استفاده از تصادفی سازی مندلی در مطالعات اپیدمیولوژیک

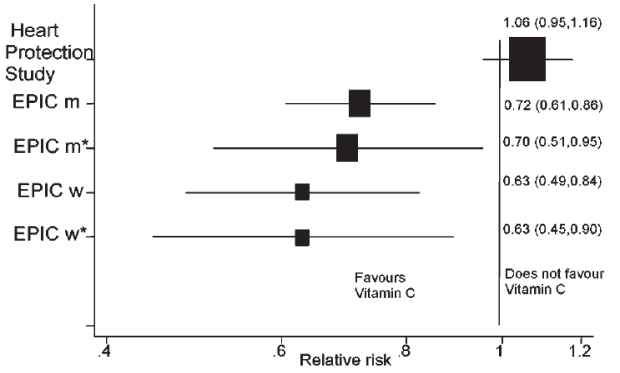
دکتر محمد حسن کاظمی[1]

مقدمه:

طی دهه های اخیر در موارد متعددی، یافته های حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک کلاسیک که با متدهای مشاهده ای انجام شده بودند، نقض شده و زیر سوال قرار گرفته اند. در اغلب این موارد، یافته های علیتی گزارش شده، در اثر متغیرهای مخدوش کننده ایجاد شده بودند و یک رابطه حقیقی را نشان نمی دادند.

مطالعات مشاهده ای فراوانی تا کنون به اجرا گذاشته شده که یک رابطه معنی دار علیتی بین یک مواجهه و پیامد را نشان داده، ولی این یافته ها با انجام یک کارآزمایی کنترل شده تصادفی (RCT[2]) نقض گردیده است. بااین وجود نمی توان از کارآزمایی های بالینی در بسیاری از موارد استفاده نمود، به عنوان مثال در مواردی که مواجهه مورد نظر، برای سلامتی افراد مضر بوده (مثلاً مواجهه با سموم) و یا در مواردی که اندازه گیری دقیق مواجهه دشوار می باشد (مثل جنبه های مختلف تغذیه).

یکی از مثال های چنین مواردی، رابطه بین مصرف ویتامین C و کاهش بیماری های عروق کرونر قلب (CHD) می باشد. هر چند که در مطالعات مشاهده ای انجام شده در این خصوص، یک رابطه حفاظتی بین افزایش ویتامین C پلاسما 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).

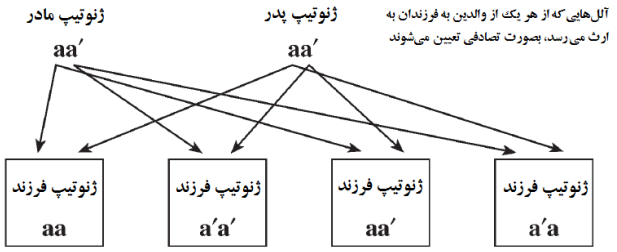


شکل ۱- نتایج متفاوت حاصل از مطالعات مشاهده ای (EPIC) و یک کارآزمایی تصادفی شده(Heart Protection Study)در خصوص اثر افزایش ویتامین C پلاسما بر مرگ و میر پنج ساله ناشی از بیماری عروق کرونر

عوامل مخدوشگری که می توانند سبب ایجاد چنین روابط علیتی جعلی شوند می توانند 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 مکمل های 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 مکمل ها استفاده نمی کنند متفاوت می باشند.

مفهوم تصادفی سازی مندلی[3]:

اساس تصادفی سازی مندلی، قانون دوم مندل (قانون جور شدن مستقل ژن ها) می باشد. بر طبق این قانون در هنگام تشکیل گامت ها جدا شدن آلل های یک جفت آلل، مستقل از جدا شدن آلل های یک جفت آلل دیگر صورت می گیرد. بنابراین وراثت یک صفت ژنتیکی، مستقل از وراثت صفات دیگر می باشد (شکل ۲).



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

در مطالعات اپیدمیولوژی ژنتیک معمولی، معمولاً اختلافات ژنتیکی و فنوتیکی 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 می شود، از جور شدن مستقل ژن ها به منظور کنترل مخدوش کننده ها در بررسی رابطه بین یک مواجهه و پیامد استفاده می گردد.

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

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2026-11-01]

چنانچه در یک نقطه از زنجیره DNA در بین تعدادی از افراد یک جامعه تفاوتهایی وجود داشته باشد (با شیوع حداقل ۱٪)، به آن پلی مورفیسم گفته می شود. تصادفی سازی مندلی بر پایه این ایده اجرا می شود که چنانچه یک پلی مورفیسم[۱] 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.

افرادی که دارای آلل های هموزیگوت TT هستند در مقایسه با افرادی که دارای آلل های هموزیگوت CC هستند، به طور میانگین دارای ۲/۶ µmol/l هوموسیستئین بالاتری در پلاسما می باشند. بنابراین چنانچه یک رابطه علیتی بین هوموسیستئین و CHD وجود داشته باشد، افراد با ژنوتیپ TT در مقایسه با افراد CC باید در معرض خطر بیشتر CHD باشند. با توجه به اینکه مقایسه بین این افراد بر اساس ژنوتیپشان می باشد، بنابر قانون دوم مندل امکان اندکی برای مخدوش شدگی وجود خواهد داشت (جدول ۱)

عوامل خطر	ژنوتیپ *MTHFR*			
	TT N = 349	CT N = 340	CC N = 76	*P*-value
مصرف 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
	هموسیستئین پلاسما			
	4.5–9.9 µmol/l N = 268	10.0–12.4 µmol/l N = 252	12.5–74.4 µmol/l N = 257	
مصرف 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 هموسیستئین پلاسما

