

ORIGINAL RESEARCH PAPER

The Evaluation of GJB2 Gene Expression in the Cochlear Tissue Exposed to White Noise

Monireh Khadem¹, Elham Kazemi Rad², Mohammad Reza Monazzam Esmailpoor¹, Maryam Mirzaei Hotkani¹, Sajjad Mozaffari¹, Amir Abbasi Garmaroudi^{1*}

¹ Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2021-01-09

Accepted: 2021-08-13

ABSTRACT

Introduction: One of the most important complications of exposure to noises is changes in the gene expression patterns. Irreversible damage to the inner ear, such as noise-induced hearing loss (NIHL), is caused by tissue damage and changes in the gene expressions in the auditory system. Changes in the GJB2 gene expression pattern lead to autosomal deafness at different loci. The present study aims to evaluate the GJB2 gene expression in cochlear tissue exposed to white noise.

Material and Methods: In this study, ten male Westar rats were divided into two experimental (W_1 , W_2) groups of six rats and a control (normal) group of four rats. Two experimental groups were exposed to constant white noise in the frequency range of 100-20000 Hz and the sound pressure level of 118-120 dB. In order to study the histology and gene expression, after a cochlea biopsy, the histological tests, RNA extraction, cDNA synthesis, and qRT-PCR analysis were performed.

Results: The results showed that the transcript level of GJB2 was significantly decreased in both experimental groups W_1 and W_2 by 0.02 and 0.12-fold, respectively ($p < 0.05$). Also, the results of the histological study showed that cochlear tissue was more seriously damaged in the W_1 group than W_2 .

Conclusion: It can be concluded that a significant reduction in the GJB2 gene expression and irrevocable damage to auditory nerve ganglion and Reissner membrane (vestibular membrane) caused changes in the gene expression patterns in cochlear tissue and developed the risk of non-syndromic sensorineural hearing.

Keywords: Hearing impairment, Cochlear tissue, GJB2 expression, White noise

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Khadem M, Kazemi Rad E, Monazzam Esmailpoor MR, Mirzaei Hotkani M, Mozaffari S, Abbasi Garmaroudi A. The Evaluation of GJB2 Gene Expression in the Cochlear Tissue Exposed to White Noise, J Health Saf Work. 2022; 12(1): 25-39.

1. INTRODUCTION

Researches have shown that high-pitched abnormal ambient sounds can cause irreversible damage and alter the molecular structure and gene expression patterns of adult ear tissue. A few studies have been conducted on the effects of noise exposure on the expression of genes involved in hearing impairment. One type of noise with a range of audible frequencies is white noise located in the auditory range. This noise could induce hearing impairment. A study has been performed by Hsu et al. (2004) to investigate the effects

of acoustic trauma on the connexin 26 (CX26) protein expression in the dorsal wall of rat cochlear tissue. Rats were exposed to white noise (4kHz) for two days. Western blot analysis showed that this protein expression after exposure to white noise in the dorsal (posterior) wall of the cochlear tissue increased significantly, and also the results showed that the amount of protein 26 (CX26) in spiral ligament fibrocytes of the dorsal wall in the cochlea increased. In addition, in the human auditory system, cochlear tissue and its hair cells are severely affected by acoustic trauma, resulting in hair cell death, molecular changes, and gene expression pattern, or NIHL. Furthermore, in the human

* Corresponding Author Email: a-garmaroudi@alumnus.tums.ac.ir

auditory system, cochlear tissue hair cells are the most important sensory neuron receptors of sound when exposed to sounds (white noise). Therefore, cochlear tissue can be used as an ideal tissue sample for tissue pathology studying. The present study aimed at evaluating the GJB2 gene expression in cochlear tissue exposed to white noise.

2. MATERIAL AND METHODS

In this study, ten male Westar rats were divided into two experimental groups of six rats and a control group of four rats. Two experimental groups were exposed to constant white noise with a frequency range of 100-20000 Hz and a sound pressure level of 118-120 dB (8 hours of exposure per day). Ten rats with specified weight and age (7-8 weeks, 190-200 g) were placed inside a high-performance audio chamber. One week before the exposure, they maintained under controlled conditions of the experimental environment (12 h light/12 h darkness cycle, temperature of 25 ± 2 ° C, and humidity of 45-52%). Then, they were exposed to noise at a specific time from 10 am to 6 pm, and during the period, the necessary tests were performed, and water and food were sufficiently provided to the rats. Exposure to white noise took place inside a four-cell high-performance audio chamber measuring $60 \times 52 \times 40$ cm³. The sound transmission loss from inside the chamber to the outside was 50 dB. The walls of this chamber were composed of layers of iron sheet, cellulose, air layer, cellulose, iron sheet, and cellulose, respectively. Two holes on the chamber walls were used for ventilation of the chamber. A peripheral blowing pump with a flow of 70 lit/min was used to supply enough oxygen for animal samples inside this chamber. The desired noise level was generated using an ADOBE AUDITION version 13.0.7 and distributed using two speakers in each chamber (6 Ω, 20 w). Frequency and sound pressure level measurements were performed using SPECTRUM ANALYZER version 5.0.2. The following steps were taken to determine the GJB2 gene expression: 1) Histological tests, 2) Designing the primer using Primer 3 v:0.4.0, 3) Extraction of total cochlear RNA and cDNA synthesis 4) Using the qRT-PCR method to determine gene expression. At the first step, the rats were anesthetized by exposure to carbon dioxide in a cubic chamber, then the skull bone was dissected, and the brain of the specimens was removed. The cochlear tissue, including the inner ear, located inside the pterygium, was

removed from the tympanic and temporal sections of the auditory system using surgical instruments. The cochlear tissue inside the microtubule for extract RNA and histological tests were performed (tissue fixation, alcohol dehydration, clearing with xylene, impregnation with Paraffin, molding, and cutting from the samples with a microtome in thickness of 5-10 μm and painting of hematoxylin and eosin). Finally, a morphological-pathological examination was performed on cochlear tissue using light microscope images at 200 microns. QRT-PCR products were identified according to the instructions of the 2X REAL-TIME MASTER MIX FOR SYBR KIT. First, CT of each sample and its internal control gene (reference) was obtained in the experimental and control groups using the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique. Then, to determine the normalized or relative CT of the gene (Δ CT) using EXCELL, Δ CT of the target gene in the experimental and control groups was calculated according to the equation (CT target gene - CT internal control). Next, to convert the logarithmic number Δ CT to linear mode, the calculated Δ CT number for each sample was substituted in the equation $2^{-\Delta ct}$, and the relative or normalized GJB2 gene expression for each sample of the experimental groups as well as the control group was obtained using equation $2^{-\Delta ct}$. Accordingly, the normalized (relative) gene expression of samples in each exposure and control group was averaged, and the calculated number was considered as the relative expression of the target gene in that group. Finally, gene expression fold changes, as the ratio of values for noise-exposed rats relative to unexposed controls was obtained. Gene expression fold changes in the control group always equal 1 because the relative gene expression ratio in each group divided by itself becomes 1. In addition, primer sequences of the target gene in the qRT-PCR technique were given in Table 1. Statistical calculations were performed using Graph Pad Prism version 9.0.0.121. Relative gene expression value data are mean \pm standard deviation and were normalized to the internal control. The normal distribution hypothesis for quantitative variables was evaluated through the Shapiro-Wilk test, which was considered statistically significant ($P < 0.05$). Differences between the experimental and control groups were evaluated via Tukey's Multiple Comparison Test, followed by post hoc pairwise comparisons to determine which differences

