



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2024, Cilt 11(1): 141-149

Kolanjiyokarsinom ve Hepatoselüler Karsinom Hastalarında Farklı Genler Tarafından Tetiklenen Ortak Biyolojik Yolaklar

Common Biological Pathways Triggered by Different Genes in Cholangiocarcinoma and Hepatocellular Carcinoma Patients

Gizem Ayna Duran

¹İzmir Ekonomi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir/Türkiye,

e-mail: gizem.duran@ieu.edu.tr
ORCID: 0000-0002-2168-753X

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gizem Ayna Duran
Gönderim Tarihi / Received: 17.12.2023
Kabul Tarihi / Accepted: 06.03.2024
DOI: 10.34087/cbusbed.1405966

Öz

Kolanjiyokarsinom (CHOL) erken teşhis edilmesi zor olan ve oldukça yüksek düzeyde öldürücü bir kanser türüdür. CHOL tanısında radyolojik görüntüleme kısıtlılıklar mevcuttur ve biyopsi ile tanı yöntemi gibi invaziv tanı yöntemleri dışında genetik tabanlı ve özgün biyobelirteçlerin belirlenmesi zorunlu hale gelmektedir. Literatürde bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda öncelikle intrahepatik (iCHOL) ve ekstrahepatik (eCHOL) kolanjiyokarsinom hastalarında ortak upregüle olan genler belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda klinikte CHOL kanserlerinin hepatoselüler karsinom (LICH) kanserinden ayırt edici tanısının zor olması sebebiyle CHOL hastalarında hepatoselüler karsinomdan (LICH) farklı olarak ve LIHC hastaları ile ortak olarak upregüle edilen genlerin tespit edilmesi de amaçlanmıştır. Hastaların gen yoğunluk verileri NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından (GSE121248, GSE132305 ve GSE45001) sağlanmıştır. Çalışmada R LIMMA paketinde yer alan lineer modelleme yöntemi kullanılarak kanserli olan ve olmayan örnekler arasında upregüle genler (differentially expressed genes-DEGs) tespit edilmiştir. Tespit edilen genlerin hangi biyolojik yollara etki ettiğini belirlemek için Gen seti zenginleştirme analizi (Fonksiyonel zenginleştirme analizi) (GSEA) ShinyGO 0.80 webtool kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlarımıza göre CHOL hastalarında LIHC hastalarından farklı olarak upregüle edilen 4 gene (F2R, ITGA11, LAMC2 ve LAMB3) odaklanılmıştır. CHOL ve LIHC hastalarında ortak olarak upregüle edilen 2 gen (COL1A1, ITGA2) tespit edilmiştir. Söz konusu genlerinin ortak olarak işaret ettiği biyolojik yolaklar PI3K-Akt sinyal yolağı ve ekstraselüler matriks (ECM)-reseptör etkileşimi süreçleridir. Belirlenen genler ile protein-protein ve ilaç etkileşim çalışmaları sonuçları klinik denemeler ile desteklenip CHOL ile LIHC kanserlerinin ayırt edilmesinde etkin bir şekilde hedeflenebilecektir.

Anahtar Kelimeler: kolanjiyokarsinom, intrahepatik, ekstrahepatik, hepatoselüler karsinom, biyobelirteç

Abstract

Cholangiocarcinoma (CHOL) is a highly lethal type of cancer that is difficult to diagnose early. There are limitations in radiological imaging in the diagnosis of CHOL, and it becomes necessary to determine genetic-based and specific biomarkers other than invasive diagnostic methods such as biopsy. Unlike the studies in the literature that carried out these purposes, in our study, the genes that were commonly upregulated in intrahepatik (iCHOL) and extrahepatik (eCHOL) cholangiocarcinoma patients were determined. In addition, our study aimed to identify genes that are upregulated in CHOL patients, differently from hepatocellular carcinoma (LICH), and in common with LIHC patients, since it is difficult to differentiate CHOL cancers from LIHC cancers in the clinic. Gene expression data of the patients were provided from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE121248, GSE132305 and GSE45001). In the study, upregulated genes (differentially expressed genes-

DEGs) were detected between cancerous and non-cancerous samples using the linear modeling method in the R LIMMA package. Gene set enrichment analysis (Functional enrichment analysis) (GSEA) was performed using ShinyGO 0.80 webtool to determine which biological pathways the detected genes affect. According to our results, we focused on 4 genes (F2R, ITGA11, LAMC2 and LAMB3) that were upregulated in CHOL patients differently than in LIHC patients. Two commonly upregulated genes (COL1A1, ITGA2) were detected in CHOL and LIHC patients. The biological pathways that the genes in question commonly indicate are the PI3K-Akt signaling pathway and extracellular matrix (ECM)-receptor interaction processes. The identified genes and the results of protein-protein and drug interaction studies will be supported by clinical trials and can be effectively targeted to differentiate CHOL and LIHC cancers.

Keywords: cholangiocarcinoma, intrahepatic, extrahepatic, hepatocellular carcinoma, biomarker

