

Research Paper

Evaluation of Changes in NFKB Gene Expression Following Epstein-barr Virus and Its Participation in the Half-life of Patients With Acute Epstein-Barr Positive Lymphoblastic Leukemia



Mina Gozali¹ , *Changiz Ahmadizadeh¹

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.



Citation Gozali M, Ahmadizadeh Ch. [Evaluation of Changes in NFKB Gene Expression Following Epstein-barr Virus and Its Participation in the Half-life of Patients With Acute Epstein-Barr Positive Lymphoblastic Leukemia (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(4):550-565. <https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3277.2>

<https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3277.2>



Received: 21 Nov 2020

Accepted: 27 Feb 2021

Available Online: 01 Oct 2021

Key words:

NFKB, EBV virus,
Acute lymphoblastic
leukemia

ABSTRACT

Aims Leukemia is one of the most common childhood malignancies. The Epstein-Barr Virus (EBV) is a tumorigenic virus of the herpes family and causes a primary infection in young children. This study aimed to evaluate the increase in NFKB expression following the EBV virus and its contribution to the half-life of EBV-positive acute lymphoblastic leukemia patients.

Methods & Materials In this case-control study, we examined blood samples of 60 patients referred to Tabriz Children's Hospital for 6 months, Tabriz City, Iran, in 2019. RNA extraction was performed from the collected samples, and the quantity and quality of the extracted RNA were controlled by a NanoDrop device and gel electrophoresis. cDNA synthesis was performed from RNA extracted from the sample. NFKB gene expression was assessed using real-time PCR. The obtained data were analyzed using a t-test.

Findings The results showed that the EBV virus decreased the expression of the NFKB gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. The expression of the NFKB gene in patients with acute lymphoblastic leukemia increased significantly compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion The NFKB gene can be used as a precursor for diagnosing acute lymphoblastic leukemia. However, further studies are required on EBV infection and acute lymphoblastic disease.

English Version

1. Introduction

Leukemia is one of the most common childhood malignancies, affecting about 40 cases per million children under 15. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) accounts for about 75% of these cases.

ALL is divided according to cell line into T or B. Signs and symptoms of acute leukemia are associated with normal tissues and can lead to bone marrow failure or specif-

ic tissue infiltration. Common symptoms are fever, paleness, petechia, ecchymosis, nausea, anorexia, and bone or joint pain [1, 2]. Acute leukemia is the most common type of malignancy in children and accounts for about 30% of all childhood malignancies. Statistics show that 4 out of every 100000 children under the age of 15 have acute leukemia. About 77% of pediatric leukemia are acute lymphoblastic, 11% are myeloblastic, and 12% are other types of leukemia [3]. ALL is a type of white blood cell leukemia or cancer. ALL damages and kills normal bone marrow cells and spreads to other organs. Although the disease is most common in childhood between 2 and 5,

* Corresponding Author:

Changiz Ahmadizadeh, PhD.

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Tel: +98 (910) 4030464

E-mail: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

it can also be seen in people over 60. In ALL, the precursors of B and T lymphocytes are involved. Mutations in proto-oncogenes and their conversion to oncogenes are effective factors in causing malignancies. ALL prevalence is higher in males than females [4, 5].

Epstein-Barr Virus (EBV) is the first DNA tumor virus discovered and is a herpes virus family member. EBV consists of a dual-stranded genome approximately 172 kb in length that encodes more than 80 genes and unencoded RNAs. It is a linear virus but forms circular as an epizome in the nucleus of infected cells. EBV is associated with many malignant diseases of lymphoma carcinomas, as well as many benign diseases, such as infectious mononucleosis, and is also considered a promoter factor for some autoimmune diseases. In total, about 1%-1.5% of the cancers are estimated to be related to EBV worldwide [6].

The Epstein-Barr virus infects about 90% of the population and is the primary infection in young children, and may cause mononucleosis infection [7]. In most people, the virus is lodged in B cells, and the health consequences are not recognized. However, the virus has a list of associated malignant diseases of lymphoid or enveloping origin, such as Burkitt lymphoma, post-transplant lymphocytic disease, B immune lymphoma, Hodgkin's lymphoma, natural killer T cell lymphoma, rhinoplasty, leiomyosarcoma in AIDS, and - * + gastric cancer subsets. In addition, these viruses are associated with areas, such as the chest, lungs, and prostate [8].

NF- κ B is a protein complex that controls DNA transcription, cytokine production, and cell half-life. Its gene is expressed in most cells and changes its behavior under the influence of various environmental factors such as stress, viruses, and radiation. NF- κ B is a major factor in regulating the pattern of immune response to microbial agents. Abnormal regulation of the NF κ B gene has been observed in various diseases, such as cancers [9, 10]. NF- κ B is a transcription factor that regulates the expression of antiapoptotic genes and activates chemokines and pro-inflammatory cytokines. NF- κ B is a key mediator in carcinogenesis by inflammation [11]. NF- κ B is widely used by eukaryotic cells to regulate the expression of genes involved in proliferation and survival. Therefore, many human tumors have abnormal and unregulated NF- κ B, in which NF- κ B is permanently active [12, 13]. NF- κ B activates the expression of genes that keep cell proliferation active and, on the other hand, protects cells against apoptosis. This transcription factor is involved in various cellular activities and plays an important role in various biological functions. Known actions of this factor include the regulation of immune and inflammatory responses, cell

proliferation, hematopoiesis, and NF κ B apoptosis. Takeda et al. showed that TNF-induced apoptosis is potentiated by the suppression of NF- κ B in acute human Jurkat cell leukemia [14]. Lehtinen et al. concluded that activation of maternal herpes virus infection increases the risk of ALL in children. Only positive EBV immunoglobulin in mothers, EBV-IgG, is associated with a significant risk of ALL in children [15]. Previous studies have shown that H₂O₂ is an effective inducer of NF κ B pathway activation [16]. This study aimed to evaluate the increase in NF κ B expression following the EBV virus and its participation in the half-life of EBV-positive acute lymphoblastic leukemia patients.

2. Materials and Methods

Statistical population

The sample size was estimated at 60 (60 healthy individuals as control and 60 patients with acute lymphoblastic leukemia) using the following formula considering $P = 0.1$, with a 95% confidence interval and a tolerable error rate of 0.04.

$$n = \frac{Z^2_{1-\frac{\alpha}{2}} p(1-p)}{d^2}$$

In this case-control study, we included the children aged 14 years with ALL who were referred to Tabriz Children's Hospital, Tabriz City, Iran, in 2019. After referral, the details of each patient were recorded with the permission and consent of the patient. The inclusion criteria included patients with no history of acute viral infections, autoimmune diseases, or endocrine disorders. An oncologist confirmed the diagnosis of ALL in children. These patients were sampled before starting chemotherapy. Two milliliters of venous blood were taken from each individual and poured into the Falcon tubes, containing EDTA as an anticoagulant. Then, the tubes were gently shaken to mix and prevent blood clots from forming and eventually transferred to the laboratory and stored in a freezer at -80°C. In addition, the blood of 60 healthy individuals was taken as a control group.

RNA extraction

To extract RNA, the cells were lysed with Traysol buffer. The resulting cell lysates were transferred into DNase/RNase-free microtubes. Then, 200 μ L of chloroform was added to the microtube and centrifuged at 12000 rpm for 10 min. In the next step, the supernatant was discarded, and 70% isopropanol was added to it. On the next day, the tubes were centrifuged for 10 min at 12000 rpm, and then the supernatant was discarded, and the precipitate

Table 1. Specifications of primers used in this study

Primer Name (Access Number)	Primer Sequence	Product Size PCR (bp)	Tm Primer
NFKB1-F Forward	CCGGCTTCAGAATGGCAGAA		59.23
NFKB1 - Reverse	TATGGGCCATCTGTTGGCAG	139	59.97
NFKB1-P Primer	TGGGAAGGCCTGAACAAATGTTCA		60.32
GAPDH- Forward	GAAAGCCTGCCGGTACTAA		60.60
GAPDH-Reverse	CTGCGCTCCTGCCTCGATGG	150	60.31
GAPDH-Primer	AGGAAAAGCATCACCCGGAG		59.30

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

was dried at ambient temperature. Finally, the resulting precipitate was dissolved in 1 μ L. The amount of RNA extracted by the optical method was measured using the NanoDrop device (Wilmington, DE, USA), and the quality of RNA was evaluated by gel electrophoresis.

