



بررسی تغییرات بیان miR-6165 در سرطان پستان و تاثیر آن در میزان رشد و مهاجرت سلولی

سید عمر ابراهیمی^{۱*} (MSc)، سمیه رئیسی^{۱**} (PhD)

^۱ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۳۰ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۷/۲۱)

چکیده

مقدمه: در سرطان، ncRNA به عنوان رانندگان آنکوژنیک و سرکوب کننده‌های تومور در سرطان شناخته شده‌اند؛ اگر چه انواع زیادی از آن‌ها گزارش شده است، بیشترین موارد مطالعه روی microRNA انجام گرفته است. miRNAها در فرایندهای مهمی مانند همئوستازی، رگزایی، تکثیر سلولی و آپوپتوز دخیل هستند. miR-6165 در ژن P75NTR قرار دارد، برای القاء آپوپتوز در رده‌های سلولی کلورکتال شناسایی و یک مطالعه نقش مهارکنندگی تومور در سرطان کلورکتال را برای آن پیشنهاد داده است. اما مکانیسم عملکرد آن در سرطان پستان هنوز کاملاً مشخص نشده است. بنابراین، هدف این مطالعه، بررسی سطح بیان و اثر miR-6165 روی تکثیر و مهاجرت سلولی در سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: ۵۰ بافت توموری و غیرتوموری مجاور در مطالعه وارد شدند. سطح بیان miR-6165 در رده‌های سلولی سرطان پستان و بافت‌های توموری توسط qPCR بررسی شد. pre-mir-6165 در وکتور pEGFPN1 کلون شد. به دنبال آن، سلول‌های سرطانی MCF7 کشت داده شدند و وکتور حاوی pre-miR-6165 به سلول‌ها ترانسفکت شدند. اثر بر روی تکثیر و مهاجرت سلولی به ترتیب توسط روش MTT و تست خراش مطالعه شدند. آنالیز بیوانفورماتیک (غنی سازی و ژن‌های کلیدی هدف miRNA) انجام شد.

یافته‌ها: میزان بیان miR-6165 در بافت‌های توموری و رده‌های سلولی پستان افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش بیان miR-6165 به طور مستقیم با متاستاز در ارتباط بود. miR-6165 تکثیر و مهاجرت را در رده سلولی سرطان پستان افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: miR-6165 ممکن است به عنوان آنکو میر عمل کند و رشد و مهاجرت سلولی را افزایش دهد و در نتیجه به عنوان یک هدف درمانی برای سرطان پستان در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: miR-6165، سرطان پستان، انکو میر، تکثیر سلولی

**شهرکرد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد

مقدمه

MicroRNA (miRNA) ها، یک دسته بزرگ از RNAهای غیرکدکننده درون سلولی می‌باشند که حدود ۱۹ تا ۲۲ نوکلئوتید طول دارند. این مولکول‌ها بیان ژن‌های هدف را با هیبرید شدن در ناحیه غیرترجمه‌ای^۱ رونوشت ژن هدف، به‌طور منفی تنظیم می‌کنند. این عملکرد سبب می‌شود رونوشت ژن هدف تجزیه شده و یا ترجمه آن مهار شود (۱). یک miRNA می‌تواند چندین ژن را کنترل نموده و یک ژن نیز به‌وسیله چندین miRNA تنظیم می‌شود و به این صورت در فرایندهای مهمی مانند تنظیم سیستم ایمنی، همئوستازی، رگزایی، تکوین سلولی، تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز دخیل هستند (۲-۵). کاهش یا افزایش در بیان miRNAها در تومورهای مختلف سرطانی گزارش شده است. بعضی miRNAها با توجه به این حالت به عنوان انکوژن و یا مهارکننده تومور مورد توجه قرار می‌گیرند (۶ و ۷). این مولکول‌ها در شروع و پیشرفت سرطان با مهار ژن‌های وابسته به سرطان درگیر هستند (۸). تفاوت در بیان miRNA در سرطان‌های مختلف می‌تواند به علت تفاوت‌های موجود بین منشاء سلول سرطانی و بافت استرومایی اطراف آن باشد. با مطالعه ۴۸ miRNA در بافت‌های توموری متاستازی و یا اولیه و همچنین مایع سرمی با هدف بررسی منشأ تومور، الگوی بیان miRNAها برای آنالیز ۵ نوع سرطان (پروستات، کولون، تخمدان، پستان و ریه) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آنالیز سبب تمایز بیماران سرطانی ریه و کولون، با الگوی خاص بیان miRNA شد. بنابراین، چنین فاکتورهایی

می‌توانند اثرانگشتی را برای بدخیمی‌های مختلف فراهم کند (۹ و ۱۰).

سرطان پستان رشد مهار نشده سلول‌های غیرطبیعی است که در بافت‌های مختلف پستان مانند مجاری انتقال‌دهنده شیر، بافت تولیدکننده شیر و یا در بافت غیرغددی رخ می‌دهد. این بیماری شایع‌ترین نوع سرطان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است (۱۱). در این ناهنجاری، تشخیص زودهنگام برای بیماران کلیدی است؛ به‌طوری که نرخ بقا به مدت ۵ سال پس از تشخیص برای بیماران در مرحله ۰، ۱ یا ۲ بیشتر از ۹۰ درصد است. تقریباً ۱۰ درصد از بیماران در مراحل ۳ و ۴ قرار دارند. در موارد پیشرفته شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هرسپتین و سایر روش‌ها برای معالجه مورد استفاده قرار می‌گیرند اما درمان رخ نمی‌دهد (۱۲). سرطان پستان به چندین زیرمجموعه تقسیم شده است: لومینال A، لومینال B، غنی از گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی نوع ۲، شبه بازال^۳، کلودین پایین^۴ و شبه نرمال^۵ (۱۳). در عمل این زیرمجموعه‌ها بر اساس ترکیبی از تجزیه و تحلیل ایمونوهیستوشیمی گیرنده‌های استروژن (ER)، گیرنده پروژسترون (PgR) و بیان ERBB2 و شاخص برچسب‌گذاری Ki67^۶ شناسایی می‌شوند (۱۴). این طبقه‌بندی انتخاب مناسب عوامل هورمونی و شیمی‌درمانی و عواملی که ERBB2 را در طی درمان سرطان پستان هدف قرار می‌دهند تسهیل می‌کند.

مطالعه پروفایل miRNA در رده‌ها و نمونه‌های سرطانی پستان، miRNAهای متعددی را که در سرطان پستان دچار تغییر می‌شوند شناسایی کرده است.

