واجد دو اگزون است که فقط یکی از این دو اگزون (اگزون ۲) کدهای لازم برای سنتز پروتئین را دارد [۵]. پروتئین‌های حاصل از این دو ژن (کانکسین ۲۶ و کانکسین ۳۰)، از خانواده بزرگ کانال‌های ایجادکننده اتصالات شکافی

(Gap Junction) است که مسئول ایجاد اتصالات باز بین سلولی است و اجازه انتقال یون پتاسیم و مولکول‌های کوچک را می‌دهد [۶]. تاکنون بیش از ۱۰۰ جهش مختلف در ژن کانکسین ۲۶ گزارش شده و این جهش‌ها در قومیت‌های مختلف شیوع متفاوتی دارد [۷]. به‌عنوان مثال جهش 35delG در جمعیت‌های قفقازی [۸]، 167delT در یهودیان اشکنازی [۹]، 235delC در جمعیت‌های آسیای شرقی [۱۰-۱۳] و R143W در جمعیت آفریقا [۱۴]، به‌عنوان شایع‌ترین جهش‌های GJB2 گزارش شده است. در ژن کانکسین ۲۶، شش باز گوانین در موقعیت ۳۰-۳۵ ناحیه کد کننده وجود دارد که حذف یکی از این نوکلئوتیدها منجر به جهش 35delG می‌شود. جهش 35delG منجر به ایجاد کدون خاتمه زودرس در اسیدآمینو شماره ۱۳ می‌شود [۱۵]. در ژن GJB6 سه حذف بزرگ (Del(GJB6-D13S1854)، Del(GJB6-D13S1830) و حذف ۹۲۰ کیلوبازی) گزارش شده که به صورت هموزیگوت یا هتروزیگوت مرکب با ژن GJB2 باعث بروز ناشنوایی می‌شود (شکل ۱). جهش Del(GJB6-D13S1854) شامل حذف یک قطعه ۳۰۹ کیلوبازی از ناحیه تومری ژن GJB6 و جهش Del(GJB6-D13S1854) شامل حذف یک قطعه ۲۳۲ کیلوبازی است و در حذف ۹۲۰ کیلوبازی، هشت ژن که شامل GJB6، GJB2، GJA3، CRYL1، MPHOSPH8، PSPC1، ZMYM5، ZMYM2 است، حذف می‌شود [۱۶، ۱۷]. در هر سه نوع حذف گزارش شده، قطعه‌ای از ناحیه تومری ژن GJB6 حذف می‌شود که در این مطالعه برای تکثیر این قطعه آغازگر (Primer) طراحی شد و با استفاده از روش Real Time-PCR مقدار کمی آن بررسی شد.



شکل ۱ در این شکل حذف های بزرگ در لوکوس 3q11 نشان داده شده است. همچنین محل آغازگرهای طراحی شده در روش Real Time با فلش مشخص شده است. F: آغازگر جلویی (Forward); R: آغازگر برگشتی (Reverse)

اودیوگرام (Audiogram) بیمار، ضمیمه شد. ۹۴ بیمار از ۶۳ خانواده در این تحقیق شرکت کردند. اکثر این افراد برای تشخیص جهش ژنی به منظور تصمیم در ازدواج دو فرد مبتلا یا ازدواج فامیلی مراجعه کرده بودند. خانواده‌ها از مناطق مختلف کشور بودند. در هیچ مورد والدین مشکل شنوایی واضح نداشتند.

پس از گرفتن رضایت‌نامه آگاهانه از خانواده‌ها، ۱۰ سی‌سی خون از افراد بیمار گرفته شد و به منظور جلوگیری از لخته شدن، در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) نگهداری شد. بیماران با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع (Salting Out)، استخراج شد [۱۸]. برای تشخیص جهش شایع 35delG (Amplification Refractory Mutation system-PCR: ARMS-PCR) استفاده شد. توالی آغازگرهای ARMS-PCR در صورت زیر است:

35delGN: 5'-GCAGACGATCCTGGGGGGTG-3'  
 35delGM: 5'-GCAGACGATCCTGGGGGGTG-3'  
 مشترک: 5'-GACACAAAGCAGTCCACAGTGTTG-3'

هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های ژن GJB2 و سه حذف بزرگ ژن GJB6 در ناشنوایان مراجعه کننده به مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و تعیین فراوانی جهش در دو ژن GJB2 و GJB6 در آن‌ها بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

معیارهای انتخاب بیماران در این مطالعه عبارت بود از: (۱) نشانه‌های ناشنوایی غیرنشانه‌گانی با توارث اتوزوم مغلوب در مبتلایان؛ (۲) مجزا کردن موارد ناشنوایی با علل محیطی از طریق بررسی پرونده پزشکی بیماران و پرسش دقیق در مورد عوامل ممکن از قبیل ناشنوایی‌های ناشی از عفونت گوش داخلی، مننژیت و صدمات فیزیکی؛ (۳) تأیید ناشنوایی با استفاده از آزمایش‌های شنوایی‌سنجی (Audiology). همچنین یکی از معیارهای انتخاب و جداسازی موارد ارثی از تک‌گیر، وجود حداقل دو بیمار در خانواده در موارد ارثی بود. ابتدا با استفاده از پرسش‌نامه‌هایی که برای این کار تهیه شده بود، اطلاعات مورد نیاز جمع‌آوری شد. سپس شجره خانوادگی ترسیم و الگوی وراثتی بیماری مشخص و مدارک شنوایی‌سنجی و

طراحی و در پایگاه اینترنتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Blast) چک شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای ژن GJB2 و GJB6 برای تعیین توالی

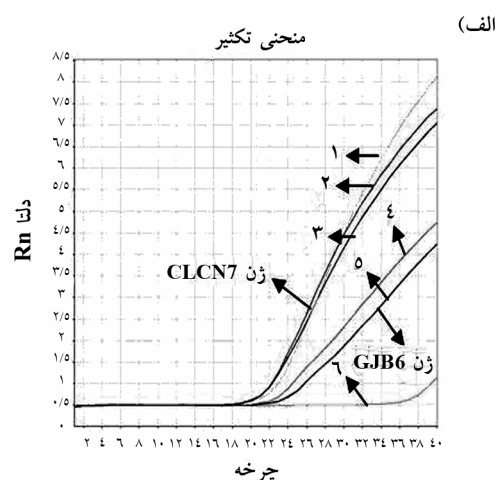
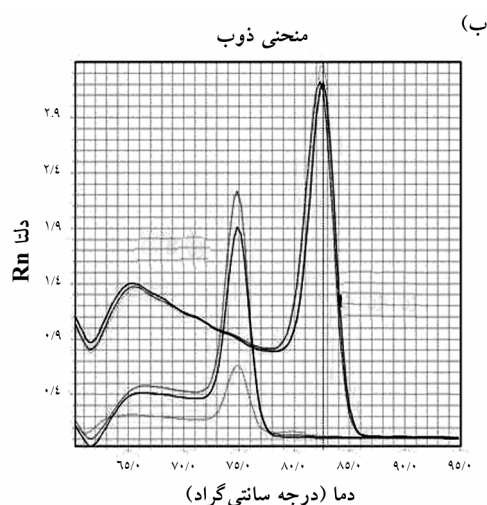
توالی آغازگر	نام آغازگر
5'AAGTCTCCCTGTCTGTCTAG 3'	Cx26F
5'CCTCATCCCTCTCATGCTGC 3'	Cx26R
5'GTCTGTAATATACACCGTGCAC 3'	Cx30F
5'CTCTTCAGGCTACAGAAGGAAC 3'	Cx30R

برای غربالگری حذف‌های بزرگ ژن GJB6، از روش Real-Time PCR استفاده شد، در این مطالعه شش بیمار هتروزیگوت برای جهش ژن GJB2 شرکت کردند. در این روش ژن CLCN7 به‌عنوان ژن کنترل انتخاب شد و توالی آغازگرهای آن عبارت بود از:

F: 5'-CTCTTAGGCCAGGCGTTTGTG-3'

R: 5'-ACCGTGCTCAGCGCTATGC-3'

