

فراوانی جهش 35delG در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان حسی - عصبی غیرسندرومی جسمی مغلوب

دکتر عیسی عبدی راد^۱، دکتر میرداود عمرانی^۲، مرتضی باقری^۳، دکتر احمد پرورش^۴

تاریخ دریافت ۸۷/۰۵/۲۷، تاریخ پذیرش ۸۷/۱۰/۲۵

چکیده

پیش زمینه و هدف: ناشنوایی شایع ترین اختلال حسی - عصبی ارثی است که به طور تقریبی ۱ در هر ۱۰۰۰ کودک تازه متولد شده را تحت تاثیر قرار می دهد. حداقل ۵۰ درصد از ناشنوایی ها ارثی بوده و تقریباً نیمی از ناشنوایی های ارثی به صورت جسمی مغلوب غیرسندرومی می باشد. صدها ژن در بروز ناشنوایی سندرومی و غیرسندرومی دخیل هستند. اختلال شنوایی غیرسندرومی DFNB1 از طریق جهش در ژن GJB2 (Gap Junction Beta 2)، رایج ترین دلیل ناشنوایی غیرسندرومی به صورت جسمی مغلوب می باشد. گرچه چندین جهش در ژن GJB2 شناسایی شده است، جهش نقطه ای 35 delG مسئول بروز اکثر ناشنوایی ها در جمعیت های مختلف می باشد. شناسایی جهش های ژن GJB2 در یک جمعیت ابزار تشخیصی برای نوع شایع ناشنوایی را فراهم می آورد و می تواند در تشخیص قبل از تولد مورد استفاده قرار گیرد. و همچنین در ارزیابی میزان خطر در افراد دارای خطر بالا در خانواده افراد میتلا مفید واقع گردد. هدف از انجام این مطالعه تعیین کردن وفور جهش 35 delG در ژن GJB2 در جمعیت ناشنوایان حسی - عصبی غیرسندرومی جسمی مغلوب در استان آذربایجان غربی بود.

مواد و روش کار: ۱۰۳ بیمار از ۸۱ خانواده با اختلال ناشنوایی حسی - عصبی غیرسندرومی با الگوی توارث جسمی مغلوب وارد مطالعه شدند. ۳-۵ میلی لیتر خون محیطی برای استخراج DNA اخذ گردید. DNA با روش استاندارد نمک اشباع استخراج شد. جهش 35 delG در بیماران با روش semi-nested PCR غربالگری شد. برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم EcoNI به انجام رسید. و سپس روی ژل آگاروز ۲ درصد تحت اشعه لامپ UV به مشاهده باندها پرداخته شد.

یافته ها: جهش هموزیگوت 35 delG در ۵ بیمار پیدا شد. ۶۷٪ (۶۹ نفر از ۱۰۳ بیمار) تک گیر و ۳۳٪ فامیلی بودند. ۴ نفر از ۵ بیمار که جهش 35 delG داشتند، حاصل ازدواج فامیلی بودند. ۲۰۶ کروموزوم از ۱۰۳ فرد ناشنوای غیرسندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب مورد بررسی قرار گرفتند و از این میان ۱۰ کروموزوم (۵ نفر) جهش 35 delG را نشان دادند. و فراوانی جهش 35 delG برابر ۴/۸۵٪ بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که ژن ها و یا جهش های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب در جمعیت استان آذربایجان غربی دخیل می باشند.

کلید واژه ها: ناشنوایی غیر سندرومی جسمی مغلوب (ARNSHL), GJB2, 35delG

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیستم، شماره اول، ص ۳۹-۳۴، بهار ۱۳۸۸

آدرس مکاتبه: بخش ژنتیک، بیمارستان مطهری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه. تلفن تماس: ۰۴۴۱-۲۲۴۰۱۶۶

Email: isaabdirad@umsu.ac.ir

مقدمه

تقریباً ۶۰٪-۵۰٪ از ناشنوایی های حسی - عصبی قبل از تکلم علت ژنتیکی داشته (۳) و در این میان ۷۰٪ موارد غیرسندرومی می باشد یعنی این که شخص ناشنوا، غیر از ناشنوایی اختلال

ناشنوایی رایج ترین نقص حسی - عصبی است و از هر ۱۰۰۰ کودک ۱ نفر با اختلال شنوایی شدید متولد می شود (۱،۲).