¹ 3'UTR

² ERBB2+

³ basal-like

⁴ claudin-low

⁵ normal-like

⁶ Ki67 labeling index

مطالعات عملکردی برای تعدادی از این miRNAها، هر دو نقش انکوژنی و مهارکنندگی تومور را مشخص کرده است. بنابراین هدف‌گیری این مولکول‌ها می‌تواند به عنوان گزینه‌ای برای درمان سرطان به کار رود. مسیرهای قابل قبول برای درمان شامل کسب^۷ و یا حذف^۸ عملکرد miRNA در سلول‌های سرطانی می‌باشد. اخیراً در درمان سرطان‌ها از خود miRNAها به تنهایی یا همراه با داروها، شیمی درمانی و رادیوتراپی استفاده شده است (۱۵). بنابراین در این مطالعه یکی از miRNAهای دارای تغییر بیان (miR-6165) در سلول‌های مختلف سرطان سینه مورد توجه قرار گرفت. miR-6165 انسانی برای اولین بار توسط سلطانی و همکاران مورد شناسایی قرار گرفت (۱۶). در این مطالعه بررسی بیان این miRNA بر روی رده‌های مختلف سرطانی مانند سلول‌های سرطانی معده، گردن رحم، کولون انجام و کاهش در بیان آن مشخص شد (۱۷). بنابراین با توجه به اینکه میان مطالعات قبلی و پژوهش حاضر بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان تناقضی برای بیان miR-6165 مشاهده شد، به بررسی بیشتر این miRNA پرداخته شد. در این مطالعه، بررسی تغییرات بیان miR-6165 در بافت‌های توموری پستان انجام شد و اثر القاء آن بر روی تکثیر و مهاجرت سلولی مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تعیین میزان بیان miR-6165 در رده‌های سلولی و بافت توموری سینه
در مطالعه حاضر برای مشخص شدن میزان بیان miR-6165 در رده‌های مختلف سرطان سینه، ابتدا رده‌های سلولی کشت داده شدند و سپس RNA تام

سلولی توسط محلول RNX-Plus استخراج شد. رده‌های استفاده شده در این مرحله شامل MCF-7، MDA-MB-231، T47D و BT-549 بودند. در ادامه توسط کیت سنتز cDNA مخصوص miRNA (BONmiR-Tehran) سنتز DNA مکمل (cDNA) انجام شد. در این سنتز واکنش پلی‌آدنیلایسون و سپس رونویسی معکوس انجام شده و RNA پلی‌آدنیل به cDNA مربوطه تبدیل می‌گردد، و در نهایت، واکنش Real-time PCR انجام می‌شود. برای مشخص شدن بیان miR-6165 در بافت‌های سرطانی، بافت‌های پارافینه توموری و سالم مجاور آن از بخش پاتولوژی بیمارستان تهیه شدند. لازم به ذکر است تمام موارد اخلاقی برای حفظ اطلاعات و ناشناس بودن افراد در نظر گرفته شد و نمونه‌های دریافت شده در کمیته پژوهشی و اخلاق دانشگاه به شماره ۰۰۵. ۱۳۹۷. IR.SKU.REC مورد تأیید قرار گرفتند.

نمونه‌ها که شامل ۵۰ نمونه بافت توموری پستان و ۵۰ نمونه بافت غیرتوموری مجاور بودند، توسط متخصص پاتولوژی تأیید و پس از ثبت اطلاعات پاتولوژیک و بالینی (اندازه تومور، متاستاز و درجه توموری) برش‌گیری شدند. برش توسط دستگاه میکروتوم از بلوک‌های پارافینه، به اندازه حدود ۲۰ میکرون صورت گرفت و برش‌ها (حدود ۳ برش) داخل میکروتیوب‌ها قرار گرفتند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه نگهداری شده‌اند. برای استخراج RNA از بافت‌ها، کیت مخصوص استخراج RNA از بافت پارافینه شده مورد استفاده قرار گرفت (MN: NucleoSpin® totalRNA FFPE- (Macherey Nagel- Germany). به منظور سنتز

⁷ Gain of function

⁸ Loss of function

ترانسفکشن وکتور نوترکیب به رده سلولی سرطان پستان

بررسی اثر miR-6165 بر روی رده سلولی MCF-7 انجام شد. میزان ترانسفکت در این رده سلولی اپیتلیالی نسبت به سایر رده‌های سرطان پستان بیشتر است. این رده سلولی دارای منشاء بافتی کارسینومای داکتال بوده و دارای خاصیت متاستازی است. در بررسی عملکرد miR-6165، از وکتور دارای ساختار حاوی miR-67 گونه C.elegance به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در ابتدا سلول‌ها در پلیت ۶ خانه با تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، پلاسمیدهای کنترل و miR-6165 با روش لیپوفکتامین به سلول‌های مورد نظر ترانسفکت شدند. برای بهینه‌سازی ترانسفکشن، از محیط بدون سرم و بدون آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، سلول‌ها میکروسکوپ فلورسنت برای مشخص کردن بازده ترانسفکت مورد بررسی قرار گرفتند. برای تأیید تولید miR-6165 بالغ از وکتورهای منتقل شده به سلول، از روش Real-time PCR استفاده شد. در این بررسی سلول‌های ترانسفکت شده با miRNA اختصاصی با سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور کنترل مقایسه شدند.

بررسی اثر miRNA بر تکثیر و مهاجرت سلولی تکثیر و مهاجرت سلولی به‌ترتیب با روش MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)3-2,5-) (diphenyltetrazolium bromide) و تست خراش سلولی انجام شد. در روش MTT، ابتدا سلول‌ها در پلیت ۶ خانه کشت داده می‌شوند و ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن، در پلیت ۹۶ خانه به میزان ۱۰^۵ سلول/چاهک کاشته می‌شود. سپس در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار با MTT انجام شده و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای

cDNA از روش ذکر شده در مراحل قبل (پلی‌آدنیلایسون) بهره گرفته شد و در نهایت واکنش qPCR برای cDNAهای سنتز شده بافتی و همچنین رده‌های سلولی با استفاده از پرایمر اختصاصی miR-6165 انجام شد و داده‌های به‌دست آمده با روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ آنالیز شدند. برای مشخص شدن تغییرات بیان، روش آنالیز نسبی انجام شد که در آن میزان بیان ژن در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های سالم مجاور و با استفاده از ژن U6 مقایسه شدند.

همسانه‌سازی pre-mir-6165

به‌منظور ایجاد ساختار وکتوری pre-miR-6165، ابتدا قطعه حاوی توالی پیش‌ساز miRNA توسط پرایمرهای F:TCGAAAGCTTAGGGTGCAGCAGGTCAGC R:TCGAGGTACCGGGGTGGGAGTCAGG و GA توسط روش PCR تکثیر شد. در مرحله بعد وکتور pEGFP-N1 با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Favor Gene- تایوان) خالص‌سازی شد. وکتور و قطعه تکثیر شده pre-mir-6165 در واکنش‌های جداگانه توسط آنزیم‌های برشی KpnI و HindIII برش داده شدند تا برای مرحله بعد یعنی اتصال قطعه به وکتور آماده گردند. در این مرحله با استفاده از آنزیم لیگاز T4، به مدت ۳ ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش اتصال انجام شد. سپس آزمایشات با ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب ایجاد شده به سلول‌های مستعد DH5 α ادامه یافت. بعد از زمان حدود ۱۸ ساعت بر روی کلونی‌ها رشد کرده در پلیت آگار، فرایند کلونی PCR انجام شد. کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای مستقیم CMV و معکوس GFPN صورت گرفت تا مشخص شود کلونی‌ها حاوی پلاسمید نوترکیب هستند. بعد از آن برای تأیید نهایی همسانه‌سازی تعیین توالی وکتور نوترکیب انجام شد.

