

اثر عفونت EBV به روی سرطان مری با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک

حسین گودرزی

گروه بیولوژی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

چکیده

سرطان مری یکی از سرطان های شایع در ایران و دنیا است، ایران در کمربند آسیایی سرطان مری واقع شده است. علت سرطان مری به درستی مشخص نمی باشد. عفونت با Epstein Barr Virus (EBV) عامل بسیاری از بدخیمی ها در انسان از جمله عامل لنفوم بورکیت و لنفوم هوچکین شناخته شده است. همچنین این ویروس می تواند با سرطان های معده و نازوفارنکس نیز ارتباط داشته باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر عفونت EBV بر روی سرطان مری با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک انجام شد. نتایج حاصل از تفسیر نتایج بیوانفورماتیکی که با استفاده از پایگاه های مختلف و روش های مختلف انجام شد نشان داد که در ۱۰ درصد از نمونه های بیوپسی سرطان مری اثراتی از ویروس EBV دیده می شود با توجه به این یافته ، می توان مطرح کرد که: احتمالاً بین آلودگی به این عفونت ویروسی و سرطان مری می تواند نوعی ارتباط وجود داشته باشد، و ویروس EBV یکی از عوامل موثر در سرطان مری در این مناطق محسوب شود، و ممکن است این ویروس در پاتوژنز سرطان مری نقش داشته باشد. اما، با توجه به شیوع بالای این سرطان در این مناطق باید همچنان به دنبال دخالت سایر عوامل خطر مداخله گر در این سرطان نیز بود. برای اثبات این مدعا باید با انجام یک مطالعه گسترده تر، و به ویژه مطالعات مورد-شاهدی و یا کوهورت، این فرضیه را به صورت کاملاً علمی اثبات نمود.

واژه های کلیدی: ویروس اپشتن بار، EBV، سرطان مری، بیوانفورماتیک

مقدمه

سرطان مری یکی از شایع‌ترین سرطان‌های درگیر کننده سیستم گوارشی و ششمین سرطان کشنده در جهان است. این نوع سرطان در بخشی از جهان بنام کمربند آسیایی از سواحل جنوبی دریای مازندران در ایران تا چین شمالی شیوع بالایی دارد. مصرف مشروبات الکلی، سیگار و عوامل تغذیه‌ای از فاکتورهای سرطان مری می‌باشند (1). سرطان مری¹ (EC) به‌طور جدی سلامت انسان را تهدید می‌کند و یک‌راه جدید امیدوارکننده برای درمان EC شامل ایمونوتراپی سرطان است. برای بهبود کارایی ایمونوتراپی EC و توسعه استراتژی‌های جدید برای پیش‌بینی پیش‌آگهی EC یا درمان بالینی، درک مناظر ایمنی در EC مورد نیاز است. سلول‌های EC حاوی آنتی‌ژن‌های توموری فراوان، از جمله آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور و نوآنتی‌ژن‌ها هستند که توانایی شروع لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک با واسطه سلول‌های دندریتیک را در مراحل اولیه توسعه سرطان دارند (2). همان‌طور که سلول‌های EC با سیستم ایمنی مبارزه می‌کنند، توانایی سرکوب ایمنی ضد تومور را از طریق نقاط بازرسی ایمنی، عوامل ترشح‌شده و سلول‌های ایمنی تنظیم‌کننده منفی به دست می‌آورند. فیروبلاست‌های مرتبط با سرطان نیز به فرار ایمنی سلول‌های EC کمک می‌کنند (3). برخی از عوامل چشم‌انداز ایمنی در ریز محیط تومور EC با توسعه سرطان، بقای بیمار یا پاسخ درمانی مرتبط هستند. بر اساس چشم‌انداز ایمنی، واکسن‌های پپتیدی، درمان با سلول‌های T پذیرفته‌شده و محاصره نقاط بازرسی ایمنی را می‌توان برای ایمونوتراپی EC استفاده کرد (4). مطالعاتی وجود دارد که ابتلا به برخی از ویروس‌ها می‌تواند میزان این بیماری را تحت تأثیر قرار دهد. سرطان مری یکی از تهاجمی‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است. طبق آمار جهانی سرطان در سال ۲۰۱۸ بر اساس ۱۸۵ کشور، سرطان مری هفتمین سرطان شایع و ششمین سرطان از نظر مرگ‌ومیر در سطح جهان است (5). دو نوع اصلی سرطان مری، کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC) و آدنوکارسینوم مری (EAC)، از نظر علائم، توزیع جغرافیایی و علت متفاوت هستند. ESCC شایع‌ترین زیرگروه سرطان مری در سطح جهان است (6). بیش از ۸۰ درصد موارد سرطان مری در سراسر جهان را تشکیل می‌دهد (7). در سال ۲۰۱۲، حدود ۳۹۸۰۰۰ مورد جدید ESCC وجود داشت که ۷٫۶ برابر بیشتر از موارد EAC بود (8) مانند بسیاری از انواع سرطان‌های دیگر، تغییرات ژنتیکی، تکثیر غیرقابل کنترل و فرار از مرگ سلولی و پاسخ ایمنی با پاتوژن ESCC مرتبط است. نرخ بالای تهاجم موضعی و متاستازهای دوردست نیز در بدخیمی ESCC نقش دارد. در واقع، اکثر بیماران در تشخیص اولیه متاستاز موفقیت ندارند (9). تشخیص و درمان تأخیری منجر به پیش‌آگهی بد می‌شود. میزان بقای ۵ ساله بیماران ESCC تنها ۳۰-۲۰٪ است (10). در این تحقیق به اثر عفونت EBV به روی سرطان مری با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک پرداخته شده است.

پیشینه تحقیق

بیماری و همکاری‌ها در سال ۲۰۱۸ به بررسی و مقایسه فراوانی ویروس اپشتین بار در بافت‌های سرطان مری پرداختند. یافته‌ها نشان‌دهنده حضور EBV در سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی مری باشد نتایج مطالعه نشان داد که فراوانی ویروس اپشتین بار در بافت‌های سرطان مری نشان داد. ولی این یافته نمی‌تواند نقش EBV را در ابتلا به سرطان مری تأیید و یا رد کرد (64).

افراسیایی و همکاران ۲۰۲۲ به بررسی آنالیزهای ژنتیکی و رونویسی از تغییر فاز لیتیک در عفونت ویروس اپشتین بار به‌عنوان یک محرک مهم در ایجاد و پشتیبانی لوپوس اریتماتوز سیستمیک پرداختند. در مجموع ۱۰ ژن خطر SLE از این لیست (CD40، LYST، JAZF1، JRF5، BLK، JKZF2، IL12RB2، FAM167A، PTPRC و SLC15A) توسط فاکتور رونویسی EBV، EBNA2، بیان متفاوت بین سلول‌های LCL و B مورد هدف قرار گرفتند. اکثریت نیز با شماره کپی EBV DNA و سطح بیان ژن‌های کدگذاری شده EBV مرتبط بودند. مدل شبکه ژنی نهایی ما بر اساس این ژن‌ها نشان‌دهنده پیوندی است که جایگاه‌های خطر SLE و مسیرهای سیگنالینگ تکثیر سلولی B و نهفتگی EBV را در برمی‌گیرد. (65).

¹ Esophageal cancer

ژانگ و همکاران ۲۰۲۲ به بررسی میکرو RNA BART22 رمزگذاری شده با ویروس اپشتین بار به عنوان نشانگرهای زیستی جدید عمل می‌کند و تبدیل بدخیم کارسینوم نازوفارنکس را هدایت می‌کند. پرداختند. یافته‌ها نشان داد که EBV-miR-22 BART-22 مستقیماً ۳' UTR mRNA ژن MOSPD2 را هدف قرار می‌دهد تا با فعال کردن مسیر سیگنالینگ Wnt/ β -catenin، EMT و متاستاز سلول‌های NPC را تقویت کند. یافته‌های ما یک نشانگر زیستی پیش‌آگهی بالقوه و بینش جدیدی در مورد مکانیسم‌های مولکولی متاستاز NPC ارائه می‌دهد (66).

دولان و همکاران ۲۰۲۲ به بررسی سرطان مری در مرحله اولیه همه‌گیری COVID-19 پرداختند. نودوشش مورد از فوژکتومی در سال ۲۰۱۹ در مقابل ۳۷ مورد طی ماه مارس تا ژوئن ۲۰۲۰ (گروه COVID-19) انجام شد. هیچ تفاوتی بین گروه‌ها برای بیماری‌های همراه قبل از عمل مشاهده نشد. زمان انتظار تا عمل جراحی از درمان نهایی نژادجوانت مشابه بود، میانگین ۵۰ روز در سال ۲۰۱۹ در مقابل ۵۳ روز در طول کووید-۱۹. $p = 0.601$. هیچ افزایشی از مرحله بالینی تا مرحله پاتولوژیک وجود نداشت، ۹٫۴٪ در سال ۲۰۱۹ در مقابل ۷٫۵٪ در $p = 0.841$ COVID-19 عوارض کلی کمتری در طول COVID-19 در مقایسه با ۲۰۱۹ رخ داده است، ۴۳٫۲٪ در مقابل ۶۴٫۶٪ $p = 0.031$ ، اما عوارض در درجات خاص مشابه بود. نرخ پذیرش مجدد از نظر آماری در طول کووید-۱۹ با سال ۲۰۱۹ تفاوتی نداشت، ۱۶٫۲٪ در مقابل ۱۰٫۴٪ $p = 0.38$. هیچ مرگ‌ومیر حین عمل یا عفونت COVID-19 در گروه COVID-19 مشاهده نشد.

دوو و همکاران ۲۰۲۲ به بررسی ارزش ژن مرتبط با ایمنی و سلول‌های ایمنی تومور نفوذی بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک در سرطان مری اولیه پرداختند. تجزیه و تحلیل رگرسیون چند متغیره کاکس با سن، درجه، مرحله تومور، نوع تومور و امتیاز خطر به عنوان متغیرهای کمکی انجام شد. نتایج نشان داد امضای پیش‌آگهی IRG ما جهت جدیدی برای پیش‌بینی بقای بیماران اولیه ESCA فراهم می‌کند و توانایی بالقوه ایجاد، ترویج و بهبود روش‌های درمانی شخصی‌سازی شده بر اساس خطر هر بیمار را دارد (68).

ادواردز و همکاران ۲۰۲۲ به بررسی نقش اصلی برای MicroRNA های سلولی، RNA های طولانی غیرکدکننده (lncRNAs و BART lncRNA رمزگذاری شده با ویروس Epstein-Barr در طول رشد تومور در داخل بدن. پرداختند. این مطالعه اثرات ویروس اپشتین بار (EBV) و یک شکل از RNA های غیر کد کننده طولانی BART (lncRNAs) رمزگذاری شده و ویروس را بر بیان سلولی در سلول‌های اپیتلیال رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی و به عنوان تومورهای *in vivo* ارزیابی کرد که توسط تعیین توالی RNA با توان عملیاتی بالا mRNA و RNA های کوچک خوشه‌بندی سلسله مراتبی بر اساس بیان ژن، خطوط سلولی را از تومورها متمایز کرد و تومورهای EBV مثبت و تومورهای BART را از تومورهای EBV منفی متمایز کرد. بیان EBV و BART همچنین تغییرات بیان خاصی را در microRNA های سلولی (miRs) و lncRNA ها ایجاد کرد (69).

النگ و همکاران ۲۰۱۹ به تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک ژن‌های بیان شده متفاوت و شناسایی ژن‌های کلیدی در لنفوبلاست‌های تبدیل شده با EBV پرداختند. RT-qPCR و سترن بلات نشان داد که ژن‌های BIRC5، PTPN11، E2F1، PLK1 و FYN در لنفوبلاست‌های تبدیل شده با EBV تنظیم پایین‌تری دارد. خاموش کردن ژن PLK1 در سلول‌های راجی می‌تواند از تکثیر و تهاجم سلولی جلوگیری کرده و باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز شود. در نتیجه، BIRC5، PTPN11، E2F1، PLK1 و FYN مولکول‌های کلیدی نامزد لنفوسیت‌های تبدیل شده با EBV هستند (70).

