

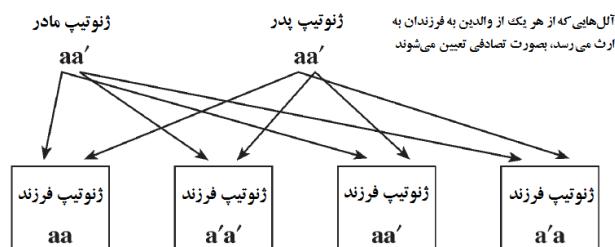
استفاده از تصادفی سازی مندلی در مطالعات اپیدمیولوژیک

دکتر محمد حسن کاظمی^۱

عوامل مخدوشگری که می‌توانند سبب ایجاد چنین روابط علیتی جعلی شوند می‌توانند با فاکتورهای اجتماعی-اقتصادی، عوامل رفتاری و دسترسی به خدمات بهداشتی درمانی مرتبط باشند. به عنوان مثال در مطالعه فوق الذکر، افرادی که به مقدار زیاد از مکمل‌های ویتامینه استفاده کرده و در نتیجه میزان ویتامین بالاتری در پلاسمای خود دارند، در بسیاری از خصوصیات و رفتارهای دیگر، با افرادی که از این مکمل‌ها استفاده نمی‌کنند متفاوت می‌باشند.

مفهوم تصادفی سازی مندلی^۲:

اساس تصادفی سازی مندلی، قانون دوم مندل (قانون جور شدن مستقل ژن‌ها) می‌باشد. بر طبق این قانون در هنگام تشکیل گامت‌ها جدا شدن آلل‌های یک جفت آلل، مستقل از جدا شدن آلل‌های یک جفت آلل دیگر صورت می‌گیرد. بنابراین وراثت یک صفت ژنتیکی، مستقل از وراثت صفات دیگر می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- نمایش قانون دوم مندل (قانون جور شدن مستقل ژن‌ها)

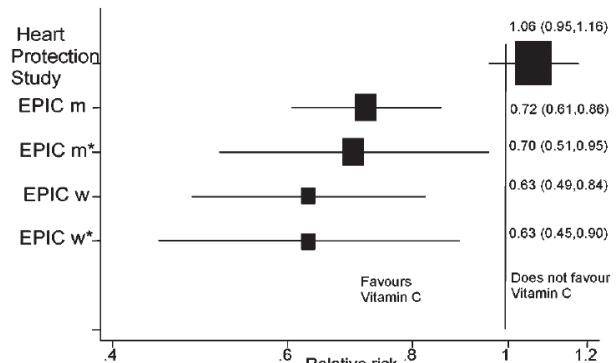
در مطالعات اپیدمیولوژی ژنتیک معمولی، معمولاً اختلافات ژنتیکی و فنتوتیکی بین افراد یک جامعه مورد بررسی قرار گرفته تا به ریشه ژنتیکی بعضی از صفات پی برده و یا عملکرد یک ژن را مورد ارزیابی قرار داد. در صورتی که در مطالعاتی که بر اساس تصادفی سازی مندلی انجام می‌شود، از جور شدن مستقل ژن‌ها به منظور کنترل مخدوش‌کننده‌ها در بررسی رابطه بین یک مواجهه و پیامد استفاده می‌گردد.

مقدمه:

طی دهه‌های اخیر در موارد متعددی، یافته‌های حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک کلاسیک که با متدهای مشاهده‌ای انجام شده بودند، نقض شده و زیر سوال قرار گرفته‌اند. در اغلب این موارد، یافته‌های علیتی گزارش شده، در اثر متغیرهای مخدوش کننده ایجاد شده بودند و یک رابطه حقیقی را نشان نمی‌دادند.

