

Purple noise-induced changes in the expression of SLC26A4 gene in cochlear tissue of rat

Elham Kazemi Rad¹ , Monireh Khadem² , Mohammad Reza Monazzam Esmailpoor³ ,
Maryam Mirzaei Hotkani⁴ , Amir Abbasi Garmaroudi^{*4} , Sajjad Mozaffari⁴ 

1- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Occupational Health and Safety Engineering, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Occupational Health and Safety Engineering, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- M.Sc., Department of Occupational Health and Safety Engineering, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Aims: As one of the most important physical detrimental factors, purple noise can be considered similar to sounds that a wide range of people are exposed to in their workplaces. Also, cochlear tissue samples are the best tissue samples to evaluate gene expression and pathologic studies following noise exposure. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of purple noise on the expression of SLC26A4 gene in cochlear tissue.

Methods & material: Totally, 10 male Wistar rats were used in this experimental study. Both N₁ and N₂ exposure groups were exposed to purple noise with sound pressure level of 115-120 dB and frequency range of 4-20 kHz. Histological tests were performed for pathological studies. Finally, the relative expression of SLC26A4 gene was determined by qRT-PCR technique. All experiments were conducted according to ethical standards of working with laboratory animals.

Results: The results showed that the expression of SLC26A4 gene decreased significantly compared to the normal level in both N₁ and N₂ groups. The results of cochlear tissue pathology showed that the group exposed to purple noise for 6 days had more mechanical damage 7 days after cessation of exposure.

Conclusion: Significant decreased expression in SLC26A4 gene and permanent damage to the Reissner and Basal lamina membranes in the cochlear tissue and the auditory nerve ganglion leads to strengthening the incidence of advancing sensorineural hearing impairment and increases the likelihood of metastasis in cochlear tissue.

Keywords: Purple noise, SLC26A4 expression, Cochlear tissue, Sensorineural hearing impairment

Please Cite this article as: Kazemi Rad E, Khadem M, Monazzam Esmailpoor M.R, Mirzaei Hotkani M, Abbasi Garmaroudi A, Mozaffari S. Purple noise-induced changes in the expression of LC26A4 gene in cochlear tissue of rat. Journal of Health in the Field. 2021; 8(4):1-11.

Corresponding Author: Department of Occupational Health and Safety Engineering, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: a-garmaroudi@razi.tums.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.22037/jhf.v8i4.33987>

Received: 3 February 2021

Accepted: 28 April 2021

اثرات صدای بنفش بر روی میزان بیان ژن SLC26A4 در بافت حلزون گوش رت

الهام کاظمی راد^۱ , منیره خادم^۲ , محمدرضا منظم اسماعیل پور^۳ , مریم میرزائی حتکنی^۴ ,
امیر عباسی گرمارودی^{۴*} , سجاد مظفری^۴ 

- ۱- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و اهداف: صدای بنفش را می‌توان مشابه صوتی در نظر گرفت که طیف وسیعی از افراد به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل فیزیکی زیان‌آور، در محیط‌های کاری خود در تماس با آن هستند. از طرفی، نمونه‌ی بافت حلزون گوش بهترین نمونه بافتی جهت بررسی میزان بیان ژن و مطالعات آسیب شناسی، پس از تماس با اصوات محسوب می‌شوند لذا هدف از این پژوهش، بررسی اثرات صدای بنفش بر روی میزان بیان ژن SLC26A4 در بافت حلزون گوش بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع، ۱۰ سر رت نر با نژاد ویستار در این مطالعه تجربی استفاده گردید. دو گروه مواجهه N1 و N2 در تماس با صدای بنفش (۲-۴ kHz، ۱۱۵-۱۲۰ dB SPL) قرار گرفتند. آزمایشات بافت شناسی جهت مطالعات آسیب شناسی بافت صورت گرفت و در پایان، میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 بوسیله ی qRT-PCR تعیین گردید. کلیه آزمایشات این مطالعه، طبق موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در هر دو گروه مواجهه N1 و N2 کاهش معنادار میزان بیان ژن SLC26A4 نسبت به سطح نرمال اتفاق افتاده است. نتایج مطالعه‌ی آسیب‌شناسی بافت حلزون گوش نشان داد که نمونه ی گروهی که ۶ روز با صدای بنفش مواجهه داشت، پس از ۷ روز از قطع مواجهه صدمات مکانیکی بیشتری دیده بود.

نتیجه‌گیری: این سطح از کاهش بیان در ژن SLC26A4 و آسیب دائمی غشای رایسنر و بازال لامینا در بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی، منجر به تقویت بروز نقص شنوایی حسی-عصبی پیش رونده و افزایش احتمال متاستاز در بافت حلزون گوش می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: صدای بنفش، بیان SLC26A4، بافت حلزون گوش، نقص شنوایی حسی-عصبی

* نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار.

