بسم الله الرحمن الرحيم

٢٠٣٤٤٩ - ١٥٩.١٠٥

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی - ژنتیک

تعیین فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی مارکرهای ژن *GJB2* در ایران

استاد راهنما:

دکتر صادق ولیان بروجنی

پژوهشگر:

حلیمه رضائی

مهرماه ۱۳۸۹

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران
IRANDOC
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

۱۵۹۰۱۰

۱۳۹۰/۳/۱۸

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی ژنتیک خانم حلیمه رضائی

تحت عنوان

تعیین فراوانی آللی و هتروزیگوسیتی مارکرهای ژن *GJB2* در جمعیت ایران

در تاریخ ۸۹/۷/۲۱ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی.. به تصویب نهایی رسید.

۱. استاد راهنمای پایان‌نامه دکتر صادق ولیان بروجنی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضاء

۲. استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

۳. استاد داور خارج گروه دکتر مرتضی هاشم‌زاده چالشتری با مرتبه‌ی علمی استاد امضاء

امضای مدیر گروه

سپاس و تشکر خداوندی را که به من شور و شوق گام نهادن
در مسیر فراگیری دانش را عطا فرمود و مرا در تمام مراحل تحصیل یاری کرد

از استاد گرانمایه و ارجمند جناب آقای دکتر ولیان
که راهنمایی های خالصانه و دلسوزانه خویش را از اینجانب دریغ نکردند
و همچنین سایر اساتید محترم گروه ژنتیک به خاطر زحماتی که در طول مدت تحصیل برای من کشیدند
و دوستان عزیز که همیشه مشوّق و مایه دلگرمی‌ام بوده اند، سپاس و تشکر فراوان دارم.

تقدیم به پدر و مادر مهربانم که وسعت افق‌های پیش رویم

از نگاه‌های بلندشان روشن می‌شود

و خواهر و برادر عزیزم به پاس همراهی و دلگرمیشان.

چکیده

یکی از شایع‌ترین نقص‌ها در هنگام تولد، ناشنوایی است که تقریبا ۱ در ۱۰۰۰ تولدهای زنده را به خود اختصاص می‌دهد. از ۵۰٪ آسیب شنوایی ارثی، حدود ۷۰ درصد غیرسندرومیک می‌باشد. یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین ژن‌های دخیل در این نقص، ژن *GJB2* می‌باشد. *GJB2* رمز کننده پروتئین کانکسین ۲۶ واقع در کروموزوم ۱۲-۱۱ q ۱۳ است. این ژن واجد ۲۲۶۳ نوکلئوتید بوده که از دو اگزون و یک اینترون تشکیل شده است. اگزون ۲ با طول ۶۸۱ جفت باز تنها ناحیه رمز کننده این ژن می‌باشد. مارکرهای ژنتیکی بسیاری در داخل و خارج ژن مزبور دیده شده که فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی متفاوتی در جمعیت‌های گوناگون دارند. از بین مارکرهای شناخته شده سه مارکر *Ban*I, D13S141, D13S175 در این مطالعه انتخاب شدند.

پس از استخراج DNA ژنومی ازخون، ژنوتیپ ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند ایرانی با استفاده از PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳٪ (*Ban*I) و پلی آکریل آمید ۱۰٪ (D13S141 و D13S175) تعیین شد. فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی با استفاده از پایگاه GENEPOP و تعیین بلوک هاپلوتیپی با نرم‌افزار PHASE تخمین زده شد. همچنین عدم تعادل پیوستگی برای ۱۰۰ فرد مورد مطالعه با برنامه کامپیوتری 2LD انجام شد.