1. Giriş

Kolanjiyojarsinoma (CHOL) safra kanalı epitelinin tümörüdür ve erken teşhis edilmesi zor bir kanser türü olduğundan dolayı tespit edildiği evrede oldukça ölümcül bir kanser çeşididir ve Global Cancer Statistics 2018 raporuna göre hepatoselüler karsinom (LIHC) ile beraber olasılıkla erkekte ikinci kadında ise altıncı kanser kaynaklı mortalitenin nedeni olarak gösterilmektedir [1]. Tümörün bulunduğu anatomik lokasyon açısından CHOL perihilar, ekstrahepatik (eCHOL) ve intrahepatik (iCHOL) olarak üçe ayrılmaktadır [2,3,4]. Ayrıca kombine hepatoselüler-kolanjiyokarsinom tümörleri de nadir olarak gözlenen primer karaciğer malignitelerinden biridir ve histolojik olarak karışık bir kanser türü olduğundan dolayı noninvaziv ve doğru teşhisin konulması hemen hemen imkansızdır [5,6]. Bunun yanı sıra klinikte LIHC ve iCHOL'ün ameliyat öncesi süreçte noninvaziv ayırıcı tanısının esas olarak görüntülemeye dayandığı bilinmektedir. Ancak konvansiyonel görüntüleme ve radyolojik yöntemlerin iki karsinom arasında ayırım yapmadaki doğruluğu yetersizdir. Bu nedenle Huang J.L. ve ark. 2023 yılında her iki kanser türü için etkili ve invaziv olmayan bir ameliyat öncesi ayırıcı tanı yöntemi sağlamak amacıyla bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülerine dayalı yeni bir derin öğrenme modeli oluşturmuştur [7]. Bir başka grup da 2020 yılında makine öğrenmesi aracılığıyla çok fazlı bilgisayarlı tomografi (CT) taramaları üzerine bir tanı modeli geliştirmeye çalışmıştır [8].

CHOL tanısında klinik belirtiler (sarılık, koyu renkli idrar, kil renkli dışkı ve kaşıntı, karın ağrısı, halsizlik, gece terlemesi, kilo kaybı veya kaşeksi gibi) ve fiziksel muayene, endoskopik bulguların (kolanjiyografi, endoskopik ve intraduktal ultrason gibi), görüntüleme yöntemlerinin (tomografi, ultrason görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması, gibi) yanı sıra kandan Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9), Carcinoembryonic Antigen (CEA), Alpha-Fetoprotein, Serum IgG4 ölçümü gibi laboratuvar bazlı testler de tanı koyma sürecinde klinikte kullanılmaktadır [4]. Buna karşın genetik düzeyde CHOL tanısını LIHC tanısından ayırtmaya yönelik klinikte rutin uygulamaya konulmuş bir tanı yöntemi mevcut değildir.

Biz de çalışmamızda ekstrahepatik (eCHOL) ve intrahepatik (iCHOL) CHOL tanısı almış hastaları LIHC tanısı almış hastalardan gen düzeyinde ayırtmak adına CHOL hastalarında LIHC hastalarından farklı olarak upregüle edilen genler belirlenmiştir. Çalışmamızda farklı düzeylerde ekspresye edilen genler arasından ilaç hedefleme çalışmalarına da yol göstermesi açısından sadece upregüle edilen genlere odaklanılmıştır. Bunun yanı sıra çalışmamızda CHOL ve LIHC hastalarında ortak olarak upregüle olan genler de farklı olarak tespit edilen genler ile karşılaştırma yapılması ve süreçlerin biyolojik yollar açısından daha detaylı anlaşılması için belirlenmiştir.

2. Materyal Ve Metot

2.1 Veri Setlerinin ve Hastaların Gen Yoğunluklarına ait Bilgilerin Elde Edilmesi

Hepatoselüler Karsinom (LIHC), ve safra yolu kanser çeşitleri olan ekstrahepatik kolanjiokarsinom (eCHOL), ve intrahepatik kolanjiokarsinom (iCHOL) için mikrodizi verilerinin (sırasıyla GSE121248, GSE132305, GSE45001) gen ekspresyon profilleri, Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından elde edildi

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>).

Bu üç veri setinden (GPL570 [HG-U133 Plus 2] Affymetrix İnsan Genomu U133 Plus 2.0 Dizisi) elde edilen gen yoğunlukları LIHC için 70 tümörlü dokuya ve 37 sağlıklı dokuya, eCHOL 182 tümörlü dokuya ve 38 sağlıklı dokuya ve iCHOL için ise 10 tümörlü dokuya ve 10 sağlıklı dokuya aittir (Tablo-1).

2.2 İstatistiksel analiz

Çalışmada tüm veri setleri için ayrı ayrı R LIMMA (versiyon 4.4.2) paketinde yer alan lineer modelleme yöntemi kullanılarak kanserli olan ve olmayan örnekler arasında farklılaşan genler tespit edilmiştir [9]. İstatistiki anlamlılığı karar vermede p-değeri<0.05 eşik değer olarak kabul edilmiştir. Böylece kanserli olan örneklerde sağlıklı olanlara göre upregüle-downregüle olan genler tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tüm veri setlerinde ortak bir biçimde istatistiki olarak anlamlı bir biçimde farklılaşan ortak upregüle olan genler de ortaya çıkartılmıştır. iCHOL ve LIHC için kat değişimi

(fold chage) 1.5 ve üstü olarak alınırken eCHOL için bu değer 0.5 olarak belirlenmiştir. CHOL ve LIHC kanserlerinde DEG analizi gerçekleştirmek için **Tablo-1** Çalışmada kullanılan veri setlerine ait bilgiler

UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/ualcan-res.pl>) biyoinformatik tabanlı web araçları kullanıldı [10].

Veriseti	Platform	Kanser Türü	Kişi Başına Düşen Gen Sayısı	Örnek Sayısı (kanseri doku/sağlıklı doku)
GSE121248	GPL570	LIHC	54675	N=107 LIHC tümörlü doku sayısı=70 Sağlıklı doku sayısı=37
GSE132305	GPL13667	eCHOL	49386	N=220 eCHOL tümörlü doku sayısı=182 Sağlıklı Safra Kanalı doku sayısı=38
GSE45001	GPL14550	iCHOL	23572	N=20 iCHOL tümörlü doku sayısı=10 Sağlıklı Safra Kanalı doku sayısı=10

2.3 LIHC, eCHOL ve iCHOL Kanseri Hastalarında Belirlenen Ortak Genlerin Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

LIHC, eCHOL ve iCHOL kanserli hastalarda yaygın upregüle edilmiş genlerin hangi ana biyolojik yollara etki ettiğini belirlemek için Gen seti zenginleştirme analizi (Fonksiyonel zenginleştirme analizi) (GSEA) yapılmıştır. Bu nedenle ShinyGO 0.80: Gen Ontology Enrichment Analysis (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go80/>) analizleri LIHC, eCHOL ve iCHOL kanserli hastalarda ortak olarak belirlenen yukarı regüle edilen genlerin moleküler etkileşimini ve ilişki ağlarını tanımlamak için Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) veritabanı seçilerek gerçekleştirilmiştir [11].