در این روش برای هر فرد، دو واکنش (یکی برای آلل سالم و دومی برای آلل جهش‌یافته) انجام شد. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد و متافور (MetaPhor) ۳ درصد الکتروفورز شد. افراد هموزیگوت برای جهش 35delG مشخص و آزمایش‌های بیشتری روی آن‌ها انجام گرفت و در بقیه موارد برای مشخص شدن جهش‌های ژن GJB2 از روش تعیین توالی (Direct Sequencing) با دستگاه (Applied Biosystems, USA) Genetic Analyzer 3130 استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از روش تعیین توالی از نرم‌افزار Chromas نسخه ۲/۳۳ استفاده شد. برای تخلیص محصولات PCR و حذف آغازگرهای اضافه و dNTP و ... از کیت KBC pure ساخت شرکت زیست فناوری کوثر (تهران، ایران) استفاده شد. توالی آغازگرهای GJB6 و GJB2 برای تعیین توالی در جدول ۱ آمده است. آغازگرهای تعیین توالی توسط نرم‌افزار Gene Runner



نمودار ۱ (الف) منحنی تکثیر ژن کنترل (CLCN7) و ژن هدف (GJB6) در دو نمونه طبیعی و مورد بررسی با روش Real Time PCR. منحنی تکثیر ژن CLCN7 در فرد طبیعی و دو فرد بیمار هتروزیگوت (به‌ترتیب با شماره‌های ۱ و ۲ و ۳ مشخص شده‌اند) که همگی دارای چرخه‌های آستانه‌ای (C<sub>t</sub>) برابر هستند. همچنین منحنی تکثیر ژن GJB6 در فرد طبیعی و دو فرد بیمار هتروزیگوت و هموزیگوت (به‌ترتیب با شماره‌های ۴ و ۵ و ۶) که دارای C<sub>t</sub> متفاوت هستند، در نمودار نشان داده شده است. (ب) منحنی ذوب محصول تکثیر ژن GJB6 و CLCN7: نمودار نشان می‌دهد که محصول غیراختصاصی در واکنش وجود نداشته است.

فاقد DNA الگو، کنترل هموزیگوت، کنترل هتروزیگوت،

از هر کدام از نمونه‌ها شامل، ژن کنترل و نمونه کنترل

بشود از: V37I, W24X, R127H, delE120. انواع ژنوتیپ‌های یافت شده در این بیماران در جدول ۲ آمده است. در جمعیت مورد مطالعه، در ۶ خانواده از ۱۳ خانواده دارای جهش در ژن کانکسین ۲۶ (۴۶/۱۵ درصد)، افراد بیمار برای جهش 35delG هموزیگوت بودند و در دو خانواده، جهش 35delG به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. فراوانی آلل‌های جهش یافته ژن کانکسین ۲۶، برابر با ۱۵/۸ بود (جدول ۳).

جدول ۲ ژنوتیپ‌های مشاهده شده در خانواده‌های مورد بررسی

ژنوتیپ	تعداد خانواده
35delG/ 35delG	۶
35delG/Wt	۲
delE120/delE120	۱
Wt R127H/	۲
Wt W24X/	۱
V37I/ Wt	۱
Total	۱۳

جدول ۳ فراوانی آللی جهش‌های ژن GJB2

نوع جهش	تعداد آلل	فراوانی بر حسب درصد
35delG	۱۴	۷۰
delE120	۲	۱۰
V37I	۱	۵
W24X	۱	۵
R127H	۲	۱۰
Total	۲۰	۱۰۰

در این مطالعه، به منظور غربالگری جهش‌های ژن GJB6 از روش تعیین توالی و برای مشاهده حذف‌های احتمالی از روش Real-Time PCR استفاده شد. ژن GJB6 فقط برای افرادی که یکی از جهش‌های آن‌ها، جهش در ژن کانکسین ۲۶ بود بررسی شد. در این روش، مقدار کمی ژن GJB6 توسط تکثیر ناحیه تلومری این ژن که در تمام حذف‌های گزارش شده حذف می‌شود، اندازه‌گیری شد. در این روش به دلیل این‌که رنگ SYBR Green به هر نوع DNA دو رشته‌ای مثل

کنترل طبیعی و نمونه مورد آزمایش، سه واکنش جداگانه انجام گرفت. منحنی تکثیر و ذوب رسم شده توسط دستگاه در نمودار ۱ نشان داده شده است. ۲۰ میکرولیتر از محلول واکنش (Fast SYBR Green Kit, Fast SYBR Green Master (Applied Biosystems, US), ۵ میکرولیتر DNA، آغازگرهای رو به جلو و معکوس به غلظت ۰/۲ میکرومولار برای واکنش استفاده شد. حجم نهایی واکنش نیز ۲۰ میکرولیتر بود.

