Sarem Journal of Medical Research. Volume 6, Issue 2, summer 2021: 103-110

Report of Mutation type and Accurate Sizing of *FMR1* CGG Repeats in Four Iranian Patients with Primary Ovarian Insufficiency (POI) and Idiopathic Infertility

ARTICLE INFO

Article Type
Case Report

Authors
Akram Abdi[1,2], M.Sc
Tamouchin Moharrami [1,2*], PHD
Reza Mahdian[3], MD, PHD
AboTaleb Saremi[1,2], MD

[1] Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran.
[2] Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran.
[3] Genetic & Metabolism Group, Molecular Medicine division, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Corresponding Author
Address: Sarem Women Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran.
Postal code: 1396956111
Phone: +98 (021) 44670888
Fax: +98 (021) 44670432
Tamochinmoh@gmail.com

Article History
Received: September 01, 2021
Accepted: September 13, 2021
e Published: July 20, 2022

ABSTRACT

Background and Aims: The fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene contains a CGG repeat sequence within its 5'UTR, the expansion of which can result in both neurological and reproductive disorders. Repeats containing more than 200 CGG repeats are defined as a full mutation and cause fragile X syndrome. The repeat numbers between 55 and 200 CGG are defined as permutation (PM) and can cause premature ovarian insufficiency (POI) and diminished ovarian reserve (DOR). Normal alleles have 5 to 44 repeats and intermediate 45 to 54 (IM). POI affects ~ 1% of women before the age of 40 and 0.1% before the age of 30. Twenty percent of women with POI can have the premutation of CGG repeat, which can expand to the full mutation in the following generations causing Fragile X syndrome with Intellectual disability. Therefore it is important to evaluate patients with POF for the presence of CGG repeats. The aim of this study is mutation detection and determination of expanded allele of the FMR1 CGG repeats using TRP PCR in four Iranian women from 29 to 34 years old.

Material & Methods: Four women in the age range of 29-34 with premature ovarian insufficiency (POI) and idiopathic infertility after genetic counseling were referred to the Molecular Laboratory in the Department of Medical Genetics, Sarem Women's Hospital. DNA of whole blood samples was extracted using the salting-out method. Amplification of the FMR1 gene of every patient was performed by TRP PCR using automated capillary electrophoresis used for the detection of expended FMR1 alleles.

Findings: CGG repeats sizing using TRP-PCR identified 3 women with PM allele, one was homozygote and two were heterozygote for PM allele. Another patient showed a heterozygote IM allele.

Conclusion: In this study, the FMR1 gene PM alleles and also IM allele were associated with infertility. It is recommended that women with POI and Infertility of unknown etiology, and particularly those with a family history of POI, should be considered for the evaluation of CGG repeats.

Keywords: FMR1 Gene; Premature Ovarian Insufficiency (POI); Infertility; TRP-PCR; Fragile X Syndrome.

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

گزارش نوع موتاسیون و اندازه گیری دقیق تکرارهای CGG ژن *FMR1* در چهار بیمار ایرانی با نارسایی زودرس تخمدان (POI) و ناباروری ناشناخته

اکرم عبدی[۱،۲]، تموچین محرمی[۲و۱*]، رضا مهدیان[۳]، ابوطالب صارمی [۱،۲]

[۱] مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
[۲] پژوهشکده سلولی و مولکولی و سلول های بنیادی صارم(SCRC)، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران.
[۳] بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران- ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ژن عامل سندرم ایکس (X) شکننده همراه با ناتوانی ذهنی ۱ (The fragile X mental) (*FMR1* retardation 1) دارای توالی تکرار CGG در ۵' UTR ناحیه پروموتور خود می‌باشد که گسترش این تکرارها می‌تواند منجر به بیماری نورولوژیکی ایکس شکننده و تولید مثلی شود. تکرارهای بیش از ۲۰۰ CGG به عنوان جهش کامل نام برده می‌شود که موجب سندرم X شکننده می‌گردد. تعداد تکرارهای بین ۵۵ تا ۲۰۰ CGG به عنوان پیش جهش تعریف می‌شوند و می‌توانند موجب نارسایی زودرس تخمدان (POI) و کاهش ذخیره تخمدان (DOR) شوند. آلل‌های نرمال بین ۵ تا ۴۴ تکرار و آلل‌های متوسط ۴۵ تا ۵۴ تکرار CGG دارند. POI تقریباً یک درصد از زنان زیر ۴۰ سال و ۰،۱ درصد از زنان زیر ۳۰ سال را درگیر می‌کند. هدف از این مطالعه، تعیین موتاسیون و اندازه‌گیری دقیق تعداد تکرارهای CGG در ژن *FMR1* توسط روش TRP PCR، در چهار زن ایرانی دارای دامنه سنی ۲۹ تا ۳۴ ساله با نارسایی زودرس تخمدان و ناباروری ناشناخته است. از آنجایی که ۲۰ درصد خانم‌ها با POF واجد تکرارهای پیش جهشی CGG می‌باشند، بررسی این تکرارها در این بیماران بسیار مهم است چرا که افزایش این تکرارها در نسل‌های بعدی می تواند منجر به تولد فرزندان مبتلا به ناتوانمندی ذهنی سندرم ایکس شکننده گردد.

مواد روش‌ها: چهار بیمار بعد از مشاوره ژنتیک، به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی در دپارتمان ژنتیک پزشکی بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی زنان صارم ارجاع داده شدند. DNA لنفوسیت‌های خونی با روش Salting Out استخراج شد. تکثیر ژنی در هر بیمار توسط روش TRP PCR و آنالیز محصولات تکثیر ژنی، با استفاده از Capillary Electrophoresis برای تعیین آلل‌های گسترش یافته ژن *FMR1* انجام گردید.

یافته ها: در اندازه‌گیری تکرارهای CGG برای هر کدام از پروبانده‌ها، سه بیمار با آلل پیش جهش بدست آمد که یکی از آن ها هموزیگوت بوده و در دو بیمار آلل PM به صورت هتروزیگوت بود. در بیمار چهارم آلل متوسط هتروزیگوت بدست آمد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه انجام شده، آلل‌های پیش جهش و همچنین آلل متوسط ژن *FMR1* در بیماران همراه با ناباروری مشاهده گردید. بررسی تکرارهای CGG ژن *FMR1* در بیماران با POI و ناباروری با علل ناشناخته، به خصوص در مواردی که تاریخچه خانوادگی از POI وجود دارد، توصیه می شود.