شامل TargetScane، miRMap، miRDIP، miRTarbase، PicTar، MirWalk، Miranda، miRDB، RNAHybrid، MicroT4، RNA22، PITA، miRTar2GO و miRBridge بودند (۱۸). پایگاه‌های داده ذکر شده بر اساس الگوریتم‌های متفاوت عوامل اثرگذار مختلفی مانند: نوع جایگاه‌های موجود در mRNA، تعداد جایگاه‌ها، فاصله جایگاه‌ها از یکدیگر، ترکیب بازی در 3'UTR، درصد AU، طول 3'UTR، تعداد هدف‌های miRNA مورد نظر در سایر mRNAها و در نتیجه میزان در دسترس بودن آن، انرژی دوپلکس^۹ و انرژی اتصال^{۱۰} ژن‌های هدف miRNAهای مختلف را پیشگویی و امتیازدهی می‌کنند.

آنالیز غنی‌سازی^{۱۱} و تشخیص ژن‌های هدف کلیدی

به منظور دسترسی به ویژگی‌های عملکردی احتمالی مجموعه‌های ژنی به دست آمده، آنالیز غنی‌سازی با استفاده از سرور Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) انجام شد. برای بررسی برهمکنش پروتئینی بین ژن‌های به دست آمده مجموعه ژنی به پایگاه داده STRING (<https://string-db.org>) داده شد و با هدف دستیابی به آماره‌های شبکه و مجسم سازی شبکه از نظر برهمکنش ژنی، از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد. پس از آنالیز شبکه، ژن‌های کلیدی توسط نرم‌افزار مشخص شدند.

یافته‌ها

بیان نسبی miR-6165 در رده‌های سلولی سرطان پستان (MCF-7، MDA-MB-231، T47D و

ارزیابی اثر القاء miRNA اختصاصی، نمودار نسبت به کنترل رسم می‌شود. در بررسی میزان مهاجرت سلولی تحت تأثیر miR-6165، ابتدا سلول‌ها در تراکم ۹۰ درصد کاشته می‌شوند، بعد از ترانسفکت سلول‌ها با وکتور نوترکیب، یک خراش به صورت عمودی در قسمت مرکزی پلیت توسط سرسمپلر ایجاد می‌شود. سلول‌ها با این خراش از مرکز پلیت حذف می‌شوند. برای خارج کردن سلول‌های جدا شده از محیط، یک شستشو با محلول PBS انجام شده و محیط تازه به پلیت اضافه می‌گردد. عکس برداری از سلول‌ها در ساعت‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ صورت گرفت و سپس میزان بسته شدن خراش با نرم‌افزار ImageJ ویرایش ۲۰۲۰ آنالیز شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده به وسیله نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ مورد تحلیل آماری قرار گرفتند؛ از آزمون ANOVA یک طرفه و نیز آزمون T-test مستقل، با توجه به تعداد گروه‌ها، جهت بررسی و وجود ارتباط و میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده گردید. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد در سطح معنی‌داری کوچک‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شدند. برای رسم نمودارها در هر آنالیز از نرم‌افزار GraphPad Prism ویرایش ۸/۰۱ استفاده شد.

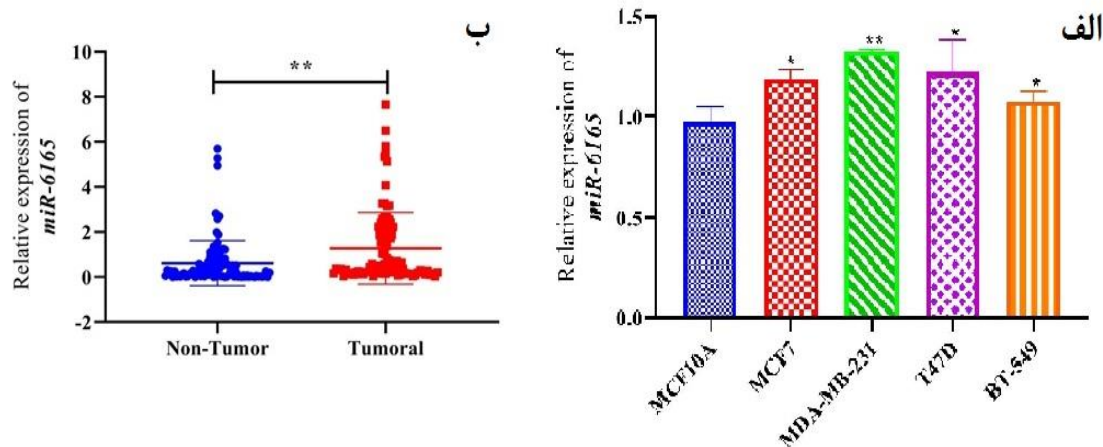
بررسی ژن‌های هدف miRNA

برای بررسی ژن‌های هدف miRNA از ۱۴ پایگاه داده استفاده شد. ژن‌هایی که توسط حداقل ۷۰ درصد از پایگاه‌های داده تایید شدند، به عنوان هدف miRNA انتخاب شدند. پایگاه‌های داده استفاده شده در این مرحله

^۹ ΔG duplex
^{۱۰} ΔG binding
^{۱۱} Enrichment

درجه توموری ۳ بودند. بررسی بیان در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های غیرتوموری نیز افزایش بیان miRNA به صورت معناداری نشان داد ($p < 0.007$) (شکل ۱-ب). برای ارزیابی اختصاصیت و حساسیت بیان miR-6165 به منظور تمایز میان نمونه‌های توموری و غیرتوموری آنالیز منحنی عملیاتی گیرنده^{۱۲} (ROC) رسم شد. سطح زیر منحنی (AUC) برای miR-6165 برابر با ۶۶ درصد ($p < 0.0005$) می‌باشد، و در نتیجه این احتمال که miRNA می‌تواند به عنوان یک تومور مارکر مناسب برای سرطان پستان باشد کاهش می‌یابد (شکل ۲-الف).

