

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده علوم طبیعی  
گروه زیست شناسی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته ژنتیک  
مولکولی

عنوان

بررسی موتاسیون شایع در اینترون شماره ۱ (IVS 1 +1G>A) ژن  
Connexin 26 در بیماران مبتلا به ناشنوایی اتوزومی غیر  
سندرومی مغلوب

استاد راهنما

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی

استاد مشاور

دکتر امید عمرانی

پژوهشگر

نیکو فتوحی

تیرماه ۱۳۹۰

ستایش و سپاس بیکران بایسته آن ایزد دانایی  
که چراغ دانش را در اندیشه انسان فروزان می  
دارد، تا در پرتو آن هستی را از دورترین مرز  
های کهکشان تا پیچاپیچ هزار توی یاخته ها  
بکاود و رازهای آن را بگشاید و بدین گونه خود  
را از بردگی جهل برهاند و به آزادی و بهروزی  
دست یابد.

## تقدیم به پدر و مادر عزیزم

آنانکه امید رسیدن به افق های روشن را در دلم شکوفا ساختند  
و شهامت قدم گذاشتن در این راه و همت ادامه دادنش را به من  
آموختند.

## و همچنین یگانه خواهرم

که موفقیتش آرزوی همیشگی من است.

## و تقدیم

به تمام آنانکه مرا اندیشیدن آموختند.

## تشکر و قدردانی :

در آغاز بر خود وظیفه می دانم که در به انجام رسانیدن این پروژه(طرح) از استاد گرانقدر و محترم جناب آقای دکتر مرتضی جبارپور بنیادی که لطف نموده و این فرصت را در اختیار بنده قرار دادند تشکر نمایم که بی شک حمایت های ایشان به مثابه پدری مهربان سبب دلگرمی بنده در طول این پروژه و صد البته در دوران تحصیل در دانشگاه تبریز گردید.

و تشکری ویژه از جناب آقای دکتر محمد علی حسینیپور فیضی که زحمت داوری این طرح را تقبل نمودند، کسی که به حق دین بزرگی به گردن من دارند.

بر خود واجب می دانم که از جناب آقای دکتر محسن اسماعیلی که همچون دوستی مهربان و بی ریا کمک های خود را از بنده دریغ ننمودند و در تمام مراحل مرتفع کننده مشکلات این طرح بودند، تشکر و قدردانی نمایم تا گوشه ای از زحمات بی دریغ ایشان را ارجع نهاده باشم.

جا دارد که از جناب آقای دکتر امید عمرانی که وظیفه مشاوره این طرح را بر عهده گرفتند، و نیز از دوست عزیزم جناب آقای دکتر مهدی حقی که طی این طرح با همیاری های خود بنده را حمایت کردند، تشکر نمایم و سپاس ویژه خود را از تمامی دوستان دوره کارشناسی ارشد به خصوص خانم مهندس زهرا نوری و آقای مهندس عزیز خرمی که همواره در کنار من بودند، اعلام دارم.

و تشکر دیگر از مسئولین محترم کتابخانه دانشکده علوم جناب آقای جعفرپور و سرکار خانم مختاری که نهایت همکاری را با من مبذول نمودند.

با آرزوی سلامتی و موفقیت برای تمامی این عزیزان در تمامی مراحل زندگیشان.

