



Scan online to view this article

## Investigation of biomarker value of *SLC1A2* gene in tissue samples of patients with glioblastoma multiforme

Nasrin Karimi<sup>1</sup>, Hamidreza Kheiri<sup>2\*</sup>, Vajiheh Zarrinpour<sup>1</sup>,  
Mohammadmahdi Forghanifard<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2. Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** glioblastoma Multiforme (GBM), astrocytoma grade IV which makes up 53% of all gliomas. It is the most common and deadly primary malignant brain tumor in adults. The mortality rate in glioblastoma multiforme is very high. The aim of this study was to determine the expression of *SLC1A2* gene in tumor tissues and margins Healthy subjects with glioblastoma multiform were designed and performed.

**Materials and Methods:** In this study, 50 tissue samples including 25 tissue samples with glioblastoma multiform disease and 25 healthy tissue samples around the GBM tumor before treatment were collected as control samples. RNA extraction and cDNA synthesis were performed in all samples. *SLC1A2* gene expression was investigated using Real-time PCR method. *ACTB* gene was used as internal control. Statistical analysis of data was done using GraphPad Prism version 8 software. Roc curve was used to check the biomarker value of *SLC1A2* gene.

**Results:** Decreased *SLC1A2* gene expression was observed in glioblastoma multiforme samples and its expression was compared with the age, gender and tumor size of the patients. The expression of *SLC1A2* gene with the age of the patients was statistically investigated and a significant relationship was observed among people over 50 years old and under 50 years old (P-value< 0.05), while this significant relationship was not observed in gender and tumor size (P-value>0.05).

**Conclusion:** The *SLC1A2* gene was less expressed in the tumor tissue of patients with glioblastoma multiforme than in the healthy tissue around the tumor. By examining the ROC curve, it is possible that the *SLC1A2* gene can be proposed as a biomarker.

**Keywords:** *SLC1A2* Gene, Biomarker, Glioblastoma multiforme, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran

Email: h.kheiri@zums.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## بررسی ارزش بیومارکری ژن *SLC1A2* در نمونه های

### بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم

نسرین کریمی<sup>۱</sup>، حمیدرضا خیری<sup>۲\*</sup>، وجیهه زرین پور<sup>۱</sup>، محمد مهدی فرقانی فرد

۱. گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲. گروه زیست فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات زیست فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** گلیوبلاستوما مولتی فرم (GBM)، آستروسیتوما گرید IV، ۵۳٪ کلیه گلیوماها را تشکیل می دهد، شایع ترین و کشنده ترین تومور بدخیم اولیه مغز در بزرگسالان است. میزان مرگ و میر در گلیوبلاستوما مولتی فرم بسیار بالا می باشد. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن *SLC1A2* در بافت توموری و حاشیه ای سالم افراد مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه از ۵۰ نمونه بافت شامل ۲۵ نمونه بافت مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم بیماری و ۲۵ نمونه بافت سالم اطراف تومور GBM قبل از درمان به عنوان نمونه کنترل جمع آوری شد. در تمام نمونه ها، استخراج RNA و سنتز cDNA صورت گرفت. بیان ژن *SLC1A2* با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد. از ژن *ACTB* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد. از منحنی Roc برای بررسی ارزش بیومارکری ژن *SLC1A2* استفاده شد.

**یافته ها:** کاهش بیان ژن *SLC1A2* در نمونه های گلیوبلاستوما مولتی فرم مشاهده شد و بیان آن با سن، جنس و اندازه تومور بیماران مقایسه شد. بیان ژن *SLC1A2* با سن بیماران از لحاظ آماری بررسی و ارتباط معنادار در بین افراد بالای ۵۰ سال و زیر ۵۰ سال مشاهده شد ( $P\text{-value} < 0/05$ ) در حالی که در جنسیت و اندازه تومور این ارتباط معنادار مشاهده نشد ( $P\text{-value} > 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** ژن *SLC1A2* در بافت توموری بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم کم تر از بافت سالم اطراف تومور بیان شده بود. با بررسی منحنی ROC این احتمال می رود که ژن *SLC1A2* بتواند به عنوان مارکر زیستی مطرح شود.