^۱ دانشیار ژنتیک پزشکی، بخش ژنتیک، بیمارستان مطهری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار ژنتیک، بخش ژنتیک، بیمارستان مطهری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ کارشناس ارشد ژنتیک، بخش ژنتیک، بیمارستان مطهری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ استادیار گوش، حلق و بینی، بخش گوش، حلق و بینی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

جهش در ژن GJB2 بوجود می‌آیند. در این مطالعه شیوع نسبی جهش ۳۵ delG در ژن GJB2 در جمعیت^۱ ARNSHL در استان آذربایجان غربی بررسی شده است.

مواد و روش کار

۱۰۳ بیمار از ۸۱ خانواده با ناشنوایی حسی - عصبی جسمی مغلوب برای جهش ۳۵ delG در ژن GJB2 بررسی شدند. با در نظر گرفتن ضریب همخوانی معادل یا بیشتر از 0.015625 به عنوان مرز روابط فامیلی، ۶۲ از ۸۱ (۷۶/۵۴٪) خانواده‌ها ازدواج فامیلی داشتند. شرایط ورود به مطالعه شامل موارد ذیل می‌باشد. (۱) نقص شنوایی غیر پیش رونده مادر زادی حسی-عصبی (قبل از تکلم)، (۲) یافته‌های غیر طبیعی در معاینه بالینی، تست‌های پاراکلینیک و سابقه پزشکی پیدا نشود. (۳) نقص شنوایی بر اساس الگوی توارث جسمی مغلوب در سابقه فامیلی باشد. ۳-۵ میلی لیتر خون محیطی برای استخراج DNA به روش نمک اشباع اخذ گردید (۱۳). جهش ۳۵ delG با روش semi-nested PCR غربال‌گری شد. در مرحله اول از PCR قطعاتی به طول ۲۸۵ باز تکثیر می‌یابد. پرایمرهای ۱۶۷ (5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3') و ۴۲۵ (R-5'-GACACGAAGATCAGCTGCAG-3') همان‌طور که قبلاً توصیف شده‌اند برای شناسایی جهش مورد نظر به کار می‌روند. برنامه PCR به شرح ذیل می‌باشد: دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و اکستنسین در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۳۵ سیکل). در مرحله دوم یک قطعه DNA به طول ۸۷ باز با بکارگیری پرایمر جدید دارای جهش ۳۵ delG تکثیر داده می‌شود. به طوری که حرف با فونت کوچک نشان دهنده ۲ نوکلئوتیدی است که با DNA الگو به صورت اشتباه مکمل می‌شود. اگر جهش ۳۵ delG وجود داشته باشد، یک سایت برش آنزیمی برای آنزیم EcoNI در قطعه تکثیر یافته تولید می‌شود. از این رو آنالیز به روش آنزیمی با استفاده از آنزیم EcoNI در مرحله بعد به آسانی ژنوتایپ‌های مختلف را در جایگاه جهش ۳۵ delG ژن GJB2 نشان می‌دهد.

هر واکنش PCR (۵۰ میکرولیتر) در semi-nested PCR شامل مواد ذیل می‌باشد. تریس کلراید ۵۰ میلی مولار با درجه PH معادل ۸/۳، منیزیم کلراید ۲ میلی مولار، هر یک از DNTPها با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار، از هر پرایمر ۳۵ delG (R-5'-CTGGTGGAGTGTTCcCtC-3')، ۱۶۷ یک میکرو مولار و ۲ میکرو لیتر از محصولات PCR به طول

دیگری ندارد. تقریباً ۷۷٪ ناشنوایی‌های غیرسندرومی جسمی مغلوب، ۲۲٪ جسمی غالب، ۱ درصد وابسته به X و کمتر از ۱ درصد میتوکندریایی هستند. لوکوس‌های مختلفی برای اختلال شنوایی غیرسندرومی در بروز ناشنوایی جسمی مغلوب شناسایی شده است.