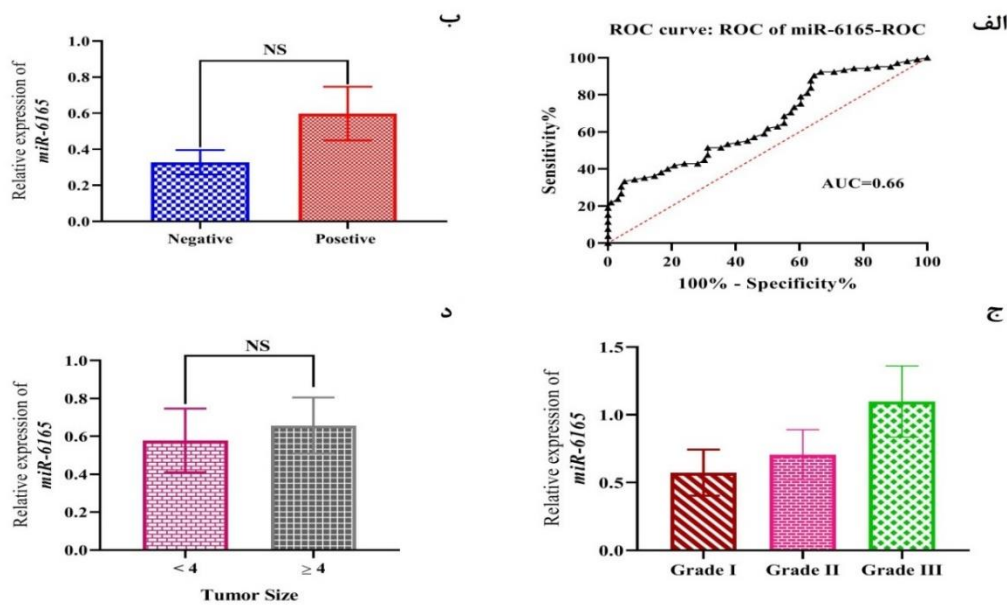
و نمونه‌های توموری پستان و غیرتوموری (BT-549) مجاور تعیین شد. داده‌ها نشان داد که بیان miR-6165 به صورت معناداری در رده‌های سرطانی پستان نسبت به رده سالم (MCF-10A) افزایش قابل توجهی دارد ($p > 0.01$) (شکل ۱-الف). در خصوص نمونه‌های توموری، مطابق با بررسی دموگرافیک، نمونه‌ها دارای محدوده سنی ۲۵ الی ۷۰ سال با میانگین ۴۸ سال بودند. ۴۸ درصد از بافت‌ها به صورت متاستاز مثبت بوده و میانگین اندازه تومور در نمونه‌ها حدود ۴ سانتی‌متر تأیید شد. از نظر درجه توموری ۳۳ درصد از افراد درجه تومور ۱، ۵۱ درصد درجه توموری ۲ و ۲۰ درصد دارای



شکل ۱) نمودار میزان بیان miR-6165 در الف) رده‌های سلولی سرطان پستان در مقایسه با رده سالم سینه ب) بافت‌های توموری سینه در مقایسه با بافت سالم مجاور

Fig 1) Diagram of miR-6165 expression in a) Breast cancer cell lines compared to normal mammary cell b) Breast tumor tissues compared with normal adjacent tissue

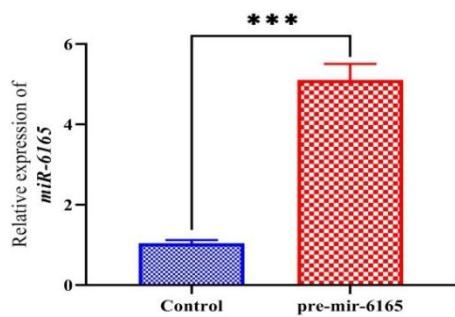
¹² receiver operating characteristic curve



شکل ۲) الف) منحنی ROC سطح زیر منحنی ۶۶ درصد را نشان می‌دهد. ب) میزان بیان مقایسه‌ای miR-6165 در نمونه‌های متاستاز منفی و مثبت (ج). درجه توموری ۱ تا ۳ (د). میانگین سایز توموری کوچک‌تر و بزرگ‌تر از ۴

Fig 2) a) ROC curve displays the area under the curve of 66%. B) Comparative expression of miR-6165 in negative and positive metastasis samples (c). Tumor grade 1 to 3 (d). The average tumor size is smaller and larger than 4

qPCR ارزیابی شد. مشخص شد که ساختار طراحی شده برای تولید miRNA بالغ بهینه بوده و به میزان ۵ برابر در سلول‌های ترانسفکت شده نسبت به کنترل بیان می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳) میزان بیان miR-6165 بالغ در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب

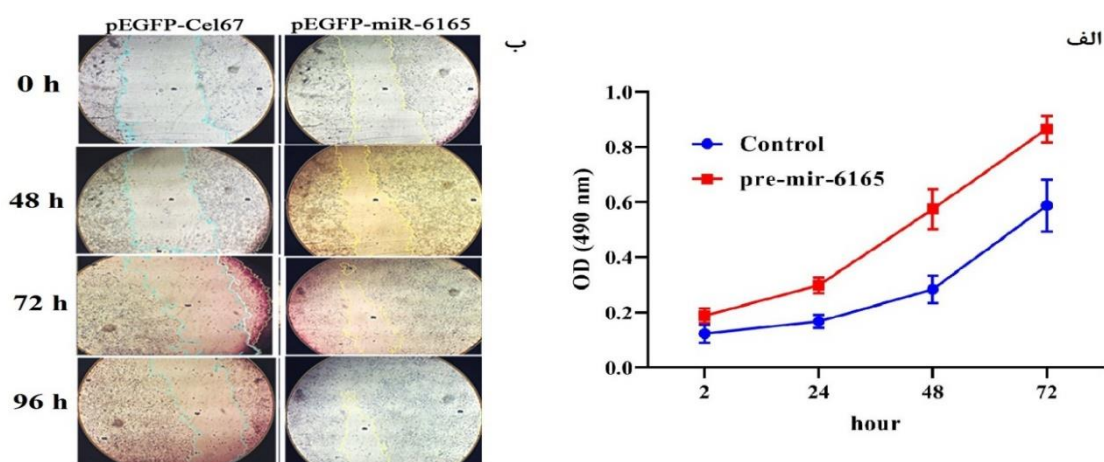
Fig 3) Expression of mature miR-6165 in cells transfected with recombinant vector

مطابق با آنالیزهای انجام شده افزایش بیان miR-6165 در نمونه‌های متاستازی نسبت به غیرمتاستازی نشان داده شد، اما این افزایش بیان از نظر آماری معنادار نبود (شکل ۲-ب). $(p=0/11)$ ارتباط میزان بیان ژن با درجه‌های توموری ۱ تا ۳ نیز سنجیده شد (شکل ۲-ج)، در این بررسی میزان افزایش در درجه ۳ توموری مشاهده شد $(p=0/05)$. در بررسی ارتباط بیان ژن با اندازه توموری، با توجه به اینکه میانه اندازه تومورها در حدود ۴/۱ سانتی‌متر محاسبه شد، نمونه‌ها به دو دسته اندازه تومور کوچک‌تر از ۴ سانتی‌متر و بزرگ‌تر و مساوی ۴ سانتی‌متر تقسیم شدند. مقایسه بیان ژن در هر دو گروه انجام شد (شکل ۲-د) و تفاوت معناداری در میزان بیان miR-6165 در این دو گروه مشاهده نشد $(p>0/05)$.

