Increased miR132 Gene Expression Associated with Prenatal Lithium Exposure in Rat Offspring

Taghvaei Moein [1], Askari Zeynab [2], haidari Alishir [3], Samareh Moosavi Saeedeh [4], Beheshti Farimah [5,6], Saleh Seyed Mohsen [7], Askarian Saeedeh [8]

1. MSc student, Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0009-0007-1418-5463
2. MSc student, Department of Biology, School of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran. ORCID ID: 0009-0001-6831-3383
3. MSc student, Department of Medical Biotechnology, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran. ORCID ID: 0009-0005-2649-7486
4. Assistant Professor, Department of Biology, Kavian Institute of Higher Education, Mashhad, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4576-9863
5. Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1524-2339
6. Assistant Professor, Departments of Physiology, School of Medicine, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran. . ORCID ID: 0000-0003-1524-2339
7. Assistant Professor, Department of Mathematics and Statistics, University of Neyshabur, Neyshabur, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8818-1309
8. Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran. (Corresponding Author), Tel: 051-38002291, Email: askarians1@thums.ac.ir. ORCID ID: 0000-0001-7092-5947

ABSTRACT

Background and Aim: The use of lithium, a mood-stabilizing drug, is a common treatment for bipolar disorder. Discontinuing lithium during pregnancy can be dangerous, as it may cause manic or severe depression in the mother. Despite the positive effects of lithium, it is important to study the molecular effects of this drug on infants. This study aims to investigate the expression of the miR-132 gene in the neonates of rats whose mothers were exposed to lithium during pregnancy.

Materials and Methods: In this study, experimental female mice received lithium carbonate at a concentration of 30mg/kg in their drinking water daily during pregnancy. The newborns were then divided into two control and experimental groups. When the neonates reached 60 days of age, their hippocampus and blood serum were isolated for molecular analysis. Total RNA was extracted from the blood and serum, followed by cDNA synthesis. The expression of miR-132 was evaluated using qRT-PCR and compared with the control group using the Pfaffl method.

Results: The expression of miR-132 in the hippocampal tissue and serum samples of infants whose mothers received lithium during pregnancy showed a significant decrease compared to the control group. The down-regulation of miR-132 expression was observed to be more pronounced in serum samples compared to hippocampal tissue samples.

Conclusion: The decreased expression of miR-132 in the hippocampus and blood serum of newborn rats exposed to lithium during pregnancy indicates the influence of lithium on gene expression. This miRNA showed potential as a valuable indicator for detecting the effects of drug exposure on offspring. However, identifying specific miRNA markers for bipolar disorder is a challenging quest, and further studies are required.

Keywords: Bipolar Disorder, Pregnancy, Lithium, microRNA, Gene Expression.

Received: Jan 1, 2024 **Accepted:** Sep 14, 2024

How to cite the article: Taghvaei Moein, Askari Zeynab, haidari Alishir, Samareh Moosavi Saeedeh , Beheshti Farimah, Saleh Seyed Mohsen, Askarian Saeedeh. Increased miR132 Gene Expression Associated with Prenatal Lithium Exposure in Rat Offspring.SJKU 2025;30(2):15-28

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره سی /خرداد وتیر ۱۴۰۴/۲۸-۱۵

افزایش بیان ژن miR132 در نوزادان موش صحرایی تحت‌تأثیر لیتیوم در دوران بارداری

معین تقوایی[۱]، زینب عسکری[۲]، علی شیر حیدری[۳]، سعیده ثمره موسوی[۴]، فریماه بهشتی[۵،۶]، سید محسن صالح[۷]، سعیده عسکریان[۸]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی کاویان، مشهد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۹-۰۰۰۷-۱۴۱۸-۵۴۶۳

۲. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۹-۰۰۰۱-۶۸۳۱-۳۳۸۳

۳. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه، تربت‌حیدریه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۹-۰۰۰۵-۲۶۴۹-۷۴۸۶

۴. استادیار، گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی کاویان، مشهد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۵۷۶-۹۸۶۳

۵. استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه، تربت‌حیدریه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۱۵۲۴-۲۳۳۹

۶. استادیار، گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه، تربت‌حیدریه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۱۵۲۴-۲۳۳۹

۷. استادیار، گروه ریاضیات و آمار، دانشگاه نیشابور، نیشابور، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۸۱۸-۱۳۰۹

۸. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: askarians1@thums.ac.ir تلفن ثابت: ۳۸۰۰۲۲۹۱-۰۵۱، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۰۹۲-۵۹۴۷

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از لیتیوم که یک داروی تثبیت‌کننده خلق‌وخو است در بیماری اختلال دوقطبی (Bipolar disorder) یکی از درمان‌های رایج است. قطع مصرف لیتیوم در دوران بارداری می‌تواند خطرناک باشد؛ زیرا ممکن است باعث بروز دوره‌های شیدایی یا افسردگی شدید در مادر شود. با وجود اثرات مثبت لیتیوم، اما اثرات مولکولی استفاده از این دارو در نوزادان در حال مطالعه و دارای اهمیت است. هدف این مطالعه بررسی بیان ژن miR-132، در نوزادان موش‌هایی است که مادران در دوران بارداری در مجاورت لیتیوم قرار گرفته اند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موش‌های ماده درگروه تجربی، داروی لیتیوم با غلظت ۳۰mg/kg در آب آشامیدنی روزانه دریافت کردند. نوزادان متولد شده، در دو گروه کنترل و تجربی تا سن ۶۰ روزگی نگه داری شدند و هیپوکمپ و سرم خون آن‌ها جهت بررسی مولکولی جداسازی گردید. استخراج RNA کامل از خون و سرم و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. با استفاده ازqRT- PCR بیان miR132 با روش Pfaffl ارزیابی و با گروه کنترل مقایسه شد.

یافته‌ها: بیان miR132 در نمونه بافت هیپوکامپ و سرم نوزادانی که مادران در دوره بارداری لیتیوم دریافت کرده نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد. کاهش بیان miR132 در نمونه‌های سرم بیشتر از نمونه‌های بافتی هیپو کمپ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: کاهش بیان miR-132 در هیپو کمپ و سرم خون موش‌ها، نشان‌دهنده اثرات لیتیوم بر بیان ژن‌ها در نوزادان موش‌ها است و این miRNA می‌تواند کاندید خوبی برای تشخیص اثرات استفاده از دارو در فرزندان باشد. بااین‌حال معرفی یک یا چند نشانگر miRNA اختصاصی اختلال دوقطبی کاری بسی دشوار است و نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری است.