Electrophoresis of extracted RNA samples

To evaluate the quality of the extracted RNAs, 5 samples were electrophoresed randomly on the formaldehyde agarose gel. For this purpose, first, 0.8 gel was made. Then, the samples were loaded on the gel after tightening the gel and were electrophoresed at 80V for 1 hour.

Quantitative RNA analysis

Quantitative analysis of RNA was performed by NanoDrop device with absorption measurements at 260 and 280 nm.

cDNA synthesis

The complementary DNA molecules were fabricated with the QuantiTect Reverse Transcription kit by Kiajen. The used primers were designed by Gene runner software (Version 3.05) and BLASTed by the NCBI website (www.ncbi.nlm.nih.gov). Table 1 presents the information on the primers. The primers were synthesized by the Takapozist Company.

Real-time RT-PCR

A real-time PCR reaction was performed in triplicate. Thus, in real-time PCR tubes, 1 μ L of cDNA and 19 μ L of the Mastermix SYBR green, containing 1 μ L of forward-priming primer (0.2 μ M), 1 μ L of Primer Rivers (0.2 μ M), 7 μ L of DEPC, and 10 μ L Mastermix 1x real-time were

shed. Then the tubes were placed in real-time PCR, and the device was run.

Isolation of viral dna from a sample of patients with leukemia

To investigate the methylation of the NFKB gene, total DNA from the received paraffin block was isolated according to the instructions of Bioneer, the manufacturer of the DNA extraction kit from the paraffin block with catalog number 740980.50. To evaluate the methylation of the EBV virus genome, viral DNA was first isolated from tissue samples of EBV-positive acute lymphoblastic leukemia patients as follows. First, 200 mg of homogenized tissue was transferred into a 1.5 mL tube, then 200 μ L of lysis buffer HL was added and incubated for 5 minutes at room temperature. Next, 20 μ L of proteinase K and 20 μ L of Carrier DNA were added and mixed. Then, the internal control of binding buffer HL was added to the amount and mixed. The mixture was transferred to an RTA Spin Filter and incubated for 1 min at room temperature. The mix was centrifuged at 2000 rpm for 2 min. The mixture was again transferred into the RTA Spin Filter into the new RTA Receiver.

Afterward, 500 μ L of Wash Buffer I was added to the RTA Spin Filter. The mixture was centrifuged at 11000 rpm for 1 min. The mixture was again transferred to a new RTA Spin Filter. Next, 700 μ L of Wash Buffer II was added and centrifuged. Then, the filter was removed and placed on the tube. The RTA Spin Filter was transferred to a new tube. It was centrifuged at maximum speed for 4 min to remove the ethanol completely. It was transferred to a new filter for 15 minutes. Then, 100 μ L of Elution Buffer, previously heated to 56°C was added to the RTA Spin Filter, and the mixture was incubated at room temperature

Table 2. Frequency distribution of the patients and control group according to gender and Epstein-Barr Virus (EBV)

Variable	No. (%)				The Chi-square	Sig.
	Patient		Control			
Female	36(58.6)		36(41.4)		5.21	0.061
Male	24(41.0)		24(59)			
Presence of EBV	EBV-	EBV+	EBV-	EBV+	6.092	0.039
	41	19	53	7		

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

for 1 min, then centrifuged and the viral DNA at 4°C or 20 °C stored.

Quantify the EBV Virus

The auxiliary standards in Kit TM (DynaBio, Takapozist, Iran) were the same as the sample extraction method and with the same volume.

To generate a standard curve in RotorGene TM 2000/3000/6000, all 5 standards were defined in the editing menu of RotorGene software. The same items were used as the standards for the specified concentrations.

The following formula was applied to convert the specified values using the standard curve to IU/mL samples.

$$\text{Result (IU/mL)} = \frac{\text{Result (IU/}\mu\text{L)} \times \text{Elution volume (}\mu\text{L)}}{\text{Sample volume (mL)}}$$

Statistical analysis

After completing the laboratory work, using Hardy Weinberg's law, the expected and observed frequencies were calculated and entered into the SPSS. Analysis of variance was used to compare the mean number of mutant alleles in the study population. The null hypothesis

in ANOVA is that the mean of the dependent variable is equal at all levels of the independent variable.

3. Results

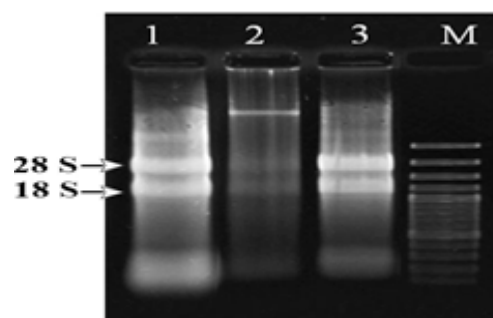
The patient group comprised 24 men (41.4%) and 36 women (58.6%), and the control group included 24 men (41.4%) and 36 women (58.6%). The Mean±SD age in the patient group was 8.6±1.35 years, and the mean age in the healthy group was 7.74±1.46 years. There was no statistical difference between the patient group and the healthy group regarding the mean age (Table 2).

Qualitative analysis of RNA

To confirm the quality of the extracted RNA, electrophoresis of the samples was performed on 0.8% agarose gel, showing ribosomal 18s and 28s bands (Figure 1). The presence and quality of ribosomal 18s and 28s bands indicate the quality of the extracted RNA.

Quantitative analysis of treated RNA

After treating the RNA extracted by the mentioned method and quantifying it, spectrophotometric analysis was performed to ensure their concentration.



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. 18s and 28s ribosomal bands from electrophoresis of RNA samples on 0.8% agarose gel

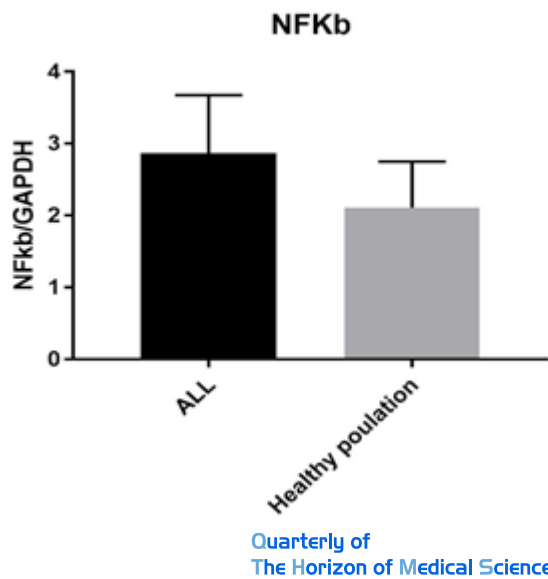


Figure 2. NFKB expression change in leukemia samples compared to the control group

Evaluation of NFKB Gene Expression Change in Leukemia Cells by Real-Time PCR

To evaluate NFKB expression change, after initial configuration, we performed RNA extraction. After cDNA synthesis, the expression pattern was examined using primers and specific probes.

Study of NFKB Gene Expression in Leukemia Cells Compared With the Control Samples by Real-Time RT-PCR

NFKB gene expression was evaluated in leukemia samples. The results showed that NFKB gene expression increased significantly in the group of acute lymphoblastic leukemia ($P < 0.05$, Figure 2).

The result of changes in NFKB gene expression showed that the EBV virus decreased NFKB gene expression in EBV positive groups ($P = 0.041$) (Figure 3).

Table 3 separately shows the significant pattern of the NFKB gene using the unpaired t-test.

