

Hepatit-B virüs ilişkili hepatosellüler karsinomda tümöral glipikan 3 mRNA seviyesinin diagnostik ve prognostik biyobelirteç olabilme potansiyelinin entegratif transkriptomik meta-analiz ve biyoinformatik ile değerlendirilmesi

Evaluation of tumoral glypican 3 mRNA level as a diagnostic and prognostic biomarker for hepatitis-b virus-associated hepatocellular carcinoma by an integrative transcriptomic meta-analysis and bioinformatics

Sevcan Atay 

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı HBV-ilişkili hepatosellüler kansinom hastalarında tümöral GPC3 mRNA seviyesinin diagnostik ve prognostik biyobelirteç olabilme potansiyelinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokularına göre HBV-ilişkili HCC tümör dokularında GPC3 mRNA ekspresyonu entegratif transkriptomik meta-analiz yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar farklı bir hasta kohortunda valide edildi ve GPC3 mRNA seviyesi ile klinik değişkenler arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgular: Meta-analize 4 farklı veri setinden (GSE19665;GSE84402;GSE121248;GSE55092) HBV-ilişkili hepatosellüler karsinom dokuları (n=61) ile eşlenik tümör içermeyen dokulara (n=61) ait transkriptomik veriler dahil edildi. GPC3 mRNA seviyesinin eşlenik dokulara göre tümörde daha yüksek olduğu bulundu (kat değişimi=12,88; p=0; FDR=0). Sonuçlar GSE14520 veri setinde (HBV-ilişkili HCC tümör (n)=203; eşlenik non-tümöral doku (n)=203) valide edildi (log-kat değişimi= 4,82; adj.p=1, 43 E-79). ROC analizi sonucunda GPC3 mRNA seviyesinin tümör dokularını tümör içermeyen eşlenik karaciğer dokularından yüksek spesifite ve sensitivite ile ayırabildiği bulundu (n=203; AUC=0,9108; %95CI=0,08792-0,9424; p<0,0001). Tümöral GPC3 mRNA seviyesi ile hastalarda genel sağkalım (HR (logrank)= 0,81; %95CI=0,5223-1,2771; p= 0,3663), 3 yıl içinde rekürrens gelişimi (p=0,5793) ya da erken (<1 yıl) ve geç rekürrens (>3 yıl) (p= 0,9950) arasında bir ilişki bulunmadı. Çok-değişkenli Cox orantılı tehlikeler regresyon analizleri sonucunda da GPC3 mRNA seviyesi ile genel sağkalım arasında bir ilişki bulunmadı. Yüksek GPC3 mRNA seviyesi yüksek serum AFP seviyesi, küçük tümör boyutu ve aktif viral replikasyon ile ilişkili bulundu. GPC3 mRNA seviyesi CLIP evre 0'a göre evre 1'de daha yüksekti, fakat TNM ve BCLC evreleme arasında ilişki yoktu.

Sonuç: Çalışma sonuçları HBV-ilişkili HCC ve yakın tümör içermeyen karaciğer doku ayırımında GPC3 mRNA seviyesinin yüksek spesifite ve sensitivite ile iş görebilecek bir diagnostik biyobelirteç olma potansiyelinin oldukça yüksek, fakat prognostik bir biyobelirteç olabilme potansiyelinin düşük olduğunu önermektedir.

Anahtar Sözcükler: Hepatit B virüsü, hepatosellüler karsinom, glipikan 3, GPC3, biyobelirteç.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to evaluate the potential of GPC3 mRNA level as a diagnostic and prognostic biomarker for HBV-associated HCC.

Materials and Methods: GPC3 mRNA expression in HBV-associated HCC tumor tissues compared to matched adjacent tissues was evaluated by integrative transcriptomic meta-analysis. The results were validated in a different patient cohort and the possible associations between GPC3 mRNA level and the clinical variables were evaluated.