فراوانی برای مارکر D13S141 ، چهار آلل ۱۱۳، ۱۲۳، ۱۲۵ و ۱۲۷ جفت باز با تکرارهای دو نوکلئوتیدی ۸، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ در جمعیت ایرانی دیده شده است. آلل ۱۲۳ جفت باز با ۱۳ تکرار بیشترین فراوانی (۰/۵۵۰) و آلل ۱۱۳ جفت باز با ۸ تکرار کمترین فراوانی (۰/۰۴۰) را دارند. برای مارکر D13S175، تنها ۷ آلل در جمعیت ایرانی مشاهده شد. آلل ۳ با فراوانی ۰/۴۸ و آلل ۶ با فراوانی ۰/۰۱۰ بیشترین و کمترین فراوانی را در این مطالعه داشتند. فراوانی آللی مارکر *Ban*I درجمعیت ایرانی بصورت ۰/۸۴ برای ژنوتیپ -/- و ۰/۱۶ برای ژنوتیپ +/+ مشاهده شدند. درصد هتروزیگوسیتی سه مارکر فوق بررسی شد که مارکرهای D13S141 و D13S175 نسبت به *Ban*I دارای فراوانی بالاتری بودند. چهار بلوک هاپلوتیپی با فراوانی بیش از ۵٪ در جمعیت ایرانی مشاهده شد. تخمین مقدار χ^2 و D′ نشان دهنده پیوستگی نامتعادل و کاهش نوترکیبی در جفت مارکر D13S141-D13S175 می‌باشد. بنابراین این دو مارکر از لحاظ فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی، عدم تعادل پیوستگی و کاهش نوترکیبی، می‌توانند به عنوان مارکرهای مناسب در تشخیص پیش از تولد و حاملین ناشنوایی در جمعیت ایرانی پیشنهاد شوند.

کلمات کلیدی:

ناشنوایی، *GJB2*، بلوک هاپلوتیپی، فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی، جمعیت ایرانی، مارکر های D13S141، D13S175 و *Ban*I

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- ساختمان گوش ---- ۳
۱-۱-۱- گوش خارجی ---- ۳
۱-۱-۲- گوش میانی ---- ۳
۱-۱-۲-۱- استخوان چکشی ---- ۴
۱-۱-۲-۲- استخوان سندانی ---- ۵
۱-۱-۲-۳- استخوان رکابی ---- ۵
۱-۱-۳- گوش داخلی ---- ۶
۱-۱-۳-۱- حلزون ---- ۷
۱-۱-۳-۲- اندام کورتی ---- ۷
۱-۱-۳-۳- سلول‌های مویی ---- ۸
۱-۱-۳-۴- مجاری نیم‌دایره ---- ۹
۱-۱-۳-۵- اوتریکول و ساکول ---- ۹
۱-۲- شنوایی ---- ۱۰
۱-۲-۱- امواج صوتی ---- ۱۰
۱-۲-۲- آستانه شنوایی ---- ۱۱
۱-۲-۳- مکانیسم شنوایی ---- ۱۱
۱-۳- بیماری‌های گوش ---- ۱۲
۱-۳-۱- اختلالات مادرزادی گوش ---- ۱۲
۱-۳-۲- عفونت‌ها و التهابات گوش ---- ۱۲
۱-۴- ناشنوایی و انواع آن ---- ۱۲
۱-۴-۱- کاهش شنوایی بر حسب محل ضایعه ---- ۱۳