در این روش قطعه ۲۰۰ جفت نوکلئوتیدی در انتهای تلومری ژن GJB6 که در هر سه نوع حذف مشترک است، بررسی و وجود و یا عدم وجود آن بررسی شد.

توالی آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر این قطعه عبارت بود از:

5'-AAGACGCTGGTCAGTTCACCTG-3' جلویی

5'-GATGCATGAAGAGGGCGTACAAG-3' برگشتی

نمونه‌های DNA به غلظت ۲۵ میکروگرم در میکرولیتر رقیق شد و کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتری نانودراپ 2000 (Nanodrop, Thermo, USA) بررسی شد. طیف جذبی ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ بود. تمام آغازگرهای Real-Time براساس نرم‌افزار Express v.2 طراحی شد. برنامه واکنش Real-Time به صورت زیر بود:

چرخه‌های تکثیر سه مرحله‌ای شامل (۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه، ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه) بود. در مرحله نهایی، منحنی ذوب توسط نرم‌افزار دستگاه رسم شد.

### ۳- نتایج

در این تحقیق، ناشنوایی در ۴۵ درصد موارد به علت ازدواج فامیلی بود. به طور کلی ناشنوایی وابسته به ژن کانکسین ۲۶ در ۱۳ خانواده از ۶۳ خانواده یافت شد (۲۰/۶ درصد). در این جمعیت شایع‌ترین جهش ژن کانکسین ۲۶، 35delG گزارش شد؛ این جهش در ۸ خانواده از ۱۳ خانواده (۶۱/۵ درصد) با جهش GJB2 مشاهده شد. جهش‌های دیگر ژن کانکسین ۲۶ که توسط روش توالی‌یابی به دست آمد عبارت

آغازگر دایمر متصل می‌شود، با رسم منحنی ذوب توسط دستگاه وجود محصولات غیراختصاصی ثابت می‌شود. برای تفسیر نتایج به‌دست آمده از Real-Time PCR، از روش  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد که یک روش نسبی برای اندازه‌گیری تعداد کپی یک ژن است. براساس این روش، اگر مقدار CT میانگین یک نمونه کوچک‌تر از ۰/۶ باشد نشان‌دهنده این است که فرد برای این نوع حذف‌ها هتروزیگوت است. در نمونه کنترل هموزیگوت، ژن GJB6 تکثیر نمی‌شود. در این مطالعه، روش تعیین توالی و Real-Time PCR هیچ‌گونه حذف یا جهش نقطه‌ای را در ژن GJB6 نشان نداد.

#### ۴- بحث

عوامل متعددی در ایجاد ناشنوایی‌ها دخالت دارند. بر پایه مطالعات متعدد در جمعیت‌های اروپایی و آمریکایی جهش در ژنی به‌نام GJB2 که پروتئین کانکسین ۲۶ را کد می‌کند عامل اصلی بروز ناشنوایی‌های اتوزوم مغلوب غیرنشانگانی در جمعیت سفید پوست اروپایی است. جهش‌های این ژن در جمعیت‌های مختلف شیوع متفاوتی دارد. جهش 35delG در بیشتر جمعیت‌های جهان با فراوانی‌های مختلف دیده می‌شود. این جهش در جمعیت‌های اروپایی و آمریکایی به‌عنوان شایع‌ترین جهش شناسایی شده است [۱۹-۲۱]. در این مطالعه ۷ خانواده از ۶۳ خانواده مورد بررسی دارای جهش ژن GJB2 در دو آلل خود بودند (۱۱/۱ درصد). همچنین از ۱۳ خانواده‌ای که دارای جهش ژن کانکسین ۲۶ بودند، در ۶ خانواده فقط یکی از آلل‌های این ژن، دچار جهش شده بود (۴۶ درصد). فراوانی جهش 35delG در بین سایر جهش‌ها برابر ۷۰ درصد بود.