ژو و همکاران ۲۰۱۹ به تجزیه و تحلیل توالی ژنوم، زیرگروه‌های ویروس اپشتین بار مرتبط با خطر بالای کارسینوم نازوفارنکس را شناسایی می‌کند پرداختند. طریق تعیین توالی ژنوم در مقیاس بزرگ ۲۷۰ ایزوله EBV و مطالعه ارتباط دومرحله‌ای جدایه‌های EBV از چین، ما دو نوع غیر مترادف EBV را در BALF2 شناسایی کردیم که به شدت با خطر NPC مرتبط هستند (نسبت شانس $OR = 8.69$ ، $P = 9.69 \times 10^{-25}$ ، برای SNP 162476_C، $OR = 6.14$ ، $P = 2.40 \times 10^{-}$ ، 32 برای SNP 163364_T). اثرات تجمعی این‌گونه‌ها به ۸۳ درصد از خطر کلی NPC در جنوب چین کمک می‌کند. (71)

روش شناسی تحقیق

پایگاه‌های استفاده‌شده در این پژوهش به شرح زیر است:

پایگاه GEO:

در ابتدا برای شروع مطالعه به پایگاه GEO مراجعه شد و سپس با دریافت GSE مناسب برای پژوهش به شناسه GSE161533 انتخاب شد و ساختن گروه بیمار و کنترل در بین سمپل‌ها، آنالیز داده‌ها صورت گرفت، نمودارها ترسیم شد و داده‌ها مربوط به ژن‌های بیماری سرطان مری در غالب یک جدول به دست آمد، دانلود شد و در آکسل انتقال داده شد. میزان بیان ژن‌ها را نسبت به ژن‌هایی که بیان آن‌ها در مواجهه با بیماری دچار تغییر نمی‌شود را نشان می‌دهد. رنگ قرمز نشان‌دهنده ژن‌هایی است که در مواجهه با بیماری افزایش بیان داشته و نقاط آبی نشان‌دهنده ژن‌هایی است که در زمان وقوع بیماری دچار کاهش بیان می‌شوند نقاط مشکی ژن‌هایی هستند که در مقایسه با ژن‌هایی که کاهش یا افزایش بیان داشته‌اند این ژن‌ها تغییر خاصی در بیان‌شان ایجاد نشده است.

پایگاه Enrich r:

در این پایگاه داده‌هایی که در پایگاه قبل به اکسل انتقال داده شد را ابتدا برحسب معنی‌داری 0/05 جدا شد و فقط داده‌های معنی‌دار باقی ماند و بعد داده‌ها برحسب $\log FC$ از بزرگ به کوچک سورت شد و داده‌های منفی و مثبت از یکدیگر جدا شد و ژن‌ها با افزایش بیان و ژن‌ها با کاهش بیان از یکدیگر جدا شدند و هرکدام به صفحه جدید منتقل شد. لیست Gene Symbol را کپی کرده و به پایگاه Enrichr وارد شد و مسیر سیگنالی در پایگاه KEGG دریافت شد در انتها یک جدول از داده‌های این مسیر سیگنالی دانلود شد و نموداری در غالب معنی‌داری ۱۰ مسیر معنی‌دار در این پایگاه گرفته شد (یک‌بار لیست ژنی برای ژن‌های دارای افزایش بیان یا همان ژن‌های UP را به پایگاه Enrich r برده و جدول و نمودار مربوطه دریافت شد و بار دیگر لیست ژن‌ها با کاهش بیان یا همان Down را به پایگاه Enrichr برده و جدول و نمودار مربوطه دریافت گردید).

پایگاه String:

جدول دانلود شده در پایگاه قبل به اکسل منقل شد با استفاده از ژن‌های ده مسیر اول در پایگاه string شبکه پروتئینی ژن‌ها رسم شد و تصویر شبکه دانلود شد. در این شبکه به مهم‌ترین پروتئین‌ها که بیشترین ارتباط را با دیگر پروتئین‌های نتورک دارد نشان داده شد. در این پایگاه دیده شد که در کل نتورک چند پروتئین وجود دارد و میانگین خطوطی که ارتباط بین پروتئین نشان داده شد و به صورت عددی بیان شد و از مهم‌ترین اطلاعاتی که این پایگاه بیان کرد میزان معنی‌داری یا همان P.value است. (یک‌بار برای ژن‌های با افزایش بیان و یک‌بار برای ژن‌هایی با کاهش بیان شبکه ترسیم و نتیجه ثبت گردید).

پایگاه BioGrade:

در مرحله با واردکردن پروتئین‌های مهم که در شبکه string نمایان شد، به صورت singel protein و ترسیم شبکه مخصوص برای یک پروتئین، ارتباط آن را با پروتئین‌های دیگر رؤیت کرد. در این شبکه دیده شد که پروتئین مدنظر MET در مرکز قرار دارد و مابقی پروتئین‌هایی که با MET ارتباط دارند در اطراف آن قرار گرفته و با ضخامت خطوط میزان ارتباط بین MET با مابقی پروتئین‌ها دیده شد و تصویر نتورک ترسیم و ثبت گردید.

پایگاه Network Anlaysia:

ژن‌هایی که در string شبکه پروتئینی ترسیم شد را برای دریافت شبکه دقیق‌تر و قابل‌ویرایش در این مرحله به پایگاه Network Anlaysia وارد شد و شبکه پروتئینی دقیق‌تر و قابل‌ویرایش همراه با جدول Degree و Betweenness

۲ لیست تک ژن‌ها

۴ نشان دهنده میزان ارتباط یک پروتئین با مابقی پروتئین‌ها

۵ نشان دهنده میزان معنی‌داری

دریافت شد. در این مرحله به لیستی از مهم‌ترین ژن‌هایی که در سرطان مری تأثیر گزار هستند، رؤیت شد. در این پایگاه با هایلایت کردن ژن‌هایی که Degree و Betweenness بالایی دارند به شبکه نظم داده شد و پروتئین‌هایی که در شبکه اهمیت کمتری داشتند محو گردید و پروتئین‌های مهم‌تر برجسته شد. (یک‌بار برای ژن‌های دارای کاهش بیان شبکه و جدول ترسیم و دریافت شد و بار دیگر برای ژن‌ها بایان بالا)

پایگاه GEPIA:

در این مرحله ژن‌هایی که رد پایگاه قبل هایلایت شد و از جمله مهم‌ترین ژن‌ها در سرطان مری به شمار رفتند را در پایگاه Gepia به صورت تکی وارد شد و میزان معنی‌داری ژن را در نمودارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته شد. در این مرحله میزان اهمیت یک ژن در بیماری سرطان مری در مقایسه با ۳۲ سرطان دیگر مقایسه شد و نتیجه در غالب نمودار ثبت شد. (به صورت تک ژن هم‌ژن‌های بایان بالا یا up و ژن‌های بایان پایین یا down جداگانه وارد شد و نمودارهای مختلف بررسی شد)

پایگاه miRNET:

در این مرحله با وارد کردن لیست ۱۰ ژن مهم در نتورک های قبل، به مهم‌ترین micrRNA های که در روند این بیماری تأثیر گزار هستند، دسترسی پیدا شد. micrRNA ها از آن جهت مهم هستند که بیان یا عدم بیان یک ژن را پس از رونویسی کنترل می‌کنند پس micrRNA ها ژن‌های مهم در بیماری‌های مختلف حائز اهمیت هستند و حتی در بخش دارو بسیار کمک‌کننده هستند.

پایگاه Gene Cards:

در انتهای کار آنالیز بیوانفورماتیکی بایستی به پایگاه Gene Cards مراجعه کرد و به سنجش ژن‌های مهم که در طول آنالیز به آن‌ها پرداخته شد بررسی بیشتری روی ژن صورت گیرد. در این پایگاه ژن‌های مدنظر به صورت تک ژن وارد شده و اطلاعات همچون: نام‌های دیگر ژن، شکل سه‌بعدی پروتئین، جایگاه ژن در کروموزوم، شماره کروموزوم که ژن بر روی آن قرار دارد و جایگاهی که ژن در آن قسمت بیان بیشتری در سلول دارد و ... در دسترس قرار می‌دهد. ژن MET جز دسته ژن‌ها بایان بالا در پایگاه Gene Cards بررسی شد. این ژن روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد. این ژن عضوی از خانواده پروتئین‌های گیرنده تیروزین کیناز و محصول پروتئین‌کوژن MET را کد می‌کند. پیش پروتئین کدگذاری شده به صورت پروتئولیتی پردازش می‌شود تا زیر واحدهای آلفا و بتا تولید کند که از طریق پیوندهای دی سولفیدی به هم متصل می‌شوند تا گیرنده بالغ را تشکیل دهند. پردازش بیشتر زیر واحد بتا منجر به تشکیل پپتید M10 می‌شود که نشان داده شده است که فیروز ریه را کاهش می‌دهد. اتصال لیگاند آن، فاکتور رشد هیپاتوسیت، باعث دیمریزاسیون و فعال شدن گیرنده می‌شود که در بقای سلولی، جنین زایی و مهاجرت و تهاجم سلولی نقش دارد. جهش در این ژن با کارسینوم سلول پاپیلاری کلیه، کارسینوم سلول کبدی و سرطان‌های مختلف سر و گردن مرتبط است.

یافته ها

تهیه نمونه و استخراج DNA.

40 نمونه بلوک پارافینه سرطان مری و ۴۰ نمونه بلوک پارافینه بافت سالم مری به عنوان شاهد از بیمارستان ها و آزمایشگاه های پاتولوژی جمع آوری شد. بلوک های انتخاب شده مربوط به سال های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۵ هجری شمسی بودند. طیف سنی افراد سرطانی از ۳۱ تا ۹۰ سال بود که به سه گروه (۵۱-۳۱، ۷۰-۵۰ و ۷۱-۹۰ سال (تقسیم بندی شدند که بیشترین تعداد افراد سرطانی مربوط به سنین سال بودند و سعی گردید در انتخاب افراد نرمال ۵۱-۷۰ به این توزیع سنی توجه گردد و نمونه های کنترل با دقت بیشتری انتخاب شوند. با استفاده از دستگاه میکروتوم برش های نازک به ضخامت ۶ میکرونی به تعداد ۶ تا ۱۰ عدد از بلوک های پارافینی تهیه و در میکروتیوب های ۵/۱ میلی لیتری فاقد DNase/RNase ریخته شد. بعد از دپارافینه کردن نمونه ها با گزینن/MERK/آلمان (و اتانول مطلق، DNA ژنومیک با استفاده از روش نمکی) salting

Out (استخراج گردید). روش استخراج به این ترتیب بود که به هر کدام از نمونه ها ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده و ۲۰ تا ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز k اضافه گردید، سپس نمونه ها ورتکس و اسپین شدند و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد حمام آب به صورت یک شبانه روز قرار داده شدند) اگر بعد از ۲۴ ساعت بافت کاملاً هضم نشده بود، دوباره پروتئیناز k اضافه و یک شبانه روز دیگر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس به هر کدام از نمونه ها ۲۰۰ میکرولیتر NaCl پنج مولار اضافه و بعد از سانتریفوژ در دور ۱۴ هزار rpm به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی به لوله جدید منتقل شد. رسوب حاوی پروتئین و نمک دور ریخته شد. به محلول رویی انتقال یافته به ویال دیگر، هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و با سروتیه کردن، کاملاً مخلوط شدند. برای افزایش راندمان کار، میکروتیوب ها به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس ۲۰ دقیقه با دور ۱۴ هزار rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب را با اتانول ۷۰٪ شستشو داده و سپس در دور ۱۴ هزار rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. این مرحله دو بار تکرار شد تا DNA به طور کامل شستشو داده شود. در آخر بعد از خشک شدن کامل رسوب در دمای اتاق، در مقدار مناسب آب حل شد) برای حل DNA در آب، ۳۰ دقیقه DNA های استخراج شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد حمام آب قرار داده شدند. نمونه ها تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شوند.

