

ارزیابی سندروم X شکننده در مبتلایان به عقب ماندگی ذهنی خفیف در شهرستان رفسنجان

محمدرضا میرزایی^۱، دکتر غلامرضا اسدی کرم^۲، دکتر مهدی محمودی^۳، محمدرضا حاجی زاده^۴، سیدمهدی موسوی^۵، احمدرضا صیادی^۶، سیدحبيب... حسینی^۶

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۴/۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۱۰/۲۶ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: سندروم X شکننده (FXS) عامل اصلی عقب ماندگی ذهنی ارثی در انسان به شمار می‌رود. افراد با درجات متفاوتی از عقب ماندگی ذهنی، گوش‌های بلند، پیشانی و چانه جلو آمده، بیضه‌های بزرگ، جمجمه بزرگ و چاقی مشخص می‌گردند. این سندرم همراه با یک شکستگی در انتهای بازوی بلند کروموزوم X (Xq۲۷/۳) می‌باشد که در گسترش‌های متافازی لنفوسیت‌های کشت شده افراد مبتلا در محیط کشت اختصاصی قابل مشاهده است. فراوانی این سندروم در نژادهای مختلف انسان بین یک در هزار و پانصد برای مردان و یک در دو هزار و پانصد برای زنان گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی FXS در افراد عقب مانده ذهنی خفیف مدرسه استثنایی زهره شمسایی رفسنجان بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی که بر روی تعداد ۵۲ فرد عقب مانده ذهنی خفیف (بهره هوشی بین ۵۵ تا ۷۵) که از نظر کلینیکی مشکوک به سندروم X شکننده بودند با روش‌های سیتوژنتیکی مورد غربالگری قرار گرفتند. پس از تهیه نمونه خون بیماران، کشت لنفوسیت‌ها در محیط کشت اختصاصی انجام و با روش G-Banding کاربوتایپ هر فرد تهیه گردید و برای تجزیه و تحلیل آن از آزمون آماری فیشر استفاده شد.

یافته‌ها: افراد با میانگین سنی ۱۲/۷ (۷-۱۷) سال شامل ۳۷ پسر (۷۱/۲٪) و ۱۵ دختر (۲۸/۸٪) بودند میانگین بهره هوشی (IQ) در این افراد ۶۱/۳ (۷۴-۵۵) تعیین گردیده بود. نتایج ما حاکی است ۸/۱٪ افراد مذکر و ۶/۶٪ افراد مؤنث و به طور کلی ۷/۷٪ افراد مورد مطالعه شکستگی کروموزوم X در ناحیه Xq۲۷/۳ داشتند.

نتیجه‌گیری: فراوانی موارد مثبت X شکننده در این مطالعه برابر با فراوانی به دست آمده در دیگر مطالعات مشابه که روی افراد مشکوک به FXS (با عقب ماندگی ذهنی خفیف) انجام شده است می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سندروم X شکننده، عقب ماندگی ذهنی، کاربوتایپ

۱- (نویسنده مسئول) مربی گروه آموزشی بیوشیمی بیوفیزیک، ژنتیک و تغذیه دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۴۰۰، فاکس: ۰۳۹۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: mirzaee_mr@yahoo.com

۲- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی پزشکی و ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- دانشیار گروه آموزشی بیوشیمی بالینی و ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۴- کارشناس ارشد گروه آموزشی بیوشیمی پزشکی و ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۵- مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۶- مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مقدمه

سندروم X شکننده (FXS) یکی از عوامل عقب ماندگی ذهنی ارثی در انسان است که با درجات متفاوتی از عقب ماندگی ذهنی بروز می‌کند. علائم ظاهری سندروم شامل گوش‌های بلند، پیشانی جلو آمده، بیضه‌های بزرگ، رفتارهای غیر طبیعی و چاقی است [۳-۱]. قدرت نفوذ در این سندروم ۸۰٪ برای مردان و ۳۰٪ برای زنان گزارش شده است. که این قدرت نفوذ در نسل‌های بعدی افزایش پیدا می‌کند، این حالت خاص افزایش قدرت نفوذ یک صفت از نسلی به نسل بعد، بنام تئوری شرمین (Sherman Paradox) معروف است [۴].

