

Analysis the role of miR-195 in Colorectal Adenocarcinoma Cancer

Niloofar Avazpour¹, Mohamadreza Hajjari^{1*}, Seyed Reza Kazemi Nezhad¹,
Maryam Tahmasebi Birgani²

1. Shahid Chamran University of Ahvaz, Faculty of Science, Department of Genetics, Ahvaz, Iran

2. Jundishapur University of Medical Sciences, School of Medicine, Department of Medical Genetics, Ahvaz, Iran

(Received: 2019/05/6

Accept:2019/10/7)

Abstract

Background: Colorectal cancer as a leading cause of cancer related death develops through multistep pathway. MicroRNAs (microRNAs) are a group of small noncoding RNAs that inhibit target mRNA translation. Previous studies have shown that abnormal expression of these genes is associated with colorectal cancer. It is also shown that abnormal expression of these genes is associated with colorectal cancer. miR-195 appears to be the major regulatory factor in various cancers including colorectal cancer. Further studies are needed to precisely determine the regulatory role of miR-195 in colorectal cancer. Thus, the present study was conducted to determine the expression level of miR-195 in colon adenocarcinoma and normal tissue specimens and to confirm this biomarker in tissue samples in Iran.

Materials and Methods: In our case-control study, bioinformatic analyses were performed on gene expression and results were confirmed using experimental and in vitro analysis on clinical samples. Also, after RNA extraction and cDNA synthesis, gene expression analysis was done by using Real time PCR and then statistical analyses were performed.

Results: The initiation of invasion and metastasis pathways may be due to decreased miR-195 expression. The qRT-PCR test results for the expression of genes showed that miR-195 expression decreased potentially in tumor tissues compared to adjacent normal tissues ($p < 0.00001$). miR-195 is potentially associated with clinicopathologic features of tumors.

Conclusion: The potential role of miR-195 in the development of colon cancer is shown.

Keywords: Hsa-miRNA-195(miR-195); Colorectal cancer; Gene expression; Tumor Biomarker

* Corresponding: Mohammadreza Hajjari

Email: M-hajjari@scu.ac.ir; Mohamad.hajjari@gmail.com

بررسی نقش miR-195 در سرطان کلورکتال آدنوکارسینوما

نیلوفر عوض پور^۱، محمدرضا حجاری^{۱*}، سیدرضا کاظمی نژاد^۱، مریم طهماسبی بیرگانی^۲

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه ژنتیک، اهواز، ایران
 ۲- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۶

چکیده:

سابقه و هدف: سرطان کلورکتال (سرطان روده بزرگ) به عنوان یک دلیل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان، از طریق مسیر چند مرحله‌ای توسعه می‌یابد. میکرو RNAها (microRNAs) گروهی از RNAهای کوچک غیر کدکننده هستند که سبب مهار ترجمه mRNA هدف می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیان غیر طبیعی این ژن‌ها با سرطان کلورکتال مرتبط هستند. miR-195 به نظر می‌رسد فاکتور اصلی تنظیمی در سرطان‌های مختلف از جمله کلورکتال است. مطالعه‌های بیشتری برای تعیین دقیق نقش تنظیمی miR-195 در سرطان کلورکتال نیاز است. هدف از این مطالعه، تعیین سطح بیان miR-195 در نمونه‌های توموری آدنوکارسینوم روده بزرگ و بافت‌های طبیعی و به دنبال آن تایید این بیومارکر در نمونه‌های بافتی در ایران است.

مواد و روش‌ها: تحقیق با طراحی موردی - شاهدهی انجام شد. ابتدا تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی *in silico* روی بیان ژن انجام شد و نتایج آن با تجزیه و تحلیل تجربی و آزمایشگاهی روی نمونه‌های بالینی تایید شد. در این بررسی، به دنبال استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن‌ها با استفاده از پرایمرهای طراحی شده با روش PCR زمان واقعی (Real time PCR) اندازه‌گیری شد و سپس تحلیل آماری انجام شد.