در بررسی القاء miR-6165 به رده سلولی، ابتدا بیان miRNA بالغ در ساختارهای طراحی شده با روش

از تست خراش استفاده شد. پس از ترانسفکت سلول‌ها و بررسی مهاجرت تحت تأثیر وکتور حاوی pre-mir-6165، مشخص شد که در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت، اثر به صورت تسریع مهاجرت سلولی می‌باشد. به صورتی که بعد از گذشت این زمان، منطقه خراش داده شده کاملاً توسط سلول‌ها پوشانده شد (شکل ۴-ب).

برای مشخص شدن تأثیر miRNA القاء شده به سلول بر تکثیر سلولی، ترانسفکشن در پلیت‌های ۹۶ خانه با لیپوفکتامین انجام شد. شکل ۴-الف نمودار جذب در ۴۹۰ برای سلول‌های MCF-7 در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ می‌باشد و مطابق با نمودار ترانسفکت وکتور حاوی pre-mir-6165 بر روی افزایش تکثیر سلول‌های MCF-7 تأثیر قابل توجهی دارد. به منظور مشخص شدن اثر بر مهاجرت سلولی،



شکل ۴) تأثیر ترانسفکت با وکتور حاوی pre-mir-6165 بر روی میزان تکثیر سلولی (الف) مهاجرت سلولی (ب)

Fig 4) Effect of transfection with vector containing pre-mir-6165 on cell proliferation (a) Cell migration (b)

PI3K، سیگنالینگ با واسطه سایتوکاین‌ها و مسیر سیگنالینگ MAPK می‌باشد. ۱۵ مورد از مسیرهای عملکردی و سیگنالینگ‌های سلولی در جدول ۱ نمایش داده شده است.

آنالیز غنی‌سازی با استفاده از پایگاه Enrichr نشان داد که عملکردها و سیگنالینگ‌های مهمی که اهداف miR-6165 در آن درگیر است، به تنظیم مهاجرت سلولی، سیگنالینگ با رسپتور تیروزین کیناز، تنظیم فعالیت تیروزین کینازی، تنظیم اتصالات سلولی،

نام مسیر	P-value	همگرا P-value	Odds Ratio	امتیاز ترکیبی
مسیر سیگنالینگ آدیپوکتین	۰/۰۰۰۰۲۷۰۶	۰/۰۰۲۷۷۹	۷/۹۹	۸۴/۰۱
مسیر سیگنالینگ MAPK	۰/۰۰۰۰۰۴۶۶۲	۰/۰۰۰۰۱۴۳۶	۴/۸۰	۸۱/۱۱
استرس شکاف مایعات و آرترواسکلروز	۰/۰۰۰۰۱۱۶۰	۰/۰۰۱۷۸۷	۵/۶۶	۶۴/۳۸
بیوستز اسیدهای چرب	۰/۰۱۱۴۳	۰/۱۰۳۵	۱۲/۱۱	۵۴/۱۷
مسیر سیگنالینگ نوروتروفین	۰/۰۰۰۱۴۱۲	۰/۰۰۰۸۷۰۱	۵/۲۹	۴۶/۹۳
متابولیسم گلیسرولیپید	۰/۰۰۱۰۵۸	۰/۰۲۰۳۷	۶/۴۵	۴۴/۲۲
هدایت آکسونی	۰/۰۰۰۱۱۰۶	۰/۰۰۰۸۵۱۳	۴/۳۵	۳۹/۶۳
مقاومت انسولین	۰/۰۰۰۴۶۰۱	۰/۰۱۷۷۱	۵/۱۰	۳۹/۲۲
عدد درون ریز و عوامل جذب مجدد کلسیم	۰/۰۰۳۱۸۹	۰/۰۳۷۷۸	۶/۵۶	۳۷/۷۲
مسیر سیگنالینگ انسولین	۰/۰۰۰۳۷۰۳	۰/۰۱۶۲۹	۴/۶۰	۳۶/۳۳
کاردیومیوپاتی بطن راست (ARVC)	۰/۰۰۲۲۲۴	۰/۰۳۳۱۳	۵/۴۷	۳۳/۴۰
تهاجم باکتریایی به سول های اپیتلیالی	۰/۰۰۲۵۰۸	۰/۰۳۳۵۹	۵/۳۲	۳۱/۸۶
مسیر سیگنالینگ PPAR	۰/۰۰۲۵۰۸	۰/۰۳۲۱۹	۵/۳۲	۳۱/۸۶
سرطان پروستات	۰/۰۰۱۴۹۱	۰/۰۲۴۱۷	۴/۸۷	۳۱/۷۰
مسیر سیگنالینگ فسفولیپاز D	۰/۰۰۰۶۱۹۴	۰/۰۱۹۰۸	۴/۲۶	۳۱/۴۴

فرایندهای بیولوژیک مهم برای miR-6165 شامل، فرایندهای هومئوستازی، تنظیم تکثیر سلولی، فسفریلاسیون پروتئین، حرکت سلولی (لوکوموشن)، اتصالات بیولوژیک، تنظیم تمایز سلولی، تحرک سلول^{۱۳}، پاسخ به استرس و تنظیم بیان ژن می باشد (جدول ۲).

