ORIGINAL ARTICLE

Investigating the Effects of Exposure to Continuous White Noise on SLC26A4 Gene Expression Levels in Male Rat Cochlea

Maryam Mirzaei Hotkani[1],
Kolsoum Inanloorahatloo[2],
Mohammad Reza Monazzam Esmaeilpoor[3],
Amir Abbasi Garmaroudi[4],
Monireh Khadem[5]

[1] MSc in Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] MSc Student in Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 9, 2021 ; Accepted April 12, 2021)

Abstract

Background and purpose: Irreversible damage to the inner ear is known as noise-induced hearing loss (NIHL). Exposure to excessive noise can affect the expression of genes in molecules involved in development of NIHL. *SLC26A4* gene or PDS is responsible for causing both syndromic and non-syndromic deafness and is located at DFNB site. The aim of this study was to investigate the expression level of this gene due to continuous white noise exposure.

Materials and methods: In this experimental study, 10 healthy male Wistar rats were divided into exposure group (n=6) and control group (n=4). Exposur group was exposed to continuous white noise (8hr/day, 6days, SPL=110±5dB) in noise chambers. Cochlear biopsy was done 1 hour (n=5) and 1 week (n=5) after exposure and then, RNA extraction, cDNA synthesis and Real-Time PCR analysis were done. In addition, histological analyzes were performed. Data analysis was done using One-Way ANOVA (95% CI diff.).

Results: At both 1 hour and 1 week after exposure, the expression of *SLC26A4* gene decreased significantly (P= 0.0005 and P= 0.0003, respectively). The fold changes compared to the control group (=1) were 0.0733 and 0.00712, respectively. Histological images illustrated serious damage to the cochlea.

Conclusion: Sensorineural deafness will happen if exposure to intense noise continues and subsequently down-regulation of *SLC26A4* in the cochlea occur during longer discontinuation and in case of expression level failure to return to its basal level.

Keywords: noise, gene expression, *SLC26A4* gene, cochlea, noise-induced hearing loss

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (198): 28-39 (Persian).

* **Corresponding Author: Monireh Khadem -** School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: khadem@sina.tums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 198 تیر سال 1400 (39-28)

بررسی اثرات ناشی از قرار گرفتن در معرض صدای سفید یکنواخت بر میزان بیان ژن SLC26A4 در حلزون گوش موش صحرایی نر

مریم میرزایی حتکنی[1]
کلثوم اینانلو راحتلو[2]
محمدرضا منظم اسماعیل پور[3]
امیر عباسی گرمارودی[4]
منیره خادم[5]

چکیده

سابقه و هدف: آسیب غیرقابل برگشت در گوش داخلی به NIHL شناخته می‌شود. مواجهه با صدای بیش از حد، می‌تواند بیان ژن‌های ملکول‌های درگیر در پیشرفت NIHL را تحت تاثیر قرار دهد. ژن *SLC26A4* یا همان PDS، مسئول ایجاد ناشنوایی سندرومیک و غیرسندرومیک است و بر روی جایگاه DFNB قرار دارد. هدف این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن مورد نظر در اثر تماس با صدای سفید یکنواخت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 10 سر رت نر ویستار سالم به گروه مواجهه (n=6) و گروه کنترل (n=4) تقسیم شدند. گروه مواجهه در اتاقک‌های صوتی بازآوا در تماس با صدای سفید یکنواخت 8hr/day, 6days, SPL= 110±5dB قرار گرفتند. نمونه‌گیری از حلزون گوش یک ساعت (n=5) و یک هفته (n=5) پس از قطع مواجهه انجام شد و سپس استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز Real-Time PCR صورت گرفتند. علاوه بر این آنالیزهای هیستولوژیک نیز انجام شد. نتایج با آزمون آماری One-Way ANOVA (فاصله اطمینان 95درصد) بررسی شدند.

یافته‌ها: در هر دو نقطه زمانی یک ساعت و یک هفته بعد از مواجهه، بیان ژن *SLC26A4* به‌طور معناداری کاهش یافت (*P-value* به ترتیب 0/0005 و 0/0003). Fold change در مقایسه با گروه نرمال (=1) به ترتیب 0/0733 و 0/00712 محاسبه شد. تصاویر هیستولوژیک آسیب‌های جدی به حلزون گوش را نشان دادند.

استنتاج: انتظار می‌رود در صورت مداومت مواجهه با صدای عمدی و متعاقبا کاهش بیان *SLC26A4* در حلزون گوش در قطع تماس‌های طولانی‌تر و عدم بازگشت آن به سطح پایه خود، منجر به بروز ناشنوایی حسی-عصبی شود.

واژه های کلیدی: سر و صدا، بیان ژن، ژن *SLC26A4*، حلزون گوش، NIHL

مقدمه

مواجهه طولانی مدت با صدا باعث آسیب غیرقابل برگشت به گوش داخلی می‌شود که به NIHL Noise Induced Hearing Loss معروف است(1). در سطح سلولی، قرار گرفتن در معرض سر و صدای

مولف مسئول: منیره خادم - تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت E-mail: khadem@sina.tums.ac.ir
1. کارشناس ارشد مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
2. استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
3. استاد، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
4. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
5. استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1399/10/20 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1399/11/6 تاریخ تصویب : 1400/1/23