4. Discussion

This study showed that the expression of the NFKB gene increased significantly in the patient group, and the Epstein-Barr virus decreased the expression of the NFKB gene in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). ALL is a type of cancer that affects lymphocytes and lymphocyte-producing cells in the bone marrow. Lymphocytes are a type of white blood cell that produces antibodies and are vital parts of the immune system. Lymphocytes are divided into subgroups based on their functions, the most important of which are B and T cells. In ALL, an accumulation of cells that make up immature lymphocytes called blast cells is seen in the bone marrow. These cells affect normal blood cells and eventually reduce the production of red blood cells, white blood cells, and platelets. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood, occurring in 80% to 85% of cases of children less than 6 years old [17]. In a 2004 study, Pui et al. found that neurological involvement was rare in patients with leukemia [18]. Also, in the study of Akramipour et al., who studied 5 years of children with acute myeloid leukemia in Ahvaz Shafa Hospital, less than 5.3% involvement of the nervous system in these patients was reported [19].

NFKB is a transcription factor that plays an important role in inflammation, immune responses, innate and acquired immunity by regulating various aspects of the evolution and function of functional cells, which is consistent with our study [20]. A study on liver HepG cells by Narayanan et al. revealed that in virus-infected cells, two types of reactive oxygen species increase, thereby activating the NF- κ B pathway in the early stages of the disease. This finding is consistent with our study [21]. The results of Chinini's study show that I3C and its compounds can

Table 3. Bilateral ANOVA of NFKB gene expression pattern based on fold change in leukemia patients with positive and negative EBV

Comparison of leukemia patients/healthy population	Calculated Values
Fold Change Leukemia/healthy population	1.82
p*	0.041
t	2.256
df	2
Is the difference significant? (Confidence interval= 95%)	Yes

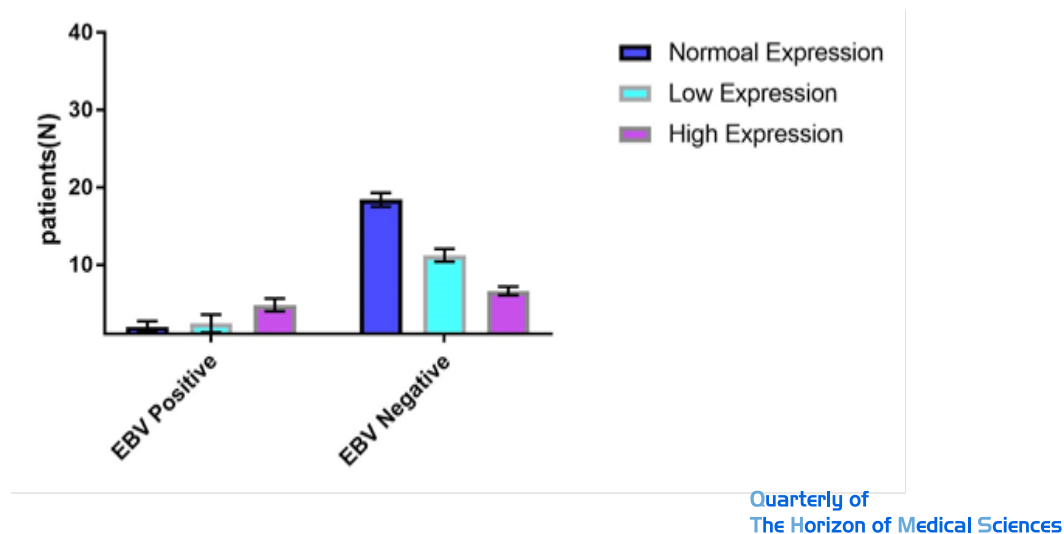


Figure 3. Bilateral ANOVA of NFKB Gene expression pattern based on fold change in with positive and negative EBV leukemia patients

induce apoptosis in various cancer cells by inhibiting the NF- κ B transcription factor, which is inconsistent with our study [22]. Salvatore et al., in their research, stated that following treatment of cells with doxorubicin, this compound inhibits DNA synthesis by binding to double-stranded DNA and stabilizing the topoisomerase II complex, leading to the induction of apoptosis.

On the other hand, in addition to this process, another pathway is activated, which, by using NF- κ B and subsequent activation of genes involved in cell survival such as survivin, IAP1-c, and XIAP, prevents cell death. These results are consistent with our study [23]. The results of a study by Adcock et al. showed that NF- κ B activation plays an important role in inflammatory processes, immune responses, and cell death through binding to promoters of various genes such as TNF- α , 1 β -IL, and cyclooxygenase-2. This finding is not consistent with our study [24]. Go et al. stated that valproate protects neurons from oxidative stress-inducing cell death by increasing NF- κ B acetylation and has a neuroprotective effect consistent with our study [25]. In the study of intermediate proteins, 170 related protein kinases were observed from the expressed reduced genes, of which 62 were predicted to be specific for the expressed reduced genes, and among 62 kinases (Inhibitor of NF- κ B), kinase subunit (Beta) IKKB received the best score. It plays an important role in the NF- κ B signaling pathway activated in DNA damage, cytokine inflammation, bacterial and viral production. By activating hundreds of genes, it triggers the immune response, growth control, and protection against apoptosis. This finding is consistent with our study [26]. Rothe stated in his research that some molecules whose expression is regulated in EBV-infected cells might play

an indirect role in NF- κ B activation. SNK6 cells are reported to produce TNF- α , which activates NF- κ B in T and NK cells [27]. Rothe stated in his study that NF- κ B could be activated downstream of CD40 and CD137. EBV-induced CD40 or CD137 expression may be involved in NF- κ B activation in EBV-T/NK cells. This result is not consistent with our study [27]. Sugano et al. reported that EBV binding initiates NF- κ B activation, which is necessary for successful cell infection. NF- κ B activity, in turn, also regulates the expression of the CD21 molecule, which may provide a positive feedback loop to enhance cell sensitivity to EBV entry. This finding is inconsistent with our study [28]. Cahir-McFarland et al. showed that deletion of NF- κ B activity-induced apoptosis of EBV-infected lymphoma cell lines in vitro and mice, indicates that this is a major pathway created by viral oncoproteins. The findings are consistent with our study results [29, 30]. There is a relationship between NF- κ B activation and cell proliferation in cell cycle arrest based on the relative balance between biological and biochemical functions of NF- κ B, besides the important role of NF- κ B in resistance to apoptosis and hematopoietic stem cell division control. Recently NF- κ B has also been shown to be involved in oxidative stress. NF- κ B activation is responsible for activating Nitric Oxide Synthase (iNOS) to increase Nitric Oxide (NO), described as a pro-apoptotic function of NF- κ B. Nitric oxide production pattern may control cell survival because acute NO production has been shown to cause apoptosis. However, chronic NO production with active constituent NF- κ B signaling can inhibit the mechanism of apoptosis. This finding is consistent with our study [31]. Safa et al. reported that in human tumorigenesis, NFKB is an essential factor in the survival of cancer cells, which is consistent with our

study [31]. Poglio et al. reported that changes in the NF- κ B pathway are recognized, particularly in ALL and other types of leukemia. For example, its regulation should facilitate leukemia cell apoptosis. This finding is consistent with our study [32]. A study published by Lehtinen et al. showed that maternal reactivation of EBV infection in the first trimester was associated with a significant increase in the incidence of ALL in offspring. This result is inconsistent with our study [15]. Takada et al. showed that TNF-induced apoptosis is amplified by the suppression of NF- κ B in acute human Jurkat cell leukemia. This result is consistent with our study [14].

5. Conclusion

The NF κ B gene could be a precursor to the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. However, further studies on EBV infection and acute lymphoblastic disease are required.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Informed consent was obtained from patients and families participating in the current study.