کلمات کلیدی: اختلال دوقطبی، بارداری، لیتیوم، میکرو RNA، بیان ژن.

وصول مقاله:۱۴۰۲/۱۱/۱۱ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۳/۶/۱۷ پذیرش:۱۴۰۳/۶/۲۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

مقدمه

اختلالات دوقطبی (BDs) اختلالات خلقی مکرر و گاه مزمن بوده که حدود ۲ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و طیفی شامل حالت خلقی شدید و تحریک پذیری بالا (شیدایی یا Mania)، نیمه شیدایی (Hypomania)، افسردگی (Depression) را در بر می گیرد(۱). علت دقیق اختلال دوقطبی هنوز به طور کامل مشخص نیست؛ اما اعتقاد بر این است که ترکیبی از عوامل ژنتیکی و محیطی در بروز بیماری نقش دارند. ژن‌ها می‌توانند خطر ابتلا به اختلال دوقطبی را افزایش دهند، ژن‌هایی مانند , HTT۵،ANK3, AKAP11- و پلی مورفیسم در ژن DAOA منجمله ژن هایی اند که با اسکیزوفرنی و اختلال دوقطبی مرتبط هستند (۲).

عوامل محیطی مانند قرارگرفتن در معرض استرس یا سوءمصرف مواد نیز می‌توانند خطر ابتلا به اختلال دوقطبی را افزایش دهند، اختلال دوقطبی بر نحوه فکر، احساس و رفتار فرد تأثیر می‌گذارد و می‌تواند تأثیر قابل‌توجهی بر زندگی روزانه داشته باشد. احتمال می‌رود مشکل فیزیکی در قسمتی از مغز که کنترل حالات روانی را به عهده دارد عامل این اختلالات باشد. به این دلیل است که برخی نوسانات خلقی با دارو قابل‌کنترل هستند، تثبیت‌کننده‌ای خلقی مثل لیتیوم و برخی از داروهای ضدتشنج مانند والپروات و کاربامازپین و به‌ویژه لیتیوم که اولین مداخله بالینی برای درمان طولانی‌مدت این بیماری است و از عود حالات افسردگی و شیدایی جلوگیری می‌کند (۳).

باوجودآنکه لیتیوم خط مقدم درمان بیماری دوقطبی برای شصت سال یا بیشتر محسوب می‌شود؛ اما پاسخ بیماران دریافت‌کننده نسبت به آن متفاوت است. مکانیسم عملکرد خاص لیتیوم در تنظیم خلق‌وخو به‌تدریج در حال روشن‌شدن است که شامل مهار مستقیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳(GSK3) glycogen synthase kinase-3 و اثرات مختلف آن بر عوامل نوروتروفیک، انتقال‌دهنده‌های عصبی، متابولیسم اکسیداتیو، آپوپتوز، سیستم‌های پیام‌رسان و حتی تعدیل‌کننده سیستم ایمنی است (۴, ۵).

با وجود استفاده درمانی جهانی و مزایای لیتیوم، عوارض جانبی در استفاده از آن نیزگزارش شده است به عنوان مثال مطالعه ای نشان داد یک سوم از بیماران مبتلا به BD که تحت درمان با لیتیوم، به مدت طولانی قرار می‌گیرند دچار اختلال تیروئید شدند که ۷۹٪ از آن کم کاری تیروئید بود؛ البته با جایگزینی هورمون تیروئید اصلاح شد(۶). برخی مطالعات حتی عوارض جانبی سمی حاد و مزمن برای لیتیوم گزارش نموده‌اند که به صورت اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی ظاهر می شود و با تظاهرات سمی مزمن بر سیستم های قلبی، کلیوی و غدد درون ریز اثر می گذارد(۷)؛ البته تمامی عوارض با دوز دارو، مدت زمان استفاده، جنس و نژاد بیماران نیز مرتبط است. با این حال تجویز و استفاده از لیتیوم در دوران بارداری گاها با احتیاط باید بشد؛ زیرا با توجه به وزن مولکولی و اندازه پایین لیتیوم قسمت اعظم آن از جفت رد می شود و انتظار می رود علاوه بر تأثیرات لیتیوم بر مادران باردار از نظر سطح عملکرد تیروئید، باروری و عملکرد تخمدان، نوزادان متولد شده از مادران باردار نیز تحت تأثیر لیتیوم قرار بگیرند (۸).

MicroRNA ها (miRNAs) گروهی از مولکول‌های RNA کوتاه، غیر کدکننده هستند که به عنوان تنظیم کننده های پس از رونویسی بیان ژن عمل می‌کنند و دارای نقش کلیدی در بسیاری از فرایندهای مهم بیولوژیکی ازجمله تکوین، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز هستند و حتی در بیماری‌زایی مثل سرطان‌ها و اختلالات مختلف از جمله آلزایمر، هانتینگتون، سکته مغزی و ... نیز نقش دارند (۹). در نتیجه، miRNA ها با توجه به پایداری و ثباتشان در سرم، پلاسما، بزاق و ادرار می توانند به عنوان نشانگرهای زیستی برای اختلالات عصبی مختلف عمل کنند. در سال‌های اخیر،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

پیشرفت‌ها در زمینه miRNA منجر به شناسایی چشم‌اندازهای بالقوه جدیدی در درمان برای اختلالات صعب‌العلاج سیستم عصبی مرکزی شده است (۱۰, ۱۱). از این رو، شناخت مکانیسم بیان miRNA ها در بیماری‌های مختلف علاوه بر اینکه در شناخت مسیرهای مولکولی مؤثر است می‌تواند نقش تشخیصی و یا در برخی موارد از طریق تنظیم بیان آن‌ها، نقش درمانی هم داشته باشد (۱۲).

بیان miR132 نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های عصبی مختلف دارد. اختلال در تنظیم آن با بروز و تشدید بیماری‌های شناختی و دژنراتیو عصبی، از جمله بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، صرع و اختلالات روانپزشکی مانند افسردگی و اسکیزوفرنی مرتبط است (۱۳, ۱۴). در حالی که در بیماران آلزایمری، کاهش بیان miR-132 در نواحی مختلف مغز، از جمله قشر تمپورال و قشر پیشانی مشاهده شده است(۱۵)؛ اما مطالعه‌ای به بررسی بیان و نقش miR-132 در بیماری اختلال دو قطبی نپرداخته است گرچه با وجود شواهد در سایر بیماری های عصبی ممکن است در پاتوفیزیولوژی BD نیز دخیل باشد.

