

بررسی پلی مورفیسم rs1801260 ژن CLOCK در بیماران ایرانی مبتلا به بی خوابی (اینسومنیا)

دلارام غلامعلیان^۱، مریم زارع^{۲*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۴/۲۰

چکیده

پیش زمینه و هدف: ریتم‌های شبانه‌روزی فرآیندهایی طبیعی هستند که چرخه خواب‌و بیداری را تنظیم می‌کنند و تقریباً هر ۲۴ ساعت تکرار شده و توسط یک ساعت شبانه‌روزی درونی کنترل می‌شوند. عملکرد نادرست سیستم ساعت شبانه‌روزی باعث اختلال در الگوی طبیعی خواب می‌شود. تنظیم مولکولی این سیستم توسط تعدادی از ژن‌های ساعت انجام می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها ژن CLOCK است و یک فاکتور رونویسی را کد می‌کند که نقش اساسی در تنظیم ساعت شبانه‌روزی مولکولی دارد. در این مطالعه پلی مورفیسم جایگاه rs1801260 ژن CLOCK در بیماران ایرانی مبتلا به اختلال بی خوابی مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۶۰ نمونه خون از افراد دارای مشکلات عمقی بی‌خوابی، ناتوانی در کنترل خواب و خواب نامنظم به‌عنوان گروه بیمار و ۶۰ نمونه از افراد بدون هیچ‌گونه سابقه بی‌خوابی و یا اختلال در خواب به‌عنوان گروه کنترل به دست آمد. سپس استخراج DNA انجام شده و بررسی پلی مورفیسم با روش ARMS-PCR و با پرایمرهای اختصاصی برای آلل‌های طبیعی و موتانت انجام شد و نتایج بررسی گردید. **یافته‌ها:** بر اساس نتایج، ۵۰ درصد بیماران دارای ژنوتیپ GG، ۳۶/۷ درصد ژنوتیپ AG و ۱۳/۳ درصد ژنوتیپ AA بودند. در گروه کنترل نیز فراوانی ژنوتیپ‌های GG، AG و AA به ترتیب معادل ۳۰ درصد، ۲۶/۷ درصد و ۴۳/۳ درصد بوده است. همچنین این پلی مورفیسم به‌طور معنی‌داری با اختلال بی‌خوابی در بیماران مرتبط است ($p < 0.05$) و با جنسیت، سن و سبک زندگی بیماران ارتباط معناداری ندارد. **بحث و نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها نشان می‌دهد که پلی مورفیسم rs1801260 و آلل G در این جایگاه ارتباط معنی‌داری با اختلال خواب داشته و به نظر می‌رسد که نقش مهمی در بروز این بیماری در جمعیت ایرانی دارد. از این رو بررسی ژن CLOCK در افراد بیمار یا مستعد می‌تواند برای پیشگیری و درمان مؤثر بیماری کمک‌کننده باشد.

کلیدواژه‌ها: ریتم شبانه‌روزی، ژن CLOCK، بی‌خوابی، پلی مورفیسم، rs1801260

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره چهارم، ص ۲۳۴-۲۳۳، تیر ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: تهران، بلوار ارتش، خیابان نخل، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵
تلفن: ۰۹۱۲۲۷۸۷۹۵۱

Email: m_zare@pnu.ac.ir

مقدمه

محیط خارجی ممکن است منجر به اختلالات خواب ریتم شبانه‌روزی شود (۲). بی‌خوابی (Insomnia) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین انواع اختلالات خواب هست که در سراسر جهان بین ۱۶/۸ تا ۳۱ درصد از جمعیت عمومی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بی‌خوابی با دشواری مداوم در شروع یا حفظ خواب و یا بیداری در صبح زود، همراه با اختلالات عملکردی مرتبط مانند خستگی یا مشکل در تمرکز در طول روز مشخص می‌شود. خطرات سلامتی مرتبط با بی‌خوابی شامل اختلالات مزمن و روانی متعددی از جمله بیماری قلبی، سندرم متابولیک، چاقی، افسردگی و اضطراب است (۳، ۴).

ریتم‌های شبانه‌روزی، چرخه‌های ویژه خواب‌و بیداری هستند که توسط فرایندهای درونی و فاکتورهای بیرونی تنظیم می‌شوند. این ریتم‌های متناوب ۲۴ ساعته توسط ساعت‌های مولکولی ایجاد می‌شوند و وظیفه هماهنگ کردن زمان درونی بدن با دنیای بیرونی را به عهده دارند. تقریباً تمام فیزیولوژی بدن توسط ریتم شبانه‌روزی تنظیم می‌شود و اختلال در آن عواقب عمده‌ای بر سلامتی دارد (۱). در این رابطه، فرایند خواب به‌شدت توسط ریتم‌های شبانه‌روزی تنظیم می‌شود، به‌طوری‌که ناهماهنگی بین ریتم‌های شبانه‌روزی و

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، مرکز شهر ری، شهر ری، ایران
^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

مورد بررسی قرار گرفته است. ژن‌های اصلی ساعت در جزایر پانکراس انسان، جایی که انسولین به‌طور ریتمیک ترشح می‌شود، بیان می‌شوند و این تنظیم به هموستازی گلوکز کمک می‌کند. (۹، ۱۲، ۱۳).

ژن CLOCK (The Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) یکی از اولین ژن‌هایی است که در این رابطه مورد بررسی قرار گرفته است. این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم 4q12 قرار دارد و فاکتور رونویسی CLOCK را کد می‌کند که نقش مرکزی در ساعت شبانه‌روزی داشته و باعث تنظیم رونویسی بسیاری از ژن‌های خروجی ریتم شبانه‌روزی می‌شود. اختلال در عملکرد این ژن، تنظیم رونویسی این ژن‌ها را برهم می‌زند. مطالعات نشان داده‌اند که وقوع پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در عملکرد این ژن تأثیر گذار است (۱۲، ۱۴).