2.4 Etik Kurul Onayı

Bu çalışmada kullanılan kanser hastalarının gen yoğunluklarına ait bilgiler herkesin kullanımına açık olan Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından alındığından dolayı etik kurul onayı gerekli olmamaktadır

3. Sonuçlar

3.1 Kolanjiokarsinom ve Hepatoselüler Karsinom Hastalarında Farklı Olarak Eksprese Edilen Genler (DEGler)

Çalışmamızda biyoinformatik analizler ile öncelikle ayrı ayrı her bir kanser türünde ekspresyonu değişmeyen ve upregüle ve downregüle edilen genler (DEGler) belirlenmiştir. Ardından çalışmamızın amacına uygun olarak hem intrahepatik hem de ekstrahepatik kolanjiokarsinom (CHOL) hastalarında ortak olarak upregüle olan 32 adet gen belirlenmiştir. Bu genlerin yanı sıra hem CHOL hem de LIHC hastalarından ortak upregüle olan 7 gen olduğu tespit edilmiştir (Tablo-2). LIHC'ye özgü olarak tespit edilen gen sayısı Tablo-2'de de gösterildiği üzere 308'dir fakat çalışmamızda sadece CHOL'a özgü ve LIHC ile ortak olarak değişkenlik gösteren genlere odaklanılmıştır.

Tablo-2 LIHC, eCHOL ve iCHOL Kanseri Hastalarında Farklı Şekilde Ekspres Edilen Genler

Veri setleri	Anlamlılığın Yönü	Gen Sayısı
GSE121248 (LIHC)	Upregüle	15769
	Anlamlı olmayan	26899
	Downregüle	12007
GSE132305 (eCHOL)	Upregüle	3481
	Anlamlı olmayan	43359
	Downregüle	2546
GSE45001 (iCHOL)	Upregüle	1195
	Anlamlı olmayan	21544
	Downregüle	833
Farklılaşan Genler		
LIHC'dan farklı olarak sadece eCHOL ve iCHOL ortak genler	Upregüle	32
LIHC, eCHOL ve iCHOL ortak genler	Upregüle	7
LIHC'ye özgün genler	Upregüle	308

3.2 Kolanjiokarsinom Hastalarında Hepatoselüler Karsinom Hastalarından Farklı Olarak Upregüle Edilen Genler ve İlişkili Biyolojik Yolaklar

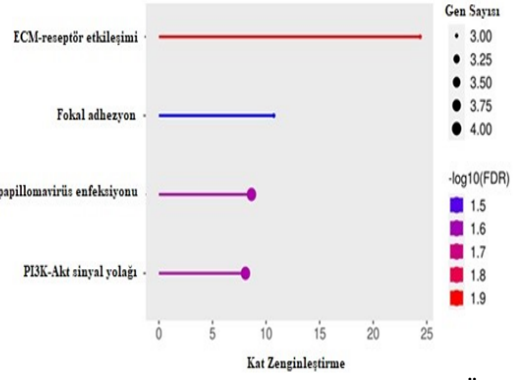
Çalışmamızda CHOL'da LIHC'den farklı olarak upregüle olduğu tespit edilen genler protein kodlayan genlerdir ve Tablo-3A'da bu genlerin listesine yer verilmiştir. Bunun yanı sıra gen zenginleştirme analizlerinin sonuçlarına göre CHOL hastalarında LIHC hastalarından farklı olarak upregüle edilen 4 gene odaklanılmıştır. Söz konusu F2R, ITGA11, LAMC2 ve LAMB3 genlerinin ortak olarak işaret ettiği biyolojik yolaklar PI3K-Akt sinyal yolağı ve ekstraselüler matris (ECM)-reseptör etkileşimi süreçleridir (Şekil-1, Tablo-3B). Belirlenen genlerin CHOL kanserlerinde net bir şekilde ve anlamlı düzeyde upregüle olduğu TCGA örneklerinde de gösterilmiştir (Şekil-2 A, B, C, D). Ayrıca çalışmamızda bu genlerin (düzeyleri benzer de olsa ITGA11 ve LAMB3 dışında) LIHC kanserlerinde downregüle olduğu da açıkça görülmektedir (Şekil-2 E, F, G, H). Çalışmamızda CHOL ve LIHC hastalarının gen yoğunluk verilerinin kullanılarak yapılan DEG analizlerinden elde edilen kat değişimi (log₂FC-fold change)

değerlerine göre ITGA11 geni iCHOL ve eCHOL hastalarında hasta olmayan bireylere göre sırasıyla 3 ve 0.53 kat artış göstermiştir. Bunun yanı sıra LAMB3 geni de benzer bir şekilde eCHOL ve LIHC hastalarında hasta olmayan bireylere göre sırasıyla 2.92 ve 0.69 kat artış göstermiştir. Benzer şekilde F2R geni sırasıyla 1.88 ve 0.52 kat artış gösterirken LAMC2 geninde ise sırasıyla 3.86 ve 0.52 kat artış gözlenmiştir. Sonuçlarımız TCGA hastalarının gen yoğunluk verilerinin kullanılarak yapılan analiz sonuçları ile tutarlıdır ve benzerdir.