یافته‌ها: آغاز مسیرهای تهاجم و متاستاز می‌تواند ناشی از کاهش بیان miR-195 باشد. نتایج تست qRT-PCR که برای بررسی بیان ژن‌ها انجام شد، نشان داد که بیان miR-195 به طور بالقوه در بافت‌های تومور نسبت به بافت‌های نرمال مجاور کاهش می‌یابد ($p < 0/00001$) همچنین سطح بیان miR-195 به طور بالقوه با ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژیک طراحی تومورها مرتبط است هرچند P-value میزان معناداری نشان نداد. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان‌دهنده نقش بالقوه miR-195 در پیشرفت سرطان کلورکتال است.

واژگان کلیدی: تومور بیومارکر، بیان ژن، سرطان کلورکتال، Hsa-miRNA-195(miR-195)

مقدمه

نقش ایفا کند. این ژن‌ها می‌توانند به عنوان یک کلاس جدید از انکوژن یا ژن‌های سرکوب‌کننده تومور عمل کنند(۴). miRNAها ژن‌های هدف خود را از طریق کامل یا ناقص جفت شدن با 3' UTR از mRNA سرکوب می‌کنند. بنابراین، آن‌ها می‌توانند فرآیند بیولوژیکی مختلف را از جمله تکثیر سلولی و آپوپتوزیس کنترل کنند(۵). افزایش شواهد حاکی از آن است که نتایج بالینی بیماران سرطانی با شکست در کنترل چرخه سلولی ارتباط دارد. بنابراین، به نظر می‌رسد که نبود تنظیم بیان miRNAهای مربوط به چرخه سلولی در بسیاری موارد بررسی شده است(۶). برخی از ژن‌های miRNA در مناطق کروموزومی قرار دارند که اغلب حذف شده یا جا به جا می‌شوند. miR-195 روی کروموزوم انسان در موقعیت 17p13.1 واقع شده است که اغلب در سرطان‌های مختلف انسان از جمله سرطان روده بزرگ حذف می‌شود(۷).

سرطان کلورکتال (روده بزرگ) سومین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان و یکی از شایع‌ترین علل تومورهای بدخیم است. بقای بلندمدت برای بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال اولیه یکی از نتایج بهبود تشخیص و درمان این بیماران است(۱). به خوبی نشان داده شده است که انحراف از بیان ژن‌های غیرکدکننده پروتئین نقش مهمی در توسعه سرطان‌های انسانی ایفا می‌کند(۲).

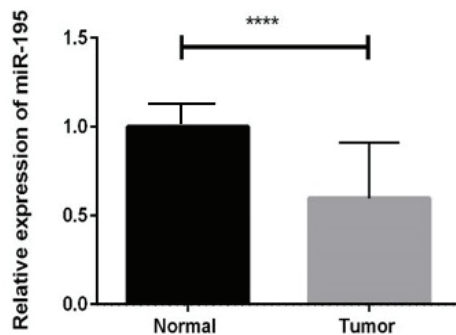
میکروRNAها (miRNA) ملکول‌های RNA 21-23 نوکلئوتیدی هستند که بیان ژن را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کنند(۳). این RNAهای غیرکدگذار بسیار محافظت شده هستند و نقش‌های سلولی بسیاری را در سلول‌ها بر اساس ژن‌های هدف شان ایفا می‌کنند. نبود تنظیم بیان miRNAها می‌تواند در توسعه سرطان