جهش delE120 که در مطالعه دکتر نجم‌آبادی و همکاران در غرب و شمال غرب کشور گزارش شده بود [۲۲]، در خانواده‌ای در غرب کشور (استان لرستان) مشاهده شد و فراوانی آن ۱۰ درصد بود. جهش R127H در دو خانواده (۱۰ درصد) و جهش W24X (۵ درصد) و V37I (۵ درصد) هر کدام در یک خانواده مشاهده شد و در دو خانواده

چندشکلی (Polymorphism) V153I گزارش شد. جهش V37I جزء جهش‌های نادر بوده که تاکنون در ایران گزارش نشده بود.

در خانواده‌های هتروزیگوت (۴۶/۱ درصد) که تنها یک جهش ژن GJB2 داشتند، در ادامه جهش‌های نقطه‌ای و حذفی کانکسین ۳۰ نیز بررسی شد و هیچ جهش نقطه‌ای یا حذفی پیدا نشد. این نتیجه یا به دلیل این است که در این خانواده‌ها یک جهش حذفی غیر از جهش‌های گزارش شده در ژن کانکسین ۳۰، وجود دارد یا این‌که جهش در منطقه تنظیمی از ژن GJB2 است که مورد بررسی قرار نگرفته است یا جهش در ژن‌های دیگر عامل ناشنوایی است. به‌طور کلی شیوع جهش‌های ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت ایران بسیار کمتر از جمعیت‌های غربی گزارش شده است و از آن‌جا که جمعیت ایران از قومیت‌های مختلف تشکیل شده و شیوع این جهش‌ها در قومیت‌های مختلف، با یکدیگر متفاوت است، اقوام مختلف به‌صورت جدا بررسی شدند [۲۳-۳۱].

در مطالعه‌ای که توسط دکتر نجم‌آبادی و همکاران انجام شد [۲۲]، فراوانی جهش ژن GJB2 در ۸ ناحیه از کشور بررسی شد و فراوانی جهش این ژن در جمعیت‌های شمال (گیلان و مازندران و گلستان) و شمال غرب کشور بیشتر از سایر نقاط کشور بود، میزان این فراوانی در شمال ۳۸ درصد و در شمال غرب ۲۲ درصد بود. در یک مطالعه که در ترکیه انجام گرفت، فراوانی جهش GJB2 حدود ۲۵ درصد بود [۳۲] که میزان این فراوانی تقریباً مشابه جمعیت شمال غرب ایران است. همچنین مشخص شده که فراوانی این جهش در جنوب شرق ایران ۹ درصد است و در جمعیت‌های پاکستانی همسایه ایران نیز این فراوانی برابر ۶/۱ درصد است [۳۳]. در این مطالعه میانگین جهش ژن GJB2 در ایران ۱۶/۷ درصد گزارش شد. همچنین فراوانی جهش 35delG نیز در جمعیت‌های شمالی کشور بیشتر از سایر نقاط دیده شد (۳۴ درصد).

براساس مطالعات گذشته در جمعیت ایران که توسط محققین دیگر گزارش شده‌اند، شیوع جهش‌های ژن GJB2 در

این واقعیت است که ژن‌های دیگری در بروز ناشنوایی غیرنشانگانی در کشور نقش دارد. می‌توان از مطالعه این خانواده‌ها که فاقد جهش‌های GJB2 بودند، برای شناسایی ژن‌های دیگر مسئول در ناشنوایی استفاده کرد. با توجه به این‌که جهش در ژن GJB2 حدوداً ۲۰ درصد موارد را شامل می‌شود، مطالعه برای پیدا کردن ژن‌های درگیر دیگر می‌بایست ادامه یابد تا مشاورین ژنتیک بهتر بتوانند خانواده‌ها را راهنمایی کنند.

لازم به ذکر است که در میان افرادی که برای ژن GJB2 هموزیگوت بودند، تفاوت در شدت بیماری دیده شد. همچنین بین افراد هتروزیگوت (با یک جهش در ژن فوق و ژن دیگر روی جایگاه نامشخص در این مطالعه) و نیز بین افراد هتروزیگوت مرکب تفاوت فنوتیپی دیده شد که دور از انتظار نبود.

با توجه به نتایج به دست آمده نمونه‌های فاقد جهش در دو ژن مزبور یا هتروزیگوت برای یک جهش می‌بایست دقیق‌تر بررسی شود تا ژن‌های دیگر عامل ناشنوایی ارثی غیرنشانگانی در کشور مشخص شود. چنین مطالعه‌ای به صورت مقدماتی در مرکز در جریان است.