Sorumlu yazar: Sevcan Atay
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye
E-posta: sevcan.atay@hotmail.com
Başvuru tarihi: 31.08.2021 Kabul tarihi: 10.01.2022

Results: Transcriptomic data of HBV-associated HCC tissues (n=61) and matched adjacent tissues (n=61) from four datasets (GSE19665;GSE84402;GSE121248;GSE55092) were included in the meta-analysis. GPC3 mRNA level was found to be higher in tumors than adjacent tissues (fold change=12.88; p= 0;FDR=0). The result was validated in GSE14520, (HBV-associated HCC(n)=203; matched adjacent tissue(n)=203), (log-fold-change= 4.82; adj.p=1.43E-79). It was found that GPC3 mRNA level could distinguish HCC from adjacent tissues with high specificity and sensitivity (AUC=0.9108;95%CI=0.08792-0.9424;p<0.0001). There was no association between tumoral GPC3 mRNA level and overall survival (HR (logrank)=0.81;95%CI=0.5223-1.2771;p=0.3663), recurrence within 3 years (p=0.5793), and early, or late recurrence (p= 0.9950). Multivariate Cox proportional hazards regression analyzes also found no association between GPC3 mRNA level and overall survival. High GPC3 mRNA level was associated with high serum AFP level, small tumor size and active viral replication. GPC3 mRNA level was higher at stage 1 than CLIP stage 0 but showed no association with TNM and BCLC staging.

Conclusion: The results of the study suggest that the GPC3 mRNA level has the potential to be a diagnostic biomarker that can work with high specificity and sensitivity in differentiating between HBV-associated HCC and adjacent tissues. However, its potential to be a prognostic biomarker is low.

Keywords: Hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, glypican 3, GPC3, biomarker.

GİRİŞ

Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğer tümörlerinin %90'ını oluşturur ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir (1). Çoğu durumda, hastalığın ileri evrelerde teşhis edilmesi, hastaların tedavi seçeneklerinden elde edeceği faydayı sınırlayan ve hastaların hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde azaltan bir faktördür (1). Hepatit B (HBV) hastalarında enfekte hepatositlerden virüsün intrahepatik kovalent olarak kapalı dairesel DNA'sının antiviral tedavi ile elimine edilememesi, bu hastalarda tedavi sonrasında siroza ve HCC'ye progresyon gözlenebilmesine sebep olabilmektedir (2, 3). Bu sebeple, HBV hastalarında HCC gelişiminin düzenli takibinin gerçekleştirilebilmesi için güvenilir erken tanı biyobelirteçlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Glypican 3 (GPC3) klinikte immünohistokimya (IHC) yöntemi pozitif boyamasının HCC tanısına yardımcı olduğu bilinen bir biyobelirteçtir (4). Karaciğer biyopsilerinin IHC ile değerlendirilmesi karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilse de, GPC3 immünreaktivitesinin fokal olabileceği ve hepatoselüler karsinomun oldukça yüksek intratümöral heterojeniteye sahip olması nedeniyle biyopsi örneklerinde negatif boyamanın HCC diagnozunu dışlayamayacağı belirtilmiştir (5). Kronik hepatit B yönetimi için daha hassas ve güvenilir biyobelirteç analizlerine duyulan ihtiyaç devam etmektedir.

Mesajcı RNA seviyesinde gerçekleştirilen moleküler analizler histopatolojik incelemeye

kiyasla kantitatif ve daha hassas sonuç verebilmeleri açısından avantajlı yöntemlerdir. Bu çalışmada, kamusal veri bankalarından elde edilen transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak hepatit B virüsü ilişkili hepatoselüler karsinom hastalarında tümöral GPC3 mRNA seviyesinin diagnostik ve prognostik biyobelirteç olabilme potansiyeli literatürde ilk kez değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gene Expression Omnibus Veri Kümelerinin Seçimi

Bu çalışmada NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veri bankasında depolanan transkriptomik veriler kullanılmıştır. NCBI Gene Expression Omnibus (GEO), hepatoselüler karsinom dokularına ait transkriptomik verileri içeren veri setleri açısından taranmıştır. İnküzyon kriterleri; i) insan kaynaklı hepatoselüler karsinom tümör dokuları ve bu dokulara eşlenik komşu tümör içermeyen karaciğer dokuları, ii) hastalığın etiolojisinin hepatit B virüs enfeksiyonu olduğu kesin olarak belirtilmiş örnekler, iii) kullanılan arraylerin standart platformlara ait olması ve iv) mikroarraylerin tek kanallı olması olarak belirlenmiştir.