کلید واژه‌ها: ژن *FMR1*؛ نارسایی زودرس تخمدان (POI)؛ ناباروری؛ TRP-PCR.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲
*نویسنده مسئول: تموچین محرمی

مقدمه

ناباروری تقریباً ۹ درصد از زوج‌ها یا به طور متوسط ۷۲ میلیون زن در سنین بین ۲۰ تا ۴۴ سال را در جهان درگیر می‌کند. یکی از رایج‌ترین دلایل نازایی زنان کاهش ذخیره تخمدان[۱](DOR) است. DOR با علایمی مانند کاهش در تعداد و کیفیت اووسیت‌ها، کاهش احتمال رخداد حاملگی، افزایش میزان سقط خود به خودی و کاهش پاسخ به تحریک تخمدان در لقاح آزمایشگاهی (IVF) مشخص می‌شود [۱و۲].

[۱] Decreased Ovarian Reserve (DOR)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

نارسایی زودرس تخمدان[۲](POI) عبارتی است که در تفسیر دامنه وسیعی از عملکرد معیوب تخمدان بکار برده می‌شود. همچنین یک بیماری هتروژن است که در زنان قبل از سن ۴۰ سالگی تشخیص داده می‌شود. POI وضعیتی است که با DOR (چرخه قاعدگی منظم یا غیر منظم، کم باروری، سطوح هورمون FSH بالا و میزان پایین هورمون آنتی‌مولرین (AMH)، شمار فولیکول‌های آنترال (AFC) < ۷-۵ (۲ تا ۱۰ میلی متر) شروع می شود و در نهایت به عدم عملکرد زودرس تخمدان[۳](POF) (فقدان قاعدگی، به طور قابل افزایش توجه سطوح FSH، ناباروری) می‌رسد. شیوع POF تقریبا ۱:۱۰۰۰۰ در زنان زیر ۲۰ سال، ۱:۱۰۰۰ از زنان زیر ۳۰ سال و ۱:۱۰۰ از زنان زیر ۴۰ سال است. عدم عملکرد تخمدان و کاهش فولیکول دو مکانیسم اساسی در موارد POI هستند [۳]. به طور کلینیکی، بیماران ممکن است علایمی مانند، قطع قاعدگی اولیه یا ثانویه و یا قاعدگی اندک را نشان دهند. عوامل متعددی، مانند فاکتورهای ژنتیکی، سابقه شیمی درمانی یا رادیوتراپی، جراحی تخمدان‌های دو طرف، بیماری‌های خودایمنی یا عفونی، به عنوان دلیل POI شناخته شده‌اند. اما، در بیشتر مواقع، عوامل آن ناشناخته باقی می‌ماند. ژن عقب‌ماندگی ذهنی X شکننده (*FMR1*) بیشترین دلیل ژنتیکی همراه با POI است [۴]. همراه بودن بازآرایی‌های کروموزوم X با POF در مطالعات متعددی نشان داده شده است. دو ناحیه مهم و حیاتی در بازوی بلند کروموزوم X به عنوان ژن‌های قلمداد شده POF هستند که شامل *POF1* در ناحیه Xq26-q28 و *POF2* در Xq13.3-q22 هستند. ژن *FMR1* به عنوان حساس‌ترین ژن در *POF1* است. ارتباط بین وضعیت پیش جهش ژن *FMR1* و بیماری POF خاطر نشان می‌کند که ژن *FMR1* خطر POF و طبق مطالعات اخیر، بیماری‌زایی DOR را افزایش می‌دهد[۲]. ژن *FMR1* در Xq27.3 قرار گرفته است که سندرم X شکننده (یک شکلی از عقب افتادگی ذهنی وابسته به X) مربوط به این ژن می‌باشد. این ژن دارای تعداد متغیری از تکرارهای CGG در ۵′UTR است که در انواع مختلف آللی با توجه به تعداد تکرارها طبقه‌بندی می‌شود و ارتباط فنوتیپی آن شامل: آلل نرمال بین ۵ تا ۴۴ تکرار، آلل متوسط بین ۴۵ تا ۵۴ تکرار، آلل پیش جهش بین ۵۵ تا ۲۰۰ تکرار و جهش کامل با تعداد بیشتر از ۲۰۰ تکرار را شامل می‌شود. برای ارزیابی خطر[۴]FXS و بیماری‌های همراه آن تعداد تکرارها و وضعیت متیلاسیون ژن باید مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. آلل‌های بالاتر از ۲۰۰ تکرار به طور معمول متیله هستند و نتیجه آن خاموشی ژن است و موجب تولید نشدن FMRP به عنوان محصول پروتئینی و ظهور سندرم X شکننده که رایج‌ترین شکل ناتوانی ذهنی و اوتیسم ارثی می‌شود [۲و۵].