Email: a-garmaroudi@razi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸

مقدمه

بیش از ۵۰٪ موارد کاهش شنوایی با نقص حسی-عصبی از نوع وراثت بوده و بقیه موارد از نوع محیطی می‌باشد [۱]. از میان علل محیطی می‌توان به مواجهه با صدای بنفش اشاره کرد. در ابتدا به مطالعاتی که به علل وراثتی نقص شنوایی غیر سندرمی/سندرمی حسی-عصبی اشاره شده است پرداخته می‌شود، نظیر مطالعاتی که نشان داده است، تغییرات الگوی بیان ژن SLC26A4 که در جایگاه کروموزومی DFNB4 (Deafness neurosensory autosomal beta- 4) قرار دارد، سبب کاهش شنوایی ژنتیکی به دو فرم غیر سندرمی و سندرمی (سندرم پندرد) می‌شود. شیوع افراد مبتلا به ناشنوایی نوع سندرم پندرد (PDS= Pendred Syndrome) که ناشی از جهش این ژن می‌باشد، بیشتر است. بر همین اساس، ژن SLC26A4 را ژن PDS نام‌گذاری می‌کنند. بیش از ۳۰۰ جهش در این ژن شناسایی شده است. در جمعیت‌های بسیاری از جمله در ایران، تغییرات الگوی بیان این ژن به عنوان دومین عامل ناشنوایی ارثی پس از ژن GJB2 به حساب می‌آید. ناشنوایی حسی-عصبی ناشی از سندرم پندرد در برخی از موارد پیشرونده است و سبب درجات مختلفی از ناشنوایی می‌شود [۲]. در مطالعه‌ای که در آسیای شرقی و جنوبی انجام گرفت شواهد نشان داد که ۵ درصد از کل ناشنوایی پیش‌کلامی با وراثت مغلوب به دلیل تغییرات معنی‌دار بیان ژن SLC26A4 و جهش ناشی از آن می‌باشد [۳]. شیوع سندرم پندرد با وجود افزایش ازدواج‌های خویشاوندی در ایران در حال فزونی است [۲]. عامل ژنتیکی به تنهایی نمی‌تواند سبب بروز نقص شنوایی سندرمی-غیرسندرمی به صورت حسی-عصبی شود بلکه عامل دیگری مانند عامل محیطی مواجهه با صدای ناهنجار درکنار عامل نقص مادرزادی، نقش تشدید کننده برای ایجاد این نوع نقص شنوایی ایفا می‌کند و همچنین می‌تواند به تنهایی بر روی میزان بیان این ژن اثر

گذاشته و سبب تغییرات معنی‌دار بیان ژن، آسیب سلول‌های موئی بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی گردد که در نهایت این تغییرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی سیستم شنوایی منجر به بروز نقص شنوایی حسی-عصبی شود. در واقع بروز نقص شنوایی حسی-عصبی در اثر تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های مرتبط با سیستم شنوایی، آسیب دائمی نورون‌های بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی رخ می‌دهد [۴-۶]. یکی از این اصوات ناهنجار که اثرات آن بر روی انسان کمتر مورد توجه قرار گرفته، صدای بنفش است. مشخصه‌های فیزیکی صدای بنفش با اصوات صنعتی شباهت زیادی دارد [۸،۷] لذا صدای بنفش را می‌توان مشابه اصواتی در نظر گرفت که طیف وسیعی از افراد به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل فیزیکی زیان‌آور، در محیط‌های کاری خود در تماس با آن هستند. بر همین اساس، مطالعه‌ی گسترده در مورد اثرات این صدا بر روی سیستم شنوایی انسان می‌تواند به شناخت کامل اثرات نامطلوب اصوات صنعتی نظیر اثر بروز نقص شنوایی کمک کند. از آنجائی که در ارتباط با اینکه مواجهه با صدای بنفش به چه میزان می‌تواند بر روی تغییر میزان بیان ژن SLC26A4 و آسیب بافت سیستم شنوایی انسان نقش داشته باشد، تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است لذا در ادامه به مطالعات مشابه که بر روی پروتئین‌های مشابه صورت گرفته است، پرداخته می‌شود نظیر مطالعه‌ای نشان داد که طیف وسیعی از جمعیت مناطق شهرنشین در زندگی روزمره و یا محیط کاری خود در تماس با صوت تحت عنوان صدای فرکانس پایین (LFN= Low Frequency Noise) که دارای تراز فشار صوت ۶۰ تا ۱۱۰ دسی بل و حدود فرکانسی بیش از ۱۰۰ هرتز می‌باشد قرار دارند که سبب تهدید سلامتی و اختلالاتی نظیر سرگیجه، سردرد و تهوع در این افراد می‌شود [۹]. مطالعه دیگری که توسط Gong و همکاران با هدف بررسی تحریک پروتئین‌های شوک گرمایی در

اثر تماس توام گرما و صدای بیش از حد مجاز بر روی رت وحشی صورت گرفت، دو نمونه رت در مواجهه با صدای دارای تراز فشار صوت ۱۰۶ dB (طی مدت ۲ ساعت در روز) و حدود فرکانسی ۲۰-۲ کیلو هرتز بودند. نتایج مطالعه، تحریک حداکثری میزان بیان ژن پروتئین‌های شوک گرمایی (Heat stress protein) و هم چنین افت شنوایی نسبی را نشان داد اما در قیاس با استرس گرمایی، استرس صوتی منجر به تحریک کمتری از سطوح ژن‌های پروتئین‌های HSP25، HSP70.1، HSP70.3 و HSP86 شد [۱۰] یا مطالعه‌ای که نشان داد تماس با صدا (تراز فشار صوت ۱۲۰ دسی بل و حدود فرکانسی ۷ کیلو هرتز) سبب افزایش میزان بیان ژن‌های پروتئین‌های C1s، Cfi گردیده است [۱۱]. هم چنین مطالعه‌ای مشابه نشان داد که مواجهه با صدا (مقدار تراز فشار صوت ۱۳۰ دسی بل و ۱۶ کیلو هرتز) منجر به افزایش میزان بیان ژن‌های CRH و گیرنده اش CRH-R1 در PVN شده است و استرس فیزیکی ناشی از این صوت، سلول‌های میکروگلیال را به شدت تحت تاثیر قرار داده بود [۱۲]. همچنین بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی سیستم کورتی که گیرنده حسی-عصبی و حساس به صوت محسوب می‌شود به شدت تحت تاثیر ترومای آکوستیک قرار می‌گیرند که در نهایت منجر به مرگ سلول‌های موئی، تغییرات میزان بیان ژنی و بروز NIHL (Noise-induced hearing loss) می‌شود [۱۳]. تحریک بیش از حد آکوستیکی، سبب فعل و انفعالات سوء ساختاری-مولکولی و فیزیولوژیکی گوش داخلی و هم چنین تغییرات الگوی بیان ژنی می‌شود [۱۴]. اصوات ناهنجار به عنوان یک عامل فیزیکی تنش‌زا برای بدن محسوب می‌شود که برحسب نوع مواجهه (کوتاه مدت و بلند مدت) می‌تواند باعث اختلال در عملکرد فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی بسیاری از سیستم‌های بدن نظیر بافت حلزون گوش، اعصاب، قلب و عروق و پارامترهای هورمونی شود [۱۵، ۱۶]. همچنین مطالعه‌ای نشان داده است که