هدف این مطالعه ارتباط بین بیان ژن miR-132، پس از معرض قرارگرفتن با لیتیوم در دوران بارداری (بر روی نوزادان)، است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی حیوانات

پژوهش حاضر نوعی مطالعه تحلیلی مداخله‌ای (تجربی) است، این مطالعه با تعداد ۸ سر موش‌های ماده با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۲۰ گرم شروع شد. بعد از باروری، موش‌های ماده به دو گروه تقسیم شدند که شامل یک گروه کنترل و یک گروه تجربی دریافت‌کننده لیتیوم کربنات با غلظت ۳۰ میلی‌گرم / کیلوگرم در روز است (۸)، مقدار داروی مورد نظر محاسبه شده و در آب آشامیدنی حل گردید (علت اینکه از گاواژ استفاده نشد این است که گاواژ سبب ایجاد استرس در دوران بارداری می‌شود و مادران جنین خود را از دست خواهند داد و یا نوزادان را بعد از تولد به دلیل استرس وارد شده حذف می‌کند). پس از پایان دوره شیردهی، بچه موش‌های متولد شده تا سن ۶۰ روزگی بدون هیچ مداخله‌ای نگه‌داری شدند سپس در هر گروه ۱۰ سر موش نر به صورت تصادفی انتخاب گردید.

نمونه‌گیری بافت و سرم

موش‌های موردمطالعه توسط گاز دی‌اکسیدکربن طبق پرتکل‌های اخلاقی تأیید شده، کشته شدند. سپس بافت هیپو کمپ نمونه‌برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های حاوی محلول پایدارکننده RNA (کالا زیست، ایران با شماره کاتالوگ: DB9708) غوطه‌ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌های خونی نیز در لوله‌های درب‌دار حاوی EDTA جمع‌آوری‌شده و در میکروتیوب‌های RNase/DNase free نگه‌داری شدند. جهت تهیه پلاسما، نمونه‌های خونی در دمای $4\ ^0C$ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف رویی (پلاسما) در میکروتیوب RNase/DNase free دیگری قرار گرفت، نمونه‌های سرم و بافت تا زمان استخراج، جهت حفظ RNA در دمای $-70\ ^0C$ نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای طراحی پرایمر، توالی miR-132 در انسان، موش و رت بررسی گردید. توالی miRNAها از سایت miRBase به آدرس https://mirbase.org/ شناسایی شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Clustal Omega با یکدیگر هم ردیف گردید و پرایمر برای ناحیه مشترک طراحی شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

شکل ۱. مقایسه توالی miR-132 به‌منظور طراحی پرایمر. توالی‌های miR-132 با استفاده از الگوریتم Clustal Omega هم ردیف شدند. توالی کادر زردرنگ مربوط به ناحیه پرایمر miR132 است.

از مقادیر ۲۰۰ میکرولیتر سرم و بافت‌هایی با اندازه حدود ۲-۳ میلی‌مترمربع برای استخراج RNA توسط کیت RNX plus (شرکت سیناژن، ایران. شماره کاتالوگ RN7713C) طبق دستورالعمل سازنده استفاده گردید. غلظت RNAی تلخیص شده، با دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) بررسی گردید، همچنین جهت اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، نمونه‌های RNA ای با استفاده از ژل الکتروفورز ۱ درصد نیز بررسی شدند و نمونه‌هایی که قطعات S ۲۸ و S ۱۸ را روی ژل نشان دادند برای ادامه آزمایش انتخاب شدند. RNA کامل تا زمان استفاده، در دمای ^{0}C ۷۰- نگهداری شد. جهت سنتز cDNA از کیت بن یاخته (BON-miR miRNA 1strand cDNA Synthesis Kit, Catalog#BN-001013-PO) استفاده شد. در این کیت ابتدا دم پلی A به کمک آنزیم پلی A پلیمراز به انتهای '۳ همه miRNAهای در گردش اضافه شد، سپس به کمک یک پرایمر عمومی و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس، سنتز cDNA از miRNAها صورت گرفت (۱۶).

رسم منحنی استاندارد:

برای محاسبه کارایی واکنش پرایمرها (جدول ۱)، منحنی استاندارد رسم گردید. به این منظور ابتدا مخلوطی از نمونه‌های cDNA از غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌صورت ۱۰ برابری تا چندین رقت (1,0.1,0.01,0.001,0.0001,0.000001) رقیق گردید. لگاریتم بر پایه ۱۰ کدام از رقتها در رسم نمودار منحنی استاندارد، استفاده شد. لگاریتم رقتها در محور X ها و Ct ها در محور عمودی قرار دارند، با استفاده از شیب خط کارایی واکنش با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Efficiency of the Reaction} = 10^{-\left(\frac{1}{slope}\right)} - 1$$

(فرمول شماره ۱)

بررسی بیان ژن miRNA:

در نهایت واکنش qRT-PCR برای miRNA، با استفاده از کیت BON-miR QPCR (بن یاخته، تهران، ایران با شماره کاتالوگ: BON209002)، با پرایمر ریورس عمومی (ارایه شده در کیت) و پرایمر فورارد اختصاصی و توسط دستگاه LightCycler مدل ۹۶ خانه و ساخت شرکت Roch انجام گرفت. از ژن U6 به‌عنوان کنترل داخلی (ژن رفرنس) استفاده شد. واکنش qRT-PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۷.۵ میکرولیتر مسترمیکس - سایبر گرین (QPCR master mix، دنا زیست، ایران با شماره کاتالوگ: A323402) و ۱ میکرولیتر cDNA، ۰.۵ میکرولیتر از هر پرایمر و مابقی آب استریل تهیه شد. برنامه دمایی واکنش شامل واسرشت شدن اولیه ۲ دقیقه در دمای

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

^0C ۹۵-، سپس ۴۵ سیکل شامل ۱ واسرشت شدن ۵ ثانیه در دمای ^0C ۹۵-، ، اتصال پرایمرها (Annealing) و تکثیر(Extension) تواماً ۳۰ ثانیه در دمای ^0C ۶۰- انجام شد.

