

# کاربرد روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC در بررسی ارتباط ژنتیکی برخی از میکروستلایت‌ها با میزان HDL-C در خانواده‌های دارای افراد مبتلا به سندرم متابولیک: مطالعه قند و لیپید تهران

نیما حسین‌زاده<sup>۱</sup>، یدالله محرابی<sup>۲</sup>، مریم‌السادات دانشپور<sup>۳</sup>، حمید علوی‌مجد<sup>۴</sup>، فریدون عزیزی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه آمار زیستی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استاد آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده بهداشت، گروه اپیدمیولوژی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه آمار زیستی، تهران، ایران

<sup>۵</sup> استاد، فوق تخصص غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، تهران، ایران

نویسنده رابط: یدالله محرابی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده بهداشت، گروه اپیدمیولوژی، تهران، ایران. تلفن: ۲۲۴۳۲۰۴۱، پست الکترونیک:

ymehrab@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱۹؛ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۹

**مقدمه و اهداف:** بررسی چندین نشان‌گر نزدیک به هم، اطلاعات بیشتری را برای تعیین دقیق‌تر مکان بیماری با استفاده از آنالیز ارتباط ژنتیکی فراهم می‌آورد. این تحقیق ضمن معرفی روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC و به‌کارگیری آن‌ها، به مطالعه ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری برخی میکروستلایت‌های منتخب با میزان HDL-C برای شناخت نواحی ژنی موثر در سندرم متابولیک می‌پردازد. **روش کار:** تعداد ۱۲۵ خانواده از بین شرکت‌کنندگان در مطالعه قند و لیپید تهران به‌گونه‌ای انتخاب شدند که حداقل یک نفر از اعضای آن‌ها مبتلا به سندرم متابولیک و حداقل دو نفر دچار کاهش HDL-C باشند. ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری HDL-C با برخی میکروستلایت‌های کروموزوم‌های ۸، ۱۱، ۱۲ و ۱۶، با به‌کارگیری روش‌های FBAT-MM و FBAT-LC بررسی گردید. **نتایج:** خانواده‌های مورد بررسی شامل ۵۶۳ نفر (۲۶۹ مرد و ۲۹۴ زن) بودند. با به‌کارگیری روش FBAT-MM، تنها ارتباط ژنتیکی هم‌زمان سه میکروستلایت کروموزوم ۱۱ با میزان HDL-C معنی‌دار شد ( $P > 0.05$ ). با کمک روش FBAT، میکروستلایت D11S1304 از بین میکروستلایت‌های کروموزوم ۱۱، عامل معنی‌داری آزمون ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری شناخته شد. **نتیجه‌گیری:** FBAT-MM و FBAT-LC مشکلاتی مانند محافظه‌کاری بالا و توان پایین روش‌های چند نشان‌گری مشابه را ندارند. یافتن میکروستلایت‌های موثر در تغییرات HDL-C می‌تواند راه‌کار مناسبی را برای طراحی مطالعات بعدی برای یافتن ژن‌های مستعدکننده سندرم متابولیک، فراهم آورد.

**واژگان کلیدی:** میکروستلایت، HDL-C، FBAT-MM، FBAT-LC، سندرم متابولیک

## مقدمه

تعیین ژن‌های مربوط به بیماری‌ها و مکان‌یابی آن‌ها به منظور رسم نقشه ژنی در جهت تولید داروهای مؤثرتر برای درمان بیماری‌ها، همواره از اهداف مهم در مطالعات اپیدمیولوژی ژنتیک بوده است. در علم پزشکی، تقسیم بندی بیماری‌ها، از لحاظ علل به وجود آمدن و همچنین بر اساس این که عامل به‌وجود آورنده آن‌ها ژنتیکی است یا محیطی، صورت می‌پذیرد. بیماری‌های چند عاملی مانند سندرم متابولیک، در زمره یکی از این تقسیم بندی‌ها قرار می‌گیرد (۱). بدلیل اثر عوامل محیطی و ژنتیکی فراوان در ایجاد این بیماری‌ها، اثر هر کدام از این عوامل بطور مجزا در ایجاد

بیماری کم بوده و بندرت می‌توان عاملی پیدا کرد که تاثیر عمده‌ای در ایجاد این نوع از بیماری‌ها داشته باشد. تفاوت زمینه ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف نیز می‌تواند باعث تغییر اثر هر کدام از این عوامل باشد (۲). از این رو بررسی این بیماری‌های چند عاملی و تعیین مکان ژنتیکی ژن‌های موثر در ایجاد آن‌ها، بزرگترین مشکلی است که تاکنون دانشمندان علم ژنتیک با آن برخورد کرده‌اند. در راستای تعیین مکان ژنتیکی<sup>۱</sup> یک ژن

