بررسی پیوستگی ۷ جایگاه ژنی برای ناشنوایی غیرسندرومی آتوزومی مغلوب در خانواده‌های ایرانی

رامک بدر[۱]، بهاره شجاع صفار[۲]، نیلوفر بزاززادگان[۲]، خدیجه جلالوند[۳]، *کیمیا کهریزی[۴]، حسین نجم آبادی[۵]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۳- کارشناس ژنتیک
۴- متخصص اطفال، دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۵- دکترای ژنتیک ملکولی، استاد دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۷/۱۵
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۵/۲۰

*آدرس نویسنده مسئول:
تهران، اوین، بلوار دانشجو، بن بست کودکیار، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، گروه ژنتیک
تلفن: ۲۲۱۸۰۱۳۸
*E-mail:kkahrizi@uswr.ac.ir

چکیده

هدف: نقص شنوایی فراوان‌ترین بیماری حسی- عصبی می‌باشد که به دو فرم سندرومی و غیرسندرومی مشاهده می‌شود. هدف این مطالعه، بررسی پیوستگی ۷ جایگاه ژنی مسئول در ناشنوایی غیر سندرومی آتوزومی مغلوب در خانواده‌های ایرانی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی، ۴۱ خانواده دارای حداقل ۲ فرد مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی آتوزومی مغلوب که جهش در جایگاههای ژنی DFNB21, DFNB23, DFNB29 و DFNB4, DFNB6, DFNB7/11, DFNB8/10, DFNB9, DFNB12, DFNB16, DFNB18 و DFNB1, DFNB2, DFNB3 و DFNB4 در آنها منفی بود، به‌صورت ساده و در دسترس انتخاب و ۷ جایگاه ژنی DFNB30, DFNB28 DFNB67, DFNB37, DFNB36, DFNB31 و DFNB22 با ژنهای مشخص در آنها بررسی شد. نقشه یابی هوموزیگوسیتی در مورد این خانواده‌ها با استفاده از مارکرهای چند شکل (STR) انجام شد.

یافته‌ها: ۳ خانواده در ۳ جایگاه ژنی DFNB30, DFNB28 و DFNB31 به طور مشخص پیوستگی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق تقریباً ۷٪ از علل ناشنوایی غیر سندرومی آتوزومی مغلوب در بین جمعیت ایران مشخص شد.

کلید واژه‌ها: ناشنوایی غیر سندرومی/ وراثت اتوزومی مغلوب/ آنالیز پیوستگی/ ایران

مقدمه

کاهش شنوایی فراوان‌ترین نقص حسی در انسان است که افراد را در تمامی‌سنین درگیر می‌کند. یک تا دو نفر در ۱۰۰۰ تولد زنده به آن مبتلا می‌شوند و در حدود ۷۰ تا ۱۲۰ میلیون نفر در جهان از ناشنوایی رنج می‌برند. در ایران در حدود ۸۴۰۰۰ فرد ناشنوا وجود دارد. حدود نیمی از ناشنوایی‌ها با دخالت عوامل ژنتیکی و نیمی دیگر با علل عفونی یا غیرژنتیکی ایجاد می‌شوند. با توجه به پیچیدگی مکانیسم شنوایی، وجود ژن‌های متعدد دخیل در سیستم شنوایی قابل انتظار می‌باشد و نقص در هر یک از این ژن‌ها منجر به کم شنوایی یا ناشنوایی خواهد شد. این ناهنجاری‌ها می‌توانند تنها به ناشنوایی محدود شوند (غیر سندرومی) یا بر اعضای دیگر نیز تأثیر بگذارند (سندرومی)، که بیش از ۷۰٪ ناشنوایی‌های ژنتیکی به‌صورت غیرسندرومی‌می‌باشند. ناشنوایی ژنتیکی غیر سندرومی‌شامل چهار نوع آتوزومی‌غالب، آتوزومی‌مغلوب، وابسته به x و میتوکندریایی می‌باشد که در این میان سهم نوع آتوزومی‌مغلوب۷۵ تا ۸۰ درصد است و تاکنون ۶۷ جایگاه ژنی و ۲۳ ژن برای این فرم ناشنوایی شناسایی شده است (۱). بررسی انجام شده در ناشنوایی غیرسندرمی‌آتوزومی‌مغلوب در ایران در مرکز تحقیقات ژنتیک توسط نجم آبادی وهمکاران (۲۰۰۵) نشان داده است که جهش در ژن GJB2 تنها مسئول حدود ۱۸٪ ازناشنوایی غیرسندرومی‌با وراثت مغلوب در ایران می‌باشد و جهش در ژن GJB6 نیز نقشی در ناشنوایی ایران ندارد. پس در جمعیت ایران برخلاف بسیاری از کشورها GJB2 عامل اصلی ناشنوایی نمی‌باشد. این نتایج بررسی سایر جایگاههای ژنی مطرح در زمینه ناشنوایی غیرسندرومی آتوزومی مغلوب را حائز اهمیت می‌سازد. (۳، ۲). در این راستا ۷ جایگاه ژنی DFNB22، DFNB28، DFNB30، DFNB31، DFNB36، DFNB37 و DFNB67 که در جمعیت ایرانی بیشتر مطرح هستند مختصراً به شرح آنها پرداخته می‌شود:

۱ـ جایگاه ژنی DFNB22 برای نخستین بار در سال ۲۰۰۲ در یک خانواده بزرگ فلسطینی شناسایی شد. جهش در این ژن (OTOA) به‌صورت جابه جایی انتقالی[1] T به C در جایگاه پردازش[2] دهنده GT درپیوند اگزون ۱۲/ اینترون ۱۲ بودکه پیش بینی می‌شود منجر به نقص پردازش[3] به‌صورت حذف اگزون ۱۲ گردد(۴). پروتئین رمز شونده توسط ژن OTOA پروتئین اوتوانکورین[4] می‌باشد. این جایگاه ژنی در کروموزم ۲. ۱۲p۱۶ بین مارکرهای D16S3046 و D16S412 واقع شده است که ۲۸ اگزون دارد و در حدود ۸۲kb[5] می‌باشد.

۲- جایگاه ژنی DFNB28 درسال ۲۰۰۶ بر روی کروموزوم ۲۲q۱۳شناسایی شد. این جایگاه ژنی حدود ۶/۳ Mb[6] است و بین مارکرهای D22S1043 و D22S282 واقع شده است. مطالعه‌ای که بر روی ۴ خانواده فلسطینی و ۱۲ خانواده پاکستانی در سال۲۰۰۵ صورت گرفت منجر به شناخت جهشهای ژن TRIOBP به‌صورت جانشینی (R347x) 1039C→T، (G1019R) 3055G→T، (Q581X)، R1117X، R778X، R1068X، Q297X گردید و ۲ جهش تغییر قالب به‌صورت R1078fsX1083 و D1069fsX1082 دیده شد (۶، ۵).

۳ـ جایگاه ژنی DFNB30 در سال ۲۰۰۲ دریک خانواده اسرائیلی شناسایی و ژن MYO3A درکروموزوم ۱. ۱۲p۱۰ نقشه یابی شد. جایگاه ژنی نام برده در منطقه ۱۳cM و بین مارکرهای D10S1749 و D10S1654 واقع شده است. پروتئین کد کننده این ژن متعلق به خانواده بزرگ میوزین می‌باشد. MYO3A کاندید مناسبی برای DFNB30 به دلیل پیوسته بودن ۴ میوزین دیگر با ناشنوایی است. با مطالعه‌ای که بر روی خانواده اسرائیلی صورت گرفت ۳ جهش مختلف پیدا شد. یکی از جهشها به‌صورت بی‌معنی درکدون ۱۰۴۳ 3126T→G بود. جهش دیگر در منطقه پردازش گیرنده در اینترون۱۷، 1777 (-12) G→A سبب حذف اگزون ۱۸ و آخرین جهش در منطقه پردازش گیرنده در اینترون۸، 732 (-2) A→G شناخته شد (۷).