جدول ۱. توالی های پرایمر. توالی پرایمر های مورد استفاده و مشخصات miRNA مورد بررسی در این مطالعه. پرایمر طراحی شده برای انسان، موش و موش صحرایی برای شناسایی miR-132 قابل استفاده است.

کروموزوم	شماره miRNA در سایت miRBASE	توالی پرایمر	نام پرایمر اختصاصی (Forward)
Chr10	MI0000905	5'- ACCGTGGCTTTCGATTGTTAC- 3'	rno-miR-132
Chr17		5'- TTGAACGATACAGAGAAGATTAG- 3'	U6 (snRNA)

تجزیه‌وتحلیل آماری بیان ژن

آنالیز داده‌ها (Ct ها) جهت بررسی نسبت بیان ژن‌ها با بررسی بیان ژن بر اساس میزان کارایی واکنش پرایمرها، با روش pfaffl(۱۷) انجام شد.

برای بررسی توزیع نرمال در گروه‌های از تست‌های Anderson-Darling test، Kolmogorov-Smirnov test استفاده گردید و باتوجه‌به حجم کم نمونه‌ها از تست Mann Whitney test برای بررسی معنی‌داری بین نمونه‌ها استفاده گردید. تمامی محاسبات و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۹ انجام شد. سطح معناداری p value<0.05 در نظر گرفته شد. نتایج به‌صورت میانگین تغییرات fold change ± SEM خطای استاندارد میانگین گزارش گردید و برای هر نمونه حداقل ۳ تکرار انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

این طرح در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه مطرح شد و با رعایت اصول اخلاق در پژوهش تمام مراحل کار با حیوان در این طرح، توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه با کد ۴۰۱۰۰۰۰۳۵ و شناسه اخلاق IR.THUMS.AEC.1401.007 مورد تائید قرار گرفت.

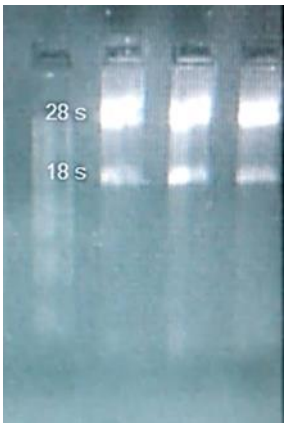
یافته‌ها

استخراج RNA

پس از استخراج RNA طبق دستورالعمل استاندارد، برای اطمینان از سالم‌بودن RNA استخراج شده، مقدار ۵ میکرولیتر بر روی ژل اگارز ۱ درصد بارگذاری شد، مشاهده دو باند ۲۸ و ۱۸S، تائید کننده کیفیت RNA بود. غلظت و کیفیت RNAها با دستگاه نانودراپ نیز بررسی گردید و نمونه‌هایی که واجد شرایط بودند به مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برای سنتز cDNA استفاده شدند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

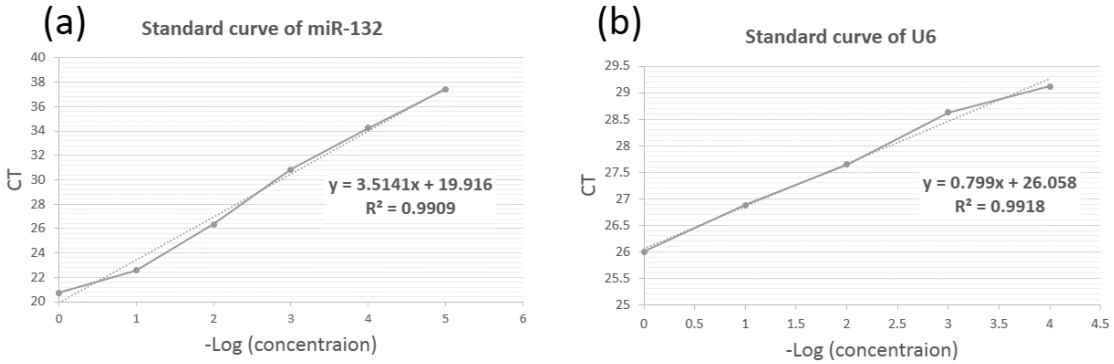
[DOI: 10.22034/30.2.15]



شکل ۲. بررسی کیفی RNA استخراج شده. به‌منظور اطمینان از کیفیت RNA کامل استخراج شده از بافت، مقداری از RNA بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید و سپس با نانودراپ تعیین غلظت شد. ردیف اول سمت چپ RNA تجزیه شده را نشان می‌دهد؛ لذا این نمونه وارد مراحل تهیه cDNA و RT-PCR نگردید.

رسم نمودار استاندارد

جهت استفاده از فرمول Pfaffl و برآورد کارایی پرایمرها و همچنین بررسی شرایط بهینه آزمایش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از cDNA تهیه شد و سپس آزمایش Real-time PCR طبق دستور مدنظر برای آزمایش نهایی نمونه‌ها انجام گردید. از Ct های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده گردید. در شکل شماره ۳ برای نمونه نمودار استاندارد دو پرایمر miR-132 و U6 آورده شد. دقت واکنش (R^2) از ۰/۹ بیشتر است و طبق محاسبه فرمول شماره ۱ کارایی پرایمر miR-132 معادل ۹۲.۵۶ درصد با ضریب شیب ۳.۵۱ و کارایی پرایمر U6 نزدیک به ۹۴.۳۹ درصد با ضریب شیب ۰.۷۹ محاسبه گردید.