ارزیابی خلوص و کیفیت DNA استخراج شده:

غلظت و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. نسبت جذب نوری (Optical Density) طول موج های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه هایی که این نسبت را در حدود ۷/۱ تا ۲ نشان دادند برای انجام PCR بکار رفتند. نمونه های مناسب برای انجام PCR از روی تکثیر ژن بتا اکتین با آغازگر اختصاصی آن ژن تعیین شدند) جدول ۱. برای انجام واکنش، مخلوط ۲۵ میکرولیتری برای هر نمونه طبق دستور کار ارائه شده برای مسترمیکس PCR توسط شرکت سیناژن تهیه شد. ابتدا در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه گرم شدند و سپس برای ۳۰ چرخه تحت فرآیند PCR شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه قرار گرفتند. در انتها در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه باقی ماندند تا اطمینان حاصل شود که محصول به طور کامل تکثیر شده است. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۵/۱ درصد الکتروفورز شدند تا باند ۱۶۱ جفت بازی مشاهده شود. انجام واکنش PCR برای بررسی حضور ویروس ایشیتین-بار هر کدام از نمونه ها که برای ژن بتا اکتین مثبت بودند، برای شناسایی و تشخیص ویروس EBV. مجدد PCR شدند. در این مرحله چون باید ویروس احتمالی در نمونه ها تکثیر شود به همین علت نیاز به آغازگر ویروس ایشیتین-بار است. توالی این آغازگر در جدول ۱-۴ نشان داده شده است. برای PCR نمونه ها در یک میکروتیوب ۲/۰ میلی لیتری، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس شرکت، ۵/۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲۰ نانوگرم از DNA الگو ریخته شد سپس با آب دیونیزه حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ژن بتا اکتین و مشخصات آن

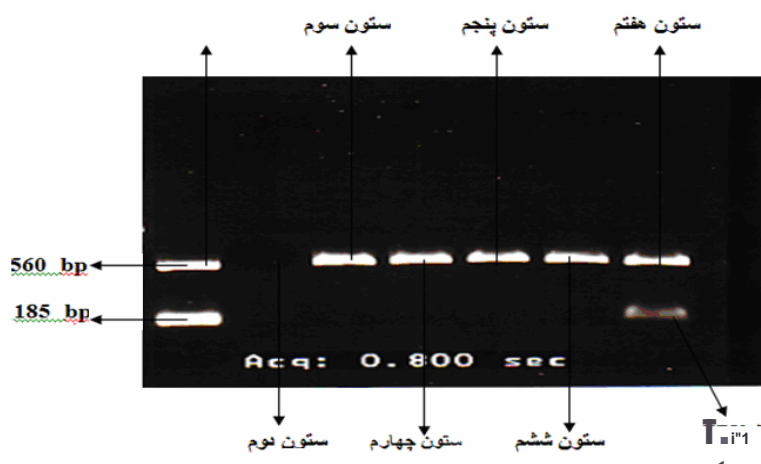
آغازگر	توالی (۳' → ۵')	اندازه	دمای اتصال	درصد GC	اندازه محصول PCR (bp)
رفت (Act F)	AGACGCAGG ATGGCATGGG	۱۹	۶۲/۴۱	۶۳/۱۶	۱۶۱
برگشت (Act R)	GAGACCTTCAA CACCCAGCC	۲۱	۶۲/۹۳	۶۱/۹۰	۱۶۱

جدول ۲- توالی آغازگرهای ژن ویروس اِپشتین- بار

اندازه محصول (bp) PCR	درصد GC	دمای اتصال	اندازه	توالی (۵' → ۳')	آغازگر
۴۹۷	۴۵/۸۳	۵۹/۷۷	۲۴	TCTTGATAGGGA TCCGCTAGGATA	رفت (EBV F)
۴۹۷	۵۰/۰۰	۶۲/۹۶	۲۴	ACCGTGGTTCTG GACTATCTGGAT	برگشت (EBV R)

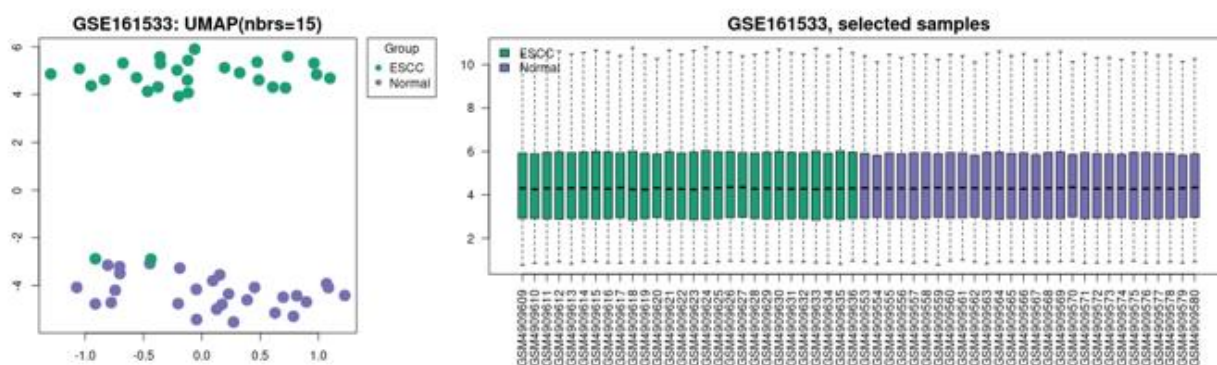
برنامه دمایی برای PCR ژن EBV شامل مرحله آغاز در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی دو زنجیره DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها مجدداً در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه باقی ماندند تا اطمینان حاصل شود که محصول به طور کامل طولیل شده است. جهت تایید محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند تا باند ۴۹۷ جفت بازی مشاهده شد. در تمامی مراحل برای تشخیص آلودگی های احتمالی از کنترل مثبت (DNA ژنوم ویروس) و کنترل منفی (آب استفاده شد).

برای آنالیز آماری، داده ها بر طبق آزمون مجذور کای شدت همبستگی با آزمون کرامر مورد بررسی قرار گرفتند.



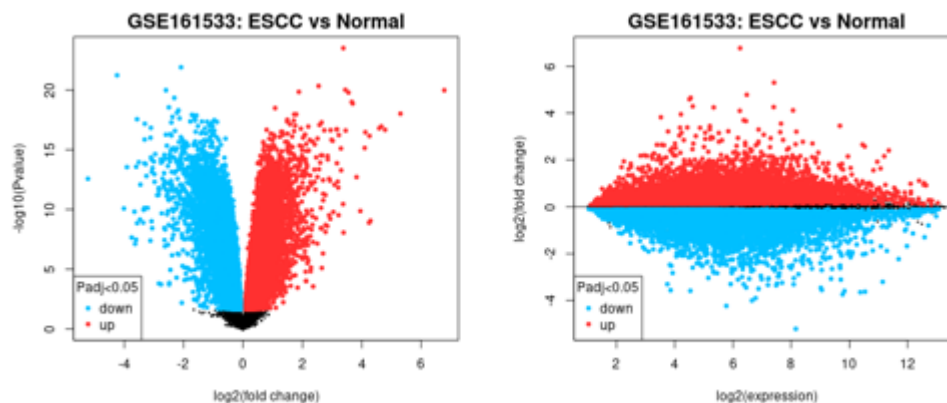
شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR

شکل ۱-۴ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکریل آمید ۱ و شناسایی ژنوم EBV در نمونه ستون هفتم باند ۵۶۰ جفت باز نشان دهنده کنترل داخلی جهت تایید صحت انجام واکنش PCR و باند ۱۸۵ bp بخشی از ژنوم تکثیر یافته EBV است. ستون دوم نشان دهنده کنترل منفی (فاقد DNA است).



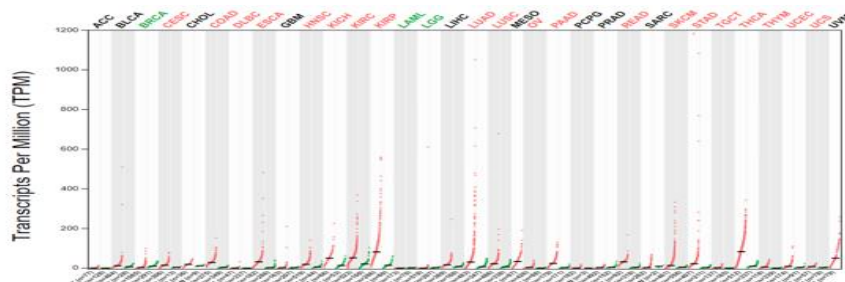
شکل ۲- دریافت GSE مناسب برا پژوهش

در عکس فوق ابتدا برای شروع مطالعه به پایگاه GEO مراجعه شد و سپس با دریافت GSE مناسب برا پژوهش به شناسه GSE161533 انتخاب شد و ساختن گروه بیمار و کنترل در بین سمپل ها، آنالیز داده ها صورت گرفت، نمودارها ترسیم شد و داده ها مربوط به ژن های بیماری سرطان مری در غالب یک جدول به دست آمد، دانلود شد و در آکسل انتقال داده شد.



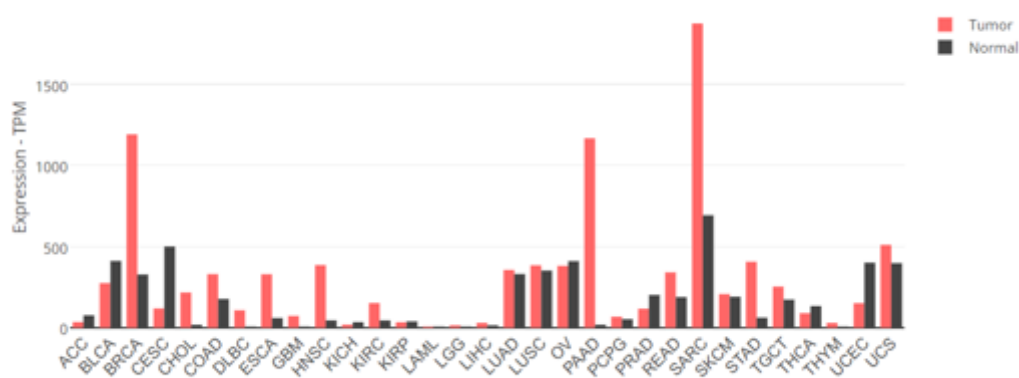
نمودار ۲- Mean Difference plot

نمودار Mean Difference plot برحسب واریانت یا میانه داده ها و Pvalue همانند نمودار volcano plot میزان بیان ژن هایی که کاهش یا افزایش بیان دارند را در مواجهه با بیماری نشان می دهد. رنگ قرمز نشان دهنده ژن هایی است که در مواجهه با بیماری افزایش بیان داشته و نقاط آبی نشان دهنده ژن هایی است که در زمان وقوع بیماری دچار کاهش بیان می شوند نقاط مشکی ژن هایی هستند که در مقایسه با ژن هایی که کاهش یا افزایش بیان داشته اند این ژن ها تغییر خاصی در بیان شان ایجاد نشده است.

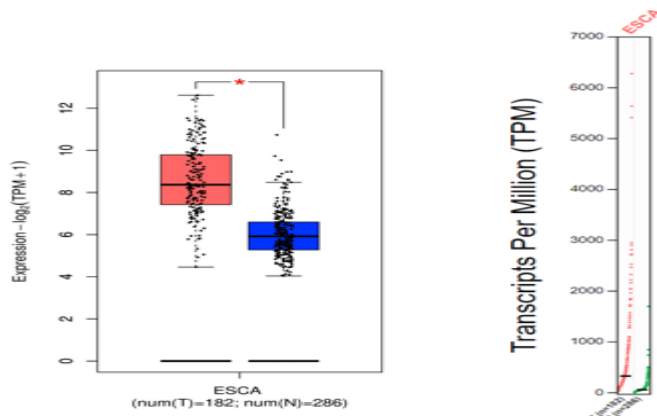


نمودار Dot Plot برای ژن CD34 که یکی از ژن‌های down بوده در بیماری سرطان مری در مقایسه با ۳۲ سرطان دیگر:

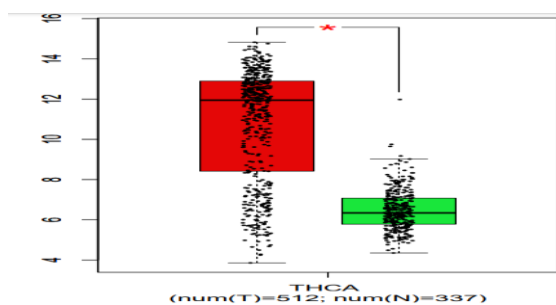
در این نمودار با سنجش ارتفاع نقاط در هر سرطان میزان بیان و اهمیت ژن مدنظر در سرطان مری در مقایسه با ۳۲ سرطان دیگر ارزیابی شد و ثبت گردید. دیده شد که ژن CD34 در سرطان مری دچار کاهش بیان نسبت به نمونه سالم شده است.