<sup>۱</sup> Loci

آماره امتیاز<sup>۷</sup> FBAT، واریانس مربوط به آن و آماره آزمون بررسی ارتباط ژنتیکی FBAT تک نشان‌گری برای  $k$  امین نشان‌گر به ترتیب به صورت:

$$U_i^k = \sum_j T_{ij} [X_{ij}^k - E(X_{ij}^k)]$$

$$\text{Var}(U_i^k) = \sum_{j,k} T_{ij} T_{i\ell} \text{Cov}(X_{ij}^k, X_{i\ell}^k)$$

$$\hat{z}_{i,k} = \frac{\sum_i U_i^k}{\sqrt{\sum_i \text{Var}(U_i^k)}} = \frac{\sum_i \sum_j T_{ij} [X_{ij}^k - E(X_{ij}^k)]}{\sqrt{\sum_i \sum_{j,\ell} T_{ij} T_{i\ell} \text{Cov}(X_{ij}^k, X_{i\ell}^k)}}$$

معرفی می‌گردند به گونه‌ای که  $E(X_{ij}^k)$  و  $\text{Cov}(X_{ij}^k, X_{i\ell}^k)$  تحت برقراری فرض صفر عدم وجود ارتباط ژنتیکی و با توجه به توزیع شرطی  $X_{ij}^k$  به شرط آماره بسنده‌ای<sup>۸</sup> برای ژنوتیپ  $k$  امین نشان‌گر والدین، محاسبه خواهند شد. از طرفی، در صورت بزرگ بودن  $N$ ، آماره  $\hat{z}_{i,k}$  دارای توزیع نرمال استاندارد خواهد بود (۴،۵). در بررسی ارتباط ژنتیکی  $M$  مارکری، فرض کنید که به دنبال آزمون فرض: برای هر  $k$ ،  $E(z_k) = 0$  در مقابل فرض:  $H_1: Z' = (z'_1, z'_2, \dots, z'_M)$  که  $z'_k = E(z_k | H_1)$  و حداقل به ازای یک  $k$  داشته باشیم  $z'_k \neq 0$  باشیم.

در روش FBAT-MM، با تعریف برداری شامل آماره‌های امتیازی FBAT برای تمام  $k$  نشان‌گر به صورت  $U_{MM} = (\sum_i U_i^1, \sum_i U_i^2, \dots, \sum_i U_i^M)^T$  و با در نظر گرفتن ماتریس واریانس:

$$V_E = (e_{kk'})_{k,k'=1}^M \text{ جایی که } e_{kk'} = \sum_i \{ \sum_j T_{ij} [X_{ij}^k - E(X_{ij}^k)] \} \{ \sum_j T_{ij} [X_{ij}^{k'} - E(X_{ij}^{k'})] \}$$

ماتریس همبستگی این بردار به صورت:

$$C_E = \text{diag}(V_E)^{-1/2} V_E \text{diag}(V_E)^{-1/2}$$

و با تعریف ماتریس قطری  $D_T$  با عناصر  $\text{Var}(U_i^k)$  و ماتریس تعدیل شده  $V_A = D_T^{1/2} C_E D_T^{1/2}$ ، آماره آزمون بررسی چند نشان‌گری ارتباط ژنتیکی به صورت فرم درجه دوم<sup>۹</sup>:

$$FBAT_{MM} = U_{MM}^T V_A^{-1} U_{MM}$$

به دست خواهد آمد. تحت برقراری فرض صفر، این آماره از توزیع کی دو با درجه آزادی ای برابر با رتبه ماتریس  $V_E$  پیروی خواهد نمود (۶).

در روش FBAT-LC می‌توان دسته جامعی از آماره‌های آزمون

بخصوص، می‌توان از روش‌های تحلیل ارتباط ژنتیکی<sup>۲</sup> مانند روش FBAT<sup>۳</sup> بهره گرفت. با توجه به مطالب بیان شده در مورد بیماری‌های چند عاملی، قانون معینی برای این‌که مکان دقیق ژن بیماری‌زا را بر روی یک کروموزوم خاص تعیین کنیم، وجود ندارد. از این رو ناحیه ژنی را که در مطالعات قبلی در ارتباط با بیماری بوده است در نظر گرفته و با استفاده از روش‌های مناسب و با به کارگیری علل‌های نشان‌گرهای<sup>۴</sup> منتخب در آن ناحیه، برای تعیین هر چه دقیق‌تر این مکان تلاش می‌کنیم. اما با پیشرفت تکنولوژی و تکمیل شدن پروژه ژنوم انسانی، نشان‌گرهای چند ریخت<sup>۵</sup> زیادی در ژنوم انسانی شناخته شده‌اند که بسیاری از این نشان‌گرها را می‌توان در فاصله فیزیکی کوتاهی مورد بررسی قرار داد. تحقیقات نشان داده است، بررسی چندین نشان‌گر نزدیک به هم در مقایسه با مطالعه تک نشان‌گری، اطلاعات بیشتری را برای تعیین هر چه دقیق‌تر مکان بیماری با استفاده از آنالیز ارتباط ژنتیکی در اختیار محقق قرار می‌دهد (۳). از این رو تلاش محققین به سوی تطابق روش‌های تحلیل ارتباط ژنتیکی موجود با منابع اطلاعاتی جدید سوق پیدا کرد. در راستای این تکامل، روش‌های FBAT چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC، به وجود آمدند که قادرند منابع اطلاعاتی موجود در چندین نشان‌گر نزدیک به هم را در تعیین دقیق‌تر مکان ژنتیکی بیماری‌های چند عاملی، در روش‌های محاسباتی خود دخیل نمایند.