Tablo-3A Kolanjiokarsinom Hastalarında Hepatoselüler Karsinom Hastalarından Farklı Olarak Upregüle Edilen Genler

Sayı	LIHC'dan farklı olarak iCHOL ve eCHOL ortak upregüle edilen genler	Genin Açıklaması
1	ABHD17C	17C, epalmitoilaz içeren abhidrolaz alanı
2	COL10A1	kollajen tip X alfa 1 zinciri
3	CST2	sistatin SA
4	DIO2	iyodotironin deiyodinaz 2
5	F2R (FAR1)	pıhtılaşma faktörü II trombin reseptörü (Proteazla Aktive Edilen Reseptör 1)
6	FAP	fibroblast aktivasyon proteini alfa
7	FDCSP	foliküler dendritik hücre tarafından salgılanan protein
8	FNDC1	fibronektin tip III alanı içeren 1
9	H2AC8	H2A kümelenmiş histon 8
10	HOXB6	homeobox B6
11	HTRA3	HtrA serin peptidaz 3
12	INHBA	inhibin alt birimi beta A
13	ITGA11	integrin alt birimi alfa 11
14	KRT17	keratin 17
15	KRT6B	keratin 6B
16	LAMB3	laminin alt birimi beta 3
17	LAMC2	laminin alt birimi beta 3
18	MATN3	matrilin 3
19	MICAL2	mikrotübül ile ilişkili monooksijenaz, calponin ve LIM alanı içeren 2
20	MMP7	matris metallopeptidaz 7
21	NTM	nörotrimin
22	OLFML2B	Olfaktomidin benzeri 2B
23	PKM	piruvat kinaz M1/2
24	PLEK2	plekstrin 2

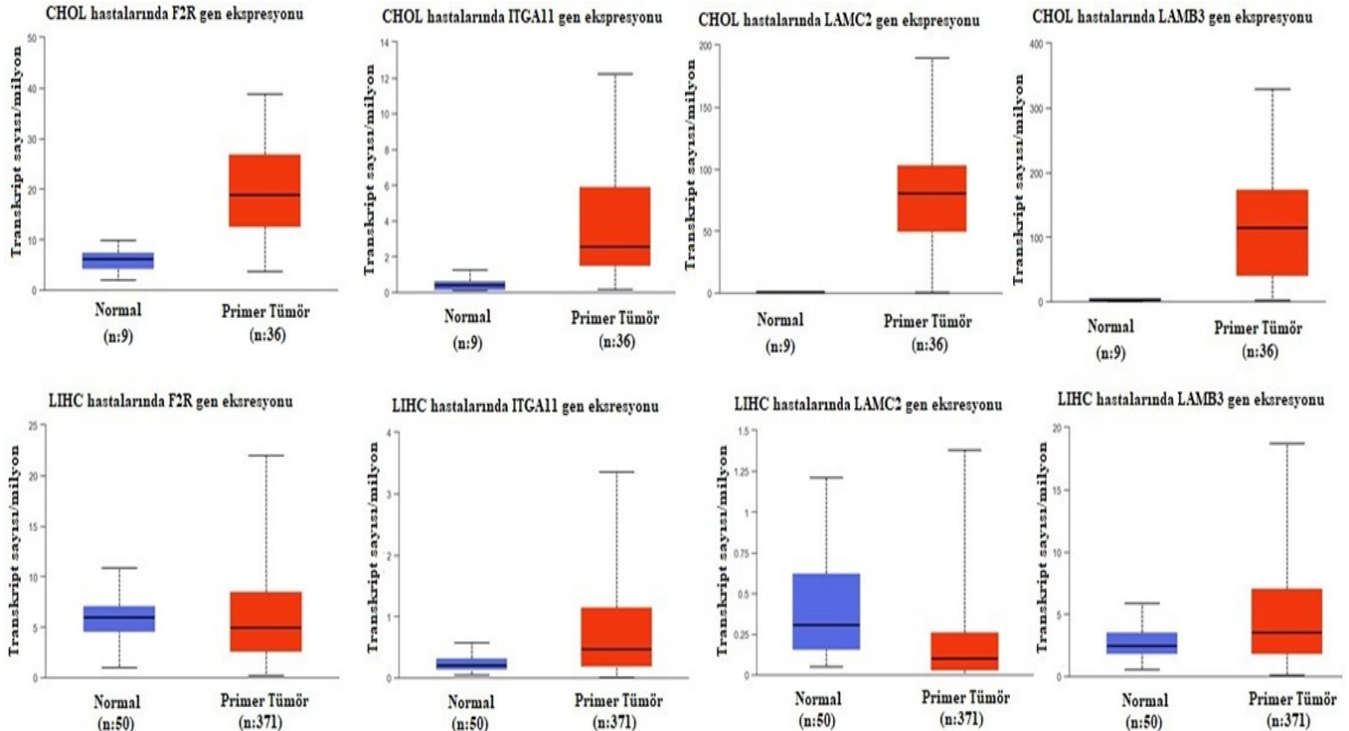
25	PLP2	proteolipid proteini 2
26	POSTN	periostin
27	PTK7	protein tirozin kinaz 7 (inaktif)
28	RUNX1	RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 1
29	SPINT1	serin peptidaz inhibitörü, Kunitz tip 1
30	SPON2	spondin 2
31	SULF1	sülfataz 1
32	UNC5B	unc-5 netrin reseptörü B



Şekil-1 Kolanjiyokarsinoma Hastalarına Özgü Upregüle Olan Genlerin İlişkili Olduğu Biyolojik Yolaklar

Tablo-3B Kolanjiyokarsinoma Hastalarına Özgü Upregüle Olan Genler ve İlişkili Olduğu Biyolojik Yolaklar

Zenginleştirme FDR	Gen Sayısı	Yolak Genleri	Kat Zenginleştirme (Fold enrichment)	Biyolojik Yolak	Genler
0.012575211	3	88	24.37606534	ECM-reseptör etkileşimi	ITGA11, LAMB3, LAMC2
0.023975095	4	354	8.079449153	PI3K-Akt sinyal yolu	F2R (PAR1), ITGA11, LAMB3, LAMC2



Şekil-2 F2R, ITGA11, LAMC2 ve LAMB3 Genlerinin TCGA veri tabanından elde edilen CHOL ve LIHC hastalarındaki Ekspresyon Düzeylerinin Tespiti TCGA UALCAN veri tabanına gen yoğunluk verileri girilmiş CHOL ve LIHC hastalarında ilgili genlerin sağlıklı dokuya