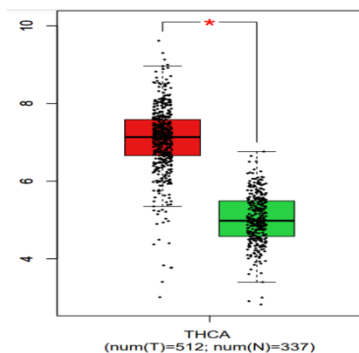
در طول چند دهه گذشته، سرطان مری به یکی از شایع‌ترین انواع سرطان غدد درون ریز تبدیل شده است که به افزایش شیوع کمک کرده است. در سال ۲۰۲۰، ۵۸۶۲۰۲ مورد جدید سرطان مری در سراسر جهان تشخیص داده شده است. این تقریباً ۳,۰٪ از تمام بیماران مبتلا به سرطان را تشکیل می‌دهد. سازمان جهانی بهداشت گزارش داد که در سال ۲۰۲۰، ۲,۳ میلیون زن با ۶۸۵۰۰۰ مورد برای علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است، هنوز اطلاعات کمی در مورد بیولوژی آن وجود دارد. MicroRNA ها (miRNAs : miRs) RNA های غیر کدکننده ای هستند که می‌توانند بیان ژن را با بریدن نواحی ترجمه نشده mRNA کاهش دهند. این عوامل آن‌ها را به یک بازدارنده بالقوه ترجمه پروتئین تبدیل می‌کند. مکانیسم‌های بیولوژیکی متنوعی که در پیدایش سرطان نقش دارند توسط miRNA تعدیل می‌شوند. بررسی بیان جهانی miRNA در سرطان، فعالیت تنظیمی را از طریق تنظیم بالا و پایین تنظیم در چندین سرطان، از جمله سرطان مری و سرطان سینه، نشان داد



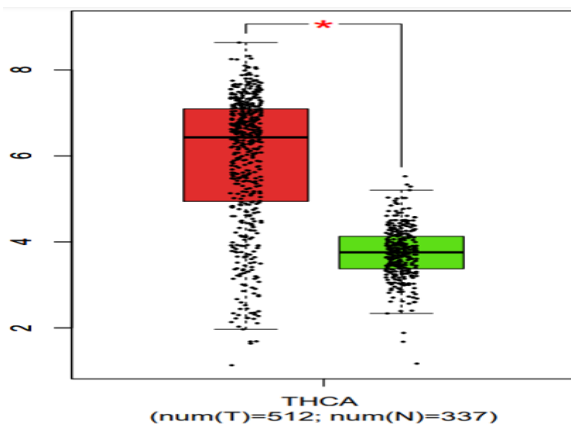
در BoxPlot اختلاف بیان این ژن در نمونه سالم و بیمار نشان داده شد. ژن MET همان پلات قرمز است که میزان افزایش بیان این ژن در سرطان مری را نسبت به نمونه کنترل که با پلات سبز نشان داده‌ی نتیجه ثبت گردید. در ادامه تعدادی دیگر از مهم‌ترین ژن‌هایی که در شبکه‌های قبل اهمیت بیان آن‌ها ثبت گردید مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه بیان شد.



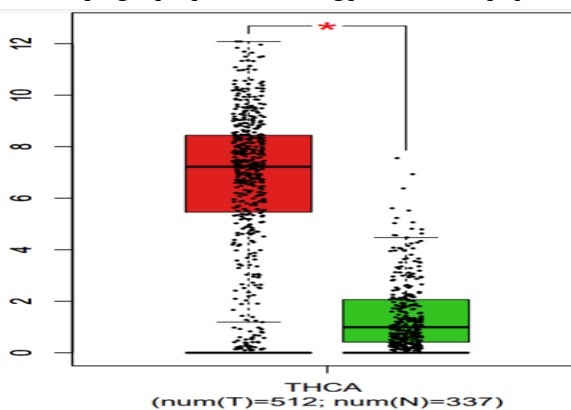
نمودار Box Plot ژن CCND1 در سرطان مری:



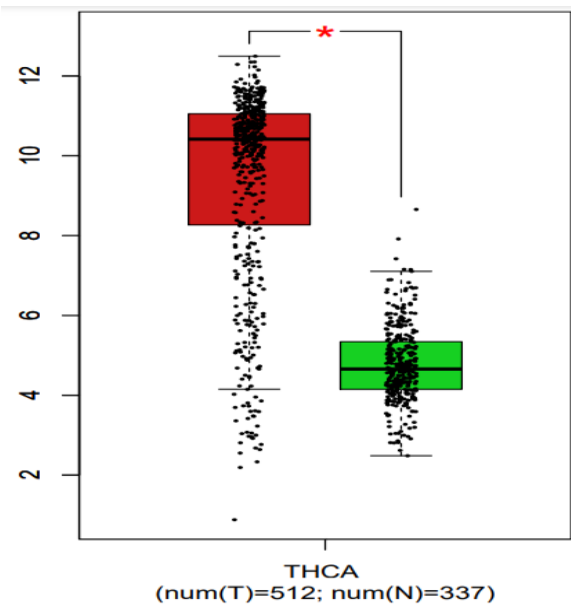
نمودار Box Plot ژن SFN در سرطان مری:



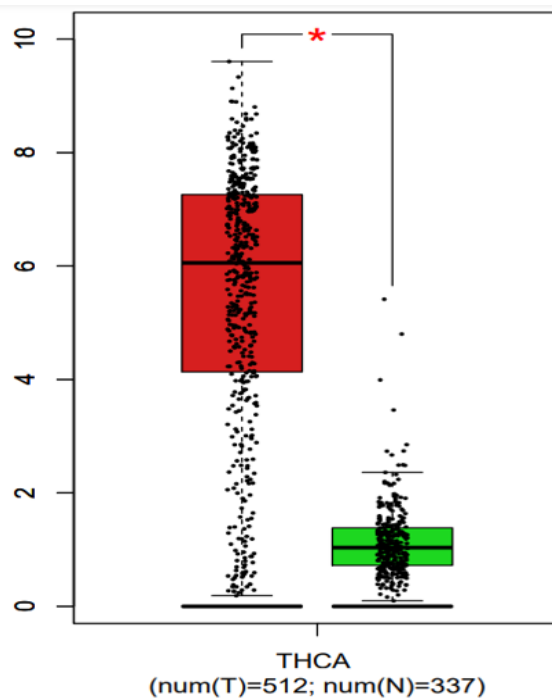
نمودار Box Plot ژن LRRK2 در سرطان مری:



نمودار Box Plot ژن CDH2 در سرطان مری:

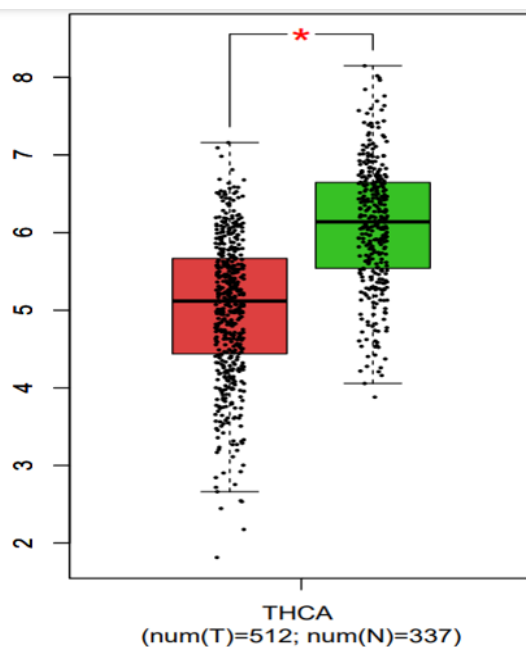


نمودار Box Plot ژن TIAM1 در سرطان مری:

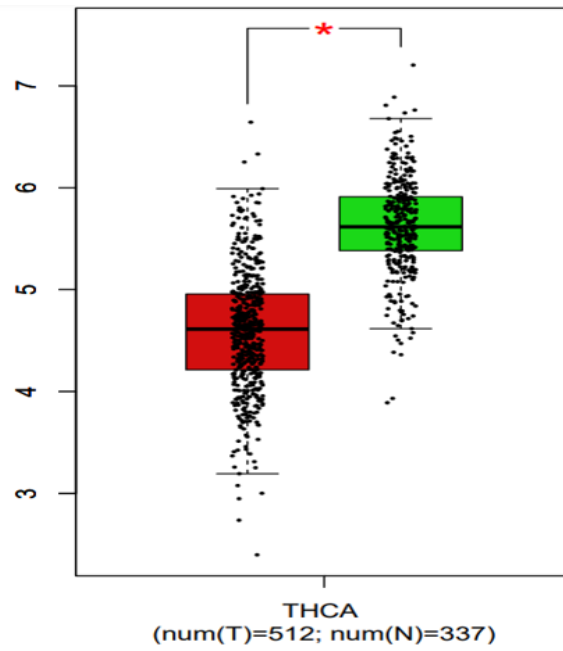


نمودار Box Plot ژن CD34، یکی از ژن DOWN در سرطان مری:

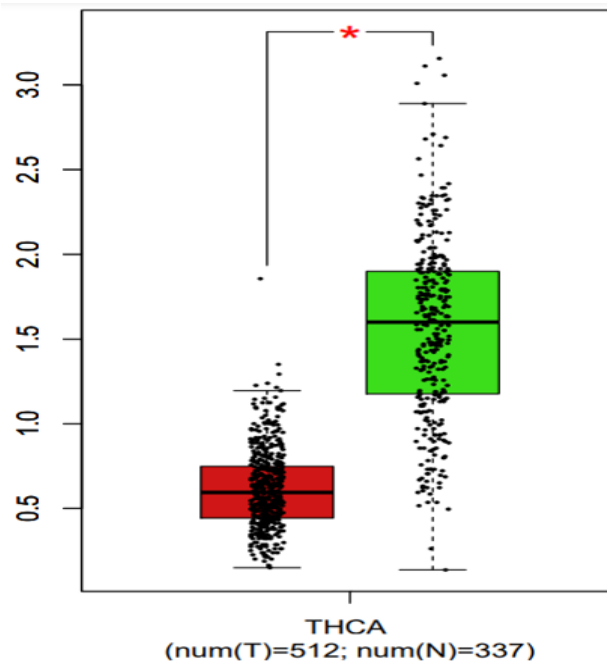
در این نمودار پلات سبز نشان دهنده نمونه سالم و نشان دهنده میزان بیان ژن CD34 در نمونه سالم بوده و پلات قرمز نشان دهنده نمونه بیمار و میزان کاهش بیان این ژن را نسبت به نمونه سالم نشان داد و نتیجه ثبت گردید. در ادامه برای بررسی بیشتر چندین ژن مهم که در شبکه ها مهم تلقی شدند مورد بررسی قرار گرفت و پلات هر کدام ترسیم شد.