در روش FBAT-MM، آماره آزمون با در نظر گرفتن آماره تک نشان‌گری FBAT و همبستگی‌های موجود بین ژنوتیپ نشان‌گرهای افراد مورد مطالعه به دست می‌آید. روش FBAT-LC نیز با اختصاص وزن‌هایی به داده‌های موجود، ترکیب خطی مناسبی را از آماره‌های آزمون ارتباط ژنتیکی تک نشان‌گری FBAT مهیا ساخته، سپس آماره آزمون خود را به دست می‌آورد. برای آشنایی با نحوه عملکرد روش‌های FBAT-MM و FBAT-LC، فرض کنید که  $N$  و  $M$  و  $n_i = 1, 2, \dots, N$ ، به ترتیب نشان‌دهنده تعداد خانواده‌های هسته‌ای<sup>۶</sup>، نشان‌گرها و فرزندان خانواده  $i$  ام باشد. همچنین  $X_{ij}^k$  و نیز به ترتیب معرف،  $T_{ij}$  تعیین شده ژنوتیپ  $k$  امین نشان‌گر و تابعی از صفت مورد مطالعه، در  $k$  امین فرزند خانواده  $i$  ام باشند. طبق روش آنالیز ارتباط ژنتیکی FBAT،

<sup>۲</sup> Genetic Association Analysis

<sup>۳</sup> Family Base Association Test

<sup>۴</sup> Marker

<sup>۵</sup> Polymorphic

<sup>۶</sup> Nuclear family

<sup>۷</sup> Score statistic

<sup>۸</sup> Sufficient statistic

<sup>۹</sup> Quadratic form

از ۱۰۲cm در مردان و بیش از ۸۸cm در زنان). ۲- تری‌گلیسرید بیشتر یا مساوی ۱۵۰mg/dl. ۳- HDL-C کمتر از ۴۰mg/dl در مردان و کمتر از ۵۰mg/dl در زنان. ۴- فشار خون بیشتر یا مساوی ۱۳۰/۸۵mmHg. ۵- قند خون ناشتا بیشتر یا مساوی ۱۱۰mg/dl (۱۰). از این رو، جهت شناسایی سندرم متابولیک، می‌توان از بررسی تغییر عواملی مثل افزایش تری‌گلیسرید، فشار خون، قند خون ناشتا، دور کمر و کاهش میزان HDL-C بهره جست (۱۱). از آن‌جا که مطالعات پیشین نشان داده است که ۳۲ درصد از افراد ایرانی مبتلا به این سندرم هستند (۱۲)، بررسی جدی عوامل این بیماری در جمعیت ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. فراوان‌ترین فنوتیپ این بیماری کاهش میزان HDL-C است که برای شناسایی دلیل این کاهش نیاز به شناسایی ژن‌های اثرگذار بر متابولیسم آن است. از این رو در این تحقیق بر آن شدیم که به شناسایی نواحی کروموزومی اثرگذار بر میزان HDL-C با استفاده از روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC و به کارگیری ۱۲ میکروستلایت متعلق به ۴ ناحیه کروموزومی مربوط به کروموزوم‌های ۸، ۱۱، ۱۲ و ۱۶ که در ارتباط با سندرم متابولیک هستند، پرداخته و گامی در جهت یافتن نواحی ژنی مؤثر در سندرم متابولیک در جمعیت ایرانی برداریم.

## روش کار

جامعه مورد بررسی: افراد مورد بررسی در این مطالعه، از خانواده‌هایی که دارای حداقل یک نفر با علائم سندرم متابولیک و حداقل دو نفر با کاهش میزان HDL-C هستند، از میان شرکت‌کنندگان در مطالعه قند و لیپید تهران انتخاب شدند (۱۳). بر اساس فراوانی سندرم متابولیک، اطلاعات ژنوتیپی تعداد ۱۲۵ خانواده هسته‌ای شامل ۵۶۳ نفر در محدوده سنی ۸۷-۱۸ سال برای مطالعه نواحی کروموزومی اثرگذار بر میزان HDL-C با کمک چهار میکروستلایت از کروموزوم ۸، سه میکروستلایت از کروموزوم ۱۱، سه میکروستلایت از کروموزوم ۱۲ و دو میکروستلایت از کروموزوم ۱۶ در اختیار بوده که برای بررسی ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری این میکروستلایت‌های منتخب با میزان HDL-C توسط روش‌های FBAT-MM و FBAT-LC در این مطالعه، از تمام این اطلاعات استفاده گردید. جزئیات مربوط به اندازه‌گیری‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی افراد و همچنین فراوانی الی میکروستلایت‌ها در گزارش‌های پیشین آمده است (۱۴، ۱۵).