Table 1. Primer sequences of the target gene used in QRT-PCR

| Oligo Name | | Sequences: 5-3 | Tm |
|------------|---------|------------------------------|-------|
| GJB2 | Forward | 5'-TCACTGTCCTCTTCATCTTCCG-3' | 59.51 |
| | Reverse | 5'-CTTCCGTTTCTTTTCGTGTCTC-3' | 57.88 |
| GAPDH | Forward | 5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3' | 61.58 |
| | Reverse | 5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3' | 61.32 |

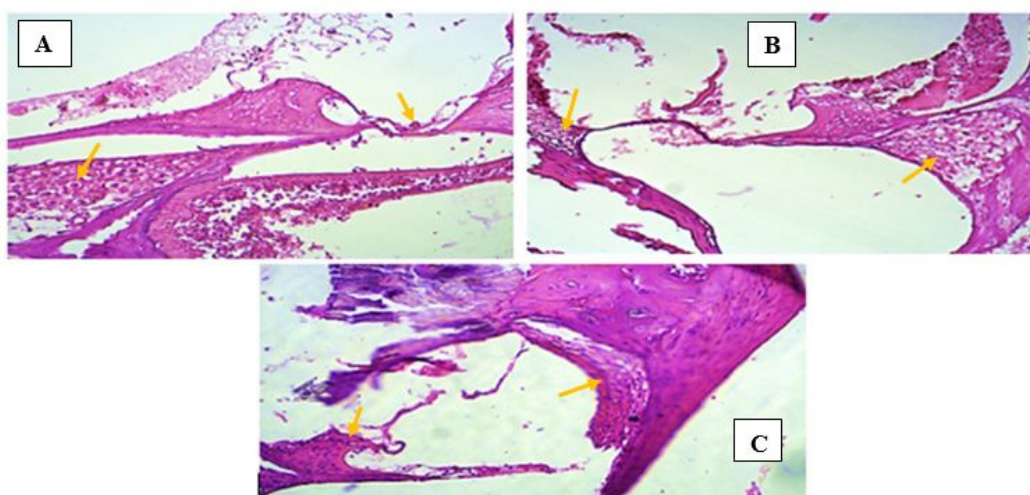


Fig. 1. The cochlear tissue images of exposed rats (B, C) compared to the unexposed rats (A). The tissue was shot through the hematoxylin and eosin staining method. The tissue pathology images show irreversible damage in different sections at both time points of the exposure (B, C) compared to the non-exposure (A).

Table 2. The mean and standard deviation of relative or normalized GJB2 gene expression

| Group | Mean | Standard Deviation |
|----------------|--------|--------------------|
| W ₁ | 0.0005 | 0.00022 |
| W ₂ | 0.0027 | 0.00100 |
| Control | 0.0233 | 0.01383 |

account for the result of the more inclusive test. In this study, the sample size and type of exposures in the tested time-periods, according to the nature of this study, were obtained experimentally and by surveying the results of similar studies in this field of research. The study was done under the principles of the Ethics Research Committee of the School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences (Code: IR.TUMS.SPH.REC.1398.220).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of sound measurements showed that sound pressure level was uniform in different parts of the chamber (the difference of measurements was less than 5%), and all samples were exposed to white noise by increasing the

distance of floor surface from the chamber, the sound pressure level was also increased. Also, the SPECTRUM ANALYZER software results showed that the frequency range and produced sound pressure level in the chamber were quite similar to the target frequency spectrum and sound pressure level for the present study. In addition, results showed that the cochlear tissue and hair cells of the sample in the W₁ group indicated more serious damage than the W₂ group. Besides, in the sample of the W₁ group, the ganglion of the auditory nerve and the Reissner membrane were more damaged (Fig. 1). One week and 1 hour after cessation of noise exposure, the transcript level of GJB2 was decreased in both W₁ and W₂ groups by 0.02 and 0.12-fold, respectively (Table 2).

Compared to the W_2 group, there were significant differences in gene expression between both W1 ($P = 0.031$) and W2 ($P = 0.048$) groups.

4. CONCLUSIONS

It was concluded that a significant reduction in the GJB2 gene expression and irrevocable damage to auditory nerve ganglion and Reissner membrane

contributed to changes in the gene expression patterns in cochlear tissue and developed the risk of non-syndromic sensorineural hearing.

5. ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to express their gratitude to the Assistance of Research and Technology at Tehran University of Medical Sciences.

بررسی میزان بیان ژن GJB2 در بافت حلزون گوش مواجهه یافته با صدای سفید

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

^۱ گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۲ گروه انگل و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

چکیده

مقدمه: یکی از مهم‌ترین عوارض مواجهه با نویزها، تغییرات الگوی بیان ژن‌های سیستم شنوایی می‌باشد. آسیب‌های برگشت‌ناپذیر گوش داخلی نظیر NIHL در اثر آسیب بافتی و تغییرات بیان ژن‌های سیستم شنوایی ایجاد می‌گردد. تغییرات الگوی بیان ژن GJB2، باعث بروز ناشنوایی اتوزومال در لوکوس‌های مختلف می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن GJB2 در بافت حلزون گوش مواجهه یافته با صدای سفید است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۱۰ سر رت ویستار به دو گروه مواجهه و یک گروه کنترل تقسیم‌بندی شدند. دو گروه آزمایش در معرض مواجهه با صدای سفید یکنواخت (حدود فرکانسی ۲۰۰۰-۱۰۰ هرتز و مقدار تراز فشار صوت ۱۲۰-۱۱۸ دسی‌بل) قرار گرفتند. جهت مطالعات بافت‌شناسی و بیان ژن، پس از بافت‌برداری از حلزون گوش، به ترتیب آزمایشات بافت‌شناسی، استخراج RNA، سنتز cDNA و آنالیز qRT-PCR انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن GJB2 در گروه مواجهه W_1 و گروه W_2 به ترتیب ۰/۲ و ۰/۱۲ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($p\text{-value} < 0.05$). از طرفی نتایج مطالعه بافت‌شناسی نشان داد که بافت حلزون در گروه مواجهه W_1 آسیب بیشتری نسبت به W_2 دیده بود.