مطالعات مشاهده‌ای فراوانی تا کنون به اجرا گذاشته شده که یک رابطه معنی دار علیتی بین یک مواجهه و پیامد را نشان داده، ولی این یافته‌ها با انجام یک کارآزمایی کنترل شده تصادفی (RCT) نقض گردیده است. با این وجود نمی‌توان از کارآزمایی‌های بالینی در بسیاری از موارد استفاده نمود، به عنوان مثال در مواردی که مواجهه مورد نظر، برای سلامتی افراد مضر بوده (مثلًاً مواجهه با سموم) و یا در مواردی که اندازه گیری دقیق مواجهه دشوار می‌باشد (مثل جنبه‌های مختلف تغذیه).

یکی از مثال‌های چنین مواردی، رابطه بین مصرف ویتامین C و کاهش بیماری‌های عروق کرونر قلب (CHD) می‌باشد. هر چند که در مطالعات مشاهده‌ای انجام شده در این خصوص، یک رابطه حفاظتی بین افزایش ویتامین C پلاسمای و کاهش مرگ و میر پنج ساله ناشی از بیماری عروق کرونر قلب مشاهده گردید، ولی این نتایج پس از اجرای یک کارآزمایی کنترل شده تصادفی نقض گردید و هیچگونه رابطه معنی داری دیده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج متفاوت حاصل از مطالعات مشاهده‌ای (EPIC) و یک کارآزمایی تصادفی شده (Heart Protection Study) در خصوص اثر افزایش ویتامین C پلاسمای مرگ و میر پنج ساله ناشی از بیماری عروق کرونر

۱- ایران، تهران، اداره بهداشت و درمان نزاجا، دانشجوی دکترای تخصصی اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۲- Randomized Controlled Trial

۳- Mendelian Randomization

افرادی که دارای آلل های هموزیگوت TT هستند در مقایسه با افرادی که دارای آلل های هموزیگوت CC هستند، به طور میانگین دارای $2/6 \mu\text{mol/l}$ هوموسمیستئین بالاتری در پلاسما می باشند. بنابراین چنانچه یک رابطه علیتی بین TT وجود هوموسمیستئین و CHD وجود داشته باشد، افراد با ژنتیپ CHD در مقایسه با افراد CC باید در معرض خطر بیشتر باشند. با توجه به اینکه مقایسه بین این افراد بر اساس ژنتیپشان می باشد، بنابر قانون دوم مندل امکان اندکی برای مخدوش شدگی وجود خواهد داشت (جدول ۱)

عوامل خطر	ژن MTHFR			P-value
	TT N = 349	CT N = 340	CC N = 76	
صرف سیگار % (95% CI)	17 (13–21)	23 (18–27)	19 (11–31)	0.9
میانگین فشار خون سیستولیک (SD) mmHg	147 (24)	146 (24)	150 (23)	0.2
میانگین کلسترول تام (SD) mmol/l	6.3 (1.1)	6.2 (1.1)	6.3 (1.3)	0.7
کلاس اجتماعی % (95% CI)	52 (47–58)	58 (52–64)	53 (40–65)	0.9
هموسمیستئین پلاسما				
	4.5–9.9 $\mu\text{mol/l}$ N = 268	10.0–12.4 $\mu\text{mol/l}$ N = 252	12.5–74.4 $\mu\text{mol/l}$ N = 257	
صرف سیگار % (95% CI)	16 (12–21)	14 (10–20)	30 (24–36)	<0.001
میانگین فشار خون سیستولیک (SD) mmHg	142 (22)	148 (25)	150 (25)	<0.001
میانگین کلسترول تام (SD) mmol/l	6.3 (1.1)	6.3 (1.2)	6.2 (1.1)	0.5
کلاس اجتماعی % (95% CI)	48 (42–55)	55 (48–61)	63 (56–69)	0.001

جدول ۱- عدم وجود رابطه معنی دار بین عوامل مخدوش کننده بالقوه با پلی مورفیسم ژنتیکی و وجود رابطه معنی دار بین آنها و سطح هوموسمیستئین پلاسما

در متأ آنالیزی که بر روی مطالعات مشاهده ای انجام شده در این زمینه انجام گردید، یک خطر نسبی به مقدار ۱/۱۳ (با فاصله اطمینان ۱/۰۸ تا ۱/۱۹) برابر رابطه بین $2/6 \mu\text{mol/l}$ هوموسمیستئین بالاتر و CHD محاسبه گردید. در متأ آنالیز دیگری که بر روی مطالعات بر پایه تصادفی سازی مندلی انجام گردید، یک خطر نسبی به مقدار ۱/۱۶ (با فاصله اطمینان ۱/۰۵ تا ۱/۲۸) برای افراد با ژنتیپ TT در مقایسه با افراد CC برای خطر CHD محاسبه گردید.