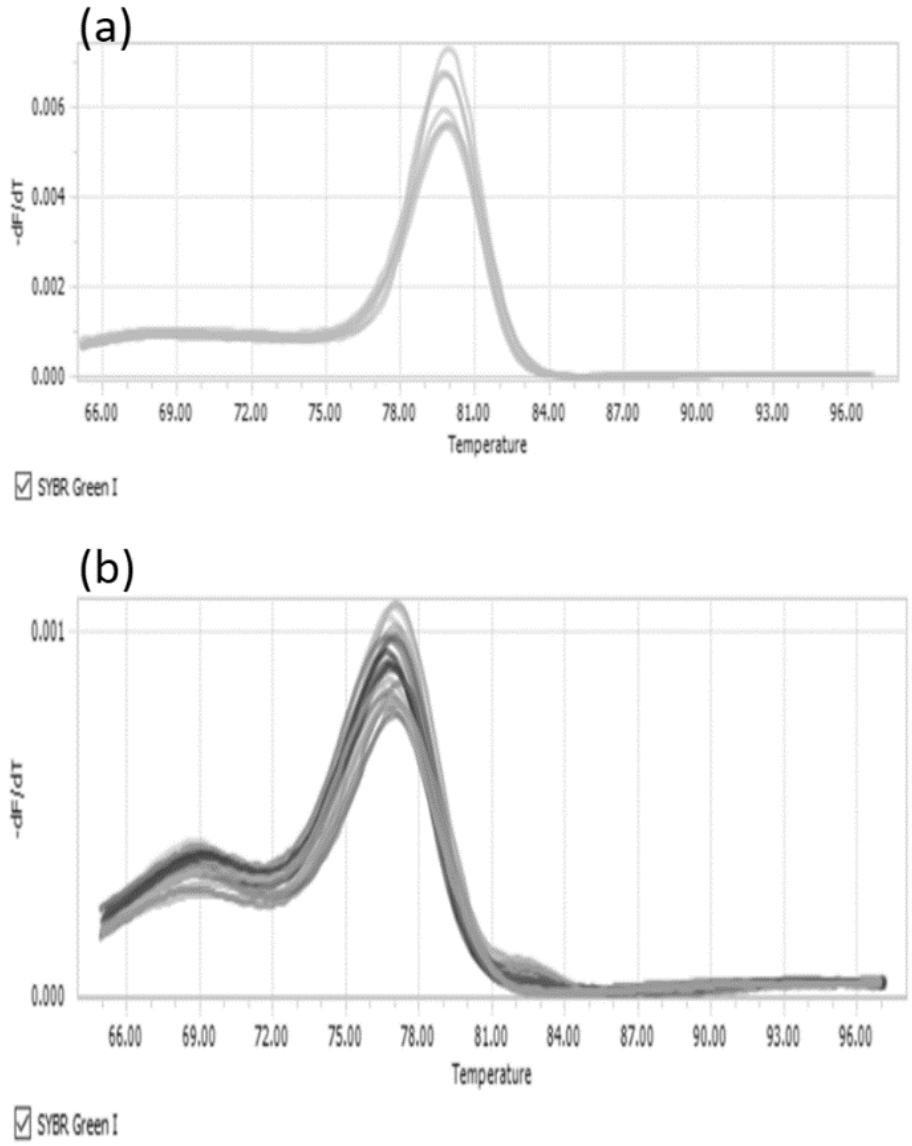
شکل ۳. منحنی‌های استاندارد. (a) نمودار استاندارد مربوط به miR-132 و (b) نمودار استاندارد مربوط U6 .

انجام آزمایش و آنالیز نتایج Real Time PCR

منحنی ذوب ژن‌ها در شکل ۴ نشان‌داده‌شده است، محور X تغییرات دما و محور Y نشان‌دهندهٔ سرعت تغییر در واحد فلورسانس متناسب با زمان است. در این نمودار دمای ذوب Tm قلهٔ نمودار است. وجود تک قله و فقدان باند غیراختصاصی نشان‌دهنده دقت آزمایش و تکثیر تنها قطعه مدنظر است

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

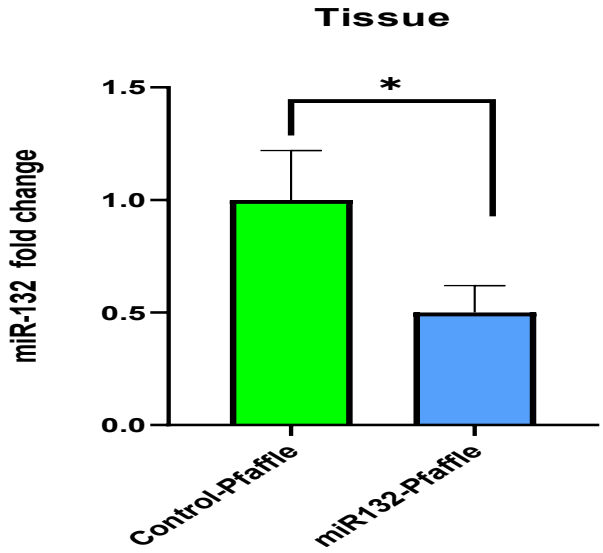


شکل ۴. منحنی‌های ذوب. نمونه‌ای از منحنی‌های ذوب مربوط به (a) واکنش مربوط به ژن U6، (b) واکنش مربوط به ژن-miR 132.

در روش Pfaffl به دلیل اینکه کارایی پرایمرها نیز در نظر گرفته می‌شود دقت بیشتری نسبت به روش ddCt که کارایی واکنش همواره ۱۰۰ درصد در نظر گرفته می‌شود دارد. در این مطالعه کاهش بیان miRNA در نمونه‌های بافتی هیپو کمپ با روشPfaffl نشان داده شد به‌طوری‌که بیان ژن miR-132 در موش‌هایی که مادرانشان در دوران بارداری لیتیوم مصرف کرده بودند با روش Pfaffl کاهش ۲.۰۱ برابری ($p<0/05$) را نسبت به گروه کنترلشان نشان دادند (نمودار ۱).

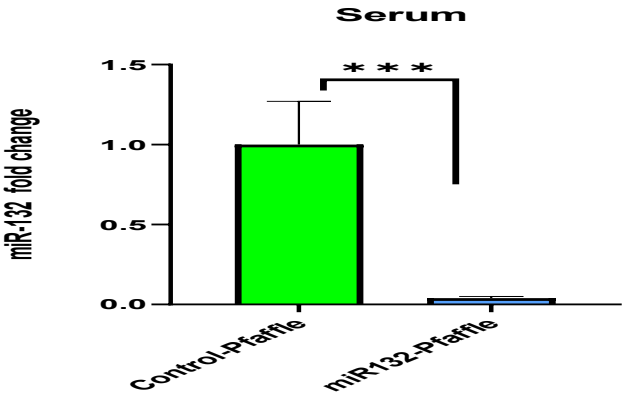
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]



نمودار ۱. درصد بیان miR132 در نمونه‌های بافت هیپو کمپ. آنالیز بیان نسبی miR132 با روش Pfaffl در بافت هیپوکامپ ۱۰ سر بچه‌موش‌ها نشان‌دهنده موش‌هایی است که مادران در دوران بارداری لیتیوم گرفته‌اند. نتایج به‌صورت میانگین تغییرات fold change ± SEM خطای استاندارد میانگین گزارش گردید و برای هر نمونه حداقل ۳ تکرار انجام شد. مقدار *P* کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری آماری در نظر گرفته شده است.*بیانگر سطح معنا داری کم تر از۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل (P<0/05)، nsبه منظره عدم ارتباط معنا دارد است.