نام خانوادگی دانشجو: فتوحی	نام: نیکو
عنوان پایان نامه: بررسی موتاسیون شایع در ایترون ۱ ( $IVS1+1G>A$ ) ژن کانکسین ۲۶ در بیماران مبتلا به ناشنوایی اتوزومی غیرسندرمی مغلوب	
استاد راهنما: دکتر مرتضی جبار پور بنیادی استاد مشاور: دکتر امید عمرانی	
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک مولکولی دانشگاه: تبریز	دانشکده: علوم طبیعی تاریخ فارغ التحصیلی: تیر ۹۰ تعداد صفحات: ۷۵
کلید واژه: $IVS1+1G>A$ ، جایگاه ژنی DFNB1، ناشنوایی اتوزومی مغلوب غیرسندرمی، ترک های آذری ایران	
<b>چکیده</b>	
<p><b>زمینه و هدف:</b> ناشنوایی یکی از شایع ترین اختلالات مادرزادی است. از هر ۱۰۰۰ نوزاد زنده یک نوزاد در هنگام تولد یا اوایل کودکی دارای نقص شنوایی عمیق با شدید است. بیش از 50% ناشنوایی های Prelingual زمینه ژنتیکی دارند که این گروه را می توان به دو دسته ی سندرمی و غیرسندرمی تقسیم نمود. بیش از 80% ناشنوایی های غیرسندرمی الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب را دارا هستند. ناشنوایی غیرسندرمی مغلوب (ARNSHL) در 50% موارد به واسطه جهش در دو ژن <i>GJB2</i> (کانکسین ۲۶) و <i>GJB6</i> (کانکسین ۳۰) واقع در لوکوس DFNB1 کروموزوم 13q ایجاد می شود. محصولات پروتئینی این دو ژن در ایجاد اتصالات شکافی (Gap Junction) نقش مهمی ایفا می کنند. هدف از این مطالعه غربالگری بیماران ناشنوا در جمعیت ترکان آذری از نظر فراوانی جهش <math>IVS1+1G&gt;A</math> ی در ژن <i>GJB2</i> است.</p>	
<p><b>روش بررسی:</b> در این مطالعه، جهش <math>IVS1+1G&gt;A</math> ی در ژن <i>GJB2</i> در ۱۰۵ ناشنوی ARNSHL مورد بررسی قرار گرفت. روش مورد استفاده در این بررسی RFLP-PCR بود. در این تکنیک بعد از تکثیر قطعه مدنظر، محصول حاصل در معرض هضم آنزیمی با آنزیم HphI قرار گرفت. این آنزیم در مواقع بروز جهش توانایی برش جایگاه اختصاصی خود را ندارد.</p>	
<p><b>یافته ها:</b> در این پژوهش ژن کانکسین ۲۶ از نظر وجود جهش در ناحیه پیرایشی <math>IVAS1+1G&gt;A</math>، در ۲۱۰ کروموزوم (۱۰۵ فرد ناشنوا) از ۸۸ خانواده با تکنیک RFLP مورد بررسی قرار گرفت. در میان افراد مبتلا ۵۹ فرد (۵۶٪) از والدینی با ازدواج فامیلی و ۴۶ فرد (۴۴٪) حاصل ازدواج غیرفامیلی بودند. در این مطالعه ۱ بیمار هموزیگوت و ۸ بیمار هتروزیگوت تشخیص داده</p>	

## ادامه چکیده

شدند، در این میان ۲ بیمار (۲۲٪) دارای جهش  $IVS1+1G>A$  ، حاصل ازدواج فامیلی بودند، و یکی از اعضای خانواده یکی از بیماران با وجود جهش  $IVS1+1G>A$  هموزیگوت شنوا بود. در نهایت فراوانی جهش  $IVS1+1G>A$  در جمعیت ۵٪ برآورد گردید.