Funding

This article was extracted from MA. thesis of the first author at the Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

Authors' contributions

All authors contributed to the current article, equally.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات بیان ژن NF-kB به دنبال ویروس اپشتین بار و مشارکت آن در نیمه عمر بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد اپشتین بار مثبت

مینا گوزلی^۱، چنگیز احمدی زاده^{۱*}

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

چکیده

اهداف: لوسمی یکی از شایع ترین بدخیمی های دوران کودکی است. ویروس اپشتین بار (EBV) یک ویروس تومورزا از خانواده هرپس ویروس ها بوده و باعث عفونت اولیه در خردسالان است. هدف از این مطالعه، بررسی افزایش بیان NF-kB به دنبال ویروس EBV و مشارکت آن در نیمه عمر بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد EBV مثبت بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد شاهدی نمونه خونی ۶۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان کودکان تبریز طی ۶ ماه در سال ۱۳۹۸ مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNA از نمونه جمع آوری شده انجام و سنجش کمی و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت. سنتز cDNA از RNA استخراج شده از نمونه انجام شد. میزان بیان ژن NF-kB با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد ویروس EBV باعث کاهش بیان ژن NF-kB در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد شده و همچنین میزان بیان ژن NF-kB در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: ژن NF-kB می تواند به عنوان یک پیش آگهی تشخیص لوسمی لنفوبلاستیک حاد باشد که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه است. همچنین انجام مطالعات بیشتر در مورد عفونت EBV و بیماری لنفوبلاستیک حاد ضروری است.

تاریخ دریافت: ۰۱ آذر ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۰۹ اسفند ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۰

کلیدواژه ها:

NFKB، ویروس EBV، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

مقدمه

در کودکان است و حدود ۳۰ درصد از تمام بدخیمی های دوران کودکی را تشکیل می دهد. آمار نشان می دهد ۴ نفر از هر ۱۰۰ هزار کودک زیر ۱۵ سال مبتلا به لوسمی حاد هستند. ۷۷ درصد لوسمی های کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد و ۱۱ درصد از نوع میلو بلاستیک بوده و ۱۲ درصد از سایر انواع لوسمی است [۳]. لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL)، نوعی از لوسمی یا سرطان سلول های سفید خون است. ALL باعث آسیب و مرگ سلول های طبیعی مغز استخوان و انتشار آن به ارگان های دیگر می شود. اگرچه این بیماری در دوران کودکی و در سنین دو تا پنج سالگی شایع تر است، در افراد بیش از ۶۰ سال نیز دیده می شود. در لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش سازهای لنفوسیت های B و T درگیر می شوند. جهش در پروتئوکوزن ها و تبدیل آن ها به آنکوزن از عوامل مؤثر در ایجاد بدخیمی هاست. شیوع آن در جنس مذکر بیشتر از مؤنث است [۴، ۵]. اپشتین بار

لوسمی یکی از شایع ترین بدخیمی های دوران کودکی است که حدود ۴۰ کودک در هر میلیون کودک زیر ۱۵ سال را مبتلا می کند. لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) حدود ۷۵ درصد این موارد از لوسمی را شامل می شود. لوسمی لنفوبلاستیک حاد بر اساس رده سلولی T یا B تقسیم بندی می شود. علائم و نشانه های لوسمی حاد با ارتشاح سلول های لوسمی در بافت های طبیعی ارتباط دارد و موجب بروز نارسایی های مغز استخوان یا ارتشاح بافتی اختصاصی می شود. علائم شایع شامل تب، رنگ پریدگی، پتشی یا اکیموز، احساس کسالت، بی اشتها و درد استخوان یا مفاصل هستند [۱، ۲]. لوسمی حاد شایع ترین نوع بدخیمی

1. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)

* نویسنده مسئول:

چنگیز احمدی زاده

نشانی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

تلفن: ۴۶۴۰۳۰۳ (۹۱۰) ۹۸+

پست الکترونیکی: dr_ahmadizadeh@yahoo.com

م تفاوت دارای نقشی حائز اهمیت است. از اعمال شناخته شده این فاکتور می توان به تنظیم پاسخ های ایمنی و التهابی و تکثیر سلولی و برای خون سازی و NF-KB آپوپتوز اشاره کرد. NF-KB از همین رو بسیاری از تومورهای انسانی دارای NF-KB غیرعادی و تنظیم نشده هستند، به این گونه که در آن ها NF-KB به صورت دائم فعال است [۱۲، ۱۳]. تاکادا و همکاران نشان دادند آپوپتوز ناشی از فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF) را از طریق سرکوب NF-KB در لوسمی سلول حاد انسانی سلول جورکات تقویت می کند [۱۴]. لتینن و همکاران نتیجه گرفتند که فعال شدن عفونت ویروس هرپس مادرانه خطر ALL در فرزندان را افزایش می دهد. تنها مثبت بودن ایمونوگلوبولین EBV در مادران (-EBV immunoglobulin-G) با ریسک بسیار زیاد قابل توجه ALL در فرزندان همراه بوده است [۱۵]. مطالعات پیشین نشان می دهند H_2O_2 یک القاکننده مؤثر در فعال شدن مسیر NF-KB است [۱۶].

این مطالعه با هدف بررسی افزایش بیان NF-KB به دنبال ویروس EBV و مشارکت آن در نیمه عمر بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد EBV مثبت انجام شد.

مواد و روش ها

جامعه آماری

این پژوهش مورد شاهدی روی کودکان صفر تا ۱۴ ساله مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد مراجعه کننده به بیمارستان کودکان تبریز در سال ۱۳۹۸ انجام شد. حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن $P=0/1$ ، فاصله اطمینان ۹۵ درصد و میزان خطای قابل تحمل ۰/۰۴، تعداد ۶۰ نفر (۶۰ فرد سالم به عنوان کنترل و ۶۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد) برآورد شد.

$$n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 p(1-p)}{d^2}$$

مشخصات هر بیمار پس از مراجعه، با کسب اجازه و رضایت از بیمار ثبت شد. معیارهای ورود به مطالعه برای گروه بیماران شامل تشخیص قطعی ابتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد توسط متخصص انکولوژی و عدم سابقه عفونت های حاد ویروسی، بیماری های خودایمنی و اختلالات غدد درون ریز بود. این بیماران قبل از شروع شیمی درمانی مورد نمونه برداری قرار گرفتند. سپس نمونه گیری از خون وریدی انجام گرفت. بدین ترتیب که از هر فرد مقدار ۲ سی سی خون گرفته شد و در لوله های فالتکون حاوی EDTA، به عنوان ماده ضد انعقاد، ریخته شد و سپس لوله ها به آرامی تکان داده شدند تا مخلوط شوند و از تشکیل لخته های خونی جلوگیری شود. این نمونه ها نهایتاً به آزمایشگاه انتقال داده

ویروس (EBV) یک ویروس تومورزا و عضوی از خانواده هرپس ویریده هاست. ویروس اپشتین بار از یک ژنوم دورشته ای تقریباً به درازی kb-172 تشکیل یافته که بیش از ۸۰ ژن و RNA های غیرکدشونده را رمزگذاری می کند. این ویروس، ویروسی خطی است، اما به صورت اپیزوم در هسته سلول های عفونی به شکل حلقوی درمی آید. EBV با بسیاری از بیماری های بدخیم لنفوم، کارسینوم ها و همچنین بسیاری از بیماری های خوش خیم نظیر مونونوکلئوز عفونی مرتبط است و همچنین به عنوان یک پروموتور فاکتور برای برخی از بیماری های خودایمنی محسوب می شود. در مجموع برآورد می شود که حدود ۱ تا ۱/۵ درصد از فراوانی سرطان در سرتاسر جهان مختص به EBV است [۶]. ویروس اپشتین بار حدود ۹۰ درصد از جمعیت را عفونی می کند و عفونت اولیه در خردسالان است و ممکن است سبب عفونت مونونوکلئوزیس شود [۷]. در بیشتر افراد، ویروس در سلول های B نهفته می شود و عواقب سلامتی تشخیص داده نمی شود. با این حال این ویروس با لیستی از بیماری های بدخیم با منشأ لنفوئیدی یا پوششی همانند لنفومای بورکیت، بیماری تکثیری لنفاوی پس از پیوند، لنفومای B در ایمنی، لنفومای هاجکین، لنفومای سلول های کشنده طبیعی T، سرطان بینی حلقوی، لیومیوسارکوما در ایدز و زیرمجموعه های سرطان معده در ارتباط است. به علاوه ارتباط این ویروس ها با نقاطی همانند سینه، ریه و پروستات گزارش شده است [۸].