نویسنده مسئول: محمدرضا حجاری

پست الکترونیک: M-hajari@scu.ac.ir; Mohamad.hajari@gmail.com

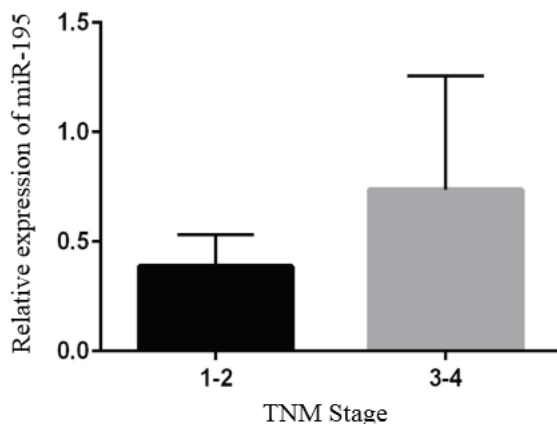
یافته‌ها:

بیان miR-195 در نمونه‌های بافت سرطانی کولورکتال کاهش یافته و با ویژگی‌های کلینوپاتولوژی در بیماران همراهی نشان می‌دهد. ابتدا برای تشخیص اینکه آیا miR-195 درگیر در سرطان کولورکتال است یا خیر، بیان ژن در پورتال داده‌ها TCGA (The Cancer Genome Atlas) از dbDEM2۰۰ بررسی شد. نتایج نشان داد که miR-195 در بافت‌های تومور نسبت به بافت‌های نرمال در سرطان کولورکتال دارای بیان کمتری است. برای بررسی بیشتر، سطح بیان miR-195 در بافت سرطان کولورکتال (n=۲۰) نسبت به بافت نرمال مجاور (n=۲۰) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ما دریافتیم که سطح بیان ژن miR-195 (در مقایسه با بیان ژن کنترل داخلی U6) به میزان قابل توجهی در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال کاهش می‌یابد (مقدار $p < 0/00001$). نتایج آزمون مان-ویتنی (Mann-whitney test) روی داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در گروه نرمال به مراتب بیشتر از افراد مبتلا به سرطان کولورکتال است که تاییدکننده نقش بالقوه این ژن در این سرطان است (نمودار-۱).



نمودار ۱: بیان ژن miR-195 بر حسب گروه‌ها

همچنین، همبستگی بین بیان miR-195 با ویژگی‌های کلینوپاتولوژیک در نمونه‌های سرطان کولورکتال بررسی شد.



نمودار ۲: میزان بیان ژن miR-195 بر حسب مراحل تومور.

نتایج نشان داد که کاهش بیان miR-195 به صورت معکوس با مراحل TNM مرتبط است. آنالیز من-ویتنی نشان می‌دهد که بیان ژن miR-195 در نمونه‌های با مراحل III-IV کاهش می‌یابد (P-value 0.2363).

بیان miR-195 به طور قابل توجهی در بافت‌های توموری با مرحله III-IV (Stage) در مقایسه با نمونه‌های توموری در مرحله I-II بالاتر است (Pvalue 0.2363).

Zhang و همکارانش، نشان دادند که افزایش بیان miR-195 به کاهش بیان FGF2، به عنوان ژن اصلی تکثیر سلولی و همچنین CyclinB1 و CyclinD1 منجر می‌شود. بنابراین، می‌تواند پروتکل سلولی را درگذر از G1/S در سلول‌های سرطان کولورکتال کنترل کند (۸). بررسی‌های اخیر نشان‌دهنده بیان غیر عادی miR-195 در سرطان‌های مختلف است. miR-195 می‌تواند نقش آنکوژنیک در سلول‌های سرطانی مختلف مانند لوسمی لنفوسیتی مزمن و سرطان پستان داشته باشد و ممکن است به عنوان سرکوب کننده تومور در کارسینوما، سرطان معده و مثانه عمل کند (۱۱،۹). بنابراین مطالعه حاضر جهت بررسی بیان این میکرو RNA در نمونه‌های بافتی سرطان کولورکتال به منظور بررسی نقش آن طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها:

تحقیق با طراحی مورد-شاهدی انجام شد. در ابتدا، بیان ژن miR-195 بین ۵۹ بافت تومور و هفت بافت نرمال مبنی بر GSE10259 از طریق <http://www.picb.ac.cn/dbDEM2/> (مدل خطی برای داده‌های میکروآرای) که در R (<http://www.r-project.org/>) در نظر گرفته شده است، برای نمایش بیان متفاوتی از میکرو RNA ها در این پایگاه داده استفاده شده است (۱۲).