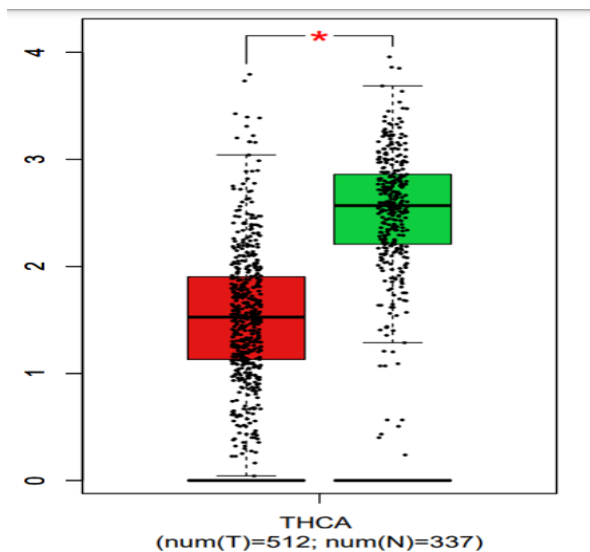
نمودار Box Plot ژن CBWD5، یکی از ژن DOWN در سرطان مری:



نمودار Box Plot از ژن CNTD، یکی از ژن‌های DOWN در سرطان مری:

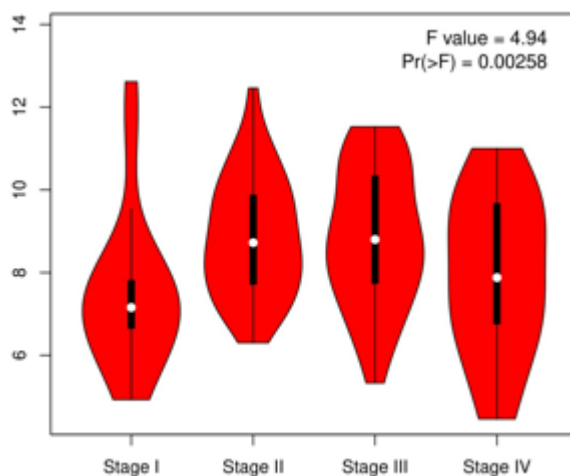


نمودار Box Plot از ژن PCLO، یکی از ژن‌های DOWN در سرطان مری:



نمودار^۸ Stage Plot:

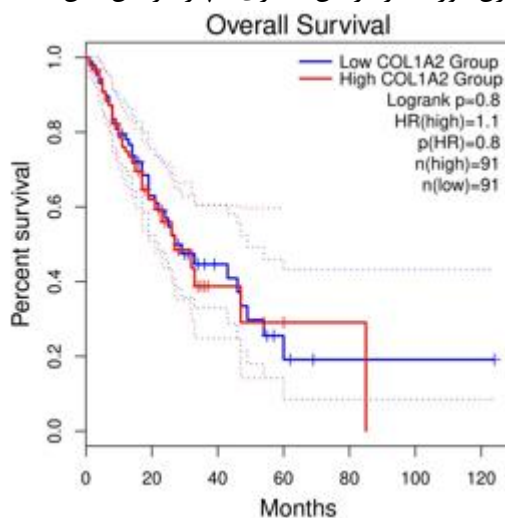
از دیگر نمودارهای که در این پایگاه مورد سنج قرار گرفته شد، نمودار stage plot بود که این نمودار stage های مختلف بیماری را که زن مورد نظر در آن بیان می‌شود را نشان داد. مساحت این نمودار ارتباط مستقیمی با تراکم نمونه‌ها داشت. زن مورد نظر در سرطان مورد نظر در هر استیج که بیان داشت در این قسمت پدیدار شد و در برخی از زن‌ها در استیج‌های مختلف ممکن است بیان نداشته باشند و استیجی ترسیم نمی‌شود. شاخص سنجش این نمودار بر اساس F.VALUE و Pr^A بوده است. نقطه سفید mean، مستطیل چهارک‌ها، خط نازک انحراف معیار را نشان داد.



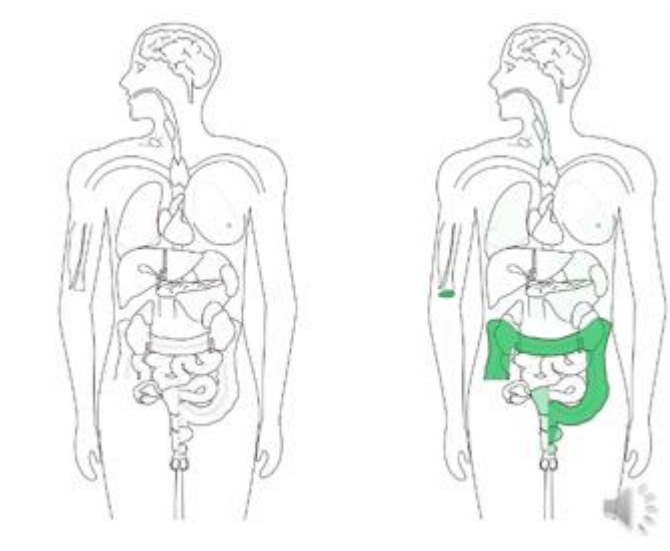
زن CD34 در همه استیج‌ها دارای بیان بوده است. در تصویر بالا دیده شد که اصطلاحاً شکم و مساحت استیج‌ها به سمت پایین کشیده شده و نشان‌دهنده کاهش بیان زن CD34 در این بیماری است.

⁸ نمودار ویولنی

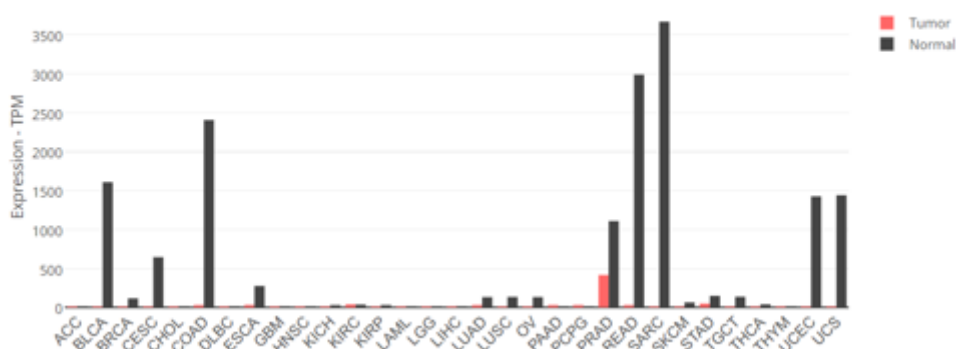
ژن MET در همه استیج ها بیان داشت، شکم استیج ها به سمت بالا کشیده شده و همراه با مساحت استیج ها که در برخی نواحی پهن تر دیده شد نشان داد که ژن مورد نظر در این بیماری دچار افزایش بیان شده است.



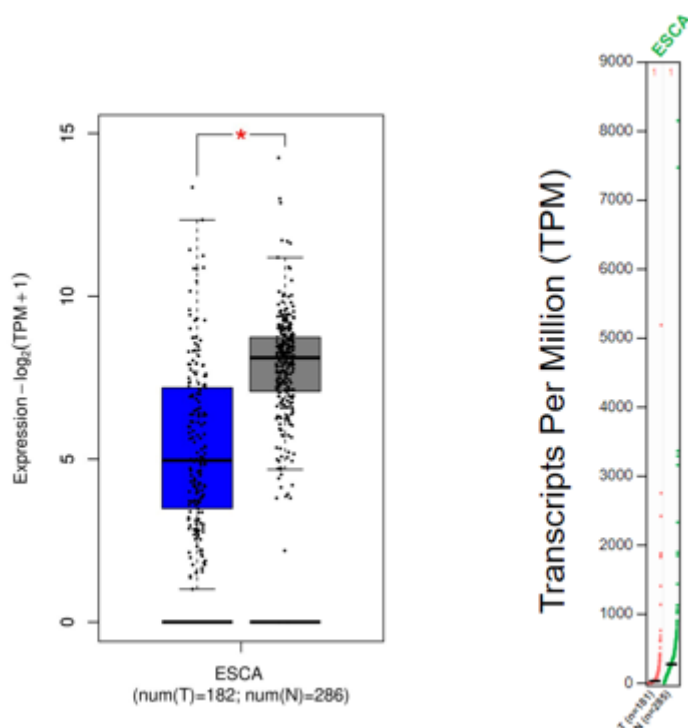
پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن متعلق به خانواده سیکلین بسیار حفاظت شده است که اعضای آن با تناوب چشمگیر فراوانی پروتئین در طول چرخه سلولی مشخص می شوند. سیکلین ها به عنوان تنظیم کننده CDK کینازها عمل می کنند. سیکلین های مختلف الگوهای بیان و تخریب مشخصی را نشان می دهند که به هماهنگی زمانی هر رویداد میتوزی کمک می کند. این سیکلین یک کمپلکس را تشکیل می دهد و به عنوان یک زیرواحد تنظیم کننده یا CDK6 عمل می کند که فعالیت آن برای انتقال چرخه سلولی G1/S لازم است. نشان داده شده است که این پروتئین با پروتئین سرکوبگر Rb تومور CDK4Rb تعامل دارد و بیان این ژن به طور مثبت توسط Rb تنظیم می شود. جهش، تقویت و بیان بیش از حد این ژن که پیشرفت چرخه سلولی را تغییر می دهد، اغلب در انواع سرطان های انسانی مشاهده می شود.



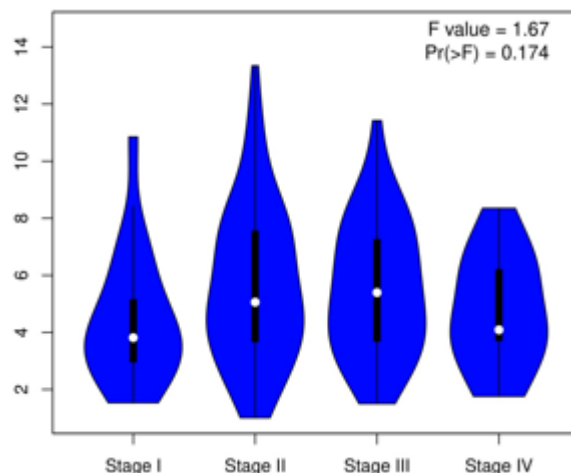
نمودار Body map با شدت رنگ در ارگان های مختلف میزان بیان ژن را در فرد بیمار و سالم نشان می دهد.



ژن زیر واحد آلفای آنزیم هترودیمری کوآنزیم سوکسینات لیگاز A را کد می‌کند. این آنزیم به سمت میتوکندری هدف قرار می‌گیرد و تبدیل سوکسینیل CoA و ADP یا GDP به سوکسینات و ATP یا GTP را کاتالیز می‌کند. جهش در این ژن علت اختلال متابولیک مرگبار اسیدوز لاکتیک نوزادی و کاهش DNA میتوکندری است. بیماری‌های مرتبط با SUCLG1 عبارت‌اند از: سندرم کاهش DNA میتوکندریایی ۹ و اسیدوز لاکتیک نوزادی کشنده همراه با اسیدوری متیل مالونیک. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به چرخه TCA و انتقال الکترون تنفسی، سنتز ATP توسط جفت‌شدن شیمیایی و تولید گرما توسط پروتئین‌های جداکننده اشاره کرد.

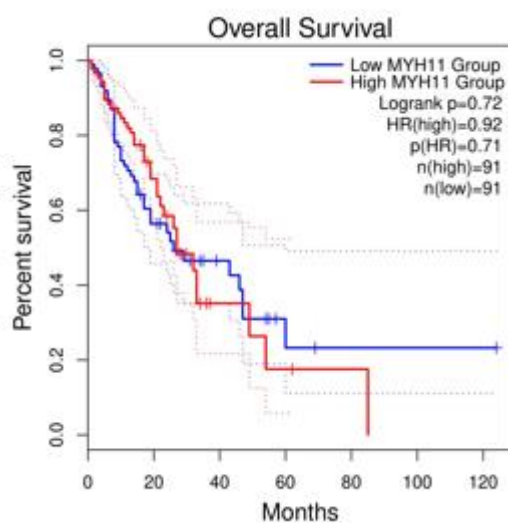


با استفاده از مسیرهای آنالیز بیوانفورماتیک و با دست یافتن صحیح به ژن‌هایی که در بیان آن‌ها هنگام وقوع بیماری، تغییری صورت می‌گیرد و بررسی *micRNA* ها که آن ژن‌ها را کد می‌کند می‌توان با تغییر بیان این ژن‌ها در مسیر صحیح روند بیماری با دارو مناسب جلوگیری کرد و به مهار بیماری کمک شایانی صورت گیرد.

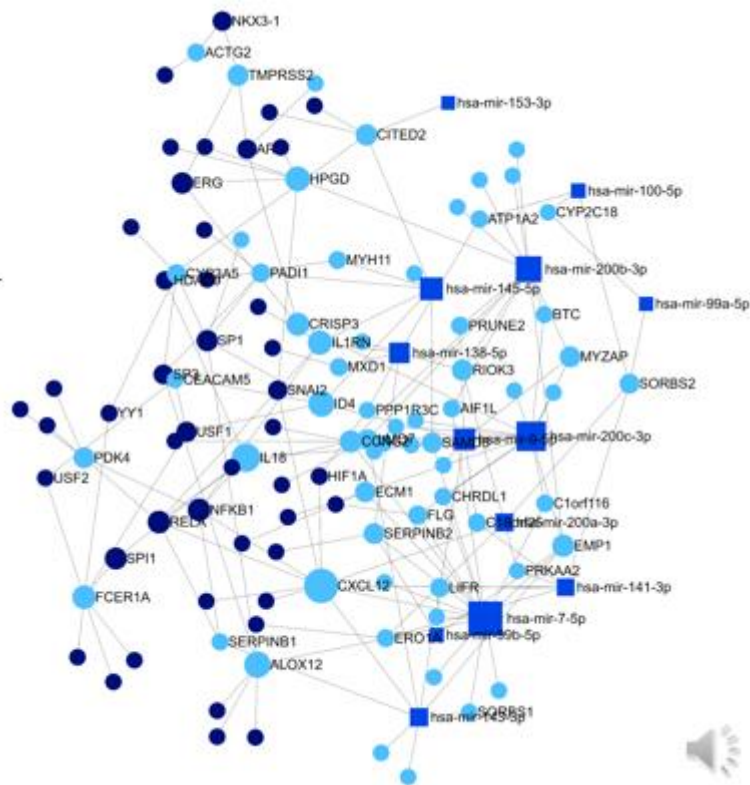


در این مرحله با وارد کردن لیست ۱۰ ژن مهم در نتورک های قبل، به مهم ترین miRNA هایی که در روند این بیماری تأثیر گزار هستند، دسترسی پیدا شد.