ترمیم و بازسازی مجدد سلول‌های عصبی نظیر سلول‌های موئی در انسان و سایر پستانداران در صورت آسیب و تخریب، امکان پذیر نمی‌باشد بلکه سبب مرگ دائمی این سلول‌ها در سیستم کورتی، بروز نقص شنوایی حسی-عصبی و تغییرات آستانه شنوایی دائمی (PTS=Permanent Threshold Shift) می‌شود [۱۳]. انتخاب این ژن به دو دلیل صورت گرفت: (۱) مطالعه‌ای که اثرات مواجهه با صدای بنفش بر روی تغییرات میزان بیان ژن مستعد نقص شنوایی مادرزادی (SLC26A4) و نقش تغییرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی ناشی از آن را در بافت حلزون گوش نشان دهد صورت نگرفته است (۲) استعداد پذیری بیشتر این ژن در جهت تغییرات الگوی بیان ژنی و بروز نقص شنوایی حسی-عصبی به صورت مادرزادی، همچنین با توجه به اینکه مشخصه‌های فیزیکی صدای بنفش با اصوات صنعتی که اثرات زیان‌آور آن اثبات شده است شباهت زیادی دارد و طیف وسیعی از کارگران در محیط کاری خود در تماس با آن قرار دارند و از طرفی برخی از مطالعات حکایت از آن دارند که نمونه‌ی بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی آن، بهترین نمونه‌ی بافتی از سیستم شنوایی جهت بررسی میزان بیان ژن مستعد بروز نقص شنوایی و مطالعات آسیب شناسی پس از تماس با اصوات محسوب می‌شوند [۱۳، ۱۴]. بر همین اساس هدف از این پژوهش، بررسی اثرات صدای بنفش بر روی میزان بیان ژن SLC26A4 در بافت حلزون گوش بود. از نوآوری این مطالعه می‌توان به این اشاره کرد که تاکنون مطالعه‌ای به طور مستقیم در حیطه اثرات صدای بنفش به عنوان یکی از عوامل محیطی و غیر مادرزادی بر روی تغییرات میزان بیان ژن SLC26A4 و نقش تغییرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی ناشی از آن را در بروز نقص شنوایی سندر می/غیر سندر می حسی-عصبی نشان دهد صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

انتخاب گروه مطالعه

این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی بوده و در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. در مطالعه حاضر در مجموع ۱۰ سر رت نر با نژاد ویستار استفاده گردید که به دو گروه مواجهه N_1 ($n=3$)، N_2 ($n=3$) و گروه کنترل ($n=4$) تقسیم گردید. گروه‌های مواجهه در تماس با صدای بنفش به صورت یکنواخت با مقدار تراز فشار صوت ۱۲۰-۱۱۵ دسی بل (۸ ساعت مواجهه در روز) و طیف فرکانسی ۲۰-۴ کیلو هرتز قرار گرفتند به طوری که نمونه‌های گروه مواجهه N_1 ، ۳ روز با صدای بنفش و نمونه‌های گروه مواجهه N_2 ، ۶ روز با صدای بنفش تماس داشتند. نمونه‌های هر دو گروه در یک مقطع زمانی مشابه یعنی ۷ روز پس از پایان مدت زمان تماس خود با صدای بنفش، بیهوش و بعد از بافت برداری از حلزون گوش رت‌ها، آزمایشات بافت‌شناسی و تعیین بیان ژن بر روی آن‌ها صورت گرفت. جهت تعیین میانگین سطح نرمال بیان ژن SLC26A4، از ۴ سر رت گروه شاهد، تحت همان شرایط ولی بدون اینکه مواجهه با صدای بنفش داشته باشند، استفاده گردید و بعد از بافت برداری از حلزون گوش رت‌های این گروه، آزمایشات بافت‌شناسی و بیان ژن بر روی آن‌ها صورت گرفت. جهت مطالعات ریخت‌شناسی و آسیب‌شناسی بافت حلزون گوش گروه‌های آزمایش، آزمایشات هیستولوژی و تصویر برداری از بافت بوسیله میکروسکوپ نوری برای ۲ سر رت از گروه‌های مواجهه انجام گردید به طوریکه ۱ سر آن از گروه N_1 و ۱ سر دیگر از گروه N_2 در نظر گرفته شد. هم چنین جهت مطالعات ریخت‌شناسی و آسیب‌شناسی بافت حلزون گوش در حالتی که تحت هیچ گونه استرس یا تحریک صوتی قرار نداشت، ۱ سر رت نیز از گروه شاهد انتخاب گردید و آزمایشات هیستولوژی و تصویر برداری از بافت آن با استفاده از

میکروسکوپ نوری صورت گرفت. در این مطالعه حجم نمونه با توجه به نوع مطالعه، به صورت تجربی و نیز با بررسی یافته‌های مطالعات مشابه در این زمینه تحقیقاتی بدست آمد [۹، ۱۰، ۴].