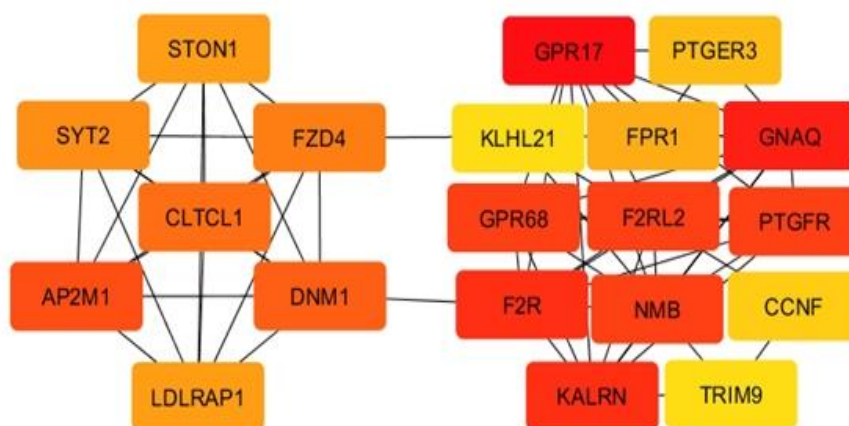
نام مسیر	P-value	همگرا P-value	Odds Ratio	امتیاز ترکیبی
تنظیم مثبت تکثیر سلولهای مزانشیمی	۰/۰۰۰۳۰۹۷	۰/۰۴۹۳۹	۲۱/۴۷	۱۷۳/۵۱
تنظیم مثبت اکسیداسیون اسید چرب	۰/۰۰۰۳۰۹۷	۰/۰۴۷۹۰	۲۱/۴۷	۱۷۳/۵۱
تنظیم مثبت مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز	۰/۰۰۰۰۰۳۸	۰/۰۰۰۹۷۱	۱۱/۶۷	۱۷۲/۴۲
تنظیم منفی فسفریلاسیون پپتیدیل سرین	۰/۰۰۰۰۶۷۵	۰/۰۲۲۹۹	۱۷/۵۰	۱۶۸/۰۲
سازماندهی لاملاپودیا	۰/۰۰۰۰۱۶۸	۰/۰۱۰۷۱	۱۵/۱۴	۱۶۶/۴۸
تنظیم مثبت مهاجرت فیبروبلاستی	۰/۰۰۲۳۳۰	۰/۱۳۵۱	۲۶/۲۵	۱۵۹/۱۰
تنظیم منفی سرهم بندی اتصالات سلولی	۰/۰۰۰۰۸۴۷۴	۰/۰۲۵۴۴	۱۶/۵۸	۱۵۵/۴۲
تنظیم تکثیر سلولی مزانشیمی	۰/۰۰۰۴۰۹۱	۰/۰۵۷۹۹	۱۹/۶۹	۱۵۳/۵۷
سرهم بندی فیبرهای ارتجاعی	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۶۱۸	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
پاسخ سلولی به القاء لپتین	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۶۰۳	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
هومئوستازی گازی	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۵۸۷	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
تنظیم منفی فرایند متابولیسم نیتریک اکساید.	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۵۷۲	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
تنظیم مثبت بناکسیداسیون اسید چرب	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۵۵۷	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
تنظیم منفی بیوستز نیتریک اکساید	۰/۰۰۳۳۳۵	۰/۱۵۴۳	۲۲/۵۰	۱۲۸/۹۹
تنظیم منفی سرهم بندی چسبندگی کانونی	۰/۰۰۰۶۶۴۳	۰/۰۶۳۹۶	۱۶/۸۷	۱۲۳/۴۵

¹³ motility

به منظور بررسی شبکه ژنی و پیدا کردن مهم‌ترین ژن‌های موجود در شبکه میانکنش ژنی، اهداف miRNA به پایگاه داده STRING داده شدند و بعد از رسم شبکه، خروجی سایت با نرم‌افزار Cytosape بررسی شد و ۲۰ ژن کلیدی با بالاترین امتیاز شناسایی شدند. شکل ۵ شبکه رسم شده برای ژن‌های

miR-6165 را نشان می‌دهند. به منظور پی بردن به اهمیت هاب ژن‌های یافت شده در سرطان پستان ارتباط آن‌ها با زنده‌مانی^{۱۴} با استفاده از وب سرور کاپلان مایر پلاتر (<https://kmplot.com/analysis/>) بررسی شد. مشخص شد که میان ۲۰ ژن یافت شده به‌عنوان ژن‌های کلیدی در برهمکنش پروتئین- پروتئین ۱۴ ژن

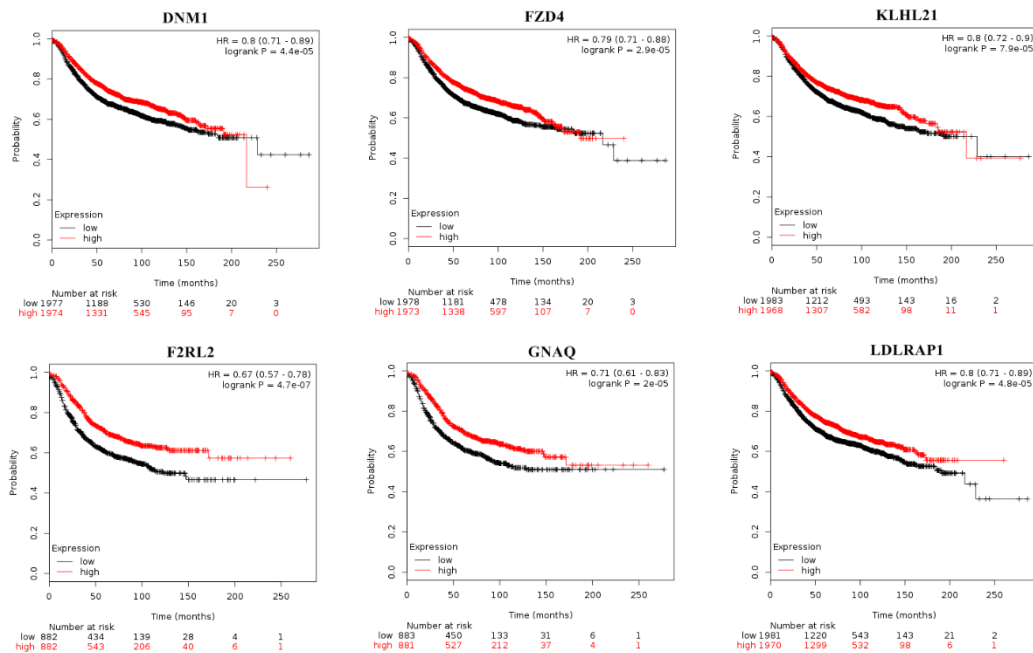
(*KLHL21, TRIM9, CCNF, PTGER3, FPR1, LDLRAP1, SYT2, FZD4, DNMI, AP2M1, GPR68, F2RL2, GNAQ, GPR17*)



شکل ۵) ژن‌های کلیدی در هدف‌های miR-6165

Fig 5) key genes in miR-6165 targets

با p value کوچک‌تر از ۰/۰۰۱ با زنده‌مانی در سرطان پستان ارتباط معنی‌دار دارند. نمودارهای زنده‌مانی برای ۶ مورد از این ژن‌ها در شکل ۶ نمایش داده شده است.