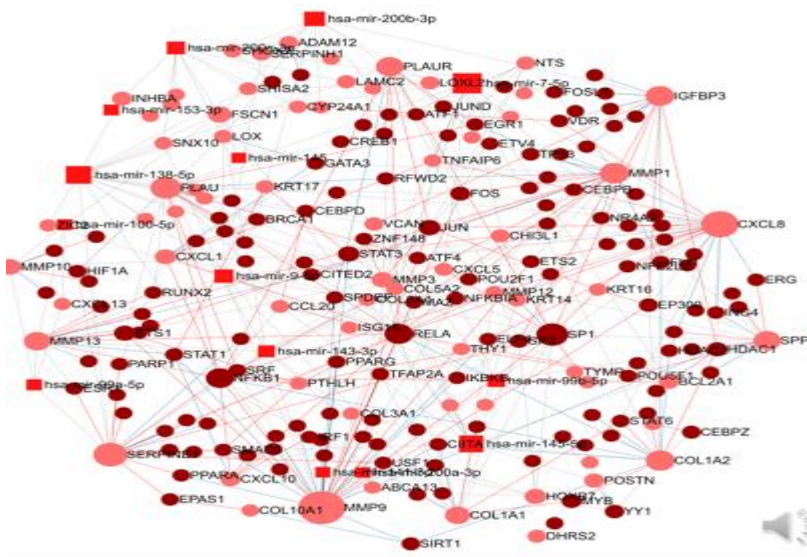
miRNA ها از آن جهت مهم هستند که بیان یا عدم بیان یک ژن را پس از رونویسی کنترل می کنند پس miRNA ها ژن های مهم در بیماری های مختلف هائز اهمیت هستند و حتی در بخش دارو بسیار کمک کننده هستند.



در ابتدا برای شروع مطالعه به پایگاه GEO مراجعه شد و سپس با دریافت GSE مناسب برا پژوهش به شناسه GSE161533 انتخاب شد و ساختن گروه بیمار و کنترل در بین سمپل ها، آنالیز داده ها صورت گرفت، نمودارها ترسیم شد و داده ها مربوط به ژن های بیماری سرطان مری در غالب یک جدو به دست آمد، دانلود شد و در آکسل انتقال داده شد.

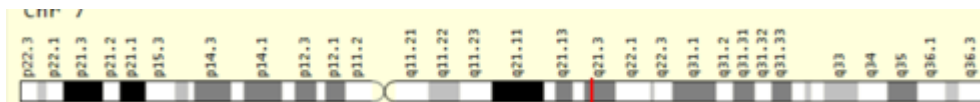


در شبکه miRNET، ژن‌ها به صورت دایره و miRNA ها به مربع نشان داده شد. خطوط ارتباطی بین ژن‌ها و miRNA ها نشان‌دهنده میزان ارتباط آن‌ها با یکدیگر است. میزان ارتباط به صورت عددی در جدول در ادامه ثبت گردید.

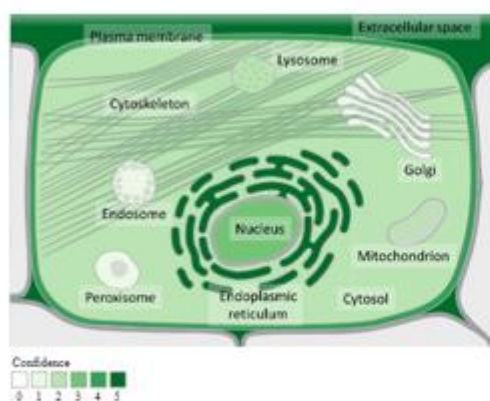


یک ژن کد کننده پروتئین استفیبرونکتین‌ها به سطوح سلولی و ترکیبات مختلف از جمله کلاژن، فیبرین، هپارین، DNA و اکتین متصل می‌شوند. این ژن فیبرونکتین را کد می‌کند، گلیکوپروتئینی که به شکل دایمر محلول در پلاسما و به شکل دایمر یا چندمیری در سطح سلول و در ماتریکس خارج سلولی وجود دارد. پیش‌پرو پروتئین کدگذاری شده به صورت پروتئولیتی برای تولید پروتئین بالغ پردازش می‌شود. فیبرونکتین در فرآیندهای چسبندگی و مهاجرت سلولی از جمله جنین زایی، بهبود

زخم، انعقاد خون، دفاع میزبان و متاستاز نقش دارد. این ژن دارای سه ناحیه است که در معرض پیرایش جایگزین هستند، با پتانسیل تولید ۲۰ نوع رونوشت مختلف که حداقل یکی از آن‌ها ایزوفرمی را کد می‌کند که تحت پردازش پروتئولیتیک قرار می‌گیرد.



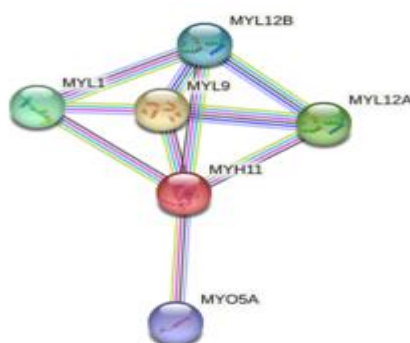
ژن HIBCH، از جمله ژن‌هایی است که در سرطان مری دچار کاهش بیان شد، مورد بررسی قرار گرفت. این ژن روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارد. این ژن آنزیم مسئول هیدرولیز HIBYL-CoA و β -هیدروکسی پروپینیل-CoA را کد می‌کند. جهش در این ژن با کمبود ۳-hydroxyiso-



Compartment	Confidence
endoplasmic reticulum	5
extracellular	5
plasma membrane	4
nucleus	3
cytoskeleton	3
lysosome	2
cytosol	2
mitochondrion	2
golgi apparatus	1
endosome	1
peroxisome	1

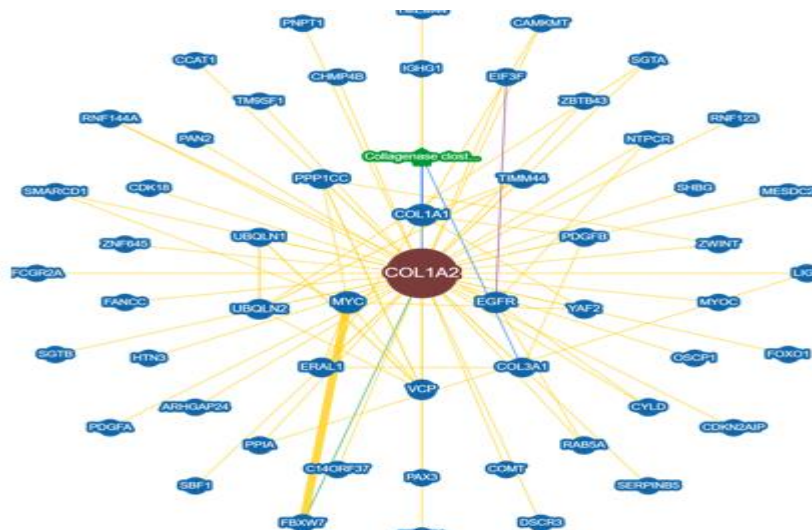
نمودار Volcano plot بر حسب Pvalue/Log FC:

میزان بیان ژن‌ها را نسبت به ژن‌هایی که بیان آن‌ها در مواجهه با بیماری دچار تغییر نمی‌شود را نشان می‌دهد. رنگ قرمز نشان‌دهنده ژن‌هایی است که در مواجهه با بیماری افزایش بیان داشته و نقاط آبی نشان‌دهنده ژن‌هایی است که در زمان وقوع بیماری دچار کاهش بیان می‌شوند نقاط مشکی ژن‌هایی هستند که در مقایسه با ژن‌هایی که کاهش یا افزایش بیان داشته‌اند این ژن‌ها تغییر خاصی در بیانشان ایجاد نشده است.



در مرحله با وارد کردن پروتئین‌های مهم که در شبکه string نمایان شد، به صورت 'singel protein' و ترسیم شبکه مخصوص برای یک پروتئین، ارتباط آن را با پروتئین‌های دیگر رؤیت کرد. در این شبکه دیده شد که پروتئین مدنظر MET در مرکز قرار دارد و مابقی پروتئین‌هایی که با MET ارتباط دارند در اطراف آن قرار گرفته و با ضخامت خطوط میزان ارتباط بین MET با مابقی پروتئین‌ها دیده شد و تصویر نتورک ترسیم و ثبت گردید.

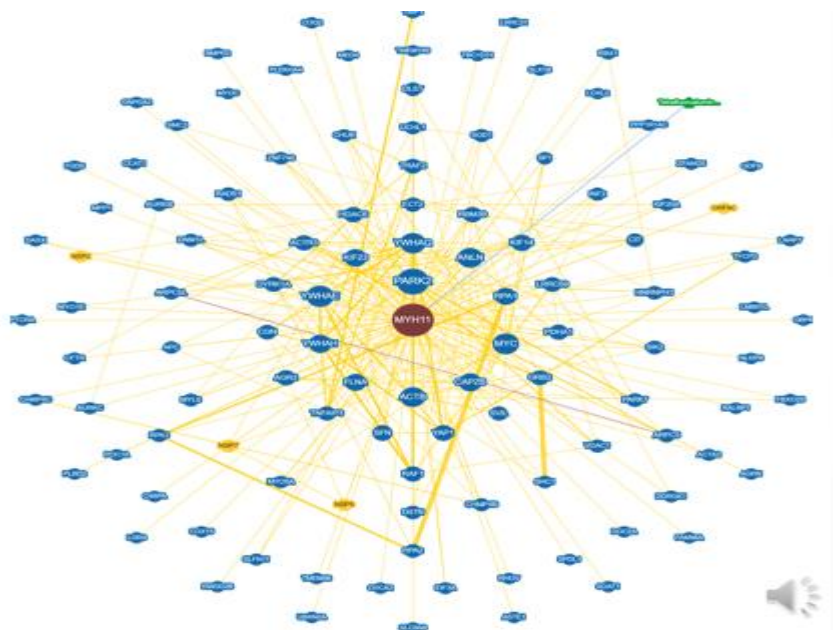
2



ژن‌هایی که در string شبکه پروتئینی ترسیم شد را برای دریافت شبکه دقیق‌تر و قابل‌ویرایش در این مرحله به پایگاه Network Anlaysia وارد شد و شبکه پروتئینی دقیق‌تر و قابل‌ویرایش همراه با جدول Degree^{۱۱} و Betweenness^{۱۲} دریافت شد. در این مرحله به لیستی از مهم‌ترین ژن‌هایی که در سرطان مری تأثیر گزار هستند، رؤیت شد. در این پایگاه با هایلایت کردن ژن‌هایی که Degree و Betweenness بالایی دارند به شبکه نظم داده شد و پروتئین‌هایی که در شبکه اهمیت کمتری داشتند محو گردید و پروتئین‌های مهم‌تر برجسته شد. (یکبار برای ژن‌های دارای کاهش بیان شبکه و جدول ترسیم و دریافت شد و بار دیگر برای ژن‌ها با بیان بالا)

^{۱۱} نشان دهنده میزان ارتباط یک پروتئین با مابقی پروتئین‌ها

^{۱۲} نشان دهنده میزان معنی داری



در این شبکه پروتئین‌ها با علامت دایره نشان داده شده‌اند و هر چه پروتئین بزرگ‌تر به معنی اهمیت پروتئین در شبکه و ارتباطات بیشتری با دیگر پروتئین‌ها دارد.