عنوان | صفحه

۱-۴-۱-۱-کاهش شنوایی انتقالی ---- ۱۳
۱-۴-۱- ۲-کاهش شنوایی حسی _ عصبی ---- ۱۳
۱-۴-۱- ۳-کاهش شنوایی مختلط ---- ۱۳
۱-۴-۲- کاهش شنوایی ارثی ---- ۱۳
۱-۴-۲-۱- کاهش شنوایی سندرومیک ---- ۱۴
۱-۴-۲-۲- کاهش شنوایی غیرسندرومیک ---- ۱۴
۱-۵- ژن رمز کننده کانکسین ۲۶(*GJB2*) ---- ۱۵
۱-۶- کانکسین ۲۶ ---- ۱۶
۱-۷- روش‌های مطالعه بیماری‌های ژنتیک ---- ۱۸
۱-۷-۱- هاپلوتیپ ---- ۱۸
۱-۷-۲- نمونه‌گیری برای تعیین هاپلوتیپ ---- ۱۸
۱-۷-۳- کاربردهای هاپلوتیپ ---- ۱۹
۱-۷-۴- اصطلاحات مورد استفاده در تعیین هاپلوتیپ ---- ۱۹
۱-۷-۵- فاکتورهای موثر در تخمین هاپلوتیپ ---- ۱۹
۱-۸- روش‌های تعیین هاپلوتیپ ---- ۲۱
۱-۹- روش‌های آماری تعیین هاپلوتیپ در جمعیت ---- ۲۱
۱-۱۰- مقایسه دقت الگوریتم‌ها در تخمین هاپلوتیپ ---- ۲۷
۱-۱۱- عدم تعادل پیوستگی ---- ۲۷
۱-۱۲- بلوک هاپلوتیپ ---- ۲۸
۱-۱۳- اهداف پایان نامه ---- ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده ---- ۳۱
۲-۲- مواد مورد نیاز در استخراج DNA ژنومی از خون ---- ۳۲
۲-۳- روش تهیه اتیلن دی آمینو تترا استیک اسید (EDTA) (۰/۵ مولار ---- ۳۴

عنوان | صفحه

۲-۴- روش ساخت محلول Tris–HCl (۰/۵ مولار ---------- ۳۴
۲-۵- محلول تریس اتیلن دی آمین ترا استیک (TE) ---------- ۳۴
۲-۶- روش استخراج DNA ژنومی از سلول‌های خون ---------- ۳۵
۲-۷- بررسی خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده ---------- ۳۶
۲-۷-۱- ارزیابی کیفی DNA استخراج شده ---------- ۳۶
۲-۷-۲- ارزیابی کمی DNA استخراج شده ---------- ۳۶
۲-۸- جداسازی و تکثیر قطعه مورد نظر از DNA ژنومی استخراج شده ---------- ۳۶
۲-۸-۱- تکنیک PCR ---------- ۳۷
۲-۸-۲- اصول انجام تکنیک PCR ---------- ۳۸
۲-۸-۳- غلظت یون منیزیم (Mg^{+2}) ---------- ۳۸
۲-۸-۴- داکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs) ---------- ۳۹
۲-۸-۵- غلظت پرایمرها ---------- ۳۹
۲-۸-۶- دمای ذوب(TM) ---------- ۳۹
۲-۸-۷- بهینه سازی PCR برای دمای اتصال پرایمرها ---------- ۴۰
۲-۸-۸- آنزیم DNA Polymerase ---------- ۴۰
۲-۸-۹- تعداد چرخه‌های تکثیر ---------- ۴۰
۲-۹- روش انجام واکنش PCR ---------- ۴۱
۲-۹-۱- شرایط استاندارد برای یک واکنشPCR ---------- ۴۱
۲-۹-۲- روش انجام تکنیک PCR ---------- ۴۳
۲-۱۰- ژل الکتروفورز (Gel Electrophoresis) ---------- ۴۵
۲-۱۱- ژل آگارز ---------- ۴۵
۲-۱۱-۱- عوامل موثر بر حرکت DNA در ژل‌های آگارز ---------- ۴۶
۲-۱۱-۱-۱-اندازه مولکول DNA ---------- ۴۶
۲-۱۱-۱-۲- غلظت آگارز ---------- ۴۶
۲-۱۱-۱-۳-شکل فضایی DNA ---------- ۴۷