در نمونه‌های سرم miRNAها نسبتاً پایدار هستند و برای بررسی به‌عنوان شاخص بیماری‌زایی موردتوجه قرار گرفته‌اند. بیان ژن miR-132 با روش Pfaffl کاهشی ۲۴ برابری (*p<0/001*) را نسبت به گروه کنترلشان نشان دادند (نمودار ۲).



نمودار ۲. درصد بیان miR132 در نمونه‌های سرم. آنالیز بیان نسبی miR132 با روش Pfaffl در سرم ۱۰ سر بچه‌موش، در موش‌هایی است که مادران در دوران بارداری لیتیوم گرفته‌اند. نتایج به‌صورت میانگین تغییرات fold change ± SEM خطای استاندارد میانگین گزارش گردید و برای هر نمونه حداقل ۳ تکرار انجام شد. ***بیانگر سطح معناداری کم‌تر از ۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل (P<0/001)، **بیانگر سطح معناداری کم‌تر از ۰/۰۱ (P<0/01)، ns به منظره عدم ارتباط معنا دارد است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

بحث

باتوجه‌به تحقیقات انجام‌گرفته اختلال دوقطبی یکی از علل اصلی ناتوانی جهانی است (۱۸). دوقطبی یک اختلال جدی خلقی است که حافظه و یادگیری را مورد هدف قرار می دهد و با عوارض روانی اجتماعی و اقتصادی قابل توجهی همراه است، این بیماری حدود ۲٪ از افراد جامعه را درگیر خود می‌کند. تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری نه تنها از آسیب زدن فرد به خود و دیگران جلوگیری می کند بلکه می تواند کنترل کننده فرد باشد (۱). نمک های لیتیومی به عنوان یک درمان اصلی برای اختلال دوقطبی شناخته می شود و به طور گسترده‌ای برای درمان افسردگی شدید و جلوگیری از عود آن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹). مکانیسم اثر لیتیوم در درمان افسردگی دقیقاً مشخص نیست؛ اما تحقیقات نشان می دهد که لیتیوم می‌تواند با تنظیم فعالیت برخی ژن ها و مسیرهای سیگنالی در مغز، به بهبود خلق‌وخو و کاهش علائم افسردگی کمک کند. همچنین لیتیوم ممکن است با تأثیر بر سطوح برخی نوروترانسمیترها مانند سروتونین و نوراپی نفرین در مغز، به کاهش افسردگی کمک کند (۲۰). از سوی دیگر، مصرف طولانی مدت لیتیوم ممکن است با برخی عوارض جانبی همراه باشد که لزوم دقت و نظارت پزشکی در زمان مصرف این دارو را ضروری می‌سازد. به طور کلی، لیتیوم به عنوان یک درمان مؤثر و مهم در مدیریت افسردگی و اختلالات خلقی شناخته شده است و تحقیقات بیشتر در مورد مکانیسم‌های اثر آن همچنان ادامه دارد (۲۱).

بااین‌حال استفاده خوراکی لیتیوم بر اختلال عملکرد شناختی و فعالیت مغزی در دوران بارداری موضوع پیچیده‌ای است، برخی مطالعات خطر استفاده از لیتیوم در هر زمانی در دوران بارداری را کم می‌دانند و احتمال خطر را عمدتاً مرتبط با استفاده در سه‌ماهه اول یا قرارگرفتن در معرض دوز بالاتر می‌دانند (۲۲).

به نظر می رسد لیتیوم از طریق مهار دو مسیر سیگنالینگ اصلی شامل گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ و پروتئین کیناز C در توسعه عصبی نیز نقش دارد (۲۳). اثرات محافظت عصبی لیتیوم از طریق افزایش نوروژنز و کاهش فرآیند آپوپتوز با واسطه فعال شدن سلول‌های پیش ساز عصبی، حتی راهکارهای جدیدی برای درمان بیماری‌های عصبی یا ایسکمیک مغز مانند آلزایمر، پارکینسون و سندرم داون پیشنهاد می‌دهد (۲۴), (۲۵). با وجود تأثیر مثبت لیتیوم، مطالعات متعددی اثر مضر لیتیوم بر روی جنین به ویژه در اولین سه‌ماهه بارداری گزارش نموده‌اند که منجر به اختلال در تمایز سلولی و اثرات نامطلوب خطرناکی بر اندام‌های حیاتی از جمله غده تیروئید، مغز و سیستم قلبی عروقی دارد. با این حال مهمترین عارضه، کم کاری تیروئید ناشی از لیتیوم است. هورمون‌های تیروئید مسئول چندین عملکرد مهم از جمله هموستاز و رشد اندام ها هستند و قطعاً برای رشد مناسب. سیستم عصبی نیز ضروری هستند؛ بنابراین کم‌کاری تیروئید می‌تواند منجر به نقص‌های حافظه و شناختی شود که احتمالاً به دلیل افزایش سطح تولید رادیکال‌های آزاد است (۲۶).

در مطالعه‌ای استفاده از ۳۰mg/kg لیتیوم در دوران بارداری موش‌های صحرایی سبب شد که فرزندان آن‌ها، کاهش هورمون‌های تیروئیدی شامل TSH, T4 و T3 را نسبت به گروه کنترل نشان بدهند که این خود نشان‌دهنده مراتبی از کم‌کاری تیروئید است به‌علاوه بچه‌موش‌ها رفتارهای اضطراب و افسردگی را نشان می‌دادند(۲۷). اثرات مجاورت با لیتیوم به ویژه در دوران بارداری همچنان در دست بررسی است و تحقیقات بیشتری برای درک کامل تأثیر آن بر عملکرد شناختی مورد نیاز است.