فاکتور هسته ای کاپا بی (NF-KB) کمپلکس پروتئینی است که کنترل رونویسی DNA، تولید سایتوکاین ها و نیمه عمر سلول را بر عهده دارد. این ژن در اکثر سلول ها بیان می شود و تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف نظیر استرس، ویروس ها و اشعه تغییر رفتار می دهد. NF-KB اصلی ترین فاکتورها در تنظیم الگوی پاسخ ایمنی به عوامل میکروبی محسوب می شود. تنظیم نابجای این ژن در بیماری های مختلف نظیر سرطان ها دیده شده است [۹، ۱۰]. NF-KB یک عامل نسخه برداری است که بیان ژن های آنتی آپوپتوزیس را تنظیم کرده و کموکاین ها و سایتوکاین های پیش التهابی را فعال می کند. در واقع، NF-KB یک میانجی کلیدی در سرطان زایی توسط التهاب است [۱۱]. NF-KB به طور گسترده توسط سلول های یوکاریوت به عنوان تنظیم کننده بیان ژن هایی که در تکثیر و بقا نقش دارند، مورد استفاده قرار می گیرد. از همین رو بسیاری از تومورهای انسانی دارای NF-KB غیرعادی و تنظیم نشده هستند، به این گونه که در آن ها NF-KB به صورت دائم فعال است. NF-KB فعال بیان ژن هایی را که تکثیر سلولی را فعال نگه می دارند، روشن می کند و از طرف دیگر سلول را در مقابل آپوپتوز حفظ می نماید. این فاکتور رونویسی در فعالیت های متنوع سلولی دخیل بوده و در اعمال بیولوژیک

2. Epstein-Barr Virus (EBV)

3. Nuclear-actor kappa B (NF-kB)

4. Tumor Necrosis Factor (TNF)

میکرولیتر پرایمر ریورز (۲/۰ میکرومولار)، ۷ میکرولیتر DEPC و ۱۰ میکرولیتر Mastermix 1x Real time ریخته شد. بعد تیوپها در دستگاه Real time PCR قرار داده شده و دستگاه run شد.

ایزولاسیون DNA ویروسی از نمونه بیماران مبتلا به لوسمی

برای بررسی متیلاسیون ژن DNA، NF-kB توتال از بلوک پارافینه دریافتی طبق دستورالعمل شرکت Bioneer، سازنده کیت استخراج DNA از بلوک پارافینه به شماره کاتالوگ ۷۴۰۹۸۰/۵۰ جداسازی شد و برای بررسی متیلاسیون ژنوم ویروس EBV ابتدا DNA ویروسی از نمونه بافت بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد EBV مثبت به صورت زیر جداسازی شد: ۲۰۰-۱ نانوگرم از بافت هموزن شده داخل تیوپ ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت. ۲۰۰ μl از Lysis Buffer HL اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۲۰۰ μl Proteinase K و ۲۰۰ μl از Carrier DNA، افزوده شد و میکس شد. افزودن کنترل داخلی از Binding Buffer HL به مقدار افزوده و مخلوط شد. به داخل RTA Spin Filter انتقال داده شد و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به مدت ۲ دقیقه در ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام شد و مجدداً مخلوط به داخل RTA Spin Filter داخل RTA Wash Buffer I از ۵۰۰ μl در مدت یک دقیقه در ۱۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مجدداً مخلوط به داخل RTA Spin Filter جدید انتقال داده شد. ۷۰۰ μl از Wash Buffer II افزوده شد و سانتریفیوژ شد، فیلتر جدا شده روی تیوپ قرار داده شد و RTA Spin Filter داخل تیوپ جدیدی انتقال داده شد. به مدت ۴ دقیقه جهت حذف کامل اتانول در حداکثر سرعت سانتریفیوژ انجام شد و به مدت ۱۵ دقیقه داخل فیلتر جدیدی انتقال داده شد. ۱۰۰ μl از Elution Buffer که قبلاً تا ۵۶ °C گرم شده بود، به داخل RTA Spin Filter افزوده شد و مخلوط در دمای اتاق به مدت یک دقیقه انکوبه شد و سپس سانتریفیوژ شد و DNA ویروسی در ۴ °C یا در ۲۰- °C ذخیره سازی شد.

تعیین کمیت ویروس EBV

استانداردهای کمکی موجود در کیت داینابایو (DynaBio)™ (Takapozist, Iran) به همان روش استخراج نمونه و با همان حجم، انجام شدند.

برای تولید یک منحنی استاندارد در RotorGene™ همه پنج استاندارد در منوی ویرایش نرم افزار RotorGene™ تعریف شدند. همان موارد نیز به عنوان استانداردهای با غلظت‌های مشخص شده مورد استفاده قرار گرفتند.

فرمول زیر باید برای تبدیل مقادیر تعیین شده با استفاده از

شده و داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ضمن خون ۶۰ فرد سالم نیز به عنوان گروه کنترل، مانند نمونه بیمار گرفته شد.

استخراج RNA

به منظور استخراج RNA، سلولها توسط بافر تریزول لیز شدند. لیزات سلولی حاصله به داخل میکروتیوپهای DNase/ RNase-free منتقل شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ اضافه شد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، مایع رویی دور ریخته شد و به آن ایزوپروپانول ۷۰ درصد اضافه شد. در روز بعد تیوپها به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۲۰۰۰ rpm دور سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در دمای محیط خشک شد. در انتها، رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر حل شد. مقدار RNA استخراج شده به روش نوری و با استفاده از دستگاه NanoDrop (Wilmington, DE, USA) اندازه گیری شد و کیفیت RNA حاصله با روش الکتروفورز روی ژل مورد ارزیابی قرار گرفت.

الکتروفورز نمونه RNAهای استخراج شده

به منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده، پنج نمونه به صورت رندوم روی فرمالدئید ژل آگارز، الکتروفورز شدند. بدین منظور ابتدا ژل ۰/۸ ساخته شد و نمونهها پس از بسته شدن ژل روی ژل لود شدند و به مدت یک ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند.

آنالیز کمی RNA

آنالیز کمی RNA از طریق دستگاه نانو دراپ و با اندازه گیری جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

سنتز cDNA

ساخت مولکولهای DNA مکمل با کیت QuantiTect Re-verse Transcription (شرکت کیازن، ایران) انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار Gene (Version 3.05) runner طراحی شد و توسط وبسایت (www.ncbi.nlm.nih.gov) BLAST شدند که اطلاعات آنها در جدول شماره ۱ موجود است. پرایمرها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند.

Real time PCR

واکنش Real time PCR به صورت تکرارهای سه تایی صورت گرفت. بدین شکل که در تیوپهای مخصوص Real time PCR یک میکرولیتر cDNA و ۱۹ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین حاوی یک میکرولیتر پرایمر فوروارد (۲/۰ میکرومولار)، یک

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای به کاررفته در این مطالعه

نام آغازگر (شماره دسترسی)	توالی آغازگر	اندازه محصول (bp) PCR	Tm آغازگر
<i>NFKB1-F Forward</i>	CCGGCTTCAGAAATGGCAGAA		۵۹/۲۳
<i>NFKB1-Reverse</i>	TATGGGCCATCTGTTGGCAG	۱۳۹	۹۷/۵۹
<i>NFKB1-P Primer</i>	TGGGAAGGCCTGAACAAATGTTTCA		۳۲/۶۰
<i>GAPDH-Forward</i>	GAAAGCCTGCCGGTACTAA		۶۰/۶۰
<i>GAPDH-Reverse</i>	CTGCGCTCCTGCCTCGATGG	۱۵۰	۳۱/۶۰
<i>GAPDH-Primer</i>	AGGAAAAGCATCACCCGGAG		۳۰/۵۹

افتخ دانش

منحنی استاندارد به IU/ml نمونه‌ها اعمال شود.