۴ـ جایگاه ژنی DFNB31 درسال ۲۰۰۲ با مطالعه برروی یک خانواده فلسطینی در موقعیت ۹q۳۲ـq۳۴ شناخته شد و ژن مسئول این جایگاه ژنی WHRN می‌باشد. این جایگاه ژنی درمنطقه ۱۵ cM بین مارکرهای D9S289 و D9S1881 واقع شده است. WHRN ۱۲ اگزون در ایزوفرم بلند و ۸ اگزون در ایزوفرم کوتاه دارد. در افراد مبتلای خانواده با ناشنوایی آتوزومی‌مغلوب غیر سندرومیDFNB31 یک جانشینی نوکلئیدی 2332 C→T در اگزون ۱۰ ژن WHRN پیدا شد. همچنین در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر روی یک خانواده تونسی جهش تغییر قالب به‌صورت حذف 1bp[7](c. 2423delG) گزارش شد (۱۰-۸).

۵ـ جایگاه ژنی DFNB36 در سال ۲۰۰۴ با مطالعه برروی ۲ خانواده پاکستانی درموقعیت ۳. ۳۶P۱ شناخته شد که ژن مسئول این جایگاه ژنی ESPN می‌باشد. این جایگاه ژنی درمنطقه ۶ cM قرار گرفته است. این ژن با ناشنوایی آتوزومی‌غالب و مغلوب هردو پیوسته است که این حالت در کانکسین ۲۶ نیز دیده شده است. مطالعه انجام شده در۲ خانواده پاکستانی منجر به شناسایی دو جهش به‌صورت یک حذف 4bp، 1988del AGAG در اگزون ۹ و حذف 4bp، 2469delGTCA در اگزون ۱۳ گردید. قابل ذکر است با مطالعه این ژن در خانواده‌های

1- Transition
2- Splice
3- Splicing
4- Otoancorin
5- Kilo base
6- Mega base
7- Centi Morgan
8- Base pair

مبتلا به ناشنوایی آتوزومی‌غالب ۴ جهش به‌صورت زیر دیده شد: (S719R)، (D744N)، (R774Q) و (2541-2543del. AAG) (۱۲، ۱۱).
۶ـ جایگاه ژنی DFNB37 با مطالعه برروی یک خانواده پاکستانی در موقعیت ۶q۱۳ بین ۲ مارکر D6S1031 و D6S1282 در منطقه ۶cM شناخته شد که ژن مسئول آن MYO6 می‌باشد. ژن MYO6 برای ساخت پروتئینی به نام میوزین ۶ به کار می‌رود. این ژن شامل ۳۲ اگزون، ۷۰ Kb می‌باشد و در سانترومر کروموزم ۶ انسان و ۹ موش واقع شده است. با مطالعه ۳ خانواده پاکستانی ۳ جهش مختلف به‌صورت اضافه شدن 1bp (36-37insT) در اگزون ۲، جابه جایی انتقالی 3496C→T و جهش missense (E216V) که به وسیله جابه جایی تقاطعی[1] (647A→T) به وجود می‌آید، گزارش شد(۱۳).
۷- جایگاه ژنی DFNB67 درسال ۲۰۰۶ با مطالعه برروی ۴ خانواده پاکستانی در موقعیت ۳. ۲۲p–۱. ۲۱p۶ شناخته شده است. ژن TMHS حاوی ۴ اگزون بوده و ۲۸/۵۱cM است که یک پروتئین ۲۱۹ اسیدآمینه‌ای راکد می‌کند و واجد ۴ بخش غشاگذر می‌باشد. ۲جهش در ۲خانواده پاکستانی به‌صورت 246delC ودیگری جهش missence tyr127-to-cys Y127C دیده شد. همچنین مطالعاتی که در همان سال بر روی ۲ خانواده تُرک صورت گرفت، منجر به شناخت ۲ جهش به قرار زیر شد: یکی به‌صورت حذف 649delG→1bp در اگزون ۲ و دیگری نیز در اگزون ۲ به‌صورت جابه جایی انتقالی 494C→T (۱۵، ۱۴).
نظر به اینکه نرخ ازدواج فامیلی به خصوص نوع اقوام درجه ۳ (first cousin) در ایران بسیار بالا می‌باشد، لذا تعیین عوامل ژنتیکی درکودکان مبتلا به ناشنوایی[2] (NSHL) و مشاور ژنتیکی خانواده‌های کودکان مبتلا می‌تواند در جلوگیری از بروز ازدواج خویشاندی و کاستن تولد چنین نوزادانی مؤثر باشد. همچنین تشخیص زود هنگام ناشنوایی به منظور رشد گفتار کودک و کسب مهارت‌های اجتماعی دارای اهمیت است که می‌تواند منجر به کیفیت زندگی بهتری برای این افراد شده و در استفاده از ابزارهای شنوایی از جمله کاشتن حلزون نیز به آنها کمک کند. در کل هدف از این تحقیق بررسی آنالیز پیوستگی، برای جایگاه‌های ژنی DFNB36, DFNB31, DFNB30, DFNB28 و DFNB67, DFNB37 و DFNB22 روی ۴۱ خانواده مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی‌با وراثت مغلوب می‌باشد.