تجزیه و تحلیل‌های بیان داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماري GraphPad Prism v6 انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده است. آزمون مان-ویتنی (Mann-Whitney test) برای بررسی شدت ارتباط بیان ژن‌ها به کار برده شد. مقدار P-value کمتر از ۵ درصد به لحاظ آماري معنادار در نظر گرفته شد.

مطالعه آزمایشگاهی:

برای اعتبار سنجی داده‌های حاصل از بررسی مورد-شاهدی، سطح بیان miR-195 در بافت‌های نرمال و توموری سرطان کولورکتال با qRT-PCR بررسی تجربی و آزمایشگاهی شد. ۲۰ جفت بافت توموری و غیر توموری مجاور بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال از بانک ملی تومور ایران (ایران، تهران) تهیه شد. بافت‌های جمع‌آوری شده بلافاصله پس از جراحی در $C^{\circ} 80^{\circ}$ فریز شدند. روند مطالعه توسط دانشگاه شهید چمران اهواز تایید شده است.

سطح بیان miR-195 در بافت‌ها با استفاده از PCR زمان واقعی (Real-time PCR) کمی‌سازی شد. RNA کل با استفاده از واکنش‌دهنده plus-RNX (سیناژن، ایران) استخراج شد. بعد از آن، کیت رونویسی معکوس (تاکارا، ژاپن) برای سنتز cDNA ژن miR-195 و ژن کنترل داخلی U6 استفاده شد. واکنش‌های RT-PCR با استفاده از سیستم ABI step one RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) با استفاده از سایبرگرین (SYBR Premix Ex Taq) انجام شد. سطوح بیان نسبی RNA با استفاده از مقادیر Ct محاسبه شد و سطح بیان ژن هدف با توجه به ژن مرجع کنترل U6 نرمالیز شدند. تجزیه و تحلیل qPCR با استفاده از آغازگرهای (Primer) موجود در جدول یک انجام شد:

ژن	توالی پرایمر
MiR-195	CGTAGCAGCACAGAAAT : (Forward) GTGCAGGGTCCGAGGT : (Reverse)
U6	ATCACTGTAAAACCGTTC- : (Forward) GTCGTATGCAGAG- : (Reverse), CA CAGGGTC

جدول یک توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های miR-195 و U6 توالی محصول حاصل از تکثیر miR-195 توسط توالی یابی سانگر تایید شد.

پیشرونده اپوپتوزی miR-195 را در رده‌های سلول‌های سرطانی نشان دادند. این مساله نشان می‌دهد miR-195 به عنوان سرکوب‌کننده تومور در توسعه سرطان نقش ایفا می‌کند (۲۳).