فراوانی این سندروم یک در ۱۵۰۰ برای مردان و یک در ۲۵۰۰ برای زنان، تقریباً در تمامی نژادهای انسانی به طور یکسان گزارش شده است [۵-۶]. اختلال FXS همراه با یک شکستگی در بازوی بلند کروموزوم X ($Xq_{27/3}$) می‌باشد که به نام جایگاه FRAXA معروف است این ناحیه در کشت‌های اختصاص لنفوسیت‌های افراد مبتلا به صورت یک نقطه شکسته شده به وضوح قابل مشاهده است. ژن FMR-1 که در جایگاه ($Xq_{27/3}$) قرار دارد، به عنوان عامل ایجاد کننده سندروم FXS شناخته شده است، این ژن ۳۸ kb اندازه داشته و شامل ۱۷ اگزون است، پروتئین FMRP (Fragile X mental retardation protein) که محصول این ژن است به تعدادی مولکول RNA از جمله mRNA کد کننده خود متصل شده و به عنوان حامل بین سیتوپلاسم و هسته عمل می‌کند [۷]. در ابتدای اگزون شماره ۱ (ابتدای ۵) تعدادی ترادف CGG وجود دارد که تعداد این ترادف‌ها بسیار مهم است. ژن FMR-1 در حالت طبیعی شامل ۵۴-۶ تکرار CGG در ابتدای ۵ است اما در افراد مبتلا این تعداد به ۱۰۰۰-۲۰۰ تکرار می‌رسد که این افزایش تکرار باعث غیر فعال شدن ژن می‌گردد [۸-۹]. در افرادی که به عنوان مردان انتقال دهنده طبیعی (NTM) و یا زنان انتقال دهنده اجباری (OTF) خوانده می‌شوند، تعداد این تکرارها بین ۲۰۰-۵۳ تکرار گزارش شده است. تشخیص آزمایشگاهی FXS توسط روش‌های مختلفی از جمله ساترن بلات، PCR و کاربوتایپ است که در این مطالعه از روش کاربوتایپ استفاده گردید [۱۱-۱۰، ۵-۶].

قدرت تشخیص روش کاربوتایپ برای تشخیص افراد مشکوک به FXS تا ۹۹٪ برای مردان و ۹۰ تا ۹۵ درصد برای زنان گزارش شده است [۵، ۹-۱۰]. با توجه به این که عقب ماندگی ذهنی یکی از معضلات بزرگ جوامع و مراکز بهداشتی است و هزینه سنگینی صرف نگهداری، آموزش و احیاناً درمان این افراد می‌گردد لذا تعیین علت عقب ماندگی ذهنی و به دنبال آن برنامه‌ریزی در جهت کاهش تولد مبتلایان به این اختلال کمک بزرگی به جامعه خواهد بود. با توجه به قابل اعتماد بودن و دقت بالای تشخیص FXS به وسیله روش کاربوتایپ مطالعه حاضر بر اساس این روش و به منظور تعیین میزان فراوانی سندرم X شکننده در بین عقب ماندگان ذهنی خفیف مدرسه استثنایی زهره شمسی شهرستان رفسنجان طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی تعداد ۵۲ فرد عقب مانده ذهنی خفیف با IQ بین ۵۵ تا ۷۵ (تست IQ توسط متخصص روانشناسی هنگام ثبت نام فرد در مدرسه انجام شده و در پرونده آنان موجود بود) که مشکوک به سندروم X شکننده بودند، مورد بررسی‌های سیتوژنتیکی برای تشخیص موارد FXS قرار گرفتند.

مقدار ۵ میلی‌لیتر خون کامل و هپارینه از افراد مورد مطالعه پس از تهیه به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده پزشکی رفسنجان منتقل و بلافاصله کشت سلولی بر طبق روش استاندارد کاربوتایپ FXS روی نمونه‌ها انجام گرفت [۱۲]. از محیط کشت اختصاصی RPMI1640 که حاوی ۲۵٪ سرم جنین گاو غیرفعال شده به وسیله حرارت (Δ FCS) آنتی‌بیوتیک (استرپتومایسین - پنی‌سیلین) ۳۰۰ mg/ml و وتیمیدین (۳۰۰ μ g/ml) بود (از محصولات GIBCO و SIGMA) برای مشاهده شکست کروموزومی استفاده گردید و از روش فیلتراسیون برای استریل کردن محیط کشت استفاده شد. برای انجام کشت به هر شیشه کشت سلولی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت، ۰/۱ میلی‌لیتر فیتوهماگلوئینین (PHA) و نیم میلی‌لیتر خون بیمار اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در 37°C انکوبه گردید. پس از این مدت به هر شیشه کشت ۰/۱ میلی‌لیتر کلشی سین (۰/۰۲٪) اضافه و پس از یک ساعت