شرایط آزمایشگاهی

همه رت‌ها از حیوان‌خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید. رت‌های مورد استفاده در این مطالعه با وزن و سن مشخص (۶-۷ هفته، ۱۹۰-۱۷۰ گرم) درون محفظه چهار سلولی صوتی با کارایی بالا قرارگرفت تا شرایط محیطی مانند نور، دما و رطوبت برای همه‌ی گروه‌ها یکسان باشد. یک هفته قبل از شروع مواجهه با شرایط محیط آزمایش (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور، درجه حرارت 25 ± 2 سانتی گراد و رطوبت ۵۵-۳۵ درصد) سازگار شدند سپس در یک زمان مشخص در تماس با صدا قرار گرفتند [۹، ۴] و طی مدت آزمایش‌های لازم، آب و غذا به مقدار کافی تحت اختیار رت‌ها قرار گرفت. شایان ذکر است که این مطالعه براساس راهنمای عمومی اخلاق در پژوهش‌های علوم پزشکی دارای آزمودنی نمونه‌های حیوانی و نیز چک لیست ملاحظات اخلاقی طرح‌های پژوهشی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. مواجهه با صدای بنفش، درون محفظه چهار سلولی صوتی با کارایی بالا به ابعاد $60 \times 52 \times 40$ سانتی‌متر مکعب صورت گرفت. افت انتقال صدا از داخل این محفظه به خارج آن ۵۰ دسی بل بود. دیواره‌های این محفظه مرکب بوده و به ترتیب از لایه‌های ورق آهن، سلولز، لایه هوا، سلولز، ورق آهن و سلولز استفاده شده است. از سوراخ روی دیواره‌های اتاقک جهت تهویه محفظه و خروج هوای داخل و هم چنین جهت تولید اکسیژن کافی برای نمونه‌های حیوانی درون این محفظه استفاده شد و بدین منظور از پمپ محیطی دمشی با فلوی ۷۰ لیتر بر دقیقه استفاده گردید.

نحوه‌ی تولید صدا در محفظه

آلودگی صوتی مورد نظر با استفاده از یک نرم افزار کامپیوتری ADOBE AUDITION با شماره نسخه: V13.0.7 تولید و بوسیله یک تقویت کننده و بلندگو درون محفظه پخش شد و جهت پایش فرکانس و تراز فشارصوت از نرم افزار SPECTRUM ANALYZER با شماره نسخه 5.0.2 استفاده گردید. همچنین جهت بررسی یکنواختی تراز فشار صوت در نقاط مختلف محفظه، بوسیله دستگاه صداسنج آنالیزوردار (CELL 491) تراز فشارصوت در نقاط مختلف اندازه گیری شد.

آزمایشات هیستولوژی و بیان ژن

ابتدا رت‌ها بوسیله تماس با گاز کربن دی اکسید درون یک محفظه مکعبی بیهوش شدند سپس بافت برداری از حلزون گوش، جهت استخراج RNA و همچنین انجام مراحل آزمایشات بافت-شناسی (ثابت سازی بافت، آگیری با الکل، شفاف سازی با گزیلول، آغشتگی با پارافین، قالب گیری، برش گیری و رنگ آمیزی همتاکسیلین اتوزین) صورت گرفت و در انتها با استفاده از تصاویر میکروسکوپ نوری در مقیاس ۵۰۰ میکرون، بررسی مورفولوژیکی-پاتولوژیکی بافت حلزون گوش انجام گردید. با توجه به تهاجمی بودن روند نمونه گیری، اصول اخلاقی این مطالعه براساس مصوبه مرکز تحقیقات اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تأیید قرار گرفت. در پایان مراحل زیر جهت تعیین میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 انجام شد:

(۱) طراحی پرایمر

با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک، پرایمرها برای ژن SLC26A4 و ژن مرجع، طراحی و ساخته شدند. در مطالعه

حاضر، ژن GAPDH به عنوان ژن استاندارد و مرجع انتخاب گردید.

(۲) استخراج کل RNA حلزون گوش و سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA REVERT AID FIRST STRAND SYNTHESIS انجام گرفت. همچنین جذب نوری (OD= Optical Density) نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ بررسی شد [۱۷،۱۳].

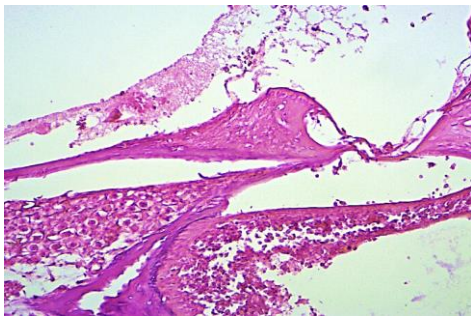
(۳) آزمایش (qRT-PCR= Quantitative real-time polymerase chain reaction)

به منظور تعیین میزان بیان نسبی ژن

(Cycle threshold) CT مربوط به هر نمونه و ژن کنترل داخلی (مرجع) آن در گروه‌های آزمایش و کنترل با استفاده از روش (qRT-PCR) بدست آمد. سپس با استفاده از رابطه‌ی تعیین بیان نرمالیزه شده یا نسبی ژن (CT کنترل داخلی-CT ژن هدف)، CT نرمالیزه شده (ΔCT) ژن SLC26A4 در گروه‌های مواجهه و کنترل محاسبه گردید. از طرفی عدد ΔCT برحسب لگاریتم بر پایه ۲ می‌باشد؛ لذا برای تبدیل عدد لگاریتمی ΔCT به حالت خطی باید عدد $2^{-\Delta CT}$ بدست آمده برای هر نمونه در رابطه‌ی $2^{-\Delta CT}$ قرار داده شود. بدین صورت، عدد ΔCT بدست آمده برای هر نمونه در فرمول $2^{-\Delta CT}$ قرار داده شد و میزان بیان نسبی ژن (Relative gene expression) یا نرمالیزه شده ژن SLC26A4 مربوط به هر نمونه‌ی گروه‌های آزمایش و همچنین گروه کنترل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta CT}$ بدست آمد. بر همین اساس، میزان بیان نسبی ژن یا نرمالیزه شده SLC26A4 بدست آمده‌ی نمونه‌ها در هر گروه مواجهه و کنترل میانگین گرفته شد و عدد محاسبه شده به عنوان میزان بیان نسبی ژن هدف در آن گروه در نظر گرفته شد. در پایان، بدین روش نیز GENE FOLD CHANGE یا به عبارتی دیگر، نسبت میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 مربوط به هر گروه

