doi: 10.17116/otorino201681119-24

Аудиологический анализ у пациентов с потерей слуха, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* в Якутии

М.н.с. Ф.М. ТЕРЮТИН[1, 2], к.б.н. Н.А. БАРАШКОВ[1, 2], д.м.н., проф. Н.Л. КУНЕЛЬСКАЯ[3], н.с. В.Г. ПШЕННИКОВА[1, 2], инж. А.В. СОЛОВЬЕВ[2]

[1]Лаборатория молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем» (дир. — д.м.н. М.И. Томский), Якутск, Россия, 677010; [2]Научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии Института естественных наук Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова», Якутск, Россия, 677010; [3]Московский научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского (дир. — д.м.н., проф. А.И. Крюков) Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия, 117152

The audiological analysis in the patients homozygous for the c.-23+1G>A mutation in the *GJB2* gene presenting with the loss of hearing in Yakutiya

F.M. TERYUTIN[1, 2], N.A. BARASHKOV[1, 2], N.L. KUNEL'SKAYA[3], V.G. PSHENNIKOVA[1, 2], A.V. SOLOV'EV[2]

[1]Yakutsk Research Centre of Complex Medical Problems, Yakutsk, Russia, 677010; [2]M.K. AmosovInstitute of Natural Sciences, North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia, 677010; [3]L.I. Sverzhevsky Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow Health Department, Moscow, Russia, 117152

Ранее в Республике Саха (Якутия) у коренного населения (преимущественно якуты) была идентифицирована основная молекулярно-генетическая причина одной из форм наследственной глухоты, обусловленной мутацией с.-23+1G>A, локализованной в донорном сайте сплайсинга (экзон 1) гена *GJB2* (Cx26). В настоящем исследовании проведен детальный аудиологический анализ у пациентов, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* на масштабной выборке пациентов из Якутии. Все индивиды с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A (*n*=108); средний возраст 14,32±4,7 года; якуты по этнической принадлежности) прошли тональную пороговую аудиометрию по воздушному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 кГц и по костному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0; 4,0 кГц шагом 5,0 дБ. В случаях невозможности проведения тональной пороговой аудиометрии были использованы данные теста ASSR. Полученные нами результаты характеризуют аллельную форму заболевания при *GJB2*-генотипе с.-23+1G>A/с.-23+1G>A как врожденную двустороннюю симметричную (90,1%), сенсоневральную (90,1%), вариабельную по степени тяжести потерю слуха (от I степени до глухоты), с «плоским» аудиопрофилем (наклон медианы в РДЧ$_{0,5,\ 1,0,\ 2.0,\ 4,0\ кГц}$, не более 5,0 дБ). Таким образом, проведенный аудиологический анализ позволяет предположить относительно равномерное, но вариабельное по тяжести поражение слуха у пациентов, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* (Cx26), что является благоприятным прогностическим признаком для слухопротезирования.

Ключевые слова: глухота, с.-23+1G>A, ген GJB2, аудиометрия, пороги слуха.

In the course of previous investigations carried out in the Republic of Sakha (Yakutiya), we have identified the main molecular-genetic factor responsible for the hereditary impairment of hearing among the indigenous population (mostly the Yakuts).The disease was shown to be attributable to the c.-23+1G>A mutation localized in the splice donor site (exon 1) of the *GJB2* (Cx26) gene. The present study involved the comprehensive audiological analysis of the patients homozygous for the c.-23+1G>A mutation in the GJB2 gene based on the results of the study of a large sample of the patients residing in Yakutiya. All individuals with the GJB2 genotype c.-23+1G>A/c.-23-1G>A (*n*=108) at the mean age of 14.32±4.7 years (all ethnic Yakuts)were examined with the use oftonal threshold audiometry for air conduction testing at the frequencies of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0 kHz and bone conduction testing at the frequencies of 0.25, 0.5, 1.0, and 4.0 with a step of 5.0 dB.The results of the ASSR test were used whenever tonal threshold audiometry proved impracticable The data obtained in the study characterize the allelic form of the disease associated with the *GJB2* genotype c.-23+1G>A/c.-23-1G>A as the congenital bilateral symmetric (90.1%), sensorineural (90.1%) form of hearing impairment of variable severity (from grade 1 to complete deafness) with the «flat» audiological profile (median slope not more than 5.0 dBin the extended frequency range (EFR) of 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0, kHz). It is concluded that the results of the audiological analysis performed in the present study give evidence of relatively homogeneous but variable in terms of severity impairment of hearing in the patients homozygous for the c.-23+1G>A mutation in the *GJB2* (Cx26) gene. It may serve as a positive prognostic sign to be used in the development and prescription of hearing aids.

