مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۹، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶/ ۹-۱

مقاله پژوهشی

بررسی پیوستگی ژنتیکی لوکوس های DFNB35 و DFNB42 در خانواده هایی با ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی از استان خوزستان

فاطمه نعمتی زرگران[۱]، محمد امین طباطبایی فر[۲]، افسانه تقی پور ششده[۱]، فهیمه مرادی[۱]، نرگس زارع پور[۱]، مرتضی هاشم زاده چالشتری[۳*]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۳]گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: **ناشنوایی یک اختلال شایع حسی است. نزدیک به ۳۶۰ میلیون ناشنوا در سراسر دنیا وجود دارد. بیش از ۵۰٪ موارد ناشنوایی به دلیل فاکتورهای ژنتیکی است. حدود ۷۰٪ موارد ارثی ناشنوایی، به دلیل اختلال شنوایی غیرسندرمی است که از این بین وراثت مغلوب اتوزومی مسئول ۸۰٪ موارد است. ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی بسیار هتروژن بوده و تاکنون بیش از ۵۰ ژن برای آن شناخته شده است. در این مطالعه ما به بررسی نقش جهش‌های DFNB42 (*ILDR1*) و DFNB35 (*ESRRB*) در ۲۵ خانواده دارای ARNSHL در استان خوزستان پرداختیم.**

روش بررسی: **این مطالعه توصیفی بر اساس آنالیز پیوستگی انجام گرفت و برای هر لوکوس ٦ مارکر STR انتخاب گردید. این مطالعه برای ۳۰۰ فرد از ۲۵ خانواده انجام گرفت که هر خانواده دارای حداقل دو فرد مبتلا و همچنین ازدواج خویشاوندی بودند. در این مطالعه جهش‌های *GJB2* بررسی گردید و ۳ خانواده با نتایج مثبت برای جهش در *GJB2* از مطالعه کنار گذاشته شدند.**

یافته ها: **با استفاده از آنالیزهای پیوستگی هیچ یک از خانواده‌های انتخاب شده به لوکوس‌های DFNB35 و DFNB42 پیوستگی نشان ندادند. این مطالعه نشان داد که جهش‌ها در دو ژن *ILDR1* و *ESRRB* نقشی در ایجاد ناشنوایی در خانواده‌های مورد مطالعه ندارند.**

نتیجه گیری: **این مطالعه نشان می‌دهد که جهش‌ها در ژن‌های *ILDR1* و *ESRRB* نقش مهمی در ایجاد ناشنوایی در استان خوزستان ندارد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که بررسی سایر جایگاه‌های دخیل در ناشنوایی می‌تواند به شناخت علل ژنتیکی بیماری در جمعیت مورد مطالعه کمک کند.**

واژه های کلیدی: **لوکوس DFNB35، لوکوس DFNB42، آنالیز پیوستگی، ناشنوایی غیر سندررمی مغلوب اتوزومی.**

مقدمه:

ناشنوایی یک نقص حسی شایع است که طبق ارزیابی‌های انجام شده حدود ۳۶۰ میلیون نفر در سرتاسر جهان از آن رنج می‌برند. این مشکل با میانگین ۱ تا ۲ در هر ۱۰۰۰ تولد رخ می‌دهد (۲،۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد کودکان ناشنوا علاوه بر مشکلاتی همچون مهارت‌های کلامی، زبانی، یادگیری و ارتباطات اجتماعی، در معرض مشکلات مرتبط با سلامت روانی بیشتری نیز هستند (۳). همچنین برآورد شده که در ایالات متحده هزینه مربوط به اختلال شنوایی حدود ۱۷۰ میلیارد دلار در سال نزدیک به ۳٪ از تولید ناخالص ملی است. از طرفی گفته می‌شود نقص شنوایی مادر زادی دو طرفه حسی- عصبی در کشورهای در حال توسعه حدود ۶ در هر ۱۰۰۰ تولد است (۴). ناشنوایی می‌تواند به دلیل عوامل ژنتیکی، محیطی یا هر دو باشد. موارد ژنتیکی،

***نویسنده مسئول:** شهرکرد- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد- گروه ژنتیک پزشکی- تلفن: ۰۳۸-۳۳۳۴۶۶۹۲، E-mail: mchalesh@yahoo.com*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

که بیش از ۵۰٪ موارد را شامل می‌شود، به دو نوع سندرمی و غیرسندرمی طبقه بندی می‌شود.