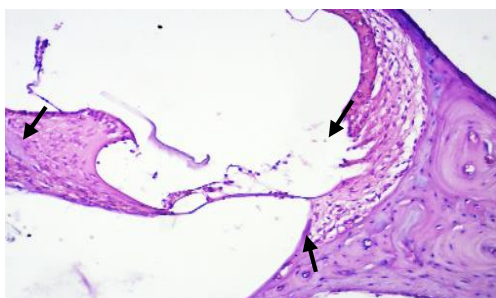
نتایج مطالعات ریخت‌شناسی و آسیب‌شناسی

بررسی میکروسکوپی بافت‌ها و تصویر برداری از آن‌ها نشان داد که بافت حلزون گوش نمونه‌ی گروهی که ۶ روز با صدای بنفش مواجهه داشت (گروه مواجهه N_2)، پس از ۷ روز از قطع مواجهه آن با صدای بنفش، آسیب بیشتری دیده بود. به علاوه، نتایج نشان داد که غشای رایسنر، بازال لامینا و گانگلیون عصب شنوایی در نمونه‌ی این گروه صدمه مکانیکی بیشتری دیده بود. تصاویر مورفولوژیک و پاتولوژیک بافت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل که بوسیله میکروسکوپ نوری ($500\mu m$) تهیه شد در اشکال (۱، ۲ و ۳) نشان داده شده است.



شکل ۱- تصویر بافتی مربوط به نمونه‌ی گروه کنترل ($500\mu m$)

Figure1- Tissue image of a control group sample ($500\mu m$)



شکل ۲- تصویر بافتی مربوط به نمونه‌ی گروه مواجهه

N_1 پس از ۷ روز از قطع مواجهه ($500\mu m$)

Figure 2- Tissue image of the N_1 exposure group sample, 7 days after cessation of noise exposure ($500\mu m$)

آزمایش به گروه کنترل بدست آمد [۹]. همواره GENE FOLD CHANGE مربوط به گروه کنترل (نرمال) برابر با عدد ۱ می‌شود بدلیل اینکه نسبت میزان بیان نسبی ژن هرگروه نسبت به خود آن گروه برابر عدد ۱ می‌شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه پس از جمع‌آوری داده‌ها، از نرم افزار SPSS 23 جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. نتایج تکنیک qRT-PCR به صورت مقادیر بیان نرمالیزه شده بود. از آنالیزهای آماری TUKEY'S MULTIPLE COMPARISON TEST-ANOVA برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید. جهت تعیین توزیع نرمال یا غیر نرمال بودن متغیرهای کمی از آزمون SHAPIRO-WILK استفاده گردید و حاصل محاسبات آماری، نرمال بودن توزیع داده‌ها را نشان داد. همچنین مقادیر $P-VALUE < 0.05$ لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

گزارشات اندازه‌گیری تراز فشارصوت محفظه

نتایج اندازه‌گیری نشان داد که نحوه‌ی چیدمان سیستم‌های صوتی در محفظه به صورتی بوده که تراز فشار صوت در تمامی نقاط محفظه یکنواخت بوده و همه‌ی نمونه‌ها در تماس با صدای بنفش قرار داشتند. همچنین نتایج نرم افزار SPECTRUM ANALYZER نشان داد که حدود فرکانس و تراز فشار صوت تولیدی در محفظه، کاملاً مشابه با گستره فرکانسی و تراز فشار صوت مدنظر (حدود فرکانسی ۲۰۰۰۰-۴۰۰۰۰ هرتز و تراز فشارصوت ۱۲۰-۱۱۵ دسی بل) برای انجام مطالعه حاضر بوده است.

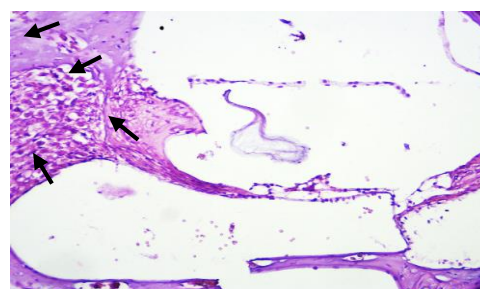
جدول ۱- میانگین و انحراف معیار میزان بیان نسبی یا نرمالیزه شده ژن SLC26A4 گروه‌های مواجهه و گروه کنترل

Table 1- Mean and standard deviation of relative or normalized expression of SLC26A4 gene in exposure and control groups

گروه ها	میانگین	انحراف معیار
N ₁	۰/۰۱۸	۰/۰۰۴۹
N ₂	۰/۰۰۴۳	۰/۰۰۲۷
کنترل	۰/۰۴۹۹	۰/۰۱۲۹۲

بحث

امروزه را می‌توان عصر فناوری و شکوفایی تمامی زمینه‌های علمی-پزشکی، تکنولوژی و شناخت مسیرهای مبارزه با مسائل و مشکلات عمده جوامع بشری نام‌گذاری کرد؛ لذا در این مطالعه سعی شد که دو مورد از اثراتی که آلودگی صوتی می‌تواند بر روی انسان‌ها داشته باشد بوسیله تکنیکی که دست مایه بشر و از پیشرفت‌های جدید متخصصان پزشکی می‌باشد مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرد. از این اثرات می‌توان به تغییرات الگوی بیان ژن SLC26A4 و تقویت بروز نقص شنوایی حسی-عصبی به صورت غیر سندرمی و یا سندرمی اشاره کرد. از مهم‌ترین یافته‌های این مطالعه، تغییرات الگوی بیان ژن SLC26A4، آسیب دائمی نورون‌های بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی می‌باشد از طرفی بر اساس مطالعات [۶-۴]، بروز نقص شنوایی حسی-عصبی در اثر تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های مرتبط با سیستم شنوایی، آسیب دائمی نورون‌های بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی رخ می‌دهد؛ لذا می‌توان گفت که یکی از مهم‌ترین اثرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی مواجهه با صدای بنفش، می‌تواند بروز نقص شنوایی غیرسندرمی/سندرمی حسی-عصبی باشد. روش‌های رایج تشخیص تغییرات الگوی بیان ژنی عبارتند از: بافت‌برداری از حلزون گوش، بررسی بیان ژن و میزان آن به وسیله تکنیک (qRT-PCR) و همچنین توالی ژنی