لوکوس‌ها برای ژن‌هایی که به صورت جسمی غالب به ارث می‌رسند به شکل DFNA (Deafness, Neurosensory, Autosomal Dominant) و لوکوس‌ها برای ژن‌هایی که به صورت جسمی مغلوب به ارث می‌رسند به شکل DFNB می‌باشند. و از آن توارث وابسته به X به شکل DFN می‌باشد. اختلال شنوایی غیرسندرومی ۱ DFNB از جهش‌های ژن GJB2 بوجود می‌آید و ۵۰٪ موارد ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب را به خود اختصاص داده است (۴-۸). ۵۰٪ موارد باقی مانده ناشی از جهش‌های موجود در سایر ژن‌های متعدد می‌باشد که بسیاری از آن‌ها تنها در یک یا دو خانواده پیدا شده‌اند (۹).

اشکال ارثی ناشنوایی می‌تواند به فرم مادرزادی یا با شروع تاخیری، هدایتی، حسی - عصبی، یا فرم ترکیبی، خفیف تا بسیار شدید، پیش‌رونده یا غیرپیش‌رونده، یک طرفه یا دوطرفه، متقارن یا نامتقارن در شدت و فرم و هم‌چنین سندرومی یا غیرسندرومی باشد. سندروم‌های ژنتیکی که ناشنوایی را شامل می‌شوند عموماً مطابق با سایر سیستم‌ها طبقه بندی می‌گردند. اختلال شنوایی غیرسندرومی براساس ویژگی‌های شنوایی سنجی، سن شروع، وجود یا عدم وجود حالت پیش‌رونده و نحوه توارث طبقه بندی می‌شوند. برای طبقه بندی‌های جزئی‌تر بایستی به جایگاه ژن و شناسایی ژن‌های مسئول برای ناشنوایی حسی - عصبی توجه کرد. اختلال شنوایی غیرسندرومی DFNB۱ براساس الگوی توارث جسمی مغلوب به ارث رسید و به‌عنوان نقص شنوایی حسی - عصبی غیرپیش‌رونده و مادرزادی مشهود است. شدت ضعف شنوایی می‌تواند در اعضای یک خانواده متغیر باشد ولی عموماً ضعف شنوایی به صورت شدید تا بسیار شدید بوده، اگر چه موارد خفیف یا متوسط از نقص شنوایی نیز توصیف شده‌اند (۱۰-۱۲). ضعف در عملکرد vestibular وجود ندارد و کودکان مبتلا مشکلات تعادلی را تجربه نمی‌کنند. و تاخیر تکاملی ندارند. اختلال شنوایی غیرسندرومی DFNB۱، مسئول تقریباً ۵۰٪ از ناشنوایی‌های حسی - عصبی غیرسندرومی جسمی مغلوب شدید تا بسیار شدید در ایالات متحده آمریکا، فرانسه، انگلستان و نیوزیلند - استرالیا محسوب می‌شود (۱۱، ۱۲).

۷۵ تا ۸۰ درصد از موارد ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب هستند و از این مقدار ۵۰٪ از طریق جهش‌های GJB2 به وجود می‌آیند. تقریباً ۱۰ درصد از کل موارد تک‌گیر ناشنوایی از طریق

^۱ Autosomal Recessive Non Syndromic Hearing Loss

بحث و نتیجه گیری

ناشنوایی در دوران کودکی یک مشکل پزشکی جدی است که اگر به موقع تشخیص داده نشود می تواند عواقب غیر قابل جبرانی را در خصوص فرایند یادگیری و روابط اجتماعی کودک به دنبال داشته باشد. پیشرفت در مراحل تشخیص و درمان عوامل عفونی که منجر به ناشنوایی می گردد منجر به افزایش نسبی در شیوع ناشنوایی حسی - عصبی ارثی می شود و در نتیجه تمایل به شناسایی عوامل ژنتیکی دخیل در ناشنوایی افزون می گردد. جمع آوری اطلاعات اپیدمیولوژیک در مورد گستره جهش های ناشنوایی در جمعیت مورد نظر، برای افزایش میزان کارایی تشخیصی روش های مولکولی و کاهش هزینه های تشخیصی ضروری است.