Ham Verilerin Ön İşlenmesi ve Array Kalite Kontrolü

Çalışma grubuna dahil edilecek olan veri kümelerine ait ham transkriptomik verileri içeren sinyal yoğunluğu dosyaları indirilmiştir. Her bir veri setine ait ham veriler GEAP (Gene Expression Analysis Platform Versiyon 0.4.0)

yazılımına yüklenerek Affymetrix Expresso algoritması ile normalize edilmiştir.

RMA normalize log₂ sinyal yoğunluklarını içeren normalize gen ekspresyon matrisi dosyaları ExAtlas yazılımı kullanılarak ExAtlas klavuzuna uygun olarak ve önceden bildirdiğim şekilde veri kalitesi değerlendirmesine tabi tutulmuştur (6, 7).

GPC3 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Entegratif Transkriptomik Meta-Analiz ile Değerlendirilmesi

GPC3 mRNA seviyesinin HBV ilişkili HCC dokularında eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokularına göre değerlendirilebilmesi için entegratif transkriptomik meta-analiz önceki çalışmamda uyguladığım protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi (7). Modifikasyonların da dahil olduğu meta-analiz protokolünü gerçekleştirmek için öncelikle kalite kontrol aşamasını geçemeyen veriler çalışma dışında bırakılmıştır. Kalite kontrol aşamasını geçen verileri içeren RMA normalize log₂ tabanındaki normalize sinyal yoğunluğu dosyaları ExAtlas yazılımına yükledikten sonra ExAtlas programının bir opsiyonu olan her bir veri setinde her bir gen için en iyi prob bırakılmıştır. Meta-analizi gerçekleştirmek için çalışmalar arasındaki heterojenliğin varyansını hesaba katan rastgele etkiler (Random effects model) yöntemi kullanıldı. Transkriptomik meta-analizde her bir tümör dokusuna ait gen ekspresyon profili, komşu eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusuna ait profil ile çift karşılaştırması yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Yanlış keşif oranı (FDR) 0,05'ten az ve gen ekspresyonundaki değişiklik ≥ 2 kat anlamlı kabul edildi. Analiz sonucu GPC3 mRNA seviyesi için sınırlandırıldı ve etki kombine kat değişikliği olarak sunuldu.

Eksternal Validasyon Grubu ve ROC Analizi

Validasyon analizi NCBI GEO2R ile gerçekleştirildi. Benjamini & Hochberg (yanlış keşif oranı, FDR) düzeltilmesi uygulanmış p değeri (adj. p) 0,05'ten az ve gen ekspresyonundaki değişiklik ≥ 2 kat anlamlı kabul edildi. ROC (receiver operating characteristic curve) analizi Graphpad Prism 8.0.1 programı ile gerçekleştirildi. Analizde 209220_at probuna ait RMA normalize log₂ tabanında sinyal yoğunlukları kullanıldı.

GPC3 mRNA Seviyesinin HBV-ilişkili Hepatosellüler Karsinom Hastalarında Prognostik Değeri

GPC3 tümöral mRNA ekspresyonunun HBV-ilişkili HCC hastalarında genel sağkalım üzerine etkisi Log-rank (Mantel-Cox) testi ile gerçekleştirildi. Hasta grubu GPC3 mRNA seviyesi baz alınarak düşük ve yüksek ekspresyon olmak üzere iki gruba ayrıldı. %95 güven aralığı (%95 CI), yüksek ekspresyona göre değerlendirilmiş tehlike oranı (HR) ve p değeri hesaplanarak Kaplan-Meier hayatta kalma grafiğinde gösterildi.

