

## غربالگری جهش های ژن DFNB59 در افراد مبتلا به ناشنوایی غیر سندرومی در استان چهارمحال و بختیاری

مریم طاهرزاده قهفرخی\*، عفت فرخی\*، دکتر سید ابوالفتح شیرمردی\*\*، جواد صفاری چالشتی\*، سمیه اسدی\*، کیهان قطره سامانی\*\*\*، مرضیه ابوالحسینی†، فاطمه آزادگان†، سمیه رئیسی††، مرضیه رئیسی†، گل اندام بنی طالبی†، غلامرضا مبینی†††، ندا پروین\*، مهدی بنی طالبی\*\*، دکتر رضا حاجی حسینی\*\*\*، دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتی†

\*کارشناس ارشد بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*پزشک عمومی- سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری، \*\*دکتری بیوشیمی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †کارشناس پژوهشی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††دانشجوی کارشناسی ارشد- گروه زیست شناسی- دانشگاه اصفهان، †††کارشناس ارشد ویروس شناسی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*مربی پرستاری- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*کارشناسی ارشد همانولوژی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*\*دانشیار گروه بیوشیمی- دانشگاه پیام نور تهران، †استاد ژنتیک انسانی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد..

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۵ تاریخ تایید: ۸۸/۱۰/۱

### چکیده:

زمینه و هدف: وقوع ناشنوایی پیش زبانی حدود ۱ در ۱۰۰۰ تولد است که بیش از ۶۰٪ موارد آن ارثی هستند. ناشنوایی اختلالی هتروژن محسوب می شود و ممکن است به علل محیطی، ژنتیکی یا هر دو رخ دهد. اخیراً جهش های ژن DFNB59 که رمز کننده پروتئین پژواکین است به عنوان عامل ناشنوایی نوع عصبی معرفی شده اند. این مطالعه با هدف بررسی نوع و فراوانی جهش های ژن DFNB59 در ۱۰۰ ناشنوای غیرسندرومی، در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- آزمایشگاهی، فراوانی جهش های ژن DFNB59 در کل اگزون های کد کننده این ژن بررسی گردید. DNA از نمونه های خون محیطی به روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شد. وجود جهش های DFNB59 با روش غربالگری PCR- SSCP /Heteroduplex Analysis (HA) بررسی گردید. سپس جهش های مشاهده شده در اگزون های ۲ و ۴ با استفاده از روش PCR- RFLP اگزون شماره ۶ با استفاده از تکنیک Nested PCR و اگزون شماره ۷ به کمک تعیین توالی تایید گردید. یافته ها: در این تحقیق ۳ نوع پلی مورفیسم ژنی ( 793C>G, 793C>T و 874G>A) و یک نوع جهش 988delG به ترتیب با فراوانی ۷، ۵، ۲ و ۱ شناسایی شد. نتیجه گیری: مطالعه حاضر و تحقیقات قبلی حاکی از نقش اندک جهش های ژن پژواکین در ایجاد ناشنوایی در استان چهارمحال و بختیاری است و نتیجه اینکه از نظر بالینی جهش های ژن DFNB59 اهمیت چندانی در این منطقه ندارند.

واژه های کلیدی: ناشنوایی، DFNB59، پژواکین، PCR- SSCP/ Heteroduplex Analysis

### مقدمه:

ناشنوایی شایع ترین نقص حسی عصبی در انسان است. حدود ۴۵۰ میلیون نفر ناتوان جسمی در دنیا وجود دارد که ۷۰ میلیون نفر آنها از ناشنوایی رنج می برند (۱). شیوع ناشنوایی در فرزندان حاصل از ازدواج

فامیلی ۱۲/۹ درصد گزارش شده است (۲، ۳). علل محیطی و ژنتیکی هر کدام سهم ۵۰ درصد در ناشنوایی داشته و اکثر موارد ژنتیکی، غیرسندرومی می باشند. حدود ۸۵-۷۵ درصد ناشنوایی غیرسندرومی

نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی- تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۶۶۶۹۲، E-mail: mchalesh@yahoo.com

به صورت اتوزوم مغلوب (DFNB) و ۲۵ درصد دیگر به شکل اتوزوم غالب (DFNA) و ۱ درصد وابسته به X (DFN) به ارث می رسد (۴-۶).