شکل ۳- تصویر بافتی مربوط به نمونه‌ی گروه مواجهه N₂ پس از ۷ روز از قطع مواجهه (۵۰۰µm)

Figure 3- Tissue image of the N₂ exposure group sample, 7 days after cessation of noise exposure (500µm)

نتایج آزمایش qRT-PCR

نتایج نشان داد که در گروه مواجهه N₁ پس از ۷ روز از قطع مواجهه، کاهش میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 نسبت به سطح نرمال اتفاق افتاده است. در واقع میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 در این گروه، ۰/۳۶ برابر نسبت به گروه کنترل کمتر بود. (GENE FOLD CHANGE = ۰/۳۶) و تفاوت بیان ژن به شکل معنی‌داری بین این گروه آزمایش نسبت به کنترل مشاهده شد (P=۰,۰۰۶). همچنین نتایج نشان داد که گروه مواجهه N₂ پس از ۷ روز از قطع مواجهه، کاهش میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 نسبت به سطح نرمال (کنترل) از خود نشان داده است. به عبارتی، میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 در این گروه، ۰/۰۸ برابر نسبت به گروه کنترل کمتر بود (GENE FOLD CHANGE = ۰/۰۸) و از طرفی پس از انجام آزمون آماری، تفاوت بیان ژن به شکل معنی‌داری بین این گروه آزمایش در مقایسه با کنترل (نرمال) مشاهده گردید (P=۰,۰۰۱). هم چنین نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن در گروه مواجهه N₂، کاهش بیشتری نسبت به گروه N₁ داشته است. (جدول ۱)

(SEQUENCY) از نظر جهش‌های ناحیه کدکننده به روش تعیین توالی (ARMS(Arbitrary Refraction Mutation System)، DHPLC(Denaturing high performance liquid chromatography)، PCR(Polymerase chain reaction) و با استفاده از مارکرهای STR (Short tandem repeat) انجام می‌گیرد [۲ و ۱۸-۲۰]. همچنین نتایج مثبت و منفی کاذب و تهاجمی بودن این تکنیک-های مولکولی-سلولی، استفاده از آن‌ها را با مشکل مواجهه ساخته است. بر همین اساس، در این مطالعه سعی شد که صحت و دقت کار آزمایشگاهی به میزان قابل توجهی بالا باشد تا از بروز خطای آزمایشگاهی کاسته شود و با سطح اطمینان بیشتری نتایج اعلام گردد. در این مطالعه، اثرات مواجهه با صدای بنفش که جزء اصوات با حدود فرکانسی بالا محسوب می‌شود، بر روی میزان بیان ژن SLC26A4 در بافت حلزون گوش مورد پژوهش قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان گفت که این نوع صدا تاثیر معنی‌داری در میزان بیان نسبی ژن SLC26A4 داشته و الگوی بیان ژنی آن را تغییر داده است. برخلاف مطالعه حاضر، بیشتر مطالعاتی که در حیطه بیان ژن و ارتباط آن با صدای ناخواسته صورت گرفته است، تنها اثرات اصوات ناهنجار دارای یک فرکانس مشخص را بر روی میزان بیان ژن‌ها بررسی کرده است [۱۱، ۱۲، ۲۱، ۲۲]. درحالی که در این مطالعه، صدای ناخواسته‌ی دارای طیفی از فرکانس‌های مختلف در محدوده شنوایی انسان (۲۰-۲۰۰۰۰ هرتز) با تمرکز بر حدود فرکانسی بالا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از طرفی همانند مطالعات مشابه اشاره شده، در این مطالعه نیز مدت زمان مواجهه، کوتاه و به صورت حاد در نظر گرفته شده است. همچنین می‌توان میزان تفاوت معنی‌دار بیان ژن SLC26A4 در گروه‌های مواجهه نسبت به سطح نرمال را ناشی از جهش ژنی دانست. مطالعاتی مشابه در همین زمینه انجام شده و نشان داده است که تغییرات معنادار میزان بیان ژن، ناشی از جهش ژنی است، نظیر مطالعه که توسط Nejat و همکاران صورت گرفت و نتایج آن نشان داد که تغییرات

قابل توجه میزان بیان ژن CX26 (ژن مستعد بروز نقص شنوایی) در افراد، مربوط به این است که ۳۸/۲۳ درصد افراد دارای نقص شنوایی حسی-عصبی، جهش در ژن CX26 را نشان دادند [۲۳] و یا در مطالعه‌ای مشابه که نشان داده شد، تغییرات قابل توجه میزان بیان ژن CX26 در افراد، مربوط به این است که ۱۳ کروموزوم (۱۳٪) در ژن CX26 جهش داشتند که بالاترین شیوع به جهش 35DELG مربوط می‌شد. جهش واریانت 35DELG ژن CX26 در ایران، شایع‌ترین جهش شناخته شده (هموزیگوت و هتروزیگوت مرکب به ترتیب در ۴۴٪ و ۳۳٪) ناشنوایی مرتبط با واریانت های CX26) می‌باشد [۲۴]. این ژن همانند ژن SLC26A4 مستعد بروز نقص شنوایی حسی-عصبی بوده لذا این فرضیه را مطرح می‌کند که پارامترهای تاثیرگذار بر روی میزان بیان این ژن می‌تواند به صورت مشابه بر روی میزان بیان ژن SLC26A4 نیز موثر باشد. جهت بررسی دقیق‌تر این موضوع و ارتباط بین تغییرات میزان بیان این ژن و جهش، می‌توان از نقشه‌های هموزیگوسیتی به کمک مارکرهای STR واقع در جایگاه کروموزومی DFNB4 استفاده نمود. از طرفی در این مطالعه، صدای بنفش تاثیر به سزایی بر روی میزان بیان ژن هدف داشته است و سبب کاهش معنی‌دار میزان بیان آن در بافت حلزون گوش گردیده است. بر همین اساس، در ادامه به مطالعاتی مشابه که استنباط آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر ارتباط دارد، اشاره می‌شود. برای مثال، مطالعه‌ای توسط Zhou و همکاران با هدف بررسی اثرات صوت دارای تراز فشار صوت ۹۸ dB (در مدت زمان ۲ ساعت در روز) و حدود فرکانسی ۲۰-۲ کیلو هرتز بر روی میزان بیان H3K9 گوش داخلی موش صورت گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که میزان بیان H3K9 در هسته‌های سلول‌های موئی خارجی در اثر ترومای آکوستیک کاهش پیدا کرده بودند [۴] یا مطالعه‌ای که توسط Yang و همکاران بر روی نوع خاصی از موش انجام شد که با صوت دارای تراز فشار

