

بر اساس تصویب اداره کل آموزش مداوم جامعه پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به پزشکان عمومی، دندانپزشکان، داروسازان و متخصصین رشته‌های پزشکی و دندانپزشکی که به پرسش‌های مطرح شده در این مقاله پاسخ دهند ۱/۵ امتیاز تعلق می‌گیرد.

آشنایی با اپیدمیولوژی مولکولی

دکتر علی اکبر حقدوست^۱

خلاصه

دانش اپیدمیولوژی مولکولی از جمله دانش‌های نوینی است که به بررسی ابعاد اپیدمیولوژیک بیماری‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی می‌پردازد. در شاخه‌ای از این علم تحت عنوان اپیدمیولوژی ژنتیک، نحوه توارث بیماری‌ها و تداخل بین ژن و محیط بحث می‌شود. علاوه بر آن، اپیدمیولوژی مولکولی یکی از بهترین روش‌های پاسخ به بعضی سؤالات در حیطه‌های زیر است:

۱. بررسی چگونگی گسترش بیماری‌ها مانند HIV/AIDS در بین کشورهای دنیا و در سطح جهانی
 ۲. بررسی چرخه انتقال بیماری‌ها در جوامع و نحوه توزیع آنها در جامعه
 ۳. بررسی میزان شدت بیماری‌ها با شاخص‌های مولکولی آنها و مرتبط نمودن آنها با شاخص‌های اپیدمیولوژیک مانند میزان بروز و میزان شیوع بیماری‌ها
- در این مقاله که برای پزشکان عمومی و متخصصین نوشته شده، سعی گردیده است تا به دور از پیچیدگی‌های فنی و با آوردن مثال‌های ساده و عینی کاربردهای این شاخه علمی شرح داده شود. انتظار می‌رود پس از مطالعه این مقاله خوانندگان بتوانند:

- ۱- اپیدمیولوژی مولکولی را تعریف کنند.
- ۲- حیطه‌های مختلف اپیدمیولوژی مولکولی را نام ببرند.

۳- نقاط قوت و ضعف یافته‌های تحقیقاتی در اپیدمیولوژی مولکولی را بیان کنند.
واژه‌های کلیدی: اپیدمیولوژی مولکولی

۱- استادیار اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان • آدرس پست الکترونیک: ahaghdoost@gmail.com

مقدمه

منشأ پیدایش HIV کجا بوده است و احتمالاً چه زمانی به انسان منتقل شده است؟ چگونه می‌توان دریافت که بیمار مبتلا به سل دچار عفونت اولیه شده است و یا بیماری وی ناشی از فعال شدن مجدد یک عفونت قدیمی است؟ آیا روشی وجود دارد که با آن بتوان دریافت چگونه و چرا برخی بیماری‌ها در گروه خاصی شایع‌تر و یا خطرناک‌تر هستند؟ آیا می‌دانید که چگونه چرخه بیماری جنون گاوی کشف و یا نحوه گسترش بیماری سارس تعیین شد؟

پاسخ به این سؤالات توسط تحقیقات صرف اپیدمیولوژیک و یا مولکولی ممکن نیست و در واقع با ترکیب فنون شناخته شده این دو علم در کنار یکدیگر می‌توان به چنین سؤالاتی پاسخ داد. در این مقاله سعی می‌شود تا به صورت روان و به دور از پرداختن به جزئیات فنی، کاربردهای تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی (Molecular Epidemiology) شرح داده شود.

تعریف اپیدمیولوژی مولکولی

در حال حاضر تعریف واحد و جامعی از این علم ارائه نشده است و در متون حداقل ۸ تعریف از علم اپیدمیولوژی مولکولی دیده می‌شود (۱).

با وجود این، به صورت کلی می‌توان گفت که این علم سعی

می‌کند با بررسی محتوای ژنتیکی و پروتئین‌های موجودات زنده و تنوع آنها در سطح جامعه، نحوه گسترش بیماری‌ها و عوامل خطر ساز (Risk Factors) آنها را شناسایی کند (۲). این تعریف بسیار گسترده است و جنبه‌های مختلفی همچون بررسی نوع ژنتیکی، بررسی اپیدمیولوژیک بدخیمی‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی، بررسی ارتباط بین مارکرهای مولکولی و حدت بیماری‌زایی میکروب‌ها و ویروس‌ها و موارد مشابهی را شامل می‌شود (۳).