Keywords: deafness, c.-23+1G>A mutation, GJB2 gene, audiometry, hearing thresholds.

Ранее в Республике Саха (Якутия) у коренного населения (преимущественно якуты), была идентифицирована основная молекулярно-генетическая причина одной из форм наследственной глухоты, обусловленной мутацией с.-23+1G>A, локализованной в донорном сайте сплайсинга (экзон 1) гена *GJB2* (Cx26) [1]. Была показана высокая частота данной мутации у больных с потерей слуха (всего

© Коллектив авторов, 2016

[1]e-mail: e-mail: rest26@mail.ru

[2]e-mail: barashkov2004@mail.ru

[3]e-mail: nlkun@mail.ru

обнаружено 70 неродственных гомозигот) и зарегистрирована экстремально высокая частота гетерозиготного носительства среди здоровых индивидов в популяции якутов (11,7%), что свидетельствует о локальном накоплении c.-23+1G>A и характеризует регион Восточной Сибири как самый обширный мировой кластер накопления данной мутации [1]. В 2012 г., в соответствии с международным каталогом Маккьюсика (Online Mendelian Inheritance in Men), форма данного заболевания, вызываемая мутацией c.-23+1G>A в гомозиготном состоянии, была классифицирована как аллельный вариант аутосомно-рецессивной глухоты 1A типа (АРГ 1A) (OMIM 2202290).

В настоящее время в мире исследования состояния слуха у индивидов, гомозиготных по мутации сайта сплайсинга c.-23+1G>A гена *GJB2*, являются редкими [1, 2]. До сих пор не проведен детальный аудиологический анализ аллельной формы АРГ 1A, идентифицированной в Якутии. Поскольку на территории Восточной Сибири эта мутация распространилась локально, в результате эффекта основателя, то именно в Якутии возможно проведение сопоставимого по масштабности с мировыми аналогами детального аудиологического исследования состояния слуха у лиц, гомозиготных по мутации сайта сплайсинга c.-23+1G>A гена *GJB2*.

Цель исследования — провести детальный аудиологический анализ потери слуха пациентов, гомозиготных по мутации c.-23+1G>A гена *GJB2* на масштабной выборке коренного населения Якутии.

Пациенты и методы

Выборка индивидов с двусторонней потерей слуха и подтвержденным *GJB2*-генотипом c.-23+1G>A/c.-23+1G>A составила 108 человек обоего пола, якутов по этической принадлежности, средний возраст которых составил 14,32±4,7 года.

Аудиологическое обследование. Все 108 обследованных индивидов прошли тональную пороговую аудиометрию с использованием аудиометра «MAICO ST 20» (Германия) по воздушному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 кГц и по костному проведению на частотах 0,25; 0,5; 1,0;, 4,0 кГц шагом 5,0 дБ. В случаях невозможности проведения тональной пороговой аудиометрии были использованы данные теста ASSR («Interacoustics», Дания). Аудиологический анализ был проведен на всех измеренных частотах (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 кГц). Обобщенные пороги слуха рассматривались на 25-м, 50-м и 75-м процентилях. Степень потери слуха оценивалась по порогам слышимости лучше слышащего уха по классификации, рекомендованной ВОЗ, согласно которой I степень соответствует 20—40 дБ в речевом диапазоне частот 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 кГц ($РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$), II степень — 41—55 дБ, III степень — 56—70 дБ, IV степень — 71—90 дБ, глухота — более 90 дБ, а для сравнения с *GJB2*-генотипом c.35delG/c.35delG по международной классификации, согласно которой «mild» соответствует 21—40 дБ в диапазоне частот 0,5, 1,0 и 2,0 кГц ($РТА_{0,5,\ 1,0\ 2,0\ кГц}$), «moderate» — 41—70 дБ, «severe» — 71—95 дБ, «profound» — более 95 дБ. Для тимпанометрии использовался тимпанометр и аудиометр «AA222» («Interacoustics», Дания).