داده‌های حاصل از بررسی Sun و همکارانش تاییدکننده این است که miR-195 می‌تواند به عنوان سرکوبگر مسیر Hippo-YAP در سرطان کولورکتال باشد. آن‌ها نشان دادند miR-195 به عنوان یکی از چهار میکروRNA است که کاهش بیان یافته است و می‌تواند نشانگر (مارکر) تشخیصی بالینی در کلینیک باشد. miR-195 در بافت‌های سرطان کولورکتال انسان در مقایسه با بافت‌های طبیعی کولورکتال کاهش بیان قابل توجهی یافته است که نشان‌دهنده نقش مهم این میکروRNA در سرطان کولورکتال است. همچنین، miR-195 به طور مستقیم بیان YAP^۱ را با هدف‌گیری مستقیم 3' UTR آن و سرکوب تکثیر، مهاجرت، تهاجم و EMT سلول‌های سرطانی روده بزرگ تنظیم می‌کند (۲۴، ۲۵). پیش از این Arndt و همکاران همچنین تعدادی از میکروRNA که به صورت متفاوتی بین ۴۵ نمونه سرطان کولورکتال کلینیکی، چهار بافت نرمال مجاور کولورکتال و هشت مدل سلولی بیان شدند، بررسی کردند. miR-195 در میان میکروRNAها با بیان کاهش یافته در بافت سرطان کولورکتال همراه است (۲۶). در نتیجه بر اساس این مطالعه، کاهش بیان قابل توجهی از miR-195 در نمونه‌های بافت سرطان کولورکتال وجود دارد و ارتباط میان بیان miR-195 با مرحله تومور وجود دارد. ارتباط میان میکروRNAها با ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک سرطان کولورکتال برای بهبود درک نقش میکروRNA در سرطان کولورکتال چند مرحله‌ای ضروری است. این نتایج نشان می‌دهد که miR-195 احتمالاً در ابتلا به سرطان کولورکتال نقش دارد و این ژن به عنوان بیومارکر تشخیصی بالقوه و هدف درمانی جدید در افراد مبتلا به سرطان کولورکتال در ایران می‌تواند معرفی شود. این مطالعه با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌ها به عنوان پایه‌ای برای تحقیق‌های بیشتر روی تعداد نمونه بیشتر، برای اثبات نقش miR-195 در سرطان کولورکتال می‌تواند در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه شهید چمران اهواز، این مقاله برگرفته از پایان‌نامه ی خانم نیلوفر عوض پور در مقطع کارشناسی ارشد این دانشگاه می‌باشد.

یافته‌های ما برای بیان miR-195 در نمونه‌های آزمایشگاهی سرطان کولورکتال با داده‌های تحلیل بیوانفورماتیکی *in silico* مطابقت نشان داد. در واقع، این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش بیان miR-195 می‌تواند نقش مهم سرکوب‌کننده تومور در سرطان کولورکتال را داشته باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، بیان miR-195 در توسعه سرطان کولورکتال با استفاده از اطلاعات آنالیز آماری و بیوانفورماتیکی *in silico* و بررسی آزمایشگاهی تایید شد. ما دریافتیم که بیان miR-195 همانند مطالعه‌های گذشته در نمونه‌های بافت تومور کاهش یافته و در نمونه‌های با مرحله TNM بالاتر با افزایش بیان همراه است. بر اساس این نتایج و بررسی‌های گذشته، به نظر می‌رسد که miR-195 می‌تواند هدف درمانی و بیومارکر بالقوه برای سرطان کولورکتال باشد.

سرطان کولورکتال (CRC) به عنوان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان و یک بیماری شایع در سرتاسر جهان باقی مانده و از جمله کشور ایران، نیازمند مطالعه بیشتر است (۱۳). میکروRNAها یک کلاس از RNAهای غیر رمزکننده کوچک هستند که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در تمام موجودات زنده ایفا می‌کنند (۱۴). شواهد اخیر نشان می‌دهد که میکروRNAها می‌توانند به عنوان سرکوب‌کننده‌های تومور یا آنکوژن‌ها عمل کنند و نقش مهمی در شروع و پیشرفت سرطان در انسان ایفا می‌کنند (۱۵، ۱۶).