پس از تهیه گسترش‌های متافازی افراد با روش G-Banding، برای تعیین شکست کروموزومی X، پنجاه تا صد گسترش متافازی هر فرد با دقت بررسی شد و از شکست‌های کروموزومی عکس‌برداری به عمل آمد. بدین ترتیب در ۳ فرد مذکر و یک فرد مؤنث شکست Xq27.3 مشاهده گردید شکل ۱ نمونه ایست از گسترش متافازی فرد شمار ۲، فلش نشان دهنده محل شکستگی در بازوی بلند کروموزوم X است. از تعداد کل افراد مورد مطالعه (۵۲ نفر) تعداد ۴ نفر یعنی ۷/۷٪ حامل شکستگی کروموزوم X با میانگین سنی $13/5 \pm 1/3$ سال و میانگین بهره هوشی (IQ) این افراد $65/6 \pm 5/5$ و از نظر جنسی ۳ نفر مرد و یک نفر زن بود و ۴۸ نفر یعنی ۹۲/۳٪ بدون شکستگی کروموزوم X بوده‌اند که میانگین سنی این افراد $12/6 \pm 2/13$ سال و میانگین بهره هوشی (IQ) $59/2 \pm 1/2$ می‌باشد و از این تعداد ۳۴ نفر یعنی ۷۰/۸٪ مرد و ۱۴ نفر یعنی ۲۹/۲٪ زن بوده است. جدول ۱ توزیع فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه بر حسب سابقه ابتلاء عقب ماندگی ذهنی در خانواده و شکست کروموزومی و جدول ۲ توزیع فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه بر حسب سابقه خویشاوندی والدین و شکست کروموزومی را نشان می‌دهد. در هیچ موردی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در نهایت نتایج ما حاکی است ۷/۷٪ افراد مورد مطالعه واجد شکستگی کروموزوم Xq27.3 بودند که از این بین ۳ نفر پسر و یک نفر دختر بود.

مراحل برداشت انجام شد. به این ترتیب که پس از سانتریفوژ کردن، سلول‌ها از محیط کشت جدا شده و تحت تأثیر محلول هیپوتونیک (KCL; ۰/۷۵M) قرار گرفتند، ضمن سانتریفوژ مجدد سلول‌ها در معرض محلول تثبیت کننده (اسید استیک - متائل ۱: ۳) قرار داده شدند. پس از چندین مرحله شستشو با محلول تثبیت کننده نهایتاً سوسپانسیون شفاف لنفوسیت‌ها در محلول تثبیت کننده به دست آمد و با روش پرتاب قطره، از هر نمونه چندین لام تهیه گردید [۱۳-۱۴].

پس از طی مرحله Aging گسترش‌های متافازی، رنگ آمیزی G-Banding روی لام‌ها انجام شد [۱۵]، بدین منظور ابتدا گسترش‌های متافازی برای مدت کوتاهی (۷-۱۱ ثانیه) تحت تأثیر تریپسین قرار گرفتند و سپس در محلول رنگ گیمسا قرار داده شدند، پس از چند دقیقه (۸-۱۴ دقیقه) لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شد. لام‌های مختلف هر بیمار مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت و حداقل ۵۰-۱۰۰ گسترش متافازی هر فرد به دقت بررسی و در صورت مشاهده موارد مشکوک عکس‌برداری انجام و کاربوتایپ افراد تهیه گردید و سپس برای تجزیه و تحلیل آن از آزمون آماری فیشر استفاده شد.

نتایج

افراد مورد مطالعه ۵۲ نفر بودند با میانگین بهره هوشی $61/3$ (۷۴-۵۵)، ۳۷ نفر (۷۱/۲٪) مذکر و ۱۵ نفر (۲۸/۸٪) مؤنث و میانگین سنی در این افراد $12/7$ (۷-۱۷) سال بود.