## ۵- تشکر و قدردانی

در پایان از خانواده‌های محترم بیماران شرکت کننده در این طرح و عزیزانی که در مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی زحمت کشیدند از جمله خانم‌ها پانتی فولادی، صدیقه امینی، فائزه رحیمی‌نژاد، تشکر می‌کنیم.

قومیت‌های مختلف کشور متفاوت است [۲۳-۳۱]؛ به‌عنوان مثال، طبق مطالعه‌ای که در استان کرمانشاه انجام گرفته [۲۳]، جهش‌های GJB2 عامل ۲۲ درصد از ناشنوایی‌های اتوزوم مغلوب غیرنشانگانی، گزارش شده و جهش 35delG به‌عنوان شایع‌ترین جهش ژن کانکسین ۲۶ معرفی شد (۶۲/۵ درصد). اما در مطالعه‌ای که در جمعیت سیستان و بلوچستان انجام شد [۲۴]، جهش‌های GJB2 عامل ۱۳/۳ درصد از ناشنوایی‌های اتوزوم مغلوب غیرنشانگانی بود و شایع‌ترین جهش ژن کانکسین ۲۶، W24X گزارش شد (۸۰ درصد) و دومین جهش شایع در این جمعیت، R127H با فراوانی ۲/۲ درصد بود. جهش ژن کانکسین ۲۶ در جمعیت‌های ترک کشور با فراوانی بیشتری (۲۸ درصد) مشاهده شده است [۲۵].

همچنین در دو مطالعه‌ای که در جمعیت‌های ترک و کرد در کشور صورت گرفته، جهش  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) بررسی شد و در هیچ‌یک از افراد هتروزیگوت برای جهش GJB2، جهش  $\Delta$ (GJB6-D13S1830) مشاهده نشد [۲۳]، [۲۵]. این یافته با یافته بررسی حاضر شباهت دارد. در این مطالعه یک روش جدید برای تشخیص حذف‌هایی که انتهای تلمریک ژن GJB6 را شامل می‌شود، ارائه شده است (Real-Time PCR). در این روش ۶ بیمار هتروزیگوت GJB2 بررسی شد و هیچ‌یک از این بیماران، حذف‌های گزارش شده در ژن GJB6 را نداشتند؛ بنابراین احتمال این‌که در کشور ما ژن GJB2 با ژن دیگری غیر از GJB6 به‌صورت هتروزیگوت مرکب بیماری ایجاد کند، وجود دارد. فراوانی پایین جهش ژن GJB2 در مطالعه حاضر، احتمالاً

## ۶- منابع

[1] Hilgert N, Alasti F, Dieltjens N, Pawlik B, Wollnik B, Uyguner O, Delmaghani S, Weil D, Petit C, Danis E, Yang T, Pandelia E, Petersen MB, Goossens D, Favero JD, Sanati MH, Smith RJ, Van Camp G. Mutation analysis of

TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. Clin Genet 2008; 74(3): 223-32.

[2] Smith RJH, Bale JF, White KR. Sensorineural

- hearing loss in children. *J Lancet* 2005; 365(9462): 879-90.
- [3] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2009; 681(2-3): 189-96.
- [4] Feldmann D, Le Maréchal C, Jonard L, Thierry P, Czajka C, Couderc R, Ferec C, Denoyelle F, Marlin S, Fellmann F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet* 2009; 52(4): 195-200.
- [5] Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 1997; 199(1-2): 165-71.
- [6] Harris AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 2001; 34(3): 325-472.
- [7] Van Camp G, Smith JR: Hereditary hearing loss home-page. <http://www.uia.ac.be/dnalab/hhh>, 2003.
- [8] Medica I, Rudolf G, Balaban M, Peterlin B. C.35delG/ GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations in Croatians with prelingual non-syndromic hearing impairment. *BMC Ear Nose Throat Disord* 2005; 5: 11.
- [9] Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1500-5.
- [10] Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37(1): 41-3.
- [11] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003; 112(4): 329-33.
- [12] Liu Y, Ke X, Qi Y, Li W, Zhu P. Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. *J Hum Genet* 2002; 47(12): 688-90.
- [13] Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110(9): 1535-8.
- [14] Brobby GW, Müller-Myhsok B, Horstmann RD. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N Engl J Med* 1998; 338(8): 548-50.
- [15] Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, Chamberlin GP, Houseman M, Taylor GR, Van de Heyning CM, Franssen E, Rowland J, Cucci RA, Smith RJ, Van Camp G. A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 2001; 38(8): 515-8.
- [16] Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat* 2001; 18(5): 460.
- [17] Feldmann D, Le Maréchal C, Jonard L, Thierry