**واژه های کلیدی:** ژن *SLC1A2*، بیومارکر، گلیوبلاستوما مولتی فرم، Iau Science.

## مقدمه

گلیوبلاستوما مولتی فرم بدخیم ترین و متداول ترین نوع آستروسیتوم های اولیه است (۱)، که ۱۶ درصد از کل

### نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان،

ایران

پست الکترونیکی: h.kheiri@zums.ac.ir.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹

نئوپلاسم های اولیه مغز و سیستم عصبی مرکزی را شامل می شود (۲). بیش از ۶۰ درصد از کل تومورهای مغزی در بزرگسالان را شامل می شود (۱). میزان بروز سالانه آن ۳ در ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت است (۳). اگرچه GBM یک تومور نادر با بروز جهانی کم است، اما پیش آگهی ضعیف آن با میزان بقا ۱۴-۱۵ ماه پس از تشخیص، آن را به یک موضوع حیاتی بهداشت عمومی تبدیل می کند. این بیماری می تواند در هر سنی رخ دهد اما حداکثر آن بین ۵۵ تا ۶۰ سال است. گلیومای بدخیم علت ۲/۵ درصد از مرگ و میرهای ناشی از سرطان است و سومین

فعالیت ترنسپورتر سدیم (۱۰)، فعالیت ناقل گذرنده گلوتامات با میل ترکیبی بالا است (۱۷). ژن *SLC1A2* به طور عمده در آستروسیت‌ها در شرایط عادی بیان می‌شود. هم‌چنین در الیگودندروسیت‌ها و نورون‌ها در سراسر نخاع و مغز، به ویژه در قشر مغز و هیپوکامپ شناسایی می‌شود (۹). اختلال عملکرد ژن *SLC1A2* با بیماری‌های عصبی متعددی مانند اسکروز جانبی آمیوتروفیک، صرع یا بیماری آلزایمر مرتبط است (۱۱). تنوع ژنتیکی در *SLC1A2* در طیف وسیعی از بیماری‌های عصبی از جمله اسکیزوفرنی، اوتیسم و در فنوتیپ‌های اصلی اختلال دو قطبی دخیل است (۹). *SLC1A2* در بیماران اسکیزوفرنی (۱۸)، افسردگی (۹) سرطان کلورکتال، ریه (۱۹) و معده (۲۰)، گلیوما و گلیوبلاستوما مولتی فرم (۲۱) مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نقش مهم و حیاتی تحقیقات در زمینه یافتن مارکر زیستی مناسب در گلیوبلاستوما مولتی فرم، سطح بیان ژن *SLC1A2* در نمونه‌های بافت توموری گلیوبلاستوما مولتی فرم با استفاده از تکنیک Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) ارزیابی شد. هم‌چنین با نمونه‌های بافت سالم از حاشیه گلیوبلاستوما مولتی فرم به عنوان کنترل مقایسه شد.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۵ نمونه بافت مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم قبل از درمان و ۲۵ نمونه بافت سالم اطراف همان نمونه‌های تومور گلیوبلاستوما مولتی فرم به عنوان نمونه کنترل در سال ۱۳۹۷-۱۳۹۶ از بیمارستان‌های امام خمینی و شهدا جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در بازه سنی ۴۶ تا ۷۷ سال بودند. جمع‌آوری نمونه‌های بافت زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان با شناسه اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1399.016 و رضایت بیماران صورت گرفت.

**استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-time PCR:** RNA از نمونه بافت گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم حاشیه بافت توموری طبق دستورالعملکیت HighPure RNA Paraffin Kit (Roche, Germany) استخراج گردید. با استفاده از دستگاه BiophotometerPluse اسپکتروفتومتری

علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در افراد ۱۵ تا ۳۴ سال است. نسبت بروز گلیوبلاستوما مولتی فرم در مردان در مقایسه با زنان بیشتر است. علی‌رغم انواع روش‌های درمانی مدرن علیه گلیوبلاستوما مولتی فرم، هنوز یک بیماری کشنده با پیش‌آگهی بسیار ضعیف است. به طور متوسط بیماران ۱۴ تا ۱۵ ماه پس از تشخیص بقا دارند (۱). با وجود پیشرفت‌های زیاد در روش‌های تشخیصی گلیوبلاستوما مولتی فرم، باز هم پیش‌آگهی زود هنگام مشکل موجود جهت درمان است (۴). روش‌های تشخیصی چون تست هیستوپاتولوژی و تصویربرداری عصبی، غیر حساس و گران هستند و ممکن است باعث خونریزی و آسیب‌های عصبی شوند. بنابراین، پیدا کردن مارکرهای مناسب به خصوص در بیمارانی که در معرض خطر بالای مرگ و میر ناشی از جراحی یا تومورهای کوچک در مغز هستند، جهت اجتناب از بیوپسی حائز اهمیت است (۵). از این‌رو یکی از اهداف مهم درمان، استفاده از بیومارکرها است (۶). یکی از روش‌های یافتن مارکرهای زیستی بررسی مجموعه ژن‌هایی است که در گلیوبلاستوما مولتی فرم بیان می‌شوند.