وجود نداشت (جدول شماره ۲).

آنالیز کیفی RNA

$$Result (IU/ml) = \frac{Result (IU/\mu l) \times Elution Volume (\mu l)}{sample Volume (ml)}$$

به منظور تأیید کیفی RNA استخراجی، الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل ۰/۸ درصد آگارز انجام شد که در تصویر شماره ۱ وجود باندهای ۱۸S و ۲۸S ریبوزومی نشان داده شده است. حضور و کیفیت باندهای ۱۸S و ۲۸S ریبوزومی نمایانگر کیفیت RNA استخراج شده است.

روش محاسبه آماری

پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی با به کار بردن قانون هاردی وینبرگ میزان فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده، محاسبه و وارد محیط SPSS شد. برای مقایسه میانگین تعداد آلل‌های جهش یافته در جامعه مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس استفاده شد. فرض صفر در آنالیز واریانس، برابر بودن میانگین متغیر وابسته در تمام سطوح متغیر مستقل است.

آنالیز کمی RNA تیمار شده

پس از تیمار RNA استخراج شده به روش مذکور و به منظور بررسی کمی آن، آنالیز اسپکتروفوتومتری انجام شد تا از غلظت آن‌ها اطمینان حاصل شود.

یافته‌ها

اطلاعات جمعیت‌شناختی جمعیت مورد مطالعه

در گروه بیماران، ۲۴ نفر (۴۱/۴ درصد) مذکر و ۳۶ نفر (۵۸/۶ درصد) مؤنث و در گروه کنترل نیز ۲۴ نفر (۴۱/۴ درصد) مذکر و ۳۶ نفر (۵۸/۶ درصد) مؤنث بودند. میانگین سنی در گروه بیمار ۸/۶۰±۱/۳۵ سال و در گروه سالم ۷/۷۴±۱/۴۶ سال بود. بین میانگین سنی گروه بیماران و گروه سالم از نظر آماری تفاوتی

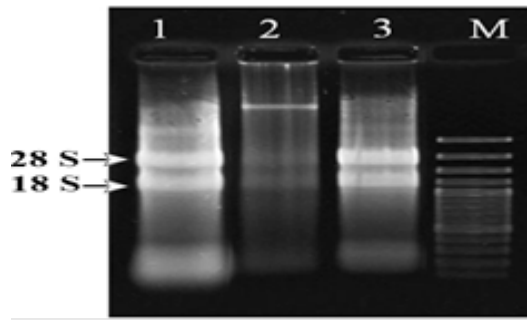
بررسی تغییر بیان ژن‌های NF-κB در سلول‌های لوسمی به روش Real time PCR

برای این منظور پس از انجام تنظیمات اولیه استخراج RNA صورت گرفت و پس از سنتز cDNA با به کارگیری پرایمرها و پروب اختصاصی الگوی بیان مورد بررسی واقع شد.

جدول ۲. توزیع فراوانی و مقایسه گروه بیماران و گروه کنترل بر حسب متغیر جنسیت

سطح معنی‌داری	خی‌دو	فراوانی (درصد)				متغیر
		گروه کنترل	گروه بیمار	EBV+	EBV-	
۰/۰۶۱	۵/۲۱	۳۶ (۴۱/۴)	۳۶ (۵۸/۶)			مؤنث
		۲۴ (۵۸/۶)	۲۴ (۴۱/۴)			مذکر
۰/۰۳۹	۶/۰۹۲	EBV+	EBV-	EBV+	EBV-	حضور EBV
		۷	۵۳	۱۹	۴۱	

افتخ دانش



تصویر ۱. ظهور باندهای 28S و 18S ریبوزومی حاصل از الکتروفورز نمونه‌های RNA بر ژل آگارز ۰/۸ درصد

فوق دانش

لنفوسیت‌ها نوعی از گلبول‌های سفید خون هستند که آنتی‌بادی تولید کرده و از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی بدن هستند. لنفوسیت‌ها برای عملکرد خود به زیرگروه‌هایی تقسیم می‌شوند که عمده‌ترین آن‌ها سلول‌های B و T هستند. در ALL، تجمع از سلول‌های تشکیل‌دهنده لنفوسیت نابالغ به نام سلول‌های بلاست در مغز استخوان دیده می‌شود. این سلول‌ها، سلول‌های طبیعی خون را تحت تأثیر قرار داده و نهایتاً باعث کاهش تولید گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و پلاکت‌های خون می‌شوند. لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) شایع‌ترین بدخیمی در دوران کودکی است که در ۸۰ الی ۸۵ درصد موارد در کودکان کمتر از شش سال بروز می‌کند [۱۷]. پوئی و همکاران نیز در مطالعه خود در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که درگیری عصبی در بیماران مبتلا به لوسمی نادر است [۱۸]. همچنین در مطالعه اکرمی‌پور و همکاران که به بررسی پنج‌ساله کودکان مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی در بیمارستان شقایق اهواز پرداخته بودند، به درگیری کمتر از ۵/۳ درصد سیستم عصبی در این بیماران اشاره شده است [۱۹].

NF-KB يك فاکتور رونویسی است که نقش مهمی در التهاب، پاسخ‌های ایمنی، ایمنی ذاتی و اکتسابی با تنظیم جنبه‌های مختلف تکامل و عمل سلول‌های عملگر ایفا می‌نماید که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۲۰]. بررسی‌های انجام‌شده در سال ۲۰۱۳ توسط نارایانان و همکاران روی سلول‌های HepG کبدی نشان داد در سلول‌های آلوده به ویروس ۲ گونه‌های فعال اکسیژن افزایش پیدا کرده و منجر به فعال کردن مسیر NF-KB در مراحل ابتدایی بیماری شده است که با مطالعه ما هم‌خوانی دارد [۲۱]. نتایج مطالعات چینی در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد I3C و ترکیبات حاصل از آن از طریق مهار فاکتور رونویسی NF-KB می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مختلف شود که با مطالعه ما هم‌خوانی ندارد [۲۲]. سالواتور و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه خود بیان کردند به دنبال تیمار سلول‌ها با دوکسوروبیسین، این ترکیب از طریق اتصال به DNA دورشته‌ای و پایداری کمپلکس آنزیم توپوایزومراز II، مانع سنتز DNA شده و این مسئله منجر به القای آپوپتوز می‌شود. از سوی دیگر، در

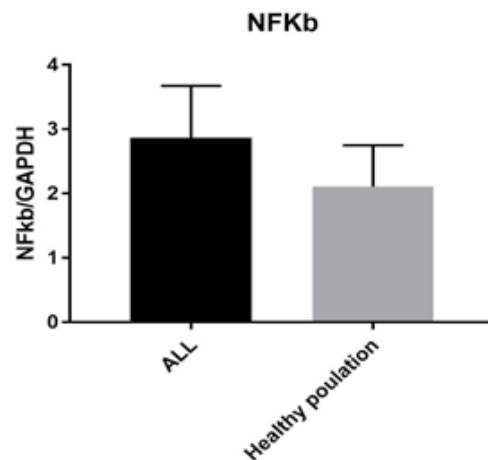
مطالعه بیان ژن NF-kB در سلول‌های لوسمی در مقایسه با نمونه‌های کنترل به وسیله Real time PCR

در نمونه لوسمی بیان ژن NF-KB مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد بیان ژن NF-KB افزایش معنی‌داری در گروه بیمار لوسمی حاد لنفوبلاستیک پیدا می‌کند ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۲).