**نتیجه گیری:** یافته های ما نظریه ی موسس یا اثر بنیان گذار را به جای نقطه داغ بیشتر تقویت می کند.

---

---

## فصل اول

- ۱-۱ ناشنوایی ..... ۱
- ۱-۱-۱ میزان ناشنوایی ..... ۵
- ۲-۱-۱ زمینه های بروز ناشنوایی ..... ۵
- ۱-۲-۱-۱ ناشنوایی اکتسابی ..... ۶
- ۲-۲-۱-۱ ناشنوایی ارثی ..... ۶
- ۲-۱ اختلالات شنوایی سندرمی ..... ۷
- ۳-۱ اختلالات شنوایی غیر سندرمی ..... ۷
- ۴-۱ اختلالات شنوایی در اثر نقص در ژنوم میتوکندریایی ..... ۸
- ۱-۴-۱ اختلالات شنوایی سندرمی - میتوکندریایی ..... ۸
- ۲-۴-۱ اختلالات شنوایی غیرسندرمی - میتوکندریایی ..... ۹
- ۵-۱ اختلالات شنوایی در اثر نقص در ژنوم هسته ای ..... ۹
- ۱-۵-۱ نقشه کروموزومی ژن های ناشنوایی ..... ۱۰
- ۲-۵-۱ اختلالات شنوایی وابسته به جنس ..... ۱۱
- ۳-۵-۱ اختلالات شنوایی غیرسندرمی غالب (اتوزومی) ..... ۱۲
- ۴-۵-۱ اختلالات شنوایی غیرسندرمی مغلوب ..... ۱۳
- ۶-۱ ژن کانکسین ۲۶ ( GJB2 ) ..... ۱۵
- ۷-۱ پروتئین کانکسین ۲۶ و نقش ساختاری آن ..... ۱۶
- ۸-۱ بررسی ساختار ژن GJB2 ..... ۱۹
- ۱-۸-۱ جهش در ژن GJB2 ..... ۱۹
- ۲-۸-۱ اپیدمیولوژی ..... ۲۰
- ۳-۸-۱ همبستگی ژنوتیپ و فنوتیپ ..... ۲۲

## فصل دوم

- ۱-۲ تجهیزات و لوازم مورد استفاده ..... ۲۴
- ۲-۲ مواد ..... ۲۵



۲۵.....	مواد مصرفی عمومی	۱-۲-۲
۲۶.....	مواد مصرفی شیمیایی	۲-۲-۲
۲۷.....	مواد مصرفی بیولوژیک	۳-۲-۲
۲۷.....	محلول ها	۳-۲
۲۷.....	محلول های لازم جهت استخراج	۱-۳-۲
۲۹.....	محلول های لازم جهت واکنش PCR	۲-۳-۲
۲۹.....	بافر B (10X) جهت RFLP	۳-۳-۲
۲۹.....	محلول های لازم جهت الکتروفورز کردن DNA	۴-۳-۲
۳۰.....	تهیه نمونه های خون	۴-۲
۳۱.....	استخراج DNA ژنومی به روش نمک اشباع	۵-۲
۳۲.....	تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده	۶-۲
۳۴.....	بررسی جهش IVS I+1G>A در ژن connexin 26	۷-۲
۳۴.....	واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR)	۱-۷-۲
۳۴.....	آغازگرهای استفاده شده جهت انجام PCR	۲-۷-۲
۳۶.....	دیگر اجزای واکنش PCR	۳-۷-۲
۳۷.....	بهینه کردن PCR	۴-۷-۲
۳۸.....	تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات PCR	۵-۷-۲
۳۹.....	رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید و عکس برداری از ژل	۶-۷-۲
۴۰.....	آنزیم HphI و جایگاه برش آن	۷-۷-۲
به	بررسی امکان تشخیص افتراقی بین جهش های IVS1+1G>A و 3170G>A -	۸-۷-۲
۴۲.....	روش SSCP	
۴۳.....	رنگ آمیزی ژل به روش نیترا ت نقره	۹-۷-۲
۴۴.....	انگشت نگاری DNA	۱۰-۷-۲

## فصل سوم

۴۵.....	۱-۳ نتایج
---------	-----------

---

---

۵۸.....	۲-۳ بحث
۶۲.....	۳-۳ نتیجه گیری
۶۳.....	۴-۳ پیشنهادات
۶۵.....	منابع

چکیده انگلیسی

---

---

## فصل اول

٩ .....	جدول ١-١
١٣ .....	جدول ٢-١
١٤ .....	جدول ٣-١

## فصل دوم

٢٤ .....	جدول ١-٢
٢٥ .....	جدول ٢-٢
٢٦ .....	جدول ٣-٢
٢٧ .....	جدول ٤-٢
٣٥ .....	جدول ٥-٢
٣٧ .....	جدول ٦-٢
٣٨ .....	جدول ٧-٢
٤٠ .....	جدول ٨-٢

## فصل سوم

٤٤ .....	جدول ١-٣
----------	----------

---

---

## فصل اول

۲.....	شکل ۱-۱.....
۳.....	شکل ۲-۱.....
۴.....	شکل ۳-۱.....
۱۰.....	شکل ۴-۱.....
۱۱.....	شکل ۵-۱.....
۱۶.....	شکل ۶-۱.....
۱۷.....	شکل ۷-۱.....
۱۸.....	شکل ۸-۱.....
۱۸.....	شکل ۹-۱.....
۲۰.....	شکل ۱۰-۱.....
۲۲.....	شکل ۱۱-۱.....
۲۲.....	شکل ۱۲-۱.....