صوتی ۱۲۰ دسی بل (طی مدت ۱ ساعت در روز) و حدود فرکانسی ۷-۱۰ کیلوهرتز تماس داشتند. نتایج آزمایشات حاکی از کاهش معنی دار میزان بیان ژن های TACII و MHCII در ماکروفاژها و مونوسیت های غشای باسیلار بود [۲۵]. نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر ارتباط و همخوانی دارد. از طرفی مطالعه ای جهت بررسی بیان انواع HSP در اثر مواجهه همزمان گرما و صدای بیش از حد مجاز صورت گرفت. نتایج آن نشان داد که پس از ۳ روز اول مواجهه توام استرس گرمایی و صدای ناهنجار به مدت ۴ ساعت در روز و طی مدت زمانی ۵ روز با تراز فشار صوت ۹۵-۱۰۶ دسی بل و فرکانس ۱۰۰ هرتز سبب افزایش معنی داری در میزان بیان ژن های مربوط به پروتئین شوک گرمایی گوش داخلی موش ها در مقایسه با گروه کنترل شده بود [۱۰] که استنباط این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر منطبق نیست. از دیگر یافته های این مطالعه آن است که مواجهه با صدای بنفش، اثرات نامطلوبی مانند آسیب بافت حلزون گوش و تغییرات مورفولوژیکی-فیزیولوژیکی سلول های عصبی ایجاد کرده است به طوری که این صدمات مکانیکی بازگشتناپذیر در غشاء نورون های بافت حلزون گوش با افزایش مدت زمان تماس بیشتر شده است. مطالعه ای که نشان داد تماس با اصوات ناخواسته، صدمات دائمی به سیستم کورتی که شامل تخریب استروسیلیکا سلول های موئی، تخریب سلول های موئی خارجی (OHCs= Out Hair Cells) و گاهی سلول های موئی داخلی (IHCs= Inlet Hair Cells) می باشد، وارد کرده است [۱۴].

همچنین نتایج مطالعه ای که نشان داد، آسیب حلزون گوش در اثر تماس با اصوات ناخواسته یک فرآیند تخریب چند عاملی می باشد که در اثر استرس های مولکولی-سلولی و بیولوژیکی شامل استرس اکسیداتیو، التهاب و تحریک پذیری و همچنین تنش های مکانیکی مستقیم رخ می دهد که این پاسخ های تنشی سبب مرگ سلولی نکروتیک و آپوپتوتیک می شود [۲۶]. از طرفی

مطالعاتی نشان داد که مواجهه کوتاه مدت و یا طولانی مدت با صدای ناخواسته می تواند سبب آزاد شدن رادیکال های سوپراکسیداز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز در اجزاء سلولی بافت های مختلف از جمله گوش شود. آزادی این رادیکال ها می تواند نقش توکسیکی برای سلول بافت ایجاد کند و در نهایت روی تغییرات مولکولی و پارامترهای فیزیولوژیکی آن تاثیر داشته باشد [۲۷]. استنباط این مطالعات کاملاً منطبق با یافته های مربوط به مطالعات ریخت شناسی و آسیب شناسی بافت حلزون گوش در این مطالعه می باشد. همچنین صدای بنفش، دارای حدود فرکانسی بالا یعنی ۲۰-۴ کیلو هرتز بود لذا این فرضیه را مطرح می کند که این نوع صوت ناخواسته به دلیل انرژی بالا، بیشترین تاثیر را بر روی میزان بیان ژن هدف و آسیب بافت حلزون گوش داشته است. کاربرد نتایج این مطالعه ارتباط دارد به کسانی که در محیط های صنعتی در مواجهه با اصوات ناخواسته هستند به خصوص افرادی که ژنوم سیستم شنوایی آن ها نسبت به عامل اصوات با تراز فشار صوت بیش از حد مجاز، حساسیت بیشتری دارند که از این دسته از افراد می توان به جمعیت زنان شاغل در صنایع اشاره کرد. با توجه به اینکه شناخت دقیق و کامل آلودگی صوتی نیازمند جمع آوری اطلاعات آماری در بلند مدت می باشد. در نتیجه این مطالعه می تواند به عنوان گامی پیش رونده جهت بررسی جامع تر این نوع از آلودگی محسوب شود.

نتیجه گیری

به طور کلی می توان استنباط کرد که با تداوم زمان مواجهه با صوت بنفش، میزان کاهش بیان ژن SLC26A4 و آسیب به غشاء نورون های بافت حلزون گوش بیشتر می گردد. از طرفی این سطح از کاهش بیان در ژن SLC26A4 و آسیب دائمی غشای رایسنر و بازال لامینا در بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی، منجر به تقویت بروز نقص شنوایی حسی-عصبی پیش

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با شماره شناسه اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1398.220 و شماره طرح ۹۸-۳-۹۹-۴۵۸۸۶ می‌باشد. بر همین اساس، پژوهشگران به جهت حمایت‌های مالی و پشتیبانی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران برای انجام این طرح نهایت قدردانی را دارند.