تاکنون تحقیقات گسترده ای در ارتباط با میزان شیوع ناشنوایی و سهم علل مختلف در کشور صورت نگرفته است. با توجه به شیوع بالای ناشنوایی در ایران پیدا کردن اساس ژنتیکی ناشنوایی و کشف ژن ها و جهش های درگیر در جهت ممانعت از پیشرفت شیوع این بیماری در تشخیص و درمان به موقع آن کمک مهمی به خانوارهای مبتلا در جامعه ایران می نماید (۷). به همین جهت اهمیت کار تحقیقاتی بر روی این بیماری کاملاً مشهود است.

تاکنون بیش از ۱۰۰ ژن که در ایجاد ناشنوایی نقش داشته اند شناسایی گردیده اند که جهش در ژن کانکسین ۲۶ بیشترین نقش را در ایجاد ناشنوایی اتوزومال مغلوب غیرسندرومی دارد (۸). یکی دیگر از ژن های دخیل در ناشنوایی اتوزومال مغلوب غیر سندرومی که در سال های اخیر شناسایی شده، ژن DFNB59 (MIM:610219) می باشد. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲ مستقر و شامل ۷ اگزون بوده که اگزون اول آن غیر رمزگزار است و ۹/۸ kb از توالی ژنومی را به خود اختصاص می دهد. محصول پلی پپتیدی ژن DFNB59، پروتئین پژواکین نام دارد که حاوی ۳۵۲ اسید آمینه می باشد. بررسی ها نشان می دهد که این پروتئین در جسم سلولی نرون های مسیر شنوایی، سلول های مویی و سلول های پشتیبان گوش داخلی یافت شده است (۹). جهش های این ژن که برای اولین بار توسط Delmaghani و همکاران در انستیتو پاستور فرانسه شناسایی شده اند، بعنوان عامل ناشنوایی نوع عصبی در ۴ خانواده ایرانی با ناشنوایی اتوزوم مغلوب معرفی شدند. بطوری که علت ناشنوایی در یک خانواده جهش T54I و در سه خانواده دیگر R183W گزارش شد. آنها اظهار داشتند که بر خلاف دیگر ژن های دخیل در ناشنوایی حسی عصبی که

همگی ناشی از نقص در سلول های حلزونی گوش است، DFNB59 اولین جایگاه ژنی ناشنوایی غیر سندرومی می باشد که بواسطه یک نقص عصبی ایجاد می شود (۹). البته در تحقیقات بعدی گزارش های مختلفی ارائه گردیده است و به عنوان نتیجه کلی بر متنوع بودن مکانیزم های بیماریزایی مربوط به جهش های ژن پژواکین تاکید نموده است (۱۰-۱۳). در هر حال مطالعات اندکی در ارتباط با شیوع و نقش جهش های ژن پژواکین در ایجاد ناشنوایی در کشورهای مختلف و از جمله ایران انجام شده است. بررسی های بیشتر می تواند میزان شیوع این جهش ها و ارتباط این ژن را با انواع ناشنوایی روشن تر کند و بالطبع افق های جدیدی در جهت پیشگیری و اعمال مداخلات درمانی بر روی دست اندرکاران بهداشت و درمان بگشاید. این مطالعه با هدف تعیین میزان جهش های ژن پژواکین در ۱۰۰ ناشنوای غیرسندرومی مراجعه کننده به بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

### روش بررسی:

این مطالعه بصورت توصیفی-آزمایشگاهی بر روی یکصد نفر از مراجعه کنندگان به بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری شامل ۵۶ مرد و ۴۴ زن با میانگین سنی  $25/72 \pm 13/61$  سال در تابستان سال ۱۳۸۶ انجام گرفت. ناشنوایان مراجعه کننده با داشتن ناشنوایی ژنتیکی غیر سندرومیک با روش نمونه گیری آسان وارد مطالعه شده و کلیه افراد ناشنوا با علل سندرومیک، غیر ژنتیکی و ناشناخته، با توجه به اودیوگرام و ویزیت پزشکی، از مطالعه حذف شدند. پس از اخذ رضایت نامه کتبی از بیماران یا والدین بیماران زیر سن قانونی، اطلاعات دموگرافیک و بالینی آنها از طریق پرسشنامه جمع آوری و از هر بیمار به میزان ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمایشات مولکولی گرفته شد. استخراج DNA نمونه های خون با روش استاندارد فنل کلروفرم انجام (۱۴) و سپس کیفیت DNA استخراجی با استفاده