در نتیجه‌ی توارث وابسته به X غالب ژن *FMR1*، زنان مبتلا به سندرم X شکننده در علایم بیماری تنوع بیشتری نشان می‌دهند و به طور ملایم‌تری از مردان به دلیل غیر فعال شدن یکی از کروموزوم‌های X مبتلا خواهند بود. شدت علایم بیماری در زنان با سندرم X شکننده با سطح فعالیت ژن *FMR1* نرمال و میزان تولید FMRP ارتباط معکوس خواهد داشت. احتمال داشتن فرزند مبتلا در یک زن مبتلا، ۵۰ درصد خواهد بود اما همه دختران یک مرد مبتلا آلل معیوب را به ارث خواهند برد؛ در صورتی که همه پسرانش نرمال خواهند بود. مردان همراه با پیش جهش، آلل PM را به دخترانشان انتقال می دهند، اما گسترش به جهش کامل به شدت نادر است. خطر گسترش به آلل جهش کامل به اندازه تکرار CGG و حضور وقفه‌های AGG در آلل پیش جهش مادری بستگی دارد[۵و۶]. ناقلین پیش جهش سندرم X شکننده معمولاً به طور ذهنی ناتوان نیستند، اما می‌توانند فنوتیپ‌های خاصی مانند شکل ملایم سندرم X شکننده، سندرم ترمور آتاکسیا همراه سندرم X شکننده (FXTAS) و در زنان، سندرم نارسایی زودرس تخمدان همراه سندرم X شکننده FXPOI را نشان دهند[۵]. ۲۰ از زنان ناقل آلل پیش جهش *FMR1* ممکن است دچار (POI) شوند [۸]. اهمیت دیگر برای آزمایش پیش جهش *FMR1*، افزایش خطر گسترش به طول جهش کامل (بالای ۲۰۰ تکرار CGG) در فرزندان و ابتلا به سندرم X شکننده است. این خطر به طور مستقیم با افزایش تعداد تکرارهای CGG ناقل پیش جهش و به طور قابل توجه در تکرارهای بالاتر از ۶۵ تا ۷۰ تکرار همراه است [۴]. اعتقاد بر این است که گسترش تکرارها عامل دست کم ۹۹ درصد از موارد سندرم X شکننده را نمایان می‌کند. حدود ۱ تا ۲ درصد از همه کودکان با تاخیر تکاملی به دلیل داشتن سندرم X شکننده با گسترش CGG یافت شده‌اند. هر چند انواع دیگر واریانت‌های بیماری به دلیل جهش ژن *FMR1* گزارش شده‌اند که شامل حذف‌های بزرگ ژنی، حذف ۵′ UTR اگزون ۱ همراه یا بدون گسترش جهش کامل CGG در ژن *FMR1* مادر است. همین طور شمار کمی از واریانت‌های تک نوکلئوتیدی (CNVs) در ناحیه کدینگ ژن *FMR1* گزارش شد [۹]. همچنین، تشخیص زود هنگام POI و یک درک منطقی از تدبیر آن در حفظ کیفیت زندگی، جلوگیری از پوکی استخوان و بهبود وضعیت ناباروری در این بیماران به عنوان یک ضرورت در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. هدف از این مطالعه، تعیین موتاسیون و تشخیص اندازه دقیق تعداد تکرارهای CGG و تعداد وقفه‌های AGG (آدنین، گوانین، گوانین) درون توالی تکرار های CGG در ۵′ UTR ژن *FMR1* در چهار زن با نارسایی زودرس تخمدان (POI) و ناباروری ناشناخته با استفاده از روش TRP PCR است.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه به بررسی مولکولی ژن *FMR1* در چهار بیمار ارجاع داده شده به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دپارتمان ژنتیک پزشکی بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی زنان صارم طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۸ پرداخته شد. بیماران در سنین بین ۲۹ تا ۳۴ سال به دلیل POI و ناباروری ناشناخته بعد از مشاوره ژنتیک استاندارد جهت تشخیص دقیق اندازه تکرار های CGG و الگوی انقطاع AGG در ۵′UTR ژن *FMR1* مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفتند. معیارهای در نظر گرفته شده برای ورود افراد به

[۲] Primary Ovarian Insufficiency (POI)
[۳] Premature Ovarian Failure (POF)
[۴] Fragile X syndrome (FXS)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

مطالعه شامل: قطع قاعدگی اولیه یا ثانویه ناشناخته برای دست کم چهار ماه و دو ثبت از افزایش سطوح FSH (< ۱۰ IU/l) در روزهای ۲ تا ۴ چرخه قاعدگی) در دست کم یک ماه در فاصله ی کم و میزان پایین هورمون آنتی مولرین (کمتر از ۰,۲ تا ۰,۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر) پیش از بند آمدن قاعدگی در زنان قبل از سن ۴۰ سالگی است [۷]. بیماران با بیماری‌های شناخته شده القا کننده POI مانند سابقه رادیوتراپی و شیمی درمانی، و جراحی تخمدان و بیماری‌های خودایمنی در نظر گرفته نشدند [۴]. بیمار اول زنی۳۴ ساله بود که به دلیل نارسایی زودرس تخمدان و سابقه‌ای از سندرم X شکننده و بیماری‌های همراه آن در خانواده جهت ارزیابی مولکولی ارجاع داده شد. بیمار دوم زنی ۳۴ ساله بود که ازدواج غیر خویشاوندی داشته و مدت ۱۲ سال از ازدواجش گذشته بود. همچنین، مدت ۱۱ سال دچار ناباروری بود. ابعاد رحم ۸۶×۴۲ میلی متر با دیواره و نیز ظاهر و سایز تخمدان ها نرمال بود. کاریوتایپ او نرمال بوده که در استفاده از روش‌های کمک باروری با شکست در IVF مواجه شده بود. نتایج آزمایشگاهی بر طبق جدول شماره ۱ می باشد. بیمار سوم زنی ۳۰ ساله که مدت سیزده سال و به طور غیر خویشاوندی ازدواج کرده بود. آزمایش کاریوتایپ او نرمال بود. در سن ۲۳ سالگی دچار آمنوره ثانویه شد. نازایی اولیه و POF داشت. همچنین، مادر و خواهر کوچکتر بیمار نیز دچار POF بودند. آنالیز مربوط به ژن های ترومبوفیلی نرمال گزارش شد و حاملگی کمیکال داشت. بیمار چهارم زنی ۲۹ ساله با ازدواجش غیر خویشاوندی که نتیجه سونوگرافی از تخمدان سالم بود. همچنین، سابقه ناباروری و شکست در IVF داشت. پدر و مادر بیمار خویشاوند درجه سوم بودند و از نظر ژن *PAI-1* در ریسک ترومبوفیلی قرار داشت. یافته های آزمایشگاهی بر طبق جدول شماره ۱ می‌باشد.