شواهد روشن می‌کند که میکروRNAها به طور غیرعادی در سرطان کولورکتال بیان می‌شوند و ممکن است نقش سرکوب‌کننده تومور یا سرطان‌زایی را در مسیر سیگنال‌دهی پایین دست داشته باشند (۱۷). به خوبی ثابت شده است که miR-195 در سرطان کولورکتال نقش ایفا می‌کند (۱۸، ۲۱). به عنوان مثال، Wang و همکارانش نشان دادند که تنظیم بیان miR-195 در سرطان کولورکتال با متاستاز به گره‌های لنفوی و پیش‌آگهی ضعیف ارتباط دارد (۱۸). علاوه بر این، Zhang و همکارانش دریافتند که miR-195 از ژن‌های مستقیم هدف پایین دست RNA بلند غیر کدکننده ژن SNHG1 است. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که تکثیر، تهاجم و مهاجرت سلول‌های هیپاتوسلولار کارسینوما (HCC) از طریق مهار miR-195 در پاسخ به توالی بلند غیر کدکننده SNHG1 شدت می‌یابد (۲۲). مطالعه‌های اخیر آزار

B, Castanos-Velez E, Mann B, Pilarsky C, Brümmendorf T, Weber B. A genome-wide map of aberrantly expressed chromosomal islands in colorectal cancer. *Molecular Cancer*. 2006 Dec;5(1):37.

8. Zhang X, Xu J, Jiang T, Liu G, Wang D, Lu Y. MicroRNA-195 suppresses colorectal cancer cells proliferation via targeting FGF2 and regulating Wnt/ β -catenin pathway. *American journal of cancer research*. 2016;6(11):2631.

9. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005 Jun;435(7043):839.

10. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*. 2004 Jun 1;64(11):3753-6.

11. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of surgery*. 2010 Mar 1;251(3):499-505.

12. <http://www.picb.ac.cn/dbDEM>

13. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015 Mar;65(2):87-108.
 14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
 15. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
 16. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. Molecular cancer. 2009 Dec;8(1):102.
 17. de Krijger I, Mekenkamp LJ, Punt CJ, Nagtegaal ID. MicroRNAs in colorectal cancer metastasis. The Journal of pathology. 2011 Aug 1;224(4):438-47.
 18. Piepoli A, Tavano F, Copetti M, Mazza T, Palumbo O, Panza A, Di Mola FF, Paziienza V, Mazzoccoli G, Biscaglia G, Gentile A. Mirna expression profiles identify drivers in colorectal and pancreatic cancers. PloS one. 2012 Mar 30;7(3):e33663.
 19. Wang X, Wang J, Ma H, Zhang J, Zhou X. Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. Medical oncology. 2012 Jun 1;29(2):919-27.
 20. Yang B, Tan Z, Song Y. Study on the molecular regulatory mechanism of MicroRNA-195 in the invasion and metastasis of colorectal carcinoma. International journal of clinical and experimental medicine. 2015;8(3):3793.
 21. Qu J, Zhao L, Zhang P, Wang J, Xu N, Mi W, Jiang X, Zhang C, Qu J. MicroRNA-195 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug doxorubicin by targeting the first binding site of BCL2L2 mRNA. Journal of cellular physiology. 2015 Mar;230(3):535-45.
 22. Zhang H, Zhou D, Ying M, Chen M, Chen P, Chen Z, Zhang F. Expression of long non-coding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 1 (SNHG1) exacerbates hepatocellular carcinoma through suppressing miR-195. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. 2016;22:4820.
 23. Liu L, Chen L, Xu Y, Li R, Du X. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. Biochemical and biophysical research communications. 2010 Sep 17;400(2):236-40.
 24. Sun M, Song H, Wang S, Zhang C, Zheng L, Chen F, Shi D, Chen Y, Yang C, Xiang Z, Liu Q. Integrated analysis identifies microRNA-195 as a suppressor of Hippo-YAP pathway in colorectal cancer. Journal of hematology & oncology. 2017 Dec;10(1):79.
 25. Ou C, Sun Z, Li S, Li G, Li X, Ma J. Dual roles of yes-associated protein (YAP) in colorectal cancer. Oncotarget. 2017 Sep 26;8(43):75727.
 26. Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K, Bittner A. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. BMC cancer. 2009 Dec;9(1):374.
- Acknowledgment**
We thank Shahid Chamran university of Ahvaz for supporting this study.
- Conflict of interest** None