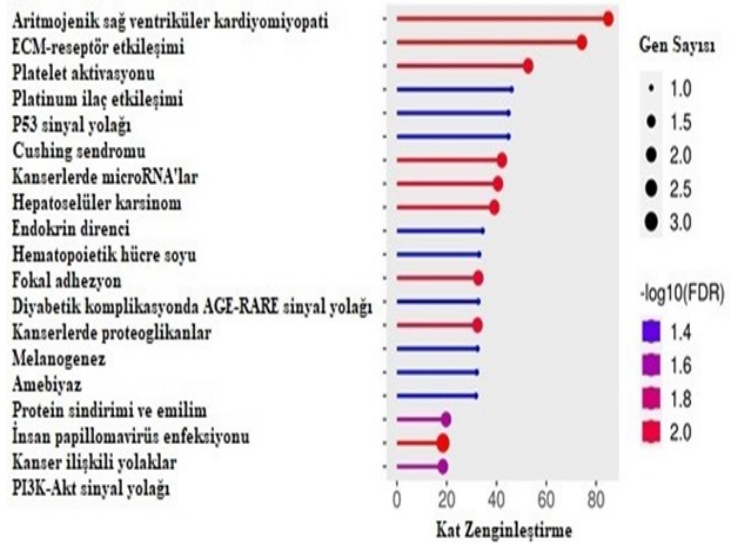
göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde farklı olduğu gösterilmiştir. Kırmızı bar: tümör örneği; mavi bar: normal doku. (p<0.01 olarak kabul edilmiştir.)

3.3 Kolanjiokarsinom ve Hepatoselüler Karsinom Hastalarında Ortak Olarak Upregüle Edilen Genler ve İlişkili Biyolojik Yolaklar

Kolanjiyokarsinom hastalarında hepatoselüler karsinom hastalarından farklı olarak upregüle edilen genler belirlendikten sonra her iki kanserde de ortak olarak upregüle edilen genler de belirlenmiştir ve bu genlerin hepsi protein kodlayan genlerdir (Tablo-4A). Ayrıca gen zenginleştirme analiz sonuçlarına göre ITGA2 ve COL1A1 genleri hem CHOL hem de LIHC’de ekstraselüler matriks (ECM)-reseptör etkileşimi ve PI3K-Akt sinyal yolağında ortak bulunan gen olarak belirlenmiştir (Tablo-4B, Şekil-3). Belirlenen COL1A1 ve ITGA2 genlerin CHOL kanserlerinde net bir şekilde ve anlamlı düzeyde upregüle olduğu TCGA örneklerinde de gösterilmiştir. Bunun yanı sıra anlamlı düzeyde de olsa aynı genler LIHC hastalarında görece CHOL hastalarına göre çok daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir (Şekil 4A, B, C, D). Çalışmamızda CHOL ve LIHC hastalarının gen yoğunluk verilerinin kullanılarak yapılan DEG analizlerinden elde edilen kat değişimi (\log_2FC -fold change) değerlerine göre ITGA2 geni iCHOL, eCHOL ve LIHC hastalarında hasta olmayan bireylere göre sırasıyla 3.042, 0.70, ve 1.72 kat artış göstermiştir. Bunun yanı sıra COL1A1 geni de benzer bir şekilde eCHOL ve LIHC hastalarında hasta olmayan bireylere göre sırasıyla 4.49, 0.78, ve 1.59 kat artış göstermiştir. Sonuçlarımız TCGA hastalarının gen yoğunluk verilerinin kullanılarak yapılan analiz sonuçları ile tutarlıdır ve benzerdir.

Tablo-4A Kolanjiyokarsinom ve Hepatoselüler Karsinom Hastalarında Ortak Olarak Upregüle Edilen Genler

Sayı	LIHC, iCHOL ve eCHOL ortak upregüle edilen genler	Genin Açıklaması
1	SOX4	SRY (Cinsiyeti Belirleyen Bölge Y)-Box 4
2	VCAN	versikan
3	LEF1	lenfoid arttırıcı bağlama faktörü 1
4	CDKN2A	sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
5	COL1A1	Kolajen tip I alpha 1 zinciri
6	ITGA2	integrin alt birimi alfa 2
7	UBE2C	ubikuitin konjuge edici enzim E2 C



Şekil-3 Kolanjiyokarsinom ve Hepatoselüler Karsinom Hastalarında Ortak Olarak Upregüle Olan Genlerin İlişkili Olduğu Biyolojik Yolaklar