همانند بسیاری از اختلالات، در نوع سندرمی پاتولوژی بیماری بسیار متنوع و متفاوت است، هر چند در نوع غیرسندرمی بیشتر اختلال حسی- عصبی است. ۷۰٪ ناشنوایی‌های ارثی در زیر گروه غیرسندرمی طبقه بندی می‌شوند که خود شامل ۴ نوع غالب اتوزومی، مغلوب اتوزومی، وابسته به X و میتوکندریایی می‌باشد که در این میان سهم نوع مغلوب اتوزومی ۷۰٪ تا ۸۰٪ است (۷-۵). در مجموع ناشنوایی مغلوب معمولاً شدیدتر از ناشنوایی غالب بروز می‌کند، زیرا معمولاً عمیق، پیش از تکلم و با نفوذ کامل است؛ در حالی که ناشنوایی غالب اغلب پیش‌رونده، پس از تکلم و از نظر بالینی اغلب به شکل ناشنوایی یک طرفه یا دو طرفه خفیف است (۹،۸). ناشنوایی غیرسندرمی ناهمگن‌ترین صفت ژنتیکی شناخته شده‌است. تاکنون حدود ۱۲۰ لوکوس برای این نقص شناخته شده است که از بین این ۱۲۰ لوکوس ۶۷ تا مربوط به فرم مغلوب اتوزومی ناشنوایی غیرسندرومی (DFNB) بوده است(۱۰). می‌توان بیان داشت که ناشنوایی در مقایسه با سایر بیماری‌های ارثی به خاطر داشتن سه ویژگی منحصر به فرد است: ۱) ژن‌های زیادی در مسیر شنوایی دخیل هستند، در نتیجه شناخت علت بیماری بسیار دشوار است. ۲) این بیماری از منظر فنوتیپ نیز در خور توجه است؛ زیرا علاوه بر سیستم شنوایی، فرد از لحاظ روابط اجتماعی و تحصیلی نیز دچار مشکل می‌شود. ۳) تشخیص زود هنگام آن می‌تواند بسیار کمک کننده باشد و به مدیریت آن کمک کند. شناسایی دقیق و کارآمد علل ژنتیکی می‌تواند علاوه بر توضیح علت، به پیش بینی ویژگی‌های شنوایی، پیشگیری از ناشنوایی، مدیریت نشانه‌های مرتبط و همراه، تعیین نوع درمان و مشاوره ژنتیک کمک کند (۱۱). اختلالات مغلوب اتوزومی در مناطق با نرخ بالای ازدواج خویشاوندی ۲ تا ۳ برابر بیشتر از جمعیت اروپا و آمریکا است (۱۲). ایران برای انجام این گونه مطالعات، به دلیل ویژگی‌های جمعیتی و میزان بالای ازدواج خویشاوندی، می‌تواند مناسب باشد (۱۳). شناسایی ژن‌ها و جهش‌های درگیر می‌تواند از چند جهت حائز اهمیت باشد. روشن شدن علت ژنتیکی بیماری باعث می‌شود خانواده‌ها اضطراب کمتری داشته باشند و راحت‌تر روی مقوله توانبخشی و درمان احتمالی تمرکز کنند. شناسایی جهش می‌تواند به پزشکان برای پیش بینی ویژگی‌های شنوایی مانند ادیوگرام بیماران و پیش آگهی شنوایی بیمار، کمک کند. همچنین پیش‌گیری از ناشنوایی می‌تواند با اجتناب از مصرف داروهای خاص و یا فعالیت های خاص در افراد مستعد ژنتیکی، انجام شود. شناسایی جهش‌های عامل در بیمارانی که ناشنوایی سندرمی دارند، پیش‌گیری و یا تشخیص زود هنگام نشانه‌های مرتبط را امکان پذیر می‌کند. این امر همچنین می‌تواند به شناخت سلول‌های درگیر و ماهیت آسیب ایجاد کننده ناشنوایی حسی- عصبی کمک کند و به‌ویژه در کاشت حلزون می‌تواند مفید باشد. شناخت جهش‌های ایجاد کننده بیماری همچنین برای ارائه مشاوره ژنتیک، به‌ویژه قبل از اقدام به بارداری، می‌تواند مفید باشد. تست‌های تشخیصی قبل از تولد برای موارد غیرسندرمی ناشنوایی حسی- عصبی، در بسیاری از کشورها به دلیل مشکلات اخلاقی انجام نمی‌گیرد (۱۱).