*SLC1A2* (Solute Carrier Family 1 Member 2) یک ژن کد کننده پروتئین است (۷) و به عنوان ناقل گلوتامات ۱ (GLT1) شناخته می‌شود. اندازه ژن *SLC1A2* در انسان ۱۱/۷ کیلوباز است و دارای ۱۱ اگزون است (۸). ژن *SLC1A2* در موقعیت کروموزومی 13p 13-12.9 قرار دارد (۹)، دارای ۵۷۴ اسید آمینه است (۷). *SLC1A2* از نظر ساختاری هتروترایمر است (۱۰، ۱۱، ۱۲) و ایزوفرم ۳ آن می‌تواند با ایزوفرم ۱ الیگومریزه شود (۱۳). انتقال‌دهنده گلوتامات عصبی و نقش اصلی را در خاتمه انتقال سیناپسی و در هموستاز گلوتامات خارج سلولی در سیستم عصبی مرکزی بازی می‌کند (۱۰). از نام‌های دیگر این ژن *GLT-1* و *EAAT2* است (۱۱). *SLC1A2* متعلق به خانواده (EAAT2) Excitatory amino acid transporter 2 است (۹). *EAAT2* هدایت کننده آنیونی در منافذ و انتقال دهنده و حذف گلوتامات از شکاف سیناپسی در سیستم عصبی است (۱۴). عملکردهای بیولوژیکی *SLC1A2* عبارتست از انتقال سیناپسی شیمیایی (۱۵)، انتقال غشایی L-آسپاراتات (۱۶) ورود L- گلوتامات از غشای پلاسمایی (۱۷) و عملکردهای مولکولی آن شامل

در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد، مرحله سوم (Melting) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد (۲۳).

میزان بیان ژن‌ها با استفاده از (Cycle threshold) CT مقایسه ارزیابی شد و تجزیه و تحلیل CT نمونه‌ها با استفاده از روش  $\Delta\Delta C_t$  انجام شد و از کمیت سنجی نسبی Relative Quantification (RQ) برای بررسی تغییرهای بیان استفاده شد. آنالیزهای آماری، به منظور مقایسه بیان نسبی ژن‌ها در نمونه‌های بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های سالم اطراف توموری و بررسی مشخصات پاتولوژی و مقایسه آن با بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون‌های آزمون T-test مستقل و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) توسط نرم‌افزار GraphPad Prism V.8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) انجام شد. سنجش توزیع نرمال داده‌ها نیز با استفاده از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف انجام شد. از منحنی ROC برای ارزیابی حساسیت و اختصاصیت ژن *SLC1A2* به عنوان مارکر زیستی در نمونه‌های گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم استفاده شد و بهترین برش از طریق بالاترین حساسیت و ویژگی تعیین شد.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

منحنی‌های تکثیر و منحنی ذوب برای ژن‌های *SLC1A2* و *ACTB* (شکل ۱. A و B، شکل ۲. A و B) به صورت جداگانه توسط دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System رسم گردید، که این امر تأییدی بر اتصال صحیح پرایمرها و اختصاصیت آن در ژن‌های مورد نظر است. در این مطالعه مشخصات کلینیکوپاتولوژی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم (سن، جنس، درجه بیماری و اندازه تومور) مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین ارتباط بیان ژن *SLC1A2* با مشخصات کلینیکوپاتولوژی بیماران بررسی شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. کمیت سنجی نسبی بیان ژن

(Eppendorf, Germany) OD، نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. از نمونه RNA هایی که نتایج نسبت OD ۲۸۰/۲۶۰ nm آن‌ها بین ۲-۱/۸ بود، جهت سنتز cDNA استفاده شد. جهت سنتز cDNA از RNA استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد و با کیت RT/PCR AccuPower® (BioNEER, Oakland, USA) سنتز cDNA انجام شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد و انکوبه شد. پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های *SLC1A2* و *ACTB* با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner Version 6.5.52 به صورت اگزون جانکشن طراحی شدند، سپس به شرکت سازنده Metabion international AG (Steinkirchen, Germany) سفارش داده شد. برای ژن *ACTB* از توالی پرایمر Forward: TAAGTCCTGCCCTCATTT و Reverse: GTACAGGTCTTTGCGGATGTR (Accession No. NM\_004171.4) و برای ژن *SLC1A2* از پرایمرهای Forward: AATAGCTACTCCTTTAACCGC و Reverse: GGCAACTCCTTTAACCGC (Accession No. NM\_001101.5) استفاده شد. ژن *ACTB* (Actin Beta) (۲۲) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش Real-time PCR برای هر نمونه با سه بار تکرار واکنش‌های Real-time PCR انجام شد. مخلوط تکثیر در حجم ۲۰ μl تهیه شد. و از RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, Germany) استفاده شد. واکنش Real-time PCR برای بررسی تغییرهای بیان ژن‌های *SLC1A2* و *ACTB* بر روی نمونه‌های بیمار مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم حاشیه بافت توموری با استفاده از دستگاه StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) انجام شد و منحنی‌های تکثیر و ذوب توسط دستگاه رسم شد. واکنش Real-time PCR طی ۳ مرحله به صورت زیر انجام پذیرفت: مرحله اول holding در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم به طور متناوب در طول ۴۵ سیکل جهت دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال و گسترش