جدول ۱: نتایج آزمایش های تشخیص پزشکی در دو نفر از بیماران

نوع آزمایشات	بیمار دوم	بیمار چهارم
LH	۶.۶۲ IU/L	۳.۴ IU/L
FSH	۱۴.۰۹ IU/L	۵ IU/L
Prolactin	۱۳ ng/ml	۲۲ ng/ml
TSH	۱.۲۴ IU/L	۲.۶ IU/L
βHCG	۰.۵ IU/ml >	۰.۵ IU/ml >
Estradiol	-	۳۵ pg/ml
Anti-Mullerian hormone	-	۴.۵ ng/ml
Vitamin D3	-	۴۰.۵ ng/ml
Testosterone	۲۰ ng/ml >	-
OH-Progesterone	۴ ng/ml	-
T3	۱.۱ mg/dl	-
T4	۱۰.۱ mg/dl	-

آزمایش FMR1

میزان ۵ سی‌سی خون محیطی از بیماران گرفته و در لوله حاوی EDTA نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی از لنفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از روش Salting out انجام گردید. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودرآپ استفاده شد. در این مطالعه، مقایسه اندازه تکرارهای CGG در ژن FMR1 در زنان با POI و ناباروری ناشناخته با استفاده از روش ارزیابی PCR پرایمر سه تایی (TRP-PCR) انجام شد. بیماران با استفاده از معرف‌های AmplideX® PCR/CE FMR1 Reagents (RUO) برای اندازه‌گیری تکرارهای سه‌تایی در ناحیه ۵′ UTR ترجمه نشونده ژن FMR1 در لوکوس FRAXA مورد بررسی قرار گرفتند. آشکارسازی و تعیین اندازه قطعات DNA حاصل از تکثیر به وسیله Genetic Analyzer و Capillary Electrophoresis انجام شدند. اطلاعات توسط نرم افزار GeneMapper (Applied Biosystems) مورد بررسی قرار گرفت. الگوریتم‌های Asuragen® برای انعکاس اندازه امپلیکون بیماران با تعداد تکرار CGG بوسیله مقایسه نمونه نسبت به اندازه استاندارد معلوم موجود در AmplideXTM Kit استفاده شد. نتیجه نهایی به عنوان اندازه FMR1 CGG برای هر بیمار گزارش گردید. اندازه تکرارها طبق طبقه بندی ACMG به قرار زیر بود: بزرگتر از ۲۰۰ تکرار به عنوان موتاسیون کامل، ۵۵ تا ۲۰۰ تکرار به عنوان پیش جهش، ۴۵ تا ۵۴ تکرار به عنوان آلل‌های Gray Zone یا متوسط و کمتر از ۴۵ تکرار به عنوان آلل‌های نرمال گزارش شدند [۱۱].

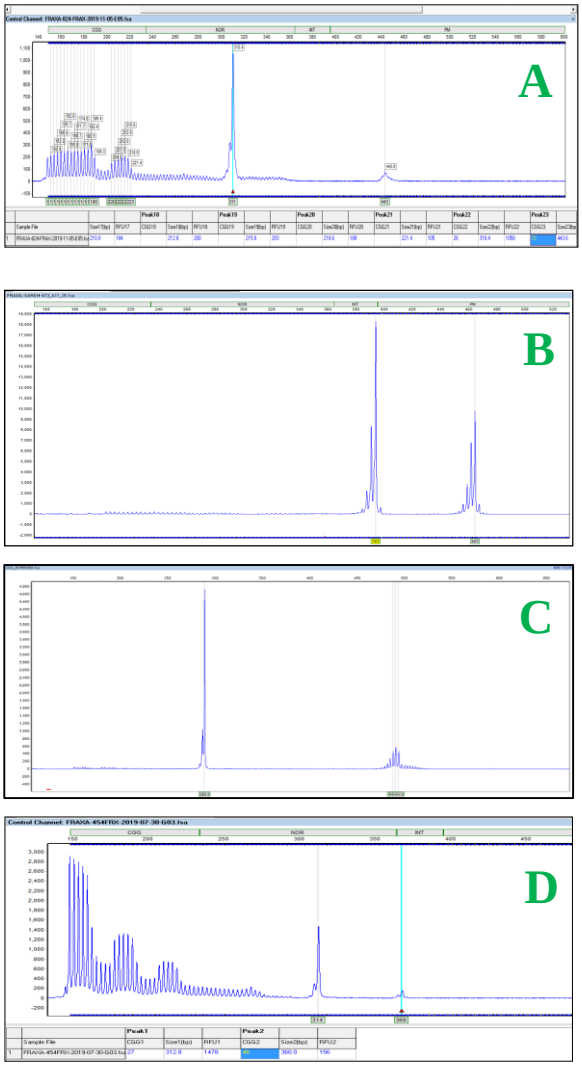
ترکیبات شامل پرایمرهای مخصوص ژن و پرایمر CGG، بافر میکس پلی مراز برای ازدیاد ناحیه تکرار CGG در ژن FMR1 است. همچنین، آنالیز محصولات TRP-PCR برای تحلیل اندازه تکرارهای Cgg به Capillary Electrophoresis وابسته است که در آن از، سایز استاندارد ۱۰۰۰ نشاندار شده با Rox و یک ماده رقیق کننده بکار برده می‌شود. اجزاء مستر میکس TRP-PCR شامل بافر GC-Rich Amp ۱۱,۴۵ میکرولیتر، جفت پرایمرهای نشان‌دار (فلورسنت FAM) برای ازدیاد ژن FMR1 انسانی FMR1 F,R FAM ۰,۵ میکرولیتر، پرایمر CGG ژن FMR1 ۰,۵ میکرولیتر، رقیق کننده Diluent ۰,۵۰ میکرولیتر، پلیمراز GC-Rich Mix ۰,۰۵ میکرولیتر، نمونه ی DNA ۲ میکرولیتر در حجم مناسب واکنش ۱۵,۰۰ میکرولیتر بود. پروتوکل گرمایشی TRP-PCR برای انجام واکنش شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، به دنبال آن ۱۰ چرخه با دناتوراسیون در ۹۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ ثانیه، انیلینگ در ۶۲ سانتی‌گراد برای ۳۵ ثانیه، گسترش در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۲۰ چرخه با دناتوراسیون در ۹۷ سانتی‌گراد و در ۳۵ ثانیه و آنیلینگ ۶۲ در درجه در ۳۵ ثانیه و دمای گسترش ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه به همراه افزودن ۲۰ ثانیه در هر چرخه به زمان گسترش و مرحله گسترش نهایی (Final Extension) به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. بعد از این مرحله، محصولات PCR برای تجزیه و تحلیل توسط CE استفاده شد. بعد از اتمام سیکل گرمایی، محصولات به طور مستقیم با ۱۳,۰ میکرولیتر از محلول Formamide/ROX در هر چاهک از پلیت آنالیز CE جدید تقسیم و سپس به ترموسایکلر انتقال داده شد. نمونه ها باید قبل از آنالیز CE برای ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد دناتوره شده و با ۴ درجه سانتیگراد دنبال شوند تا برای تزریق در دستگاه CE آماده گردند. بعد از دناتوره محصولات امپلیکون‌ها توسط Applied Biosystems Genetic Analyzer Running از نظر سایز بررسی شد. بعد از تجزیه و تحلیل CE، الکتروفروگراف‌ها برای تشخیص پیک‌های محصول طول کامل مخصوص ژن و تکرارهای سه‌تایی CGG تجزیه و تحلیل شدند [۱۱].