چند نشان‌گری را که شامل ترکیب خطی از آماره‌های آزمون تک مارکری است، به صورت:

$$S = W^T \hat{Z} = \sum_k w_k \hat{z}_k$$

در نظر گرفت که  $w_k$  نشان دهنده وزن وابسته به داده‌های موجود برای  $k$  امین نشان‌گر بوده و  $W = (w_1, w_2, \dots, w_M)$  بردار شامل این وزن‌هاست. با در اختیار بودن بردار  $W$ ، آماره  $S$  دارای توزیع تقریبی  $N(0, W^T \Sigma W)$  بوده که  $\Sigma$  نشان‌دهنده ماتریس واریانس-کوواریانس بردار  $\hat{Z}$  می‌باشد. تحت برقراری فرض مقابل  $Z'$ ، بهترین ترکیب خطی  $\hat{Z}$  که مقدار بهینه‌ای را برای آماره  $S$  در آزمون فرض صفر: برای هر  $k$ ،  $H_0: E(z_k) = 0$  فراهم می‌آورد برابر خواهد بود با:  $W' = \Sigma^{-1} Z'$

در اغلب موارد و در عمل، فرض مقابل  $Z'$  یا ناشناخته بوده و یا تعیین نمی‌گردد. از این رو، بردار وزن‌های  $W$  نیز به صورت مجهول باقی خواهد ماند. برای تعیین بردار وزن‌های  $W$ ، برای هر نشان‌گر می‌توان از مدل میانگین شرطی<sup>۱</sup> استفاده نمود. این مدل برای صفت  $T$  و  $k$  امین نشان‌گر به صورت:  $E(T_{ij}) = \alpha + \beta f(X_{ij}^k)$  خواهد بود (۸، ۷).

اگر  $\hat{z}_\beta^k$  معرف برآورد حداقل مربعات استاندارد پارامتر  $\beta$  در این مدل باشد آن‌گاه با فرض  $w = \hat{z}_\beta^k$  در آماره  $S$ ، آماره آزمون FBAT-LC به صورت:

$$Z_{LC} = \frac{\hat{Z}_\beta^T \hat{Z}}{\sqrt{\hat{Z}_\beta^T \Sigma \hat{Z}_\beta}}$$

به دست خواهد آمد. این آماره دارای توزیع تقریبی نرمال استاندارد بوده و فرض صفر به ازای مقادیر بزرگ آن رد خواهد شد. لازم به ذکر است که در صورت مجهول بودن ماتریس  $\Sigma$ ، می‌توان از ماتریس  $V_E$  بهره گرفت (۹). همچنین در صورت رد شدن فرض صفر در هر دو روش FBAT-MM و FBAT-LC، می‌توان از روش FBAT تک نشان‌گر برای تعیین نشان‌گری که منجر به معنی‌داری ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری شده است، استفاده نمود.

سندرم متابولیک فنوتیپی مرکب است که با افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و دیابت نوع دوم همراه خواهد بود. برای تشخیص سندرم متابولیک، طبق معیار ATP III، نیاز به برقراری ۳ شرط از ۵ شرط ذیل خواهد بود: ۱- چاقی تنه‌ای (دور کمر بیش

<sup>۱</sup> Conditional mean model

ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری میکروستلایت‌های کروموزوم ۱۱ با میزان HDL-C، منجر به معنی‌داری آماره‌آزمون روش FBAT-MM شده است.

جدول شماره ۱ - اطلاعات توصیفی مربوط به داده‌ها

| HDL-C<br>(میانگین<br>$\pm$ انحراف<br>معیار) | سن<br>(میانگین<br>$\pm$ انحراف<br>معیار) | زن<br>(تعداد) | مرد<br>(تعداد) |                                  |
|---|--|---------------|----------------|----------------------------------|
| $\pm 11/19$<br>44/32                        | $36/34 \pm 19/04$                        | 294           | 269            | کل افراد                         |
| $\pm 11/12$<br>46/41                        | $30/95 \pm 16/83$                        | 213           | 211            | افراد سالم                       |
| $\pm 8/29$<br>38/02                         | $54/12 \pm 14/38$                        | 78            | 52             | افراد مبتلا به سندرم<br>متابولیک |

جدول شماره ۲ - نتایج بررسی ارتباط ژنتیکی هم‌زمان میکروستلایت‌ها با

میزان HDL-C، با استفاده از روش FBAT-LC و FBAT-MM

| p-value کلی |         | کروموزوم                  |
|-------------|---------|---------------------------|
| FBAT-LC     | FBAT-MM |                           |
| 0/370       | 0/203   | 4 میکروستلایت کروموزوم ۸  |
| 0/997       | *0/042  | 3 میکروستلایت کروموزوم ۱۱ |
| 0/514       | 0/940   | 3 میکروستلایت کروموزوم ۱۲ |
| 0/857       | 0/520   | 2 میکروستلایت کروموزوم ۱۶ |

\* معنی داری در سطح 0/05

جدول شماره ۳ - نتایج بررسی ارتباط ژنتیکی میکروستلایت‌های کروموزوم

۱۱ با میزان HDL-C، با استفاده از روش FBAT

| میکروستلایت | FBAT   |
|-------------|--------|
| D11S1998    | 0/762  |
| D11S934     | 0/401  |
| D11S1304    | *0/005 |

\* معنی داری در سطح 0/05

## بحث

این مقاله به بررسی ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری بین چهار میکروستلایت کروموزوم ۸، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۱، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۲ و دو میکروستلایت کروموزوم ۱۶

میکروستلایت‌های منتخب برای کروموزوم ۸ شامل D8S1132، D8S1743 و D8S514، D8S1779 برای کروموزوم ۱۱ شامل D11S1304، D11S1998 و D11S934، برای کروموزوم ۱۲ شامل D12S1632، D12S329 و D12S96، و برای کروموزوم ۱۶ شامل D16S3096 و D16S2624 هستند.