یکی از انواع پلی‌مورفیسم‌های شناسایی شده در این ژن که با فنوتیپ‌های انسانی مرتبط هستند، پلی‌مورفیسم rs1801260 A/G در ناحیه ترجمه نشدنی سر ۳' (3' UTR) ژن CLOCK می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم این جایگاه با میزان بیان پروتئین CLOCK مرتبط است (۱۵). علاوه بر نقش محوری که ژن CLOCK در ساعت شبانه‌روزی ایفا می‌کند، این ژن در تنظیم خواب نیز مشارکت به‌سزایی دارد. بر اساس برخی شواهد افراد حامل آلل G در این جایگاه، اغلب حدود ۱۰ تا ۴۴ دقیقه تأخیر در زمان‌بندی ترجیحی خود برای ورود به مراحل فعال خواب دارند و افراد با ژنوتیپ هموزیگوت GG به طرز چشمگیری با کاهش خواب شب و افزایش خواب‌آلودگی در روز همراه هستند (۱۲، ۱۶).

لازم به ذکر است که ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs1801260 و اختلالات خواب در بیماران مبتلا به اختلالات روانپزشکی نیز مشاهده شده است. در میان بیماران مبتلا به اختلال افسردگی اساسی (Major Depressive Disorder: MDD) یا اختلال دو قطبی (Bipolar Disorder) افراد هموزیگوت حاوی آلل G، با کاهش خواب اساسی و افزایش اختلال خواب مواجهند. بعلاوه مشاهده شده است که ایجاد جهش مداوم در ژن CLOCK در موش‌ها، چهارچوب هموستاز خواب در آن‌ها را تغییر می‌دهد (۱۷، ۱۸). همچنین شواهد نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم‌های ژن CLOCK از جمله جایگاه rs1801260 با خلق و خو، بیماری‌هایی مانند بیش‌فعالی، فرایندهای متابولیکی، چاقی و سرطان نیز مرتبط می‌باشد (۱، ۶، ۱۷). لذا با توجه به اهمیت این ژن و نقش مرکزی آن در تنظیم بیان سایر ژن‌های ساعت در انسان و نیز با توجه تنوع ژنتیکی این ژن در جوامع مختلف، در این مطالعه پلی‌مورفیسم جایگاه rs1801260 ژن CLOCK در بیماران مبتلا به اختلال بی‌خوابی در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

خواب مناسب برای حفظ سلامتی و بهینه‌سازی عملکرد کلی در هنگام بیداری ضروری است. زمان، عمق و مدت خواب توسط سیستم شبانه‌روزی و هموستاز خواب تنظیم می‌شود که به مدل دو فرآیندی معروف است (۱، ۵).

شناسایی تأثیر متقابل ژنتیک بر سلامت خواب و خواب بر بیان و کارکرد صحیح ژن‌ها، برای فهم ریتم‌های شبانه‌روزی و لایه‌های زیرین آن لازم و ضروری است. ریتم شبانه‌روزی به تدریج از ماه سوم حیات به بعد با پیدا کردن توانایی تولید ملاتونین در بدن نوزاد تعریف می‌شود و الگوهای بیولوژیکی بدن از جمله چرخه‌های خواب‌بیداری، دما، فشار خون، ترشح هورمون‌ها، دفع و غیره را کنترل می‌کند. این وقایع شبانه‌روزی توسط ساعت‌های بیولوژیکی کنترل می‌شوند و با هر دو نشانه محیطی مانند نور و دما و همچنین با نشانه‌های اجتماعی مانند فعالیت بدنی و رفتار تغذیه‌ای هماهنگ می‌شوند. چرخ‌دنده‌های این ساعت شبانه‌روزی پروتئین‌هایی هستند که تولید و تخریب آن‌ها، توسط مسیرهای فیدبکی به هم پیوسته کنترل می‌شود (۵ و ۶). از دیدگاه مولکولی، ساعت شبانه‌روزی در پستانداران از تعدادی ژن تشکیل شده است که به‌صورت لوپ‌های فیدبکی رونویسی و ترجمه‌ای با هم کار کرده و نوسانات شبانه‌روزی را تولید می‌کنند. در مرکز این شبکه مولکولی دو عامل رونویسی وجود دارد: فاکتور (CLOCK) و فاکتور (BMAL1) که با هم هتروداپمر می‌شوند و به پروموتورهای ژن‌های ساعت و همچنین تعداد زیادی از ژن‌های کنترل شده با ساعت متصل شده و باعث بیان ژن‌های Period (Per1-3) و Cryptochrome (Cry1/2) می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود با فسفریله شدن و تشکیل کمپلکس و انتقال به هسته به‌صورت منفی از فعالیت رونویسی CLOCK-BMAL1 جلوگیری می‌کنند. این لوپ فیدبک منفی تقریباً ۲۴ ساعت طول می‌کشد تا تکمیل شود (۷).

طبق مطالعات صورت گرفته تغییرات ژنتیکی در این ژن‌های ساعت با اثرات فنوتیپی در مجموعه‌ای از فرآیندهای بیولوژیکی مانند ترجیح خواب روزانه، خواب شبانه، متابولیسم، تنظیم خلق و خو، اعتیاد و باروری همراه است. تخمین زده شده است که حداقل ۲۰ درصد از کل ژن‌های پستانداران با ساعت کنترل می‌شوند که همین امر نشان‌دهنده تنظیم گسترده ژن شبانه‌روزی است (۸ و ۹). بر اساس مطالعات، خواب ناکافی باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو و همین‌طور پاسخ ایمنی می‌شود. علاوه بر این، کمبود خواب جزئی با پاسخ‌های آسیب DNA و پیری سلول و مشکلات حافظه مرتبط است (۱۰، ۱۱).