GPC3 tümöral mRNA ekspresyonunun HBV-ilişkili HCC hastalarında iki grup arasında farklılık gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Birden fazla hasta grubundaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis Dunn's multiple comparisons test ile gerçekleştirildi. GPC3 mRNA seviyesi ile ilişkili bulunan klinik parametreler ve GPC3 mRNA seviyesinin genel sağkalım üzerine etkilerinin belirlenmesi için tek değişkenli Cox orantılı tehlikeler regresyon analizi gerçekleştirildi. GPC3 mRNA seviyesinin ilişkili bulunduğu klinik parametreler göz önüne alındığında tehlike oranını tahmin etmek için çok değişkenli bir analiz yapıldı. Cox orantılı tehlikeler regresyon analizleri XLSTAT ile diğer tüm istatistiksel analizler ise Graphpad Prism 8.0.1 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm analizlerde p değerinin 0,05'ten az olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

GPC3 mRNA seviyesi HBV-ilişkili HCC tümör dokularında yakın eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokularına göre daha yüksektir

Çalışmaya dahil edilen veri kümeleri Tablo-1'de gösterilmiştir. Entegratif transkriptomik meta-analize 4 farklı veri setinden (GSE19665 (8), GSE84402 (9), GSE121248 (10), GSE55092 (11)) kalite kontrolünden geçen HBV-ilişkili hepatosellüler karsinom dokuları (n=61) ile eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokularına (n=61) ait transkriptomik veriler dahil edildi. Meta-analiz sonucunda GPC3 mRNA seviyesinin tümör dokularında yakın tümör içermeyen karaciğer dokularına göre 12,883 kat daha yüksek olduğu belirlendi (p=0, FDR=0).

Tablo-1. Çalışmaya dahil edilen transkriptomik veri setleri.

	GEO ID	Platform	Tümör ve eşlenik doku çifti (n)	Referans
Entegratif Transkriptomik Meta-Analize Dahil Edilen Veri Setleri	GSE19665	Affymetrix Human Genome U133 Plus	5	(8)
	GSE84402	2.0 Array	13	(9)
	GSE121248		37	(10)
	GSE55092		6	(11)
Validasyon ve Prognostik Analizler için kullanılan Veri Seti	GSE14520 (LCS Kohort 2)	Affymetrix HT Human Genome U133A Array	203	(12)

Tablo-2. GSE14520 veri setinden çalışmanın inklüzyon kriterlerine uyan ve çalışmaya dahil edilen hastalara ait klinik değişkenler.

Değişkenler	Kategoriler	Yüzde (%) ya da Ort. ± St.D.
Etiyoloji	HBV	100
Cinsiyet	K	12.808
	E	87.192
Yaş	-	50.754 ± 10.586
HBV Aktif Viral Replikasyon	Evet (AVR-CC)	25.123
	Hayır (CC)	74.877
ALT(>/<=50U/L)	Yüksek	40.887
	Düşük	59.113
Ana tümör boyutu (>/<=5 cm)	NA	0.493
	Büyük	34.975
	Küçük	64.532
Multinodüler	Hayır	79.803
	Evet	20.197
Siroz	Hayır	6.897
	Evet	93.103
TNM Evreleme	I	42.857
	II	36.453
	III	1.478
	IIIA	11.330
	IIIB	6.404
	IIIC	1.478
BCLC Evreleme	0	9.360
	A	68.473
	B	10.345
	C	11.823
CLIP Evreleme	0	44.828
	1	33.498
	2	15.271
	3	4.433
	4	1.478
	5	0.493
AFP (>/<=300ng/ml)	NA	1.478
	Yüksek	44.828
	Düşük	53.695

HBV; Hepatit B virüsü, K; kadın, E;erkek, AVR-CC; Aktif viral replikasyonu olan kronik taşıyıcı, CC; kronik taşıyıcı, ALT; serum alanin aminotransferaz, BCLC; Barselona Kliniği Karaciğer Kanseri, CLIP; Karaciğer Kanseri İtalyan Programı, AFP; serum alfa-fetoprotein. Yaş ortalama ± standart sapma, geri kalan değerler total hasta sayısına göre yüzde olarak ifade edilmiştir.