## روش‌های آماری

در این تحقیق به بررسی ارتباط ژنتیکی هم‌زمان چهار میکروستلایت کروموزوم ۸، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۱، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۲ و دو میکروستلایت کروموزوم ۱۶ با میزان HDL-C با استفاده از روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC پرداخته شد. از نرم افزار Excel و ویرایش ۲۰۰۷ در آماده سازی داده‌ها و از نرم افزار FBAT و ویرایش ۲۰۰۲ (۴) برای بررسی ارتباط ژنتیکی هم‌زمان میکروستلایت‌ها با میزان HDL-C در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شده است.

## ملاحظات اخلاقی

داده‌های مورد استفاده در این پژوهش از مطالعه قند و لیپید تهران گرفته شده است. این طرح دارای مجوز اخلاقی از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد و از شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه کتبی گرفته شده است.

## یافته‌ها

تعداد ۱۲۵ خانواده‌ی هسته‌ای شامل ۵۶۳ نفر (۱۳۰ نفر مبتلا به سندرم متابولیک و ۴۲۴ نفر سالم و ۹ نفر نامعلوم) دارای اطلاعات لازم جهت بررسی‌های مد نظر بودند. میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد مربوط به صفت HDL-C، سن و تعداد زنان، مردان و افراد مبتلا به سندرم متابولیک در این ۵۶۳ نفر در جدول ۱ درج شده است.

در بررسی ارتباط ژنتیکی هم‌زمان چهار میکروستلایت کروموزوم ۸، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۱، سه میکروستلایت کروموزوم ۱۲ و دو میکروستلایت کروموزوم ۱۶ با میزان HDL-C و با استفاده از روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC، تنها ارتباط ژنتیکی هم‌زمان سه میکروستلایت کروموزوم ۱۱ با میزان HDL-C با کمک روش FBAT-MM در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول شماره ۲). با به کارگیری روش FBAT تک نشان‌گری برای سه میکروستلایت این کروموزوم دیده می‌شود که میکروستلایت D11S1304 دارای ارتباط ژنتیکی معنی‌دار در سطح ۵ درصد با میزان HDL-C است. (جدول شماره ۳).

از این رو می‌توان گفت که میکروستلایت مذکور، در بررسی

است که با به کارگیری  $\hat{\beta}_k^k$  به عنوان برآورد حداقل مربعات استاندارد پارامتر  $\beta$  در مدل میانگین شرطی  $E(T_{ij}) = \alpha + \beta f(X_{ij}^k)$  و استفاده از آن‌ها در بردار وزنی  $W$ ، دارای دو مزیت است. نخست آن که، از اطلاعاتی که برای محاسبه آماره آزمون  $\hat{Z}_k$  استفاده می‌شود، در محاسبه  $\hat{\beta}_k^k$  بهره گرفته نمی‌شود. از این رو می‌توان گفت که تحت برقراری فرض صفر،  $\hat{Z}_k$  و  $\hat{\beta}_k^k$  مستقل از هم خواهند بود. دوم آن که تحت برقراری فرض مقابل،  $\hat{Z}_k$  و  $\hat{\beta}_k^k$  همبستگی مثبتی با هم داشته، می‌توان از  $\hat{\beta}_k^k$  به عنوان جانشینی برای  $Z'_k$  استفاده نمود. از این رو روش FBAT-LC قادر است که انواع متنوعی از فرض‌های مقابل را در روش آنالیزی خود بگنجانند (۹).

با توجه به نتایج این مطالعه، در بررسی ارتباط ژنتیکی چند نشان‌گری میکروستلایت‌های منتخب با میزان HDL-C، تنها ارتباط ژنتیکی میکروستلایت D11S1304 با این صفت و با کمک روش FBAT-MM معنی‌دار شد. این در حالی است که با استفاده از روش FBAT-LC، هیچ یک از میکروستلایت‌ها ارتباط ژنتیکی معنی‌داری را با میزان HDL-C نشان ندادند.