تاکنون ۱۳ ژن شبانه‌روزی هسته‌ای که به آن‌ها ژن ساعت (Circadian Clock Genes) نیز اطلاق می‌شود در انسان شناسایی شده است و در سال‌های اخیر، عملکرد این ژن‌ها به‌طور قابل توجهی

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه شامل ۶۰ نمونه از افراد با مشکلات عمقی بی‌خوابی، ناتوانی در کنترل خواب، خواب نامنظم و عوارض ناشی از آن در طول روز به‌عنوان گروه بیمار و ۶۰ نمونه از افرادی بدون هیچ‌گونه سابقه بی‌خوابی و یا اختلال در خواب به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. نمونه‌های بیمار از افراد مراجعه‌کننده به کلینیک خواب عرفان تهران طی یک دوره ۳ ماهه جمع‌آوری شد. برای انجام این پژوهش از هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون در لوله‌های حاوی EDTA استریل گرفته شد و درون ظرف یخ نگهداری و در شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. اهداف پژوهش برای همه افراد شرکت‌کننده توضیح داده شد و تمام افراد به‌صورت آگاهانه و با تکمیل و امضا فرم رضایتنامه آگاهانه جهت شرکت در پروژه تحقیقاتی به همراه تأیید اطلاعات آسیب‌دیدگی توسط متخصص اعصاب و روان در این پژوهش مشارکت نمودند افرادی با سابقه ابتلا به اختلالات و بیماری‌های اعصاب و روان و نیز افرادی که سابقه مصرف داروهایی با عوارض بی‌خوابی داشته‌اند، از مطالعه خارج شدند. اطلاعات کلینیکی و پاتولوژی بیماران شامل سن، جنس، قد، وزن، BMI و سابقه خانوادگی نیز دریافت شد. تحقیق حاضر توسط

کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور مورد تأیید قرار گرفته و کد اخلاق پزشکی (IR.PNU.REC.1401.482) دریافت نموده است. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج DNA از خون با استفاده از کیت تکاپوزیست مدل DYnaBio Blood/Tissue DNA Extraction Mini Kit (شرکت تکاپو زیست، ایران) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. غلظت و خلوص نمونه DNA استخراج شده، با استفاده از روش کمی طیف‌سنجی جذبی اشعه ماوراءبنفش و با دستگاه نانودراپ (Nano Drop ND-1000, Thermo Scientific, USA) و نیز الکتروفورز DNA روی ژل ۱ درصد بررسی شد. سپس برای بررسی وضعیت پلی‌مورفیسم rs1801260 در ژن CLOCK، تکثیر DNA های استخراج شده با روش ARMS-PCR انجام شد.

برای طراحی پرایمر ابتدا توالی جایگاه rs1801260 با استفاده از پایگاه SNP متعلق به NCBI به دست آمد و سپس طراحی پرایمرهای F و R به‌صورت دستی و با کمک سایت NEB (New England Biolabs) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده (شرکت تکاپو زیست، ایران) در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی پلی‌مورفیسم rs1801260 ژن CLOCK

توالی	پرایمر
CTAAAACACTGTCAGAACTGGCTA	پرایمر (A) Forward
CTAAAACACTGTCAGAACTGGCTG	پرایمر (G) Forward
TGAGATGCAGTATTGAGTGTC	پرایمر Reverse

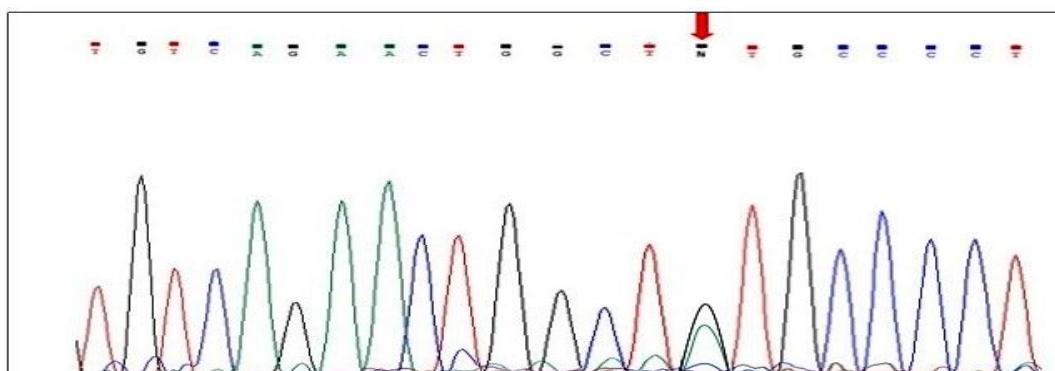
بر روی ژل آگارز ۱ درصد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV تأیید شد. برای تأیید اختصاصی بودن پرایمرها و نتایج به دست آمده، تعیین توالی محصولات PCR نیز انجام شده (شرکت ژنوسل، تهران، ایران) و نتایج بررسی گردید.