Молекулярно-генетический анализ. Образцы геномной ДНК были экстрагированы из лейкоцитов периферической крови фенолхлороформным методом. Амплификацию фрагментов гена *GJB2*, включающих экзон 1 и экзон 2 гена *GJB2* с фланкирующими областями, проводили с помощью ПЦР с использованием праймеров 5'-CCGGGAAGCTCTGAGGAC-3', 5'-GCAACCGCT CTGGGTCTC-3' [3] для амплификации экзона 1 и 5'-TCGGCCCCAGTGGTACAG-3', 5'-CTGGGCAATGC GTTAAACTGG-3' [4, 5] для амплификации экзона 2. Амплифицированные фрагменты очищали от компонентов ПЦР на магнитных частицах AMPure XP и проводили реакции секвенирования по Сэнгеру с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Секвенирование фрагментов гена *GJB2* проводили на автоматическом генном анализаторе ABI Prism 3130XL («Applied Biosystems», США).

Статистический анализ. Доверительные интервалы были рассчитаны с использованием программы Sampling, любезно предоставленной V. Macaulau и адаптированной M. Metspalu. Сравнение частоты встречаемости признаков оценивали по критерию χ^2. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$. Аудиограммы, имеющие обрыв, при определении порога слышимости на $РДЧ_{0,5,\ 1.0,\ 2.0,\ 4.0\ кГц}$, медианы, процентилей, средних показателей и стандартной ошибки были нормализованы путем внесения максимальных показателей (120,0 дБ) в местах отсутствия ответа пациента.

Этический контроль. Обследования, предусмотренные рамками научно-исследовательской работы, проводились с информированного письменного согласия участников или их родителей. Данная научно-исследовательская работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП (Якутск, протокол №16 от 16 апреля 2009 г.).

Результаты и обсуждение

Потеря слуха при GJB2-генотипе c.-23+1G>A/c.-23+1G>A. Считается, что аутосомно-рецессивная глухота, связанная с рецессивными мутациями в гене *GJB2*, характеризуется врожденной двусторонней сенсоневральной потерей слуха различной степени тяжести. Мы провели аудиологический анализ у 108 индивидов с подтвержденным молекулярно-генетическим исследованием *GJB2*-генотипом c.-23+1G>A/c.-23+1G>A.

В результате выявлено, что у 45 пациентов (41,7%) тугоухость была заподозрена в возрасте до 12 мес, у 54 (50,0%) — в возрасте от 1 года до 3 лет и у 9 (8,3%) — после 4 лет **(рис. 1, а)**. Таким образом, достоверно чаще ($p<0,05$), чем в другом возрасте, тугоухость была заподозрена или диагностирована с рождения до 3 лет.

Тональная пороговая аудиометрия всех 108 индивидов с *GJB2*-генотипом c.-23+1G>A/c.-23+1G>A показала два типа потери слуха — у 99 пациентов сенсоневральный (91,7%) и 9 пациентов смешанный (8,3%). Полученные статистически значимые отличия ($p<0,05$) свидетельствуют о том, что данная аллельная форма заболевания характеризуется преимущественно сенсоневральной потерей слуха **(см. рис. 1, б)**. Учитывая вероятность ошибки аудиометрии или наличия других факторов, которые могли привести к регистрации потери слуха смешанного типа, эти 9 пациентов были исключены из дальнейшего анализа.

У 90 пациентов с двусторонней сенсоневральной потерей слуха (90,9%) было выявлено симметричное поражение слуха, у 9 (9,1%) — асимметричное **(см. рис. 1, в)**.