بحث و نتیجه گیری

سرطان مری به عنوان نهمین بدخیمی شایع و ششمین عامل سرطان در جهان محسوب می‌شود و نیز به عنوان یکی از کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها طبقه‌بندی شده است. در کشورهای غربی خطر سرطان مری به‌طور کلی پایین است. بررسی‌ها نشان داده‌است که مصرف فراوان الکل و تنباکو می‌تواند عامل بیش از ۹۰ درصد موارد سرطان مری در این نواحی باشد. عوامل ویروسی همانند EBV می‌تواند یکی از فاکتورهایی باشد که شیوع بالای این نوع سرطان را در این نواحی توجیه می‌نماید. مکانیسم ورود و اثر EBV به درستی شناخته شده نیست ۱۵ اما بررسی‌های مختلف نشان داده است که این ویروس می‌تواند سلول‌های اپی‌تلیال را آلوده کرده و سبب ترانسفورماسیون آنها به سمت بدخیمی شود (73) اخیراً نشان داده شده است که EBV با متوقف کردن بیان مولکول پیش آپوپتوزی Bax موجب مهار آپوپتوز در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌شود در حالیکه تأثیری در افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوزی 2-Bcl و c-Myc ندارد (31). همچنین ویروس EBV با القاء تولید سیتوکاین ضد التهابی IL-10 موجب رشد و تکثیر سلول‌های B در لنفوم بورکیت می‌گردد از طرفی در مطالعات قبلی نقش ویروس EBV در سرطان معده، بیماری هوچکین، لنفوم بورکیت و سرطان‌های نازوفارنژیال ثابت شده است بنابراین بررسی فراوانی و ارتباط بین آلودگی به EBV و سرطان مری با توجه به شیوع بالا در این نواحی لازم به نظر می‌رسد شایان ذکر است که به رغم اینکه این نواحی روی کمر بند آسیایی سرطان مری قرار دارند تا به حال مطالعه‌ای در این مورد در ایران انجام نشده است. اما نتایج مطالعات در سایر کشورها با توجه به شیوع بالای این سرطان موید شیوع بالاتری از EBV می‌باشد. به طور مثال در سوئد ۲۰ درصد (35)، در فرانسه ۴/۲۱ درصد و در آلمان ۴۰ درصد نمونه‌ها آلودگی به EBV داشتند. این در حالی است که در کشورهای آسیایی مثل چین و ژاپن بین آلودگی به ویروس EBV و ESCC ارتباطی وجود ندارد (27) در مطالعه حاضر میزان شیوع ویروس EBV در نمونه‌های بیوپسی سرطان مری ۱۰ درصد است. اختلاف موجود در نتایج بدست آمده در همراهی عفونت EBV با سرطان مری در نقاط مختلف دنیا، می‌تواند ناشی از تفاوت در مناطق جغرافیایی و عوامل محیطی و حتی عوامل ژنتیکی باشد (73) بی‌شک برای پیشگیری و کاهش میزان بیماری‌های مختلف در جامعه و ارتقاء سطح سلامت عمومی، شناخت عوامل ایجاد کننده بیماری‌ها و درک اهمیت هر یک از آن‌ها به عنوان نخستین گام عملی مطرح می‌باشد در مورد EBV و بیماری‌های متعددی که توسط این ویروس ایجاد می‌شود نیز این اصل کلی حاکم است. لذا، انجام مطالعات اپیدمیولوژی می‌تواند در برنامه ریزی‌ها و سیاست‌گذاری‌های سلامت جامعه مورد استفاده قرار گیرد، و توجه دوباره و

بیش از پیش کادر بهداشتی درمانی را جلب نماید. باید در نظر داشت که گاهی تفسیر نتایج آزمایشگاهی سخت و پیچیده است. این امر باید توسط متخصصین آشنا با روند پاتوژنز ویروس EBV و آزمایشات مربوطه، که دسترسی به بیمار و بررسی‌های کلینیکی و پاراکلینیکی کامل او را لازم دارد، انجام گیرد (34).

نتایج حاصل از این بررسی، در ۱۰ درصد نمونه‌های ESCC و ۴/۴ درصد نمونه‌های بافت غیرسرطانی مری، EBV DNA با روش Real Time PCR را شناسایی کرد. سرطان سلول‌های سنگفرشی مری به عنوان شایعترین نوع بدخیمی مری محسوب شده و شیوع بالایی را در کشور های کمتر توسعه یافته از جمله استان های شمالی ایران دارد. در کشورهای غربی خطر سرطان سلول های سنگفرشی مری به طور کلی پائین است. Wu و همکارانش با بررسی ۱۶۴ نمونه جراحی سرطان سلول های سنگفرشی مری، میزان پروتئین‌های EBV EBER را در ۷/۶٪ و LMP-۱ را در ۱/۶٪ با روش‌های ISH و IHC (ایمونوهیستو-شیمی) شناسایی کردند (74). Jenkins و همکاران، حضور EBV را در ۳/۸٪ موارد از نمونه بیماران در آمریکا گزارش کردند (75). Wang و همکاران، EBV را در ۳/۵٪ موارد در تایوان شناسایی کردند (76). Awerkiew و همکاران نیز EBV را در ۳/۵٪ از موارد (۸ از ۲۳ نمونه) نمونه‌های سرطانی بیماران آلمان شناسایی کردند (77). Sedaghat و همکاران با بررسی تنها ۲۸ نمونه سرطانی بیماران ایرانی، میزان حضور EBV را در ۱۲ مورد (۸/۴۲٪) نشان دادند (۲۵). همچنین Haghshenas و همکارانش با روش PCR میزان EBV DNA را در ۱۰٪ موارد گزارش می‌دهند که مشابه با نتایج مطالعه حاضر می باشد (78). این در حالی است که در بررسی حاضر باتوجه به حجم نمونه بیشتر و مقایسه با نمونه غیرسرطانی این میزان بسیار کمتر از مطالعه Sedaghat و همکاران (۱۰٪ در برابر ۸/۴۲٪) ولی مشابه میزان گزارش شده در مطالعه Haghshenas و همکارانش در نمونه بیماران مازندرانی و گلستانی می‌باشد، با این تفاوت که در بررسی حاضر از تعداد نمونه بیش از دو برابر و نیم و نیز نمونه شاهد غیرسرطانی و همچنین از روش مولکولی دقیق‌تری استفاده گردید. ژانگ و همکارانش، در ناحیه Shantou از استان Guangdong کشور چین، با بررسی حضور ویروس‌های HSV-۱، CMV-۱ و HPV-1 و EBV در نمونه بافت بیماران مبتلا به سرطان مری، با روش Nested PCR، میزان EBV را در اتیولوژی ESCC در این ناحیه از کشور چین، DNA ویروس EBV را در مخاط ۷۰ نمونه ESCC ۳۰٪ گزارش کردند. همچنین، آنها میزان حضور EBV را در مخاط نمونه‌های ESCC بطور قابل توجهی بیشتر از نمونه‌های مخاط نرمال (۴/۷٪) نشان دادند و بیشترین میزان آلودگی را در بیماران با محدوده سنی ۴۸-۵۸ سال گزارش کردند (79). اختلاف بین میزان EBV DNA در نمونه‌های سرطانی و غیرسرطانی مری در مطالعه ما نیز با نسبت کمتری مشابه مطالعه Zhang بدست آمده است. در مطالعه Awerkiew و همکاران با مطالعه بر روی ۷۲ نمونه ESCC و ۴۰ نمونه آدنوکارسینوما از آلمان و ۴۳ نمونه ESCC از روسیه حضور EBV DNA را بوسیله PCR و ISH نشان دادند. آنها، میزان حضور EBV DNA را با روش Nested PCR در ۳/۴٪ از نمونه‌های ESCC و ۲/۶٪ از نمونه‌های آدنوکارسینوما گزارش کردند و با استفاده از نشان داده نشد. در صورتیکه، در نسخه‌های EBER در هسته ۷ نمونه ESCC و یک نمونه AC از ۲۴ نمونه EBV DNA مثبت بیان شدند (3). همچنین، برخی گزارشات نظیر مطالعه Yanai و همکاران در ژاپن Sunpaweravong و همکارانش در تایلند (۱۶) و Hong و همکارانش (۲۹) با روشهای ISH و PCR حاکی از منفی بودن تمامی نمونه‌های ESCC تحت مطالعه می‌باشد. در سایر مطالعات، EBV DNA و یا نسخه‌های EBER در موارد خیلی نادر، ۴-۷٪ یا در هیچ موردی مشاهده نشد (۳۲-۳۰). با توجه به اینکه ارتباط بین EBV و سرطان مری بیشتر بر روی بافتهای بلوک پارافینه انجام شده است، به نظر می‌رسد که مطالعه بر روی نمونه بافتهای تازه می‌تواند در نشان دادن این ارتباط دقیق‌تر باشد. همچنین، پیشنهاد می‌گردد میزان بیان برخی پروتئین‌های مهم این ویروس بر روی بافتهای تازه صورت پذیرد. نتایج این مطالعه نشان داد، اگرچه شیوع EBV DNA در نمونه‌های کنترل غیرسرطانی پائینتر از نمونه‌های سرطان مری بوده ولی این موضوع نمی‌تواند بیانگر ارتباط علت و معلولی بین EBV و نقش آن در ابتلا به ESCC باشد. با توجه به اینکه میزان EBV DNA شناسایی شده در مناطق مختلف دنیا و براساس روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مختلف، متفاوت می‌باشد، انجام مطالعات وسیعتر بر روی جمعیت های نژادی مختلف و استفاده از روشهای تشخیصی استانداردتر برای روشن شدن بیشتر این ارتباط مفید خواهد بود (74).

با توجه به آلودگی در ۱۰ درصد از نمونه های بیوپسی سرطان مری در این مطالعه، می توان مطرح کرد که: احتمالاً بین آلودگی به این عفونت ویروسی و سرطان مری می تواند نوعی ارتباط وجود داشته باشد، و ویروس EBV یکی از عوامل موثر در سرطان مری در این مناطق محسوب شود، و ممکن است این ویروس در پاتوژنز سرطان مری نقش داشته باشد. اما، با توجه به شیوع بالای این سرطان در این مناطق باید همچنان به دنبال دخالت سایر عوامل خطر مداخله گر در این سرطان نیز بود. برای اثبات این مدعا باید با انجام یک مطالعه گسترده تر، و به ویژه مطالعات مورد-شاهدی و یا کوهورت، این فرضیه را به صورت کاملاً علمی اثبات نمود.

منابع:

1. Yuan X, Chen J, Shi D, Song J, Wang P, Cheng D, et al. Advanced esophageal cancer with bone metastases: Prognostic biomarkers and palliative treatment. *Heliyon*. 2024;10(1):e23510.
2. Thavanesan N, Vigneswaran G, Bodala I, Underwood TJ. The Oesophageal Cancer Multidisciplinary Team: Can Machine Learning Assist Decision-Making? *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2023;27(4):807-22.
3. Hoppo T, Jobe BA. Personalizing Therapy for Esophageal Cancer Patients. *Thoracic Surgery Clinics*. 2013;23(4):471-8.
4. Chung CS, Lee YC, Wu MS. Prevention strategies for esophageal cancer: Perspectives of the East vs. West. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2015;29(6):869-83.
5. Eiz-Vesper B, Ravens S, Maecker-Kolhoff B. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell responses to Epstein-Barr Virus: insights in immunocompetence, immune failure and therapeutic augmentation in transplant patients. *Current Opinion in Immunology*. 2023;82:102305.
6. Xie P, Xia W, Lowe S, Zhou Z, Ding P, Cheng C, et al. High spicy food intake may increase the risk of esophageal cancer: A meta-analysis and systematic review. *Nutrition Research*. 2022;107:139-51.
7. Teng C, Kong F, Mo J, Lin W, Jin C, Wang K, et al. The roles of RNA N6-methyladenosine in esophageal cancer. *Heliyon*. 2022;8(11):e11430.
8. Ekeke CN, Chan EG, Fabian T, Villa-Sanchez M, Luketich JD. Recommendations for Surveillance and Management of Recurrent Esophageal Cancer Following Endoscopic Therapies. *Surgical Clinics of North America*. 2021;101(3):415-26.
9. Yang J, Janjigian YY. Immune Checkpoint Blockade and Targeted Therapies in Esophageal Cancer. *Thoracic Surgery Clinics*. 2022;32(4):467-78.
10. Jiao R, Jiang W, Xu K, Luo Q, Wang L, Zhao C. Lipid metabolism analysis in esophageal cancer and associated drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2024;14(1):1-15.
11. Federico JA, Martin JT. Surgeons' Role in Local Palliation of Esophageal Cancer. *Surgical Clinics of North America*. 2021;101(3):489-97.
12. Vošmik M, Hodek M, Buka D, Sýkorová P, Grepl J, Paluska P, et al. Cardiotoxicity of radiation therapy in esophageal cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2020;25(3):318-22.
13. Merritt RE. Conduit Selection for Reconstruction After Esophagectomy for Esophageal Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* [Internet]. 2024; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055320724000012>
14. Wang X, Bai H, Li R, Wang L, Zhang W, Liang J, et al. High versus standard radiation dose of definitive concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Radiotherapy and Oncology*. 2023;180:109463.