**جدول شماره ۱: توالی آغازگرها، دمای اتصال و طول محصولات PCR اگزون های ژن پژواکین مورد بررسی**

توالی آغازگرها	طول قطعه (bp)	دمای اتصال °C	شماره اگزون
Forward2:5'ATGGATTTATCTGGGGGTTGC3'	۲۹۶	۵۲	۲
Reverse2:5'ACAGATGAATGAGTTGGCACTCC3'			
Forward 3:5'ACT GAGTTTCTTCTTATAAAGG3'	۲۳۶	۵۵	۳
Reverse 3:5'TTAGGA TTATTATACTGACCG3'			
Forward 4: 5' TACTATTAGGTGAACTATGAATG 3'	۲۸۲	۵۶	۴
Reverse 4:5'AGTTAGTAAGAGAACCCCAAC3'			
Forward 5: AGCTATCCTTACATGTTATGATCC3'	۱۹۲	۵۸	۵
Reverse 5: 5'CATGCAGACCCTTAACTCAC3'			
R6 Forward:5'TTCATCACCCCATCAAACAA3'	۲۳۱	۵۳	۶
R6 Reverse:5'TCATGTGTTAAGCCAGGA3'			
R7A Forward:5'CACATTTCTTTTCTGTTTTT3'	۲۱۵	۵۳	۷A
R7A Reverse:5'GAAGTTCCCATTCACAGA3'			
R7B Forward: 5'GAAGGGACCCATATCCGAGT3'	۲۳۸	۵۸	۷B
R7B Reverse:5'GTGGCACAACCTG AACTAAA3'			

رمز دست‌رسی (NM-001042702) و نرم افزار Primer 3، انجام شد (جدول شماره ۱). هر واکنش PCR برای هر اگزون شامل: ۰/۲µl از آغازگر Forward و ۰/۲µl از آغازگر Reverse TaqDNA Polymerase (50PM)، ۰/۱۵µl از (5U/µl)، ۰/۵µl از (10mM) Mix dNTP، ۲/۵µl از (10X) Taq DNA buffer (۵۰mM) MgCl<sub>2</sub> ۲/۵µl و ۱µl از (100 ng) DNA که با ddH<sub>2</sub>O به حجم ۲۵µl رسانده شد. سپس توالی های اگزونی در دستگاه PCR (ASTEPC 818-Japan) تحت شرایط دمایی ۳۰ الی ۳۵ سیکل شامل دمای واسرشت شدن ۹۶°C، دمای ساخت ۷۲°C و دمای اتصال ۵۸°C-۵۲°C که در جدول شماره ۱ به تفکیک اگزون ها آمده است، تکثیر گردیدند. سپس محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (Merck Germany) تحت جریان ۵۰ میلی آمپر به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شده و توسط رنگ آمیزی نترات نقره رؤیت شدند. پس از آن از روش غربالگری PCR-SSCP (۱۵) و HA

(Heteroduplen Analysis) (۱۶) به طور همزمان به منظور تشخیص جهش های احتمالی استفاده شد. در روش غربالگری PCR-SSCP برای هر نمونه به میزان ۸ µl محصول PCR با ۶ µl SSCP Dye در یک میکروتیوب مخلوط گردید. سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد قرار داده شدند تا دو رشته DNA کاملاً از هم باز شوند. پس از مدت زمان لازم بلافاصله میکروتیوب ها بر روی یخ قرار گرفتند. به منظور انجام هترو دوپلکس، ابتدا ۲ میکرولیتر محصول PCR با ۳ میکرولیتر EDTA نیم مولار داخل میکروتیوب ها ریخته، سپس در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی مشخص قرار گرفتند (۱) سیکل ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۶۰ سیکل ۳۰ ثانیه ای که از ۹۶ درجه سانتی گراد شروع شده و در هر سیکل ۱ درجه از دما کم می شود تا نهایتاً در شصتیمین سیکل به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برسد). قبل از بارگیری نمونه های آماده شده برای SSCP محتویات میکروتیوب های هم شماره PCR-SSCP و

