

استفاده از تصادفی سازی مندلی در مطالعات اپیدمیولوژیک

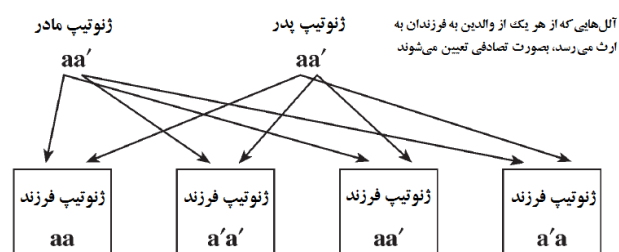
دکتر محمد حسن کاظمی^۱

مقدمه:

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^۲:

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).



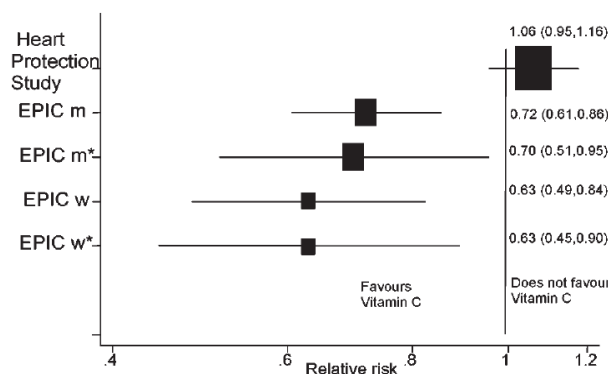
شکل ۲- نمایش قانون دوم مندل (قانون جور شدن مستقل ژن ها)

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.

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) 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

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

۲- Randomized Controlled Trial

۳- Mendelian Randomization

افرادى كه داراى آلل هاى هموزيگوت TT هستند در مقايسه با افرادى كه داراى آلل هاى هموزيگوت CC هستند، به طور ميانگين داراى $2/6 \mu\text{mol/l}$ هوموسيستئين بالاترى در پلاسما مى باشند. بنابر اين چنانچه يك رابطه عليمى بين هوموسيستئين و CHD وجود داشته باشد، افراد با ژنوتپ TT در مقايسه با افراد CC بايد در معرض خطر بيشتر CHD باشند. با توجه به اينكه مقايسه بين اين افراد بر اساس ژنوتپيشان مى باشد، بنابر قانون دوم مندل امكان اندكى براى مخدوش شدگى وجود خواهد داشت (جدول ۱)

عوامل خطر	ژنوتپ MTHFR			P-value
	TT N = 349	CT N = 340	CC N = 76	
مصرف سيگار (95% CI)	17 (13-21)	23 (18-27)	19 (11-31)	0.9
ميانگين فشار خون سيستوليك (SD) mmHg	147 (24)	146 (24)	150 (23)	0.2
ميانگين كلسترول تام (SD) mmol/l	6.3 (1.1)	6.2 (1.1)	6.3 (1.3)	0.7
(95% CI) % كلاس اجتماعى	52 (47-58)	58 (52-64)	53 (40-65)	0.9
هوموسيستئين 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	
مصرف سيگار (95% CI) %	16 (12-21)	14 (10-20)	30 (24-36)	<0.001
ميانگين فشار خون سيستوليك (SD) mmHg	142 (22)	148 (25)	150 (25)	<0.001
ميانگين كلسترول تام (SD) mmol/l	6.3 (1.1)	6.3 (1.2)	6.2 (1.1)	0.5
(95% CI) % كلاس اجتماعى	48 (42-55)	55 (48-61)	63 (56-69)	0.001

جدول ۱- عدم وجود رابطه معنى دار بين عوامل مخدوش كننده بالقوه با پلى مورفيسم ژنتيكى و وجود رابطه معنى دار بين آنها و سطح هوموسيستئين پلاسما

در متا آناليزى كه بر روى مطالعات مشاهده اى انجام شده در اين زمينه انجام گرديد، يك خطر نسبى به مقدار $1/13$ (با فاصله اطمينان $1/8$ تا $1/19$) براى رابطه بين $2/6 \mu\text{mol/l}$ هوموسيستئين بالاتر و CHD محاسبه گرديد. در متا آناليز ديگرى كه بر روى مطالعات بر پايه تصادفى سازى مندلى انجام گرديد، يك خطر نسبى به مقدار $1/16$ (با فاصله اطمينان $1/5$ تا $1/28$) براى افراد با ژنوتپ TT در مقايسه با افراد CC براى خطر CHD محاسبه گرديد.