جدول ۱: توزیع فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه بر حسب سابقه ابتلاء به عقب ماندگی ذهنی خفیف در خانواده و شکست کروموزومی

| شکست کروموزومی | سابقه ابتلاء به عقب ماندگی ذهنی خفیف در خانواده | | خیر | | کل | |
|----------------|---|------|-------|------|-------|------|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد |
| بلی | ۱ | ۳/۸ | ۳ | ۱۱/۵ | ۴ | ۷/۷ |
| خیر | ۲۵ | ۹۶/۲ | ۲۳ | ۸۸/۵ | ۴۸ | ۹۲/۳ |
| جمع کل | ۲۶ | ۱۰۰ | ۲۶ | ۱۰۰ | ۵۲ | ۱۰۰ |

جدول ۲: توزیع فراوانی نمونه‌های مورد مطالعه بر حسب سابقه خویشاوندی والدین و شکست کروموزومی

| کل | | خیر | | بلی | | سابقه خویشاوندی والدین |
|----------------|-------|------|-------|------|-------|------------------------|
| درصد | تعداد | درصد | تعداد | درصد | تعداد | فراوانی |
| شکست کروموزومی | | | | | | |
| ۷/۷ | ۴ | ۴/۳ | ۳ | ۳/۲ | ۱ | بلی |
| ۹۲/۳ | ۴۸ | ۸۵/۷ | ۱۸ | ۹۶/۸ | ۳۰ | خیر |
| ۱۰۰ | ۵۲ | ۱۰۰ | ۲۱ | ۱۰۰ | ۳۱ | جمع کل |



شکل ۱: گسترش منافازی کروموزوم‌ها که مربوط به فرد شماره ۲ می‌باشد. فلش محل شکستگی در بازوی بلند کروموزوم X را نشان می‌دهد

بحث

هدف این مطالعه تعیین ارتباط سندروم X شکننده و عقب ماندگی ذهنی خفیف در تعدادی از دانش‌آموزان مدرسه استثنایی زهره شمسایی رفسنجان بود. بر اساس نتایج این تحقیق ۸/۱٪ افراد مذکر و ۶/۶٪ افراد مؤنث و در مجموع ۷/۷٪ افراد مورد مطالعه حامل شکستگی Xq_{۲۷} بودند که معرف افراد FXS است. مطالعات گذشته میزان فراوانی FXS در جوامع مختلف را ۰/۴-۰/۸ در هزار برای مردان و ۰/۲-۰/۶ در هزار برای زنان تعیین کرده‌اند که این مطالعات بر پایه تشخیص‌های سیتوژنتیکی انجام شده است [۱۸-۱۶، ۱۳].

مطالعاتی که با روش‌های مولکولی انجام شده است فراوانی این اختلال در جوامع اروپایی، آمریکایی و استرالیایی را ۰/۶ در هزار تعیین کرده‌اند [۱۹]. هم‌چنین مطالعات گسترده‌ای در مورد تعیین فراوانی FXS در جامعه عقب ماندگان ذهنی انجام شده که نتایج متفاوتی را به همراه داشته است. در مطالعه‌ای

که توسط Jacobs روی سه جامعه اصلی عقب مانده ذهنی (افرادی که به عنوان عقب مانده ذهنی در خانواده نگهداری می‌شوند، افراد عقب مانده ذهنی که در مراکز خاص نگهداری می‌شوند و افرادی که در مدارس استثنایی در حال تحصیل هستند) انجام گرفت و میزان فراوانی FXS در جوامع ذکر شده (تمامی گروه‌های عقب مانده ذهنی) را ۱/۹٪ در مردان و ۰/۳٪ در زنان تعیین نمود [۱۲] در حالی که در مطالعه Proops که یک جمعیت بزرگ از عقب ماندگان ذهنی را شامل می‌گشت فراوانی به دست آمده برای FXS، ۴/۸٪ بوده است [۱۹]. این مطالعات و تحقیقات مشابه مشخص نمودند افرادی که به عنوان عقب مانده ذهنی شدید (بهره هوشی کمتر از ۴۰) شناخته می‌شوند جزو مبتلایان به FXS قرار نمی‌گیرند و یکی از معیارهای تشخیص FXS داشتن بهره هوشی بالای ۵۰ است [۱۷، ۲۰].

به هر حال نتایج ما حاکی است ۷/۷٪ افراد مورد مطالعه که تماماً دارای بهره هوشی بین ۵۵ تا ۷۵ بوده و در مدرسه استثنایی زهره شمسایی رفسنجان مشغول تحصیل بودند مبتلا به FXS هستند از این تعداد ۳ نفر پسر و ۱ نفر دختر بودند، نتایج این تحقیق تقریباً با نتایج تحقیقات انجام گرفته در دیگر مناطق دنیا یکسان می‌باشد. با توجه به توارثی بودن این سندرم، خانواده‌هایی که صاحب یک فرزند عقب مانده ذهنی هستند شانس بیشتری برای داشتن فرزند FXS خواهند داشت و لازم است تست‌های غربالگری همانند بسیاری از کشورها [۲۳] روی این خانواده‌ها انجام گیرد.