## جدول شماره ۲: شرایط PCR-SSCP/HA اگزون های پژواکین

اگزون	ولتاژ	دما (°C)	زمان (ساعت)	غلظت ژل
۲	۲۸۰	۴	۵	٪۶
۳	۲۰۰	۱۰	۵	٪۶
۴	۲۰۰	۱۰	۷	٪۱۰
۵	۲۰۰	۲۰	۵	٪۶
۶	۱۰۰	۴	۶	٪۸
۷A	۲۰۰	۴	۶	٪۱۰
۷B	۲۸۰	۲۰	۵	٪۸

## جدول شماره ۳: مشخصات تغییرات نوکلئیدی یافت شده در ژن DFNB59 در ۱۰۰ بیمار ناشنوا در استان چهارمحال و بختیاری

نوع جهش	تعداد خانواده	تعداد کروموزوم	تغییرات نوکلئیدی	تغییرات اسید آمینه
Missense	۵	۶	c.793C>T	P.R265C
Missense	۷	۷	c.793C>G	P.R265G
Missense	۲	۲	c.874G>A	P.G292R
Framshift	۱	۲	c.988delG	P.V330LfsX7

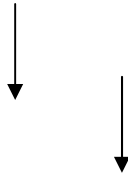
نوع جهش تغییر قالب 988delG به ترتیب با فراوانی ۷،۵،۲ و ۱ در اگزون شماره ۷ آشکار شد (تصویر شماره ۱) (جدول شماره ۳) که نتایج تعیین توالی مستقیم نیز بر آن صحت گذاشت (تصاویر شماره ۴-۲). در مورد بقیه اگزون ها هیچگونه شیفت و اختلاف الگو بر روی ژل های پلی اکریل آمید مشاهده نشد. PCR-RFLP اگزون های شماره ۲ و ۴ (تصویر شماره ۵) و Nested PCR اگزون شماره ۶ نتایج PCR-SSCP/HA را تایید کرد.

HA با هم مخلوط گردیده و سپس درون چاهک های ژل پلی اکریل آمید بارگیری شدند (جدول شماره ۲). سپس ژل پلی اکریل آمید با استفاده از نیتراز نقره رنگ آمیزی شده و باندهای تشکیل شده روی Light box بررسی گردیدند. در مورد اگزون های شماره ۲ و ۴، علاوه بر روش PCR-SSCP-HA از روش PCR-RFLP (۱۷) نیز به ترتیب برای تشخیص احتمالی جهش های T54I و R183W استفاده شد (۱۸). برای تشخیص وجود یا عدم وجود جهش 726delT در اگزون شماره ۶ علاوه بر روش PCR-SSCP/HA از تکنیک Nested PCR نیز استفاده گردید. بدین منظور از آغازگرهای داخلی 6NESF: 5'AAG GGA AGA AAC GGC AACA 3' و 6NESR: 5'TTC TCA AAC TGT ACA GCA 3' دمای اتصال (Annealing) ۵۲ درجه سانتیگراد طراحی گردید. اگزون شماره ۷ هر ۱۰۰ نمونه مورد بررسی نیز بصورت یکپارچه با آغازگر R7A Forward و R7B Reverse تکثیر و تعیین توالی مستقیم شد.

## یافته ها:

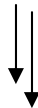
**تصویر شماره ۱:** ژل پلی اکریل آمید PCR-SSCP/HA مربوط به اگزون شماره ۷، شماره ۳ جهش 988delG، شماره های ۷، ۹، ۴، به ترتیب چند شکلی های c.793C>T, 793C>G, 874G>A و شماره ۱۰: مارکر می باشد.

با روش غربالگری PCR-SSCP و HA در مجموع ۱۵ درصد تغییرات ژنی در ژن DFNB59 مشاهده شد که ۱ درصد آن بیمارزیا بود. ۳ نوع پلی مورفیسم ژنی (793C>T, 793C>G و 874G>A) و یک



A

(الف) (ب)  
**تصویر شماره ۲:** نتایج تعیین توالی اگزون شماره ۷ ژن پژواکین (الف) نمونه سالم (ب) جهش *988 delG*



Ò ß •

(الف) (ب)  
**تصویر شماره ۳:** نتایج تعیین توالی اگزون شماره ۷ ژن پژواکین (الف): نمونه سالم، (ب) چند شکلی *874 G > A*