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

بیش از حد باعث آسیب دائمی به ارگان کورتی شده که شامل تخریب سلول‌های خارجی مو (OHCs)، تخریب سلول‌های مویی استروسیلیا و گاهی سلول‌های داخلی مو (IHCs) می‌شود(2). ارگان کورتی عضوی از گوش داخلی است که در حلزون گوش قرار دارد و به شنوایی کمک می‌کند. این ارگان شامل سه ردیف سلول موئی خارجی و یک ردیف سلول داخلی است که وظیفه آن تبدیل انرژی مکانیکی به انرژی الکتریکی است و از طریق عصب شنوایی به سیستم عصبی مرکزی منتقل می‌شود تا شنوایی را تسهیل کند(3). افت شنوایی مادرزادی، شایع‌ترین اختلال حسی- عصبی است که تقریبا 1/1000-2000 کودک تازه متولد شده را درگیر می‌کند. تقریبا 70 درصد ناشنوایی‌های ژنتیکی، غیرسندرومیک هستند و بدون هیچ نقص یا سایر علائم بروز می‌کنند(7-4). نزدیک به 85 درصد این نوع از اختلالات، الگوی وراثتی جسمی مغلوب (DFNB)، 15-12 درصد موارد غیرسندرومیک، الگوی وراثتی جسمی غالب (DFNA)، و 3-1 درصد آنها الگوی وابسته به جنس (DFNX) را نشان می‌دهند(7-9). ویژگی‌های کاهش شنوایی غیرسندرومیک در انواع مختلف متفاوت است. کاهش شنوایی می‌تواند روی یک گوش (یک طرفه) یا هر دو گوش (دو طرفه) تأثیر بگذارد. درجات کاهش شنوایی از خفیف (دشواری در درک گفتار ملایم) تا عمیق (عدم توانایی شنیدن حتی صداهای بسیار بلند) است. اصطلاح "ناشنوایی" اغلب برای توصیف کم شنوایی شدید تا عمیق استفاده می‌شود. از دست دادن شنوایی ممکن است پایدار یا پیشرونده باشد و با افزایش سن فرد شدیدتر شود(10). پیشرفت‌های اخیر در فن آوری‌های با عملکرد بالا، تلاش برای نشان دادن تغییرات جهانی در بیان ژن‌های حلزون گوش را تسهیل می‌کند(11). بنابراین مواجهه با صدای بیش از حد، بیان ژن‌های ملکول‌هایی که به نظر می‌رسد در پیشرفت NIHL مهم هستند را در موش‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهد(2). مطالعات قبلی چندین ژن را در پاسخ حلزون به آسیب صوتی شناسایی کرده است، که در درجه اول با فرایندهای مختلف بیولوژیکی مانند کنترل رونویسی، استرس اکسیداتیو، مسیرهای مختلف مولکولی و التهاب همراه هستند(11). بنابراین خلا مطالعات قبلی، عدم توجه به ژن‌های دخیل در بروز ناشنوایی حسی- عصبی در حیوانات سالم در اثر مواجهه با عامل محرک محیطی مانند صدا بود.

جایگاه ژنی DFNB4 به عنوان دومین جایگاه شایع پس از DFNB1 در ایجاد ناشنوایی غیرسندرومیک ارثی در جهان و حتی در ایران می‌باشد. این جایگاه باعث ایجاد دو فرم ناشنوایی سندرومیک که یک بیماری اکتسابی اتوزومال است (سندروم پندرد یا PDS Syndrome) و غیرسندرومیک (افت شنوایی که بر سایر قسمت‌های بدن اثر نمی‌گذارد) می‌شود(12،9). سندروم پندرد نوعی اختلال است که معمولا با کم شنوایی و گواتر همراه است. این سندروم در اواخر کودکی و اوایل جوانی اتفاق می‌افتد و با کاهش شنوایی شدید تا عمیق ناشی از تغییر در گوش داخلی (افت شنوایی حسی- عصبی) در بدو تولد مشخص می‌شود اما تمایز بالینی بین ناشنوایی غیرسندرومیک و سندرم پندرد سخت است(13). ژن *SLC26A4* یا همان *PDS* که مسئول ایجاد ناشنوایی سندرومیک و غیرسندرومیک است، بر روی جایگاه DFNB و موقعیت 7q22.3 در کروموزوم 7 انسان و موقعیت 6q16 در کروموزوم 6 رت قرار دارد، در هر دو گونه دارای 23 اگزون، و مسئول کدگذاری پروتئین پندرین 780 آمینواسیدی است که دارای انتقال دهنده‌های سولفات می‌باشد و حاملین کلرید-یدید را رمزگذاری می‌کند. مکان‌های بیان پروتئین مذکور در غده تیروئید، گوش داخلی و کلیه‌ها است(9،14-16).

هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان بیان ژن موردنظر در اثر تماس با صدای سفید یکنواخت است تا بتواند نگرش‌های ارزشمندی را در رابطه با طراحی مداخلات محافظتی هدفمند در مورد پیشگیری از ابتلا به ناشنوایی حسی- عصبی غیرسندرومیک ارائه دهد. لازم به ذکر است که در این تحقیق به بررسی اثر صدا به عنوان

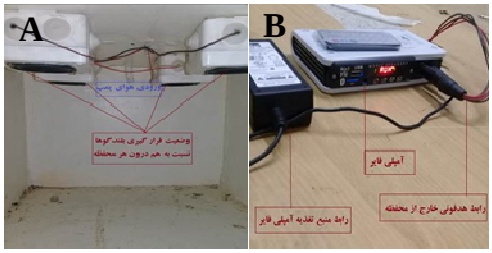
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

یک عامل محیطی بر بیان ژن *SLC26A4* در موش‌های سالم از نظر ژنتیکی پرداخته می‌شود و هیچ مطالعه مشابهی با این هدف بر روی ژن مذکور وجود ندارد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: 10 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که از نظر سیستم شنوایی سالم و بدون مشکل بودند، در سن 9-8 هفتگی، با میانگین وزنی 250-200 گرم در شروع مطالعه(17)، از حیوانخانه دانشکده فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شده و در اتاقک‌های استاندارد صوتی[1] در آزمایشگاه صدا گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای دانشکده بهداشت نگهداری شدند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: فضای داخلی محفظه های صوتی بازآوا (A) و فضای خارجی آن همراه با آمپلی فایر (B)