نتیجه‌گیری: کاهش معنادار این سطح از میزان بیان نسبی ژن GJB2 و آسیب بازگشت‌ناپذیر گانگلیون عصب شنوایی و غشای رایسنر، سبب تغییرات الگوی بیان این ژن در بافت حلزون گوش و تقویت بروز نقص شنوایی غیر سندرمی حسی-عصبی می‌گردد.

کلمات کلیدی: نقص شنوایی، بافت حلزون گوش، بیان GJB2، صدای سفید

نحوه استناد به این مقاله

خادم منیره، کاظمی راد الهام، منظم اسماعیل پور محمدرضا، میرزائی حتکنی مریم، مظفری سجاد، عباسی گرمارودی امیر. بررسی میزان بیان ژن GJB2 در بافت حلزون گوش مواجهه یافته با صدای سفید. فصلنامه بهداشت و ایمنی کار. ۱۴۰۱؛ ۱۲ (۱): ۲۵-۳۹.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبه: a-garmaroudi@alumnus.tums.ac.ir

مقدمه

افراد در زندگی روزمره و عادی خود با صدای سفید به دلیل دارا بودن طیفی از فرکانس‌های قابل شنیدن، در تماس هستند. هم‌چنین در عصر جدید، پیشرفت تکنولوژی به‌گونه‌ای بوده که تحت تأثیرات آن، استفاده از ابزار و ماشین‌آلات در تمام ابعاد زندگی انسان به‌صورت گسترده نفوذ کرده است. بر همین اساس، این اتفاق می‌تواند گستره وسیع‌تری از افراد را در زندگی روزمره و محیط کار خود در تماس با صدای سفید قرار دهد که اثرات زیان‌آور آن مانند نقص شنوایی حسی-عصبی بر روی انسان شناخته شده است. کاهش شنوایی با نقص حسی-عصبی به‌عنوان شایع‌ترین نقص، علل ژنتیکی-محیطی بسیاری دارد که بیش از نیمی از این موارد ژنتیکی هستند و از سطح هتروژنی بالایی برخوردار می‌باشد و مابقی از نوع محیطی است که از مهم‌ترین آن می‌تواند مواجهه با صدای سفید در زندگی روزمره و محیط کار انسان باشد (۹). مطالعات نشان داده است که در میان انواع مختلف ناشنوایی، ناشنوایی غیر سندرمی حسی-عصبی با وراثت اتوزومی مغلوب (ARNSHL)^۱ به‌عنوان ۸۰ درصد از موارد ناشنوایی پیش از تکلم مادرزادی به‌حساب می‌آید. تفاوت معنی‌دار میزان بیان نسبی ژن GJB2^۲ نسبت به سطح نرمال، ناشی از جهش ژنی در آن است. تغییرات الگوی بیان ژن GJB2 به‌تنهایی علل ۵۰ درصد ناشنوایی‌های ژنتیکی غیر سندرمی حسی-عصبی اتوزومی مغلوب می‌باشد (۱۰). عامل مادرزادی به‌تنهایی نمی‌تواند منجر به بروز نقص شنوایی حسی-عصبی شود بلکه عامل دیگری همچون مواجهه با صدای ناهنجار، در کنار عامل نقص مادرزادی، نقش بالقوه‌ای برای ایجاد این نوع نقص شنوایی ایفا می‌کند و هم‌چنین می‌تواند به‌تنهایی بر روی میزان بیان نسبی این ژن اثر گذاشته و سبب تغییرات معنی‌دار بیان ژن، آسیب سلول‌های موئی بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی گردد که درنهایت این تغییرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی بافت حلزون گوش، منجر به

بروز نقص شنوایی حسی-عصبی شود. به‌عبارتی دیگر، بروز نقص شنوایی حسی-عصبی در اثر تغییرات الگوی بیان پروتئین‌های مرتبط با سیستم شنوایی، منجر به آسیب دائمی نورون‌های بافت حلزون گوش می‌گردد (۱۱-۱۳). از طرفی در سیستم شنوایی انسان، بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی آن، مهم‌ترین گیرنده حسی-عصبی صوت محسوب می‌شوند. این قسمت از سیستم شنوایی، به‌شدت تحت تأثیر ترومای آکوستیک قرار می‌گیرد که نتیجه آن منجر به مرگ سلول‌های موئی، تغییرات مولکولی و الگوی بیان ژنی و یا بروز نقص شنوایی ناشی از مواجهه با صدا (NIHL) (Noise-induced hearing loss) می‌شود (۶). بر همین اساس، بافت حلزون گوش می‌تواند به‌عنوان نمونه بافتی ایده آل برای بررسی این موضوع کاربرد داشته باشد. مطالعات متعدد در ارتباط با اثرات صدا و نقش آن در تغییر بیان ژن‌های مشابه با ژن هدف در این مطالعه صورت گرفته است، مطالعه Gong و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که در هر سه نقطه زمانی ۳ روز، ۵ روز و ۶ روز پس از قطع مواجهه توأم استرس گرمایی و صدای ناهنجار (تراز فشار صوت ۱۰۶-۹۵ دسی‌بل و فرکانس ۱۰۰ هرتز)، میزان بیان ژن‌های مربوط به پروتئین‌های شوک گرمایی گوش داخلی موش‌های گروه مواجهه یافته نسبت به گروه کنترل در سطح معنی‌داری تغییر کرده بود. از این‌رو این عوامل محیطی-فیزیکی می‌تواند نقش به‌سزایی در تغییرات الگوی بیان ژنی HSP^۳ داشته باشد (۲). مطالعات نشان داده است که تغییرات مولکولی گانگلیون، مردگی سلول‌های موئی و پیشرفت در کاهش سطح شنوایی افراد در نتیجه تغییر الگوی بیان ژن SLC4A2/CTL2^۴ می‌باشد (۳). علاوه بر این، تغییرات گلیکوکانژوگه‌های سطح جسم سلولی نورون‌ها پس از مواجهه با صدای ناخواسته علاوه بر بافت گوش در سایر بافت‌ها از جمله بافت قلب نیز گزارش شده است (۴). تحقیقات نشان داده است که اصوات ناهنجار محیطی با شدت بالا می‌تواند آسیب‌های جبران‌ناپذیری ایجاد کنند و سبب تغییر در ساختمان مولکولی و الگوی بیان ژنی