GPC3 mRNA seviyesi HBV-ilişkili HCC için İyi Bir Diagnostik Biyobelirteç Adayıdır

Elde edilen bu anlamlı tümör mRNA yüksekliği ardından GSE14520 veri setinde hepatosellüler karsinom ve yakın tümör içermeyen eşlenik karaciğer dokularına ait transkriptomik verilerini içeren LCS-Kohort 2'de (n=445) (12) valide edilmiştir. Bu grupta gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi sonucunda GPC3 mRNA seviyesinin tümör dokularında (n=203) yakın tümör içermeyen karaciğer dokularına (n=203) göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (logaritmik kat değişimi=4,82, adj. p=1,43E-79).

LCS-Kohort 2 grubunda gerçekleştirilen ROC analizi sonucunda GPC3 mRNA seviyesinin tümör dokularını tümör içermeyen eşlenik karaciğer dokularından yüksek spesifite ve sensitivite ile ayırabildiği bulunmuştur (AUC=0.9108, Std. hata=0.01, %95 CI=0,08792-0,9424, p <0,0001), (Şekil-1).

GPC3 mRNA Seviyesinin HBV-ilişkili Hepatosellüler Karsinom Hastalarında Prognostik Biyobelirteç Olma Potansiyeli Düşüktür

GPC3 mRNA seviyesinin HBV-ilişkili hepatosellüler karsinom hastalarında prognostik değerinin belirlenmesi için LCS-Kohort 2 hasta grubuna ait klinik ve transkriptomik veriler kullanıldı. LCS Kohortundan çalışmaya uygun bulunan ve dahil edilen hastalara ait klinik veriler Tablo-2'de gösterilmektedir.

GPC3 mRNA seviyesi ile HBV-ilişkili HCC hastalarında tanı sonrası genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı (HR (logrank)=0,81, %95 CI= 0,5223-1,2771, p= 0,3663), (Şekil-2). Tanı sonrası 3 yıl içinde rekürans gelişen (n=92) ve gelişmeyen (n=78) hastalar arasında tümör GPC3 mRNA seviyesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.5793), (Şekil-3A). Rekürans gelişen hastalar erken rekürans (n=49) ve geç rekürans gelişen (n=21) olarak iki gruba ayrıldığında aralarında GPC3 mRNA seviyesi açısından bir farklılık gözlenmedi (p= 0.9950), (Şekil-3B).

GPC3 mRNA seviyesinin ana tümör boyutu 5 cm'den küçük/eşit olan tümörlerde 5 cm'den büyük olan tümörlere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu (p=0.0069), (Şekil-4A). Fakat GPC3 mRNA seviyesi ile tümörün multinodüler olması ile bir ilişki bulunmadı (p=0.9535), (Şekil-4B).

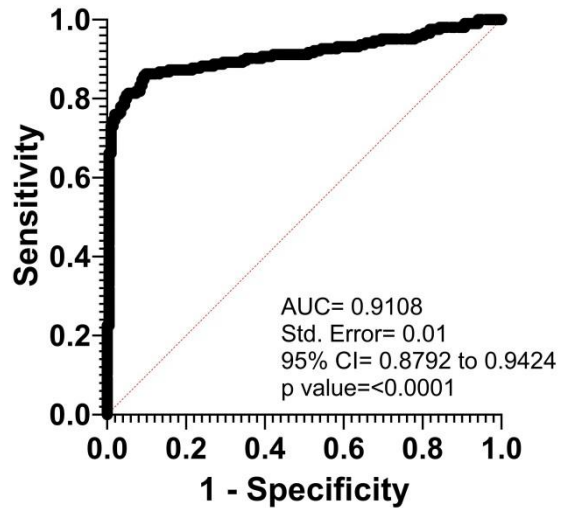
TNM derecelendirmesi I (n=87), II (n=74) ve III (n=42) olan hastalar arasında tümör GPC3 mRNA seviyesi anlamlı bir farklanma göstermedi (p>0.9999), (Şekil-5A). BCLC evrelemesine göre evre 0 (n=19), A (n=139), B (n=21) ve C (n=24) olan hasta gruplarında da benzer şekilde GPC3