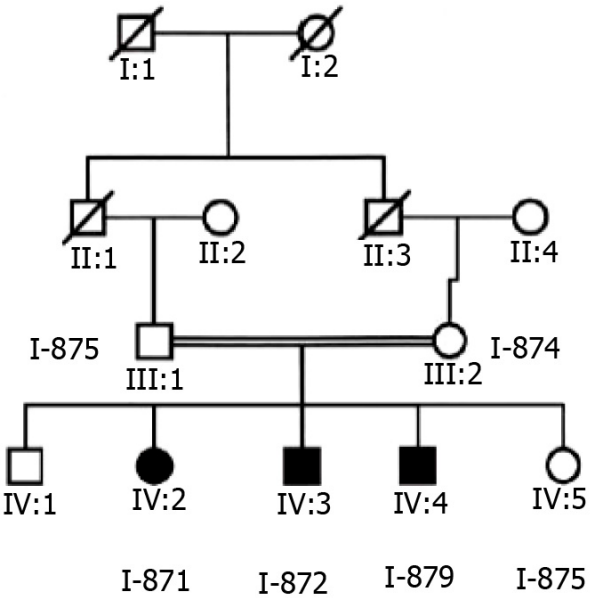
روش بررسی

۴۱ خانواده دارای افراد مبتلا به ناشنوایی غیرسندرومی‌با وراثت آتوزومی‌مغلوب از نمونه‌های در دسترس سرتاسر ایران به‌صورت ساده انتخاب و در این مطالعه توصیفی شرکت کردند. در هرخانواده در نتیجه ازدواج خویشاوندی حداقل ۲ فرد ناشنوا وجود داشت. از طریق بررسی‌های بالینی افراد مورد نظر، بروز ناشنوایی در آنها اثبات و بررسی فیزیولوژی افراد طی انجام مشاوره ژنتیک و ترسیم شجره، نحوه وراثت در هر خانواده مشخص شد و فرم پرسشنامه توسط کارشناس مربوطه تکمیل گردید و با اخذ رضایت بیمار از این افراد نمونه خون تهیه شد. قابل ذکر است که این خانواده‌ها پیوستگی به جایگاههای ژنی DFNB16, DFNB18, DFNB21, DFNB23, DFNB29 و DFNB4, DFNB6, DFNB7/11, DFNB8/10, DFNB9, DFNB12 و DFNB1, DFNB2, DFNB3 و DFNB4نداشته‌اند. استخراج DNA ژنومی توسط روش نمک اشباع انجام گردید (۱۶). سپس غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد و جایگاههای ژنی از طریق پیوستگی مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که برای هر یک از جایگاه‌های ژنی حداقل ۳ و حداکثر ۶ مارکر[3] STR با کمترین فاصله و بالاترین هتروزیگوسیتی و حتی‌الامکان کوچکترین اندازه محصول PCR انتخاب شد. جهت تکثیر STRها از پرایمرهای مربوط به آنها استفاده شد که البته به دلیل ازدیاد آنها، از ذکر توالی خودداری و به مراجع ذکر شده بسنده می‌شود (۱۸، ۱۷). شرایط بهینه جهت PCR با توجه به دمای چسبیدن[4] مناسب برای تکثیر هر STR شامل دمای واسرشتی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشتی ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، دمای چسبیدن (۵۵ تا ۶۵) درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه که پس از طی ۳۵ سیکل با مرحله کامل شدن سنتز در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه به اتمام می‌رسد. محصولات PCR آماده شده، بر روی ژلهای پلی آکریل آمید ۸٪ برده شده و پس از رنگ‌آمیزی ژلها، به بررسی خانواده‌ها پرداخته شد و با مشاهده پیوستگی، نمونه‌ها جهت شناسایی جهش در ژن مورد نظر و تعیین توالی به خارج از کشور ارسال شد.