جدول ۱. بررسی ویژگی‌های کلینیکی پاتولوژی بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم

| تعداد ( درصد )             | خصوصیات  |
|----------------------------|----------|
| سن                         |          |
| ۷ (۲۸)                     | سال < ۵۰ |
| ۱۸ (۷۲)                    | سال > ۵۰ |
| جنس                        |          |
| ۱۴ (۵۶)                    | مرد      |
| ۱۱ (۴۴)                    | زن       |
| درجه تومور                 |          |
| ۲۵ (۱۰۰)                   | ۴        |
| اندازه تومور ( سانتی متر ) |          |
| ۱۰ (۴۰)                    | ≤ ۳      |
| ۱۵ (۶۰)                    | > ۳      |

تعیین Cut-off برای این ژن مشخص گردید که میزان Cut-off ژن *SLC1A2* برابر با  $11/06 <$  و به ترتیب حساسیت و اختصاصیت آن  $0/72$  و  $0/92$  است. آنالیز منحنی ROC نشان داد که مقدار *SLC1A2* می‌تواند به خوبی بین بیماران و افراد کنترل افتراق قائل شود.

### بحث

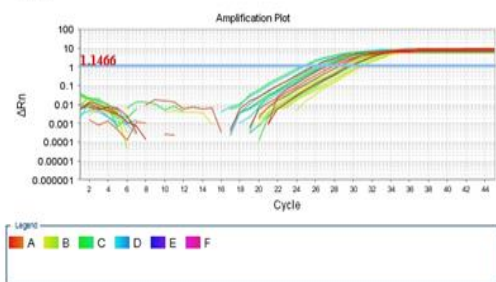
تومورهای مغز، ۸۵ تا ۹۰٪ از تومورهای اصلی سیستم عصبی مرکزی را تشکیل می‌دهند (۲۴). گلیوبلاستوما مولتی فرم، از رایج‌ترین انواع تومورهای سیستم عصبی مرکزی است که از سلول‌های ستاره‌ای شکل بافت گلیال منشاء می‌گیرد. این نوع تومور، دارای درجات متفاوتی از چند شکلی است و به عنوان یکی از تهاجمی‌ترین انواع تومورها محسوب می‌شود. رشد تهاجمی تومور، تهاجم بافتی منتشر و تخریب عصبی از مشخصه‌های گلیوم بدخیم است. اگرچه تحریک‌پذیری گلو تامات نقش کلیدی در تخریب عصبی ناشی از گلیوما دارد، مکانیسم‌های کنترل این فرآیند به درستی شناخته نشده است (۲۵). هرچند پیشرفت‌های عمده‌ای در زمینه تشخیص این سرطان در حوزة پرتو درمانی، شیمی درمانی و جراحی وجود دارد، اما پیش‌آگهی چندان مناسبی برای بیماران مبتلا به گلیومای بدخیم وجود ندارد (۲۶). از این رو استفاده از بیومارکرها به عنوان هدف جدیدی برای درمان بسیار اهمیت دارد (۶).

در این پژوهش بیان ژن *SLC1A2* در بافت افراد مبتلا به سرطان گلیوبلاستوما مولتی فرم با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد و نتایج نشان داد که بیان