نتایج حاصل از تغییرات بیان ژن NF-KB نشان داد ویروس EBV باعث کاهش بیان ژن NF-KB در گروه‌های EBV مثبت شد ($P = 0/041$) (تصویر شماره ۳).

بحث

نتایج این بررسی نشان داد میزان بیان ژن NF-KB افزایش معنی‌داری در گروه بیمار دارد و ویروس ایشیتین‌بار باعث کاهش بیان ژن NF-KB در لوسمی لنفوبلاستیک حاد شده است. لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) نوعی سرطان است که بر لنفوسیت‌ها و سلول‌های تولیدکننده لنفوسیت در مغز استخوان تأثیر می‌گذارد.



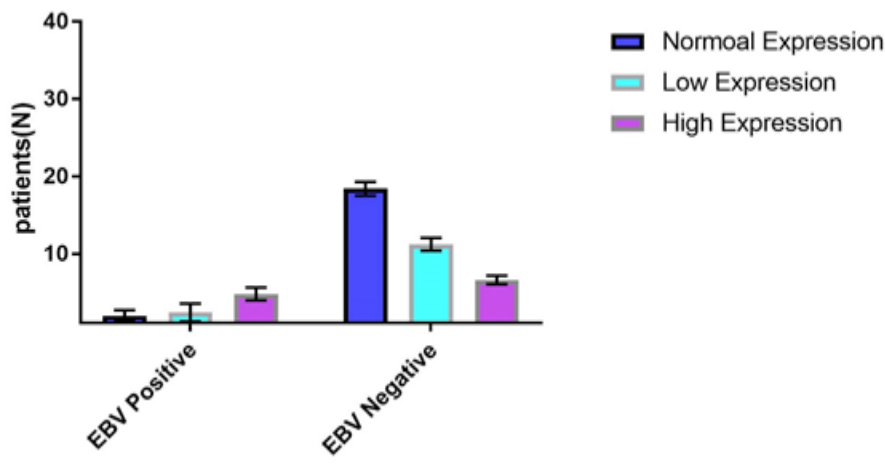
فوق دانش

تصویر ۲. تغییر بیان NF-KB در نمونه‌های لوسمی در مقایسه با نمونه حاضر در گروه کنترل

جدول ۲. تفکیکی بیان کننده الگوی معنی داری ژن NF-KB با به کارگیری تست T غیر جفتی

مقایسه بیماران لوسمی و افراد غیر لوسمی	مقادیر محاسبه شده
Fold Change Leukemia/Healthy population	۸۲/۱
سطح معنی داری	۰۴۱/۰
t	۲۵۶/۲
df	۲
آیا با فرض فاصله اطمینان ۹۵ درصد، تفاوت معنی دار است؟	بله

افتخ دانش



تصویر ۳. آنالیز آماری ANOVA دوطرفه الگوی بیان ژن NF-KB بر اساس تغییر Fold Change در بیماران مبتلا به لوسمی در دو گروه با EBV مثبت و منفی

Kinase Subunit (Beta) IKKB نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ NF-KB ایفا می کند و این مسیر در آسیب های وارد شده به DNA، التهاب سایتوکاین ها، تولید باکتری ها و ویروس ها فعال شده و با فعال کردن صدها ژن باعث پاسخ ایمنی، کنترل رشد و محافظت در مقابل آپوپتوز می شود که با مطالعه ما همخوانی دارد [۲۶]. روته و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که برخی از مولکول هایی که بیان آن ها در سلول های آلوده به EBV تنظیم می شود ممکن است در فعال سازی NF-KB نقش غیرمستقیم ایفا کنند. طبق گزارش ها سلول های SNK6 TNF- α را تولید می کنند که NF-KB را در سلول های T و NK فعال می کند [۲۷]. روته و همکاران در سال ۱۹۹۵ در مطالعات خود بیان کردند که NF-KB می تواند در پایین دست از CD40 و CD137 فعال شود. بیان CD40 یا CD137 ناشی از EBV ممکن است در فعال سازی NF-KB در سلول های EBV-T / NK نقش داشته باشد که با مطالعه ما همخوانی ندارد [۲۷]. سوگانو و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان کردند اتصال EBV فعال سازی

کنار این فرایند مسیر دیگری نیز فعال می شود که با به کارگیری NF-KB و به دنبال آن فعال شدن ژن های دخیل در بقای سلولی مانند AP1-c، Survivin و XIAP از مرگ سلولی جلوگیری می کند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۲۳]. نتایج حاصل از مطالعه آدکوک و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان داد فعال شدن NF-KB نقش مهمی را در فرایندهای التهابی، پاسخ های ایمنی و مرگ سلولی به واسطه اتصال به پروموتور ژن های مختلف مانند TNF α ، 1 β -IL و سیکلواکسیژناز ۲ بازی می کند که با مطالعه ما همخوانی ندارد [۲۴]. گو و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند که والپروات با افزایش استیلآسیون NF-KB نورون ها را از استرس اکسیداتیو القاکننده مرگ سلولی محافظت کرده و دارای اثر محافظ عصبی است که با مطالعه ما همخوانی دارد [۲۵]. در بررسی روی پروتئین های حد واسطه، از ژن های کاهش بیان یافته، ۱۷۰ پروتئین کیناز مرتبط مشاهده شد که از این تعداد، ۶۲ عدد، اختصاصی ژن های دسته کاهش بیان یافته، پیش بینی شدند و از بین ۶۲ عدد کیناز Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

رضایت آگاهانه از بیماران و خانواده‌های مشارکت کننده در پژوهش حاضر اخذ گردید.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مینا گوزلی در گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران، با کد ۲۲۰۳۰۵۰۷۹۷۱۰۰۴ است.

مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده سهمی برابر در اجرای پژوهش و نگارش مقاله حاضر داشته‌اند.

تعارض منافع

در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در این پژوهش ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

NF-KB را آغاز می‌کند که برای عفونت موفقیت‌آمیز سلول لازم است. فعالیت NF-KB به نوبه خود، همچنین بیان مولکول CD21 را تنظیم می‌کند که ممکن است یک حلقه بازخورد مثبت برای تقویت حساسیت سلول به ورود EBV فراهم کند که با مطالعه ما همخوانی ندارد [۲۸]. کاهیر مک‌فارلند و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای نشان دادند حذف فعالیت NF-KB باعث بروز آپوپتوز رده‌های سلولی لنفوم آلوده به EBV در شرایط آزمایشگاهی و موش می‌شود و نشان می‌دهد که این یک مسیر اساسی است که توسط آنکوپروتئین‌های ویروسی ایجاد می‌شود که با مطالعه ما همخوانی دارد [۲۹]. بین فعال‌سازی NF-KB و تکثیر سلولی در بازداشت چرخه سلولی رابطه وجود دارد. بر اساس تعادل نسبی بین عملکردهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی NF-KB، همچنین نقش مهم NF-KB در مقاومت به آپوپتوز و کنترل تقسیم سلول‌های بنیادی خونساز، اخیراً به خوبی مشخص شده است که NF-KB نیز در استرس اکسیداتیو نقش دارد. فعال‌سازی NF-KB مسئول فعال شدن اکسید نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) برای افزایش اکسید نیتریک (NO) است که به عنوان یک عملکرد طرفدار آپوپتوز NF-KB توصیف شده است. الگوی تولید NO ممکن است بقای سلولی را کنترل کند، زیرا مشخص شد که تولید حاد NO باعث آپوپتوز می‌شود. اما از طرف دیگر، تولید مزمن NO با سیگنالینگ NF-KB سازنده فعال می‌تواند مکانیسم آپوپتوز را مهار کند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۳۰]. صفا و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای بیان کردند که در تومورزایی انسان، NF-KB یک عامل مهم در بقای سلول‌های سرطانی است که با مطالعه ما همخوانی دارد [۳۱]. پوگلیو و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه‌ای بیان کردند تغییرات در مسیر NF-KB به‌ویژه در ALL و سایر لوسمی‌ها به رسمیت شناخته شده است؛ به عنوان مثال، تنظیم آن باید آپوپتوز سلول‌های لوسمی را تسهیل کند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۳۲]. در یک مطالعه منتشر شده از لتین و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داده شد فعال شدن مجدد مادر از عفونت EBV در سه‌ماهه اول با افزایش قابل توجهی در بروز ALL در فرزندان همراه است که با مطالعه ما همخوانی ندارد [۱۵]. تاکادا و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند آپوپتوز ناشی از TNF را از طریق سرکوب NF-KB در لوسمی سلول حاد انسانی سلول جورکات تقویت می‌کند که با مطالعه ما همخوانی دارد [۱۴].