محل نگهداری جوندگان طبق پیشنهاد اتحادیه اروپا، درجه حرارت 24 ساعته ^{oC} 1 ± 20، رطوبت نسبی 10±55 درصد، روشنایی از طریق لامپ آزمایشگاهی، به‌طور غیرمستقیم و یکنواخت، تعداد دفعات تهویه 20-15 بار در ساعت (توسط سه پمپ محیطی) تنظیم گشت و حداقل ارتفاع و فضای کف مورد نیاز برای آن‌ها به ازای هر حیوان در نظر گرفته شد(18). چرخه 12 ساعت نور/ 12 ساعت تاریکی (7 صبح تا 7 عصر) برای حیوان‌ها ثابت شد و در تمام مدت دسترسی آزاد به آب و غذا (کنسانتره پلیت) داشتند(17). موش‌ها به‌طور تصادفی به 2 گروه (مورد-شاهد) تقسیم شدند. در گروه مورد، 3 موش به ازای هر محفظه صوتی (به دلیل کاهش همپوشانی در هنگام استرس صوتی) و همه‌ی موش‌های کنترل در یک محفظه آزادانه رها شدند. سپس به آن‌ها یک هفته فرصت داده شد تا با شرایط جدید سازگار شوند. تمام مراحل مربوط به استفاده و مداخله حیوانات طبق دستورالعمل کمیته تحقیقات و اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز کلیه اصول استفاده از حیوانات آزمایشگاهی طبق بیانیه هلسینکی رعایت شد. تمام تلاش‌ها برای به حداقل رساندن تعداد حیوانات و رنج آن‌ها صورت گرفت.

مواجهه: موش‌های کنترل، بدون تماس با صدا (n=4) در یک محفظه صوتی با صدای زمینه 50dB نگهداری شدند و گروه‌های در معرض (n=6) در دو اتاقک صوتی مجزا، (در هر کدام 3 موش) قرار گرفتند. پروتکل صوتی برای قرار گرفتن در معرض صدای سفید متناوب تا 6 روز متوالی (8 ساعت در روز) با مشخصات باند فرکانسی 70Hz تا 16kHz و SPL=115±5dB طراحی و توسط نرم‌افزار Cuebase ورژن 5 تولید و از طریق 4 بلندگو (هرکدام 20 وات و 6 اُهم) داخل هر محفظه و روی سقف در فاصله 40 سانتی‌متری بالاتر از موش‌ها پخش شد. سرانجام، هر چهار بلندگو از طریق یک درگاه هدفونی خارج از محفظه به تقویت‌کننده‌های 100 وات متصل شده و صدای خروجی تقویت گشت(تصویر شماره 1). این سطح صدا به این دلیل انتخاب شد که عمدتاً باعث کاهش شنوایی موقت در طیف فرکانسی گسترده و آسیب سلولی می‌شود، اما آنقدر قوی نیست که بتواند بلافاصله تعداد زیادی سلول حسی یا حمایتی را از بین ببرد. هدف جلوگیری از مرگ فوری و گسترده این سلول‌ها بود که به طور قابل توجهی جمعیت سلول‌های مورد استفاده برای به دست آوردن mRNA برای تجزیه و تحلیل را تغییر می‌دهند(20،19). تراز فشار صوت نویز تولید شده درون محفظه با استفاده از یک صدا سنج (TES 1358 Sound Analyzer, Taipei, Taiwan)، در

1. Chamber

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

سطوح مختلف کنترل وچک شد. اختلاف بین اندازه‌گیری‌ها در نقاط مختلف کم‌تر از 5 درصد بوده، بنابراین میدان صوتی درون محفظه همگن در نظر گرفته شد.

جمع‌آوری نمونه حلزون گوش

در پایان 6 روز، نیمی از نمونه‌ها (3 مورد، 2 شاهد) بلافاصله یک ساعت و نیم دیگر یک هفته پس از قطع مواجهه با رعایت اصول اخلاقی به‌وسیله گاز CO2 عمیقا بیهوش شده و پس از تقسیم جمجمه به دو بخش، به کمک عصب شنوایی (زوج 8) به عنوان راهنما، در زیرمیکروسکوپ لوپ، محل قرارگیری حلزون گوش در پشت استخوان پطروس پیدا شد. از هر گروه (کنترل، قطع تماس یک ساعته، قطع تماس یک هفته) یک گوش در فرمالدهید 4 درصد فیکس شده (در مجموع 3 نمونه) و برای آنالیز هیستولوژی به روش هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گشت. مابقی نمونه‌ها (مجموعا 17 عدد) در درمای 80- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش Real-Time PCR نگهداری شدند(21).

استخراج RNA (3 بار تکرار برای هر نمونه)

کلیه بافت‌ها به کمک روتار استاتور به‌طور کامل له و همسان گشتند. سپس به ازای هر 50 گرم بافت، 300µl محلول ترایزول (Kiagene, Iran) به منظور همگن‌سازی اضافه گردید. پس از ورتکس (Qiagene, Hilden, Germany) و قرار گرفتن در دمای محیط، 200-250µl کلروفرم سرد افزوده و محلول به شدت تکان داده شد. پس از جدا شدن فازهای محلول، به سانتریفیوژ (Hettich, Germany) با دمای ^{oC} 4 و با 12000rpm منتقل گشت. فاز شفاف روئی که حاوی RNA است به آرامی جدا شده و در میکروتیوب دیگری با 500µl ایزوپروپانول سرد مخلوط گشت و مجدد سانتریفیوژ شد. پس از جدا کردن ایزوپروپانول، رسوب با 250µl اتانول 80 درصد شستشو و مجدد سانتریفیوژ شد. پس از خشک و بی رنگ شدن آن، 10-30µl آب استریل DEPC به رسوب افزوده گشت و به مدت 15 دقیقه در دمای ^{oC} 55 در دستگاه Dry Block Incubator (Kiagene, Iran) قرار گرفت تا رسوب حل شود(21).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی[2] (3 بار تکرار برای هر نمونه)

به منظور تشخیص اثر صدا بر میزان بیان ژن *SLC26A4* در حلزون گوش‌های مواجهه یافته و نیافته با صدای سفید یکنواخت درسطح mRNA از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمّی در زمان واقعی توسط دستگاه ABI StepOne (USA) استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Easy cDNA Synthesis kit,Parstous, Iran طبق دستورالعمل انجام شد. محصولات Real-Time PCR طبق دستورالعمل کیت (2X Real-Time PCR Master Mix For SYBR® Green I high ROX, BioFACT™, Korea توسط Syber Green شناسایی شدند. به مخلوط فوق، به ازای هر نمونه 1µl پرایمر (پیشرو + پسرو) و 1µl cDNA افزوده گردید.