شنوایی به واسطه سلول‌های اختصاص یافته در گوش داخلی انجام می‌گیرد که در نهایت صدا به سیگنال الکتریکی تغییر می یابد. صدا به وسیله سلول‌های مژک‌دار تعبیه شده در لایه‌هایی از سلول‌های حمایت کننده، هدایت می‌شود و سپس سیگنال‌های الکتریکی تولید شده به نواحی خاصی از مغز برای پردازش اطلاعات انتقال می یابند. هرگونه اختلال در توسعه، ساختار، عملکرد و حفظ سلول‌های مژک‌دار، حمایتی و یا سیستم عصبی شنوایی، می‌تواند منجر به مشکلات ناشنوایی گردد (۱۴). در این مطالعه از روش آنالیز پیوستگی استفاده گردیده است که یک روش قدرتمند در شناسایی ژن‌های دخیل در بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌های مغلوب اتوزومی، است.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

در مطالعه حاضر پیوستگی دو ژن *ILDR1* و *ESRRB* که هر دو در اتصالات و ارتباطات سلولی در گوش داخلی نقش دارند، با ناشنوایی در ۲۵ خانواده از استان خوزستان، با حداقل ۲ فرد ناشنوا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی:

در این مطالعه ۲۵ خانواده دارای حداقل دو فرد ناشنوا از استان خوزستان با همکاری مراکز بهزیستی انتخاب گردید. این افراد بر اساس معاینات بالینی جزء موارد ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی شناسایی شدند. محاسبه ارزش SLINK با استفاده از نرم‌افزار FastSLINK version 2.51 انجام گرفت (۱۵). نمونه‌گیری به روش تصادفی ساده پس از تکمیل پرسشنامه و رضایت‌نامه‌ی کتبی انجام شد. ۵ میلی‌لیتر نمونه خون از افراد خانواده گرفته شد و در لوله‌های حاوی EDTA در ۲۰- درجه نگهداری گردید. بعد از استخراج DNA به روش استاندارد فنل- کلروفرم کیفیت و کمیت DNA با نانودراپ بررسی شد (۱۶). توالی‌یابی اگزون دوم *GJB2* انجام گرفت و از میان ۲۵ خانواده انتخاب شده، ۳ خانواده دارای جهش در این اگزون بودند که از مطالعه خارج شدند.

در مرحله بعد STRهای مناسب از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI genome browser Map viewer و ucsc انتخاب و پرایمرهای مناسب جهت تکثیر STRها با استفاده از پایگاه داده NCBI UniSTS انتخاب شد. برای انتخاب نشانگر مناسب توجه به فاصله نشانگرها از ژن، طول محصول PCR، درجه‌ی چندشکلی آن‌ها و هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر معین ضروری بود. مشخصات مربوط به هر نشانگر و اطلاعات هرکدام جهت تکثیر در جدول‌های شماره ۱ تا ۴ آورده شده‌است.

جدول شماره ۱: نشانگرهای مورد استفاده برای لوکوس DFNB35 و ویژگی‌های آن‌ها

نام نشانگر	پرایمر F (Forward)	پرایمر R (Reverse)	اندازه محصول (bp)
D14S53	CTTTCCCCAGTGAAGTTGC	ACACTGCACTCCTACTCTG	۱۳۵-۱۵۵
D14S61	CCTGCTAAAAGTCAAGTGGG	AATGGCGTATCAGAGAGGAA	۱۹۷-۲۲۷
D14S1036	AAGCCCCTTTGTGACTGAC	GCCCATGTGATATTTGGTG	۲۰۳-۲۱۷
D14S279	GTGACCTCAGCATGTATTACTC	CAGGTATTCCCAATATGCAGC	۱۹۶-۲۱۲
D14S270	CCACTAATGATAACATTGTCGC	AGAGGCAGGTGAATGACT	۲۱٤-۲۲٤
D14S983	TGGACTGGTTAGCCTCAGTG	GCATCAACTGGCTTCCAATC	۲۲۲-۲۷۰