4. Tartışma

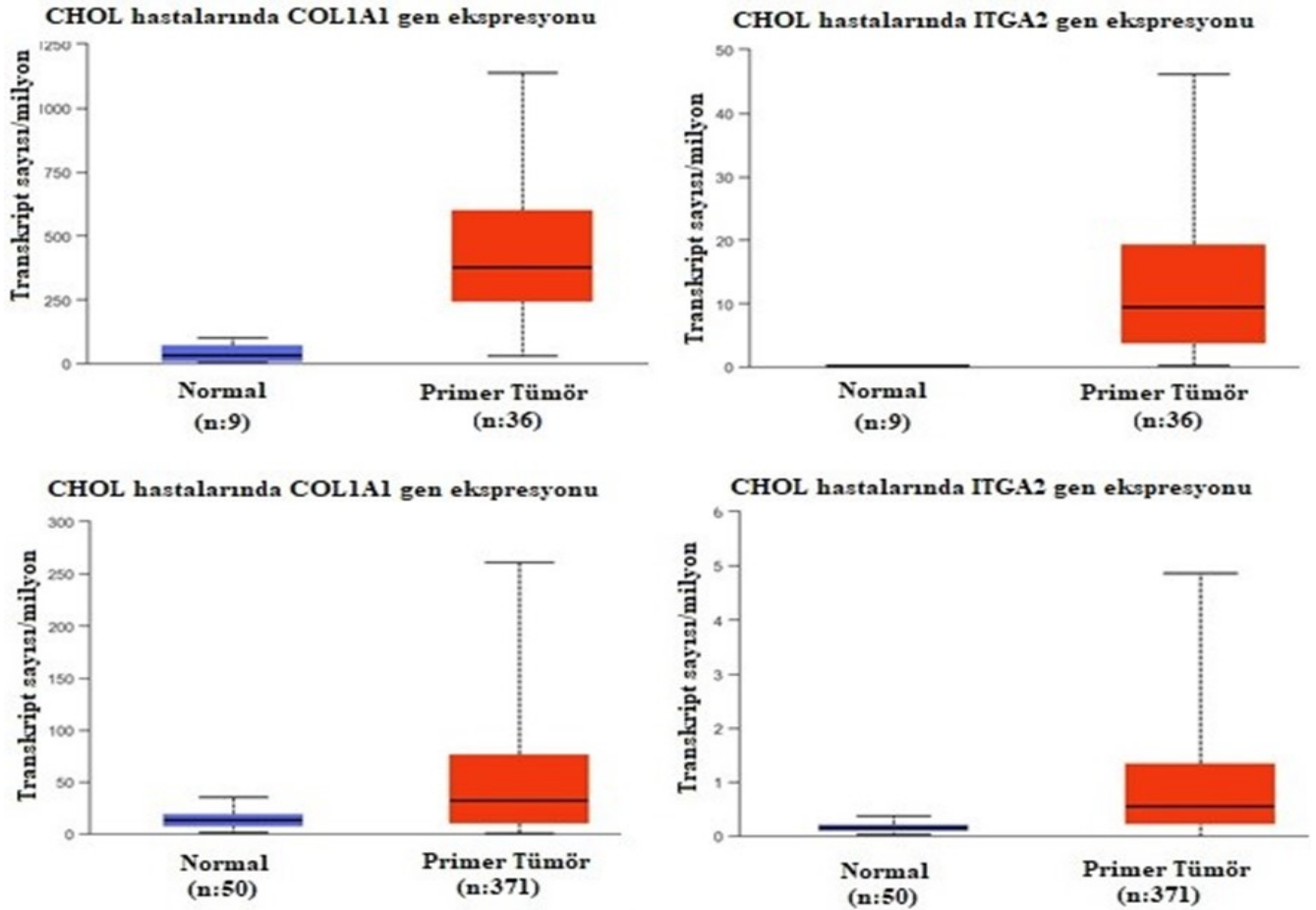
Kolanjiyokarsinom tanısı sırasında radyolojik görüntüleme kısıtlılıklar mevcuttur ve biyopsi ile tanı yöntemi gibi invaziv tanı yöntemleri dışında etkin, özgün ve erken bir tanı yöntemi geliştirilmesi zorunlu hale gelmektedir. Kolanjiyokarsinom kanserlerinde ekspresyon düzeyinde kanserli olmayan doku ile karşılaştırıldığında farklılaşan aday biyomarker genlerin tespit edilmeye çalışıldığı biyoinformatik tabanlı çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmalar genellikle CHOL’e özgü genlerin belirlenmesine odaklanmış olup, bizim bilgimize göre CHOL’ün LIHC’tan farklı olarak ve LIHC ile ortak olarak upregüle edilen genlere vurguda bulunan çalışma sayısı kısıtlıdır. Ayrıca literatürde intrahepatik ve ekstrahepatik kolanjiyokarsinom için ortak upregüle genlerin belirlendiği çalışmalar da sınırlı sayıdadır. Bu açıdan çalışmamız özgündür ve CHOL-LIHC arasındaki tanısal karışıklığı da ortadan kaldırmaya yöneliktir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre kolanjiokarsinom hastalarında hepatoselüler karsinom hastalarından farklı olarak upregüle olduğu tespit edilen 32 adet protein kodlayan gen mevcuttur. Bu genler ile gen zenginleştirme analizleri yapıldığında işaret edilen kanserleşme ile ilgili olan biyolojik yolaklar PI3K-Akt sinyal yolağı ve ekstraselüler matriks (ECM)-reseptör etkileşimidir. Bu biyolojik yolaklar kolanjiyokarsinom hastalarında LIHC hastalarından farklı olarak F2R (PAR1), ITGA11, LAMC2, LAMB3 genleri tarafından aktive edilmektedir.

Tablo-4B Kolanjiyokarsinoma ve Hepatoselüler Karsinoma Hastalarında Ekstraselüler Matris Reseptör Etkileşimi ve PI3K-Akt Sinyal Yolağına Özgü Belirlenen Genler

Zenginleştirme FDR	Gen Sayısı	Yolak Genleri	Kat Zenginleştirme (Fold enrichment)	Biyolojik Yolak	Genler
0.007128	2	88	74.28896	ECM-reseptör etkileşimi	COL1A1, ITGA2
0.022941	2	354	18.46731	PI3K-Akt sinyal yolu	COL1A1, ITGA2

bulguları ile benzerdir. Bir diğer çalışmada ise Xiao



Şekil-4 ITGA2 ve COL1A1 Genlerinin TCGA veritabanından elde edilen CHOL ve LIHC hastalarındaki Ekspresyon Düzeylerinin Tespiti
TCGA UALCAN veritabanına gen yoğunluk verileri girilmiş CHOL ve LIHC hastalarında ilgili genlerin sağlıklı dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde farklı olduğu gösterilmiştir. Kırmızı bar: tümör örneği; mavi bar: normal doku. ($p < 0.01$ olarak kabul edilmiştir.)

Shen H. ve ark. 2022 yılında gerçekleştirdiği çalışmalarında NCBI GEO veritabanını kullanarak CHOL hastalarında upregüle ve downregüle genleri belirlemiştir [12]. Bizim çalışmamızda iCHOL-eCHOL ortak olarak tespit edilen upregüle genler arasında sadece LAMC2 geni Shen H ve ark.