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

نتایج

نتایج برای تعیین تعداد تکرارهای CGG در ۵' UTR ژن FMR1 در چهار زن با POI و ناباروری ناشناخته در سنین بین ۲۹ تا ۳۴ سال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در ارزیابی تعداد تکرارها در ژن FMR1، آلل‌ها به عنوان تکرارهای عدد صحیح همراه با طبقه بندی ژنوتیپی خاص: نرمال، متوسط، پیش جهش و جهش کامل گزارش شدند (شکل های A تا D).



تصویر شماره ۱: الکتروفروگراف ها نشان دهنده ی تعداد تکرارهای CGG در بیماران (شکل های A تا D). A: بیمار اول با آلل PM و هموزیگوت (۷۲ تکرار)؛ B: بیمار دوم با آلل PM هتروزیگوت (۳۴/۵۶)؛ C: بیمار سوم PM هتروزیگوت (۸۷/۱۹)؛ D: بیمار چهارم با آلل متوسط یا Gray Zone و هتروزیگوت (۴۶/۲۴)

TRP-PCR، تمایز آلل‌های هموزیگوت از هتروزیگوت را نشان داد. از چهار زن بررسی شده، سه بیمار آلل پیش جهش را مشخص کردند و در یکی از بیماران آلل متوسط یا Gray Zone تعیین داده شد. تعداد تکرارهای CGG به ترتیب در یکی از بیماران آلل PM به صورت هموزیگوت و همراه با ۷۲ تکرار و در دو بیمار دیگر آلل PM هتروزیگوت همراه با ۳۴/۵۶ و ۱۹/۸۷ تکرار CGG گزارش شد. تعداد تکرارها در بیمار همراه با آلل سایز متوسط هتروزیگوت، شامل ۲۷/۴۶ CGG بود (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج آزمایش تعیین تعداد تکرارهای CGG در ۵' UTR ژن *FMR1*.

بیماران	سن	تعداد تکرارها	تعیین موتاسیون
۱	۳۴	۷۲	PM/Homo
۲	۳۴	۳۴/۵۶	PM/Hetro
۳	۳۰	۱۹/۸۷	PM/Hetro
۴	۲۹	۲۷/۴۶	IM/Het

بحث:

در این مطالعه، چهار نفر بیمار زن با میانگین سنی ۳۲ سال به دلیل سابقه مثبت خانوادگی POI و قطع قاعدگی قبل از ۴۰ سالگی و همراه با ناباروری مورد بررسی تعیین دقیق گسترش تعداد تکرار های CGG در ناحیه پروموتور ژن *FMR1* قرار گرفتند. در بررسی ژنوتیپی بیماران توسط روش TRP-PCR و با استفاده از کیت Amplidex آلل پیش جهش در ۳ بیمار و آلل سایز متوسط در یک بیمار بدست آمد. طبق نتایج این بررسی، موتاسیون پیش جهش در یکی از بیماران زن به شکل هموزیگوت و در دو بیمار دیگر به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. پیش تر ناقلین آلل‌های پیش جهش ژن *FMR1* از نظر کلینیکی نرمال در نظر گرفته می‌شدند. اما، مطالعات بیشتر، اخیراً نشان دادند که ناقلین PM در خطر فنوتیپ‌های همراه سندرم X شکننده هستند. ناقلین PM خطر بالایی برای ابتلا به نارسایی زودرس تخمدان همراه سندرم X شکننده[۵](FXPOI) دارند، در حالی که ۳۰ درصد از مردان ناقل آلل پیش جهش، علایم سندرم ترمور اتاکسیا همراه سندرم X شکننده را بروز می‌دهند، بطوری که علایم لرزش‌های خودآگاه بیمار از ۵۰ سال به بعد شروع می‌شود و به تدریج به ناهماهنگی حرکتی پیشروی می کند[۱۲]. FXPOI از نظر کلینیکی دارای اهمیت است و به عنوان ناقلین پیش جهش *FMR1* تعریف می‌شود که کاهش باروری دارند. علایم FXPOI شامل قطع قاعدگی قبل از ۴۰ سالگی، عدم کارکرد تخمدان‌ها و کاهش باروری است که در نتیجه وجود بیومارکرهای منبع تخمدانی ناهنجار و کاهش عمل متقابل تخمدان به