شکل ۶) نمودارهای بقاء برای ژن‌های هدف کلیدی miR-6165
 Fig 6) survival curve of miR-6165 hub target genes

بحث

رونویسی می‌شوند. بنابراین افزایش یا کاهش بیان معنادار هر miRNA به تنهایی نمی‌تواند به منزله درگیری آن در یک وضعیت پاتولوژیک خاص باشد و توجه به زمینه ژنی و ژن میزبان یک فاکتور حیاتی در بررسی اهمیت هر miRNA است. miR-6165 برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ مورد شناسایی قرار گرفت و بعد از آن، بررسی برای شناسایی جایگاه و ویژگی‌های مربوط به آن انجام شد (۱۶). در این مطالعه مشخص شد که miR-6165 در چهارمین ایترون ژن p75NTR قرار دارد و با بررسی آن مشخص شد که در تمایز سلول‌های عصبی نقش مهمی دارد. بررسی بیان miR-6165 در مطالعه دیگری انجام نشده است. در مطالعه ذکر شده، با بررسی بیان این miRNA در رده‌های مختلف سرطانی و غیرسرطانی (منشأ عصبی و

در بررسی بیان miRNAها زمینه ژنی فاکتور مهمی در تحلیل اهمیت بیان افتراقی است. اگرچه فاکتورهایی مانند حضور پروموتور مستقل و پایداری متفاوت miRNAهای مختلف منجر به اختلاف در میزان بیان miRNA و ژن میزبان می‌شود. مطالعات زیادی حاکی از بیان همزمان miRNA و ژن میزبان با پروموتور مشترک است. در مطالعه‌ایی که روی اثر ژن میزبان و زمینه ژنومی^{۱۵} روی بیان و تکامل (۱۹) miRNA انجام شد مشخص شد که وضعیت کروماتین ژن میزبان و ناحیه ژنی دربرگیرنده، بر زمان و مکان بیان miRNAهای ایترونی اثر می‌گذارد. چه آن دست از miRNAهایی که از ایترون‌های پیرایش^{۱۶} شده ایجاد می‌شوند، چه آنهایی که از پروموتور مستقل خود

¹⁵ Genomic context
¹⁶ splice

از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به مواردی مانند ترانسفکت مشکل برخی سلول‌های سرطانی پستان حتی توسط روش لیپوفکتامین اشاره کرد که تأثیر miR-6165 را بر روی رده‌های مختلف با ویژگی‌های متفاوت بررسی شود. همچنین نمونه‌های بافتی مورد بررسی، از نوع پارافینه بوده که استخراج RNA از این بافت‌ها بسیار مشکل بوده و میزان آن کمتر از بافت‌های تازه می‌باشد.

در میان ژن‌های کلیدی miR-6165 افزایش بیان GPR68 در رده سلولی MCF-7 مهاجرت سلولی را مهار می‌کند (۲۰). کاهش CLTCL1 به عنوان مارکری در سرطان پستان برای رفتن به مرحله تهاجم است. این ژن عضوی از خانواده کلاترین‌هاست که در انتقالات داخل سلولی و پایدارسازی دوک میتوزی نقش دارد (۲۱). مهار FPR1 رشد و متاستاز سلول‌های سرطان پستان را در مدل حیوانی سرطان پستان (با سلول‌های MDA-MB-231) کاهش می‌دهد. اما سیگنالینگ FPR1 برای موفقیت در شیمی درمانی علیه سرطان پستان لازم است (۲۲). اهداف ژنی miR-6165 در مسیر سیگنالینگ MAPK, Rap1, Wnt, Ras, PI3K/Akt و تنظیم منفی اتصالات سلولی درگیر هستند. بدون در نظر گرفتن تکرار ژن‌ها در سیگنالینگ‌های مختلف مجموعاً ۳۹ ژن در مسیرهای یاد شده درگیر هستند. یکی از این ژن‌ها MEF2C است. در مطالعه‌ای مشخص شد که اگزوزوم‌های آزاد شده از ماکروفاژهای وابسته به تومور، حاوی miR-223 هستند و تهاجم سرطان پستان را با هدف گرفتن MEF2C افزایش می‌دهند (۲۳). IL1R1 رشد و تکثیر سلولی را در سرطان پستان مهار می‌کند و متاستاز به ریه را کاهش می‌دهد (۲۴). NR4A1 یک مهارکننده تومور است که در تومورهای سه گانه منفی

غیرعصبی) مشخص شد که بیان آن در سلول‌های سرطانی از جمله سلول HeLa (سرطان گردن رحم)، MCF7 (سرطان پستان)، AGS (سرطان معده)، U87 (گلیوبلاستوما) و SW480 (سرطان کولون) دارای کاهش بیان قابل توجهی نسبت به سلول فیروبلاست جنینی انسان (به عنوان یک رده سالم) می‌باشد (۱۷). miR-6165 در اینترون چهارم ژن NGFR قرار دارد که ژن زمینه در سرطان پستان دچار کاهش بیان می‌شود و این کاهش بیان به میزان ۵ برابری می‌باشد. در پایگاه داده Ensemble نزدیک‌ترین پروموتور به آن حدود ۴۸۰۰ جفت باز بالاتر پیشگویی شده است. human cDNA refseq برای یک lncRNA که در فاصله کمتر از ۱۰۰ جفت‌باز پایین دست این miRNA قرار دارد حاکی از وجود یک قطعه cDNA ۱۳۱ جفت‌بازی است اما برای miR-6165، cDNA شناسایی نشده است. در یک مطالعه (۱۷) برای تشخیص پروموتور مستقل، ناحیه‌ای ۱۷۰۰ جفت‌بازی حدود ۲۵۰۰ جفت‌باز بالادست miR-6165 در یک وکتور حاوی EGFP بدون پروموتور کلون شد و به رده‌های HeLa, HEK293T (کلیه) و SW480 (کولون) ترانسفکت شد. رده سلولی HeLa, EGFP را بیان کرد که نشان‌دهنده حضور پروموتوری اختصاصی برای miR-6165 است که به‌طور خاص در HeLa فعال است. از آنجایی که این miRNA در سرطان پستان دچار افزایش بیان می‌شود و ژن زمینه‌ای کاهش بیان معنادار دارد به‌نظر می‌رسد این پروموتور در سرطان پستان هم فعال باشد. کاهش در میزان اینترون‌های دربردارنده ناحیه‌ایی که احتمال دارد به miR-6165 پردازش شود یکی از منابع تولید این miRNA را کاهش می‌دهد. با این وجود افزایش این میر می‌تواند حاکی از اهمیت آن در پیشرفت سرطان باشد.

سپاس و قدردانی

نویسندگان قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد اعلام می‌دارند. این مطالعه قسمتی از پایان‌نامه نویسنده نفر اول برای دریافت درجه کارشناسی ارشد می‌باشد. گرنت شماره 98GRD30M32855 دریافت شده توسط نویسنده مسئول برای کمک به تکمیل مطالعه استفاده شده است. تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

دچار کاهش بیان می‌شود (۲۵). بیان CCND2 رشد و مهاجرت سلول‌های سرطان پستان را مهار می‌کند. پروموتور این ژن در سرطان پستان هایپرمتیله می‌شود که با پیش آگهی پائین همراه می‌باشد (۲۶ و ۲۷).