جدول شماره ۲: نشانگرهای مورد استفاده برای لوکوس DFNB42 و ویژگی‌های آن‌ها

نام نشانگر	پرایمر F (Forward)	پرایمر R (Reverse)	اندازه محصول (bp)
D3S3720	CAAGCAATCCTCCAGCCTC	GCTGTATCTGAATCTAAAGCCT	۲۱٦-۲۳٦
D3S3576	GATCTAGTTGGCAAGGCG	TTGGACTCGAGCAATCC	۲۰۲-۲۱٤
D3S3674	GCCTTGGAAAACCTTGAA	TTGCCTGCAACAATGATTAC	۱۸۱-۲۰۵
D3S3709	TGCATGTGCGTGTATATTTG	ACAGTTGTGAGACACCACCTATT	۱٤۵-۱۸۳
D3S3552	GCCACTCCCAAATGTCTG	GACTGGAACTTGATTGCC	۱٦۱-۱۷۷
D3S1278	GGACACATGCTCCTGGAA	TGCACTAVAGGGCAGTTG	۲۰۳-۲۳۱
D3S3645	GCAGTGCTGAAAGATGGC	ACCTGGACTTGGGATGG	۱٦٤-۲۱۲

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

جدول شماره۳: برنامه دمایی PCR نشانگرها

مراحل PCR	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
۱	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲	۹۵	۳۰ ثانیه	۹
	۶۷-۵۷*	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
۳	۹۵	۳۰ ثانیه	۲۶
	۵۷-۵۰*	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
٤	۷۲	۵ دقیقه	۱

*: دمای اتصال پرایمر برای هر نشانگر متغیر بوده و در این محدوده بوده است.

جدول شماره۴: مقادیر لازم برای PCR نشانگرهای نزدیک ژن‌های مورد بررسی

مواد	غلظت	حجم µl
dH_2O		۱٤/۵۵
PCR buffer	۱۰X	۲
dNTP	۱۰mM	۰/۵
$MgCl_2$	۵۰mM	۰/٦
Primer (F)	۱۰pM	۰/۳
Primer (R)	۱۰pM	۰/۳
Taq-DNA Polymerase	۵Unit/µl	۰/۲۵
DNA	٤۰-۵۰Ng/µl	۱/۵
حجم کل		۲۰

به منظور تعیین ژنوتیپ ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، STRهای انتخاب شده تکثیر گردید و با استفاده از ژل پلی اکریل‌آمید ۱۲٪-۸٪ بررسی آللی صورت گرفت. نمونه‌ها با جریان ۶۰mA به مدت ۴-۲ ساعت الکتروفورز شدند و با رنگ آمیزی نیترات نقره باندها قابل رویت گردید.

محاسبه LOD score دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به منظور اثبات یا رد پیوستگی ژنتیکی با استفاده از نرم افزارهای SuperLink version 1.6 (امتیاز LOD پارامتری دو نقطه‌ای) و نرم افزار GeneHunter (محاسبه امتیاز LOD پارامتری چند نقطه‌ای) انجام شد (۱۸،۱۷).

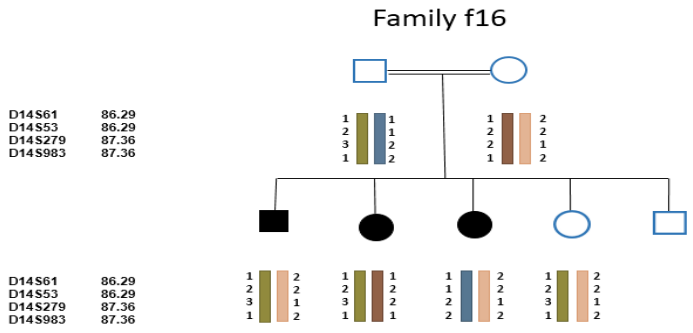
برای برخی خانواده‌ها، رسم هاپلوتایپ (مجموعه‌ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) با کمک نرم افزار Haplopainter version 029.5 صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می‌شود (۱۹).