عملکرد miRNAها در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، تکامل عصبی، تعمیر DNA، آپوپتوز، پاسخ در شرایط استرس‌های اکسیداتیو، هیپوکسی بافتی، التهاب، تب، عفونت و بسیاری دیگر از فعالیت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک به اثبات

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

رسیده است (۲۸) و تخمین زده می شود که بیش از دوسوم تنظیم و تغییرات بیان ژن ها وابسته به تنظیم miRNA ها است. بسیاری از محققین پیشنهاد می‌کنند که در میان نشانگرهای زیستی رونویسی، microRNA ها استفاده شود؛ زیرا آن‌ها در خون نیز قابل تشخیص بوده و بسیار پایدار هستند، به علاوه نیمه عمر طولانی دارند و تجزیه و تحلیل آن‌ها با هزینه نسبتاً کم، حساسیت بالا و ویژگی بالا از طریق تکنیک های استاندارد به راحتی قابل اندازه گیری است (۲۹)؛ بنابراین شناسایی miRNA های دخیل در بیماری زایی و استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی برای تشخیص سریع بسیار حائز اهمیت است.

گرچه نقش miR-132 در اختلال دوقطبی به طور کامل شناخته نشده است؛ اما در اختلالات روانپزشکی مختلف از جمله اسکیزوفرنی و افسردگی نقش دارد. در مطالعه‌ای بیان ۸۵۴ miRNA را در بافت قشر جلوی مغز از ۱۰۰ فرد مبتلا به اسکیزوفرنی (SCZ) و دوقطبی (BPD) و مقایسه آن با افراد سالم بررسی شده و کاهش بیان قابل‌توجهی در miR-132 در هر دو SCZ و BPD نشان داد (۳۰).

ژن های PTEN و GAT1 به عنوان ژن های هدف miR-132 معرفی شده اند، PTEN یک ژن سرکوب کننده تومور است که نقش مهمی در تنظیم مسیرهای سیگنالی مرتبط با رشد، بقا و متابولیسم سلول ایفا می‌کند. miR-132 به طور مستقیم به 3́UTR(منطقه ۳' غیر ترجمه شده) ژن PTEN متصل می‌شود و موجب سرکوب بیان آن می‌شود. این سرکوب بیان PTEN توسط miR-132 می‌تواند منجر به تحریک مسیر PI3K/AKT و در نتیجه افزایش رشد و بقای سلولی شود. GAT1 یک ناقل عصبی گلوتامات است که نقش مهمی در کنترل سطح گلوتامات خارج سلولی در سیناپس‌ها دارد. miR-132 به طور مستقیم به 3́UTR ژن GAT1 متصل می‌شود و موجب کاهش بیان آن می‌شود. این سرکوب بیان GAT1 توسط miR-132می‌تواند به تغییر در سطح گلوتامات خارج سلولی و تأثیر بر عملکرد سیناپسی منجر شود؛ بنابراین،miR-132 از طریق تنظیم منفی بیان ژن‌های PTENو GAT1 می‌تواند در فرآیندهای سلولی و عصبی مختلف نقش داشته باشد.(۳۱). همچنین بیان این ژن با رفتارهای مرتبط با اضطراب در بیماران مبتلا به افسردگی بی نظم نیز گزارش شده است، که نشان دهنده دخالت بالقوه آن در تنظیم عاطفی است که با BD مرتبط است (۳۲).

در این مطالعه نیز بیان miR-132 در بافت هیپو کمپ و سرم موش‌هایی که مادران در دوره بارداری لیتیوم مصرف نموده بودند به طرز قابل‌توجهی کاهش نشان داد. کاهش بیان miR-132 در هیپو کمپ موش‌هایی که مادران لیتیوم مصرف کرده بودند، با درنظرگرفتن این نکته که لیتیوم سبب ایجاد شرایط کم‌کاری تیروئید می‌شود، مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

هدف این مطالعه ارتباط بین بیان ژن miR-132، پس از معرض قرارگرفتن با لیتیوم در دوران بارداری (بر روی نوزادان)، است. باوجود اثرات مثبت لیتیوم در بیماری دوقطبی، برای مادران باردار با این بیماری مصرف این دارو باید بااحتیاط بیشتری استفاده شود. استفاده دوزهای بالا سبب اختلالات رفتاری و مولکولی در نوزادان می‌گردد؛ البته اثرات تحت‌تأثیر دوز دارو یا زمان مصرف یا مدت‌زمان استفاده و حتی ژنتیک افراد، متفاوت خواهد بود. استفاده از miRNAها در مایعات بدن به‌عنوان نشانگرهای بالقوه ارزشمندی در تشخیص بیماری، پیش‌آگهی‌های مولکولی، اندام‌های درگیر و پیگیری موفقیت در روند درمان موردتوجه و بررسی قرار گرفته‌اند.

در این مطالعه بیان miR-132 در هیپو کمپ نوزادانی که مادران آن‌ها در مجاورت دوز بالایی از لیتیوم در دوره بارداری قرار گرفته بودند کاهش نشان داد که با مشاهدات کم‌کاری تیروئید مطابقت دارد؛ البته استفاده از لیتیوم خود سبب ایجاد اثرات کم‌کاری تیروئیدی نیز می‌گردد. نتایج

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

Real Time PCR نشان می‌دهد miR-132 باتوجه‌به تفاوت بیان بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده لیتیم می‌تواند کاندید خوبی برای تشخیص زودهنگام بیماری باشد. بااین‌حال معرفی یک یا چند نشانگر miRNA اختصاصی اختلال دوقطبی کاری بسی دشوار است و نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری است.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که در انجام این مطالعه مشارکت نموده‌اند سپاسگزاری می‌گردد. این طرح، در طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ در آزمایشگاه جامع دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه انجام شد. به علاوه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه با کد ۴۰۱۰۰۰۰۳۵ و شناسه اخلاق IR.THUMS.AEC.1401.007 این طرح را مورد تائید قرار داد. تأمین مالی توسط دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه و موسسه آموزش عالی کاویان مشهد انجام شده است. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.Goes FS. Diagnosis and management of bipolar disorders. BMJ. 2023;381:e073591.
2.Fabbri C. The role of genetics in bipolar disorder. Bipolar disorder: from neuroscience to treatment. 2021:41-60.
3.Crapanzano C, Casolaro I, Amendola C, Damiani S. Lithium and valproate in bipolar disorder: from international evidence-based guidelines to clinical predictors. Clinical Psychopharmacology and Neuroscience. 2022;20(3):403.
4.Szałach ŁP, Lisowska KA, Cubała WJ, Barbuti M, Perugi G. The immunomodulatory effect of lithium as a mechanism of action in bipolar disorder. Frontiers in Neuroscience. 2023; 17: 1213766.
5.Campbell IH, Campbell H, Smith DJ. Insulin signaling as a therapeutic mechanism of lithium in bipolar disorder. Translational Psychiatry. 2022;12(1):350.
6.Joseph B, Nunez NA, Pazdernik V, Kumar R, Pahwa M, Ercis M, et al. Long-term lithium therapy and thyroid disorders in bipolar disorder: a historical cohort study. Brain sciences. 2023;13(1):133.
7.Ferensztajn-Rochowiak E, Rybakowski JK. Long-term lithium therapy: Side effects and interactions. Pharmaceuticals. 2023;16(1):74.
8.Van Deun K, Hatch H, Jacobi S, Köhl W. Lithium carbonate: Updated reproductive and developmental toxicity assessment using scientific literature and guideline compliant studies . Toxicology. 2021;461:152907.
9.Li S, Lei Z, Sun T. The role of microRNAs in neurodegenerative diseases: A review. Cell Biology and Toxicology. 2023;39(1):53-83.
10.Hussein M, Magdy R. MicroRNAs in central nervous system disorders: Current advances in pathogenesis and treatment. The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery. 2021;57:1-11.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