## فصل دوم

## فصل سوم

۵۱.....	شکل ۱-۳.....
۵۲.....	شکل ۲-۳.....
۵۳.....	شکل ۳-۳.....
۵۳.....	شکل ۴-۳.....
۵۴.....	شکل ۵-۳.....
۵۴.....	شکل ۶-۳.....
۵۵.....	شکل ۷-۳.....
۵۶.....	شکل ۸-۳.....
۵۷.....	شکل ۹-۳.....

# فصل اول

## بررسی منابع

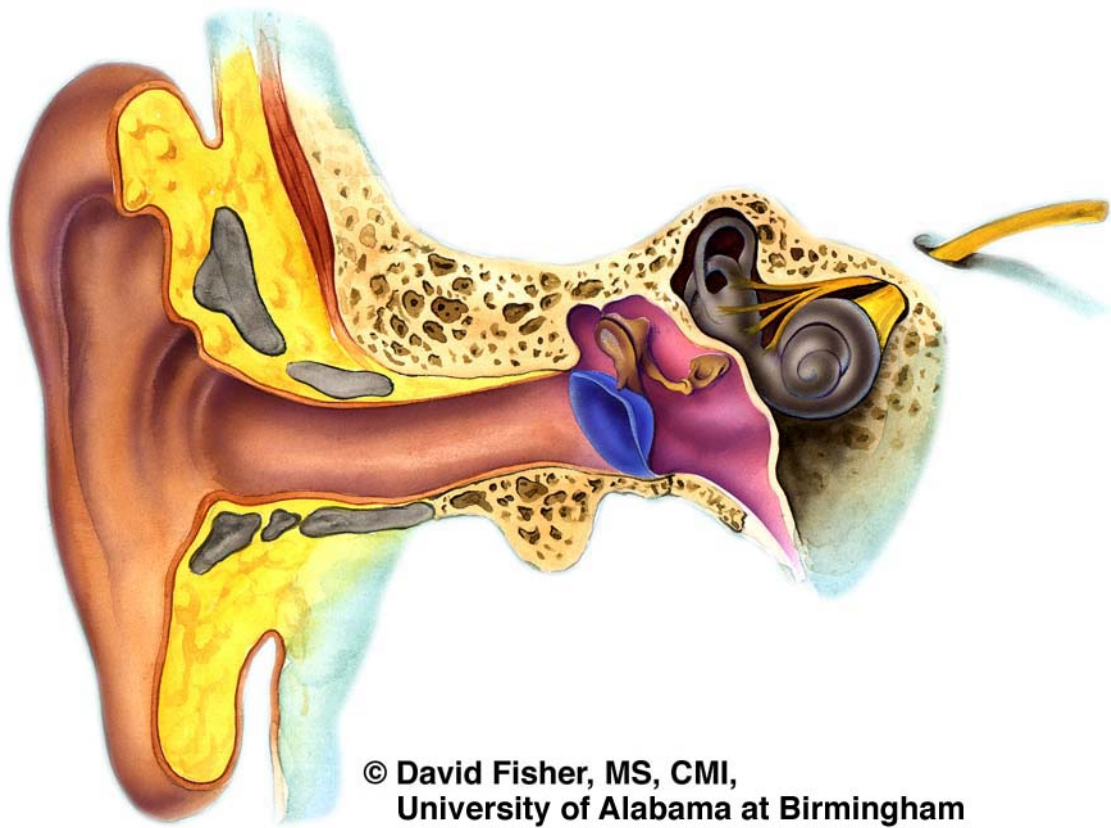
## ۱-۱ ناشنوایی

کاهش شنوایی یا ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی در انسان است که تقریباً از هر ۱۰۰۰ تولد یک تولد درجاتی از ناشنوایی از شدید تا عمیق را نشان می‌دهد (۱،۲). در جمعیت نرمال درجاتی از ناشنوایی در ۴٪ افراد جوان تر از ۴۵ سال و در ۱۰٪ افراد ۶۵ سال به بالا دیده می‌شود (۳). البته در برخی گزارشات این میزان شیوع ۱ در هر ۶۵۰ تولد نیز ذکر شده است (۴). لازم به ذکر است که ۱ کودک پیش از رسیدن به سن بلوغ نیز ناشنوا می‌گردد (۱).