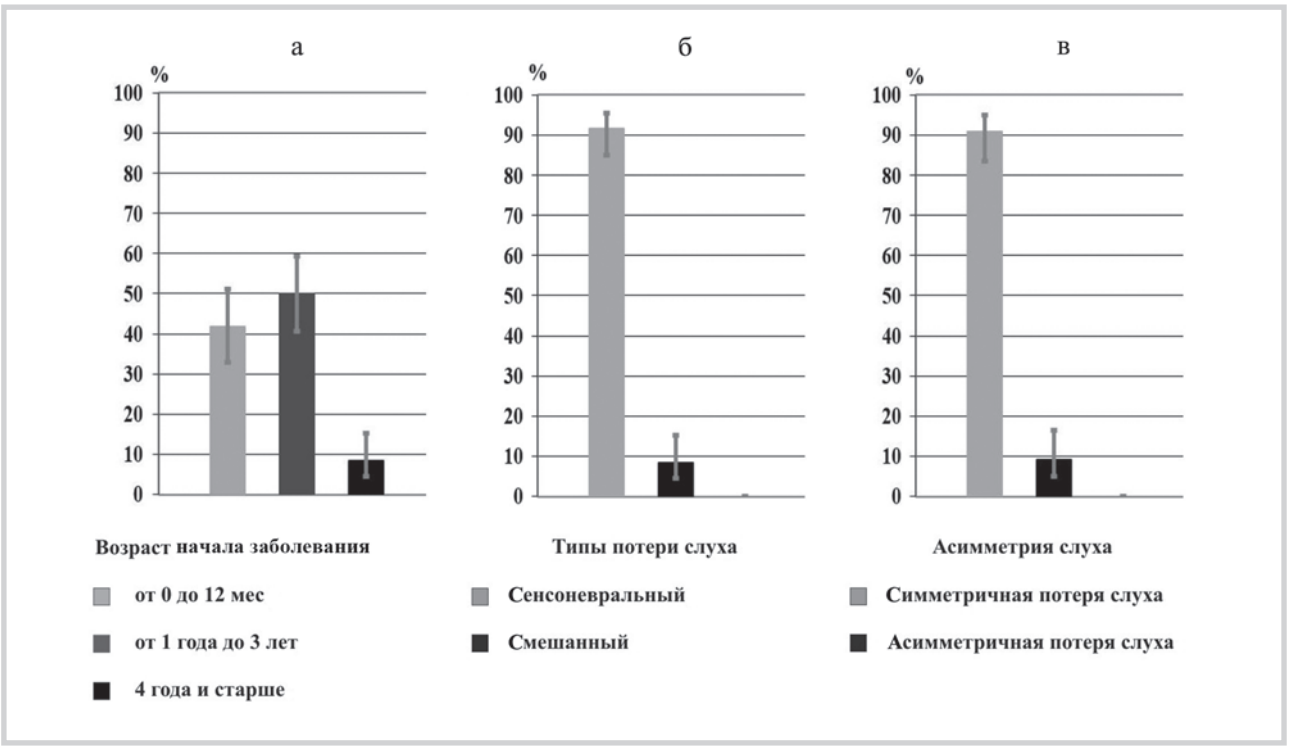


Рис. 1. **Клинико-аудиологические данные пациентов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A.**

Доверительный интервал а — между возрастами начала заболевания (*n*=108), б — между типами потери слуха (*n*=108), В — между симметричностью и асимметричностью потери слуха (*n*=99); пациенты со смешанным типом потери слуха (*n*=9) не были включены в анализ асимметрии слуха (в).