3 Heat stress protein

1 Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss
2 Gap junction beta-2 protein

یکنواخت با حدود فرکانسی ۲۰۰۰-۱۰۰ هرتز و مقدار تراز فشار صوت ۱۲۰-۱۱۸ دسی بل (۸ ساعت مواجهه در روز) قرار گرفتند. هر دو گروه مواجهه W_1 و W_2 به صورت مشابه، ۶ روز با صدای سفید تماس داشتند، اما ۳ رت گروه مواجهه W_1 بلافاصله پس از گذشت ۱ هفته از پایان مدت تماس خود و ۳ رت گروه مواجهه W_2 بلافاصله پس از گذشت ۱ ساعت از پایان مدت تماس خود بی‌هوش و کشته شدند و بعد نمونه‌گیری از بافت حلزون گوش رت‌ها، آزمایش‌های ژنتیکی و بافت‌شناسی بر روی آن‌ها صورت گرفت. در واقع میزان تغییرات بیان نسبی ژن GJB2 نسبت به سطح نرمال و مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌های گروه مواجهه W_1 ، یک هفته پس از پایان مدت تماس با صدای سفید و دیگری (W_2) ۱ ساعت پس از پایان مدت تماس با صدای سفید، مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین میانگین سطح نرمال بیان ژن GJB2، از ۴ سر رت گروه کنترل، تحت همان شرایط ولی بدون اینکه مواجهه با صدای سفید داشته باشند، استفاده گردید و بعد نمونه‌گیری از بافت حلزون گوش رت‌های این گروه، آزمایشات بر روی آن‌ها صورت گرفت. جهت مطالعه بافت‌شناسی حلزون گوش گروه‌های مواجهه، آزمایشات بافت‌شناسی و تصویربرداری از بافت به وسیله میکروسکوپ نوری (LABOMED, USA) برای ۲ سر رت از گروه‌های آزمایش انجام گردید؛ به طوری که ۱ سر آن از گروه W_1 و ۱ سر دیگر از گروه W_2 در نظر گرفته شده بود. از طرفی جهت بافت‌شناسی حلزون گوش در حالت نرمال و بدون تماس با صدای سفید، ۱ سر رت از گروه کنترل انتخاب گردید و آزمایشات بافت‌شناسی و تصویربرداری از بافت آن با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام گرفت (۱۱).

شرایط آزمایشگاهی

۱۰ سر رت (ویستار نر) با وزن و سن مشخص (۷-۸ هفته، ۲۰۰-۱۹۰ گرم) درون محفظه صوتی با کارایی بالا قرار گرفت تا شرایط محیطی مانند نور، دما و رطوبت برای همه گروه‌ها یکسان باشد. بر اساس مطالعات پیشین، رت

بافت گوش بالغین گردند (۱). مطالعه‌ای توسط Hsu و همکاران (۲۰۰۴) با هدف بررسی اثرات ترومای آکوستیک بر روی میزان بیان پروتئین کانکسین ۲۶ (CX26) در دیواره پشتی بافت حلزون گوش رت صورت گرفت. رت‌ها با صدای سفید (۴kHz) به مدت ۲ روز مواجهه داشتند. آنالیز حاصل از آزمایش وسترن بلات نشان داد که میزان بیان این پروتئین بعد از مواجهه با صدای سفید در دیواره پشتی (خلفی) بافت حلزون گوش افزایش قابل توجه داشته و همچنین میزان پروتئین کانکسین ۲۶ (CX26) در فیبروسیت‌های لیگامنت مارپیچی دیواره پشتی حلزون گوش افزایش پیدا کرده است (۵). بسیاری از مطالعات به سایر اثرات منفی مواجهه با صدای سفید بر روی انسان مانند افزایش ریسک ابتلا به فشارخون و بیماری قلبی-عروقی، تغییرات ترشح غدد درون‌ریز، کم‌خونی، اختلال در خون‌رسانی به مفاصل و استخوان، آسیب سیستم عصبی بینایی، بیماری‌های گوارشی، آزرده‌گی، کاهش کارایی و تغییرات غلظت سرمی پرداخته‌اند (۱۴). تاکنون در ارتباط با اثرات صدای سفید به‌عنوان یکی از عوامل غیر مادرزادی بر روی تغییرات میزان بیان ژن GJB2 و نقش تغییرات فیزیولوژیکی-پاتولوژیکی ناشی از آن در بروز نقص شنوایی حسی-عصبی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن GJB2 در بافت حلزون گوش مواجهه یافته با صدای سفید است.

روش کار

انتخاب گروه مطالعه

این مطالعه از نوع تجربی بوده که بر روی رت‌های (ویستار) انجام گرفت. برای انجام این مطالعه آزمایشگاهی، گروه‌های مورد-شاهد انتخاب گردید. در این مطالعه در مجموع ۱۰ سر رت (ویستار نر) انتخاب گردید که از این میان ۶ سر رت به‌عنوان گروه آزمایش (مورد) و ۴ سر رت به‌عنوان گروه کنترل (شاهد) استفاده شد. ۶ سر رت گروه آزمایش به‌صورت مساوی به دو گروه مواجهه W_1 و W_2 تقسیم و در معرض مواجهه با صدای سفید

ها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند و سیکل روزانه آن‌ها ۱۲ ساعت نور-۱۲ ساعت تاریکی بود و یک هفته قبل از شروع مواجهه با شرایط محیط آزمایش سازگار شدند سپس در یک زمان مشخص از ۱۰ صبح تا ۶ عصر در مواجهه با صدا قرار گرفتند (۷-۸، ۱۵-۱۶). تماس با صدای سفید، درون محفظه صوتی با کارایی بالا به ابعاد ۴۰×۵۲×۶۰ سانتی‌متر مکعب انجام گرفت. دیواره‌های این محفظه مرکب بوده و به ترتیب از لایه‌های ورق آهن، سلولز، لایه هوا، سلولز، ورق آهن و سلولز استفاده شده بود. همچنین افت انتقال صدا از درون این محفظه به بیرون آن ۵۰ دسی‌بل بود.