ناشنوایی و به طور کلی اختلالات شنوایی را می‌توان به دو دسته ی جامع تقسیم بندی کرد: ۱. اختلالات Prelingual و ۲. اختلالات Poslingual. دسته اول نقص های شنوایی هستند که قبل از یادگیری گفتار رخ می‌دهند و دسته دوم نقص های بعد از یادگیری گفتار را در بر می‌گیرد (۱).

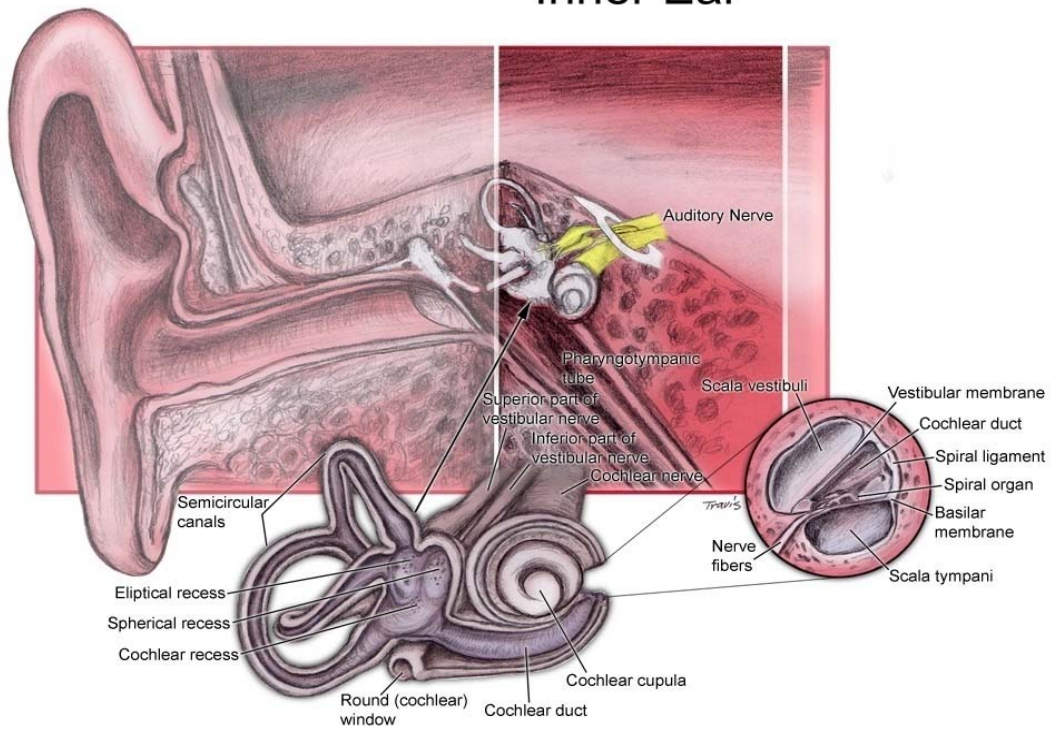
از نقطه نظر فیزیولوژی گوش می‌توان ناشنوایی را به دو گروه کاملاً متمایز تفکیک کرد: ۱. نقص های شنوایی هدایتی (انتقالی) و ۲. نقص های شنوایی حسی-عصبی. در نقص شنوایی هدایتی (انتقالی) گوش داخلی سالم بوده ولی به دلیل وجود ناهنجاری هایی در گوش میانی و داخلی انتقال امواج صوتی با اشکال رو به رو شده و در نتیجه فرد قادر به درک صداها نمی‌باشد (۱، ۵، ۶) (شکل ۱-۱).