در ابتدا باید گفت که اپیدمیولوژی مولکولی دقیقاً همان اپیدمیولوژی ژنتیکی (Genetic Epidemiology) نیست. اپیدمیولوژی ژنتیکی در واقع یکی از اصلی‌ترین و مهم‌ترین شاخه‌های اپیدمیولوژی مولکولی است و موضوع صحبت آن، نگاه به ژن‌ها و مواد ژنتیکی موجودات در مقیاس اپیدمیولوژیک برای شناخت نحوه انتقال بیماری‌های ژنتیک و تعیین محل احتمالی قرارگیری ژن و یا ژن‌های موثر در بروز بیماری بر روی کروموزم‌ها است.

معمولاً در تحقیقات آزمایشگاهی، به خصوص در رشته ژنتیک، حجم نمونه‌ها بسیار محدود است و این پژوهش‌ها عمدتاً بر روی نمونه‌های غیرتصادفی (Non - random) انجام می‌گیرند و هدف عمده آنها شناخت عمیق مکانیسم‌ها است.

ب) شاخه‌ای که هدف آن شناسایی و مطالعه نحوه انتقال بیماری‌ها در مقیاس جغرافیایی کوچکتر است.

ج) شاخه‌ای که هدف آن مطالعه پاتوژن‌های بیماری‌ها و ارتباط دادن عوامل خطر آنها با مارکرهای مولکولی است.

در ادامه سعی می‌شود با مثال‌های عینی کاربردهای هر یک از این شاخه‌ها شرح داده شود.

نحوه گسترش بیماری‌ها در سطح دنیا

مواد ژنتیکی موجودات در طول زمان تغییر می‌یابند و یکی از علل اصلی آن نیز جهش و نوترکیبی است. بر اساس شواهد موجود، سرعت این تغییرات در بین موجودات مختلف یکسان نیست. حتی در یک موجود خاص نیز میزان تغییرات مثلاً در ژن‌های تولیدکننده پروتئین‌های اصلی و حیاتی با ژن‌های تولیدکننده آنتی‌ژن‌های سطحی برابر نیست. به عبارت دیگر ژن‌های سطحی با سرعت بیشتری نسبت به ژن‌های حیاتی تغییر می‌یابند. البته سرعت ایجاد ژن‌های جدید با سرعت پخش شدن آنها در جامعه یکسان نیست، زیرا بسیاری از ژن‌های جهش یافته باعث مرگ موجود می‌شوند و امکان اشاعه آنها در جامعه وجود ندارد. اما نکته جالب و مهم آن است که سرعت متوسط ایجاد شکل‌های جدید یک ژن در

اگرچه این شیوه‌ها غالباً دقت بالایی

(Internal Validity)، تعمیم‌پذیری آنها به کل جامعه چندان آسان نیست. به عنوان مثال در این تحقیقات ممکن است پژوهشگر سعی کند تأثیر یک ژن خاص را بر رشد سلولی ارزیابی کند و بعد از آزمایش‌های متعدد پاسخ دقیقی در محیط‌های کشت سلولی بیابد، ولی این تحقیقات به آسانی نمی‌تواند روشن کند که تغییر این ژن بر جامعه و محیط چه آثاری به جا می‌گذارد. به همین دلیل است که مقاومت‌های بسیار زیادی بر سر راه اشاعه فنون اصلاح ژنتیکی نژادهای گیاهی یا حیوانی وجود دارد.

در تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی سعی می‌شود اصول علمی هر دو شاخه به دقت رعایت شود. در این پژوهش‌ها مفاهیم اپیدمیولوژیک همچون نمونه‌گیری تصادفی، حجم نمونه قابل قبول، حذف و یا کاهش خطاها و سوگیری‌ها به اندازه فنون بسیار پیشرفته مولکولی مهم هستند (۱).

به صورت کلی شاید بتوان اپیدمیولوژی مولکولی را به سه زیرشاخه اصلی تقسیم کرد:

الف) شاخه‌ای که هدف آن شناسایی میزان و نحوه گسترش بیماری‌ها و عوامل ایجادکننده آنها در سطح دنیا است.