References

- 1- Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12(2):57-64.
- 2- Mohseni M, Azizi F, Bazazzadegan N, Dehghani A, Sayfati M, Taghdiri M, Jamali P, et al. Screening of DFNB4 locus in Iranian Families with Hereditary Hearing Impairment. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2008; 10(4):395-400 (In Persian).
- 3- Park H, Shaukat S, Liu XZ, Hahn S, Naz S, Ghosh M, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *Journal of Medical Genetics* 2003; 40(4):242-8.
- 4- Zhou X-X, Chen S, Xie L, Ji Y-Z, Wu X, Wang W-W, et al. Reduced Connexin26 in the mature cochlea increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *International journal of Molecular Sciences* 2016; 17(3):301-308.
- 5- Sun D, Li X. The effect of noise exposure on the expression of NOS mRNA in the cochlea. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi. Journal of Clinical Otorhinolaryngology* 2000; 14(8):373-4.
- 6- Pfenninger K, Maylie-Pfenninger M-F, Friedman L, Simkowitz P. Lectin labeling of sprouting neurons: III. Type-specific glycoconjugates on

رونده و افزایش احتمال متاستاز در بافت حلقون گوش می‌گردد. لذا باید در جهت کاهش و یا حذف این موارد، اقدامات کنترلی و پیشگیرانه صورت گیرد در غیر اینصورت، افزایش هزینه‌های درمانی دولت، محدودیت‌های جسمی و روانی برای افراد، کاهش نیروی انسانی کارآمد برای کشور، کاهش کیفیت زندگی و کار را می‌توان نتیجه عدم توجه به این مسئله دانست. در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که اثرات این نوع صوت بر روی میزان بیان انواع LncRNA های دخیل در نقص شنوایی مورد پژوهش قرار گیرد.

growth cones of different origin. *Developmental Biology* 1984; 106(1):97-108.

- 7- Zare S, Hasheminejad N, Elahi Shirvan H, Hasanvand D, Hemmatjo R, Ahmadi S. Assessing Individual and Environmental Sound Pressure Level and Sound Mapping in Iranian Safety Shoes Factory. *Romanian Journal of Acoustics and Vibration* 2018; 15(1):20-5 (In Persian).
- 8- Chen G-D. Prestin gene expression in the rat cochlea following intense noise exposure. *Hearing Research* 2006; 222(1-2):54-61.
- 9- 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. *Hearing Research*. 2018; 36(3):49-54.
- 10- Gong T-W, Fairfield DA, Fullarton L, Dolan DF, Altschuler RA, Kohrman DC, et al. Induction of heat shock proteins by hyperthermia and noise overstimulation in Hsf1-/- mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 2012; 13(1):29-37.
- 11- Patel M, Hu Z, Bard J, Jamison J, Cai Q, Hu BH. Transcriptome characterization by RNA-Seq reveals the involvement of the complement components in noise-traumatized rat cochleae. *Neuroscience* 2013; 24(8):1-16.

- 12- Du F, Yin L, Shi M, Cheng H, Xu X, Liu Z, et al. Involvement of microglial cells in infrasonic noise-induced stress via upregulated expression of corticotrophin releasing hormone type 1 receptor. *Neuroscience* 2010; 167(3):909-19.
- 13- Han Y, Wang X, Chen J, Sha SH. Noise-induced cochlear F-actin depolymerization is mediated via ROCK 2/p-ERM signaling. *Journal of Neurochemistry* 2015; 133(5):617-28.
- 14- 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. *Hearing Research* 2011; 277(1-2):211-26.
- 15- Stansfeld SA, Matheson MP. Noise pollution: non-auditory effects on health. *British Medical Bulletin* 2003; 68(1):243-57.
- 16- Yildirim I, Kilinc M, Okur E, Tolun FI, Kilic MA, Kurutas EB, et al. The effects of noise on hearing and oxidative stress in textile workers. *Industrial Health* 2007; 45(6):743-9.
- 17- Alagramam KN, Stepanyan R, Jamesdaniel S, Chen DH-C, Davis RR. Noise exposure immediately activates cochlear mitogen-activated protein kinase signaling. *Noise & Health* 2014; 16(73):400-406.
- 18- Martins FTA, Ramos PZ, Svidnicki M, Castilho AM, Sartorato EL. Optimization of simultaneous screening of the main mutations involved in non-syndromic deafness using the TaqMan® OpenArray™ Genotyping Platform. *BMC Medical Genetics* 2013; 14(1):112-120.
- 19- Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2012; 17(2):212-218.
- 20- Birkenhäger R, Aschendorff A, Schipper J, Laszig R. Non-syndromic hereditary hearing impairment. *Laryngo-Rhino-Otologie* 2007; 86(4):299-309.
- 21- Hsu W-C, Wang J-D, Hsu C-J, Lee S-Y, Yeh T-H. Expression of connexin 26 in the lateral wall of the rat cochlea after acoustic trauma. *Acta Oto-Laryngologica* 2004; 124(4):459-63.
- 22- Zhang MY, Chen C, Xie XJ, XU SL, Guo GZ, Jin W. Damage to hippocampus of rats after being exposed to infrasound. *Biomedical and Environmental Sciences* 2016; 29(6):435-42.
- 23- Nejat M, Riaz alhosseini Y, Arzhanghi S, Bazazzadegan N, Toutounchi M, Najmabad H, et al. Frequency of Connexin 26 gene mutations in autosomal recessive deaf non-syndrome patients in Kermanshah province. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences (Behbood)* (2002-4); 9(2):32-40 (In Persian).
- 24- Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clinical Genetics* 2003; 64(1):65-9.
- 25- Yang W, Vethanayagam RR, Dong Y, Cai Q, Hu BH. Activation of the antigen presentation function of mononuclear phagocyte populations associated with the basilar membrane of the cochlea after acoustic overstimulation. *Neuroscience* 2015; 30(3):1-15.
- 26- 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. *Hearing Research* 2016; 33(3):283-94.
- 27- Manikandan S, Srikumar R, Parthasarathy NJ, Devi RS. Protective effect of *acorus calamus* L INN on free radical scavengers and lipid peroxidation in discrete regions of brain against noise stress exposed rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28(12):23-30.