جهش در ژن GJB2 رایج ترین دلیل برای ناشنوایی مادر زادی با درجه شدید تا بسیار شدید در بسیاری از جمعیت ها می باشد (۷،۸). در بسیاری از جمعیت های اروپایی جهش ۳۵ delG منجر به ایجاد کدون خاتمه زود رس در موقعیت اسید آمینه شماره ۱۳ می گردد (۵). بیش از نصف کل افراد جمعیت شمال اروپا با دو جهش قابل شناسایی در ژن GJB2، برای جهش نقطه ای ۳۵ delG هموزیگوت هستند (۷،۸). در فراوانی جهش های GJB2 تغییرات زیادی مشاهده می شود. و غالباً جهش ۳۵ delG در جمعیت های چین ۱/۲ درصد (۱۵)، در فلسطین ۱۴ درصد (۱۶)، آمریکا ۲۶-۷۲ درصد (۱۷،۱۸)، یونان ۵۳-۹۵ درصد (۱۹،۲۰)، ایتالیا ۲۹/۴-۸۹/۵ درصد (۲۱،۲۲)، و در اردن ۹۴-۱۰۰ درصد (۲۳،۲۴) است. در ایران فراوانی جهش های GJB2 ۲۷/۶ درصد در استان گیلان (۲۶،۲۷)، ۳٪ در سیستان و بلوچستان (۲۸،۲۹) و ۱۱-۱۶/۷ درصد در استان های مختلف ایران گزارش شده است (۳۰،۳۱). فراوانی جهش ۳۵ delG در قسمت های مختلف ایران ۶/۳ درصد در استان چهارمحال و بختیاری (۳۲)، ۱۴/۲۸٪ در استان کرمانشاه (۳۳)، و ۱۲/۶ درصد در استان های مختلف ایران می باشد (۳۱). در این مطالعه ۲۰۶ کروموزوم از ۱۰۳ فرد ناشنوی غیر سندرومی با الگوی وراثتی جسمی مغلوب مورد بررسی قرار گرفتند و از این میان ۱۰ کروموزوم (۵ نفر) جهش ۳۵ delG را نشان دادند. و فراوانی جهش ۳۵ delG برابر ۴/۸۵ درصد بود.

بسیاری از مطالعات در ایران نشان می دهد میزان ازدواج فامیلی در بین خانواده هایی که اعضای مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی دارند بالا می باشد. میزان ازدواج های فامیلی در خانواده های افراد ناشنوا ۷۲ درصد در استان چهارمحال و بختیاری (۳۲)، ۷۴ درصد در استان های تهران و آذربایجان شرقی (۲۷) و ۷۰ درصد در استان های گیلان و خراسان می باشد (۲۶). در این مطالعه میزان ازدواج های فامیلی معادل ۷۶/۵۴٪ می باشد که بیش از میزان ازدواج های فامیلی در جمعیت نرمال ایران می باشد (۳۴).

۲۸۵ باز از مرحله اول به طوری که این محصولات بایستی 10^{-4} - 10^{-6} بار رقیق تر شده باشند. PCR در دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، آنیلینق ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه واکستاسیون ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (۳۵) (سیکل) انجام می شود. ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۳ یونیت آنزیم EcoNI در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه می گردد و سپس باندها روی ژل آگاروز تحت نور لامپ UV مشاهده می گردد.