شرایط دمائی تکنیک PCR به صورت یک سیکل با دمای ^{oC} 95 به مدت 10 دقیقه (دناتوراسیون 1)، 40 سیکل در 3 گام به صورت: دمای ^{oC} 95، 15 ثانیه (دناتوراسیون 2)، دمای ^{oC}60، 15 ثانیه (دمای اتصال پرایمر)، دمای ^{oC} 72، 15 ثانیه (اکستنشن) و سیکل نهایی منحنی ذوب در 3 گام: دمای ^{oC} 95، 15 ثانیه، دمای ^{oC}60، 1 دقیقه و مجدد دمای ^{oC} 95 به مدت 15 ثانیه تنظیم گشت(17). محصولات بیان ژن *SLC26A4* توسط ژن رفرنس *GAPDH* با فرمول $2^{-\Delta Ct}$ نرمال شدند. پرایمرهای ژن *SLC26A4* طبق مطالعه(22) که بر روی رت انجام شده بود، انتخاب و پرایمر *GAPDH* با نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد و سپس به کمک سایت NCBI Blast Primer چک گردید. کلیه پرایمرها توسط شرکت SinaClon ساخته شدند (جدول شماره 1).

1. Quantitative Real Time-PCR

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

جدول شماره 1: توالی پرایمر هر ژن برای آنالیز به روش Real-Time PCR

نام ژن	توالی پرایمر (3'-5')	دمای ذوب	%GC
SLC26A4 Forward	CATCATGCCTGGCTGGTTCT	59/35	55
SLC26A4 Reverse	TGGACACCAACATTCCGTCA	57/30	50
GAPDH Forward	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	61/58	50
GAPDH Reverse	CATACTCAGCACCAGCATCACC	61/32	54/55

آنالیزهای هیستولوژیک

فرایند آبگیریِ 3 نمونه فیکس شده، به ترتیب درون اتانول‌های 70 درصد، 80 درصد، 96 درصد و 100 درصد به مدت 4 ساعت (یک ساعت در هر کدام) و سپس شفاف‌سازی در زایلن 1 و 2 به مدت 80 دقیقه (40 دقیقه در هر کدام) انجام شد. آغشتگی به پارافین در دستگاه فور و درون پارافین 1 و 2 به مدت 2 ساعت (یک ساعت در هر کدام) صورت گرفت و نمونه‌های پارافینی قالب‌گیری شدند. بعد از آن نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت 10-5 میکرون (Rotary microtome,Leica Biosystems,Germany) برش داده شده و روی لام قرار گرفتند. پس از مرحله پارافین زدایی، شفاف‌سازی لام به‌مدت 15 دقیقه در زایلن 1 و 2 و 3 انجام شد. آبدهی به بافت برخلاف مرحله آبگیری بوده و به ترتیب با یک ضربه در اتانول‌ها 100 درصد، 96 درصد، 80 درصد و 70 درصد انجام شده و پس از شستن در زیر آب جاری، بسته به‌غلظت رنگ‌های هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، لام‌ها ابتدا با هماتوکسیلین رنگ‌شده و بعد از شستشو با آب در ائوزین قرارگرفته و در آخر در زیر آب جاری شسته شدند. مرحله آخر آبگیری و شفاف‌سازی بافت، به صورت ضربه‌ای، 3 بار در اتانول 96 درصد و یک بار در اتانول 100 درصد انجام شده و توسط زایلن 1 و 2 و 3 شفاف شده و لام و لامل با چسب انتلان (Entellane, Merck, Germany) مونت شده و با میکروسکوپ نوری (Labomed, USA) در بزرگنمایی‌های (×4،×10،×40) توسط نرم‌افزار Image J تصویربرداری شدند(23).

ارزیابی آماری

داده‌های کمّی به صورت میانگین ± انحراف استاندارد میانگین، با نرم‌افزار آماری GraphPad prism 8 بیان شدند (جدول شماره 2).

پس از تایید نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro Wilk (مقدار P-value در هر 3 گروه بیش‌تر از 0/05 گزارش شد). میزان تغییرات بیان ژن یا همان Fold Change در گروه‌های مختلف، بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به‌دست آمد. از آزمون آماری پارامتریک One-Way ANOVA برای تشخیص مختلف (از نظر اثر مواجهه با صدا بر میزان بیان ژن *SLC26A4*) استفاده شد (جداول شماره 3 و4) که پس از رد شدن فرض مساوی بودن میانگین تمام گروه‌ها، برای یافتن گروه‌های با اختلاف معنی‌دار در بین 3 گروه مختلف، آزمون تعقیبی Tukey استفاده گشت (جدول شماره 5). در کلیه آزمون‌ها، مقدار P< 0/05 به عنوان سطح آماری معنادار در نظرگرفته شد.