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، مطالعه حاضر نشان داد که miR-6165 در پیشرفت تومور در سرطان پستان درگیر می‌باشد. افزایش بیان miRNA توسط وکتور بیان کننده pre-mirna، به‌صورت معناداری سبب افزایش تکثیر و مهاجرت سلولی می‌شود. اما برای مشخص شدن اثرات بیشتر miR-6165 بر روی سائز تومور و متاستاز به اندام‌های دیگر، مطالعات درون تنی بر روی مدل‌های حیوانی پیشنهاد می‌گردد.

References:

- Ambros V. The Functions Of Animal MicroRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, et al. MicroRNAs: New Regulators Of Immune Cell Development And Function. *Nat Immunol* 2008; 9(8): 839-45.
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression And Promotes Apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26(5): 745-52.
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 Cluster Functions In Human Leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(13): 5166-71.
- Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA Control In The Immune System: Basic Principles. *Cell* 2009; 136(1): 26-36.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS Is Regulated By The let-7 MicroRNA Family. *Cell* 2005; 120(5): 635-47.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-Time Quantification Of MicroRNAs By Stem-Loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(20): e179.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs With A Role In Cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259-69.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA Signatures In Human Cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA Expression Profiles Classify Human Cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834-8.
- Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, et al. microRNA Expression Profiling On Individual Breast Cancer Patients Identifies Novel Panel Of Circulating Microrna For Early Detection. *Sci Rep* 2016; 6: 25997.
- Jones SK, Merkel OM. Tackling Breast Cancer Chemoresistance With Nano-Formulated siRNA. *Gene Ther* 2016; 23(12): 821-8.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular Portraits Of Human Breast Tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747-52.
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring Therapies—Improving The Management Of Early Breast Cancer: St Gallen

- International Expert Consensus On The Primary Therapy Of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015; 26(8): 1533-46.
15. Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, et al. Targeting oncomiRNAs And Mimicking Tumor Suppressor miRNAs: New Trends In The Development Of miRNA Therapeutic Strategies In Oncology (Review). *Int J Oncol* 2016; 49(1): 5-32.
16. Parsi S, Soltani BM, Hosseini E, et al. Experimental Verification Of A Predicted Intronic microRNA In Human NGFR Gene With A Potential Pro-Apoptotic Function. *PLoS One* 2012; 7(4): e35561.
17. Hassanlou M, Soltani BM, Mowla SJ. Expression and Function of hsa-miR-6165 In Human Cell Lines And During The NT2 Cell Neural Differentiation Process. *J Mol Neurosci* 2017; 63(2): 254-66.
18. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, et al. Common Features Of microRNA Target Prediction Tools. *Front Genet* 2014; 5: 23.
19. França GS, Vibranovski MD, Galante PA. Host Gene Constraints And Genomic Context Impact The Expression And Evolution Of Human microRNAs. *Nat Commun* 2016; 7: 11438.
20. Wiley SZ, Sriram K, Salmerón C, et al. GPR68: An Emerging Drug Target In Cancer. *Int J Mol Sci* 2019; 20(3): 559.
21. Sens-Abuázar C, E Ferreira EN, Osório CA, et al. Down-regulation of ANAPC13 and CLTCL1: Early Events In The Progression Of Preinvasive Ductal Carcinoma Of The Breast. *Transl Oncol* 2012; 5(2): 113-23.
22. Baracco EE, Pietrocola F, Buqué A, et al. Inhibition Of Formyl Peptide Receptor 1 Reduces The Efficacy Of Anticancer Chemotherapy Against Carcinogen-Induced Breast Cancer. *Oncoimmunology* 2016; 5(6): e1139275.
23. Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles Secreted By Macrophages Shuttle Invasion-Potentiating microRNAs Into Breast Cancer Cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 117.
24. Garg AD, De Ruyscher D, Agostinis P. Immunological Metagene Signatures Derived From Immunogenic Cancer Cell Death Associate With Improved Survival Of Patients With Lung, Breast Or Ovarian Malignancies: A Large-Scale Meta-Analysis. *Oncoimmunology* 2016; 5(2): e1069938.
25. Wu H, Bi J, Peng Y, et al. Nuclear Receptor NR4A1 Is A Tumor Suppressor Down-Regulated In Triple-Negative Breast Cancer. *Oncotarget* 2017; 8(33): 54364-77.
26. Hung CS, Wang SC, Yen YT, et al. Hypermethylation of CCND2 in Lung and Breast Cancer Is a Potential Biomarker and Drug Target. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): 3096.
27. Hajigholami S, Vaise Malekshahi Z. Nano Packaged Diblock and Curcumin: a New Approach Inorder To Drug Resistance in Breast Cancer. *Iran South Med J.* 2017; 19(6): 951-961.

Original Article

MiR-6165 Dysregulation in Breast Cancer and Its Effect on Cell Proliferation and Migration

SO. Ebrahimi (MSc)^{1*}, S. Reisi (PhD)^{2**}

¹ Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received 21 Jul, 2021

Accepted 13 Oct, 2021)

Abstract

Background: ncRNAs have been identified as oncogenic drivers and tumor suppressors in any type of cancer. Although many classes of ncRNAs have been reported, most studies have been performed on microRNAs (miRNAs). miRNAs can regulate several target genes and affect important processes such as homeostasis, angiogenesis, cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Located in the p75NTR gene, miR-6165 is known to induce apoptosis in colorectal cell lines, and one study proposed a tumor suppressive role in colorectal cancer. However, its mechanism of action in breast cancer is not completely understood yet. Therefore, this study aimed to consider the expression level and the effect of miR-6165 on the proliferation and migration in breast cancer.

Material and methods: Fifty tumor and adjacent non-tumor tissues were examined in the study. miR-6165 levels were evaluated by qPCR in breast cancer cell lines and tumor tissues. Pre-mir-6165 was cloned in the pEGFPN1 vector. Next, human breast cancer MCF7 cells were cultured and pre-miR-6165 vector was transfected to breast cancer line. The effects on cell proliferation and migration were investigated with MTT assay and scratch test, respectively. Bioinformatics analysis was performed through enrichment and hub genes finding for miRNA targets.

Results: miR-6165 was overexpressed in breast cancer tumor tissues and cell lines. High expression of miR-6165 was directly related to the metastasis. miR-6165 increased proliferation and migration in breast cancer cell line.

Conclusions: miR-6165 may function as an oncomir and increase the growth and migration of cells which may consequently serve as a therapeutic goal for breast cancer.

Keywords: miR-6165, Breast cancer, Oncomir, Cell proliferation

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Ebrahimi SO, Reisi S. MiR-6165 Dysregulation in Breast Cancer and Its Effect on Cell Proliferation and Migration. Iran South Med J 2021; 24(5): 439-453

Copyright © 2021 Ebrahimi, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence: Department of Genetics, School of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Email: s.reisi@sku.ac.ir s.reisi@yahoo.com

*ORCID: 0000-0003-2046-223X

**ORCID: 0000-0001-6843-7645

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>