ژن‌هایی مانند Pol که کد کننده آنزیم ترانس کریپتاز معکوس است و gag که یکی از پروتئین‌های داخل سلولی ویروس را کد می‌کند، دارای ساعت مولکولی کندتری هستند و لذا تنوع انواع این ژن‌ها در جامعه نسبتاً کم است. در حالی که ژن env که کد کننده پوسته گلیکوپروتئین ویروس است در سطح جامعه بسیار متنوع است و حتی احتمال یافتن چندین شکل این ژن در یک بیمار وجود دارد (۷).

از نظر ژنتیکی HIV دارای دو زیر گروه HIV1 و HIV2 است. HIV1 خود به سه زیرشاخه M، O و N تقسیم می‌شود که مثلاً زیرشاخه N برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ در کامرون شناسایی شد و بعد از مطالعات گسترده نشان داده شد که منشأ آن مرکز آفریقا بوده است. این تقسیم‌بندی بر اساس تشابه ترتیب اسیدهای نوکلئیک ژن Pol انجام شده است (۷، ۸).

با توجه به تنوع ژنتیکی HIV در یک منطقه در مقایسه با سایر مناطق و دنبال کردن و ارتباط دادن تشابهات ژنتیکی ویروس‌های یافت شده در نقاط مختلف دنیا، در حال حاضر نقشه‌های نسبتاً دقیقی در مورد نحوه گسترش HIV و زمان احتمالی آن تهیه شده است. تجربیات حاصل از مطالعات انجام شده بر روی این ویروس راه را برای مطالعات

سطح جامعه تقریباً ثابت و قابل محاسبه است و از آن به عنوان ساعت مولکولی (Molecular Clock) اسم برده می‌شود (۱). بر این اساس می‌توان عنوان کرد که هر ژن در هر موجود یک ساعت مولکولی نسبتاً دقیق و منحصر به فرد دارد. تحقیقات نشان داده است که مثلاً ساعت مولکولی HIV بیشتر از مایکوباکتریوم است و این ساعت در موجود پرسلولی مانند موش کندتر از موجودات تک سلولی است، ولی سرعت آن در انسان از موش نیز کندتر است. با دانستن این واقعیت و با تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی به سادگی می‌توان دریافت که احتمالاً یک موجود تک سلولی یا حتی یک موجود پرسلولی چه مدت زمان قبل و احتمالاً در کجا شکل گرفته است (۴).

بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده HIV نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی این ویروس در آفریقا بسیار بیشتر از سایر قاره‌ها است. به این جهت می‌توان تصور کرد که این ویروس احتمالاً مدت زمان بیشتری در قاره آفریقا انتقال می‌یافته است. حتی با مقایسه تنوع ژنتیکی این ویروس در قاره‌های مختلف و با در نظر گرفتن ساعت مولکولی ژن‌های مختلف آن می‌توان با دقت نسبتاً خوبی زمان شروع انتقال به انسان و مسیر انتقال آن را بیان کرد (۵-۷).

بیشتر بر روی سایر عوامل بیماری‌زا آسان کرده است (۸).
 نحوه انتقال بیماری در مقیاس محدود جغرافیایی تا سال ۲۰۰۰ میلادی در ژنوتایپ اصلی B و E از HIV1 در کشور تایلند شناخته شده بود که تفاوت ژنتیکی آنها حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد بوده است، در حالی که این تنوع ژنتیکی در سال ۱۹۹۱ کمتر از ۴ درصد تعیین شده بود. این نشان می‌دهد که در بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ سرعت انتقال بیماری و در نتیجه افزایش تنوع ژنتیکی بسیار زیاد بوده است. نگاه دقیق‌تر به اطلاعات، کاملاً منطبق بر یافته‌های اپیدمیولوژیک است و نشان می‌دهد بیشترین انتقال احتمالاً در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ انجام شده است. ژنوتایپ E در قسمت مرکزی آفریقا نیز دیده شده است و در زمانی که در تایلند تنوع این ژن کم بوده در آن نواحی حدود ۱۱ درصد تنوع داشته است که نشان می‌دهد انتقال ژن مذکور از آفریقا شروع شده و سپس به تایلند رسیده است (۹).