11.Zailaie SA, Siddiqui JJ, Al Saadi RM, Anbari DM, S. Alomari A, Cupler EJ. Serum based miRNA as a diagnostic biomarker for multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. Immunological investigations. 2022;51(4):947-62.
12.Jafarinia M, Farrokhi MR, Ganjalikhani Hakemi M, Cho WC. The role of miRNAs from mesenchymal stem/stromal cells-derived extracellular vesicles in neurological disorders . Human Cell. 2023;36(1):62-75.
13.Gong X, Huang M, Chen L. Mechanism of miR-132-3p promoting neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's Disease. Eneuro. 2022;9(1):38-42.
14.Qu J, Xiong X, Hujie G, Ren J, Yan L, Ma L. MicroRNA-132-3p alleviates neuron apoptosis and impairments of learning and memory abilities in Alzheimer's disease by downregulation of HNRNPU stabilized BACE1. Cell Cycle. 2021;20(21):2309-20.
15.Kim H, Kim YD. Unveiling the role of MicroRNA-132 on Alzheimer's disease brain cells. International Journal of High School Research. 2023;5(1):28-36.
16.Foroutan P, Boshagh MA, Moloudi MR, Fakhari S, Nikkhoo B, Jalili A. Expression of CXC chemokine receptors in acute ulcerative colitis: initial study from an animal model. Advanced biomedical research. 2019;8(1):56.
17.Pfaffl MW. Relative quantification. Real-time PCR: Taylor & Francis; 2007. p. 89-108.
18.Harrison PJ, Cipriani A, Harmer CJ, Nobre AC, Saunders K, Goodwin GM, et al. Innovative approaches to bipolar disorder and its treatment. Annals of the New York Academy of Sciences. 2016;1366(1):76-89.
19.Kakhki S, Ahmadi-Soleimani SM. Experimental data on lithium salts: From neuroprotection to multi-organ complications. Life Sciences. 2022:120811.
20.Rakofsky JJ ,Lucido MJ, Dunlop BW. Lithium in the treatment of acute bipolar depression: A systematic review and meta-analysis. Journal of affective disorders. 2022;308:268-80.
21.Pompili M, Berardelli I, Sarubbi S, Rogante E, Germano L, Sarli G, et al. Lithium treatment versus hospitalization in bipolar disorder and major depression patients. Journal of Affective Disorders. 2023;340:245-9.
22.Fornaro M, Maritan E, Ferranti R, Zaninotto L, Miola A, Anastasia A, et al. Lithium exposure during pregnancy and the postpartum period: a systematic review and meta-analysis of safety and efficacy outcomes. American Journal of Psychiatry. 2020;177(1):92-6.
23.Vallée A, Vallée J-N, Lecarpentier Y. Parkinson's disease: potential actions of lithium by targeting the WNT/β-catenin pathway, oxidative stress, inflammation and glutamatergic pathway. Cells. 2021;10(2):230.
24.Zanni G, Di Martino E, Omelyanenko A, Andäng M, Delle U, Elmroth K, et al. Lithium increases proliferation of hippocampal neural stem/progenitor cells and rescues irradiation-induced cell cycle arrest in vitro. Oncotarget. 2015;6(35):37083.
25.Wolter JM, Le BD, Matoba N, Lafferty MJ, Aygün N, Liang D, et al. Cellular genome-wide association study identifies common genetic variation influencing lithium-induced neural progenitor proliferation. Biological psychiatry. 2023;93(1):8-17.
26.Czarnywojtek A, Zgorzalewicz-Stachowiak M, Czarnocka B, Sawicka-Gutaj N, Gut P, Krela-Kazmierczak I, et al. Effect of lithium carbonate on the function of the thyroid gland:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]

mechanism of action and clinical implications. Journal of Physiology & Pharmacology. 2020;71:2.
27.Kakhki S, Goodarzi M, Abbaszade-Cheragheali A, Rajabi M, Masoumipour AH, Khatibi SR, et al. Folic acid supplementation improved cognitive deficits associated with lithium administration during pregnancy in rat offspring. International Journal of Developmental Neuroscience. 2023;83(7):615-30.
28.Wu X, Zeng W, Xu Y, Wang B, Liu X, Lin F, et al. Predicting of associations between microRNA and human diseases based on multiple similarities and arbitrarily-order proximity network embedding. IEEE Access. 2019;7:86625-34.
29.Wen G, Zhou T, Gu W. The potential of using blood circular RNA as liquid biopsy biomarker for human diseases. Protein & cell. 2021;12(12):911.
30.Miller BH, Zeier Z, Xi L, Lanz TA, Deng S, Strathmann J, et al. MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(8):3125-30.
31.Ronovsky M, Zambon A, Cicvaric A, Boehm V, Hoesel B, Moser BA, et al. A role for miR-132 in learned safety. Scientific Reports. 2019;9(1):528.
32.Qian Y, Song J, Ouyang Y, Han Q, Chen W, Zhao X, et al. Advances in roles of miR-132 in the nervous system. Frontiers in pharmacology. 2017;8:770.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-09-07]

[DOI: 10.22034/30.2.15]