جدول شماره 2: میانگین بیان ژن *SLC26A4* نرمال شده با ژن رفرنس GAPDH در گروه‌های مختلف

نام گروه	میانگین بیان ژن (انحراف معیار میانگین)	تعداد سر رت
1 ساعت پس از قطع مواجهه	0/003902 ± 0/001199	3
1 هفته پس از قطع مواجهه	0/0003752 ± 0/0001086	3
کنترل	0/006459 ± 0/0498819	4

جدول شماره 3: نتایج پارامترهای آزمون آماری One-Way ANOVA

پارامترها	نتایج به دست آمده
آماره F	37/72
سطح معنی‌داری	0/0002
خلاصه P value	***
آیا اختلاف میانگین معنی‌دار است (P < 0/05)؟	بله
مجذور R	0/9151

جدول شماره 4: نتایج تحلیل واریانس یک طرفه برای آزمون مقایسه میانگین چند گروه از نظر تغییر بیان ژن *SLC26A4*

منشا تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	سطح معنی‌داری
بین گروه‌ها	0/005489	2	0/002745	0/0002
درون گروه‌ها	0/0005094	7	$7/277\times10^{-6}$	
کل	0/005999	9		

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

جدول شماره 5: نتایج آزمون تعقیبی توکی در گروه‌های مختلف مواجهه یافته یا نیافته با صدا به منظور یافتن گروه‌های با اختلاف معنی‌دار در تغییر میزان بیان ژن *SLC26A4*

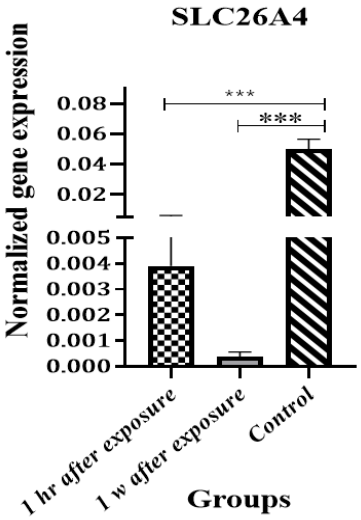
آزمون مقایسه چندگانه توکی	اختلاف میانگین	فاصله اطمینان 95%	q	معنی داری	خلاصه	P Value تنظیم شده
1ساعت، 1هفته	0/003526	0/2404 تا 0/01699-	0/7160	خیر	ns	0/8707
1ساعت، کنترل	0/04598-	0/02679- تا 0/06517-	9/981	بله	***	0/0005
1 هفته، کنترل	0/04951-	0/06869- تا 0/03032-	10/75	بله	***	0/0003

یافته‌ها

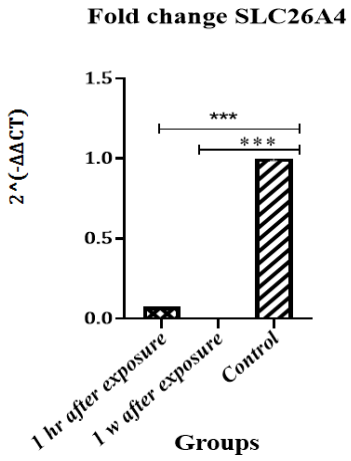
منحنی‌های ذوب در تمام نمونه‌ها برای هر دو ژن *SLC26A4* و *GAPDH* در تکنیک Real-Time PCR تک قله بوده و بر یک دما منطبق بودند که نشان دهنده قابل قبول بودن نتایج می‌باشد. نتایج نشان داد که سطح بیان *SLC26A4* در هر دو گروه قطع مواجهه یک ساعته و یک هفته نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و اختلاف میانگین آن‌ها از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود.

نمودار شماره 1 به بررسی اثر صدا بر بیان این ژن در گروه‌های مختلف می‌پردازد و نمودار شماره 2 نشان می‌دهد که fold change ژن *SLC26A4* در اثر مواجهه با صدای سفید یکنواخت و در مقایسه با گروه نرمال (fold change=1)، یک ساعت پس از قطع مواجهه، 0/0733 و یک هفته پس از قطع مواجهه 0/00712 شده است. به بیان دیگر، بیان این ژن در 6 روز مواجهه در نمونه نرمال، 13/64 برابر گروه اول (یک ساعت قطع تماس) و 140/4 برابر گروه دوم (یک هفته قطع تماس) می‌باشد.

براساس تصاویر به دست آمده از آسیب‌شناسی بافتی (تصویر شماره 2) مشخص شد که سلول‌های موئی داخلی، خارجی و سلول‌های پشتیبان پس از یک هفته از قطع مواجهه تخریب بیشتری را نسبت به قطع مواجهه یک ساعته نشان دادند. به علاوه نتایج نشان داد که آسیب به غشا رایسنر و بازال لامینا و گانگلیون عصب شنوائی نیز در این گروه‌ها اتفاق افتاده است. در کنار اینها، یک موش از هر گروه قطع مواجهه دارای عفونت در ناحیه حلزون گوش بود که به داخل آن نفوذ نکرده بود.

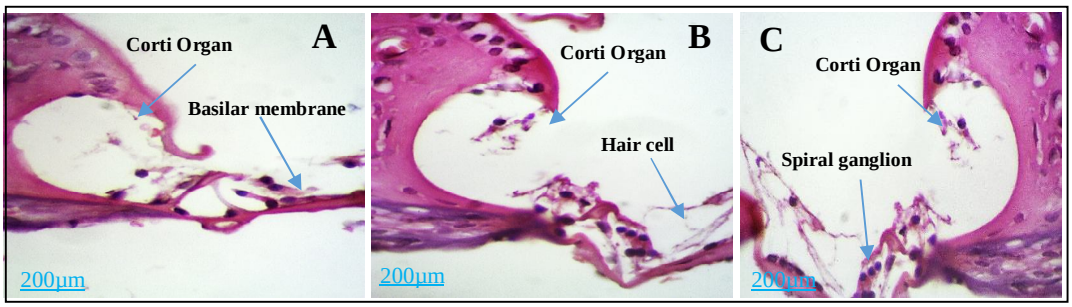


نمودار شماره 1: اثر صدای سفید یکنواخت بر بیان ژن *SLC26A4* در گروه‌های مختلف با احتساب خطای میانگین استاندارد،
***P = 0/0005
***P = 0/0003



نمودار شماره 2: تغییرات بیان ژن *SLC26A4* نسبت به گروه کنترل
***P= 0/0005
***P= 0/0003

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]



تصویر شماره 2: خصوصیات بافت شناسی حلزون گوش موش‌های صحرایی مواجهه یافته (B,C) یا نیافته (A) با صدای سفید یکنواخت (40×). فلش‌ها قسمت‌های مختلف حلزون گوش را با مقیاس 200µm نشان می‌دهند. بافت‌ها با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده‌اند. هر دو نقطه قطع مواجهه یک ساعته (B) و یک هفته (C) آسیب‌های جدی در بخش‌های مختلف را نسبت به گروه کنترل (A) نشان می‌دهند، با این حال این آسیب‌ها یک هفته بعد شدیدتر بودند.