یافته ها

جهش ۳۵ delG به صورت هموزیگوت در ۵ نفر از اعضای خانواده ۵ فامیل مختلف مشاهده شد. ۶۹ از ۱۰۳ (۶۷٪) نفر از بیماران بررسی شده به صورت تک گیر بودند یعنی در این خانواده ها فقط یک کودک مبتلا وجود داشت و بقیه (۳۳٪) به صورت فامیلیال بوده یعنی در یک خانواده دو یا بیشتر کودک مبتلا بودند. ۴ از ۵ مورد با جهش ۳۵ delG حاصل ازدواج فامیلی بودند. ۷۶/۵۴٪ خانواده ها که ازدواجشان فامیلی بود از ضریب هم خونی ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ برخوردار بودند (تابلو ۱). ضریب هم خونی میزان احتمالی است که ۲ آلل در یک لوکوس دارای جد مشترک یکسان باشند.

تابلو (۱): ضریب هم خونی (C_c; F) بین ۶۲ خانواده که ازدواج فامیلی داشتند.

نسبت فامیلی	ضریب هم خونی	تعداد خانواده	درصد
پسر عمو - دختر عمو	۱/۱۶	۱۲	۱۹/۳۵
پسر خاله - دختر خاله	۱/۱۶	۱۶	۲۵/۸۱
پسر دایی - دختر عمو و یا پسر عمو - دختر دایی	۱/۱۶	۱۹	۳۰/۶۵
نوه عمو، نوه عمو، نوه دایی، نوه خاله	۱/۳۲	۸	۱۲/۹۰
پسر عمو - دختر عمو+پسر خاله - دختر خاله	۱/۸	۱	۱/۶۱
نوه های دو برادر یا دو خواهر یا برادر و خواهر	۱/۶۴	۶	۹/۶۸
جمع		۶۲	۱۰۰

۵۲/۴۳٪ موارد مطالعه شده افراد مذکر (۵۴٪ از ۱۰۳ نفر) و ۴۷/۵۷٪ افراد مونث بودند. از بین ۵ نفر با موتاسیون ۳۵delG سه نفر مونث و دو نفر مذکر بودند.

لوکوس‌های دیگر شناسایی و تشخیص داده شوند. و همچنین با توجه به بالا بودن میزان ازدواج فامیلی در والدین ناشنویان، پرهیز از ازدواج فامیلی از بروز ناشنوایی خواهد کاست.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، همکاران شاغل در بخش ژنتیک و خانواده‌های محترم شرکت کننده در این مطالعه تشکر نموده و در ضمن هزینه این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تامین شده است.

از منظر ژنتیک ازدواج بین افراد فامیل حائز اهمیت می‌باشد چراکه در مقایسه با زوج‌های غیر خویشاوند، احتمال ناقل بودن برای یک موتاسیون مشخص در زوج افزایش می‌یابد. بنابراین نوزادان حاصل از ازدواج‌های فامیلی از احتمال بیشتری برای هموزیگوت بودن آلل جهش یافته از جمله جهش‌های ناشنوایی برخوردار هستند. در مطالعه ما در مقایسه با جمعیت‌های اروپایی و برخی از مطالعات انجام شده در ایران فراوانی جهش ۳۵ delG پایین است و نشان می‌دهد ژن‌ها و یا جهش‌های دیگری در ایجاد ناشنوایی غیرسندرومی جسمی مغلوب در جمعیت استان آذربایجان غربی دخیل هستند؛ لذا ضروری است که جهش‌های دیگر در

References:

- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 630: 16-31.
- Fortnum H, Davis A. Epidemiology of permanent childhood hearing impairment in trent region, 1985-1993. *Br J Audiol* 1997; 316: 409-16.
- Cohen MM, Gorlin RJ. Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen Jr MM, Editor. *Hereditary hearing loss and its syndromes*. Oxford: Oxford University Press; 1995. P. 9-21.
- 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; 6:1605-9.
- 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; 351:394-8.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, et al. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 792-9.
- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, et al. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 1998; 11: 387-94.
- Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJH. Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998; 391: 32.
- Zbar RI, Ramesh A, Srisailapathy CR, Fukushima K, Wayne S, Smith RJ. Passage to India: the search for genes causing autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 333-7.
- Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, Stewart IA, Nancarrow DJ, Hayward NK, et al. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 629-35.
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2173-7.
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA* 1999; 281: 2211-6.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from