[۵] Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

تحریک تخمک گذاری کنترل شده (COH) آشکار می‌شود [۸]. همراه بودن ژن *FMR1* با شکل‌های دیگر عدم کارکرد تخمدان، همانند بیماری زایی DOR کمتر شناخته شده است. این اختلافات کلینیکی در DOR به وسیله سطوح هورمونی غیر نرمال تخمدانی و قاعدگی منظم تشخیص داده می‌شود؛ در حالی که، POF به وسیله سطوح هورمون‌های تخمدانی بعد از قطع قاعدگی به اضافه ۴ ماه یا بیشتر، بعد از قطع قاعدگی (آمنوره) ثانویه در قبل از سن ۴۰ سالگی است [۱]. در بررسی صورت گرفته، آلل هموزیگوت شامل ۷۲ تکرار بود. دو بیمار زن دیگر به طور هتروزیگوت آلل پیش جهش را نشان دادند که در یکی از آن ها با آلل PM هتروزیگوت با ۵۶/۳۴ تکرار همراه بود. علایم در بیمار همراه با نازایی به مدت ۱۱ سال و با شکست در IVF وجود داشت. همچنین، در دیگر بیمار همراه با ۱۹/۸۷ تکرار بود. بیمار دچار نازایی اولیه، آمنوره ثانویه و POF بود. ضمناً، مادر و خواهر کوچکتر بیمار نیز مبتلا به POF بودند. در مورد آلل پیش جهش (۵۵ تا ۲۰۰ تکرار) باید توجه داشت که آن‌ها طی میوز ناپایدارند، مخصوصاً هنگامی که فاقد وقفه‌های AGG باشند، در نتیجه خطر افزایش گسترش تکرارهای سه تایی آلل‌ها به آلل با جهش کامل طی انتقال از مادر به فرزندانش وجود دارد [۱۳].

این ویژگی بارز بیماری پیش افتادگی یا Anticipation می‌باشد که در واقع با کاهش سن شروع و یا افزایش شدت بیماری طی ازدیاد نسل همراه است. علت اصلی این پدیده، گسترش طول حاوی تکرار سه تایی به علت لغزش حاصل از وجود توالی‌های سه نوکلئوتیدی تکراری پشت سر هم و بالطبع رخداد کراسینگ اور نابرابر و در نتیجه وخیم تر شدن اثرات آن می‌باشد. این خطر در آلل‌های PM هنگامی که تعداد تکرارها در آن بیشتر از ۹۰ تکرار باشد، به بیشتر از ۹۰ درصد می رسد و هنگامی در آلل PM تعداد تکرار CGG به بیش از ۱۰۰ تکرار برسد به بیشتر از ۹۸ درصد می رسد. همچنین، بعضی از ناقلین PM ممکن است مشکلات تاخیر تکاملی ملایم و مشکلات رفتاری نشان دهند [۱۳]. در اولین مطالعه جامع روی شیوع موتاسیون، گسترش تکرارهای سه تایی در ژن *FMR1* در زنان در سن باروری که در بخشی از چین انجام شد (PM 1/41, FM 1/3964)، سقط و القای آن در نتیجه تاخیر رشد جنین (۱/۷۵۶) بررسی شد. در این مطالعه، شیوع ناقلین پیش جهش در زنانی با تاریخچه سقط مکرر یا سقط القا شده در نتیجه تاخیر رشد جنین بیشتر از آن زنانی بود که بدون تاریخچه سقط در اطلاعات نوشته شده از آنان بودند. البته مکانیزم سقط همراه با پیش جهش تکرار CGG به طور کامل آشکار نبود. به علاوه در زنان ناقل، پیش جهش همراه با FXPOI، خطر بالاتری برای درگیری ناهنجاری‌های نورولوژیکی، باروری، درگیری غدد درون ریز، ایمونولوژی و سیستم های روانی می باشند. در نتیجه، شیوع بالای پیش جهش در زنان با تاریخچه سقط در این گروه مورد مطالعه توصیه‌هایی برای غربالگری موتاسیون تکرارهای سه تایی در زنان به همراه سقط مکرر با سقط القا شده در نتیجه تاخیر رشد جنین شده است [۱۴]. در یک مطالعه در کشور کامرون، طی بررسی‌ها دو خانواده با پیش جهش (PM) بالای ۷۰ تکرار و گسترش آن به موتاسیون کامل (FM) طی یک نسل تشخیص داده شدند. این اطلاعات برای مشاوره ژنتیک در مورد افرادی که می خواهند احتمال داشتن فرزند با جهش کامل را بدانند، از اهمیت زیادی برخوردار است [۱۵]. از نظر مکانیسم مولکولی ایجاد بیماری، این آلل‌ها به طور نرمال تحت رونویسی قرار می گیرند؛ اما، FMRP در کمتر از میزان طبیعی مورد نیاز بیان می شوند و با افزایش میزان رونویسی همراه است. افزایش تولید mRNA در سلول‌هایی که ژن را بیان می‌کنند، به طور اضافی منجر به شکل گیری اینکلوژن بادی‌ها می‌شود. تجمع اینکلوژن بادی‌ها عملکرد نرمال این سلول‌ها را مختل می‌کنند، در نورون‌ها منجر به FXTAS می شوند و در اووسیت‌ها و سلول‌های گرانولوزا منجر به FXPOI می‌گردند (۱۶). به دلایل نامعلوم، رابطه خطی بین تعداد تکرارهای سه تایی و POI وجود ندارد.