یافته ها:

در این مطالعه افراد ناشنوای جمعیت مورد بررسی دارای ناشنوایی دوطرفه‌ی حسی- عصبی شدید تا عمیق بودند. برای ۲۵ خانواده انتخاب شده، ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی با توجه به اطلاعات حاصل از شجره‌نامه‌ها

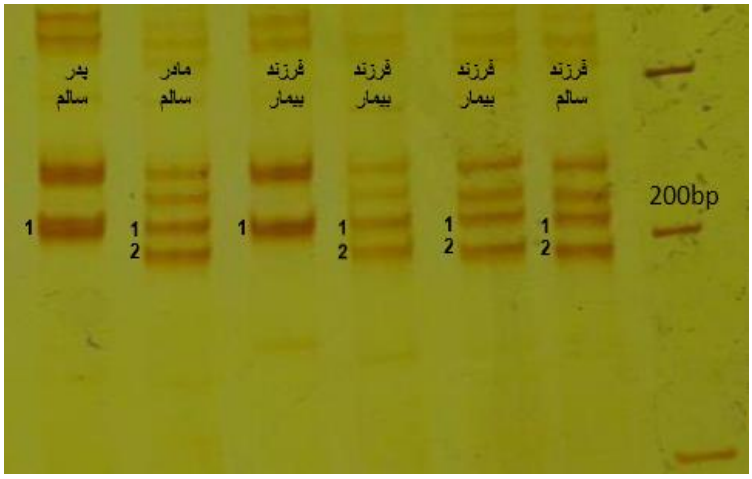
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

مورد تأیید بود. بیش از ۸۰٪ خانواده‌های انتخاب شده دارای سه نسل ازدواج خویشاوندی داشتند. ارزش SLINK خانواده‌ها وارد شده به مطالعه نزدیک ۲ تا ۷ برآورد شده است (معنی SLINK ۱ یعنی نسبت لینکاژ به عدم لینکاژ تنها ۱۰ برابر است). در این مطالعه که بر روی ۱۱۰ فرد ناشنوا و خانواده‌های آن‌ها انجام گرفت، هیچ یک از خانواده‌ها به لوکوس‌های DFNB35 و DFNB42 پیوستگی نشان ندادند.



تصویر شماره ۱: هاپلوتایپ مربوط به خانواده‌ی ۱۶ مورد بررسی

*در صورت وجود پیوستگی الگوی هاپلوتیپ بیماران باید به صورت دو آلل یکسان باشند که در این شجره‌نامه بیماران هاپلوتیپ یکسانی ندارند و پیوستگی به لوکوس **DFNB35** رد می‌شود. نقشه ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشفیلد می‌باشد.*



تصویر شماره ۲: تعیین ژنوتیپ نشانگر D14S61 (لوکوس DFNB35)

این نشانگر در دو نفر از فرزندان ناشنوا به صورت هتروزیگوت است که دال بر رد پیوستگی می‌باشد.

بحث:

ناشنوایی غیرسندرمی حسی- عصبی از لحاظ ژنتیکی بسیار هتروژن است و تا امروز بیش از ۵۰ ژن برای آن شناخته شده است (۱۲). هتروژن بودن این بیماری، معضل بزرگی در جهت شناسایی علت ژنتیکی این بیماری است و در نتیجه باعث ایجاد مشکلاتی در مشاوره ژنتیک به خانواده‌ها گردیده‌است (۲۱،۲۰). تا سال ۲۰۱۲، بیش از ۷۰۰ جهش مختلف در ۴۲ ژن در افراد مبتلا به کاهش شنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی شناخته شده است (۲۲). از آن جایی که پیشینه قومی یک عامل مهم در تنوعات و شیوع صفات مندلی از جمله ناشنوایی ارثی است، در نتیجه بررسی و شناخت لوکوس‌ها و آلل‌های بیماری‌زای (جهش‌ها) شایع جمعیت‌های مختلف باعث