آماده‌سازی بافت برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین آئوزین (H&E) صورت گرفت. جهت ثبوت بافت، پس از جدا کردن نمونه از بدن موجود زنده بلافاصله به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت، در نهایت پس از انجام مراحل آزمایشات بافت‌شناسی از جمله تصاویر بافتی که توسط میکروسکوپ نوری (LABOMED، USA) گرفته شده بود، نتایج مطالعه بافت‌شناسی حلزون گوش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بعد از انجام آزمایشات مواجهه و بافت‌شناسی، مراحل زیر جهت تعیین میزان بیان ژن GJB2 انجام گرفت:

۱) طراحی پرایمر

با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک (PRIMER ۳ V:۰.۴۰) و نیز مطالعات مشابه قبلی، پرایمرها برای ژن GJB2 و ژن HOUSEKEEPING (ژن مرجع یا خانه‌دار) طراحی شدند و جهت سفارش برای ساخت آن‌ها توسط شرکت‌های معتبر اقدام شد. در این مطالعه، ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع و استاندارد انتخاب گردید.

حجم نمونه

در این مطالعه، حجم نمونه و نوع مواجهه‌ها در بازه‌های زمانی آزمایش‌شده با توجه به ماهیت مطالعه، به صورت تجربی-آزمایشگاهی و نیز با بررسی نتایج مطالعات مشابه در این زمینه تحقیقاتی به دست آمد (۸، ۲، ۱۱).

آلودگی صوتی

آلودگی صوتی موردنظر به وسیله نرم‌افزار کامپیوتری ADOBE AUDITION (شرکت ADOBE نام انگلیسی: CC AUDITION شماره نسخه: ۷.۱۳.۰) تولید و از طریق ۲ بلندگو نصب‌شده (۲۰ وات و ۶ اهم) در سقف هر محفظه پخش شد. جهت بررسی همگن بودن تراز فشار صوت در نقاط مختلف محفظه، به وسیله دستگاه صداسنج مدل CELL ۴۹۱ ساخت کشور آلمان، تراز فشار صوت در نقاط و ارتفاعات مختلف نسبت به کف محفظه اندازه‌گیری شد.

آزمایشات بافت‌شناسی و ژنتیکی

جهت مطالعه بافت‌شناسی حلزون گوش نمونه‌های گروه‌های مواجهه و کنترل، ابتدا نمونه‌های حیوانی به وسیله مواجهه با گاز کربن دی‌اکسید درون یک محفظه بی‌هوش شدند سپس بیوپسی (بافت‌برداری) از حلزون گوش جهت استخراج RNA، سنتز cDNA و همچنین

۲) استخراج کل RNA حلزون گوش و سنتز cDNA غلظت و خلوص RNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودرآپ بررسی شد. جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مراحل استخراج RNA به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت:

۱) میکرو تیوب‌های حاوی رسوب سلولی و یا بافت لیز شده روی یخ قرار گرفتند و به ازای هر ۱ میلیون سلول و ۵۰ میلی‌گرم بافت، ۳۰۰ میکرو لیتر تریزول اضافه شد؛ سپس ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس کرده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. ۲) ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به آن اضافه و ۱۵ ثانیه به خوبی مخلوط گردید. ۳) میکرو تیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفتند؛ سپس در rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۴) به میکرو تیوب‌های حاوی

4 Optical Density

جدول ۱. توالی (seq 5-3) پرایمر های ژن هدف

| دمای ذوب | seq 5-3 | نام ژن | |
|----------|------------------------------|---------|-------|
| ۵۹/۵۱ | 5'-TCACTGTCCTTTCATCTTCCG-3' | Forward | GJB2 |
| ۵۷/۸۸ | 5'-CTTCCGTTTCTTTTCGTGTCTC-3' | Reverse | |
| ۶۱/۵۸ | 5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3' | Forward | GAPDH |
| ۶۱/۳۲ | 5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3' | Reverse | |

(ΔCT)، با استفاده از نرم افزار ΔCT , EXCELL هدف در گروه های مواجهه و کنترل طبق فرمول (CT) کنترل داخلی-CT ژن هدف) محاسبه شد. در ادامه با توجه به اینکه عدد ΔCT بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ می باشد. حال برای تبدیل عدد لگاریتمی ΔCT به حالت خطی بایستی عدد ΔCT محاسبه شده برای هر نمونه در فرمول $2^{-\Delta CT}$ قرار گیرد. بدین صورت، عدد ΔCT محاسبه شده برای هر نمونه در فرمول $2^{-\Delta CT}$ قرار گرفت و میزان بیان نسبی ژن^۷ یا نرمالیزه شده GJB2 مربوط به هر نمونه گروه های مواجهه و همچنین گروه کنترل به وسیله فرمول $2^{-\Delta CT}$ به دست آمد. بر همین اساس از NORMALIZED (RELATIVE) GENE EXPRESSION به دست آمده نمونه ها 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 نهایت بدین روش نیز GENE FOLD CHANGE یا به عبارتی دیگر، نسبت میزان بیان نسبی ژن GJB2 مربوط به هر گروه آزمایش به گروه کنترل به دست آمد (۸). علاوه بر این، توالی پرایمر های ژن هدف در تکنیک qRT-PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

(۴) بررسی تغییرات به وجود آمده در سطوح بیان ژن GJB2 گروه مواجهه در مقایسه با گروه شاهد بدین منظور از محاسبات آماری به وسیله نرم افزار PRISM GRAPH PAD V: ۹.۰.۰.۱۲۱ استفاده

7 Relative gene expression

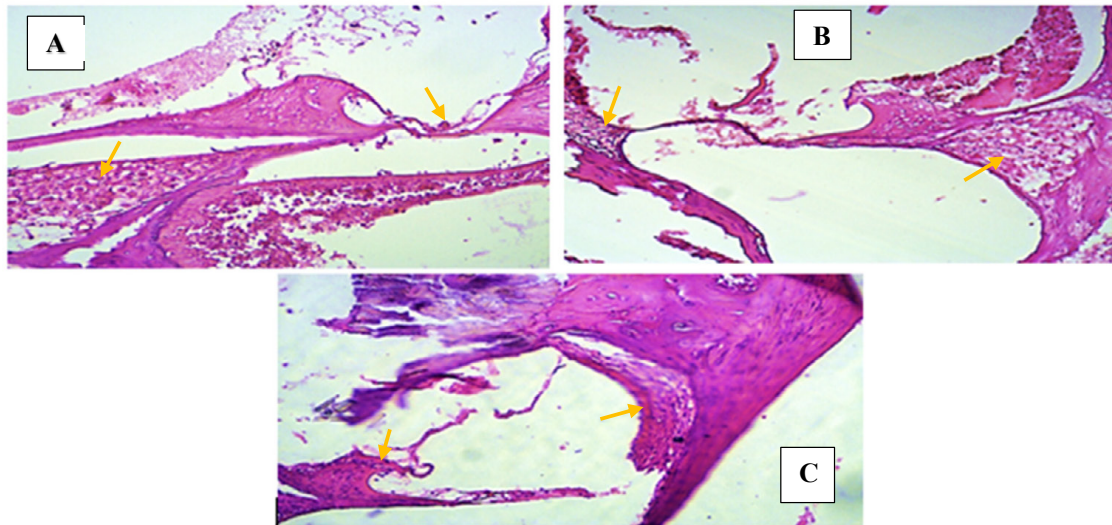
مایع شفاف به اندازه برابر با آن ایزوپروپانول اضافه شد و این ترکیب را به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. (۵) مخلوط در rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. (۶) فاز رویی به آرامی و با استفاده از سمپلر زرد دور ریخته و ۱ میلی متر اتانول ۷۵٪ به رسوب اضافه شد و خیلی کوتاه ورتکس گردید. (۷) محلول در rpm ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد. (۸) فاز رویی دور ریخته شد و طی مدت ۱۵ دقیقه رسوب نیمه خشک شد و پس از نیمه خشک شدن رسوب، ۲۰ تا ۳۰ μ l آب DEPC به آن اضافه گردید و در نهایت بعد از اندازه گیری OD نمونه ها، با استفاده از فرمول $N_{171} = N_{272}$ غلظت آن ها به $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ رسانده شد و برای سنتز cDNA آماده گردید. سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت cDNA REVERT AID FIRST STRAND SYNTHESIS انجام گرفت (۶). (۷)