عنوان | صفحه

۲-۱۱-۱-۴-حضور اتیدیوم برماید در ژل و باند الکتروفورز ---- ۴۷
۲-۱۱-۱-۵-ولتاژ مورد استفاده ---- ۴۷
۲-۱۱-۱-۶-نوع آگارز ---- ۴۷
۲-۱۱-۱-۷-باند الکتروفورز ---- ۴۷
۲-۱۱-۲- مواد و وسایل لازم برای انجام الکتروفورز افقی با ژل آگارز ---- ۴۸
۲-۱۲- روش الکتروفورز ---- ۴۹
۲-۱۲-۱- آشکارسازی قطعه DNA تکثیر یافته ---- ۵۰
۲-۱۳- الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ---- ۵۰
۲-۱۳-۱- انواع ژل‌های پلی آکریل آمید معمول در آزمایشگاه ---- ۵۰
۲-۱۳-۲- پلیمریزه شدن ژل پلی آکریل آمید ---- ۵۰
۲-۱۳-۳- مواد مورد نیاز برای انجام الکتروفورز عمودی توسط ژل پلی آکریل آمید ---- ۵۱
۲-۱۴- روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ---- ۵۱
۲-۱۵- رنگ‌آمیزی ژل پلی آکریل آمید به روش نیترات نقره ---- ۵۲
۲-۱۵-۱- محلول‌های مورد نیاز ---- ۵۲
۲-۱۵-۲- مراحل رنگ‌آمیزی ---- ۵۳
۲-۱۶- مارکرهای DNA و لزوم استفاده از آن‌ها ---- ۵۳
۲-۱۷- استخراج DNA از ژل آگارز به کمک کیت استخراج DNA شرکت Fermentase ---- ۵۴
۲-۱۷-۱- روش کار ---- ۵۵
۲-۱۸- تکنیک PCR-RFLP ---- ۵۶
۲-۱۸-۱- مواد مورد نیاز برای هضم آنزیمی ---- ۵۶
۲-۱۸-۱-۱- آنزیم‌های محدودالاثر ---- ۵۶
۲-۱۸-۱-۲- آنزیم *BanI* ---- ۵۷
۲-۱۹- روش انجام تکنیک PCR-RFLP یا هضم آنزیمی محصولات PCR ---- ۵۷
۲-۲۰- آنالیز آماری ---- ۵۸
۲-۲۰-۱- محاسبه فراوانی آللی با استفاده از پایگاه GENEPOP ---- ۵۸

عنوان | صفحه

۲-۲۰-۲- تخمین آزمون $\chi 2$ برای مارکرهای *Ban*I, D13S141, D13S175 ---------- ۵۸
۲-۲۰-۳- مطالعات نرم‌افزاری اطلاعات ژنوتیپی برای تخمین فراوانی هاپلوتیپی و LD ---------- ۵۹
۲-۲۰-۳-۱- تخمین فراوانی هاپلوتیپ با استفاده از الگوریتم Bayesian ---------- ۵۹
۲-۲۰-۳-۲- تخمین مقدار LD بین دو پلی مورفیسم ---------- ۶۰
۲-۲۰-۳-۳- تخمین مقدار LD با استفاده از برنامه 2LD ---------- ۶۱