هر چند که نتیجه حاصل از هر دو روش یکسان می باشند، ولی در مطالعات انجام شده بر پایه تصادفی سازی مندلی، امکان مخدوش شدگی بسیار کمتر بوده و نتایج حاصله قابلیت اطمینان بیشتری دارند.

۲- ارگانوفسفات ها و بیماری دامداران:
در تعدادی از دامدارانی که به منظور مبارزه با انگل های

چنانچه در یک نقطه از زنجیره DNA در بین تعدادی از افراد یک جامعه تفاوت‌هایی وجود داشته باشد (با شیوع حداقل ۰.۱٪)، به آن پلی مورفیسم گفته می شود. تصادفی سازی مندلی بر پایه این ایده اجرا می شود که چنانچه یک پلی مورفیسم ژنی موجب ایجاد تفاوت های فنوتیپی در تعدادی از افراد جامعه گردد که این تفاوت ها به نوعی سبب شبیه سازی یک مواجهه خاص شده و یا اثر یک مواجهه خاص را تغییر دهد، اگر بین وجود این پلی مورفیسم و پیامد مورد نظر رابطه معنی داری مشاهده شد، رابطه بین آن مواجهه و پیامد نیز تایید می گردد.

چند مثال از کاربرد تصادفی سازی مندلی:

۱- فولات، هوموسمیستئین و بیماری عروق کرونر قلب:

مطالعات مشاهده ای رابطه بین مقادیر بالاتر هوموسمیستئین پلاسما و افزایش خطر ابتلا به CHD را نشان داده اند. ضمناً کارآزمایی های بالینی، اثر مصرف متوسط فولات در کاهش هوموسمیستئین پلاسما را تایید نموده اند. از آنجایی که رابطه بین هوموسمیستئین و CHD ممکن است در اثر عوامل مخدوشگری چون مصرف سیگار، فاكتورهای اجتماعی اقتصادی، و یا ابتلا به آتروواسکلروز ایجاد شده باشد، به منظور تایید این رابطه از تصادفی سازی مندلی استفاده شده است.

یک پلی مورفیسم عملکردی سبب کاهش عملکرد آنزیم متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) می شود. از آنجایی که این آنزیم در تبدیل هوموسمیستئین به متیونین نقش دارد، لذا افرادی که دارای این پلی مورفیسم ژنتیکی می باشند، از میزان بالاتری از هوموسمیستئین در پلاسما برخوردار هستند. به عبارت دیگر این پلی مورفیسم، مصرف کمتر فولات را تقلید می کند.

بیماری و مواجهه می گردد. ضمناً عوامل مخدوش گری مثل مصرف سیگار و الکل، وضعیت اجتماعی اقتصادی و ... نیز ممکن است موجب اشتباه در نتیجه گیری محققین شوند.