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 26) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت موتانت برای هر دو گروه بیمار و کنترل، فرضیه‌های پژوهش و بررسی ارتباط بین ژنوتیپ افراد با بروز بیماری از طریق آزمون مجذور کای χ^2 Square محاسبه و مورد بررسی و تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. خطای کمتر از ۰/۰۵ برای سطح معناداری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای بررسی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی جایگاه rs1801260 در ژن CLOCK، از تکنیک ARMS-PCR استفاده شد و محصول

برای انجام واکنش ARMS-PCR، برای هر یک از نمونه‌های DNA استخراج شده، دو میکروتیوب، یکی برای حالت نرمال و دیگری برای حالت موتانت در نظر گرفته شده و واکنش-ARMS-PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در دستگاه (BioRad, USA) Thermal cycler انجام شد. مخلوط واکنش PCR در دو میکروتیوب جداگانه شامل ۲۰ میکرولیتر از Master mix 2X، ۴ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها و ۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز (سیناکلون، ایران) آماده سازی شد. متعاقباً مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفته و واکنش PCR تحت شرایط اختصاصی انجام شد. شرایط و پروفایل دمایی واکنش ARMS-PCR به این صورت بوده است: ۱ سیکل برای واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C، سپس ۳۴ سیکل تکثیر شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ °C و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C و ۱ سیکل نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه. متعاقباً صحت PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR



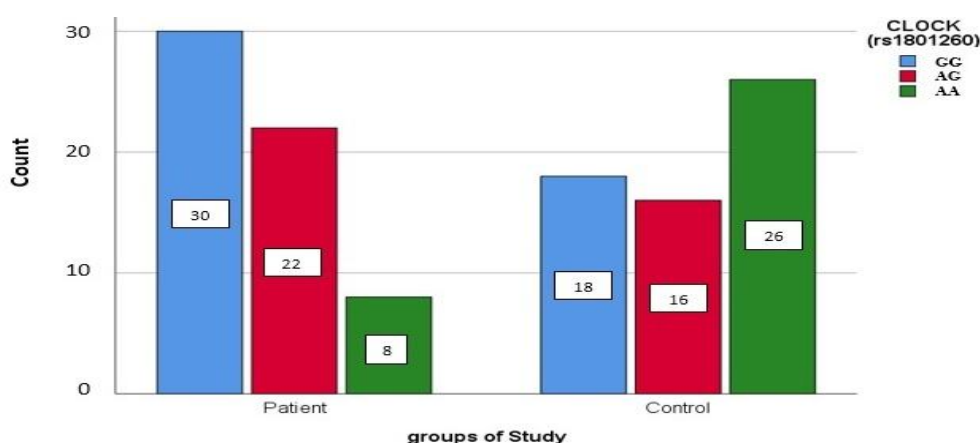
شکل (۳): نتایج تعیین توالی جایگاه rs1801260 در ژن CLOCK. در جایگاه مورد نظر که با فلش نشان داده شده، دو پیک سبز و سیاه مربوط به نوکلئوتیدهای A و G مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت AG است.

۵۰ درصد و در افراد سالم ۳۰ درصد است. میزان بروز ژنوتیپ هتروزیگوت AG در افراد بیمار ۳۶/۷ درصد و در افراد سالم ۲۶/۷ درصد است. درحالی‌که میزان بروز ژنوتیپ هموزیگوت نرمال AA در افراد بیمار تنها ۱۳/۳ درصد بوده که این میزان در افراد نرمال به ۴۳/۳ درصد می‌رسد (جدول ۲) (شکل ۴).

در این مطالعه ۱۲۰ نمونه خون (۶۰ بیمار و ۶۰ کنترل نرمال) مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی و درصد پلی‌مورفیسم rs1801260 در ژن CLOCK در دو گروه بیمار و کنترل در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان بروز ژنوتیپ هموزیگوت موتانت GG در افراد بیمار

جدول (۲): فراوانی و درصد CLOCK (rs1801260) در دو گروه بیمار و کنترل (rs1801260) CLOCK

ژنوتیپ‌ها	بیمار	کنترل	کل
ژنوتیپ GG	۳۰ ۵۰٪	۱۸ ۳۰٪	۴۸ ۴۰٪
ژنوتیپ AG	۲۲ ۳۶/۷٪	۱۶ ۲۶/۷٪	۳۸ ۳۱/۷٪
ژنوتیپ AA	۸ ۱۳/۳٪	۲۶ ۴۳/۳٪	۳۴ ۲۸/۳٪
کل	۶۰ ۱۰۰٪	۶۰ ۱۰۰٪	۱۲۰ ۱۰۰٪



شکل (۴): فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت نرمال (AA)، هتروزیگوت (AG) و هموزیگوت موتانت (GG) در جایگاه rs1801260 ژن CLOCK در دو گروه بیمار و کنترل.

ارتباط معنی داری وجود دارد (P= ۰/۰۳۴). به عبارت دیگر پلی مورفیسم جایگاه rs1801260 در ژن CLOCK به طور معنی داری با خطر بروز بیماری مرتبط است.

همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، میزان P value محاسبه شده در آنالیز آماری کمتر از ۰/۰۵ به دست آمده است که نشان می دهد بین پلی مورفیسم rs1801260 و خطر بروز بیماری

جدول (۳): بررسی رابطه بین پلی مورفیسم rs1801260 و خطر بروز بیماری در دو گروه بیمار و کنترل

χ^2	P-Value	تعداد (درصد)			
		ژنوتیپ rs1801260			
		GG	AG	AA	
۰/۰۳۴	۶/۷۳۸	۲۶ (۴۳/۱۳)	۱۶ (۲۶۷/۱۷)	۱۸ (۳۰/۰)	نرمال
		۸ (۱۳/۳)	۲۲ (۳۶/۱۷)	۳۰ (۵۰/۰)	بیمار

پلی مورفیسم rs1801260 ژن CLOCK نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله نشان داده است که بین پلی مورفیسم rs1801260 و سبک زندگی بیماران ارتباط معنی داری وجود ندارد (P=0.270). به عبارت دیگر پلی مورفیسم rs1801260 در بیماران مستقل از سبک زندگی بیماران است (جدول ۴). بررسی آماری ارتباط بین سن افراد مورد مطالعه و پلی مورفیسم rs1801260 ژن CLOCK نیز نشان داده است که پلی مورفیسم rs1801260 ارتباط معنی داری با سن بیماران ندارد (P=0.943).