است، که بیش‌ترین بیان مربوط به نمونه ۸ و کم‌ترین بیان مربوط به نمونه ۱۲ است. هم‌چنین کمیت سنجی نسبی بیان ژن *SLC1A2* در نمونه‌های مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم در شکل ۳B نشان داده شده است، که بیش‌ترین بیان مربوط به نمونه ۱ و کم‌ترین بیان مربوط به نمونه ۶ است. نتایج بیان ژن *SLC1A2* در نمونه‌های مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم با سن و جنسیت با استفاده از آزمون T-test در نرم‌افزار GraphPad Prism 8 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مقایسه بیان ژن بیان ژن *SLC1A2* با سن بیماران با  $P_{\text{value}} = 0/003$  ارتباط معناداری دیده شد (شکل ۴A). اما با جنسیت بیماران با  $P_{\text{value}} = 0/381$  و اندازه تومور با  $P_{\text{value}} = 0/162$  از لحاظ آماری ارتباط معناداری دیده نشد. (شکل ۴B و ۴C) در مقایسه آنالیز نتایج به دست آمده از میزان بیان ژن *SLC1A2* در بافت‌های گلیوبلاستوما مولتی فرم و بافت سالم حاشیه تومور گلیوبلاستوما مولتی فرم نشان داده شد که در بافت گلیوبلاستوما مولتی فرم نسبت به بافت نرمال کاهش بیان وجود دارد و از نظر آماری اختلاف معناداری دیده شد ( $P_{\text{value}} < 0/0001$ ) (شکل ۵A) در واقع با توجه به نتایج کاهش بیان ژن *SLC1A2* در گلیوبلاستوما مولتی فرم مشاهده شد. آنالیز منحنی (ROC) Receiver operating characteristic جهت ارزیابی ارزش بیومارکری *SLC1A2* در نمونه‌های بافت توموری گلیوبلاستوما مولتی فرم و سالم انجام شد، همان‌طور که در شکل ۵B نشان داده شده است. سطح زیر منحنی (AUC) به همراه برای برابر با  $0/865 \pm 0/052$  است. با

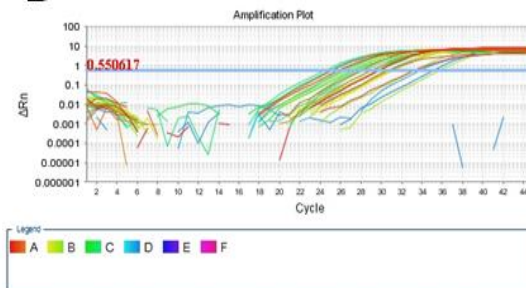
گلیوبلاستوما مولتی فرم نسبت به بافت سالم اطراف

A



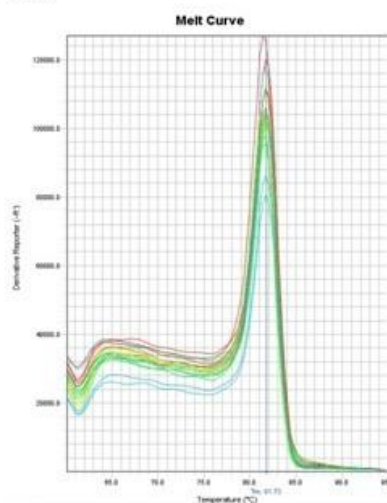
ژن *SLC1A2* در بافت بیماران مبتلا به

B

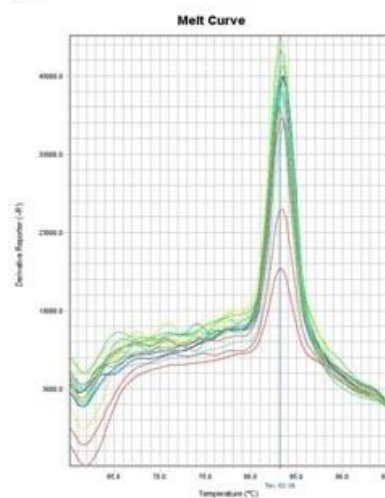


شکل ۱. منحنی تکثیر ژنهای *ACTB* و *SLC1A2* در نمونه‌های بافت توموری گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های بافت سالم از حاشیه تومور *SLC1A2* (B), *ACTB* (A)