15. Boorn HG van den, Stroes CI, Zwinderman AH, Eshuis WJ, Hulshof MCCM, Etten-Jamaludin FS van, et al. Health-related quality of life in curatively-treated patients with esophageal or gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2020;154:103069.
16. Sanchez MV, Alicuben ET, Luketich JD, Sarkaria IS. Colon Interposition for Esophageal Cancer. *Thoracic Surgery Clinics*. 2022;32(4):511-27.
17. Wei MT, Friedland S. Early Esophageal Cancer: What the Gastroenterologist Needs to Know. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2021;50(4):791-808.
18. Dinh VT, Loaïc N, Quillévéré A, Sénéchal RL, Keruzoré M, Martins RP, et al. The hide-and-seek game of the oncogenic Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 protein with the immune system: An RNA G-quadruplex tale. *Biochimie*. 2023;214:57-68.
19. Rihane FE, Hassou N, Nadifi S, Ennaji MM. Chapter 25 - Status of Helicobacter pylori Coinfection With Epstein-Barr Virus in Gastric Cancer. In: Ennaji MM, editor. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* [Internet]. Academic Press; 2020. p. 571-85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128194003000259>
20. Mostaghimi T, Bahadoran E, Bakht M, Taheri S, Sadeghi H, Babaei A. Role of lncRNAs in Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus associated gastric cancers. *Life Sciences*. 2024;336:122316.
21. Mouabata DFLN, Nganga CP, Mayakia PJI, Moukassa D, Ennaji MM. Chapter 25 - Oncogenic human viruses associated with prostate cancer: molecular epidemiology of Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus. In: Ennaji MM, editor. *Immunological Implications and Molecular Diagnostics of Genitourinary Cancer* [Internet]. Academic Press; 2023. p. 373-87. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032385496200021X>
22. Rihane FE, Erguibi D, Chehab F, Ennaji MM. Chapter 5 - MicroRNAs associated with Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus infections in gastric cancer. In: Ennaji MM, editor. *Oncogenic Viruses* [Internet]. Academic Press; 2023. p. 71-94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012824152300007X>
23. Mouabata DFLN, Nganga CP, Sounga SBL, Moukassa D, Ennaji MM. Chapter 7 - Molecular diagnosis of human oncogenic viruses associated with prostate cancer: Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus. In: Ennaji MM, editor. *Immunological Implications and Molecular Diagnostics of Genitourinary Cancer* [Internet]. Academic Press; 2023. p. 77-98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323854962000257>
24. Abdulkarim B, Bourhis J. Antiviral approaches for cancers related to Epstein-Barr virus and human papillomavirus. *The Lancet Oncology*. 2001;2(10):622-30.
25. Sadkaoui M, Tiabi I, Ennaji Y, Takati N, Filali-Ansari N, Ennaji MM. Chapter 19 - Kidney cancer associated with Epstein-Barr virus. In: Ennaji MM, editor. *Oncogenic Viruses* [Internet]. Academic Press; 2023. p. 325-33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128241523000019>
26. Chawla JPS, Iyer N, Soodan KS, Sharma A, Khurana SK, Priyadarshni P. Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein-Barr virus and human papillomaviruses: With special reference to oral cancer. *Oral Oncology*. 2015;51(8):731-7.
27. Anagnostouli M, Anagnostoulis G, Katsavos S, Panagiotou M, Kararizou E, Davaki P. HLA-DRB1*15:01 and Epstein-Barr virus in a multiple sclerosis patient with psoriasis, nasopharyngeal and breast cancers. Lessons for possible hidden links for autoimmunity and cancer. *Journal of the Neurological Sciences*. 2014;339(1):26-31.

28. Yang L, Pu J, Cai F, Zhang Y, Gao R, Zhuang S, et al. Chronic Epstein-Barr virus infection: A potential junction between primary Sjögren's syndrome and lymphoma. *Cytokine*. 2023;168:156227.
29. Vasudevan HN, Yom SS. Nasopharyngeal Carcinoma and Its Association with Epstein-Barr Virus. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2021;35(5):963-71.
30. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;66:15-22.
31. Mahajan S, Bongaerts M, Hardillo J, Tsang A, Lo KW, Kortleve D, et al. Transcriptomics of Epstein-Barr virus aids to the classification of T-cell evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Current Opinion in Immunology*. 2023;83:102335.
32. Li W, Okabe A, Kaneda A. Chapter 6 - Epigenetic aberrations by Epstein-Barr virus infection to develop gastric cancer. In: Jenkins B, editor. *Research and Clinical Applications of Targeting Gastric Neoplasms* [Internet]. Academic Press; 2021. p. 145-56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032385563100006X>
33. Granzhan A, Martins RP, Fåhraeus R, Blondel M, Teulade-Fichou MP. Chapter Eight - Quadruplex-interacting compounds for regulating the translation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) mRNA: A new strategy to prevent and treat EBV-related cancers. In: Neidle S, editor. *Quadruplex Nucleic Acids As Targets For Medicinal Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2020. p. 243-86. (Annual Reports in Medicinal Chemistry; vol. 54). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774320300221>
34. Damania B, Kenney SC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*. 2022;185(20):3652-70.
35. Piłkuła A, Kwietniewska M, Rawicz-Pruszyński K, Ciseł B, Skórzewska M, Gęca K, et al. The importance of Epstein-Barr virus infection in the systemic treatment of patients with gastric cancer. *Seminars in Oncology*. 2020;47(2):127-37.
36. West MJ. Chromatin reorganisation in Epstein-Barr virus-infected cells and its role in cancer development. *Current Opinion in Virology*. 2017;26:149-55.
37. Soldan SS, Messick TE, Lieberman PM. Therapeutic approaches to Epstein-Barr virus cancers. *Current Opinion in Virology*. 2022;56:101260.
38. Lee AZE, Tan LSY, Lim CM. Cellular-based immunotherapy in Epstein-Barr virus induced nasopharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2018;84:61-70.
39. Lee AZE, Tan LSY, Lim CM. Cellular-based immunotherapy in Epstein-Barr virus induced nasopharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2018;84:61-70.
40. Chawla JPS, Iyer N, Soodan KS, Sharma A, Khurana SK, Priyadarshni P. Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein-Barr virus and human papillomaviruses: With special reference to oral cancer. *Oral Oncology*. 2015;51(8):731-7.
41. Mostaghimi T, Bahadoran E, Bakht M, Taheri S, Sadeghi H, Babaei A. Role of lncRNAs in *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus associated gastric cancers. *Life Sciences*. 2024;336:122316.
42. Zhang Y, Lyu H, Guo R, Cao X, Feng J, Jin X, et al. Epstein-Barr virus-associated cellular immunotherapy. *Cytotherapy*. 2023;25(9):903-12.
43. Hirabayashi M, Georges D, Clifford GM, Martel C de. Estimating the Global Burden of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2023;21(4):922-930.e21.

44. Hirabayashi M, Georges D, Clifford GM, Martel C de. Estimating the Global Burden of Epstein-Barr Virus–Associated Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2023;21(4):922-930.e21.
45. Soldan SS, Messick TE, Lieberman PM. Therapeutic approaches to Epstein–Barr virus cancers. *Current Opinion in Virology*. 2022;56:101260.
46. Skalsky RL. MicroRNA-mediated control of Epstein–Barr virus infection and potential diagnostic and therapeutic implications. *Current Opinion in Virology*. 2022;56:101272.
47. Naseem M, Barzi A, Brezden-Masley C, Puccini A, Berger MD, Tokunaga R, et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;66:15–22.
48. Manivannan AC, Devaraju V, Velmurugan P, Sathiamoorthi T, Sivakumar S, Subbiah SK, et al. Tumorigenesis and diagnostic practice applied in two oncogenic viruses: Epstein Barr virus and T-cell lymphotropic virus-1—Mini review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:111974.
49. Hernández-Preciado MR, Torres-Mendoza BM, Mireles-Ramírez MA, Kobayashi-Gutiérrez A, Sánchez-Rosales NA, Vázquez-Valls E, et al. Gene expression in multiple sclerosis during pregnancy based on integrated bioinformatics analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2024;82:105373.
50. Wusiman D, Li W, Guo L, Huang Z, Zhang Y, Zhang X, et al. Comprehensive analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing data identifies B cell marker genes signature that predicts prognosis and analysis of immune checkpoints expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Heliyon*. 2023;9(12):e22656.
51. Wu QQ, Wang XY, Wu WX, Chen YX, Wang J, Zhang X, et al. Molecular mechanisms investigation for liver metastasis of colorectal cancer by combined bioinformatic gene expression profile analysis. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2023;35:100694.
52. Wang Z, Yan S, Yang Y, Luo X, Wang X, Tang K, et al. Identifying M1-like macrophage related genes for prognosis prediction in lung adenocarcinoma based on a gene co-expression network. *Heliyon*. 2023;9(1):e12798.
53. Wang D, Zhang L, Sun Z, Jiang H, Zhang J. A radiomics signature associated with underlying gene expression pattern for the prediction of prognosis and treatment response in hepatocellular carcinoma. *European Journal of Radiology*. 2023;167:111086.
54. Song AY, Mu L, Dai XY, Wang LJ, Huang LQ. Analysis of Significant Genes and Pathways in Esophageal Cancer Based on Gene Expression Omnibus Database. *Chinese Medical Sciences Journal*. 2023;38(1):20–8.
55. Zhang X, Song W, Zhang M, Song Y, Di Y, Chen B, et al. Identification of differentially expressed miRNAs and key genes involved in the progression of alcoholic fatty liver disease using rat models. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2022;46(10):102012.
56. Djordjevic D, Tang JYS, Chen YX, Kwan SLS, Ling RWK, Qian G, et al. Discovery of perturbation gene targets via free text metadata mining in Gene Expression Omnibus. *Computational Biology and Chemistry*. 2019;80:152–8.
57. Wu D, Taibi A, Lin Z, Thompson LU, Comelli EM. Data on mammary gland microRNAs expression, their predicted gene targets and corresponding pathway analysis in female mice receiving flaxseed or its oil and secoisolariciresinol diglucoside components. *Data in Brief*. 2022;42:108328.

58. Panahiazar M, Dumontier M, Gevaert O. Predicting biomedical metadata in CEDAR: A study of Gene Expression Omnibus (GEO). *Journal of Biomedical Informatics*. 2017;72:132-9.
59. Lacson R, Pitzer E, Kim J, Galante P, Hinske C, Ohno-Machado L. DSGeo: Software tools for cross-platform analysis of gene expression data in GEO. *Journal of Biomedical Informatics*. 2010;43(5):709-15.
60. Mitsuyama S, Shimizu N. CancerProView: A graphical image database of cancer-related genes and proteins. *Genomics*. 2012;100(2):81-92.
61. Gong XL, Liu J. Institutional investor information network, analyst forecasting and stock price crash risk. *Research in International Business and Finance*. 2023;65:101942.
62. Fujii N, Watanabe R, Kokuryo D, Kaihara T, Fujimura A, Hirose T, et al. A Study on Support Method for Securities Analysts Using Supply Networks. *Procedia CIRP*. 2022;112:34-8.
63. LUI K, Zhao H, Sun J, Shen Z, Xu J. Analysis of the expression profile of miRNAs related to skin photoaging in the GEO database. *Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*. 2023;5(2):53-9.
64. Yahyapour Y, Rahmani R, Alipour M, Alizadeh A, Khademian A, Sadeghi F. Prevalence and association of human papillomavirus, Epstein-Barr virus and Merkel Cell polyomavirus with neoplastic esophageal lesions in northern Iran. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2018;9(4):353.
65. Afrasiabi A, Ahlenstiel C, Swaminathan S, Parnell GP. The interaction between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis genetic risk loci: insights into disease pathogenesis and therapeutic opportunities. *Clinical & Translational Immunology*. 2023;12(6):e1454.