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- استخراج DNA ژنومی ---------- ۶۲
۳-۲ تعیین دقیق محل قرارگیری پرایمرهای مربوط به تکثیر مارکرهای *Ban*I, D13S141, D13S175 در ژن *GJB2* ---------- ۶۳
۳-۳- تکثیر توالی‌های تکراری از DNAهای استخراج شده به کمک PCR ---------- ۶۴
۳-۳-۱- تنظیم کردن دمای اتصال پرایمر و تعیین غلظت مناسب MgCl2 برای مارکر D13S141 ---------- ۶۴
۳-۳-۲- تنظیم کردن دمای اتصال پرایمر و تعیین غلظت مناسب MgCl2 برای مارکر D13S175 ---------- ۶۶
۳-۳-۳- اندازه‌گیری تعداد تکرارهای CA و GT محصولات PCR دو مارکر D13S141 و D13S175 بر روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ ---------- ۶۷
۳-۳-۴- انتخاب آلل مناسب دو مارکر D13S141 و D13S175 به عنوان مارکر آللی از بین آلل‌های افراد مورد بررسی ---------- ۶۷
۳-۳-۵- نتایج حاصل از تعیین توالی مارکرهای D13S141 و D13S175 ---------- ۷۰
۳-۴- PCR با پرایمر مربوط به تکثیر مارکر *Ban*I ---------- ۷۲
۳-۴-۱- هضم آنزیمی محصولات PCR با پرایمر اختصاصی تکثیر مارکر *Ban*I ---------- ۷۳
۳-۵- تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر D13S141 در ناحیه ژن *GJB2* ---------- ۷۴
۳-۶- تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر D13S175 در ناحیه ژن *GJB2* ---------- ۷۶
۳-۷- تخمین فراوانی آللی و درصد هتروزیگوسیتی مارکر *Ban*I در ژن *GJB2* ---------- ۷۸
۳-۸- تخمین فراوانی هاپلوتیپ در ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند با استفاده از الگوریتم Bayesian در نرم‌افزار PHASE ---------- ۸۰

عنوان | صفحه

۳-۹- تخمین مقدار D' و $\chi 2$ با استفاده از نرم‌افزار 2LD ---- ۸۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- بررسی فراوانی آللی مارکرهای D13S175, D13S141, *Ban*I در ایران، مقایسه با جمعیت‌ها ---- ۸۵

۴-۱-۱- مارکر D13S141 ---- ۸۵

۴-۱-۲- مارکر D13S175 ---- ۸۷

۴-۱-۳- مارکر *Ban*I ---- ۸۹

۴-۲- بررسی هاپلوتیپ‌های گویا در جمعیت ایران ---- ۹۰

۴-۳- بررسی مقدار LD ---- ۹۰

۴-۴- نتیجه‌گیری نهایی ---- ۹۱

۴-۵- پیشنهاداتی برای مطالعات آینده ---- ۹۲

منابع و مآخذ ---- ۹۳

فهرست شکل‌ها

عنوان — صفحه

شکل ۱-۱- پرده صماخ و استخوانچه‌های شنوایی (چکشی، سندانی و رکابی) ---- ۶
شکل ۱-۲- کانال‌های دهلیزی، حلزون و مجاری نیم دایره‌ای ---- ۶
شکل ۱-۳- سلول مویی خارجی با آرایش استریوسیلیوم متصل شده به رابطهای رأسی ---- ۹
شکل ۱-۴- عوامل ناشنوایی قبل از زبان باز کردن ---- ۱۴
شکل۱-۵- مارکرهای ژنتیکی استفاده شده در این مطالعه ---- ۱۵
شکل ۱-۶- ساختار پروتئین کانکسین ۲۶ ---- ۱۶
شکل ۱-۷-ساختار کانکسون و کانال اتصال باز ---- ۱۷
شکل ۱-۸- استنباط هاپلوتیپ از طریق الگوریتم Clark ---- ۲۲
شکل ۱-۹- فیلوژنی کامل و ناقص ---- ۲۶
شکل ۳-۱- DNA استخراج شده ژنومی ---- ۶۳
شکل ۳-۲- محل قرارگیری پرایمر مربوط به تکثیر مارکر D13S141 در ناحیه ژن *GJB2* ---- ۶۳
شکل ۳-۳- محل قرارگیری پرایمر مربوط به تکثیر مارکر D13S175 در ناحیه ژن *GJB2* ---- ۶۴
شکل ۳-۴- گرادیان دمایی مارکر D13S141 ---- ۶۴
شکل ۳-۵- تعیین غلظت مناسب MgCl2 جهت تکثیر مارکر D13S141 ---- ۶۵
شکل ۳-۶- DNA تکثیر یافته با شرایط بهینه ---- ۶۵
شکل ۳-۷- تعیین دمای اتصال مناسب پرایمرها برای مارکر D13S175 ---- ۶۶
شکل ۳-۸- تعیین غلظت مناسب MgCl2 جهت تکثیر مارکر D13S175 ---- ۶۷
شکل ۳-۹- بهینه‌سازی PCR مارکر D13S141 ---- ۶۹
شکل ۳-۱۰- بهینه سازی PCR مارکر D13S175 ---- ۶۹
شکل ۳-۱۱- تعیین توالی مارکر آللی نمونه هتروزیگوت شماره ۱ مارکر D13S141 ---- ۷۰
شکل ۳-۱۲- تعیین تعداد تکرارهای CA مارکر D13S141 ---- ۷۱
شکل ۳-۱۳- تعیین اندازه آللی مارکر D13S175 ---- ۷۲
شکل ۳-۱۴- تکثیر مارکر *BanI* ---- ۷۳
شکل ۳-۱۵- هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم *BanI* ---- ۷۴