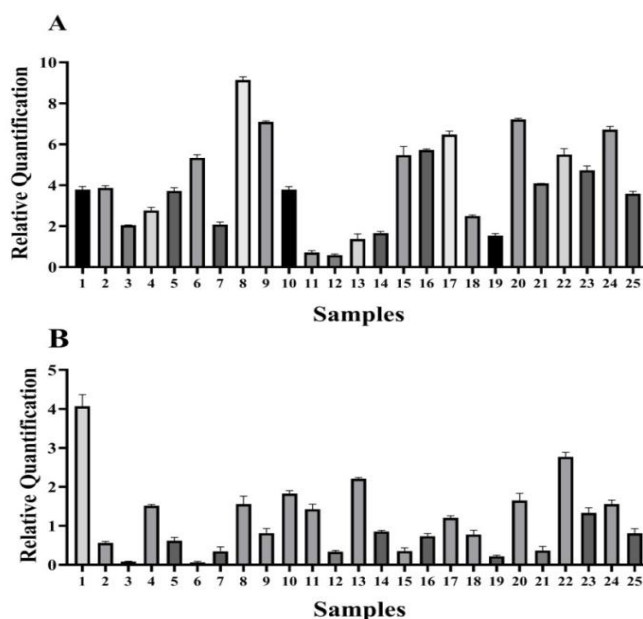
A



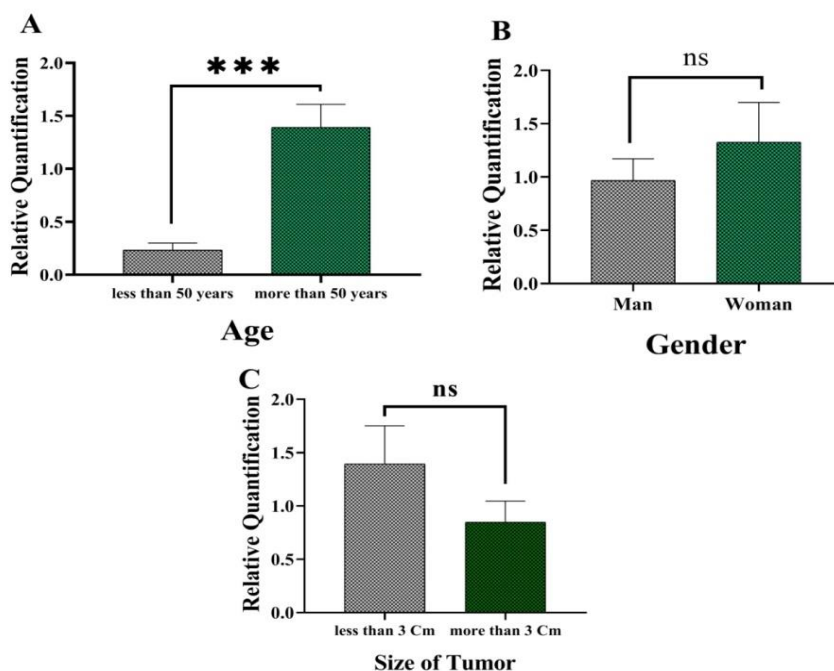
B



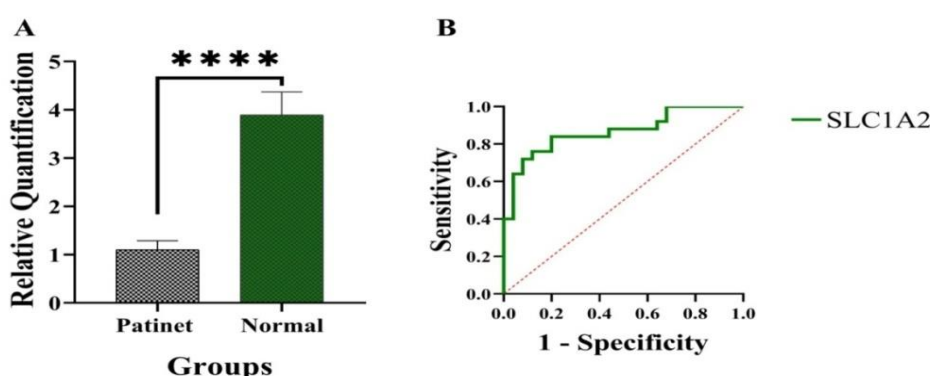
شکل ۲. منحنی ذوب ژنهای *ACTB* و *SLC1A2* در نمونه‌های بافت توموری گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های بافت سالم از حاشیه تومور *SLC1A2* (B), *ACTB* (A)



شکل ۳. بررسی بیان نسبی ژن *SLC1A2* در نمونه‌های بافت سالم از حاشیه تومور گلیوبلاستوما مولتی فرم B. در نمونه‌های بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم



شکل ۴. بررسی بیان نسبی ژن *SLC1A2* در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم با ویژگی‌های پاتولوژی. A. بررسی بیان ژن *SLC1A2* در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم براساس سن.  $P_{\text{value}} = 0.003$ . B. بررسی بیان ژن *SLC1A2* در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم بر اساس جنسیت.  $P_{\text{value}} = 0.381$ . C. بررسی بیان ژن *SLC1A2* در بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم بر اساس اندازه تومور.  $P_{\text{value}} = 0.162$ .



شکل ۵. A. نمودار مقایسه بیان ژن *SLC1A2* در نمونه‌های بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های سالم از حاشیه تومور گلیوبلاستوما مولتی فرم.  $P_{\text{value}} < 0.0001$ . B. تجزیه و تحلیل منحنی ROC ژن *SLC1A2* در نمونه‌های بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های بافت سالم از حاشیه تومور گلیوبلاستوما مولتی فرم.