چند مثال از کاربرد تصادفی سازی مندلی:

۱- فولات، هوموسیستئین و بیماری عروق کرونر قلب:

مطالعات مشاهده ای رابطه بین مقادیر بالاتر هوموسیستئین پلاسما و افزایش خطر ابتلا به CHD را نشان داده اند. ضمناً کارآزمایی های بالینی، اثر مصرف متوسط فولات در کاهش هوموسیستئین پلاسما را تایید نموده اند. از آنجایی که رابطه بین هوموسیستئین و CHD ممکن است در اثر عوامل مخدوشگری چون مصرف سیگار، فاکتورهای اجتماعی اقتصادی، و یا ابتلا به آترواسکلروز 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 هوموسیستئین به متیونین نقش دارد، لذا افرادی که دارای این پلی مورفیسم ژنتیکی می باشند، از میزان بالاتری از هوموسیستئین در پلاسما برخوردار هستند. به عبارت دیگر این پلی مورفیسم، مصرف کمتر فولات را تقلید می کند.

در متا 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) برای رابطه بین ۲/۶ µmol/l هوموسیستئین بالاتر و CHD محاسبه گردید. در متا 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 ژنوتیپ 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

۱- Polymorphism

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2026-11-01]

خارجی، گوسفندان خود را در حمام ارگانوفسفاته ها غوطه ور می کردند، 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 حربه ای از سوی دامداران برای دریافت خسارت از شرکت های بیمه و یا بازنشستگی 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 مورد-شاهدی که فاقد سوگرایی شده باشند نیز در این خصوص بسیار دشوار می باشد.

برای حل این مشکل، می توان از تصادفی سازی مندلی کمک گرفت. آنزیمی به نام پارا اُکساناز اجزای سمی حمام دام ها را غیرفعال می سازد. اگر ترکیباتی که توسط این آنزیم غیرفعال می شوند عامل بیماری دامداران باشند، بنابراین باید در بین دامدارانی که با ارگانوفسفاتها مواجهه دارند، افرادی که میزان کمتری از این آنزیم 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 آنزیم پارا اُکساناز (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 متا آنالیز انجام شده در این خصوص، خطر نسبی معادل ۱/۸ (با فاصله اطمینان ۱/۶ تا ۲) محاسبه گردید. با این وجود باید در نظر گرفته شود که در افرادی که به آترواسکلروز مبتلا هستند، میزان فیبرینوژن پلاسما افزایش یافته و موجب ایجاد یک علیت معکوس بین 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 ژنوتیپ G/G $^{g/l}$۳/۱، در افراد با ژنوتیپ A/G $^{g/l}$۳/۲۲، و در افراد با ژنوتیپ A/A $^{g/l}$۳/۳۶ می باشد، به طوری که هر آلل A موجب افزایشی معادل g/l ۰/۱۲ می گردد.

اخیراً 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 ژنوتیپ A/A و CHD آزمون گردید. در بررسی رابطه بین سطح فیبرینوژن پلاسما و CHD، خطر نسبی معنی داری معادل ۱/۲ (با فاصله اطمینان ۱/۱۳ تا ۱/۲۶۱) مشاهده شد، در صورتی که در بررسی رابطه بین داشتن ژنوتیپ A/A و CHD خطر نسبی ۱/۰۳ (با فاصله اطمینان ۰/۹۶ تا ۱/۱) 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 وجو 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[۲]انسان، و بانک اطلاعات تفاوت های ژنوم[۳]انسان 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

۱-Mendelian Inheritance in Man
۲-Human Gene Mutation Database
۳-Human Genome Variation Database

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2026-11-01]

موجب تغییرات بسیار اندک در عملکرد مورد نظر می شوند. به عنوان مثال در مطالعه رابطه بین هوموسیستئین پلاسما و افزایش خطر ابتلا به CHD که پیشتر ذکر شد، برای انجام یک آزمون با قدرت ۸۰٪ در سطح معنی داری ۵٪، نیاز به حداقل ۹۵۰۰ نفر مورد مبتلا به CHD و ۹۵۰۰ نفر شاهد می باشد. ضمناً باید در نظر داشت که در تصادفی سازی مندلی، مقادیر خطر نسبی محاسبه شده نیز اغلب کوچک می باشند. شاید یکی از دلایل زیاد بودن سوگرایی انتشار در مطالعات ژنتیکی انجام شده بر پایه تصادفی سازی مندلی، همین نیاز به داشتن حجم نمونه بالا باشد.

یکی دیگر از مشکلاتی که ممکن است در تصادفی سازی مندلی رخ دهد این است که گاهی اوقات پلی مورفیسم مورد مطالعه، در عدم تعادل پیوستگی[۱] با یک پلی مورفیسم عملکردی دیگر قرار دارد. به عبارت دیگر در چنین مواردی وراثت این دو پلی مورفیسم مستقل از یکدیگر نیستند. ممکن است پلی مورفیسمی که با پلی مورفیسم مورد نظر ما رابطه دارد، مستقیماً روابط مورد مطالعه ما را تحت تاثیر قرار داده و یا بصورت غیر مستقیم از طریق اثر روی رفتار افراد (مثلاً مصرف سیگار و الکل، قدرت یادگیری و ...) موجب ایجاد سوگرایی در مطالعه گردد.

بهترین حالت برای انجام یک تصادفی سازی مندلی در مواقعی است که یک پلی مورفیسم ژنی 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 سوگرایی بیشتری داشته و تفسیر نتیجه گیری نهایی را دشوار می سازند.

در مجموع در صورت وجود پلی مورفیسم عملکردی مناسب و حجم نمونه کافی، 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.

۱- Linkage disequilibrium

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2026-11-01]