بیشتر بر روی سایر عوامل بیماری‌زا آسان کرده است (۸).

نحوه انتقال بیماری در مقیاس محدود جغرافیایی

تا سال ۲۰۰۰ میلادی دو ژنوتایپ اصلی B و E از HIV1 در کشور تایلند شناخته شده بود که تفاوت ژنتیکی آنها حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد بوده است، در حالی که این تنوع ژنتیکی در سال ۱۹۹۱ کمتر از ۴ درصد تعیین شده بود. این نشان می‌دهد که در بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ سرعت انتقال بیماری و در نتیجه افزایش تنوع ژنتیکی بسیار زیاد بوده است. نگاه دقیق‌تر به اطلاعات، کاملاً منطبق بر یافته‌های اپیدمیولوژیک است و نشان می‌دهد بیشترین انتقال احتمالاً در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ انجام شده است. ژنوتایپ E در قسمت مرکزی آفریقا نیز دیده شده است و در زمانی که در تایلند تنوع این ژن کم بوده در آن نواحی حدود ۱۱ درصد تنوع داشته است که نشان می‌دهد انتقال ژن مذکور از آفریقا شروع شده و سپس به تایلند رسیده است (۹).

نکته جالبتر آنکه بیماران آلوده شده از طریق جنسی بیشتر دارای ژنوتایپ E بوده‌اند (۸۶ تا ۹۹ درصد) در حالی که آلوده شدگان از طریق تزریقات، بیشتر ژنوتایپ B را نشان داده بودند

ژنوتایپ B از طریق معتادان تزریقی وارد تایلند شده و ثانیاً احتمالاً نحوه انتقال جنسی ژنوتایپ E و نحوه انتقال خونی ژنوتایپ B آسان‌تر است. این مثال به شکل جالبی کاربرد تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی را در مشخص کردن نحوه انتقال بیماری در یک کشور و حتی در یک منطقه نشان می‌دهد. حتی با این فنون می‌توان نحوه انتقال فرد به فرد را با دقت قابل قبولی دنبال کرد.

پاتوژنز بیماری‌ها و عوامل خطر آنها

شاید اولین مطالعات در این زمینه را بتوان به تحقیقات انجام شده در مورد مالاریا نسبت داد. این مطالعات نشان داد که بیماران مبتلا به کم‌خونی داسی شکل و یا مبتلایان به کمبود آنزیم G6PD نسبت به اشکال کشنده بیماری از مقاومت نسبی برخوردار هستند. این مفهوم در حال حاضر به صورت وسیعی در تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی دنبال و تداخل بین ژنتیک و محیط در بروز بیماری‌ها در مقیاس جامعه بررسی می‌شود. مثال دیگری از این گونه تحقیقات مطالعه در مورد بیماری جنون گاوی (۱۰) و نحوه انتقال آن به

انسان است. این تحقیقات همچنین نشان می‌دهد که چرا تنها گروه خاصی مستعد ابتلا به این بیماری هستند. در ضمن تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی در شناسایی عوامل خطر بدخیمی‌ها به طور وسیعی در حال انجام است (۱۱، ۱۲).

محدودیت‌های اجرایی مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی

شاید بتوان ادعا کرد که مهم‌ترین محدودیت این گونه مطالعات کمبود متخصص این رشته است. زیرا به ظاهر دو رشته اپیدمیولوژی و زیست‌شناسی مولکولی دو سر یک طیف هستند و تعداد افراد متخصص و آشنا به هر دو موضوع کم است. به جز این مسأله مهم‌ترین مشکلات مطالعات مذکور را می‌توان به صورت زیر دسته‌بندی کرد:

۱- سوگیری در نمونه‌گیری (Sampling Bias): معمولاً نمونه‌گیری برای مطالعات مولکولی به صورت غیرتصادفی و از نوع آسان (Convenience) انجام می‌شود و به عنوان مثال نمونه‌ها از بین بیماران مراجعه کننده به مراکز درمانی انتخاب می‌شوند. این نمونه‌ها ممکن است نماینده کل افراد جامعه نباشند. به همین دلیل غالباً تنوع ژنتیکی در جامعه بیشتر از تنوع ژنتیکی در نمونه‌های غیرتصادفی است.