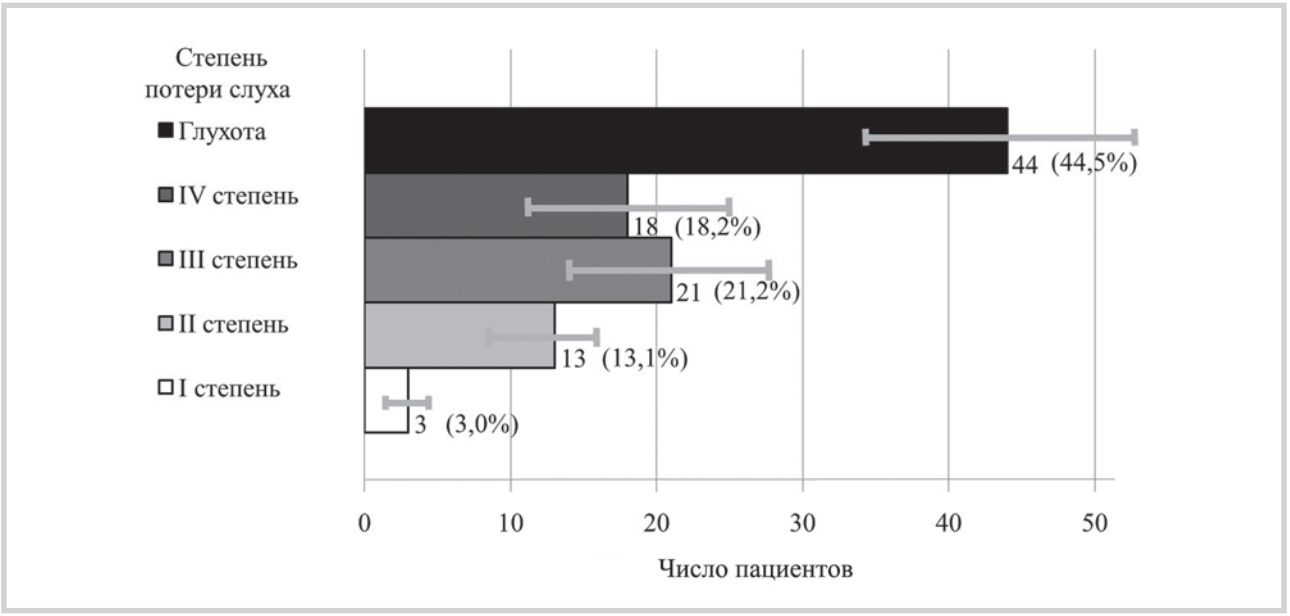
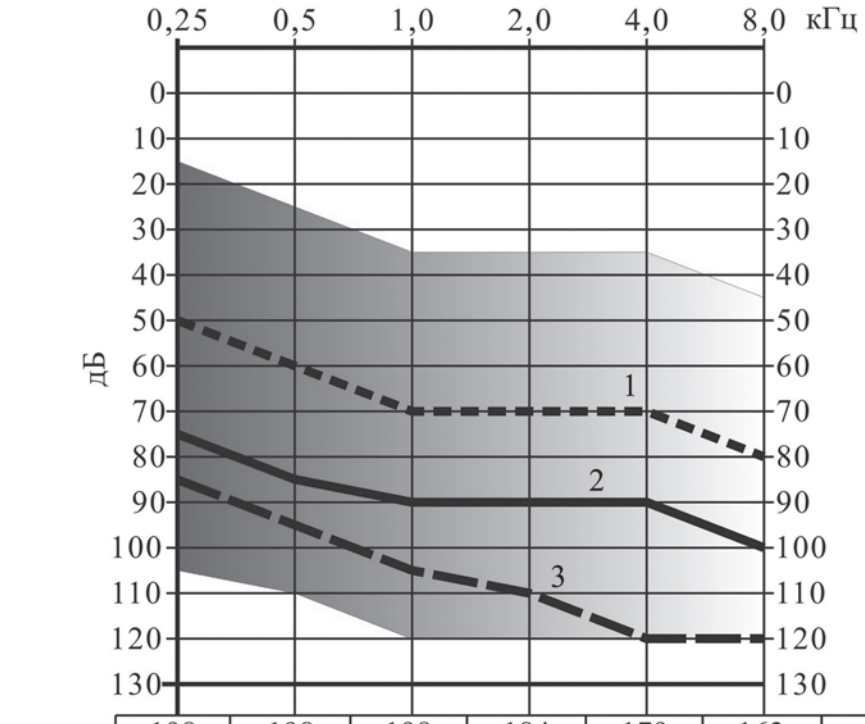


Рис. 2. **Степени потери слуха у пациентов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A, *n*=99.**

Степени потери слуха обследованных (*n*=99) были рассчитаны по порогам слуха в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$ на лучше слышащее ухо **(рис. 2)**: I степень сенсоневральной тугоухости была выявлена у 3 индивидов (3,0%), II степень — у 13 (13,1%), III степень — у 21 (21,2%), IV степень — у 18 (18,2%) и глухота — у 44 индивидов (44,5%). При этом степень потери слуха «глухота» встречалась достоверно чаще, а I степень — достоверно реже, чем другие степени (p<0,05). Потери слуха II, III и IV степени не имели статистически значимых отличий между собой.