POIدر ناقلین پیش جهش با تعداد تکرار ۸۰ تا ۱۰۰ فراوانی بیشتری دارد و در تکرار های ۵۵ تا کمتر از ۷۹ فراوانی آن کمتر است و کمترین فراوانی آن در تکرارهای ۱۰۰ تا ۱۹۹ می‌باشد. با در نظر گرفتن نقش FMRP به عنوان یک تنظیم کننده ترجمه، یک توضیح پیشنهاد شده در بی‌نظمی بیان ژن‌های متعدد تخمدان این است که بیان بعضی از ژن‌ها ممکن است تحت تاثیر مسلم تعداد تکرارها قرار بگیرند؛ در حالی که، دیگر ژن‌ها ممکن است در طول تکرارهای مختلف سرکوب شده باشند. به علاوه، عملکرد تخمدان ممکن است در مراحل مختلف تکوینی فولیکول‌ها توسط مکانیسم‌های مختلف سرکوب شده باشد. FXPOI به طور مکرر در ناقلین آلل‌های با تکرارهای متوسط CGG به همین ترتیب مشاهده شدند، اما این موضوع همیشه در مطالعات مشهود نبوده است [۱۶]. طبق نتایج این بررسی، در یکی از بیماران جهش در دامنه متوسط (Grey Zone) و به صورت هتروزیگوت بدست آمد. آلل‌های در دامنه متوسط (IM) که به عنوان آلل‌های با متوسط نیز شناخته می شوند، شامل تکرارهای بین ۴۵ تا ۵۴ CGG می باشد. افراد با سایز-IM علایم کلینیکی FXS را نشان نمی‌دهند، اگرچه آن‌ها ممکن است در معرض افزایش خطر PM-related FXTAS و FXPOI باشند. آلل‌های IM ترکیبی از آلل‌های نرمال تا پیش جهش‌اند. گسترش‌های متوسط به طور واضح همراه با فنوتیپ خاصی نیستند. آلل‌های IM خصوصیات مولکولی گسترش‌های PM را انتقال می‌دهند، افزایش mRNA ژن FMR1 و کاهش در سطح FMRP باید مورد توجه قرار گیرد همچنین، ممکن است طی دو نسل به آلل FM گسترده شود. در این رابطه، مطالعه Fernandes-Carvajal و همکاران در سال ۲۰۰۹، افزایش گسترش‌های CGG در آلل متوسط به آلل جهش کامل در دو نسل را گزارش کردند. در مطالعه آن‌ها، آلل Gray Zone در پدربزرگ خانواده با ۵۲ تکرار CGG طی دو نسل به نوه‌اش با ۵۳۸ تکرار CGG به ارث رسیده بود [۱۷]. دستورالعمل های رایج برای آزمایش ناقلین FXS مواردی مانند: تاریخچه خانوادگی از نارسایی زودرس تخمدان و FXS، علایم امراض عصبی و روانی، یا نارسایی زودرس تخمدان، و هر زنی که با توجه به تاریخچه خانوادگی طبق دستورالعمل (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics, ACOG) درخواست آزمایش دهد را شامل می شود (۱۸). با توجه به اینکه پیش جهش می‌تواند در دست کم یک در هر ۲۰۰ زن و یک در هر ۴۰۰ مرد رخ دهد، تشخیص FXTAS باید در بیمارانی که با لرزش، ناهماهنگی حرکتی، علایم بروز پارکینسون، نوروپاتی با بیماری‌های عصبی و مشکلات روانی مورد توجه قرار بگیرد. اگر تاریخچه

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

خانوادگی از موتاسیون X شکننده شناخته شده است، در نتیجه، آزمایش DNA ژن *FMR1* در بیمارانی با این علایم ضروری است. از زمان کشف FXTAS[۶] در سال ۲۰۰۱ این بیماری مشهور تحلیل برنده عصبی در حال پیشرفت که در ناقلین رخ می‌دهد، هم در مردان و هم در زنانی که سالخورده هستند، به طور کلینیکی با نشانه‌های اصلی لرزش و ناهماهنگی حرکات همراه است. در گزارشات افرادی با شمار تکرار های CGG در آلل های در رنج Gray Zone نیز با یافته‌هایی شامل FXTAS وجود داشته است [۱۹]. تشخیص FXS در افراد مبتلا، در نتیجه تغییر پذیری در علایم در اوایل کودکی اغلب به تاخیر می افتد. تقریبا ۲۵ درصد از خانواده یک کودک دوم با FXS قبل از موعد تشخیص برای فرزند اول دارند و این آگاهی همیشه با افراد اضافه شده به خانواده داده نمی‌شود. این عوامل مانع تشخیص زود هنگام زن حامل پیش جهش براساس دستورالعمل‌های رایج غربالگری می‌شود[۱۸]. علاوه بر این، بعضی از علایم ممکن است تنها بعد از بلوغ رخ دهد. از این رو، تشخیص FXS نمی‌تواند تنها بر علایم کلینیکی تکیه کند اما برای تایید تشخیص، بستگی به بررسی‌های مولکولی دارد. به طور متداول، انجام تست‌های مولکولی برای FXS تنها برای نشان دادن افراد با تاریخچه خانوادگی FXS و بیماری‌های همراه آن، با افراد با مشخصات کلینیکی معرف FXS، FXTAS، FXPOI یا ناتوانی ذهنی است. تشخیص زودرس FXS قبل از شکل‌گیری سال‌ها توانسته برای مداخله مؤثر و کاستن تشخیص‌های خانوادگی کمک کند. به علاوه مطالعات انجام شده اخیر نویدهایی را در مدیریت بهتر سندرم X شکننده در کودکان نشان داده است[۱۳]. دستورالعمل‌های رایج ACOG ایده ترکیب ساترن بلات در کنار PCR رایج را توصیه می‌کند، تنها بجز موقعی که روش جدید تر TRP-PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۰]. مطالعات متعددی به اهمیت بکار گیری یک برنامه غربالگری در زنان در سن باروری و زنان با POI در تشخیص ناقلین آلل PM اشاره کرده اند و بر کم هزینه بودن برنامه غربالگری تاکید کرده‌اند. TRP-PCR به طور قابل اطمینان همه آلل های جهش کامل را می‌تواند تعیین کند. استفاده از الکتروفورز مویین برای آنالیز محصولات TRP-PCR در تعیین دقیق اندازه بالای ۲۰۰ تکرار سودمند بوده است. بعلاوه، این روش تعیین ژنوتیپ بیماران زن در شکل موزاییک و هموزیگوت را ممکن می‌کند، زیرا آن تضمین می‌کند که آلل‌های نرمال طی امپلیفیکیشن نمی‌توانند بر آلل‌های گسترش یافته پیشی بگیرند [۲۱ و ۷].