mRNA seviyesi gruplar arasında farklı bulunmadı (p>0,05), (Şekil-5B). Hasta sayılarının evre 0 ile B ve C evrelerinde az olduğu göz önüne alınarak analiz evre 0-A (n=158) ve B-C evrelerindeki hastalar (n=45) arasında gerçekleştirildiğinde de bulgu değişmedi (p=0,70), (Şekil-5C).

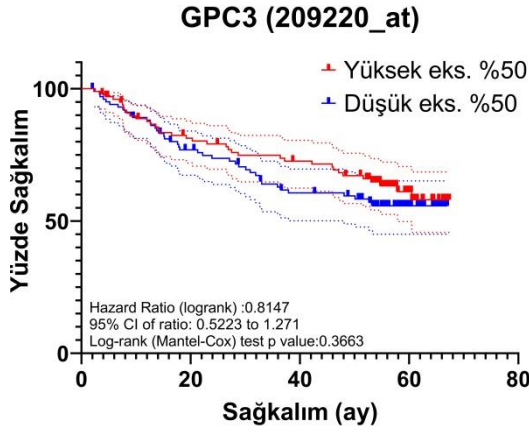
CLIP evrelemesinde hastalar evre 0, 1 ve 2-5 olarak üç gruba ayrıldığında, evre 0'a göre evre 1'de GPC3 mRNA seviyesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (p=0.0489). Fakat CLIP evre 0'a karşı 2-5. evrelerde GPC3 mRNA seviyesi değerlendirildiğinde benzer bir yükseklik gözlenmedi (p=0.2270), (Şekil-5D).

Serum alanin aminotransferaz (ALT) seviyesi 50U/L'den yüksek (n=83) ve düşük (n=120) olan hastalarda tümör GPC3 seviyesi arasında bir farklılık bulunmamışken (p=0.9785), (Şekil-6A), serum alfa-fetoprotein (AFP) seviyesi 300ng/ml'den yüksek olan hasta grubunda (n=91), düşük olan hasta grubuna (n=109) göre tümör GPC3 mRNA seviyesi anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0.0002), (Şekil-6B).

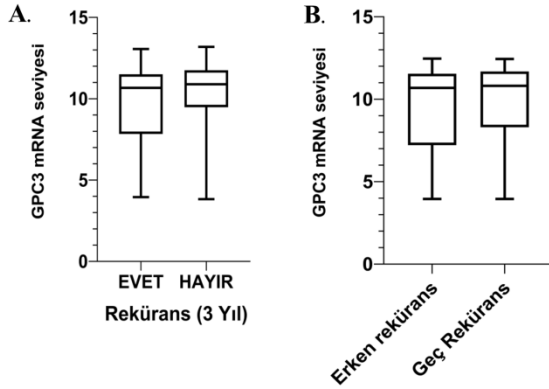
Bunlarla birlikte, viral replikasyon devam eden hastalarda (n=51) kronik taşıyıcı hasta grubuna göre (n=152) tümör GPC3 mRNA seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edildi (p=0.0495), (Şekil-6C).