عنوان صفحه

شکل ۳-۱۶- ماتریکس ژنوتیپ و تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار در مارکر D13S141 ---------- ۷۵
شکل ۳-۱۷- ماتریکس ژنوتیپ و تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظاردر مارکر D13S175 ---------- ۷۷
شکل ۳-۱۸- ماتریکس ژنوتیپ و تعداد افراد مشاهده شده و مورد انتظار در هر ژنوتیپ در مارکر *Ban*I --- ۷۹

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق ---------- ۳۱

جدول ۲-۲- مواد مورد نیاز در استخراج DNA ژنومی از خون ---------- ۳۲

جدول ۲-۳- ترکیبات بافر A ---------- ۳۳

جدول ۲-۴- ترکیبات بافرB ---------- ۳۳

جدول ۲-۵- توالی پرایمرهای Forward و Reverse برای تکثیر مارکرهای D13S175, *Ban*I, D13S141, ---------- ۳۷

جدول ۲-۶- ترکیبات مورد نیاز برای یک واکنش PCR در شرایط استاندارد ---------- ۴۱

جدول ۲-۷- مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (پس از بهینه سازی‌های متعدد) برای مارکر D13S141 ---------- ۴۲

جدول ۲-۸- مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (پس از بهینه سازی‌های متعدد) برای مارکر D13S175 ---------- ۴۲

جدول ۲-۹- مواد و مقدار مورد نیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (پس از بهینه سازی‌های متعدد) برای مارکر *Ban*I ---------- ۴۳

جدول ۲-۱۰- بهینه‌سازی دمای اتصال پرایمرهای مارکر D13S141 ---------- ۴۴

جدول ۲-۱۱- برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر D13S175 ---------- ۴۴

جدول ۲-۱۲- برنامه بهینه شده نهایی دستگاه ترموسایکلر برای مارکر *Ban*I ---------- ۴۴

جدول ۲-۱۳- غلظت‌های مختلف آگارز مورد استفاده در آنالیز اندازه‌های مختلف DNA ---------- ۴۶

جدول ۲-۱۴- مواد لازم جهت تهیه ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ ---------- ۵۱

جدول ۳-۱- فراوانی آللی مارکر D13S141 در ناحیه ژن *GJB2* ---------- ۷۵

جدول ۳-۲- درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر D13S141 ---------- ۷۶

جدول ۳-۳- فراوانی آللی مارکر D13S175 ---------- ۷۸

جدول ۳-۴- درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر D13S175 ---------- ۷۸