*SLC1A2* و *APIP-SLC1A2* در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال و ریه با استفاده از تکنیک quantitative RT-PCR و آنالیز توالی‌یابی بررسی شد و در برخی از نمونه‌ها بیان *SLC1A2* افزایشی و در برخی از نمونه‌ها بیان *SLC1A2* کاهش بود (۱۹). در مطالعه دیگری فیوژن *CD44-SLC1A2* و *APIP-SLC1A2* در ۴۲ سل لاین سرطان معده با استفاده از تکنیک RT-PCR و آنالیز توالی‌یابی و آنالیز Spectral karyotyping بررسی شد و نتیجه نشان داد خاموش کردن *CD44*

تومور تغییرهای کاهش‌دهنده دارد. در مورد بیان *SLC1A2* در گلیوبلاستوما مولتی فرم در ایران تحقیقی تا به امروز اعلام نشده است. براساس مطالعه‌های محققین نقش *SLC1A2* در سرطان هنوز مشخص نشده است.

کاهش بیان ناقل *SLC1A2* غشایی در افسردگی اساسی گزارش شد در حالی‌که روندی در همان جهت در افراد دو قطبی (bipolar disorder) مشاهده شده است (۹). در مطالعه Shinmura و همکاران، فیوژن *CD44*

نویسندگان از کلیه بیمارانی که در این مطالعه شرکت کرده‌اند و بیمارستان‌های امام خمینی و شهدا تشکر می‌کنند.

SLC1A2 با دومین siRNA خاص فیوژن، تکثیر سلولی، تهاجم و تشکیل کلنی را مهار می‌کند (۲۰).

در طی پژوهشی، کاهش قابل توجه بیان *SLC1A2* در گلیوبلاستوماهای به دست آمده از Aniplastic گلیوبلاستوما مولتی فرم مشاهده شد (۲۱). در مطالعه Lee و همکاران، نقش EAAT2 و AEG-1 در سل لاین-های گلیوما، گلیوبلاستوما و نورمال از جهت القا تخریب عصبی با استفاده از تکنیک های نودرن بلات، و سترن بلاتو Immunoprecipitation Assays بررسی شد. یافته‌های محققین نشان داد که AEG-1 از طریق تنظیم بیان EAAT2 به تجزیه عصبی ناشی از گلیوما کمک می‌کند، که مشخصه بارز این تومورکشنده است. یافته‌های محققین نشان داد که AEG-1 از طریق تنظیم بیان EAAT2 به تجزیه عصبی ناشی از گلیوما کمک می‌کند، که مشخصه بارز این تومورکشنده است (۲۵).

در این پژوهش ژن *SLC1A2* در بافت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم بیان کم‌تری را نسبت به بافت سالم اطراف تومور نشان داد، و با افزایش سن در بیماران میزان بیان ژن *SLC1A2* کاهش یافت و از نظر آماری ارتباط معناداری بین بیان ژن مورد مطالعه و سن بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما وجود داشته، اما بین جنسیت بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و بیان ژن از نظر آماری اختلاف معناداری وجود ندارد.

## نتیجه‌گیری

بیان ژن *SLC1A2* در نمونه‌های بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم نسبت به نمونه‌های سالم اطراف تومور کاهش بیان داشت و از لحاظ آماری اختلاف معناداری را در نمونه‌های بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما مولتی فرم و نمونه‌های سالم حاشیه تومور نشان داد. در آنالیز منحنی ROC ژن *SLC1A2*، با توجه به نتایج سطح زیر منحنی، میزان حساسیت و اختصاصیت مشخص گردید که ژن *SLC1A2* می‌تواند دارای ارزش بیومارکری باشد.