Аудиопрофильпри GJB2-генотипес.-23+1G>A/с.-23+1G>A. Для представления общей характеристики потерь слуха



		198	198	198	184	179	163	ушей
Процентиль	25-й	50,00	60,00	70,00	70,00	70,00	80,00	дБ
	50-й	75,00	85,00	90,00	90,00	90,00	100,0	
	75-й	85,00	95,00	105,0	110,0	120,0	120,0	

Рис. 3. **Обобщенная аудиограмма индивидов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A.**

198 ушей; область с заливкой обозначает максимальные пределы аудиограмм; 1 — 25-й процентиль, 2 — медиана, 3 — 75-й процентиль.

индивидов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A (*n*=99) все аудиограммы (оба уха — 198 ушей) были обобщены. На 25-м процентиле наклон аудиопрофиля от 0,25 кГц до 8,0 кГц составил 30,0 дБ (в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$ — 10,0 дБ), на 50-м — 25,0 дБ (в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$ — 5,0 дБ), на 75-м — 35,0 дБ (в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$ — 25,0 дБ). Таким образом, показано, что характерным для *GJB2*-генотипа с.-23+1G>A/с.-23+1G>A является близкий к горизонтальному аудиопрофиль в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$ **(рис. 3)**.

В настоящем исследовании впервые был проведен аудиологический анализ на масштабной выборке пациентов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A. Были изучены анамнестические и аудиологические данные 108 пациентов с аллельной формой АРГ1 типа, обусловленной гомозиготным по мутации с.-23+1G>A генотипом, подтвержденным прямым ресеквенированием экзона 1 и экзона 2 гена *GJB2*.

Полученные результаты показали, что возраст начала болезни у пациентов с аллельной формой заболевания, выявленной в Якутии, отмечается преимущественно до 3 лет (91,7%). По данным K. Tsukada [6], тугоухость, обусловленная с.235delC в гомозиготном состоянии, в Японии также (58,5%) диагностируется в возрасте до 3 лет, а тугоухость, обусловленная p.V37I, — в 4—5 лет (36,4%) и старше 6 лет (41,1%). В целом анализ подтверждает врожденный характер заболевания у индивидов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A, но не исключает вероятность прогрессирования нарушения слуха с рождения до 4 лет.

Тип потери слуха у 99 обследованных пациентов (91,7%) был сенсоневральным, у 9 (8,3%) — смешанным **(см. рис. 1, б)**. Не исключено,что смешанный тип тугоухости был зарегистрирован в результате того, что при тестировании костной проводимости пациенты с тяжелой степенью сенсоневральной тугоухости могли отвечать не на предъявляемый звуковой стимул, а на ощущаемую вибрацию костного генератора.

Наше исследование показало симметричное поражение слуха в 90,9% случаев у пациентов, гомозиготных по мутации 23+1G>A гена *GJB2*. Похожие результаты были получены при мультицентровом исследовании R. Snoeckx [7], где общая доля симметричного поражения слуха (разница между ушами не более 15,0 дБ) при *GJB2*-обусловленной глухоте составила 90,0%. Вероятно,

Сравнение степеней потери слуха при *GJB2*-генотипах с.-23+1G>A/с.-23+1G>A и с.35delG/с.35delG

Степени потери слуха, усреднение 0,5, 1,0, 2,0 кГц*	с.-23+1G>A/с.-23+1G>A, *n*=99 (данные настоящего исследования)	с.35delG/с.35delG, *n*=889 (R. Snoeckx и соавт., 2005**)	χ^2 (значение *p*)
Легкая потеря слуха, 21—40 дБ	3 (3,0%)	9 (1,0%)	3,02 (*p*>0,05)
Тугоухость средней тяжести, 41—70 дБ	34 (34,3%)	89 (10,0%)	48,35 (*p*<0,001)
Тяжелая тугоухость, 71—95 дБ	25 (25,3%)	222 (25,0%)	0,00 (*p*>0,05)
Глухота, >95 дБ	37 (37,4%)	569 (64,0%)	26,64 (*p*<0,001)

Примечание. * — классификация степеней потери слуха по R. Snoeckx и соавт. [7], где легкая потеря слуха — 21—40 дБ, тугоухость средней тяжести — 41—70 дБ, тяжелая тугоухость — 71—95 дБ, глухота — >95 дБ; ** — мультицентровое исследование [7]. Выделены степени, имеющие статистически значимые отличия при *p*<0,05.