در مطالعه‌ای که توسط دانگ یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۹۰۷ نفر (از ۳۳۰ خانواده) از مطالعه قلب فرامینگهام برای یافتن نقشه ژنی HDL-C صورت گرفت، با استفاده از روش Genome Wide Linkage، بخشی از کروموزوم ۶ (فاصله ۱۲۵ تا ۱۵۰ سانتی‌مورگان روی این کروموزوم یا ۶q۲۴.۳-۶q۲۲.۳) با بالاترین نمره LOD، پیوستگی ژنتیکی معنی‌داری را با صفت HDL-C و یکی از زیر مشتقات آن (HDL3-C) نشان داد. برای تعیین دقیق‌تر مکان ژنتیکی HDL-C، با استفاده از روش FBAT و با به کارگیری بیست و هشت SNP مربوط به نه ژن منتخب در ناحیه کروموزومی ۶q۲۴.۳-۶q۲۲.۳ به نام‌های NCOA7، CTGF، VNN1، VNN2، VNN3، AIG-1، PLAGL1، LOC285746 و FLJ14753، ارتباط ژنتیکی تنها یکی از چهار SNP مورد مطالعه (rs2257104) مربوط به ژن PLAGL1، با میزان HDL-C معنی‌دار شد (۱۶). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۵ توسط هارتاس و همکاران بر روی ۳۱۴ نفر از ۲۴ خانواده مکزیک و در جهت بررسی ارتباط ژنتیکی سیزده SNP مربوط به ژن‌های USF1، F11R و LOC257106 مستقر در بخش ۱q۲۱ از کروموزوم ۱ و میزان HDL-C صورت گرفت، با استفاده از روش FBAT، ارتباط ژنتیکی SNP با کد rs3737787 مربوط به ژن USF1 با میزان

میزان HDL-C در راستای تعیین نواحی کروموزومی اثرگذار بر این صفت با کمک روش‌های FBAT-MM و FBAT-LC در جمعیت ایرانی پرداخت.

با پیشرفت و تکمیل پروژه ژنوم انسانی، نشان‌گرهای چند ریخت زیادی در فاصله فیزیکی کوتاهی نسبت به هم در ژنوم انسانی شناخته شده‌اند. تحقیقات نشان داده است، بررسی چندین نشان‌گر نزدیک به هم در مقایسه با مطالعه تک نشان‌گری، اطلاعات بیشتری را برای تعیین هر چه دقیق‌تر مکان بیماری با استفاده از آنالیز ارتباط ژنتیکی در اختیار محقق قرار می‌دهد (۳). پیش از ابداع روش‌های FBAT-MM و FBAT-LC، در راستای آزمون ارتباط ژنتیکی هم‌زمان چند نشان‌گری، یا از تصحیح بن‌فرونی<sup>۱</sup> برای تعدیل مقایسه‌های چندگانه بین نشان‌گرها و تهیه سطح معنی‌داری کلی برای آزمون ارتباط ژنتیکی استفاده می‌شد که محافظه‌کاری<sup>۲</sup> مربوط به آن بسیار بالا بود. و یا روش‌هایی مورد استفاده قرار می‌گرفت که با افزایش تعداد نشان‌گرهای مورد مطالعه، درجه آزادی آماره آزمون بررسی ارتباط ژنتیکی افزایش داشته، توان آماره آزمون کاهش می‌یافت. ابداع روش‌های چند نشان‌گری FBAT-MM و FBAT-LC، توانست تا حدودی بر مشکلات مذکور غلبه کند. در روش FBAT-MM، آماره آزمون با در نظر گرفتن آماره امتیاز تک نشان‌گری FBAT و همبستگی‌های موجود بین ژنوتیپ نشان‌گرهای افراد مورد مطالعه به دست می‌آید. مکان ساختاری هاپلوتیپ‌ها در تعریف آماره آزمون این روش دخیل نبوده و سادگی محاسبات و بالا بودن دامنه کاربرد از مزایای این روش است (۶). در روش FBAT-LC نیز از ترکیب خطی آماره‌های آزمون تک نشان‌گری FBAT و وزن‌هایی که با توجه به داده‌های ژنوتیپی در دست، برای این ترکیب خطی تعیین می‌گردند، در جهت تعریف آماره آزمون بررسی ارتباط ژنتیکی هم‌زمان چند نشان‌گری بهره گرفته می‌شود. باید به این نکته توجه داشت که اگر در محاسبه بردار وزنی  $W$  روش FBAT-LC از بردار  $Z$  به جای  $Z'$  استفاده گردد، آماره آزمون  $S$  با آماره FBAT-MM معادل خواهد بود. هرچند در این حالت و تحت برقراری فرض صفر، بردارهای  $W$  و  $Z$  مستقل از هم نخواهند بود. این امر منجر می‌گردد که روش FBAT-MM دارای توان پایینی در برابر فرض‌های مقابل خاص و تعریف شده داشته باشد. این در حالی