در نقص شنوایی حسی - عصبی ایرادات کمی بغرنج تر است بدین قرار که در این گونه موارد سه حالت محتمل است: اول، نقص در گوش داخلی (حلزون شنوایی) دوم، نقص در عصب شنوایی (عصب هشتم مغزی) که ایمپالس های شنوایی را به مراکز پردازشی مغز انتقال می‌دهد و سوم نقص در مسیرهای شنوایی و انتقالی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) (شکل های ۱-۲ و ۱-۳). بایستی توجه داشت که نقص در حلزون شنوایی و یا عصب شنوایی منجر به ناشنوایی دائمی شده در حالی که در نقص شنوایی هدایتی، این مشکل را می‌توان با هدایت امواج از طریق استخوان های جمجمه به میزان زیادی مرتفع نمود (۵ و ۶).



شکل ۱-۱. شکل شماتیک گوش ( گوش خارجی، میانی و داخلی)

## Inner Ear

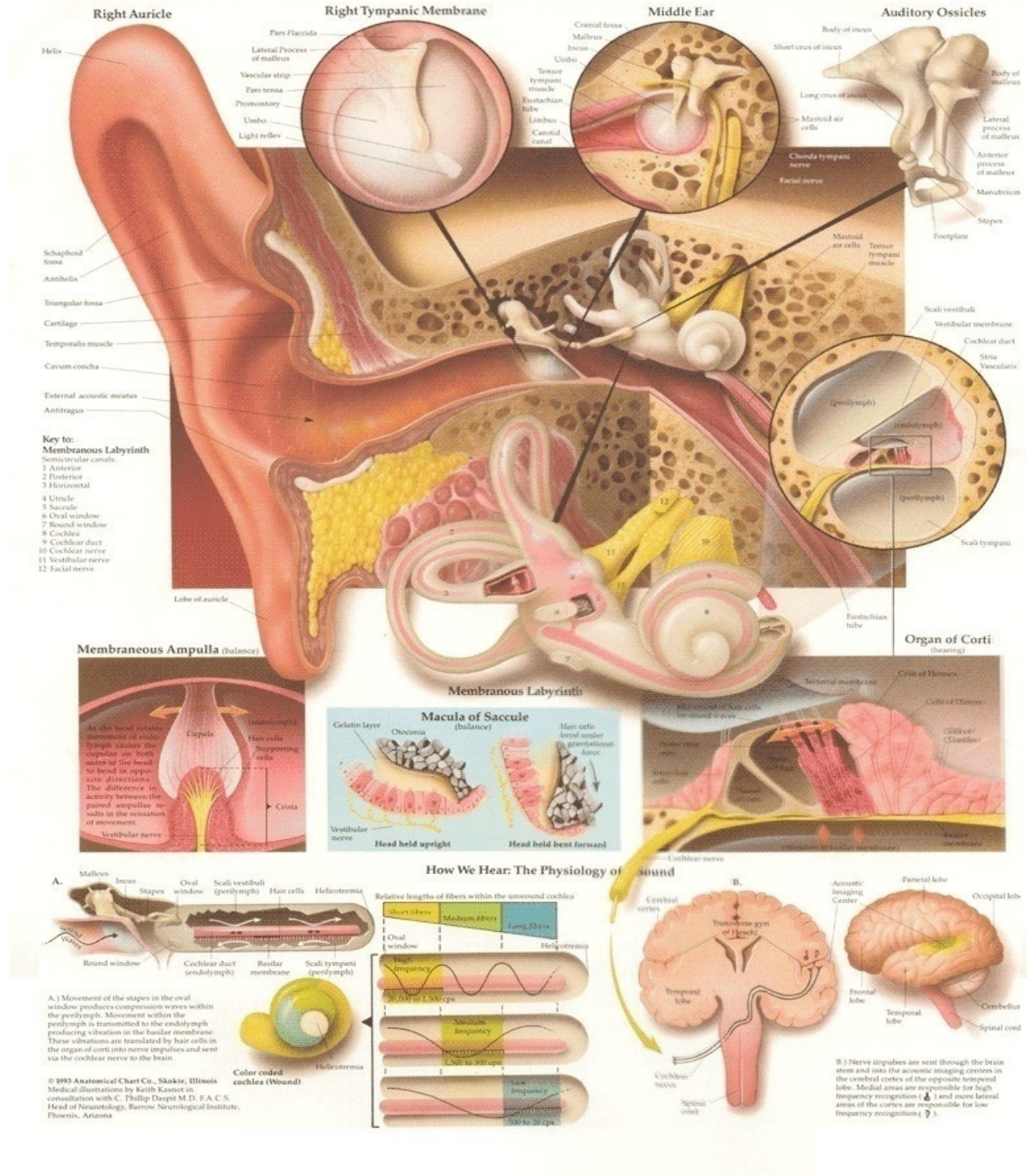


شکل ۱-۲. گوش داخلی و بخش های مداخله گر در تبدیل موج مکانیکی به ایمپالس عصبی.

از طرف دیگر می توان اختلال ناشنوایی را با در نظر گرفتن علل متنوع رخداد آن به دو دسته ی کلی عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی تقسیم بندی نمود که ناشنوایی هایی از نوع حسی - عصبی، دارای منشا ژنتیکی هستند (۷).



# THE EAR—ORGANS OF HEARING AND BALANCE



شکل ۱-۳. ساختمان کامل گوش با جزئیات

### ۱-۱-۱ میزان ناشنوایی

میزان ناشنوایی براساس میزان یا شدت صوت قابل شنیدن توسط فرد اندازه گیری می گردد که این شدت صوتی بر اساس واحد "دسی بل" بیان می شود. در شنوایی طبیعی این میزان در حد آستانه ی ۱۵ دسی بل است. در نتیجه بر این اساس ناشنوایی به چهار درجه به قرار ذیل تقسیم می شود :