(۳) آزمایش (qRT-PCR) به منظور تعیین میزان بیان ژن

محصولات qRT-PCR طبق دستورالعمل کیت ۲X REAL TIME MASTER MIX FOR SYBR

شناسایی شدند. در ابتدا CT^6 مربوط به هر نمونه و ژن کنترل داخلی (مرجع) آن در گروه های مواجهه و کنترل با استفاده از تکنیک (qRT-PCR) به دست آمد. سپس جهت تعیین CT نرمالیزه شده یا نسبی ژن

5 Quantitative real-time polymerase chain reaction
6 Cycle threshold



شکل ۱. تصاویر بافت حلزون گوش رت های مواجهه یافته (B,C) در مقایسه با مواجهه نیافته (A). بافت‌ها با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده‌اند. تصاویر آسیب‌شناسی بافت، صدمات برگشت‌ناپذیری را در بخش‌های مختلف در هر دو نقطه زمانی مواجهه (B, C) در مقایسه با عدم مواجهه (A) نشان می‌دهد.

نتایج مطالعه بافت‌شناسی

نتایج نشان داد که بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی نمونه گروه مواجهه W_1 تخریب بیشتری را نسبت به گروه W_2 نشان دادند. از طرفی نتایج نشان داد که در نمونه این گروه، گانگلیون عصب شنوایی و غشای رایسنر آسیب بیشتری دیده بود. تصاویر بافت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل که به وسیله میکروسکوپ نوری در مقیاس $200 \mu\text{m}$ تهیه شد (شکل ۱).

گزارشات آزمایش qRT-PCR

پس از انجام محاسبات، GENE FOLD CHANGE مربوط به گروه کنترل (نرمال) برابر با عدد ۱ به دست آمد. بر همین اساس، یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان بیان نسبی ژن GJB2 در گروه مواجهه W_1 ، 0.2 برابر نسبت به گروه کنترل کمتر بود ($\text{GENE FOLD CHANGE} = 0.2$) و از طرفی پس از انجام آزمون آماری TUKEY'S-ANOVA MULTIPLE COMPARISON TEST تفاوت بیان معنی‌داری بین این گروه آزمایش در مقایسه با

شد. نتایج qRT-PCR به صورت مقادیر CT نرمالیزه شده بود. (CT کنترل داخلی-CT ژن هدف). با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آنالیزهای آماری TUKEY'S MULTIPLE-ANOVA COMPARISON TEST برای ارزیابی داده‌ها استفاده گردید. فرضیه توزیع نرمال برای متغیرهای کمی به وسیله آزمون SHAPIRO-WILK ارزیابی شد و مقادیر $P\text{-VALUE} < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

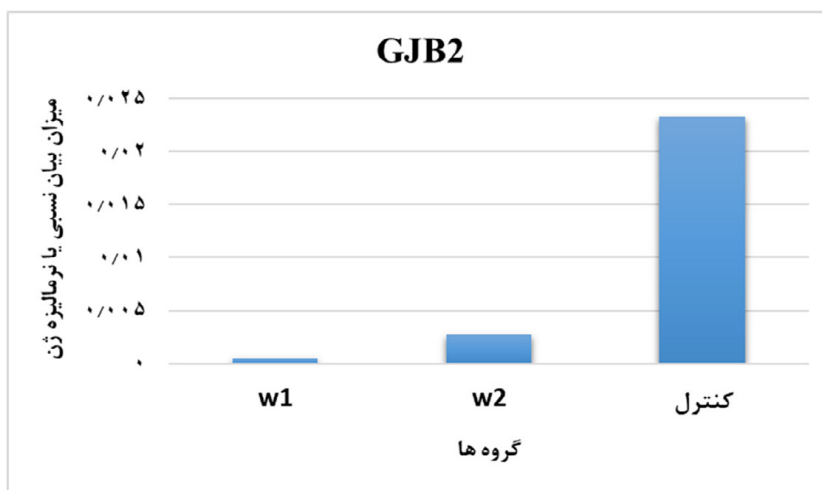
یافته‌ها

نتایج اندازه‌گیری تراز فشار صوت محفظه

نتایج اندازه‌گیری نشان داد که تراز فشار صوت در نقاط مختلف محفظه یکنواخت بوده است (اختلاف بین اندازه‌گیری‌ها در نقاط مختلف کمتر از ۵ درصد) و هرچه فاصله از سطح کف محفظه بیشتر شده، تراز فشار صوت نیز افزایش یافته است. هم‌چنین در این مطالعه، نتایج نشان داده است که متوسط تراز فشار صوت در مجاورت با بلندگو در صدای سفید ۱۱۸ دسی‌بل بوده است.