۲- استفاده از بیماران موجود در جامعه در یک مقطع زمانی به جای استفاده از بیماران جدید: این مفهوم در اپیدمیولوژی با عنوان شیوع مورد (Case Prevalence) در مقایسه با وقوع مورد (Case Incidence) بیان می‌شود و باعث می‌شود که احتمال برخورد با ژنوتایپ‌هایی که بسیار خطرناک و کشنده هستند و یا آنهایی که بسیار کم خطرند و بیماری خفیف و کوتاه مدتی ایجاد می‌کنند کاهش یابد. به عبارت دیگر احتمال برخورد با ژنوتایپ‌هایی که بیماری مزمن‌تری ایجاد می‌کنند زیادتر خواهد بود.

۳- شناسایی بیشتر ژنوتایپ‌هایی که آسان‌تر جدا می‌شوند. به عبارت دیگر ممکن است در این گونه مطالعات ژنوتایپ‌هایی که به هر دلیل در آزمایشگاه کمتر قابل استخراج هستند از نظر دور بمانند.

۴- نگاه محدود به چند ژن شناخته شده در هر میکروارگانیزم و یا بدخیمی: به دلیل مشکلات فنی امکان مطالعه همزمان کلیه ژن‌ها وجود ندارد، بنابراین در اکثر مطالعات، ژن‌های محدودی شناسایی و مطالعه می‌شوند که خود ممکن است باعث افزایش خطا در نتیجه‌گیری‌ها شود.

با توجه به محدودیت‌های اصلی بیان شده، در تفسیر نتایج

مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی باید دقت لازم را مبذول داشت. با وجود این و با توجه به نوپا بودن این علم و سرعت بسیار زیاد رشد آن، مسلماً در آینده نزدیک نقش بسیار با ارزشی در دنیای علم پزشکی بازی خواهد کرد.

Summary**Molecular Epidemiology, Concepts and Domains**Haghdoust A.A., Ph.D.¹

1. Assistant Professor of Epidemiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Molecular epidemiology is relatively a new scientific field that explores the epidemiological aspects of diseases using molecular techniques. Genetic epidemiology is a branch of molecular epidemiology that explores the expression of genes and the interactions between genes and environment. Moreover, molecular epidemiology is one of the best methods to address some specific issues such as:

1. Exploring how diseases such as HIV/AIDS had expanded among countries and in the world
2. Exploring the distribution of diseases in populations and tracking their transmission chains
3. Exploring the virulence of pathogens using molecular markers and linking their characteristics to the epidemiological indicators such as incidence and prevalence

In this paper written for general practitioners and medical experts, the applications of molecular epidemiology in public health and medicine by unfolding simple and practical examples have been discussed.

Key word: Molecular epidemiology

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2008; 15(1): 97-103

References:

1. Muin JK, Terri HB, Bernice HC. Fundamentals of genetic epidemiology. Oxford University Press; 1993.
2. Hall A. What is molecular epidemiology? *Trop Med Int Health* 1996; 1(4): 407-8.
3. Schulte PA. Projection of molecular epidemiology in Medicine. *Gac Med Mex* 1997; 133 (suppl 1): 155-9.
4. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17(2): 153-62.
5. Janssens W, Buve A, Nkengasong JN. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *ADIS* 1997; 11(6):705-12.
6. McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS. HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 1996; 10 (suppl 3): 13-20.
7. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, HO DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391(6667): 594-7.
8. Hu DI, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, *et al.* The emerging genetic diversity of HIV, the importance of global surveillance for diagnostic, research and prevention. *JAMA* 1996; 275(3): 210-6.
9. Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 1994; 8 (suppl 2): 13-28.
10. Weber T. Molecular epidemiology and emerging infectious diseases of the nervous system. *J Neurovirol* 1997; 3 (suppl 1): 46-9.
11. Shpilberg O, Dorman JS, Shahar A, Kuller LH. Molecular epidemiology of hematological neoplasms – present status and future directions. *Leuk Res* 1997; 21(4): 265-84.
12. Wild CP, Law GR, Roman E. Molecular epidemiology and cancer: Promising areas for future research in the post – genomic era. *Mutat Res* 2002; 499(1): 3-12.