ارتباط آماری بین جنسیت بیماران و پلی مورفیسم rs1801260 نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، از آنجا که سطح معنادار آماری (P value) بیشتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده، بنابراین بین پلی مورفیسم rs1801260 و جنسیت بیماران ارتباط معنی داری وجود ندارد (P=0.924). به عبارت دیگر پلی مورفیسم rs1801260 بیماران مستقل از جنسیت است. همچنین ارتباط بین سبک زندگی افراد بیماران و وجود

جدول (۴): بررسی رابطه بین پلی مورفیسم rs1801260 با جنسیت و سبک زندگی بیماران

χ^2	P-Value	تعداد (درصد)				
		ژنوتیپ rs1801260				
		GG	AG	AA	کل	
۰/۹۲۴	۰/۱۵۸	۳۰ (۱۰۰/۰)	۴ (۱۳/۳)	۱۰ (۳۳/۳)	۱۶ (۵۳/۳)	مرد
		۳۰ (۱۰۰/۰)	۴ (۱۳/۳)	۱۲ (۴۰/۰)	۱۴ (۴۶/۷)	زن
۰/۲۷۰	۵/۱۷۱	۳۲ (۱۰۰/۰)	۶ (۱۸/۸)	۶ (۱۸/۸)	۲۰ (۶۲/۵)	مصرف کافئین بیش از ۳۰۰mg در روز
		۱۰ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۶ (۶۰/۰)	۴ (۴۰/۰)	مصرف الکل
		۱۸ (۱۰۰/۰)	۲ (۱۱/۱)	۱۰ (۵۵/۶)	۶ (۳۳/۳)	مشاغل مرتبط با شیفت شب

تنوع کیفیت خواب و ۴۰ درصد از تنوع الگوی خواب به علت تفاوت های ژنتیکی می باشد (۱، ۵). تنظیم سیستم ساعت شبانه روزی توسط مجموعه ای از ژن های شبانه روزی انجام می شود که ژن CLOCK یکی از مهم ترین ژن های این سیستم بوده و عملکرد اصلی آن فعال سازی رونویسی ژن های ساعت پایین دست می باشد (۵، ۶). محصول این ژن یک پروتئین حاوی ۸۴۶ اسید آمینه است که هم به عنوان یک فاکتور رونویسی و هم به عنوان یک

بحث و نتیجه گیری

اختلالات خواب شرایطی هستند که به واسطه ناهماهنگی بین ریتم های شبانه روزی داخلی با محیط خارجی به وجود می آیند و اختلال بی خوابی (Insomnia) یکی از مهم ترین انواع آن می باشد. اگرچه اثرات محیطی، اجتماعی و یا شغلی ممکن است منجر به اختلال خواب شوند، برخی از افراد نیز از نظر ژنتیکی مستعد ابتلا به این اختلالات هستند. تخمین زده می شود که حدود ۳۳ درصد از

در این راستا Mishima و همکاران گزارش دادند که پلی مورفیسیم (rs1801260) 3111T/C ژن CLOCK با ترجیح خواب عصر و زمان تأخیر خواب شبانه در جمعیت ژاپنی مرتبط است. بطوریکه هموزیگوت های G/G در مقایسه با افراد حامل آلل A به طور قابل توجهی مدت خواب کوتاه تر و افزایش خواب آلودگی در طول روز را نشان می دهند (۲۷). بالای وجود در مطالعه ای جدیدتر که توسط Sakurada و همکاران در جمعیت بزرگی (۱۳۹۷ نفر) از بزرگسالان بالای ۴۰ سال در ژاپن انجام شد، ارتباطی بین این پلی مورفیسیم با مشکل شروع خواب مشاهده نشد (۲۳).

همچنین در مطالعه انجام شده توسط Garaulet و همکاران نیز نشان داده شد که پلی مورفیسیم این جایگاه با اختلال خواب و کم خوابی در جمعیت اسپانیایی مرتبط است (۲۸). درحالیکه مطالعه انجام شده توسط Chang و همکاران و نیز مطالعه Choub و همکاران در جمعیت ایتالیایی و مطالعه pedrazolli و همکاران در جمعیت برزیلی ارتباطی بین پلی مورفیسیم rs1801260 و زمان خواب معمولی، فاز شبانه روزی، و یا ریتم شبانه روزی را نشان نداده است (۳۱-۲۹).

همچنین Ning و همکاران با مطالعه روی کارگران چینی شاغل در صنعت نفت نشان دادند که پلی مورفیسیم جایگاه rs1801260 CLOCK با ایجاد اختلال خواب در این افراد مرتبط است (۳۲). در مطالعه ای دیگر که توسط Shi و همکاران انجام شد، مشخص شد که پلی مورفیسیم جایگاه rs1801260 CLOCK به طور مؤثری با اختلالات خواب و نیز سلامت روان در جمعیت پرستاران چینی ارتباط دارد (۳۳). همچنین مطالعه بر روی جمعیت زنان یائسه قفقازی و آسیایی مبتلا به بی خوابی نیز ارتباط بین این پلی مورفیسیم را با ریتم شبانه روزی ملاتونین نشان داده است (۳۴).

از سوی دیگر مطالعه ای بر روی موش ها نشان داد که پلی مورفیسیم جایگاه rs1801260 CLOCK منجر به تفاوت در بیان این ژن بر اساس ژنوتیپ می شود، به طوری که در موش های حامل آلل جهش یافته، بیان بیشتر پروتئین CLOCK مشاهده شد (۱۵). بیان بالاتر CLOCK در حضور آلل G در برخی رده های سلولی مختلف انسانی نیز مشاهده شده است. از آنجاییکه این پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی در یک جایگاه میانکنش با-miRNA 182 قرار دارد می تواند نتایج مربوط به کاهش بیان آن را توجیه نماید (۳۵). بالای وجود در مطالعه ای که توسط Barragan و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی جمعیت افراد سالم اسپانیایی انجام شد مشخص شد که پلی مورفیسیم rs1801260 با میزان بیان ژن CLOCK ارتباط مؤثری ندارد (۱۴).