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار میزان بیان نسبی یا نرمالیزه شده ($2^{-\Delta CT}$) ژن GJB2

| گروه‌ها | میانگین | انحراف معیار |
|----------------|---------|--------------|
| W ₁ | ۰/۰۰۰۵ | ۰/۰۰۰۲۲ |
| W ₂ | ۰/۰۰۲۷ | ۰/۰۰۱۰۰ |
| Control | ۰/۰۲۳۳ | ۰/۰۱۳۸۳ |



نمودار ۱. مقایسه میانگین میزان بیان نسبی یا نرمالیزه شده ژن GJB2 در گروه‌های آزمایش و کنترل

جدول ۳. تفاوت بیان نسبی ژن GJB2 در گروه‌های مواجهه نسبت به کنترل

| گروه‌ها | Gene fold change | p-value |
|----------------|------------------|---------|
| W ₁ | ۰/۰۲ | ۰/۰۳۱ |
| W ₂ | ۰/۱۲ | ۰/۰۴۸ |

بحث

امروزه اثرات انواع آلودگی‌های محیطی بر زندگی جوامع بشری ثابت شده است و کشورهای مختلف دنیا در جهت حذف و کاهش آن راهکارهای گوناگونی را تدوین نموده‌اند، اما در این بین، آلودگی صوتی به دلیل تأثیرات تدریجی آن، کمتر مورد توجه و بررسی قرار گرفته است در حالی که این عامل بر روی انسان‌ها اثرات نامطلوبی می‌گذارد که بارزترین آن‌ها نقص شنوایی حسی-عصبی و تغییرات الگوی بیان ژن بافت سیستم شنوایی می‌باشد. آلودگی صوتی به‌عنوان مشکل اساسی و عمده امروز

کنترل (نرمال) مشاهده گردید ($P = 0.031$). هم‌چنین نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی ژن GJB2 در گروه مواجهه W₁، ۰/۱۲ برابر نسبت به گروه کنترل کمتر بود ($\text{GENE FOLD CHANGE} = 0.12$) و تفاوت بیان معنی‌داری بین این گروه آزمایش نسبت به کنترل مشاهده شد ($P = 0.048$). مقایسه تفاوت بیان بین این دو گروه نسبت به کنترل نشان داد که تفاوت بیان گروه W₁ در مقایسه با W₂ بیشتر بوده است. نتایج آنالیز بیان ژن GJB2 در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جوامع بشری مطرح است و شناخت دقیقی از اثرات منفی آن بر روی انسان‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. تاکنون در مطالعات انجام شده در مورد صدا و اثرات آن (۱-۴، ۶، ۱۱-۱۳) روی پارامترهای بیان ژن، نتایج متفاوتی حاصل شده است که اکثر نتایج آن‌ها کاملاً منطبق با یافته‌های این پژوهش می‌باشد و در صورت تناقض در برخی از نتایج می‌تواند ناشی از خطاهای آزمایشگاهی، تفاوت زمان مواجهه و نوع صدا باشد. از آنجایی که بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی سیستم کورتی به‌عنوان مهم‌ترین گیرنده حسی-عصبی صوت به‌هنگام مواجهه با اصواتی نظیر صدای سفید در سیستم شنوایی انسان محسوب می‌شوند و تغییرات مولکولی و الگوی بیان ژنی در آن‌ها می‌تواند عامل اصلی بسیاری از نقص‌های شنوایی حسی-عصبی در جمعیت افراد در معرض مواجهه با آلودگی صوتی باشد (۶)؛ لذا این فرضیه را مطرح می‌کند که نمونه بافتی حلزون گوش، می‌تواند به‌عنوان یک نمونه بافتی ایده آل برای بررسی میزان تغییرات بیان نسبی ژن و چگونگی بروز نقص شنوایی غیر سندرمی حسی-عصبی کاربرد داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با صدای سفید سبب تغییرات الگوی بیان ژن GJB2، آسیب دائمی نورون‌های بافت حلزون گوش و گانگلیون عصب شنوایی گردیده است. از طرفی بر اساس مطالعات (۱۱-۱۳)، 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. بر همین اساس می‌توان گفت که یکی از مهم‌ترین اثرات مواجهه با صدای سفید، می‌تواند بروز نقص شنوایی حسی-عصبی غیر مادرزادی باشد. در مطالعات مختلفی که بر روی بیان پروتئین سیستم شنوایی (بافت حلزون گوش و سلول‌های موئی) انجام شده است، مشاهده شده که میزان بیان پروتئین‌های مختلف بافت حلزون گوش نظیر β -ACTIN, PRESTIN و β -SPECTRIN، پس از تماس با اصوات ناهنجار در زمان و فرکانس‌های مختلف که تراز فشار صوتی بین ۱۲۰-۱۱۰ دسی‌بل داشتند

به میزان قابل‌توجهی نسبت به کنترل افزایش داشته است (۸، ۵، ۲ و ۱۸-۱۷) که استنباط این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر ارتباط و هم‌خوانی ندارد. این تناقض می‌تواند ناشی از تفاوت زمان مواجهه، نوع صدا و ماهیت پروتئین باشد. از طرفی یافته‌های این مطالعه با نتایج مطالعه‌ای که اثرات مواجهه توأم استرس گرمایی و صدای ناهنجار بر روی میزان تغییرات بیان (تفاوت بیان) ژن‌های مربوط به پروتئین شوک گرمایی را بررسی می‌کرد (۲) و یا نتایج مطالعه‌ای که توسط Cho و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، هم‌خوانی دارد و نشان داد که از عوارض دیگر آلودگی صوتی، تغییرات در الگوی بیان ژنی است (۱۹). هم‌چنین نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعات مشابه که نشان داده‌اند ارتباط معناداری بین تغییرات الگوی بیان ژن و بروز نقص شنوایی حسی-عصبی وجود دارد انطباق دارد. از جمله مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۱۶) با هدف بررسی اثرات صدای ناخواسته بر روی میزان بیان H3K9 و ارتباط آن با نقص شنوایی (۱۱) و هم‌چنین نتایج مطالعاتی (۲۰-۲۱) که با هدف بررسی ارتباط بین مواجهه با صدای ناخواسته و میزان تغییرات بیان ژنی اپیتلیوم حساس بافت حلزون گوش و غشای باسیلار صورت گرفت، نشان‌دهنده نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. مقایسه تفاوت بیان بین دو گروه مواجهه نسبت به کنترل نشان داد که تفاوت بیان گروه مواجهه W_1 در مقایسه با W_2 بیشتر بوده است. این یافته بیانگر آن است که پس از گذشت یک هفته از قطع مواجهه، تغییرات بیان ژنی بیشتر شده است که این نتیجه همسو با یافته مطالعه‌ای است که بر روی میزان بیان انواع پروتئین‌های شوک گرمایی صورت گرفته است (۲).

از دیگر یافته‌های مهم پژوهش در این مطالعه آن است که مواجهه با صدای سفید، اثرات نامطلوبی نظیر تغییرات جسم سلولی نورون‌های عصبی، تخریب بافت حلزون و سلول‌های موئی بر روی سیستم شنوایی نمونه‌ها ایجاد کرده است. صدمات مکانیکی بافت حلزون گوش، شامل ترک خوردگی و شکستگی ردیف سوم سلول‌های موئی وقتی که با تراز فشار صوت ذکر شده در تماس بودند

کنترلی و پیشگیرانه بار اقتصادی، روانی و اجتماعی این عارضه را کاهش داد.