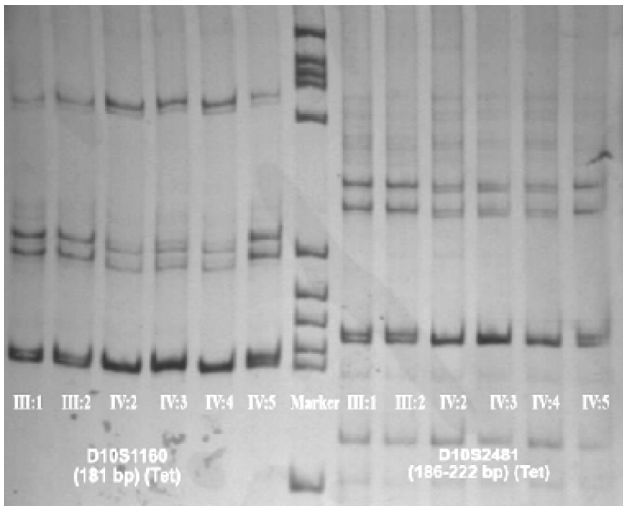
یافته‌ها

در بین ۷ جایگاه ژنی، ۳ خانواده در۳ جایگاه ژنی DFNB30 ,DFNB28 و DFNB31 به طور مشخص پیوستگی نشان دادند (تعیین توالی برای بررسی جهش در ژن جایگاه‌های ژنی ذکر شده در حال انجام می‌باشد). شکل ۱A نمایشی ازشجره نامه و شکل ۱B ژل پلی آکریل آمید است که پیوستگی دو مارکر در جایگاه ژنی DFNB30 را نمایش می‌دهد.

1- Transvertion
2- Non Syndromic Hearing Loss
3- Short Tandem Repeat
4- Annealing



شکل ۱A ـ شجره یک خانواده که پیوستگی با DFNB30 را نشان داده است



شکل ۱B - نتایج بررسی پیوستگی در خانواده مذکور توسط ۲ مارکر (STR) D10S1160,D10S2481 بر روی ژل پلی آکریل آمید از چپ به راست به‌ترتیب III:1، III:2، IV:2، IV:3، IV:4، IV:5، مارکر V و مجدداً تکرار خانواده ذکر شده.

بحث

ناشنوایی غیرسندرومی‌آتوزومی‌مغلوب به عنوان متداول‌ترین نوع از نقص شنوایی محسوب می‌گردد. برای ناشنوایی غیرسندرومی‌ارثی با توارث آتوزومی‌مغلوب تا به حال ۶۷ جایگاه ژنی و ۲۳ ژن، برای توارث آتوزومی‌غالب تا به حال ۵۴ جایگاه ژنی با ۲۴ ژن و با توارث وابسته به X تا به حال ۸ جایگاه ژنی با ۲ ژن شناسایی شده است (۱). جهش در ژن GJB2 در جایگاه ژنی DFNB1 حدود ۵۰٪ موارد ناشنوایی غیرسندرومی‌آتوزومی‌مغلوب در جوامع اروپایی را شامل می‌شود (۱۹). با این وجود بررسی انجام شده در میان ناشنوایان غیرسندرومی‌ارثی در ایران نشان داده است که برخلاف بسیاری از جمعیت‌ها GJB2 عامل اصلی ناشنوایی در ایران نبوده و تنها به میزان ۱۸٪ مؤثر می‌باشد. همچنین جهش در ژن GJB6 نیز نقشی در ناشنوایی جمعیت ایران ندارد (۳، ۲). قابل ذکر است که بررسی انجام شده در میان ناشنوایان غیرسندرومی‌ارثی در ایران نشان می‌دهد که DFNB4 تقریباً ۱۰٪ در بین جمعیت ایران مؤثر است (۲۰). در نتیجه بررسی سایر جایگاه‌های ژنی مربوط به این فرم از ناشنوایی در جمعیت ایران ضروری می‌باشد. دراین تحقیق ۷ جایگاه ژنی DFNB22، DFNB28، DFNB30، DFNB31، DFNB36، DFNB37 و DFNB67 برای ۴۱ خانواده مبتلا به نقص شنوایی غیرسندرومی‌با توارث مغلوب مورد بررسی قرار گرفت. ۳ خانواده در ۳ جایگاه ژنی DFNB30, DFNB28 و DFNB31 به طور مشخص پیوستگی نشان دادند (تعیین توالی به ترتیب برای بررسی جهش در ژنهای WHRN، MYO3A، TRIOBP در حال بررسی می‌باشد).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق حدود ۷ درصد از علل ناشنوایی غیرسندرومی اتوزومی‌مغلوب در ایران را مشخص نمود. اهمیت تحقیقات در جهت شناسایی اساس ژنتیکی ناشنوایی در ایران به منظور تشخیص و پیشگیری از شیوع رو به افزایش و درمان واضح می‌باشد و وجود خانواده‌های بزرگ با ازدواج خویشاوندی و دارا بودن فرزندان ناشنوا در سراسر ایران، لزوم مطالعات آنالیز را برای شناسایی جایگاه ژنی درگیر در ناشنوایی جهت تشخیص ژن‌های مؤثر و همچنین شناخت جهش‌های ژنی مسئول را بیشتر می‌نماید. لازم به یادآوری است که جهت پیش گیری با مشاوره قبل از زایمان و در صورت نیاز با انجام تعیین احتمال ناقل بودن والدین[1] می‌توان خانواده را از تولد نوزاد سالم یا مبتلا آگاه ساخت.