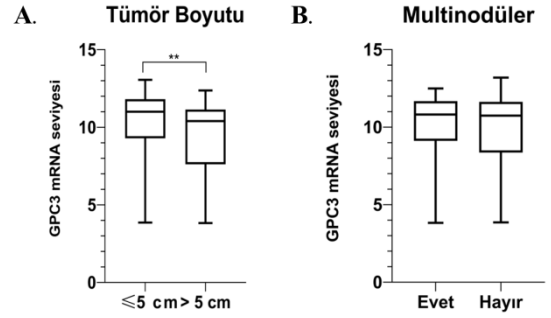
Şekil-1. Grafikte gösterilen ROC eğrisi, tümör GPC3 mRNA seviyesinin HBV-ilişkili hepatosellüler kanser dokularını eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokularından ayırt etmedeki diagnostik etkinliğini değerlendirmektedir. ROC eğrisi analizi GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarına ait AUC (eğri altındaki alan) değeri, standart hata, %95 güven aralığı (%95 CI) ve p değeri grafikte gösterilmektedir.



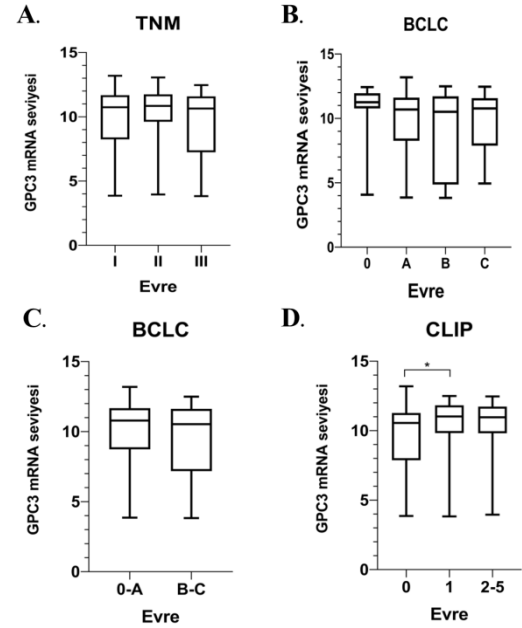
Şekil-2. Tümöral GPC3 gen ekspresyonu, HBV-ilişkili hepatosellüler kanser hastalarında genel sağkalım oranı ile ilişkili değildir. Kaplan-Meier hayatta kalma grafiği, GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak oluşturuldu. Tehlike oranı (HR), %95 güven aralığı (%95 CI) ve log-rank p değerleri grafikte sunulmaktadır. Genel sağkalım küratif operasyondan sonra herhangi bir hastalıktan ölüme kadar geçen süre olarak tanımlanmıştır.



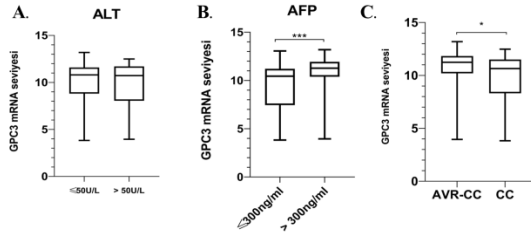
Şekil-3. HBV-ilişkili hepatosellüler kanser hastalarında küratif cerrahi operasyondan sonra 3 yıl içinde rekürans gelişen ve gelişmeyen (A) ile operasyondan sonra erken rekürans ve geç rekürans gelişen hastalarda (B) tümöral GPC3 mRNA seviyesi. Küratif cerrahi operasyondan sonra 1 seneden kısa sürede rekürans gelişmesi erken rekürans, 3 seneden sonra gelişmesi ise geç rekürans olarak tanımlanmıştır. Analiz GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil-4. Grafikler HBV-ilişkili hepatosellüler kanser hastalarında tümöral GPC3 mRNA ekspresyonu ile ana tümör boyutu arasındaki ilişkiyi (A) ve uninodüler ve multinodüler tümörlerde GPC3 mRNA seviyesini (B) göstermektedir. Analiz GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil-5. HBV-ilişkili HCC hastalarında tümöral GPC3 mRNA seviyesi ile TNM (A), BCLC (B,C) ve CLIP evreleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Analiz GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil-6. HBV-ilişkili HCC hastalarında tümöral GPC3 mRNA seviyesi ile yüksek ve düşük serum ALT (A) ve AFP (B) seviyeleri arasındaki ilişki ile aktif viral replikasyon gözlenen hastalarda kronik taşıyıcılara göre tümöral GPC3 mRNA seviyesi gösterilmektedir (C). Analiz GSE14520 LCS-kohort-2 veri setinden çalışmaya uygun bulunan hastalara ait transkriptomik ve klinik veriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Cox Orantılı Tehlikeler Regresyon Analizlerinin Sonuçları