<sup>۱</sup> Bonferroni correction

<sup>۲</sup> Conservatism

کارگیری اطلاعات ۶۴۷۶ نفر از مطالعه قلب فرامینگهام و بررسی ارتباط ژنتیکی بین SNP های rs10820738 از کروموزوم ۹، rs3200218 از کروموزوم ۸، rs8035006 از کروموزوم ۱۵، rs192719 و rs8103434 از کروموزوم ۱۹ و میزان صفت HDL-C با استفاده از روش FBAT، به نواحی کروموزومی ۱۰۱q۹ از کروموزوم ۹، ۸p۲۲ از کروموزوم ۸، ۱۵q۲۱ از کروموزوم ۱۵ و ۱۹q۱۳/۲ از کروموزوم ۱۹ رسیدند (۲۲). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۹ توسط فی توستا و همکاران با توجه به نتایج پیوستگی ژنتیکی بین ناحیه کروموزومی ۱۵q۲۱ و میزان HDL-C و حضور ژن LIPC در این ناحیه کروموزومی و در جهت تعیین دقیق تر مکان ژنتیکی اثرگذار بر میزان HDL-C انجام شد، اطلاعات ژنوتیپی نوزده SNP مربوط به ژن LIPC در ۲۲۳۸ نفر از ۵۹۱ خانواده سفید پوست شرکت کننده در مطالعه قلب فرامینگهام با استفاده از روش FBAT مورد آنالیز ارتباط ژنتیکی قرار گرفتند. بعد از تعدیل HDL-C توسط مقادیر سن و جنس، ارتباط ژنتیکی SNPهایی با کدهای rs261342 و rs261338 با میزان HDL-C معنی دار شد (۲۳).

### نتیجه گیری

همان طور که مشاهده می شود مطالعات اندکی در زمینه بررسی ارتباط ژنتیکی میکروستلایتها با سندرم متابولیک و فاکتورهای آن انجام شده، به گونه ای که مطالعه ای در زمینه بررسی ارتباط ژنتیکی همزمان چند نشانگر با میزان HDL-C توسط روش های FBAT-MM و FBAT-LC یافت نشد. از این رو نتایج مطالعه حاضر در مورد نواحی کروموزومی اثرگذار بر میزان HDL-C، می تواند در راستای تکامل مطالعات مذکور مورد استفاده قرار گیرد. امید است که با در اختیار بودن این اطلاعات در مورد میکروستلایتها و نواحی کروموزومی مربوط به آنها، راه کارهای مناسبی برای طراحی مطالعات بعدی به منظور یافتن ژن های مستعد کننده سندرم متابولیک فراهم آید.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر در اختیار قرار دادن داده های مربوط به مطالعه قند و لیپید تهران، و جناب آقای دکتر Cyril Rakovski به پاس راهنمایی های گران قدر ایشان، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می آوریم. این تحقیق بر گرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته آمار زیستی است.

HDL-C معنی دار شد (۱۷). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط کاتایرسن و همکاران روی داده های Genome Wide Scan حاصل از ۱۰۸۷ نفر از مطالعه قلب فرامینگهام و در بررسی ارتباط ژنتیکی میزان HDL-C با استفاده از روش FBAT انجام گرفت، برخی از SNP های مربوط به ژن های CHI3L2، FVT1 و SCFD2 واقع در کروموزوم های ۱، ۲، ۴ و ۱۸ با میزان HDL-C ارتباط ژنتیکی معنی داری را نشان دادند (۱۸). در سال ۲۰۰۸، لداک و همکاران با در اختیار بودن اطلاعات ژنوتیپی سی و شش SNP مستقر در کروموزوم ۱۷ برای ۱۶۹۶ نفر از ۵۸۳ خانواده با نژاد آفریقایی-آمریکایی، ۱۶۴۳ نفر از ۴۱۵ خانواده با نژاد مکزیکایی-آمریکایی و ۱۴۰۹ نفر از ۴۹۸ خانواده با نژاد اروپایی-آمریکایی که این SNP ها در ارتباط با ژن APOH هستند، به بررسی ارتباط ژنتیکی میزان HDL-C با این SNP ها با استفاده از روش FBAT پرداختند. در نژاد آفریقایی-آمریکایی، تنها یک SNP با کد rs1544556 با میزان HDL-C ارتباط ژنتیکی معنی داری را نشان داد. این در حالی است که ارتباط ژنتیکی هیچ یک از سی و شش SNP با میزان HDL-C در هیچ یک از دو نژاد مکزیکایی-آمریکایی و اروپایی-آمریکایی معنی دار نشد (۱۹). در مطالعه دو مرحله ای که در سال ۲۰۰۸ توسط لی و همکاران با توجه به نتایج حاصل از روش پیوستگی ژنتیکی در بررسی پیوستگی بخشی از کروموزوم ۱۶ (۱۶q۲۳-۹۲۴) با میزان HDL-C و با هدف تعیین دقیق تر مکان ژنتیکی موثر بر میزان HDL-C روی کروموزوم مذکور انجام گرفت، در مرحله اول، با استفاده از روش FBAT، ارتباط ژنتیکی بیست و پنج SNP مربوط به ژن های CNTNAP4، ATBF1، ADAMTS18، WWOX، MAF و CDH13 معنی دار شد. با توجه به نتایج مرحله اول و با اضافه کردن اطلاعات ژنوتیپی ۱۴۴ نفر از ۲۴ خانواده هلندی و ۴۶۷ نفر از ۲۸ خانواده فرانسوی به اطلاعات ژنوتیپی مرحله اول، ارتباط ژنتیکی SNP با کد rs2548861 مربوط به ژن WWOX با میزان HDL-C بالاترین سطح معنی داری را نشان داد (۲۰). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ توسط لو و همکاران روی اطلاعات Genome Wide Scan مربوط به ۲۹۰۶ نفر از ساکنان ایسلند و در بررسی ارتباط ژنتیکی بین SNP های متعلق به نواحی مختلف کروموزومها و ۱۵ فنوتیپ انجام شد، با استفاده از روش FBAT، قسمتی از کروموزومهای ۵ و ۶ با میزان HDL-C ارتباط ژنتیکی معنی داری را نشان دادند. لازم به ذکر است، دو SNP با کد rs4783962 و rs1800775 که با میزان HDL-C ارتباط ژنتیکی معنی داری را نشان دادند، نزدیک به ژن CEPT هستند (۲۱) در سال ۲۰۰۹، ژو و همکاران با به