## سپاسگزاری

1. HANIF, Farina, et al. Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific j. cancer prevention: APJCP*.2017;18.1: 3.
2. Davis ME. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clinical j. oncology nursing*. 2016; 1;20(5):S2.
3. Birzu C, French P, Caccese M, Cerretti G, Idbaih A, Zagonel V, Lombardi G. Recurrent glioblastoma: from molecular landscape to new treatment perspectives. *Cancers*. 2021;13(1):47.
4. Amanpour S, Muhammadnejd S, Muhammadnejad A, Mazaheri Z, Kazem-Haghighi M, Oghabian M, Khoshnevisan A. Studying angiogenesis in autochthonous xenograft models of glioblastoma multiforme by MVD-CD34 technique in Iranian patients. *Tehran University Medical Journal*. 2011 1;69(3).
5. Regazzo G., Terrenato I., Spagnuolo M., Carosi M., Cognetti G., Cicchillitti L., Sperati F., Villani V., Carapella C., Piaggio G., Pelosi A .A restricted signature of serum miRNAs distinguishes glioblastoma from lower grade gliomas. *J. Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1): 124.
6. Shabani M, Mohammad Ganji S, Salahshourifar I. Investigation of Long Non-coding RNA HOX A11-ASExpression in Iranian Patients with Glioblastoma: A Quantitative Study. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2020; 10;14(5):22-9.
7. GeneCards.org [homepage on the Internt]. The Human Gene Database. cited 2021 Oct 28] Available from; <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC1A2&keywords=slc1a2>.
8. Alam MA, Datta PK. Epigenetic regulation of excitatory amino acid transporter 2 in neurological disorders. *Frontiers in pharmacology*. 2019 ;13;10:1510
9. Fiorentino A, Sharp SI, McQuillin A. Association of rare variation in the glutamate receptor gene SLC1A2 with susceptibility to bipolar disorder and schizophrenia. *European J. Human Genetics*. 2015;23(9):1200-6.
10. Gendreau S, Voswinkel S, Torres-Salazar D, Lang N, Heidtmann H, Detro-Dassen S, Schmalzing G, Hidalgo P, Fahlke C. A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *J. Biological Chemistry*. 2004; 17;279(38):39505-12.
11. Simonin A, Montalbetti N, Gyimesi G, Pujol-Giménez J, Hediger MA. The hydroxyl side chain of a highly conserved serine residue is required for cation selectivity and substrate transport in the glial glutamate transporter GLT-1/SLC1A2. *J. biological chemistry*. 2015; 18;290(51): 30464-74.
12. Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*. 2004;431(7010):811-8.
13. Gebhardt FM, Mitrovic AD, Gilbert DF, Vandenberg RJ, Lynch JW, Dodd PR. Exon-skipping splice variants of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) form heteromeric complexes with full-length EAAT2. *J. Biological Chemistry*. 2010; 8;285(41):31313-24.

14. Melzer N, Biela A, Fahlke C. Glutamate modifies ion conduction and voltage-dependent gating of excitatory amino acid transporter-associated anion channels. *J. Biological Chemistry*. 2003; 12;278(50):50112-9.
15. Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neuroscience*. 1994; 1;14(9):5559-69.
16. Uniprot.org[homepage on the Internet].Database of protein sequence and functional information :European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).[updated2021FEB 2;cited 2021 Oct 28] Available from; <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=slc1a2&sort=score>.
17. Abousaab A, Warsi J, Elvira B, Lang F. Caveolin-1 sensitivity of excitatory amino acid transporters EAAT1, EAAT2, EAAT3, and EAAT4. *The Journal of membrane biology*. 2016;249(3):239-49.
18. Merk W, Kucia K, Mędrala T, Kowalczyk M, Owczarek A, Kowalski J. Association study of the excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) and glycine transporter 1 (GlyT1) gene polymorphism with schizophrenia in a Polish population. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2019;15:989.
19. Shinmura K, Kato H, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Du C, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Tanahashi M, Niwa H. CD44-SLC1A2 fusion transcripts in primary colorectal cancer. *Pathology & Oncology Research*. 2015;21(3):759-64.
20. Tao J, Deng NT, Ramnarayanan K, Huang B, Oh HK, Leong SH, Lim SS, Tan IB, Ooi CH, Wu J, Lee M. CD44-SLC1A2 gene fusions in gastric cancer. *Science translational medicine*. 2011; 6;3(77):77ra30
21. Tong H, Yu X, Lu X, Wang P. Downregulation of solute carriers of glutamate in gliosomes and synaptosomes may explain local brain metastasis in anaplastic glioblastoma. *IUBMB life*. 2015 Apr;67(4):306-11.
22. Röhn G, Koch A, Krischek B, Stavrinou P, Goldbrunner R, Timmer M. .ACTB and SDHA are suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human astrocytomas using quantitative RT-PCR. *Technology in cancer research & treatment*. 2018; 25;17.
23. Freitas FC, Depintor TS, Agostini LT, Luna-Lucena D, Nunes FM, Bitondi MM, Simões ZL, Lourenço AP. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Scientific reports*. 2019; 27;9(1):1-3.
24. Hassani L, Asaadi Tehrani G, Mirza Ahmadi S. Relationship between LncRNA THRIL expression controlling TNF-alpha pathway in glioblastoma cell line under temozolomide treatment. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2018 10;76(7):469-76.
25. Lee SG, Kim K, Kegelmann TP, Dash R, Das SK, Choi JK, Emdad L, Howlett ELJeon HY, Su ZZ, Yoo BK. Oncogene AEG-1 promotes glioma-induced neurodegeneration by increasingglutamateexcitotoxicity. *Cancer research*. 2011; 15;71(20):6514-23.
26. Shahsavani N, Mazaheri M. The Effect of Resveratrol on Expression of microRNA34a in U87MG Cancerous Cells Line. *J Isfahan Med Sch*. 2017; 35(429): 525-30.