بحث

NIHL یک بیماری پیچیده است که تحت تأثیر زمینه‌های شخصی، محیطی و ژنتیکی قرار دارد. کارگران با قرار گرفتن در معرض سر و صدا مشابه ممکن است سطح مختلفی از آسیب شنوایی را نشان دهند، که نقش مستعد ژنتیکی را پیشنهاد می‌کند(24). مطالعه‌ای با عنوان بررسی اثر مواجهه با صدا بر شنوایی رت ویستار با استفاده از گسیل‌های صوتی حاصل از اعوجاج گوش در سال 2015 توسط کایدانی و همکاران صورت گرفت. نتایج آن نشان داد که بیشترین مقدار افت موقت و دائم در اثر مواجهه با صدای سفید مرکب با مشخصات SPL=95dB, 500-8000Hz ابتدا در بسامد 3937/5 و کم‌ترین مقدار آن در بسامد 375 هرتز رخ داد. نتایج این مطالعه را می‌توان به دلیل نزدیک بودن نوع مواجهه و گونه حیوان مورد بررسی، به مطالعه حاضر تعمیم داد و انتظار داشت که احتمال وقوع این پدیده در حیوانات پژوهش حاضر نیز رخ داده باشد و نتیجه گرفت مواجهه با صدا ابتدا باعث صدمه به سلول‌های موئی مسئول درک صداهای با بسامد بالا و همچنین باعث ایجاد افت شنوایی کم و دائمی می‌شود(25).

طبق مطالعه Ito و همکاران در سال 2015 در مدل حیوانی که به‌صورت ژنتیکی بیان ژن *SLC26A4* کاهش داده شده بود، به بررسی پیامد آن در حلزون گوش پرداخته شد. نتایج این مطالعه انحطاط و از بین رفتن عملکرد عروق استریا، افت شنوایی نسبتا شدید و پیشرونده، بزرگ شدن فضای آندولنفی و کاهش پتانسیل درون‌ریز حلزون گوش را در موش‌های 12 ماهه و همچنین ضخیم شدن و ادماتوس عروق استریا و کاهش آستانه ABR را در موش‌های 3 ماهه نشان داد. علاوه بر این در موش‌های 12 ماهه، ناهمگنی پاتوژنیک در سطوح اپیکال حلزون گوش و همچنین کاهش در بیان ژن *KCNQ1* که از جمله ژن‌های درگیر در ساخت کانال‌های پتاسیم است و به حفظ تعادل یونی مناسب برای شنوایی طبیعی کمک می‌کند، مشاهده شد. نتایج این مطالعه را می‌توان به مطالعه حاضر تعمیم داد و انتظار داشت که بخشی از آسیب‌های وارد شده به سلول‌های موئی و سلول‌های گانگلیون مارپیچی حلزون‌های در معرض صدا، مربوط به افت زیاد ژن *SLC26A4* باشد و انتظار افت شنوایی غیرقابل برگشت را نیز داشت(26). در ادامه مطالعه قبل، مطالعه دیگری توسط همان تیم و بر روی موش‌های دستکاری شده ژنتیکی در سال 2016 انجام شد و نتایج آن نشان داد که عدم تجویز آنتی‌بیوتیک در مدت زمان بحرانی، منجر به افزایش افت شنوایی و افزایش پسرفت سراسری به علت عملکرد بد و انحطاط عروق استریا بعد از 1 ماهگی موش‌ها شد. این در حالی بود که تحریک مجدد بیان ژن *SLC26A4* در سلول‌های این بخش باعث

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

بهبود پتانسیل درون ریز حلزون گوش و جلوگیری از بروز تغییرات شنوایی در آن‌ها شد. از طرفی، تجویز مجدد داکسی سایکلین می‌تواند باعث کاهش بیان پروتئین پندرین، افزایش تخریب آن یا هر دو در سلول‌های دوکی شکل آندولنف شود که این نتیجه بیان می‌کند پندرین برای حفظ شنوایی در گوش سالم نیاز نیست اما در گوشی که به‌طور غیرطبیعی رشد کرده است لازم است. اما این احتمال وجود دارد که پندرین برای حفظ شنوایی در سایر شرایط اتوتوکسیک مثل قرار گرفتن در معرض صدا که بر ساختار و عملکرد عروق استریا تاثیر منفی دارد، مهم باشد. نتایج مطالعه حاضر و مطالعه پیشین به خوبی نقش مهم *SLC26A4* را در حلزون شنوایی نشان داده و کاهش آن را عامل تغییرات شنوایی موش‌ها می‌داند(27).

در سال 2016 تحقیقی به منظور بررسی اولین ژن‌های بیان شده در دفاع ایمنی حلزون گوش‌های رت و موش CBA/J در برابر تروما آکوستیک توسط Yang Shuzhi و همکارانش به وسیله روش RNA Sequencing انجام شد. در بین ابتدایی‌ترین ژن‌ها در پاسخ ایمنی حلزون گوش رت، دوازده ژن از خانواده Solute Carrier با نام‌های *SLC25A18,SLC4A10,SLC41A3,SLC17A7,SLC7A1, SLC16A6,SLC25A29,SLC44A3,SLC16A4,SLC38A1, SLC29A23* و *SLC25A25* به چشم می‌خورد که بعد از مواجهه به مدت 2 ساعت با صدای 120 dB ، 7-1 kHz کاهش بیان پیدا کردند که حاکی از حساسیت شدید ژن‌های این خانواده در اثر مواجهه با صدا است(11).