برخی مطالعات نیز ارتباط پلی مورفیسیم rs1801260 را با سایر اختلالات و بیماری ها از جمله اختلال بیش فعالی نشان داده اند (۳۶)

استیل ترانسفراز عمل می نماید (۱، ۷، ۱۹). مطالعات متعدد ارتباط بین پلی مورفیسیم های ژن ساعت شبانه روزی را با ویژگی های خواب و بی خوابی نشان داده اند. پلی مورفیسیم های تک نوکلئوتیدی عامل اصلی ایجاد تنوع ژنتیکی در جمعیت ها بوده و در ایجاد صفات فنوتیپی خاص مؤثرند (۲۰). بر اساس نتایج پروژه های ژنوم، در ژن CLOCK تعداد ۴۰۶ پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی (SNP) در جمعیت آفریقایی، ۲۷۱ پلی مورفیسیم در جمعیت اروپایی، ۲۷۸ پلی مورفیسیم در جمعیت آسیایی و ۲۷۷ پلی مورفیسیم در جمعیت قاره آمریکا شناسایی شده است (۲۱).

لذا در این مطالعه ارتباط بین پلی مورفیسیم جایگاه rs1801260 CLOCK با اختلال بی خوابی در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، در این جایگاه وجود آلل طبیعی A و آلل موتانت G و نیز ژنوتیپ های هموزیگوت طبیعی (AA)، هتروزیگوت (AG) و هموزیگوت موتانت (GG) در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شده است. همچنین نشان داده شد که پلی مورفیسیم این جایگاه رابطه معنی داری با اختلال کم خوابی دارد. بطوریکه درصد بیشتری از بیماران دارای ژنوتیپ GG و AG می باشند و به نظر می رسد که وجود ژنوتیپ های مختلف در جایگاه rs1801260 نقش مؤثری در ابتلا به بیماری بی خوابی دارد.

در رابطه با نقش پلی مورفیسیم ژن های تنظیم کننده ساعت شبانه روزی با اختلالات خواب، مطالعه انجام شده توسط Bragantini و همکاران نشان داد که ۱۶ پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی در ژن های مختلف ساعت از جمله ژن CRY1 و CLOCK به طور قابل توجهی با حداقل ۱ علامت بی خوابی مرتبط هستند (۲۲). همچنین سه مطالعه در مقیاس بزرگ از نوع مطالعه گسترده ارتباط ژنومی در جمعیت اروپایی و بریتانیایی انجام شد که در همه موارد سه نوع واریانت ژنتیکی در ژن PER2 به عنوان فاکتور خطر مرتبط با بی خوابی شناسایی شد (۲۳).

در همین رابطه و هم راستا با نتایج این مطالعه، پلی مورفیسیم rs1801260 A/G واقع در ناحیه ترجمه نشدنی (3'-UTR) ژن CLOCK، که منطقه مهمی برای پایداری، بیان و عملکرد mRNA است، به عنوان اولین پلی مورفیسیم مرتبط با اختلالات خواب شناسایی گردید و مشخص شد که در جمعیت اروپایی افراد حامل آلل G در این جایگاه، ۱۰ تا ۴۴ دقیقه تأخیر در زمان بندی ترجیحی برای فاز فعال خواب نشان می دهند (۲۴). با این حال، در برخی مطالعات نیز ارتباط بین این پلی مورفیسیم و آلل G با اختلالات خواب و ترجیح خواب عصرگاهی مشاهده نشد که می تواند به دلیل تفاوت ها و تنوع ژنتیکی در میان اقوام و جمعیت های مختلف و یا تأثیر سایر پلی مورفیسیم ها باشد (۲۵، ۲۶).

این افراد و از جمله کاهش میزان خواب و الگوی خواب افراد رابطه معنی‌داری دارد (۴۱).

در مجموع با توجه به اهمیت ژن CLOCK به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های ساعت در انسان که در توازن و زمان‌بندی ریتم‌های بیولوژیکی در سطح مولکولی نقش دارد، به نظر می‌رسد که هرگونه تغییر در این ژن شامل وقوع جهش‌ها و یا وجود پلی‌مورفیسم‌ها می‌تواند باعث بروز اختلال بی‌خوابی شود. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نیز نشان داده است که پلی‌مورفیسم جایگاه rs1801260 ژن CLOCK ارتباط معنی‌دار و مؤثری با بروز اختلال بی‌خوابی در بیماران ایرانی دارد. همچنین بر اساس نتایج پلی‌مورفیسم این جایگاه با جنسیت، سن، و سبک زندگی بیماران ارتباط معنی‌داری ندارد. بالای وجود برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر، پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیشتر در این زمینه بر روی تعداد بیشتری از بیماران و در جمعیت آماری بزرگ‌تر انجام شود. همچنین انجام بررسی در سایر استان‌ها و مناطق جغرافیایی ایران و نیز بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های ژن CLOCK می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

و ۳۷). مطالعه انجام‌شده توسط Pagliai و همکاران بر روی جمعیت ایتالیایی نشان داده است که افراد هموزیگوت برای آلل جهشیافته (GG) در جایگاه rs1801260 کمتر اضافه‌وزن دارند و دارای سطوح گلوکز ناشتا بالاتر و میزان افسردگی سالمندی بالاتری هستند (۱۲). همچنین شواهد متعدد حاصل از مطالعات مولکولی و مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که اختلال در سیکل شبانه‌روزی و ژن‌های مسئول آن با بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی همچون پارکینسون نیز مرتبط هستند (۳۸ و ۳۹). برخی مطالعات نیز ارتباط بین سایر پلی‌مورفیسم‌های ژن CLOCK شامل rs2070062 و rs6853192 و rs3792603 و rs11726609 را با اختلالات خواب و افزایش یا کاهش مدت‌زمان خواب نشان داده‌اند (۱۷، ۴۰).