- P, Czajka C, Couderc R, Ferec C, Denoyelle F, Marlin S, Fellmann F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss. *Eur J Med Genet* 2009; 52(4): 195-200.
- [18] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- [19] 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(23): 2211-6.
- [20] Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Milà M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 1997; 6(9): 1605-9.
- [21] Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Milà M, Zelante L, Gasparini P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351(9100): 394-8.
- [22] Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, Farhadi M, Mohseni M, Mahdih N, Ebrahimi A, Bazazzadegan N, Naghavi A, Avenarius M, Arzhanghi S, Smith RJ. GJB2 mutations: passage through Iran. *Am J Med Genet A* 2005; 133A(2): 132-7.
- [23] Mahdih N, Nishimura C, Ali-Madadi K, Riazalhosseini Y, Yazdan H, Arzhanghi S, Jalalvand K, Ebrahimi A, Kazemi S, Smith RJ, Najmabadi H. The frequency of GJB2 mutations and the Delta (GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. *Clin Genet* 2004; 65(6): 506-8.
- [24] Naghavi A, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Bazazzadegan N, Mohseni M, Smith RJ, Najmabadi H. GJB2 mutations in Baluchi population. *J Genet* 2008; 87(2): 195-7.
- [25] Bonyadi M, Esmaeili M, Abhari M, Lotfi A. Mutation analysis of familial GJB2-related deafness in Iranian Azeri Turkish patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009; 13(5): 689-92.
- [26] Sadeghi A, Sanati MH, Alasti F, Hashemzadeh Chaleshtori M, Mahmoudian S, Atefi M. Contribution of GJB2 mutations and Four common DFNB loci in autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Markazi and Qom provinces of Iran. *Iranian J Biotechnol* 2009; 7(2): 108-11. (Persian)
- [27] Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Patton MA. Familial and Sporadic GJB2-Related Deafness in Iran: Review of Gene Mutations. *Iranian J Publ Health* 2007; 36(1): 1-14. (Persian)
- [28] Hosseinipour A, Hashemzadeh Chaleshtori M, Sasanfar R, Farhud DD, Tolooi A, Doulati M, Hoghooghi Rad L, Montazer zohour M, Ghadami M. Report of a New Mutation and Frequency of Connexin 26 gene (GJB2) Mutations in Patients from Three Provinces of Iran. *Iranian J Publ Health* 2005; 34(1): 47-50. (Persian)

- [29] Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, Arzhangi S, Daneshmandan N, Javan K, Smith RJ. GJB2 Mutations in Iranians with Autosomal Recessive Non-syndromic Sensorineural Hearing Loss. *J Hum Mutat* 2002; 19(5): 572. (Persian)
- [30] Hashemzadeh Chaleshtori M, Farhud DD, Taylor R, Hadavi V, Patton MA, Afzal AR. Deafness-Associated Connexin 26 gene (GJB2) Mutations in Iranian Population. *Iranian J Publ Health* 2002; 31(3-4): 75-9. (Persian)
- [31] Hashemzadeh Chaleshtori M, Hoghooghi Rad L, Dolati M, Sasanfar R, Hoseinipour A, Montazer Zohour M, Pourjafari H, Tolooi A, Ghadami M, Farhud DD, Patton MA. Frequencies of mutations in the Connexin 26 Gene (GJB2) in two Populations of Iran (Tehran and Tabriz). *Iranian J Publ Health* 2005; 34(1): 1-7. (Persian)
- [32] Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, Yuksel-Apak M, Wollnik B. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003; 64(1): 65-9.
- [33] Santos RL, Wajid M, Pham TL, Hussan J, Ali G, Ahmad W, Leal SM. Low prevalence of Connexin 26 (GJB2) variants in Pakistani families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet* 2005; 67(1): 61-8.