مطالعه‌ای در سال 2018 توسط Hiromasa Ninomiya و همکارانش انجام شد که افزایش بیان 5 برابری در سطح بیان *HSP70* در تمام بافت حلزون گوش بعد از مواجهه 5 روزه با سطحی از اصوات فرکانس پایین[3] که همیشه در تماس هستیم، را گزارش کرد. برخلاف پژوهش حاضر، سطح بیان افزایش یافته پس از گذشت 3 روز به سطح طبیعی و مواجهه نیافته بازگشت، در حالی‌که نتایج حاصل از مطالعه حاضر روند کاهش شدیدتر بیان ژن *SLC26A4* را در هر دو نقطه زمانی پس از مواجهه نشان داد که آزمون‌های آماری معنی‌دار بودن این افت را در مقایسه با گروه کنترل اثبات کرد(28).

در سال 2019 مطالعه‌ای توسط Coyat و همکاران انجام شد که به بررسی پیامدهای مورفولوژیک ترومای آکوستیک در حلزون گوش رت ویستار 21 روز پس از قطع مواجهه با صدای تک اکتاو 119dB ، 8-4 kHz به مدت 2 ساعت پرداخت. نتایج هیستولوژیک این بررسی بروز تغییرات در حلزون گوش، از بین رفتن سلول‌های موئی داخلی و همجوشی آنها در غشای استروسیلیا، از دست رفتن نورون‌های گانگلیون مارپیچ و بهم ریختگی غلاف میلین عصب شنوایی و افت شنوایی دائمی را نشان داد. نتایج تحقیق حاضر و مطالعه‌ی پیشین نشان از وجود ارتباط بین آسیب عصب شنوایی و سلول‌های موئی داخلی و خارجی و بروز افت شنوایی در اثر مواجهه با صدا را بخوبی تایید می‌کند(29).

نکته مهم در خصوص یافته‌های این مطالعه، اثبات فرضیه موثر بودن مواجهه با صدا بر تغییر بیان ژن *SLC26A4* این تحقیق بود که با انجام آزمون آنالیز واریانس یک طرفه این اثر با حاصل شدن P= 0/0002 اثبات شد و پس از انجام آزمون تعقیبی توکی در بین 3 گروه، معنی‌دار بودن اختلاف میانگین بیان ژن مذکور را در هر دو نقطه زمانی یک ساعت و یک هفته پس از قطع مواجهه، به ترتیب برابر با 0/0005 و 0/0003 نشان داد. به طور کلی با کاهش بیان این ژن در هردو نقطه زمانی می‌توان انتظار داشت که در صورت انجام هریک از تست‌های سنجش آستانه شنوایی (ABR, DPOAE) قبل و بعد از مواجهه و در نظر گرفتن زمان‌های قطع مواجهه طولانی‌تر تا چند ماه، در صورت عدم بازگشت بیان این ژن به حالت پایه، آسیب‌های جدی به حلزون گوش وارد شود و منجر به افت شنوایی پیشرونده و غیرقابل برگشت در موش‌ها شود.

1. Low Frequency Noise

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

علل تغییرات سطوح mRNA ژن *SLC26A4* بعد از مواجهه با استرس صوتی در ناحیه حلزون گوش نسبتاً کشف نشده و نیازمند انجام مطالعات بیش‌تر در این زمینه می‌باشد زیرا هیچ مطالعه‌ای به بررسی اثر اتوتوکسیک صدا بر بیان این ژن در حلزون گوش حیوان سالم از نظر ژنتیکی نپرداخته است و این مهم نقطه قوت این مطالعه می‌باشد. همچنین استفاده از روش آنالیز Real-Time PCR که یکی از دقیق‌ترین انواع PCR است و انجام آنالیزهای هیستولوژیک در تمام 3 گروه این تحقیق که مهر تاییدی بر یافته‌های ریل تایم بود، نقاط قوت دیگر این مطالعه بودند که آن را از سایر مطالعات مشابه بررسی اثر صدا بر تغییرات بیان ژن متمایز می‌کند. افزایش سایز نمونه به منظور طراحی مطالعه به صورت مزمن و به دنبال آن افزایش نقاط پس از مواجهه در بازه زمانی طولانی‌تر از یک هفته و انجام تست‌های سنجش آستانه شنوایی قبل و بعد از مواجهه که از جمله خلاهای مطالعه حاضر می‌باشد، می‌تواند در پژوهش‌های آینده کمک شایانی در تصمیم گیری دقیق بروز افت شنوایی را فراهم آورد. بنابراین صرف نظر از این‌که ماهیت تغییرات مشاهده شده به صورت خاص منطقه‌ای از حلزون است یا سراسری، این تغییرات بینش مکانیکی جدید و فرصت‌های بالقوه برای مداخلات درمانی را فراهم می‌کند. یافته‌های این مطالعه از نظر بهداشت حرفه‌ای حائز اهمیت بالایی هستند زیرا می‌توان پیش‌بینی کرد در صورت مداومت در مواجهه با صدای محیطی، و کاهش شدید بیان این ژن در حلزون گوش منجر به بروز ناشنوایی حسی-عصبی شود که از جمله دلایل ایجاد آن، آسیب به سلول‌های موئی حلزون گوش و قرار گرفتن در معرض نویز با شدت بالا است. بنابراین با درک بهتر محیط متابولیکی گوشِ در معرض صدا، امیدواریم تایید مثبتی بر اپیدمی فعلی NIHL داشته باشیم.