نتیجه گیری

POI به طور بالینی و مولکولی هتروژن است و به طور ژنتیکی یک بیماری مولتی فاکتوریل است. نارسایی زودرس تخمدان یک تعریف گسترده شامل آمنوره اولیه (در نتیجه تکامل ناقص تخمدان) و آمنوره ثانویه (در نتیجه تقلیل زودرس اندوخته تخمدان) است. بطور کلینیکی، ویژگی اصلی POI کاهش باروری می‌باشد. جنبه فنی تجزیه و تحلیل مولکولی در تشخیص بیماری‌های مرتبط FXS بسیار مهم است. ارزیابی تعداد تکرار در *FMR1* بوسیله Triplet Repeat Primed PCR (TRP-PCR) با استفاده از معرف Amplide X FMR1 PCR Kit (Asuragen, Austin, TX, USA) با توجه به پروتکل سازنده انجام شد. برتری اصلی TRP-PCR، توانایی تعیین تعداد دقیق تکرارهای CGG بالاتر از ۲۰۰ تکرار است. مطالعات مولکولی و مشاوره ژنتیک برای تشخیص افراد خانواده با یک موتاسیون *FMR1* و تعیین پیش بینی بیماری در افراد و خطر انتقال بیماری به فرزندان ضروری هستند.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از کلیه متخصصان و پزشکانی که بیماران را به آزمایشگاه سیتوژنتیک ارجاع دادند و همچنین از پرسنل آزمایشگاه سیتوژنتیک و ژنتیک مولکولی بیمارستان تخصصی صارم و خانواده‌های ارجاعی، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تاییدیه اخلاقی:

هویت بیمار کاملاً محرمانه بوده و این پژوهش با دریافت رضایت نامه کتبی از بیمار انجام گرفته است.

تعارض منافع:

در این مطالعه تعارض منافع وجود نداشت.

سهم نویسندگان:

تمامی نویسندگان در انجام این مقاله و نیز پژوهش مورد نظر نقش داشتند.

منابع مالی:

این طرح هزینه چندانی نداشت.

منابع

1. Walker ER, Clark ML, Stelling J, Timko P, Pastore LM. The Impact of Genetic Carrier Testing in Reproductive Decision-Making : FMR1 Testing in Women with Diminished Ovarian Reserve. 2017;5:1–10.
2. Eslami H, Sc M, Eslami A, Sc M, Favaedi R, Sc M, et al. Epigenetic Aberration of FMR1 Gene in Infertile Women with Diminished Ovarian Reserve. 1(11):78–83.

[۶] Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]

3. Journal AI, Huang J, Zhang W, Liu Y, Liu Y, Wang J, et al. Association between the FMR1 CGG repeat lengths and the severity of idiopathic primary ovarian insufficiency : a meta analysis. Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol [Internet]. 2019;47(1):3116–22. Available from: https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1645153
4. Neves AR, Pais AS, Ferreira SI, Ramos V, Carvalho MJ, Estevinho A, et al. Prevalence of Cytogenetic Abnormalities and FMR1 Gene Premutation in a Portuguese Population with Premature Ovarian Insufficiency Prevalência de Anomalias Citogenéticas e da Pré- Mutação do Gene FMR1 numa População Portuguesa com Insuficiência Ovárica Prematura. 2021;580–5.
5. Me R, Jesús S, Ramos I, García A, Martinez R, Mir P, et al. Journal of Molecular and Genetic Tissue-Specific Size and Methylation Analysis in Two Fragile X Families : Contribution to the Clinical Phenotype. 2016;10(4).
6. Dean DD, Muthuswamy S, Agarwal S. Fragile X syndrome: Current insight. Egypt J Med Hum Genet [Internet]. 2016;17(4):303–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.01.005
7. Dean DD, Agarwal S, Kapoor D, Singh K, Vati C. Molecular Characterization of FMR1 Gene by TP-PCR in Women of Reproductive Age and Women with Premature Ovarian Insufficiency. Mol Diagnosis Ther. 2018;22(1):91–100.
8. Elizur SE, Aizer A, Haas J, Raanani H. FMRpolyG accumulates in FMR1 premutation granulosa cells. 2020;
9. Quartier A, Poquet H, Gilbert-Dussardier B, Rossi M, Casteleyn AS, Portes V Des, et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: A significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. Eur J Hum Genet. 2017;25(4):423–31.
10. Moreira AM, Spritzer PM. Primary ovarian insufficiency : different approaches in three cases and a review of literature. 2016;
11. Only U. Asuragen. 2017. p. 1–24.
12. Yaguchi T, Czeschlik D. Repeat expansion and methylation-sensitive triplet-primed polymerase chain reaction for fragile X mental retardation 1 gene screening in institutionalised intellectually disabled individuals. Mycoscience. 2020;51(1):1–1.
13. Tan VJ, Lian M, Faradz SMH, Winarni TI, Chong SS. A single common assay for robust and rapid fragile X mental retardation syndrome screening from dried blood spots. Front Genet. 2018;9(November):1–11.
14. Ma Y, Wei X, Pan H, Wang S, Wang X, Liu X, et al. The prevalence of CGG repeat expansion mutation in FMR1 gene in the northern Chinese women of reproductive age. 2019;
15. Kamga KK, Nguefack S, Minka K, Tingang EW, Esterhuizen A, Munung SN, et al. Cascade testing for Fragile X syndrome in a rural setting in cameroon (Sub-Saharan Africa). Genes (Basel). 2020;11(2):1–10.
16. Ürel-demir G, Alanay Y, Akta D, Boduro K, Tunçbilek E, Alika M. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Fragile x-associated premature ovarian failure in a large Turkish cohort : Findings of Hacettepe Fragile X Registry Wondershare PDFelement. 2018;221:76–80.
17. Ferreira JFB, Batista JS, Fantin C. Screening for FMR1 expanded alleles in patients with Autism Spectrum Disorders in Manaus , Northern Brazil. 2019;91:1–6.
18. Owens KM, Dohany L, Holland C, Dare J, Mann T, Settler C, et al. FMR1 premutation frequency in a large , ethnically diverse population referred for carrier testing.
19. Cabal-herrera AM, Tassanakijpanich N, Salcedo-arellano MJ, Hagerman RJ. Fragile X-Associated Tremor / Ataxia Syndrome (FXTAS): Pathophysiology and Clinical Implications.
20. Lim GXY, Yeo M, Koh YY, Winarni TI, Chong SS, Faradz SMH, et al. Validation of a commercially available test that enables the quantification of the numbers of CGG trinucleotide repeat expansion in FMR1 gene. 2017;1–15.
21. Schenkel LC, Schwartz C, Skinner C, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, Pare G, et al. Clinical Validation of Fragile X Syndrome Screening by DNA Methylation Array. J Mol Diagnostics [Internet]. 2016;18(6):834–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.005

[Downloaded from saremjrm.com on 2026-09-09]

[DOI: 10.52547/sjrm.6.2.103]