что около 10% асимметричного поражения слуха либо является закономерной долей при *GJB2*-обусловленной глухоте, либо является статистической долей экзогенного влияния.

В данном исследовании у 44 индивидов (44,5%) с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A была зарегистрирована глухота **(см. рис. 2)**, в остальных случаях были выявлены I (3,0%), II (13,1%), III (21,2%) и IV (18,2%) степени сенсоневральной тугоухости. Полученные результаты свидетельствуют о вариабельности тяжести данной аллельной формы заболевания. Возможно, тяжесть заболевания во многом зависит от влияния генов-модификаторов и экзогенных факторов [8]. Несмотря на преобладание глухоты (44,5%) у пациентов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A, при сравнении с наиболее распространенным в Европе *GJB2*-генотипом с.35delG/с.35delG **(см. таблицу)** находит подтверждение мнение K. Cryns [9] и R. Snoeckx [7] о более мягком патологическом эффекте мутации с.-23+1G>A. Так, при оценке степеней потери слуха по классификации, использованной R. Snoeckx, степень «глухота» встречается у 37,4% пациентов с *GJB2*-генотипом с.-23+1G>A/с.-23+1G>A против 64,0% у индивидов с *GJB2*-генотипом с.35delG/с.35delG **(см. таблицу)**.

Выявленный нами «плоский» (близкий к горизонтальному) аудиопрофиль при *GJB2*-генотипе с.-23+1G>A/с.-23+1G>A также был описан Y. Bajaj [2] у трех пациентов в Великобритании (выходцев из Бангладеш) [2]. Такая конфигурация аудиопрофиля, возможно, указывает на равномерное поражение волосковых клеток по всему частотно-специфичному протяжению органа Корти. Подобный аудиопрофиль теоретически может оцениваться как благоприятный прогностический признак при абилитационно-реабилитационных мероприятиях у пациентов с данной аллельной формой заболевания.

Заключение

Полученные нами результаты характеризуют аллельную форму заболевания при *GJB2*-генотипе с.-23+1G>A/с.-23+1G>A как врожденную двустороннюю симметричную (90,1%), сенсоневральную (90,1%), вариабельную по степени тяжести потерю слуха (от I степени до глухоты), с «плоским» аудиопрофилем (наклон медианы в $РДЧ_{0,5,\ 1,0,\ 2,0,\ 4,0\ кГц}$, не более 5,0 дБ). Таким образом, проведенный аудиологический анализ позволяет предположить относительно равномерное, но вариабельное по тяжести поражение слуха у пациентов, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* (Cx26), что является благоприятным прогностическим признаком для слухопротезирования.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (14-04-01741_А), (14-04-9010_Бел_А), госзаказа Министерства образования и науки РФ «Генетическая история народов Восточной Сибири и эндемичные формы наследственно-обусловленных нарушений слуха» (ГК№6.656.2014/К), Интеграционного проекта СО РАН №92 «Этногенез автохтонных народов Сибири и Северной Азии: компаративный, исторический, этносоциальный и геномный анализ», Гранта Президента Республики Саха (Якутия) им. А.И. Иванова для молодых ученых, специалистов и студентов за 2015 г. (медицинские науки) (РП №80 от 05.02.2015), Гранта НОФМУ «Научные исследования» РС(Я) — №2013020100612 на 2014 г. Авторы выражают искреннюю признательность всем участникам исследования, сотрудникам: ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №2 — Центр экстренной медицинской помощи» (Якутск) *А.А. Кожевникову*, *Л.А. Кларову*; ГБУ РС(Я) «Республиканская больница №1 — Национальный центр медицины» (Якутск) к.м.н. *Э.Е. Федотовой*, *Л.М. Васильевой*; ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (Якутск) д.б.н., проф. *Н.Н. Сазонову,* д.б.н. *С.А. Федоровой*, к.б.н. *С.К. Кононовой*, к.м.н. *С.Н. Лехановой*, к.б.н *А.М. Рафаилову*, *Г.П. Романову*, *Н.Н. Готовцеву*, *М.В. Пак*; Центра коллективного пользования «Геномика» ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН» (Новосибирск) к.б.н. *И.В. Морозову*, к.х.н. *А.А. Бондарь*; ФГБУН «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем» (Якутск) д.м.н. *М.И. Томскому*, к.м.н. *Н.А. Соловьевой*; ФГБУН «Институт гуманитарных исследований и проблем малочисленных народов Севера СО РАН» (Якутск) д.ист.н., проф. *А.Н. Алексееву*; ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН» (Уфа) д.м.н. *Л.У. Джемилевой*; ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет» (Уфа) д.б.н., проф. *Э.К. Хуснутдиновой*, а также ФГБУН «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск) к.б.н. *О.Л. Посух*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barashkov NA, Dzhemileva LU, Fedorova SA, Teryutin FM, Posukh OL, Fedotova EE, Lobov SL, Khusnutdinova EK. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene as a result of founder effect. *Journal of Human Genetics*. 2011;56(9):631-639.