(الف) (ب)  
**تصویر شماره ۴:** نتایج تعیین توالی اگزون شماره ۷ ژن پژواکین (الف): نمونه سالم، (ب) چند شکلی *793 C > G*

(ب)

(الف)

**تصویر شماره ۵:** محصولات PCR-RFLP اگزون های ۲ و ۴ ژن پژواکین بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪.  
 الف: ژل پلی اکریل آمید محصول PCR-RFLP، اگزون ۲. شماره ۱: مارکر/ شماره های ۲-۱۵: نمونه های مورد بررسی/ شماره ۱۶: نمونه کنترل مثبت (محصول PCR بدون آنزیم AFI III) شماره ۱۷: نمونه کنترل منفی (شامل کلیه ترکیبات RFLP به جز محصول PCR). ب: ژل پلی اکریل آمید محصول PCR-RFLP، اگزون ۴/ شماره ۱: مارکر/ شماره های ۱۳-۲ و ۱۶: نمونه های مورد بررسی/ شماره ۱۴: نمونه کنترل منفی (شامل کلیه ترکیبات RFLP به جز محصول PCR). شماره ۱۵: نمونه کنترل مثبت (محصول PCR بدون آنزیم SsiI).

**بحث:**

در این تحقیق که با هدف تعیین نوع و فراوانی جهش های ژن پژواکین در استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، در ابتدا کلیه آگزون ها از محل های اختصاصی به وسیله روش PCR تکثیر شدند. پس از آن از تکنیک PCR-SSCP/ HA برای کلیه آگزون ها استفاده شد. از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۵ مورد تعداد باندهای تشکیل شده بر روی ژل با بقیه نمونه ها اختلاف داشت که ۱ نمونه دارای جهش 988delG بصورت هموزیگوت و ۱۴ مورد پلی مورفیسم (یک مورد هموزیگوت و بقیه هتروزیگوت) وجود داشت. نتایج این مطالعه حاکی از نقش یک درصدی جهش های ژن DFNB59 در ایجاد ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه است. تاکنون تحقیقات اندکی در ارتباط با این ژن در نقاط مختلف دنیا انجام شده است. مطالعاتی که در این زمینه در کشورمان صورت گرفته محدود می شود به تعداد دو جهش T54I و R183W که توسط Delmaghani و همکاران (۹) در ۴ خانواده ایرانی گزارش شد و جهش های 726delT و 988delG که توسط Hashemzadeh و همکاران (۱۰) در دو خانواده ایرانی بدست آمد. Delmaghani و همکاران (۹) فراوانی جهش های مزبور را اعلام نکرده اند ولی Hashemzadeh و همکاران (۱۰) فراوانی جهش های پیدا شده را به میزان ۶/۷ درصد گزارش داده اند. اخیراً هم مطالعه ای توسط بزازادگان و همکاران انجام شده که نامبرده ۵۰ خانواده ایرانی با ناشنوایی مغلوب جسمی را بررسی و جهش (122delA) ژن DFNB59 را در جمعیت مورد مطالعه به میزان ۴ درصد گزارش نموده است (۱۹) که قبلاً توسط Schwander این جهش گزارش شده است (۱۳). مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان انجام شده نیز بیانگر آن است که جهش های ژن پژواکین نقش بارزی در ایجاد ناشنوایی ندارند. به عنوان مثال در تحقیقاتی که Collin و همکاران در کشور