Y. ve ark. 2022 intrahepatik kolanjiyokarsinom hastalarında farklı şekilde eksprese edilen genleri tespit etmişlerdir ve bizim çalışmamızda iCHOL hastalarında upregüle edildiğini tespit ettiğimiz genler arasında sadece SPP1, COL1A2, VCAN genleri Xiao Y ve ark çalışmaları ile ortak tespit edilen genlerdir [13]. Ayrıca Joseph N.M. ve ark. çalışmalarında kombine LIHC-CHOL hastalarında laboratuvar bazlı çalışmalar sonucunda intrahepatik CHOL ve LIHC hastalarındaki genler tespit edilmiştir [14]. Bunun yanı sıra Mok S.R. ve ark. örneğin yine bifenotipik LIHC-CHOL hepatic neoplazm söz konusu olduğunda biyoinformatik temelli analizlerden çok GeneCards® (<http://www.genecards.org>) websitesinden hastalığa özgü birçok biyolojik yolak ve gen tespitinde bulunmuştur [15]. İntrahepatik ve ekstrahepatik

CHOL hastalarında ortak olarak tespit edilen genetik alterasyonlar (mutasyonlar, amplifikasyonlar ve füzyonlar) ve hali hazırda bu mutasyonları hedefleyen ilaç ve kimyasallar Normanno N. ve ark. özetlediği derleme makalede açıklanmaktadır [16]. Çalışmamızda genetik alterasyonlardan farklı olarak gen ekspresyon düzeylerine odaklanılmıştır ve hasta bireylerde sağlıklı kişilerden farklı olarak upregüle edilen genlerin baskılanmasını hedefleyen ajanların tespiti ve mevcut kullanımda olan ilaçlarla uygun olan kombinasyonu ile mortalitesi yüksek olan ve teşhis edildiğinde genellikle ileri seviyelerde olan bu hastalığın tedavi etkinliği yükseltilebilecektir.

Çalışmamızda ayrıca kolanjiokarsinom ve hepatoselüler karsinom hastalarında ortak olarak 7 adet genin upregüle olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu genler ile gen zenginleştirme analizleri yapıldığında ortaya çıkan biyolojik yollar benzer şekilde CHOL'e özgü genlerin ilişkili olduğu biyolojik yollar olan PI3K-Akt sinyal yolağı ve ekstraselüler matriks (ECM)-reseptör etkileşimidir ve bu biyolojik yollar ile ilişkilendirilen genler ise protein kodlayan ITGA2 ve COL1A1 genleridir.

Örneğin, 2022 yılında Kutlu A. ve ark. kolanjiyokarsinom ve alt tiplerinin (eCHOL ve iCHOL) tanısında umut vaad eden kanser biyomarker genlerin DEG analizleri ile tespit etmeye çalışıldığı çalışmalarında biyolojik yolların tek tek genlere odaklanmaktan çok daha önem arz ettiğini savunulmuştur [17]. Çalışmalarında iCHOL ve eCHOL kanserlerinde ortak olarak tetiklenen beş biyolojik yolak tespit edilirken ortak olarak *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinin potansiyel biyomarker genler olduğunu savunmuşlardır. Bizim çalışmamızda Kutlu A. ve ark. çalışmasından farklı olarak her iki CHOL alt tipinde ortak olarak tespit edilen 32 genin (fold change 1.5 ve üstü kabul edildiğinde) arasında *COL1A1* geni mevcut iken ve *COL1A2* geni mevcut değildir. Ayrıca çalışmamızda *COL1A1* geninin CHOL ve LIHC hastalarında ortak bir şekilde upregüle olduğu gösterilmiştir. Örneğin, hem hücre kültürü çalışmalarının hem de mikrodizi ve RNAseq analizlerinin gerçekleştirildiği başka bir çalışmada, ise yüksek düzeyde eksprese edilen *COL1A1* geninin LIHC kanserlerinin erken gelişiminde ve metastatik süreçlerinde önemli bir biyobelirteç olduğu tespit edilmiştir [18].

Rattanasinchai C. ve ark. 2022 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada iCHOL hücre hatlarında laboratuvar destekli deneyler sonucunda ve hasta gen yoğunluk verileri kullanılarak biyoinformatik bazlı analizlerle bitişik normal dokularla karşılaştırıldığında ITGA2 gen ekspresyon düzeylerinin yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir [19]. ITGA2 geni kollajen bağlayıcı integrin $\alpha 2$ 'yi kodlayan bir gen dir ve yüksek ITGA2 ekspresyonunun intrahepatik kolanjiyokarsinomun kollajen tip I kaynaklı klonojenik büyümesini

desteklediğinin gösterildiği bu çalışmanın bulguları bizim sonuçlarımız ile uyumlu olmak ile birlikte ITGA2 geninin bizim çalışmamızda sadece iCHOL değil eCHOL ve LIHC kanserlerinde de ortak bir şekilde yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiştir. ITGA2 geninin overekspresyonu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da periferik safra kanalları boyunca ortaya çıkan ve sıklıkla hücre dışı matrislerin (ECM'ler) yüksek olduğu bir tümör mikro ortamı (TME) ile birlikte görülen kolanjiyokarsinomda ECM-reseptör etkileşimi ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra Rattanasinchai C. ve ark. çalışmalarında COL1A1 ve COL1A2 genlerinin de iCHOL hastalarında ITGA2 genine benzer olarak normal dokuya göre daha yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermiştir [19].