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

بهبود و ارتقاء غربالگری ژنتیکی، تشخیص مولکولی و مراقبت‌های کلینیکی می‌گردد. همچنین این بررسی‌ها می‌تواند به شناخت لوکوس‌ها و آلل‌های جدید منجر گردد. بررسی انجام شده در موارد ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی در ایران نشان داده‌است که جهش در ژن GJB2 که در بسیاری از جمعیت‌ها شایع است، تنها مسئول حدود ۱۸٪ از ناشنوایی غیر سندرمی با وراثت مغلوب اتوزومی است و جهش GJB6 نقشی در ناشنوایی ایران ندارد. این نتایج بررسی سایر جایگاه‌های ژنی مطرح در زمینه ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب اتوزومی را حائز اهمیت می‌سازد (۲۴،۲۳). DFNB42 به دلیل جهش هموزیگوت در ژن ILDR1 واقع بر کروموزوم ۳q21 رخ می‌دهد. این لوکوس با بررسی یک خانواده پاکستانی دارای ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرمی پیش از تکلم شناسایی گردید. این لوکوس بر روی کروموزوم ۳q13.31-q22.3 قرار داشت و با ناحیه‌ای که برای شکل غالب اتوزومی DFNA18 گزارش شده بود، هم‌پوشانی داشت (۲۵). Borck و همکاران با بررسی ۱۰ خانواده مبتلا به DFNB42 شامل ۸ خانواده پاکستانی و ۲ خانواده ایرانی، ۱۰ جهش متفاوت در ژن ILDR1 گزارش و این ژن را به عنوان عامل نقص شنوایی مغلوب اتوزومی معرفی کردند (۱۴). ژن ILDR1 دارای ۸ اگزون و ۶ ایزوفرم پروتئینی است که ۵ تا از آن‌ها حاصل پیرایش متناوب است. ILDR1-α شامل هر ۸ اگزون و یک پروتئین با ۵۴۶ اسیدآمینه است. در ILDR1-α'، ۳۹ کدون از اگزون ۱ به اگزون ۲ متصل شده و فاقد اگزون ۶ است. ILDR1-β فاقد اگزون ۴ و ۵ است. ایزوفرم‌های دیگر نیز به ترتیب فاقد اگزون ۱ و اگزون ۷ هستند (۲۶،۱۴). در سال ۲۰۱۳ بررسی‌هایی برای شناخت نقش ILDR1 صورت گرفت و مشخص شد که ILDR1 (دارای دومین شبه ایمونوگلوبولین) یکی از پروتیین‌های اصلی در اتصالات سه سلولی در اپیتلیال گوش داخلی است (۲۷).

با استفاده از آنالیز پیوستگی نمونه‌های ۲۴ فرد موبوط به یک خانواده پاکستانی، انصار و همکاران توانستند جایگاه نوعی ناشنوایی مغلوب اتوزومی را که DFNB35 نامیدند، برروی کروموزوم ۱۴ نقشه‌یابی کنند (۲۸). Collin و همکاران، با استفاده از نقشه‌یابی هموزیگوسیتی سراسر ژنومی در یک خانواده ترکیه‌ای با درجه همخونی بالا، به جایگاه DFNB35 برای علت ناشنوایی رسیدند. Collin و همکاران با آنالیز ژن ESRRB که یک ژن کاندید برای جایگاه DFNB35 بود، توانستند یک مضاعف‌شدگی را به صورت هموزیگوت در اگزون ۸ این ژن ردیابی کنند (۲۹). خانواده بررسی شده توسط انصار و همکاران ناقل جهش بدمعنی V342L بودند. در سه خانواده دیگر پاکستانی، جهش‌های بد معنی دیگر در این ژن ردیابی شد. یکی از این جهش‌ها (A110V) در دمین متصل شونده به DNAی رسپتور β پروتئین وابسته به استروژن بود، در حالی که سه جهش دیگر در دمین متصل شونده به لیگاند قرار داشتند. در سال ۲۰۱۱ با بررسی یک خانواده تونسی جهش Y305H شناسایی شد (۳۰). مدل‌های مولکولی نشان می‌دهند که جهش‌های بدمعنی یافت شده، باعث تغییر ساختار و پایداری این دمین‌ها می‌گردد. پروتیین ESRRB برای توسعه و عملکرد گوش داخلی ضروری است. مطالعات نشان داد که Esrrb موشی نقش حیاتی در توسعه و تکوین جنین دارد و جهش‌های سرکوب عملکرد ژن در صورت هموزیگوت بودن باعث مرگ جنین موشی می‌گردد (۳۱).

هرچند که جهش در این دو ژن در جمعیت ایرانی یا جمعیت‌های نزدیک وجود داشت، اما در مطالعه حاضر هیچ کدام از خانواده‌ها به این دو جایگاه پیوستگی نشان ندادند که می‌تواند به دلیل ناهمگونی جمعیت ایرانی و همچنین هتروژن بودن ناشنوایی باشد. به نظر می‌رسد برای شناخت علل ژنتیکی بیماری در جمعیت مورد مطالعه، باید به بررسی سایر جایگاه‌های دخیل در ناشنوایی پرداخت. همچنین ترکیب مطالعه پیوستگی با روش‌های دیگر مانند توالی‌یابی نسل دوم می‌تواند بسیار راهگشا باشد و حتی به شناخت ژن‌های جدید کمک کند.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

شناسایی علل ژنتیکی NSHL، به‌ویژه در کودکان قبل از تکلم، برای اقدامات پزشکی مناسب لازم و ضروری است. در حال حاضر، بیشتر از همیشه، نیاز به ادامه تحقیقات در این زمینه با ابزار و منابع علمی موجود حس می‌شود و پیشرفت در این حوزه بسیار قابل توجه بوده‌است (۹).