## منابع

1. Leon G, Epidemiology. Second Edition Philadelphia: W.B Saunder Company; 2000.
2. Harrap SB, Where are all the blood-pressure genes? *Lancet*. 2003; 21; 361: 2149-51.
3. Zhao H, Zhang S, Merikangas KR, Trixler M, Wildenauer DB, Sun F, Kidd KK. Transmission/Disequilibrium tests using multiple tightly linked markers. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 936-46.
4. Rabinowitz D, Laird NM. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered*. 2000; 50:211-223.
5. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epi*. 2000; 19(suppl 1): S36-S42.
6. Rakovski C, Xu X, Lazaras R, Laird N. A new multimarker test for family-based association studies. *Genet Epidemiol*. 2007; 31: 9-17.
7. Lange C, Laird NM. Power calculations of a general class of family-based association tests: dichotomous traits. *Am J Hum Genet*. 2002a; 71: 575-84.
8. Lange C, DeMeo DL, Laird NM. Power and design considerations for a general class of family-based association tests: quantitative traits. *Am J Hum Genet*. 2002b; 71: 1330-41.
9. Xu X, Rakovski C, Laird NM. An efficient family-based association test using multiple markers. *Genet Epidemiol*. 2006; 30: 620-6.
10. NCEP. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001; 16; 285: 2486-97.
11. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet*. 2005; 365: 1415-28.
12. Azizi F, Salehi P, Etemadi A, Zahedi-Asl S. Prevalence of metabolic syndrome in an urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003; 61:29-37.
13. Azizi F, Rahmani M, Emami H, Madjid M. Tehran Lipid and glucose study: Rationale and design. *CVD prevention*. 2000; 3: 242-7.
14. Daneshpour MS, Alfadhli S, Houshmand M, Zeinali S, Hedayati M, Zarkesh M, et al. Allele frequency distribution data for D8S1132, D8S1779, D8S514, and D8S1743 in four ethnic groups in relation to metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study. *Biochem Genet*. 2009; 47: 680-7.
15. Daneshpour MS. The association of the low HDL-C level with 8(q22.1-q24.3), 11(q23.3-q25), 12(q13.12-q15), 16(q23.3-q24.3) Chromosomal region in metabolic syndrome family. [dissertation]. Tehran. National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology; 2009.
16. Yang Q, Lai CQ, Parnell L, Cupples A, Adiconis X, Zhu Y. Genome-wide linkage analyses and candidate gene fine mapping for HDL3 cholesterol: the Framingham Study. *J. Lipid Res*. 2005; 46: 1416-25.
17. Huertas A, Aguilar C, Lulis A, Cantor R, Canizales S, Lee J, et al. Familial Combined Hyperlipidemia in Mexicans: Association With Upstream Transcription Factor 1 and Linkage on Chromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1985-91.
18. Kathiresan S, Manning A, Demissie S, Agostino RB, Surti A, Guiducci C, et al. A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Medical Genetics*. 2007; 8: S17.
19. Leduc MS, Shimmin LC, Klos KLE, Hanis C, Boerwinkle E, Hixson JE. Comprehensive evaluation of apolipoprotein H gene (APOH) variation identifies novel associations with measures of lipid metabolism in GENOA. *J. Lipid Res*. 2008; 49: 2648-56.
20. Lee JC, Volkov DW, Kyttala M, Dastani Z, Cantor RM, Sobel EM, et al. WW-Domain-Containing Oxidoreductase Is Associated with Low Plasma HDL-C Levels. *American Journal of Human Genetics*. 2008; 83: 180-92.
21. Lowe JK, Maller JB, Pe'er I, Neale BM, Salit J, Kenny EE, et al. Genome-Wide Association Studies in an Isolated Founder Population from the Pacific Island of Kosrae. *PLoS Genet*. 2009; 5: e1000365.
22. Xu H, Mathew G, George V. Family-based genome-wide association study for simulated data of Framingham Heart Study. *BMC Proceedings*. 2009; 3: S124.
23. Feitosa MF, Myers RH, Pankow JS, Province MA, Borecki IB. LIPC variants in the promoter and intron 1 modify HDL-C levels in a sex-specific fashion. *Atherosclerosis*. 2009; 204: 171-7.