نتیجه گیری

به‌طور کلی می‌توان استنباط کرد که کاهش معنادار این سطح از میزان بیان نسبی ژن GJB2 و آسیب بازگشت‌ناپذیر گانگلیون عصب شنوایی و غشای رایسنر، سبب تغییرات الگوی بیان این ژن در بافت حلزون گوش و تقویت نقص شنوایی غیر سندرمی حسی-عصبی می‌گردد. لذا پیامد عدم توجه به این موضوع می‌تواند به رشد فزاینده نقص شنوایی در بین جمعیت‌های مختلف با نژادهای مختلف منجر شود. بر این اساس، بایستی به افراد جامعه آموزش و مشاوره‌های بهینه و مناسبی که در راستای پیشگیری از تأثیر عامل محیطی-فیزیکی صدا بر تغییرات ژنی (نقص ژنی) اجزاء سیستم شنوایی (بافت حلزون گوش) انسان باشد، داده شود و یا با استفاده از روش‌های کنترل مهندسی و یا درمانی، ریسک آسیب به سیستم شنوایی افراد جامعه کاهش یابد. در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود، اثرات مواجهه توأم استرس گرمایی و صدای سفید بر روی میزان بیان این ژن و یا ژن‌های دیگری که دخیل با این موضوع هستند بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران به شناسه اخلاق IR.TUMS.SPH.REC.1398.220 و طرح ۹۸-۳-۹۹-۴۵۸۸۶ است. لذا پژوهشگران به جهت حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران برای انجام این طرح نهایت سپاسگزاری را دارند.

نسبت به حالت نرمال و عدم تماس با صوت، بیشتر بوده است و همچنین نشان داده شد که پس از گذشت یک هفته از قطع مواجهه، افزایش پیش‌رونده آسیب حلزون گوش وجود داشته است. در همین راستا، مطالعه‌ای که توسط Khozani و همکاران (۲۰۰۷) تحت عنوان تأثیر آلودگی صوتی در انتشار گلیکوکانژوگه‌های سطح سلول در گانگلیون مارپیچی نوزاد موش انجام گرفت، شواهد نشان داد که اصوات ناهنجار، تغییرات بافتی در نورون‌های گانگلیون ایجاد کرده است و تغییرات مولکولی می‌تواند با اختلال در پتانسیل غشایی نورون و مسیر شنوایی، منجر به نقص شنوایی مادرزادی در نوزاد موش شود (۲۲) که نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر ارتباط و هم‌خوانی دارد. یافته‌های مطالعات دیگری نشان داد، مواجهه با اصوات شدید می‌تواند منجر به تولید بیشتر اسید نیتریک در نورون‌گانگلیون مارپیچی گوش شود که تولید بیش از مقدار کافی آن به‌طور مستقیم بر روی تغییر الگوی بیان ژنی، مولکولی گانگلیون، مردگی سلول‌های موئی، اختلال در روند تکاملی بافت گوش و بروز نقص شنوایی حسی-عصبی در نتیجه تغییرات الگوی ژنی و آسیب بافتی، نقش دارد که از این میان، مهم‌ترین تأثیر بر روی تغییرات الگوی بیان ژنی است (۱۲، ۱۳). یافته‌های این مطالعات، همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. با توجه به اینکه صدای سفید بر روی میزان بیان ژن مستعد نقص شنوایی حسی-عصبی تأثیر به‌سزایی داشته است، در نتیجه باید تحقیقات بر روی این موضوع تا بررسی دقیق و کامل آن هم چنان ادامه یابد. کشف ژن‌هایی که اصوات ناهنجار بر روی آن‌ها تأثیر دارد و سبب بروز نقص شنوایی حسی-عصبی می‌شود، می‌تواند در مطالعات پاتوفیزیولوژی و توسعه راهکارهای مناسب، مفید باشد (۲۳). امید است که با نتیجه این مطالعه بتوان با اقدامات

REFERENCES

- Raphael Y, Wang Y, Lee MK. Intercellular contacts between chick stereocilia after acoustic overstimulation. *Hearing research*. 1994;73(1):85-91.
- 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.
- Kommareddi P, Nair T, Kakaraparthi BN, Galano MM, Miller D, Laczkovich I, et al. Hair cell loss, spiral ganglion degeneration, and progressive sensorineural hearing loss in mice with targeted deletion of Slc44a2/Ctl2. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2015;16(6):695-712.
- Monsefi M, Talei T. Changes of heart glycoconjugates by noise stress in mouse as an experimental model. *Journal of Applied Animal Research*. 2005;27(2):121-4. [persian].
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends in molecular medicine*. 2006;12(2):57-64.
- Mahdieh N., Riaz alhosseini Y., Arzhanghi S., Bazazzadegan N., Toutouchi 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. [persian].
- 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.
- Sun D, Li X. The effect of noise exposure on the expression of NOSmRNA in the cochlea. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi= Journal of clinical otorhinolaryngology*. 2000;14(8):373-4.
- Pfenninger K, Maylie-Pfenninger M-F, Friedman L, Simkowitz P. Lectin labeling of sprouting neurons: III. Type-specific glycoconjugates on growth cones of different origin. *Developmental biology*. 1984;106(1):97-108.
- 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 journal of medical & health science*. 2018;12(2):918-23. [persian].
- Hoshino T, Tabuchi K, Nishimura B, Tanaka S, Nakayama M, Ishii T, et al. Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;415(1):94-8.
- Eraslan E, Akyazi I, Ergül-Ekiz E, Matur E. Noise stress changes mRNA expressions of corticotropin-releasing hormone, its receptors in amygdala, and anxiety-related behaviors. *Noise & health*. 2015;17(76):141-7.
- 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.
- Chen G-D. Prestin gene expression in the rat cochlea following intense noise exposure. *Hearing research*. 2006;222(1-2):54-61.
- Cho Y, Gong T-WL, Kanicki A, Altschuler RA, Lomax MI. Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea. *Molecular brain research*. 2004;130(1-2):134-48.
- 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.
- 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.
22. Tahereh Kh, Zaman M, Zahra V, Farzaneh D, Mohammadreza A. The effect of noise pollution on the release of cell surface glycogen conjugates in the neonatal spiral ganglia. *Journal of Tehran University of Medical Sciences*. 2007;65(6):1-6. [persian].
23. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, et al. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 1998;351(8):394-98.