گروه اول : در این گروه آستانه شنوایی ۲۰-۳۹ دسی بل بوده و ناشنوایی از نوع خفیف می باشد. توجه شود که آستانه شنوایی خفیف در کودکان ۱۵-۳۹ دسی بل می باشد.

گروه دوم : در این گروه آستانه شنوایی ۴۰-۶۹ دسی بل بوده و ناشنوایی از نوع متوسط می باشد.

گروه سوم : آستانه شنوایی در این گروه ۷۰-۸۹ دسی بل است و ناشنوایی نوع شدید خوانده می شود.

و گروه چهارم : در این گروه آستانه شنوایی ۹۰ دسی بل و بالاتر است که این نوع ناشنوایی، ناشنوایی عمیق گفته می شود (۱، ۸۵ و).

### ۲-۱-۱ زمینه های بروز ناشنوایی

زمینه های بروز ناشنوایی را می توان به دو دسته عوامل ژنتیکی و عوامل محیطی دسته بندی نمود، که به ناشنوایی های ایجاد شده در اثر عوامل محیطی "ناشنوایی اکتسابی" اطلاق می شود (۷۱).

ذکر این نکته ضروری می نماید که بایستی بین مواردی چند تفکیک قائل شد. اول اینکه نقص ناشنوایی مادرزادی با نقص شنوایی ژنتیکی متفاوت است چرا که ممکن است به دلایل عوامل درون رحمی مثل عفونت و دیگر بیماری های مادر، جنین دچار نقص شنوایی شود. به طور کلی واژه ناشنوایی مادرزادی یعنی ناشنوایی که قبل از تولد و یا در زمان تولد وجود داشته باشد. همچنین ناشنوایی هایی که در سنین مختلفی بروز پیدا می کنند لزوماً تحت تاثیر عوامل محیطی نیستند و محتمل است که در اثر عوامل ژنتیکی و به طور اخص ژن هایی متعددی که در مراحل مختلفی از زندگی بروز پیدا می کنند، ایجاد شده باشند (۹).