- human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
14. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, et al. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *J Nature* 1997; 387: 80-3.
 15. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, et al. The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the chinese population. *Hum Genet* 2002; 11: 394-7.
 16. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King M-C, Avraham KB, et al. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 2002; 110: 284-9.
 17. Lin D, Goldstein JA, Mhatre AN, Lustig LR, Pfister M, Lalwani AK. Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2). *Hum Mut* 2001; 18: 42-51.
 18. Prasad S, Cucci RA, Green GE, Smith R. Genetics testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness causing mutations (R32C and 645-648delTAGA). *Hum Mut* 2000; 16: 502-8.
 19. Pampanos A, Neou P, Iliades T, Apostolopoulos N, Voyiatzis N, Grigoriadou M. Pseudodominant inheritance of DFNB1 deafness due to common 35delG mutation. *Clin Genet* 2000; 57: 232-4.
 20. Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis J, et al. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness. *Clin Genet* 1999; 55: 381-2.
 21. Gualandi F, Ravani A, Berto A, Sensi A, TrabANELLI C, Falciano F, et al. Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. *Am J Med Genet* 2002; 112: 38-45.
 22. D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio, et al. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin 26 alleles. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 685-91.
 23. Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, Parronau J, Salem N, et al. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 391-4.
 24. Mustapha M, Salem N, Delague V, Chouery E, Ghassibeh M, Rai M, et al. Autosomal recessive non-syndromic hearing loss in the Lebanese population: prevalence of the 30delG mutation and report of two novel mutations in the connexin 26 (GJB2) gene. *J Med Genet* 2001; 38: E36.
 25. Mukherjee M, Phadke SR, Mittal B. Connexin 26 and autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Ind J Hum Genetics* 2003; 9(2): 40-50.
 26. Hashemzadeh Chaleshtori M, Dowlati M, Farhud DD, Hoghooghi Rad L, Sasanfar R, Hoseinipour A, et al. Two novel mutations and predominant 35delG mutation in the connexin 26 gene (GJB2) in Iranian population. *Iran J Publ Health* 2004; 33 (2): 14-9.
 27. Hashemzadeh Chaleshtori M, Hoghooghi Rad L, Dowlati M, Sasanfar R, Hoseinipour A, Montazer Zohour M, et al. Frequencies of mutations in the connexin 26 gene (GJB2) in two populations of Iran (Tehran and East Azerbaijan). *Iran J Publ Health* 2005; 34 (1): 1-7.
 28. Sasanfar R, Toloui A, Hoseinipour A, Farhud DD, Dowlati M, Hoghooghi Rad, L, et al. Frequency of a very rare 35delG mutations in two ethnic groups of Iran populations. *Iranian J Publ Health* 2004; 33 (4): 26-30.
 29. Hoseinipour A, Hashemzadeh Chaleshtori M, Sasanfar R, Farhud DD, Toloui A, et al. Report of a new mutation and frequency of connexin 26

- gene (GJB2) mutations in patients from three provinces of Iran. *Iranian J Publ Health* 2005; 34 (1): 47-50.
30. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K. GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. *Hum Mut* 2002; 19: 572.
31. Najmabadi H, Nishimura C, Kahrizi K, Riazalhosseini Y, Malekpour M, Daneshi A, et al. GJB2 mutations: passage through Iran. *Am J Med Genet* 2005; 133A: 132-137.
32. Hashemzadeh Chaleshtori M, Montazer Zohour M, Hoghooghi Rad L, Pour-Jafari H, Farhud DD, Dolati M, et al. Autosomal recessive and sporadic non syndromic hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in a province of Iran. *Iran J Publ Health* 2006; 35 (1): 88-91.
33. Mahdieh N, Riaz Alhosseini Y, Arzhang S, Bazazzadegan N, Totonchi M, Najm Abad H, et al. Frequency of connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness in kermanshah (2002-4). *Behbood J* 2005; 9(2):32-40.
34. Farhud DD, Kamali MS, Marzban M, Andonian L, Saffari R. Consanguinity in Iran. *Iran J Publ Health* 1991; 20: 1-14.