نتیجه‌گیری:

این مطالعه پیشنهاد می‌کند که جهش‌ها در ژن‌های *ILDR1* و *ESRRB* نقش مهمی در ایجاد ناشنوایی در استان خوزستان ندارند. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که بررسی سایر جایگاه‌های درگیر در ناشنوایی با استفاده از مطالعات مشابه یا استفاده از روش‌های جدید توالی‌یابی نسل دوم می‌تواند به شناخت علل ژنتیکی بیماری در جمعیت مورد مطالعه منجر گردد. ترکیب اطلاعات حاصل از آنالیزهای پیوستگی با تکنولوژی‌های پیشرفته high-throughput و deep sequencing می‌تواند به محققان در شناسایی ژن‌های مستعد کننده با استفاده از یک راه مقرون به صرفه کمک کند.

تشکر و قدردانی:

از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند، قدردانی می‌شود. این مقاله مربوط به نتایج پایان نامه نویسنده نفر اول می‌باشد که در تاریخ ۱۳۹۴/۳/۱۰ و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تصویب گردید. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۱۸۴۱ جهت تأمین هزینه تقدیر و تشکر می گردد.

منابع:

1. Martines F, Martines E, Mucia M, Sciacca V, Salvago P. Prelingual sensorineural hearing loss and infants at risk: Western Sicily report. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2013; 77(4): 513-8.
2. Organization WH, Organization WH. WHO global estimates on prevalence of hearing loss. Retrieved October. 2012; 10: 201-2.
3.Walker R. Child mental health and deafness. Paediatr Child Health. 2013; 23(10): 438-42.
4. Tucci D, Merson MH, Wilson BS. A summary of the literature on global hearing impairment: current status and priorities for action. Otol Neurotol. 2010; 31(1): 31-41.
5. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. Annu Rev Genet. 2009; 43: 411-37.
6. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. J Med Dent Sci. 2010; 57(1): 1-10.
7. Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.
8. Imtiaz F, Taibah K, Ramzan K, Bin-Khamis G, Kennedy S, Al-Mubarak B, et al. A comprehensive introduction to the genetic basis of non-syndromic hearing loss in the Saudi Arabian population. BMC Med Genet. 2011; 12: 91.
9. Vona B, Nanda I, Hofrichter MA, Shehata-Dieler W, Haaf T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. Mol Cell Probes. 2015; 29(5): 260-70.
10. Van Camp G, Smith RJ. Hereditary hearing loss homepage. 2006.
11. Matsunaga T. Value of genetic testing in the otological approach for sensorineural hearing loss. Keio J Med. 2009; 58(4): 216-22.
12. McNicoll G. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division: Population, Resources, Environment and Development Database, Version 4.0. Population Develop Review. 2006; 32(4): 790-1. Available from: http://go.galegroup.com/ps/anonymous.
13. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, et al. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. Am J Med Genet A. 2012; 158 (10): 2485-92.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018

14. Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda HM, Kakar N, Von Ameln S, et al. Loss-of-function mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. Am J Hum Genet. 2011; 88(2): 127-37.
15. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(11): 4175-8.
16. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res. 1989; 17(20): 8390.
17. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. Bioinformatics. 2002;18(1): 189-98.
18. Sobel E, Sengul H, Weeks DE. Multipoint estimation of identity-by-descent probabilities at arbitrary positions among marker loci on general pedigrees. Hum Hered. 2001; 52(3): 121-31.
19. Tabatabaiefar MA, Shariati L, Montazer-Zohour M, Ashrafi K, Saffari-Chaleshtori J, Ghasemikhah R, et al. Mutation screening of GJB2 and GJB6 and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. J Shahrekord Univ Med Sci. 2010; 12(2): 65-75.
20. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C. GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. Genet Med. 2002; 4(4): 258-74.
21. Shearer AE, Black-Ziegelbein EA, Hildebrand MS, Eppsteiner RW, Ravi H, Joshi S, et al. Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. J Med Genet. 2013; 50(9): 627-34.
22. Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: A review. Front Biosci. 2012; 17: 2213-36.
23. Zeinali S, Davoudi-Dehaghani E, Azadmehr S, DabbaghBagheri S, Bagherian H, Jamali M, et al. GJB2 c.- 23+ 1G> A mutation is second most common mutation among Iranian individuals with autosomal recessive hearing loss. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2015; 272(9): 2255-9.
24. Kahrizi K, Shafeghati Y, Daneshi A, Jogataie M-T, MHP MKJD. Delta (GJB6-D13S1830) is not a common cause of nonsyndromic hearing loss in the Iranian population. Arch Iran Med. 2005; 8(2): 104-8.
25. Aslam M, Wajid M, Chahrour MH, Ansar M, Haque S, Pham TL, et al. A novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus (DFNB42) maps to chromosome 3q13.31-q22.3. Am J Med Genet A. 2005; 133 (1): 18-22.
26. Hauge H, Patzke S, Delabie J, Aasheim HC. Characterization of a novel immunoglobulin-like domain containing receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 323(3): 970-8.
27. Higashi T, Tokuda S, Kitajiri S, Masuda S, Nakamura H, Oda Y, et al. Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. J Cell Sci. 2013; 126(4): 966-77.
28. Ansar M, Din MA, Arshad M, Sohail M, Faiyaz-Ul-Haque M, Haque S, et al. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan. Eur J Hum Genet. 2003; 11(1): 77-80.
29. Collin RW, Kalay E, Tariq M, Peters T, Van der Zwaag B, Venselaar H, et al. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. Am J Hum Genet. 2008; 82(1): 125-38.
30. Ben Said M, Ayedi L, Mnejja M, Hakim B, Khalfallah A, Charfeddine I, et al. A novel missense mutation in the ESRRB gene causes DFNB35 hearing loss in a Tunisian family. Eur J Med Genet. 2011; 54(6): e535-41.
31. Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. Nature. 1997; 388(6644): 778-82.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2017; 19(1): 1-9. **Original article**

Genetic linkage analysis of the DFNB35 and DFNB42 loci in families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss from Khuzestan province

Nemati-Zargaran F[1], Tabatabaiefar MA[2], Taghipour-Sheshdeh A[1], Moradi F[1], Zarepour N[1], Hashemzadeh-Chaleshtori M[3*]
[1]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Genetics and Molecular Biology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; [3]Medical Genetics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 4/Mar/2016 Accepted: 3/Aug/2016

Background and aims: Hearing loss is a common sensorial disorder. There are approximately 360 million affected people all over the world. More than 50% of hearing loss is because of genetics factors. About 70% of inherited hearing loss is due to non-syndromic hearing impairment that Autosomal- recessive inheritance is responsible for about 80% of cases. Autosomal recessive non syndromic hearing loss is very heterogeneous and more than 50 genes have been identified for it. The aimof this study was to investigate the role of DFNB42 (*ILDR1*) and DFNB35 (*ESRRB*) mutations in 25 families with ARNSHL from Khuzestan Iran.
Methods: This descriptive study was based on linkage analysis and selected 6 STR markers for each locus. This study was performed for 300 individuals from 25 families that had at least two affected, also they had consanguineous marriage. In this study, it was investigated mutations of *GJB2* and 3 families with positive result for mutation in *GJB2*, were excluded from our study.
Results: With linkage analysis, none of selected families was linked to DFNB35 or DFNB42 loci. This study showed that the *ILDR1* and *ESRRB* mutations have no role in hearing loss in studied families.
Conclusion: This study shows that mutations in *ILDR1* and *ESRRB* genes have no important role in incidence of hearing loss in Khuzestan province. This result suggests that studying of other loci that are involved in deafness, can be helpful to identify genetic causes in this disease in the studied population.

Keywords: **DFNB35 locus, DFNB42 locus, Linkage analysis, ARNSHL.**

Cite this article as: Nemati-Zargaran F, Tabatabaiefar MA, Taghipour-Sheshdeh A, Moradi F, Zarepour N, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of the DFNB35 & DFNB42 loci in families with Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss from Khuzestan province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(1): 1-9.

[*]**Corresponding author:**
Medical Genetics Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00983833336692, E-mail: mchalesh@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 18:04 +0330 on Saturday March 17th 2018