جدول ۳-۵- فراوانی آللی مارکر *Ban*I ---------- ۷۹

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۶- درصد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مارکر *Ban*I ---------- ۷۹
جدول ۳-۷- فراوانی هاپلوتیپ *Ban*I, D13S141, D13S175 در ۱۰۰ فرد غیرخویشاوند که با استفاده از نرم‌افزار PHASE محاسبه شده است ---------- ۸۱
جدول ۳-۸- مقدار D′ و $\chi 2$ محاسبه شده برای سه جفت مارکر *Ban*I - D13S141, *Ban*I -D13S175, D13S141- D13S175 در ژن *GJB2* ---------- ۸۲
جدول ۳-۹- مربع کای ---------- ۸۳
جدول ۴-۱- مقایسه توزیع فراوانی آلل‌های D13S141 در جمعیت ایران با سایر جمعیت‌های دنیا ------ ۸۶
جدول ۴-۲- توزیع فراوانی آلل‌های D13S175 در جمعیت ایران با اعداد قراردادی ۱ تا ۷ ---------- ۸۸
جدول ۴-۳- مقایسه توزیع فراوانی آلل‌های *Ban*I در جمعیت ایران با سایر جمعیت‌های دنیا ---------- ۸۹

فصل اول

مقدمه

کاهش جزئی یا کامل توانایی در فهم و تشخیص صداها، نقص یا فقدان شنوایی نام دارد که توسط دامنه وسیعی از فاکتورهای محیطی _ بیولوژیکی ایجاد می‌شود (۱). ناشنوایی مادرزادی اختلالی هتروژن است که حدود ۱ نفر از ۱۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۲). عوامل ژنتیکی ۵۰٪ موارد و عوامل اکتسابی ۵۰٪ باقیمانده را به خود اختصاص می‌دهند. اختلال در شنوایی می‌تواند همراه با نشانه و سایر علائم به عنوان بخشی از بیماری بروز کند (ناشنوایی سندرومیک) و یا بصورت تنها نشانه و بدون هیچ علائمی از سایر بیماری‌ها تظاهر یابد (ناشنوایی غیر سندرومیک). حدود ۷۰٪ از ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرومی بوده و دارای الگوی توارث اتوزومی مغلوب ۸۰ درصد، اتوزومی غالب ۱۵ درصد، وابسته به X ۳ درصد و میتوکندریایی حدوُد ۲ درصد می‌باشد (۳۳-۲۹). ژن‌های بسیاری در ناشنوایی دخالت دارند که مهم‌ترین آن‌ها ژن رمز کننده پروتئین کانکسین ۲۶ است. این ژن‌ها در عملکرد صحیح گوش و مکانیسم شنوایی نقش دارند.

ناشنوایی براساس میزان اختلال (خفیف، متوسط، شدید و عمیق)، سن شروع (قبل از زبان باز کردن و یا بعد از آن)، درگیری یک یا دو گوش (یکطرفه یا دو طرفه)، ارثی یا اکتسابی بودن و محل اختلال (انتقالی، حسی _ عصبی و مختلط) تقسیم می گردد (۲).

از بین تمام ژن‌های موثر در ناشنوایی غیرسندرومیک، ژن *GJB2*[1] رمزکننده پروتئین کانکسین ۲۶ عامل ناشنوایی، درصد بالایی را در تمامی جمعیت‌ها شامل می‌شود. *GJB2* که روی کروموزوم ۱۲-۱۱ q ۱۳ واقع

[1] - Gap Junction Beta 2

شده است، اولین ژن گزارش شده برای ناشنوایی اتوزومی مغلوب غیرسندرومیک می‌باشد. جهش‌های این ژن در جمعیت‌های مختلف عامل ناشنوایی است (۱۸، ۱۹ و ۲۲) برای مثال، جهش 35delG مسئول ۸۰ درصد از ناشنوایی‌های *GJB2* در اروپا و آمریکا می باشد. این جهش سبب تغییر چارچوب و ایجاد کدون ختم زودرس در موقعیت ۱۳ می‌شود، بنابراین تولید یک پلی پپتید ۱۲ اسید آمینه‌ای ناقص به جای پلی پپتید ۲۲۶ اسید آمینه‌ای نرمال را می‌کند. قابل توجه است که اگزون یک ژن *GJB2* در نزدیکی نواحی هایپرمتیله قرار گرفته فلذا کد کننده پروتئین نمی‌باشد (۱۰و۲۲-۲۶).