Özet olarak, literatürde CHOL kanserlerine özgü hem laboratuvar hem de biyoinformatik temelli çalışmalar ile biyobelirteç genler belirlenmeye çalışılmış olsa da çalışmamızda vurgulanan CHOL (iCHOL ve eCHOL) kanserlerinde LIHC kanserlerinden farklı ve LIHC kanser hastaları ile ortak şekilde ekspresyon düzeyleri gösteren genler hakkında gerçekleştirilen çalışma sayısı kısıtlıdır. Çalışmalarımız ileri klinik ve laboratuvar çalışmaları ile desteklendikten sonra söz konusu genlerin hedeflendiği ilaç çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

5. Sonuç

CHOL ve LIHC kanserlerinde PI3K-Akt sinyal yolağı ve Ekstraselüler matriks (ECM)-reseptör etkileşiminin önemi çalışmamızda vurgulanmaktadır ve bu iki biyolojik yolak her iki kanser çeşidinde de ortak olarak işaret edilen yollar olarak tespit edilmiştir. Her iki biyolojik yolak ortak olarak her iki kanserin gelişiminde ve aşamalarında anlamlı olarak bulunsa da farklı genler tarafından tetiklenmeleri kanserleri genler düzeyinde indirgemenin daha doğru bir yaklaşım olduğunu göstermektedir. Klinikte CHOL kanserlerinin LIHC kanserinden ayırt edici tanısının zor olması sebebiyle çalışmamızda LIHC kanserlerinden farklı olarak CHOL kanser hastalarında tespit edilen ITGA11, LAMB3, LAMB3 ve F2R genlerinin önemi büyüktür ve ileri çalışmalar ile bu genlerin ayırt edici tanısal gücü teyit edilmelidir. Bunun yanı sıra aynı yollarda rol alan COL1A1 ve ITGA2 genleri de ortak tanı konusunda gelecek vaad eden genler arasındadır ve klinik ve laboratuvar tabanlı analizler ile test edilmelidir.

Referanslar

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

2. Aloia T., Pawlik T.M., Taouli B., et al. Intrahepatic bile ducts. In: AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed, Amin MB (Ed), AJCC, Chicago. 2017, p.295.
3. Khan S.A., Tavolari S., Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver Int.* 2019, 39 Suppl 1:19-31. doi: 10.1111/liv.14095.
4. Shin D.W., Moon S.H., Kim J.H. Diagnosis of Cholangiocarcinoma. *Diagnostics (Basel)*. 2023, 8;13(2):233. doi: 10.3390/diagnostics13020233.
5. Panjala, C., Sénécal, D., Bridges, M.D., Kim, G.P., Nakhleh, R.E., Nguyen, J.H., ve ark. The Diagnostic Conundrum and Liver Transplantation Outcome for Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma. *American Journal of Transplantation* 2010, 10: 1263–126. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03062.x
6. Choi J.H., Ro J.Y. Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma: An Update on Pathology and Diagnostic Approach. *Biomedicines*. 2022, 10(8):1826. doi: 10.3390/biomedicines10081826.
7. Huang J.L., Sun Y., Wu Z.H., Zhu H.J., Xia G.J., Zhu X.S., ve ark. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma based on spatial and channel attention mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2023, 149(12):10161-10168. doi: 10.1007/s00432-023-04935-4.
8. Ponnoprat D., Inkeaw P., Chaijaruwanich J., Traisathit P., Sripan P., Inmutto N., et al. Classification of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma based on multi-phase CT scans. *Med Biol Eng Comput.* 2020, 58(10):2497-2515. doi: 10.1007/s11517-020-02229-2.
9. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, ve ark. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(7), e47–e47. doi: 10.1093/nar/gkv00
10. Chandrashekar D.S., Karthikeyan S.K., Korla P.K., Patel H., Shovon A.R., Athar M., ve ark. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*. 2022, 25:18-27. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.001.
11. Ge S.X., Jung D., Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, 2020, 8(36):2628–2629, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
12. Shen H., Bai X., Liu J., Liu P., Zhang T. Screening potential biomarkers of cholangiocarcinoma based on gene chip meta-analysis and small-sample experimental research. *Front Oncol.* 2022, 10;12:1001400. doi: 10.3389/fonc.2022.1001400. PMID: 36300097; PMCID: PMC9590411.
13. Xiao Y., Zhang B., Cloyd J.M., Alaimo L., Xu G., Du S., ve ark. Novel Drug Candidate Prediction for Intrahepatic Cholangiocarcinoma via Hub Gene Network Analysis and Connectivity Mapping. *Cancers (Basel)*. 2022, 5;14(13):3284. doi: 10.3390/cancers14133284.
14. Joseph N.M., Tsokos C.G., Umetsu S.E., Shain A.H., Kelley R.K., Onodera C., ve ark. Genomic profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals similar genetics to hepatocellular carcinoma. *J Pathol.* 2019, 248(2):164-178. doi: 10.1002/path.5243.
15. Mok S.R., Mohan S., Grewal N., Elfant A.B., Judge T.A. A genetic database can be utilized to identify potential biomarkers for biphenotypic hepatocellular carcinoma-cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2016, 7(4):570-9. doi: 10.21037/jgo.2016.04.01.
16. Normanno N., Martinelli E., Melisi D., Pinto C., Rimassa L., Santini D., ve ark. Role of molecular genetics in the clinical management of cholangiocarcinoma. *ESMO Open*. 2022, 7(3):100505. doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100505.
17. Kutlu A., Arda M., Atak E., Ulukaya E. Identification of key genes and pathways for cholangiocarcinoma using an integrated bioinformatics analysis *Int J Med Biochem* 2022, 5(3):137-151 doi: 10.14744/ijmb.2022.18199
18. Ma H.P., Chang H.L., Bamodu O.A., Yadav V.K., Huang T.Y., Wu A.T.H., ve ark. Collagen 1A1 (COL1A1) Is a Reliable Biomarker and Putative Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinogenesis and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2019, 7;11(6):786. doi: 10.3390/cancers11060786.
19. Rattanasinchai C., Navasumrit P., Ruchirawat M. Elevated ITGA2 expression promotes collagen type I-induced clonogenic growth of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep.* 2022, 27;12(1):22429. doi: 10.1038/s41598-022-26747-1.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