برای نتیجه گیری دقیق تر، می توان از تصادفی سازی مندلی کمک گرفت. پلی مورفیسمی بر روی ژن بتا-فیبرینوژن وجود دارد که بر روی سطح فیبرینوژن پلاسما اثرگذار است. سطح فیبرینوژن پلاسما در افراد با ژنتوتیپ G/G $3/1^{g/l}$ ، در افراد با $3/36^{g/l}$ A/A و در افراد با ژنتوتیپ A/A $3/22^{g/l}$ می باشد، به طوری که هر آلل A موجب افزایشی معادل $1 g/l$ می گردد.^{۱۲}

آخریاً یک مطالعه مورد-شاهدی بزرگ بر این اساس انجام شده است که در دو مرحله، یکبار رابطه بین سطح فیبرینوژن پلاسما و CHD و بار دیگر رابطه بین داشتن ژنتوتیپ A/A و CHD آزمون گردید. در بررسی رابطه بین سطح فیبرینوژن پلاسما و CHD، خطر نسبی معنی داری معادل $1/2$ (با فاصله اطمینان $1/13$ تا $1/261$) مشاهده شد، در صورتی که در بررسی رابطه بین داشتن ژنتوتیپ A/A و CHD خطر نسبی $1/0.3$ (با فاصله اطمینان 0.96 تا $1/1$) محاسبه گردید که معنی دار نبود.

بنابراین به نظر می رسد که نتایج معنی دار حاصل از مطالعات مشاهده ای، ناشی از عوامل مخدوش کننده بوده و رابطه ای بین سطح فیبرینوژن پلاسما و بیماری عروق کرونر قلب وجود ندارد.

محدودیت های تصادفی سازی مندلی:

یکی از مهمترین محدودیت های اجرای این روش، محدودیت در یافتن پلی مورفیسم های عملکردی می باشد که بتواند اثر یک مواجهه محیطی خاص را شبیه سازی نماید. با این وجود، گسترش بسیار سریع دانش بشر می تواند به یافتن چنین واریته هایی کمک زیادی نماید. در حال حاضر امکان جستجوی چنین پلی مورفیسم هایی در نسخه آنلاین وراثت مندلی^۱ در انسان، بانک اطلاعات موتاسیون ژنی آنسان، و بانک اطلاعات تفاوت های ژنوم آنسان وجود دارد.

یکی دیگر از محدودیت های مهم این مطالعات، احتیاج آن به حجم نمونه بسیار بالا برای فراهم نمودن قدرت کافی آزمون می باشد. این موضوع از آنجا ناشی می شود که اغلب پلی مورفیسم های به کار گرفته شده در تصادفی سازی مندلی، تنها

خارجی، گوسفندان خود را در حمام ارگانوفسفاته ها غوطه ور می کردنند، نشانه هایی از بیماری و کاهش سطح سلامت دیده شده است. از سوی دیگر، افرادی اظهار می دارند که این بیماریها غیر واقعی بوده و حریبه ای از سوی دامداران برای دریافت خسارت از شرکت های بیمه و یا بازنیستگی زودتر از موعد می باشند. از آنجایی که انجام کارآزمایی بالینی در این خصوص، غیر ممکن می باشد، لذا نتیجه گیری قابل اطمینانی در این باره وجود ندارد و از سوی دیگر اجرای مطالعات موردن شاهدی که فاقد سوگیرایی شده باشند نیز در این خصوص بسیار دشوار می باشد.

برای حل این مشکل، می توان از تصادفی سازی مندلی کمک گرفت. آنژیمی به نام پارا اکساناز اجزای سمی حمام دام ها را غیرفعال می سازد. اگر ترکیباتی که توسط این آنژیم غیرفعال می شوند عامل بیماری دامداران باشند، بنابراین باید در بین دامدارانی که با ارگانوفسفاتها مواجهه دارند، افرادی که میزان کمتری از این آنژیم را در بدن خود دارند، به نسبت بیشتری علائم بیماری را بروز دهند.

بر اساس مطالعات ژنتیکی، در بعضی از افراد به علت وجود یک پلی مورفیسم خاص سطح کمتری از آنژیم پارا اکساناز (که غیرفعال کننده ارگانوفسفاتها می باشد) وجود دارد. در بررسی های انجام شده در بین دامدارانی که با ارگانوفسفاتها مواجهه داشتند، مشخص گردید که افرادی که دارای این پلی مورفیسم ژنتیکی خاص هستند، علائم بیماری بیشتری را نشان دادند. از آنجایی که این خصوصیت ژنتیکی تحت تاثیر عوامل مخدوش کننده قرار نمی گیرد، لذا شواهد قابل اطمینان تری را در خصوص اثرات سوء ارگانوفسفاتها بر سلامت افراد فراهم می آورد.