هر چند كه نتيجه حاصل از هر دو روش يكسان مى باشند، ولى در مطالعات انجام شده بر پايه تصادفى سازى مندلى، امكان مخدوش شدگى بسيار كمتر بوده و نتايج حاصله قابليت اطمينان بيشترى دارند.

۲- ارگانوفسفات ها و بيمارى دامداران:

در تعدادى از دامدارانى كه به منظور مبارزه با انگل هاى

چنانچه در يك نقطه از زنجيره DNA در بين تعدادى از افراد يك جامعه تفاوتهاى وجود داشته باشد (با شيوه حداقل $1/$)، به آن پلى مورفيسم گفته مى شود. تصادفى سازى مندلى بر پايه اين ايده اجرا مى شود كه چنانچه يك پلى مورفيسم ژنى موجب ايجاد تفاوت هاى فنوتىپى در تعدادى از افراد جامعه گردد كه اين تفاوت ها به نوعى سبب شبیه سازى يك مواجهه خاص شده و يا اثر يك مواجهه خاص را تغيير دهد، اگر بين وجود اين پلى مورفيسم و پيامد مورد نظر رابطه معنى دارى مشاهده شد، رابطه بين آن مواجهه و پيامد نيز تايد مى گردد.

چند مثال از كاربرد تصادفى سازى مندلى:

۱- فولات، هوموسيستئين و بيمارى عروق كرونر قلب:

مطالعات مشاهده اى رابطه بين مقادير بالاتر هوموسيستئين پلاسما و افزايش خطر ابتلا به CHD را نشان داده اند. ضمناً كارآزمائى هاى بالينى، اثر مصرف متوسط فولات در كاهش هوموسيستئين پلاسما را تايد نموده اند. از آنجاى كه رابطه بين هوموسيستئين و CHD ممكن است در اثر عوامل مخدوشگرى چون مصرف سيگار، فاكترهاى اجتماعى اقتصادى، و يا ابتلا به آترواسكلروز ايجاد شده باشد، به منظور تايد اين رابطه از تصادفى سازى مندلى استفاده شده است.

يك پلى مورفيسم عملكردى سبب كاهش عملكرد آنزيم متيلن تتراهيدروفولات ردوكتاز (MTHFR) مى شود. از آنجاى كه اين آنزيم در تبديل هوموسيستئين به متيونين نقش دارد، لذا افرادى كه داراى اين پلى مورفيسم ژنتيكى مى باشند، از ميزان بالاترى از هوموسيستئين در پلاسما برخوردار هستند. به عبارت ديگر اين پلى مورفيسم، مصرف كمتر فولات را تقليد مى كند.

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 آکساناز 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 مورفیسیم خاص سطح کمتری از آنزیم پارا آکساناز (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 مورفیسیم 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 مورفیسیمی بر روی ژن بتا-فیبرینوژن وجود دارد که بر روی سطح فیبرینوژن پلاسما اثرگذار است. سطح فیبرینوژن پلاسما در افراد با ژنوتیپ $G/G^{1/3}$ ، در افراد با ژنوتیپ $A/G^{1/2}$ ، و در افراد با ژنوتیپ $A/A^{1/3}$ می باشد، به طوری که هر آلل A موجب افزایشی معادل g/l 0.12 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 وجود ندارد.

محدودیت های تصادفی سازی مندلی:

یکی از مهمترین محدودیت های اجرای این روش، محدودیت در یافتن پلی مورفیسیم 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 مورفیسیم هایی در نسخه آنلاین وراثت مندلی^۱ در انسان، بانک اطلاعات موتاسیون ژنی انسان، و بانک اطلاعات تفاوت های ژنوم 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 مورفیسیم 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

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