نتیجه‌گیری

ژن NF-KB می‌تواند به عنوان یک پیش‌آگهی تشخیص لوسمی لنفوبلاستیک حاد باشد که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه است. همچنین انجام مطالعات بیشتر در مورد عفونت EBV و بیماری لنفوبلاستیک حاد ضروری است.

References

- [1] Kliegman R, Stanton B, Geme JSt, Schor NF. Nelson Textbook of Pediatrics. 20th ed. Amsterdam: Elsevier; 2016.
- [2] Lanzkowsky Ph. Manual of pediatric hematology and oncology. 5th ed. Amsterdam: Elsevier; 2010.
- [3] Ahmed HG, Osman SI, Ashankyty IM. Incidence of epstein-barr virus in pediatric leukemia in the Sudan. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2015SS2; 12(2):127-31. [DOI:10.1016/j.clml.2011.11.006] [PMID]
- [4] Bogdanovic G, Jernberg AG, Priftakis P, Grillner L, Gustafsson B. Human herpes virus 6 or epstein-barr virus were not detected in Guthrie cards from children who later developed leukaemia. *British Journal of Cancer*. 2004; 91:913-5. [DOI:10.1038/sj.bjc.6602099]
- [5] Borges E, Ferry JA, Friedmann AM. Epstein-barr virus-negative precursor B cell lymphoblastic lymphoma after liver transplantation: A unique form of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation*. 2002; 73(4):541-3. [DOI:10.1097/00007890-200202270-00008] [PMID]
- [6] Szymula A. Genetic analysis of the role of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein (EBNA-LP) in B cell transformation. [PhD. Dissertation]. London: Imperial College London; 2016. [DOI:10.25560/44554] <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.705836>
- [7] Fasan O, Willmott C, Czepulkowski B, Baker A, Rees D, Salisbury J, et al. Epstein-barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder with t(9;14)(p11-12;q32). *Cancer Genet Cytogenet*. 2003; 142(2):134-6. [DOI:10.1016/s0165-4608(02)00838-5] [PMID]
- [8] Huang J, Chen H, Hutt-Fletcher L, Ambinder RF, Hayward SD. Lytic viral replication as a contributor to the detection of epstein-barr virus in breast cancer. *Journal Virology*. 2003; 77(24):13267-74. [DOI:10.1128/jvi.77.24.13267-13274.2003] [PMID] [PMCID]
- [9] Kawabata Y, Hirokawa M, Saitoh Y, Kosugi S, Yoshioka T, Fujishima M, et al. Late-onset fatal epstein-barr virus-associated hemophagocytic syndrome following cord blood cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Hematology*. 2006; 84(5):445-8. [DOI:10.1532/IJH97.06101] [PMID]
- [10] Levine RL. Inherited susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*. 2009; 41(9):957-8. [DOI:10.1038/ng0909-957] [PMID]
- [11] Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Immunology & Allergy Clinics of North America*. 2009; 29(2):381-93. [DOI:10.1016/j.iac.2009.02.011] [PMID]
- [12] Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal Clinical Investigation*. 2001; 107(3):247-54. [DOI:10.1172/JCI11916] [PMID] [PMCID]
- [13] Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Molecular and Cellular Biology* Biol. 2010; 30(20):4901-21. [DOI:10.1128/MCB.00409-10] [PMID] [PMCID]
- [14] Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF-kappaB and IkkappaBalpha kinase activation, causing inhibition of expression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood*. 2005; 106(2):641-9. [DOI:10.1182/blood-2004-12-4589] [PMID] [PMCID]
- [15] Lehtinen M, Koskela P, Ogmundsdottir HM, Bloigu A, Dillner J, Gudnadottir M, et al. Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. *American Journal of Epidemiology*. 2003; 158(3):207-13. [DOI:10.1093/aje/kwg137] [PMID]
- [16] Rojkind M, Domínguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002; 59(11):1872-91. [DOI:10.1007/pl00012511] [PMID]
- [17] Mitrus AJ, Rosenthal DS. Adult leukemias. In: Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP, editors. *American society textbook of clinical oncology*. Atlanta: The American Cancer Society; 1991.
- [18] Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004; 350(15):1535-48. [DOI:10.1056/NEJMra023001] [PMID]
- [19] Akramipour R, Pedram M, Zandian K, Hashemi A. [A 5-Year- study on Children with Acute Myelocytic Leukemia/AML, Ahvaz Shafa Hospital (1996-2001) (Persian)]. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*. 2007;11(2):e80674. <https://sites.kowsarpub.com/jkums/articles/80674.html>
- [20] Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Research*. 2011; 21(1):86-102. [DOI:10.1038/cr.2010.161] [PMID] [PMCID]
- [21] Narayanan A, Amaya M, Voss K, Chung M, Benedict A, Sampey G, et al. Reactive oxygen species activate NFkB (p65) and p53 and induce apoptosis in RVFV infected liver cells. *Virology*. 2014; 449:270-86. [DOI:10.1016/j.virol.2013.11.023] [PMID]
- [22] Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2001; 20(23):2927-36. [DOI:10.1038/sj.onc.1204365] [PMID]
- [23] Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S, Binaschi M. NF-kappaB activation contributes to anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *International Journal of Oncology*. 2005; 27(3):799-806. [PMID]
- [24] Adcock IM. Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Archives for Chest Disease*. 1997; 52(2):178-86. [PMID]
- [25] Go HS, Seo JE, Kim KC, Han SM, Kim P, Kang YS, et al. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-kB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. *Journal of Biomedical Science*. 2011; 18(1):48. [DOI:10.1186/1423-0127-18-48] [PMID] [PMCID]
- [26] Salmerón A, Janzen J, Soneji Y, Bump N, Kamens J, Allen H, et al. Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the IkkappaB kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(25):22215-22. [DOI:10.1074/jbc.M101754200] [PMID]
- [27] Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*. 1995; 269(5229):1424-7. [DOI:10.1126/science.7544915] [PMID]
- [28] Sugano N, Chen W, Roberts ML, Cooper NR. Epstein-barr virus binding to CD21 activates the initial viral promoter via NF-kappaB induction. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 186(5):731-7. [DOI:10.1084/jem.186.5.731] [PMID] [PMCID]

- [29] Cahir-McFarland ED, Carter K, Rosenwald A, Giltzane JM, Henrickson SE, Staudt LM, et al. Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-barr virus latency III-infected cells. *Journal of Virology*. 2004; 78(8):4108-19. [DOI:10.1128/jvi.78.8.4108-4119.2004] [PMID] [PMCID]
- [30] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 2(10):725-34. [DOI:10.1038/nri910] [PMID]
- [31] Safa M, Tavasoli B, Manafi R, Kiani F, Kashiri M, Ebrahimi S, et al. [Indole-3-carbinol suppresses NF-κB activity and stimulates the p53 pathway in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells (Persian)]. *Tumour Biology*. 2015; 36(5):3919-30. [DOI:10.1007/s13277-014-3035-1] [PMID]
- [32] Poglio S, Cahu X, Uzan B, Besnard-Guérin C, Lapillonne H, Leblanc T, et al. Rapid childhood T-aLL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF-κB pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia*. 2015; 29(4):977-80. [DOI:10.1038/leu.2014.317] [PMID]