۳- فیبرینوژن و بیماری عروق کرونر قلب:

اثر فیبرینوژن پلاسما به عنوان عامل خطری برای بیماری عروق کرونر قلب مورد بحث های زیادی قرار گرفته است. در مطالعات همگروهی آینده نگر و مطالعات مورد شاهدی، فیبرینوژن پلاسما با بیماری عروق کرونر قلب رابطه ای مستقیم نشان می دهد، به طوری که در آخرین متأنالیز انجام شده در این خصوص، خطر نسبی معادل $1/8$ (با فاصله اطمینان $1/6$ تا 2) محاسبه گردید. با این وجود باید در نظر گرفته شود که در افرادی که به آتروواسکلروز مبتلا هستند، میزان فیبرینوژن پلاسما افزایش یافته و موجب ایجاد یک علیت معکوس بین

۱-Mendelian Inheritance in Man

۲-Human Gene Mutation Database

۳-Human Genome Variation Database

بهترین حالت برای انجام یک تصادفی سازی مندلی در مواقعي است که یک پلی مورفیسم زنی تنها سبب ایجاد یک فنوتیپ اثرگذار بر روی بیماری مورد نظر گردد. اجرای تصادفی سازی مندلی با استفاده از پلی مورفیسم هایی که همزمان موجب ایجاد چندین فنوتیپ اثرگذار روی بیماری شده و چندین عضو را تحت تاثیر قرار می دهند، کمتر توصیه می شود زیرا احتمال سوگرايی بيشتری داشته و تفسير نتيجه گيری نهايی را دشوار می سازند.

در مجموع در صورت وجود پلی مورفیسم عملکردی مناسب و حجم نمونه كافی، می توان از تصادفی سازی مندلی به عنوان روشی مطمئن و قابل اطمینان به منظور بررسی رابطه بین یک مواجهه و پیامد خاص، بدون ترس از اثر مخدوش کننده ها استفاده نمود.

منبع:

Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? International journal of epidemiology. 2003;32(1):1-22. Epub 2003/04/12.

موجب تغييرات بسيار اندک در عملکرد مورد نظر می شوند. به عنوان مثال در مطالعه رابطه بين هوموسيستين پلاسمما و آفرايش خطر ابتلا به CHD که پيشتر ذكر شد، برای انجام یک آزمون با قدرت ۸۰٪ در سطح معنی داري ۵٪، نياز به حداقل ۹۵۰۰ نفر مورد مبتلا به CHD و ۹۵۰۰ نفر شاهد می باشد. ضمناً باید در نظر داشت که در تصادفی سازی مندلی، مقادير خطر نسبی محاسبه شده نيز اغلب کوچک می باشند. شاید يكى از دلایل زياد بودن سوگرايی انتشار در مطالعات ژنتيکي انجام شده بر پاييه تصادفی سازی مندلی، همين نياز به داشتن حجم نمونه بالا باشد.

يکى ديگر از مشكلاتي که ممکن است در تصادفی سازی مندلی رخ دهد اين است که گاهي اوقات پلی مورفیسم مورد مطالعه، در عدم تعادل پيوستگی^۱ با یک پلی مورفیسم عملکردی ديگر قرار دارد. به عبارت ديگر در چنین مواردي وراثت اين دو پلی مورفیسم مستقل از يكديگر نيستد. ممکن است پلی مورفیسمی که با پلی مورفیسم مورد نظر ما رابطه دارد، مستقيماً روابط مورد مطالعه ما را تحت تاثير قرار داده و يا بصورت غير مستقيم از طريق اثر روی رفتار افراد (مثلاً مصرف سيگار و الكل، قدرت يادگيری و ...) موجب ايجاد سوگرايی در مطالعه گردد.

۱- Linkage disequilibrium