با توجه به وسعت و تنوع جهش‌های شناخته شده برای ژن *GJB2* در جمعیت‌های مختلف، امکان بررسی همه جهش‌ها در افراد ناقل یا مشکوک امکان پذیر نمی‌باشد و بسیار پرهزینه خواهد بود. با شناسائی مارکرهای ژن *GJB2*، در صورت بالا بودن میزان هتروزیگوسیتی آن‌ها می‌توان بدون تعیین نوع جهش ژن *GJB2*، تنها با تعیین نوع هاپلوتیپ فرد بیمار و والدینش، وضعیت آللی سایر فرزندان خانواده را مشخص کرد. در این تحقیق با بکارگیری سه مارکر (RFLP و دو STR)، میزان هتروزیگوسیتی آن‌ها را در جمعیت سالم ایرانی مورد بررسی قرار داده تا در صورت بالا بودن درجه هتروزیگوسیتی آن‌ها در جمعیت، هاپلوتیپ مارکری تعریف گردد.

با توجه به اهمیت ساختار شنوایی و ارتباط آن با وضعیت شنوایی و ژن‌های موثر در آن، ابتدا به بررسی مختصر سیستم شنوایی پرداخته می‌شود.

۱-۱ ساختمان گوش

سیستم شنوایی انسان از گوش خارجی، میانی و داخلی تشکیل شده است.

۱-۱-۱ گوش خارجی

گوش خارجی اولین بخش دستگاه شنوایی است که از لاله گوش و مجرای گوش خارجی تشکیل یافته است. غضروف، بافت ارتجاعی و پوست لاله گوش را تشکیل می‌دهند. لاله گوش در غالب حیوانات متحرک بوده و برای جمع کردن، هدایت امواج صوتی و تشخیص جهت صدا به کار می‌رود. در انسان لاله گوش بی حرکت بوده ولی تا اندازه‌ای جهت صوت را تشخیص می‌دهد. مجرای گوش خارجی دارای یک بخش غضروفی و یک بخش استخوانی است که داخل آن از پوست پوشیده شده و تا پرده صماخ ادامه دارد. درون این مجرا موم توسط غدد ترشح کننده چربی تولید می‌شود که مانع ورود ذرات گرد و غبار به گوش می‌گردد. طول متوسط مجرای گوش حدود ۲۵ میلی‌متر بوده که یک سوم خارجی آن از مو پوشیده و دو سوم داخلی آن از دیواره استخوانی تشکیل شده است ارتعاشات صوتی تا قسمت انتهایی مجرای گوش به وسیله هوا انتقال یافته و سپس توسط پرده صماخ و محیط‌های جامد و مایع به گوش میانی می‌رود (۱۱).

۱-۱-۲ گوش میانی

در داخل استخوان گیجگاهی سر، حفره‌ای پر از هوا وجود داشته که از طریق مجرای شنوایی (مجرای استاش)[1] به حلق و بینی راه دارد. این مجرا در موقع خوردن، جویدن و خمیازه کشیدن باز شده و یکسان شدن فشار هوا در دو طرف پرده صماخ را بدنبال دارد. در گوش میانی سه استخوانچه شنوایی چکشی[2]، سندانی[3] و رکابی[4] قرار دارند. این استخوان‌ها مانند یک زنجیر از گوش میانی شروع شده و تا پنجره بیضی[5] شکل گوش داخلی ادامه پیدا می‌کنند. به عبارتی استخوان چکشی به پرده صماخ و استخوان رکابی به پنجره بیضی ختم می‌شود که سطح آن چهار مرتبه از پرده صماخ کوچک‌تر است.

---

[1] - Auditory (Eustachian) tube
[2] - Malleus
[3] - Incus
[4] - Stapes
[5] - Oval