   doi: 10.1038/jhg.2011.72.

2. Bajaj Y, Sirimanna T, Albert DM, Qadir P, Jenkins L, Bitner-Glindzicz M. Spectrum of *GJB2* mutations causing deafness in the British Bangladeshi population. *Clinical Otolaryngology*. 2008;33(4):313-318.

   doi: 10.1111/j.1749-4486.2008.01754.x.

3. Sirmaci A, Akcayoz-Duman D, Tekin M. The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *Journal of Genetics*. 2006;85(3):213-216.

   doi: 10.1007/bf02935334.

4. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*. 1997;387(6628):80-83.

   doi: 10.1038/387080a0.

5. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(4):792-799.

   doi: 10.1086/301807.

6. Tsukada K, Nishio S, Usami S, Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of *GJB2* mutation in Japanese hearing loss patients. *Clinical Genetics*. 2010;78(5):464-470.

   doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01407.x.

7. Snoeckx RL, Huygen PLM, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P, Ambrosetti U, Nowakowska-Szyrwinska E, Bal J, Wiszniewski W, Janecke AR, Nekahm-Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm HL, Tekin M, Incesulu A, Dahl H-HM, Desire´e du Sart, Jenkins L, Lucas D, Bitner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, Ignacio del Castillo, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Van Maldergem L, Hilbert P, Roux A-F, Mondain M, Hoefsloot LH, Cremers CWRJ, Löppönen T, Löppönen H, Parving A, Gronskov K, Schrijver I, Roberson J, Gualandi F, Martini A, Lina-Granade G, Pallares-Ruiz N, Correia C, Fialho G, Cryns K, Hilgert N, Van de Heyning P, Nishimura CJ, Smith RJH, Van Camp G. *GJB2* Mutations and Degree of Hearing Loss: A Multicenter Study. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;77(6):945-957.

   doi: 10.1086/497996.

8. Hilgert N, Huentelman MJ, Thorburn AQ, Fransen E, Dieltjens N, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Skorka A, Waligora J, Ploski R, Castorina P, Primignani P, Ambrosetti U, Murgia A, Orzan E, Pandya A, Arnos K, Norris V, Seeman P, Janousek P, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Nishimura CJ, Janecke A, Nekahm-Heis D, Martini A, Mennucci E, Tóth T, Sziklai I, Castillo I, Moreno F, Petersen MB, Iliadou V, Tekin M, Incesulu A, Nowakowska E, Bal J, Heyning PV, Roux A-F, Blanchet C, Goizet C, Lancelot G, Fialho G, Caria H, Liu XZ, Xiaomei O, Govaerts P, Grønskov K, Hostmark K, Frei K, Dhooge I, Vlaeminck S, Kunstmann E, Laer LV, Smith RJH, Camp GV. Phenotypic variability of patients homozygous for the GJB2 mutation 35delG cannot be explained by the influence of one major modifier gene. *European Journal of Human Genetics*. 2008;17(4):517-524.

   doi:10.1038/ejhg.2008.201.

9. Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PLM, Moreno F, I del Castillo, Chamberlin PG, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJH, Van Camp G. A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *Journal of Medical Genetics*. 2004;41(3):147-154.

   doi: 10.1136/jmg.2003.013896.