ترکیه انجام دادند، از ۶۸ خانواده ترک مورد بررسی، دو جهش R183W و R167T هر کدام به میزان ۱/۴ درصد مشاهده شد. در غربالگری ۸۳ بیمار هلندی، جهش L244R و 512delCACT-509 بصورت هتروزیگوت هر کدام ۱/۲ درصد گزارش شد (۱۱). در مطالعه ای که Ebermann و همکاران بر روی خانواده ای بزرگ با اختلال شنوایی انجام دادند، یک مورد جهش T ins 113-114 را یافتند (۱۲). با این اوصاف تاکنون تعداد معدودی جهش در ژن DFNB59 بیماران ناشنوا گزارش شده است (۱۸، ۱۹، ۱۳-۹). هر چند تحقیقات انجام شده به نقش ناچیز جهش های این ژن در ایجاد ناشنوایی تاکید دارند، بررسی های بیشتر می تواند ارتباط این ژن را با انواع ناشنوایی روشن تر کند. عمده کار در این تحقیق استفاده همزمان از تکنیک PCR-SSCP و HA بوده که برای کلیه آگزون ها استفاده شد. بر اساس مطالعات انجام شده، درصد اطمینان تکنیک PCR-SSCP تا ۸۰ درصد نیز گزارش شده است. این روش غربالگری ارزان و حساس بر اساس شکل فضایی DNA تک رشته ای استوار است و اغلب قادر است تفاوت های توالی، حتی در حد افزایش یا کاهش یک باز آلی را نیز تشخیص دهد، لذا روشی معمول در شناسایی جهش ها محسوب می شود (۲۰). در این مطالعه، به منظور تایید نتایج روش PCR-SSCP/HA کل آگزون شماره ۷ تعیین توالی شد و کلیه تغییرات ژنی یافت شده با روش تعیین توالی مستقیم نیز مورد تایید قرار گرفت. از طرفی سه جهش شناخته شده T54I و R183W و 726delT نیز با روش های PCR-RFLP و Nested PCR برای کلیه نمونه های بیماران مورد بررسی قرار گرفت که تاییدی بر دقت و صحت روش مورد استفاده PCR-SSCP/HA در این مطالعه را نشان داد.

**نتیجه گیری:**

از آنجا که از زمان کشف این ژن توسط Delmaghani و همکاران در سال ۲۰۰۶ تاکنون (۹)، تحقیقات گسترده ای در این زمینه صورت نگرفته، با این حال مطالعات انگشت شماری که در نقاط مختلف جهان انجام شده حاکی از نقش کم رنگ این جهش در ایجاد ناشنوایی است. نتایج مطالعه حاضر نیز بیانگر نقش ۱ درصدی جهش های ژن DFNB59 در ایجاد ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه است.

**تشکر و قدردانی:**

از سازمان بهزیستی و آموزش و پرورش استثنایی استان چهارمحال و بختیاری و از کلیه دانش آموزان و والدین آنها به خاطر همکاری صمیمانه با این تحقیق قدردانی می گردد. این تحقیق از نظر مالی توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- دانشگاه پیام نور تهران و سازمان بهزیستی استان چهارمحال و بختیاری تامین شده است.

**منابع:**

1. Wilson J. Deafness in developing countries: approaches to a global program of prevention. Arch Otolaryngol. 1985 Jan; 111(1): 2-9.
2. Zakzouk S. Consanguinity and hearing impairment in developing countries: a custom to be discouraged. J Laryngol Otol. 2002 Oct; 116(10): 811-6.
3. Fageeh NA. Prospective study of hearing loss in schools for deaf children in Assir region, Saudi Arabia. West Afr J Med. 2003 Dec; 22(4): 321-3.
4. Martini A, Mazzoli M, Kimberling W. An introduction to the genetics of normal and effective hearing. Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec; 830: 361-74.
5. Nadol JB Jr, Merchant SN. Histopathology and molecular genetics of hearing loss in the human. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2001 Oct; 61(1): 1-15.
6. Ciesla CJ, Lee KJ. Audiology. In: Lee KJ (Ed) Essential Otolaryngology. 6<sup>th</sup> ed. Connecticut: Appleton & Lange; 1995. 45.
7. Imani Rad P, Kahrizi K, Bazaz-zadegan N, Mohseni M, Asadi G, Nikzad N et al. [Linkage analysis of DFNB21 locus in 50 Iranian families autosomal recessive non syndromic hearing loss. J Rehabilitation, 2006; 1(7): 2.]Persian.
8. 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 Sep; 89(3): 130-6.
9. Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, et al. Utations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. Nat Genet. 2006 Jul; 38(7): 770-8.
10. Hashemzadeh Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, Dolati M, Hoghooghi Rad L, Amani Geshnigani S, et al. Novel mutations in the pejvakin gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. Clin Genet. 2007 Sep; 72(3): 261-3.
11. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S. et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. Hum Mutat. 2007 Jul; 28(7): 718-23.
12. Ebermann I, Walger M, Scholl HPN, Charbel Issa P, Luke Ch, Nurnberg G, et al. Lang. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. Hum Mutat. 2007; 28(6): 571-7.

13. Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, et al. A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejvakin is essential for outer hair cell function. *J Neurosci.* 2007; 27(9): 2163-75.
14. 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.
15. Fujita K, Silver J. Single-strand conformational polymorphism. *PCR Methods Appl.* 1994 Dec; 4(3): S137-40.
16. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N, Highsmith WE Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis.* 1999 Jun; 20(6): 1177-85.
17. Emtiazi G, Karimi M, [Technique of DNA recombination. cell biology and genetic engineering. Esfahan: Mani Pub. 1380; p: 261-2.]Persian
18. Taherzadeh-Ghahfarrokhi M, Farrokhi E, Saffari-Chaleshtori J, khademi S, Moradi MT, Mobini Gh, et al. [Study of DFNB59 gene mutations in exon 2 and 4 in association with deafness using PCR-RFLP in Chaharmahal va Bakhtiari. *J Shahrekord Univ of Med Sci.* 2009; 10(4): 77-82.]Persian
19. Bazaz-zadegan N, Meyer N, Kahrizi K, Khosh-aian A, Mohseni M, Nikzad N, et al. [Linkage analysis of DFNB59 locus in 50 Iranian families autosomal recessive non syndromic hearing loss. Abstract Article, 10<sup>th</sup> Iran genetic congress, Center of Razi congress, 1-3 Khordad 1387 Tehran, 38-39.]Persian
20. Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 1993; 2(5): 404-14.



Received: 22/Dec/2009

Accepted: 16/July/2009

**DFNB59 gene mutations screening in non syndromic deaf subjects in Chaharmahal va Bakhtiari province**

Taherzadeh Ghahfarrokhi M (MSc)\*, Farrokhi E (MSc)\*, Shirmardi SA (MD)\*\*, Saffari-Chaleshtori J (MSc)\*, Asadi S (MSc)\*, Gatreh Samani K (PhD)\*, Abolhasani M (BSc)\*, Azadegan F (BSc)\*, Reisi S (MSc)\*\*\*, Reisi M (BSc)\*, Banitalebi GA (BSc)\*, Mobini Gh (MSc)\*, Parvin N (MSc)†, Banitalebi M (MSc)\*, Hajihoseini R (PhD)††, Hashemzadeh Chaleshtori M (PhD)†††<sup>1</sup>

\*Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, \*\*General physician, Welfare organization, Chaharmahal va Bakhtiari province, Iran, \*\*\* MSc Student. Biology Dept., Isfahan Univ.

Iran, †Lecturer, Midwifery Dept., Medical Plants Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran, ††Associate professor, Biochemistry Dept., Payame-noor Univ. Tehran, Iran, †††Professor of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci. Shahrekord, Iran

**Background and aim:** The incidence of pre-lingual deafness is about 1 in 1000 neonates from which more than 60% of cases are inherited. Deafness is a heterogeneous disorder and may be due to genetic or environmental cause or both. Mutations in the DFNB59 gene encoding pejvakin protein has been very recently shown to cause neural deafness. In the present study, we have conducted type and frequency of the DFNB59 gene mutations in a cohort of 100 non syndromic deaf subjects in Chaharmahal va Bakhtiari province.

**Methods:** In this descriptive-lab based study we investigated the frequency of DFNB59 gene mutations in the entire coding exons of the gene. DNA was extracted from the peripheral blood samples following the standard phenol chloroform procedure. DFNB59 gene mutations were investigated using PCR-SSCP/ Heteroduplex Analysis (HA). The results of PCR-SSCP/HA were confirmed by sequencing of exon 7, nested PCR and PCR-RFLP of 3 known DFNB59 mutations.

**Results:** Altogether 3 different gene polymorphisms (793C>G, 793C>T and 874G>A) and one mutation (988delG) were detected in 7, 5, 2 and 1 subjects respectively.

**Conclusion:** Based on our data from the present study and previous study, we conclude that DFNB59 gene mutations have a very low contribution to deafness in patients in Chaharmahal va Bakhtiari province and are not of great clinical importance in this region.

**Keywords:** Deafness, DFNB59, Pejvakin, PCR-SSCP/Heteroduplex Analysis.

<sup>1</sup>Corresponding author

Cellular and Molecular  
Research Center, Medical  
Faculty, Rahmatieah,  
Shahrekord, Iran.

Tel:

0381-3346692

E-mail:

mchalesh@gmail.com