تنها گزارش مربوط به ایران نیز ارتباط پلی‌مورفیسم rs1801260 3111 A/G ژن CLOCK را با میزان هورمون گرسنگی، زمان‌بندی غذا خوردن و میزان و الگوی خواب در بزرگسالان ایرانی دارای اضافه‌وزن و چاق بررسی نموده و نشان داده است که پلی‌مورفیسم این جایگاه با بسیاری از پارامترهای رفتاری

References:

- Liu C, Tang X, Gong Z, Zeng W, Hou Q, Lu R. Circadian Rhythm Sleep Disorders: Genetics, Mechanisms, and Adverse Effects on Health. *Front Genet* 2022;13:875342. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.875342>
- Meyer N, Harvey AG, Lockley SW, Dijk DJ. Circadian rhythms and disorders of the timing of sleep. *Lancet* 2022;400(10357):1061-78. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00877-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00877-7)
- Morin CM, Jarrin DC. Epidemiology of Insomnia: Prevalence, Course, Risk Factors, and Public Health Burden. *Sleep Med Clin* 2022;17(2):173-91.
- Kapoor V, Watson NF, Ball L. Chronic insomnia in the setting of MTHFR polymorphism. *J Clin Sleep Med* 2022;18(4):1215-18. <https://doi.org/10.5664/jcsm.9794>
- Ashbrook LH, Krystal AD, Fu YH, Ptáček LJ. Genetics of the human circadian clock and sleep homeostat. *Neuropsychopharmacology* 2020;45(1):45-54. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0476-7>
- Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(2):67-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
- Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet* 2017;18(3):164-79. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Lateef OM, Akintubosun MO. Sleep and Reproductive Health. *J Circadian Rhythms* 2020;18:1. <https://doi.org/10.5334/jcr.190>
- Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of Circadian Rhythms in Health and Disease. *Genome Med* 2009;11:82. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0>
- Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, et al. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(12):e1132-41.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1217154110>
- 11- Carroll JE, Cole SW, Seeman TE, Breen EC, Witarama T, Arevalo JMG, et al. Partial sleep deprivation activates the DNA damage response (DDR) and the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in aged adult humans. *Brain Behav Immun* 2016;2(51):223-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.024>
 - 12- Pagliai G, Sofi F, Dinu M, Sticchi E, Vannetti F, Molino Lova R, et al. CLOCK gene polymorphisms and quality of aging in a cohort of nonagenarians - The MUGELLO Study. *Sci Rep* 2019;9(1):1472. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37992-8>
 - 13- Chai R, Liao M, Ou L, Tang Q, Liang Y, Li N, et al. Circadian Clock Genes Act as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Glioma: Clinic Implications for Chronotherapy. *Biomed Res Int* 2022;2022:9774879. <https://doi.org/10.1155/2022/9774879>
 - 14- Barragán R, Sorlí JV, Coltell O, Gonzalez-Monje I, Fernández-Carrión R, Villamil LV, et al. Influence of DNA-Polymorphisms in Selected Circadian Clock Genes on Clock Gene Expression in Subjects from the General Population and Their Association with Sleep Duration. *Medicina (Kaunas)* 2022;16;58(9):1294. <https://doi.org/10.3390/medicina58091294>
 - 15- Ozburn AR, Purohit K, Parekh PK., Kaplan GN, Falcon E, Mukherjee S, et al. Functional implications of the CLOCK 3111T/C single-nucleotide polymorphism. *Front Psychiatry* 2016;7:67. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00067>
 - 16- Kripke DF, Nievergelt CM, Joo, E, Shekhtman T, Kelsoe JR. (2009). Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *J Circadian Rhythms* 2009;7(2):3-25. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-7-2>
 - 17- Zhang L, Ptáček LJ, Fu YH. Diversity of human clock genotypes and consequences. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;119:51-81.
 - 18- Naylor E, Bergmann BM, Krauski K, et al. The circadian clock mutation alters sleep homeostasis in the mouse. *J Neurosci* 2000;20(21):8138-43. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-21-08138.2000>
 - 19- Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P. Circadian Regulator Clock Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 2006;125(3):497-508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033>
 - 20- Fedorova L, Khrunin A, Khvorykh G, Lim J, Thornton N, Mulyar OA, et al. Analysis of Common SNPs across Continents Reveals Major Genomic Differences between Human Populations. *Genes (Basel)* 2022;13(8):1472. <https://doi.org/10.3390/genes13081472>
 - 21- The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526:68-74.
 - 22- Bragantini D, Sivertsen B, Gehrman P, Lydersen S, Guzey IC. Variations in circadian genes and individual nocturnal symptoms of insomnia. The HUNT study. *Chronobiol Int* 2019;36:681-88. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1582540>
 - 23- Sakurada K, Konta T, Takahashi S, Murakami N, Sato H, Murakami R, et al. Circadian Clock Gene Polymorphisms and Sleep-Onset Problems in a Population-Based Cohort Study: The Yamagata Study. *Tohoku J Exp Med* 2021;255(4):325-31. <https://doi.org/10.1620/tjem.255.325>
 - 24- Katzenberg D, Young T, Finn L, et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* 1998;21(6):569-76. <https://doi.org/10.1093/sleep/21.6.569>
 - 25- Allebrandt KV, Roenneberg T. The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(8):716-21. <https://doi.org/10.1590/s0100->