سپاسگزاری

نتایج این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب در مرکز مدیریت مطالعات و پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تهران با شناسه اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1398.225 و کد طرح 98-3-99-45875 تصویب و حمات مالی شده است. بدین وسیله از زحمات حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Mohammadi A, Ghavamabadi LI, Dehaghi BF, Nezhad AJ. Combined Effect of Noise Exposure and Smoking on Hearing Thresholds in Workers in a Petrochemical Plant. Pakistan J Medical Health Sci 2018; 12(2): 918-923.
2. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury–Martin BL, et al. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. Hear Res 2011; 277(1-2): 211-226.
3. Kahrizi K, Mohseni M, Nishimura C, Bazazzadegan N, Fischer SM, Dehghani A, et al. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. Eur J Pediatr 2009; 168(6): 651-653.
4. Falk MM. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol 2000; 79(8): 564-574.
5. Lefebvre PP, VanDeWater TR. Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. Brain Res Brain Res Rev 2000; 32(1): 159-162.
6. Reardon W. Genetic deafness. J Med Gene 1992; 29(8): 521-526.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

7. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 1997; 6(9): 1605-1609.
8. Kaskalan E, Önalan EE, Kaygusuz İ, Karlıdağ T, Keleş E, Akyiğit A, et al. Analysis of GJB2 (Connexin 26) mutation in patients with congenital non-syndromic sensorineural hearing loss. Turk Arch Otolaryngol 2014; 52: 1-6.
9. Shin J-W, Lee S C, Lee H K, Park H J. Genetic screening of GJB2 and SLC26A4 in Korean cochlear implantees: experience of soree Ear clinic. Clin Exp Otorhinolaryngol 2012; 5(Suppl 1): S10-S13.
10. Nonsyndromic Hearing Loss. 2020. Available from:https://medlineplus.gov/genetics/condition/nonsyndromic-hearing-loss/#resources. Acssessed January 2, 2012.
11. Yang S, Cai Q, Vethanayagam RR, Wang J, Yang W, Hu BH. Immune defense is the primary function associated with the differentially expressed genes in the cochlea following acoustic trauma. Hear Res 2016; 333: 283-294.
12. Koohiyan M, Reiisi S, Azadegan-Dehkordi F, Salehi M, Abtahi H, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Screening of 10 DFNB Loci Causing Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss in Two Iranian Populations Negative for GJB2 Mutations. Iran J Public Health 2019; 48(9): 1704-1713.
13. Pendred-Syndrome. 2020. Available from: https://medlineplus.gov/genetics/condition/pendred-syndrome/. Acssessed January 2, 2012.
14. Mohseni M, Azizi F, Bazazzadegan N, Dehghani A, Seyfati M, Taghdiri M, et al. Screening of DFNB4 locus in Iranian Families with Hereditary Hearing Impairment. Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism 2008; 10(4): 395-400 (Persian).
15. Lee KY, Choi SY, Bae JW, Kim S, Chung KW, Drayna D, et al. Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2008; 72(9): 1301-1309.
16. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Adawi F, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). Nat Genet 1997; 17(4): 411-422.
17. Bahaloo M, Rezvani ME, Yazd EF, Mehrjerdi FZ, Davari MH, Roohbakhsh A, et al. Effect of myricetin on the gene expressions of NOX3, TGF-β1, prestin, and HSP-70 and anti-oxidant activity in the cochlea of noise-exposed rats. Iran J Basic Med Sci 2020; 23(5): 594.
18. Ahmadi Noorbakhsh S, Sarafzadeh Rezaei F. Management, anesthesia and surgery of laboratory animals: Urmia University; 2011. (Persian).
19. Hu BH, Cai Q, Manohar S, Jiang H, Ding D, Coling DE, et al. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. Neuroscience 2009; 161(3): 915-925.
20. Hu BH, Cai Q. Acoustic overstimulation modifies Mcl 1 expression in cochlear sensory epithelial cells. J Neurosci Res 2010; 88(8): 1812-1821.
21. Rodrigues JC, de Brito Neto RV. RNA Extraction from Wistar Rat Cochlea for qRT-PCR. Bio-101 2017: e2621.
22. Tang L, Yu X, Zheng Y, Zhou N. Inhibiting SLC26A4 reverses cardiac hypertrophy in H9C2 cells and in rats. Peer J 2020; 8: e8253.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]

23. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. Methods Mol Biol 2014; 1180: 31-43.
24. Zhang X, Liu Y, Zhang L, Yang Z, Shao Y, Jiang C, et al. Genetic variations in protocadherin 15 and their interactions with noise exposure associated with noise-induced hearing loss in Chinese population. Environ Res 2014; 135: 247-252.
25. Kaydani M, Khavanin A, Akbari M, Rezazadeh Azari M, Rajabi-Bazl M. Study of the effect of noise exposure on rat's hearing by distortion product otoacoustic emissions. Journal of Acoustical Society of Iran 2015; 2(2): 53-58 (Persian).
26. Ito T, Nishio A, Wangemann P, Griffith AJ. Progressive irreversible hearing loss is caused by stria vascularis degeneration in an Slc26a4-insufficient mouse model of large vestibular aqueduct syndrome. Neuroscience 2015; 310: 188-197.
27. Nishio A, Ito T, Cheng H, Fitzgerald TS, Wangemann P, Griffith AJ. Slc26a4 expression prevents fluctuation of hearing in a mouse model of large vestibular aqueduct syndrome. Neuroscience 2016; 329: 74-82.
28. Ninomiya H, Ohgami N, Oshino R, Kato M, Ohgami K, Li X, et al. Increased expression level of Hsp70 in the inner ears of mice by exposure to low frequency noise. Hear Res 2018; 363: 49-54.
29. Coyat C, Cazevieille C, Baudoux V, Larroze-Chicot P, Caumes B, Gonzalez-Gonzalez S. Morphological consequences of acoustic trauma on cochlear hair cells and the auditory nerve. International Journal of Neuroscience 2019; 129(6): 580-587.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.17359260.1400.31.198.14.6]