امیدواریم با انجام تست‌های غربالگری FXS و شناسایی افراد مبتلاء در کشور، مشاوره‌های لازم را به افراد داد و مانع ازدواج دو فرد حامل که امکان داشتن فرزند FXS در این گونه موارد بیشتر است شد و هم‌چنین نتایج چنین مطالعاتی می‌تواند برای مسئولین و برنامه‌ریزان بهداشتی کشور بسیار سودمند بوده و با برنامه‌ریزی و ارایه راه‌کارهای مناسب از تولد چنین مواردی که سربار جامعه می‌شوند کاست.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌هایی این که پزشکان می‌توانند با ارجاع افراد عقب مانده ذهنی و خانواده‌های آن‌ها به کلینیک‌های ژنتیک از وجود FXS آگاهی یافته و مشاوره‌های لازم را در اختیار خانواده‌ها قرار دهند و نیز مسئولین بهداشتی در برنامه‌ریزی‌های بهداشتی و انجام تست‌های غربالگری حداقل برای خانواده‌های در معرض خطر با راه‌کارهای مناسب گامی در جهت کاهش تعداد چنین افرادی در خانواده‌ها و جامعه بر دارند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان بوده و از حمایت‌های مالی این دانشگاه برخوردار بوده است. بر خود لازم می‌دانیم از مسئولینی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند و نیز پرسنل مدرسه استثنایی زهره شمسایی مخصوصاً سرکار خانم ابراهیمی تشکر و قدردانی نماییم.

در این مطالعه تعداد ۵۲ عقب مانده ذهنی خفیف (IQ = ۵۵-۷۵) که در مدرسه استثنایی زهره شمسایی رفسنجان مشغول به تحصیل بودند (آموزش‌پذیر) مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌های ما حاکی است ۷/۷٪ افراد مورد مطالعه مبتلا به سندروم FXS هستند. نتایج به دست آمده از بررسی حاضر با نتایج دیگر مطالعات انجام شده که اساس تشخیص FXS در این مطالعات روش‌های سیتوژنتیک است مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای که توسط Megavran انجام شد نشان داد که ۷/۵٪ عقب ماندگان ذهنی خفیف ($IQ > 50$) که هیچ‌گونه اطلاعی از علت شناسی اختلال خود نداشتند مبتلا به FXS بودند [۲۱]. Jenkin در مطالعه‌ای مشابه، فراوانی FXS در بین عقب ماندگان ذهنی متوسط را ۶/۳٪ و Butler این فراوانی را ۶/۴٪ گزارش نمودند [۱۶، ۱]. این سندروم مهم‌ترین عامل عقب ماندگی ذهنی توارثی در انسان است [۱] و از الگوی خاص توارثی شبیه الگوی توارثی وابسته به X مغلوب پیروی می‌کند موارد غیر طبیعی نیز در این الگوی توارثی دیده می‌شود که شامل: ۱- مردان حامل شکستگی ممکن است هیچ‌گونه نشانه‌ای از عقب ماندگی ذهنی را بروز ندهند. ۲- زنان حامل ممکن است علایم خفیفی از عقب ماندگی ذهنی را در خود داشته باشند. با توجه به این مطلب، توارثی بودن این سندروم نیز یکی از معیارهای با اهمیت در تشخیص این سندروم است.

Carpenter و همکاران ۳۶ فرد مبتلا به عقب ماندگی ذهنی با سابقه مثبت عقب ماندگی ذهنی در خانواده را مورد بررسی قرار دادند و مشخص نمودند ۱۳/۹٪ این افراد واجد FXS هستند [۲۲]. در مطالعه‌ای که روی ۸۱ فرد عقب مانده ذهنی با سابقه مثبت عقب ماندگی ذهنی در خانواده در کشور عربستان انجام شده است این میزان ۴۱/۸٪ در جامعه مورد نظر تعیین گردیده است [۵]. این در حالی است که در مطالعه Froster-Iskenius که روی ۲۰۰ فرد عقب مانده ذهنی با سابقه فAMILI مثبت عقب ماندگی ذهنی انجام گرفته است این میزان فقط ۳/۶٪ گزارش شده است [۱۹]. در این مطالعه سه مورد از چهار مورد شناخته شده FXS دارای سابقه مثبت عقب ماندگی ذهنی در خانواده بودند.