- 879x2008000800013
- 26- von Schantz M. Phenotypic effects of genetic variability in human clock genes on circadian and sleep parameters. *J Genet* 2008;87(5):513-19. <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0074-7>
- 27- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H, Mishima Y. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005;133(1):101-4. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30110>
- 28- Garaulet M, Sanchez-Moreno C, Smith CE, Lee YC, Nicolas F, Ordovas JM. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss. *PLoS One* 2011;6(2):e17435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017435>
- 29- Chang AM, Buch AM, Bradstreet DS, Klements DJ, Duffy JF. Human diurnal preference and circadian rhythmicity are not associated with the CLOCK 3111C/T gene polymorphism. *J Biol Rhythms* 2011;26(3):276-9. <https://doi.org/10.1177/0748730411402026>
- 30- Choub A, Mancuso M, Coppede F, LoGerfo A, Orsucci D, Petrozzi L, et al. Clock T3111C and Per2 C111G SNPs do not influence circadian rhythmicity in healthy Italian population. *Neurol Sci* 2011;32:89-93. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0415-1>
- 31- Pedrazzoli M, Louzada FM, Pereira DS, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Martynhak BJ, et al. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the Brazilian population. *Chronobiol Int* 2007;24(ja 2007):1-8. <https://doi.org/10.1080/07420520601139789>
- 32- Ning L, Shi L, Tao N, Li R, Jiang T, Liu J. Effects of Occupational Stress and Circadian CLOCK Gene Polymorphism on Sleep Quality of Oil Workers in Xinjiang, China. *Med Sci Monit* 2020;26:e924202. <https://doi.org/10.12659/msm.924202>
- 33- Shi L, Liu Y, Jiang T, Yan P, Cao F, Chen Y, et al. Relationship between Mental Health, the CLOCK Gene, and Sleep Quality in Surgical Nurses: A Cross-Sectional Study. *Biomed Res Int* 2020;2020:4795763. <https://doi.org/10.1155/2020/4795763>
- 34- Semenova NV, Madaeva IM, Bairova TA, Zhambalova RM, Sholokhov LF, Kolesnikova LI. Association of the melatonin circadian rhythms with clock 3111T/C gene polymorphism in Caucasian and Asian menopausal women with insomnia. *Chronobiol Int* 2018;35:1066-1076. <https://doi.org/10.1080/07420528.2018.1456447>
- 35- Saus E, Soria V, Escaramis G, Vivarelli F, Crespo JM, Kagerbauer B, et al. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator. In major depression patients with late insomnia. *Hum Mol Genet* 2010;19:4017-25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq316>
- 36- Xu X, Breen G, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct* 2010;6:48. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-48>
- 37- Carpena MX, Hutz MH, Salatino-Oliveira A, Polanczyk GV, Zeni C, Schmitz M, et al. CLOCK Polymorphisms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further Evidence Linking Sleep and Circadian Disturbances and ADHD. *Genes* 2019;10(2):88. <https://doi.org/10.3390/genes10020088>
- 38- Hunt J, Coulson E.J., Rajnarayanan R., Oster H., Videnovic A., Rawashdeh O. Sleep and circadian rhythms in Parkinson's disease and preclinical models. *Mol Neurodegener* 2022;17:2. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00504-w>
- 39- Leng Y., Musiek E.S., Hu K., Cappuccio F.P.,

- Yaffe K. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 2019;18:307-18. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30461-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30461-7)
- 40- Riestra P, Gebreab SY, Xu R, Khan RJ, Gaye A, Correa A, et al. Circadian CLOCK gene polymorphisms in relation to sleep patterns and obesity in African Americans: findings from the Jackson heart study. *BMC Genet* 2017;18(1):58. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0522-6>
- 41- Rahati S, Qorbani M, Naghavi A, Heidari nia M, Pishvahm, H. Association between CLOCK 3111 T/C polymorphism with ghrelin, GLP-1, food timing, sleep and chronotype in overweight and obese Iranian adults. *BMC Endocr Disord* 2022; 22. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-01063-x>

ANALYSIS OF CLOCK GENE RS1801260 POLYMORPHISM IN IRANIAN PATIENTS WITH INSOMNIA

Delaram Gholamalaian¹, Maryam Zare^{2*}

Received: 12 May, 2023; Accepted: 11 July, 2023

Abstract

Background and Aims: Circadian rhythms are natural processes that regulate the sleep-wake cycle and are repeated approximately every 24 hours and controlled by an internal circadian clock. Incorrect functioning of the circadian clock system disrupts the normal sleep pattern. The molecular regulation of this system is done by several clock genes, the most important of which is the CLOCK gene that encodes a transcription factor that plays a central role in regulating the molecular circadian clock. In this study, the rs1801260 polymorphism of the CLOCK gene was investigated in Iranian patients with insomnia.

Materials and methods: In this study, 60 blood samples were collected from people with profound problems of insomnia, inability to control sleep and irregular sleep as the patient group and 60 samples from people without any history of insomnia or sleep disorder as the control group. Then DNA was extracted and rs1801260 polymorphism was assessed by ARMS-PCR using specific primers for normal and mutated alleles and the results were analyzed.

Results: According to the results, 50% of patients had GG, 36.7% had AG and 13.3% had AA genotype. In the control group, the frequency of GG, AG and AA genotypes was 30%, 26.7% and 43.3%, respectively. Also, this polymorphism is significantly associated with insomnia in patients ($p < 0.05$) and has no significant relationship with gender, age and lifestyle of patients.

Conclusion: These findings show that the rs1801260 polymorphism and the presence of the G allele in this position have a significant relationship with sleep disorder and it seems to play an important role in occurrence of insomnia in the Iranian population. Therefore, checking the CLOCK gene in patient or susceptible people can be helpful for effective prevention and treatment of the disease.

Keywords: Circadian Rhythm, CLOCK Gene, Insomnia, Polymorphism, rs1801260

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, P. O. BOX. 19395-4697, Nakhil St, Artesh Blv, Tehran, Iran

Tel: +989122787951

Email: m_zare@pnu.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(4): 234 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ MSc student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Shahre Rey, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
(Corresponding Author)