تشکر و قدردانی

نویسنده و همکاران این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از کلیه بیماران به خاطر همکاریهایشان و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی برای تصویب و حمایت مالی از طرح، ابراز می‌دارند.

1- Carrier detection

منابع:

1- Willems P.J. Genetic cause of hearing loss. J. Med. Genet. 2002; 324(15):1101–1109.
2- Riazalhossein Y. Delta (GJB6– D13S1830) is not a common cause of nonsyndromic hearing loss in the Iranian population. Archive of Iranian medicine 2005;8(2):104 –108.
3- Najmabadi H. GJB2 mutations: passage through Iran. Am J Med Genet A. 2005;133(2):132–7.
4- Zwaenepoel I. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002;99:6240–6245.
5- Shahin H. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous–actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. Am J Hum Genet. 2006;78 (1) : 144–152.
6- Riazuddin S. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletalorganizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. Am. J. Hum. Genet. 2006;78:137–142.
7- Walsh T. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002;99:7518–7523.
8- Mustapha M. DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32–34. , Europ. J. Hum. Genet. 2002; 10: 210–212.
9- Tlili A. Identification of a novel frameshift mutation in the DFNB31/WHRN gene in a Tunisian Consanguineous family with hereditary non–syndromic recessive hearing loss. HUMAN MUTATION Mutation in Brief #804, 2005 Online
10- Mburu P. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. Nature Genet. 2003; 34:421–428.
11- Donaudy F. Espin gene (ESPN) mutations associated with autosomal dominant hearing loss cause defects in microvillar elongation or organization. (Letter) J. Med. Genet. 2006;43: 157–161.
12- Naz S. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. J. Med, Genet. 2004; 41: 591–595.
13- Ahmed Z. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. Am J Hum Genet. 2003; 72 (5): 1315–1322.
14- Kalay E, Li Y. Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner–like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mutat. 2006; 27 (7) :633–639.
15- Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, Riazuddin S, Waryah AM, Khan SN, et al. Mutations of human TMHS cause recessively inherited nonsyndromic hearing loss. J Med Genet 2006; 43: 634–640.
16- Miller SA, Dykess DD, Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl acids Res. 1988; 16: 1215–1218.
17- http://genome. ucsc. edu/cgi–bin/hgGateway
18- http://www. ncbi. nlm. nih. gov/
19- Santos RIP, Wajid M, Pham TL, Hussan J, Ali G, Ahmad W, et al. Low prevalence of connexin 26 (GJB2) variants in Pakistani families with autosomal recessive non–syndromic hearing impairment. Clin Genet. 2005; 67(1): 61–68.
20- Kahrizi K. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. European Journal of Pediatrcs 2009; 168(6): 651–653.