References

- [1] Butler MG, Hamill T. Blood specimens from patients referred for cytogenetic analysis: Vanderbilt University experience from 1985 to 1992. *South Med J*, 1995; 88(3): 309-14.
- [2] Fengler S, Fuchs R, Konig R, Arnemann J. Mosaicism for FMR1 and FMR2 deletion: anew case. *J Med Genet*, 2002; 39(3): 200-01.
- [3] Mandel JL, Biancalana V. Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis diagnostic issues. *Growth Horm IGF Res*, 2004; 14Suppl A: S158-65.
- [4] Sherman S, Hagerman RJ, Silverman AD, editors Baltimore. Epidemiology in: Fragile X syndrome. The Johns Hopkins University Press. 1996; pp: 69-97.
- [5] Anwar Iqbal M, Nadia S, Michael N, et al. Cytogenetic diagnosis of fragile X syndrome. *Annals of Saudi Medicine*, 2000; 20(3-4): 214-7.
- [6] Burt BA, Dicky JJ, Ben A, et al. The fragile X syndrome. *J Med Genet*, 1998; 35: 579-89.
- [7] Webb TP, Bunday S, Thake A, Todd J. The frequency of the fragile chromosome among school children in Coventry. *J Med Genet*, 1986; 23: 396-9.
- [8] Hagerman PJ, Hagerman RJ. The fragile X permutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet*, 2004; 74(5): 805-16.
- [9] Klauck SM, Munstermann E, Bieber-Martig B, Ruhl D, Lisch S, Schmotzer G, et al. Molecular genetic analysis of the FMR-1 gene in a large collection of autistic patients. *Hum Genet*, 1997; 100(2): 224-9.
- [10] Penagarikano O, Gil A, Telez M, Ortega B, Flores P, Veiga I, et al. A new insight into fragile X syndrome among Basque population. *Am J Med Genet*, 2004; 128(3): 250-5.
- [11] Shiue CN, Lin YH, Kuan LC, Lii LM, Tsai WH, Chen YJ, et al. Cytogenetic Surveillance of mentally-retarded school children of southern Taiwan. *J formos Med Assoc*, 2004; 103(3): 218-24.
- [12] Jacobs PA, Mayer M, Abruzzo MA. Studies of the fragile (X) syndrome in populations of mentally retarded individuals in Hawaii. *Am J Med Genet*, 1986; 23(1-2): 567-72.
- [13] Verma RS, Babu A. Tissue culture techniques and chromosome preparation. 2nd ed. New York. McGraw-Hill, Inc. 1995; pp: 6-13.
- [14] Yunis JJ. Human chromosome methodology. Academic press. 1968.
- [15] Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F. Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. National fragile X Foundation. *J Med Genet*, 1993; 30(5): 410-3.
- [16] De Viries BBA, Wiegers AM, de Graff E. Mental status and fragile X expression in relation to FMR-1 gene mutation. *Eur J Hum Genet*, 1993; 1: 72-9.
- [17] Jenkins EC, Duncan EJ, Genovese M, et al. The occurrence of chromosomal abnormality in specimens referred for fragile X analysis. International fragile X conference proceeding. Dillon, Colorado: Spectra Publishers. 1992; pp: 367-73.
- [18] Turner G, Robinson H, Laing S, Purvis-Smith S. Preventive screening for fragile X syndrome. *N Engl J Med*, 1986; 315(10): 607-9.
- [19] Froster-Iskenius U, Felsch G, Schirren C, Schwinger E. Screening for fra (X) (q) in a population of mentally retarded males. *Hum Genet*, 1983; 63(2): 153-7.
- [20] Gustavson KH, Blomquist HK, Holmgren G. Prevalence of the fragile-X syndrome in mentally retarded boys in a Swedish County. *Am J Med Genet*, 1986; 23(1-2): 581-7.
- [21] McGavran L, Hagerman R, Berry R. Prevalence of chromosome abnormalities in 1983-91 (abstract). International Fragile X Conference proceedings. Dillon. Colorado. Spectra Publishers. 1992; 375.
- [22] Carpenter NJ, Leichtman LG, Say B. Fragile X- linked mental retardation. A survey of 65 patients with mental retardation of unknown origin. *Am J Dis Child*, 1982; 136(5): 392-8.
- [23] Proops R, Mayer M, Jacobs PA. A study of mental retardation in children in the Island of Hawaii. *Clin Genet*, 1983; 23(2): 81-96.