### ۱-۲-۱-۱ ناشنوایی اکتسابی

نقص شنوایی اکتسابی می توان دلایل متعددی داشته باشد که از این جمع می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- نقص های شنوایی مادرزادی پدید آمده در اثر آسیب های وارد شده به جنین به هنگام بارداری یا تولد
- نقص های شنوایی مادرزادی که در اثر بیماری ها یا مسمومیت های مادر عارض می-شود. از این جمله می توان به عفونت های ناشی از Herpes simplex virus ، Cytomegalo virus ، ، Toxoplasmosis ، Rubella و باکتری سیفلیس اشاره نمود (۸،۱ و ۱۰).

- ناشنوایی های ناشی از تروما
- ناشنوایی های ناشی از مسمومیت های دارویی مانند آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی
- اختلالات ناشی از کم کاری غده تیروئید
- ناشنوایی های شغلی
- پیرگوشی
- ناشنوایی های ناشی از فرآیند های خودایمنی

### ۱-۲-۱-۲ ناشنوایی ارثی

نقص های شنوایی ژنتیکی حدود نیمی از موارد ناشنوایی را به خود اختصاص می دهد. حتی در کودکانی که تنها فرد ناشنوا در خانواده های خود هستند ممکن است علت ناشنوایی آن ها ژنتیک یا توارث باشد (۷و). علل ایجاد ناشنوایی ژنتیکی را می توان در دو گروه کاملا مجزا مورد بررسی قرار داد:

- ناشنوایی در اثر جهش در ژنوم هسته ای
- ناشنوایی در اثر جهش در ژنوم میتوکندریایی

از نظر علائم کلینیکی بیماران مبتلا به ناشنوایی با منشا ژنتیکی را می‌توان به دو دسته کلی ناشنوایی سندرمی و ناشنوایی غیرسندرمی تقسیم بندی نمود.

## ۱-۲ اختلالات شنوایی سندرمی

منظور از ناشنوایی سندرمی همراه بودن ناشنوایی با نقص های ظاهری دیگر در چهره یا اندام و یا نقص عملکرد یک عضو دیگر با علت ژنتیکی می‌باشد (۵و۱).

در حدود ۳۰ درصد ناشنوایی ها از نوع سندرمی می‌باشد. ارتباط بیش از ۴۰۰ نوع سندرم با این نوع ناشنوایی نیز گزارش شده است. همانگونه که از نام ناشنوایی سندرمی پیداست در این شکل از بیماری عوارض کلینیکی و ناهنجاری ها و اختلالات فنوتیپی دیگری نیز مشاهده می‌شود. این نوع ناشنوایی انواع الگوهای وراثت را از خود نشان می‌دهد. همچنین این نوع از ناشنوایی به صورت prelingual مشاهده می‌گردد. از طرفی گزارشات حاکی از این است که با افزایش سن فرد ناشنوا درصد شیوع نوع سندرمی افزایش می‌یابد (۸،۱ و ۱۱).

از انواع ناشنوایی های سندرمی می‌توان به سندرم های BOR 2، BOR 1، Aport's، Fanconi Pancytopenia، Townes Brocks اشاره کرد. در این میان سندرم هایی مانند Ectodermal dysplasia و Keratitis-Ichthyosis (دراثر جهش در N14Y ژن کانکسین ۲۶) با درصد بالای از تظاهرات کلینیکی از جمله نواقص سیستم عصبی، بیماری های قلبی و بیماری های پوستی همراه هستند (۱۲).

## ۱-۳ اختلالات شنوایی غیر سندرمی

در حدود ۷۰ درصد از موارد ناشنوایی ژنتیکی، ناشنوایی از نوع غیرسندرمی است. در این نوع از ناشنوایی فرد از سلامت کامل برخوردار است (۱، ۱۳ و ۱۴). گوش خارجی این افراد سالم است و در گوش داخلی نیز تفاوت خاصی مشاهده نمی‌شود. این نوزادان در مسیر رشد و تکامل از کودکان هم سن خود عقب نیستن، یعنی به موقع می‌نشینند، به موقع راه می‌روند. بنابراین این دسته از