Serum AFP değeri bildirilmeyen 3 hastaya ait veriler analizden hariç tutuldu (n=200). Tek değişkenli Cox orantılı tehlikeler regresyon analizinde GPC3 mRNA seviyesinin hastalarda sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi bulunmadı

(coefficient=-0,028, HR=0,972, %95 CI= 0,0892-1,060, p=0,523). Aktif viral replikasyon olan hastalara göre hepatit B virüsü kronik taşıyıcı olmanın sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi bulunmadı (coefficient=0.19, HR=0,826,%95 CI= 0,504-1,352,p=0,447). CLIP evrelemede, evre 0'a göre evre 1'de bulunmak düşük sağkalım açısından bir risk oluşturmazken (coefficient=0,499, HR=01,647, %95CI=0,941-2,885, p=0,081), 2-5. evrelerde bulunmak düşük sağkalım riskini artırdığı görüldü (coefficient=1,327, HR=3.770, %95CI=2,187-6,497, p<0.0001). Serum AFP değerinin 300ng/ml altında olması ise yüksek olmasına göre düşük sağkalım tehlikesini anlamlı olarak azalttığı bulundu (coefficient=-0,477, HR=0.621, %95CI=0,000-0,969, p=0,036). Çok değişkenli analizlerin sonuçlarına göre GPC3 mRNA seviyesinin AFP seviyesi, Hepatit B virüsü viral replikasyon statüsü ve CLIP evrelemesi parametreleri sabit tutulduğunda da hastalarda genel sağkalım üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Tek değişkenli ve çok değişkenli Cox orantılı tehlikeler regresyon analizi sonuçları Tablo-3'de gösterilmiştir.

Tablo-3. Tek değişkenli ve çok değişkenli Cox orantılı tehlikeler regresyon analizi sonuçları.

	Değişken	Regresyon Katsayısı	Pr > Ki ²	Tehlike Oranı (HR)	Tehlike Oranı Alt Sınır (95%)	Tehlike Oranı Üst Sınır (95%)	
Tek Değişkenli Analizler							
	GPC3 mRNA seviyesi	209220_at	-0.028	0.523	0.972	0.892	1.060
	HBV Viral Statüsü	Kronik Taşıyıcı	-0.191	0.447	0.826	0.504	1.352
	AFP	AFP <=300ng/ml	-0.477	0.036	0.621	0.000	0.969
	CLIP evreleme	CLIP Evre 1	0.499	0.081	1.647	0.941	2.885
		CLIP Evre 2-5	1.327	<0.0001	3.770	2.187	6.497
Çok Değişkenli Analiz (a)							
		209220_at	-0.034	0.442	0.967	0.886	1.054
		Kronik Taşıyıcı	-0.223	0.383	0.800	0.486	1.320
Çok Değişkenli Analiz (b)							
		209220_at	-0.061	0.183	0.941	0.860	1.029
		AFP <=300ng/ml	-0.569	0.017	0.566	0.000	0.905
Çok Değişkenli Analiz (c)							
		209220_at	-0.046	0.309	0.955	0.875	1.043
		CLIP Evre 1	0.557	0.057	1.746	0.985	3.096
		CLIP Evre 2-5	1.350	<0.0001	3.858	2.234	6.662

TARTIŞMA

GPC3 mRNA seviyesinin HCC dokularında yüksek miktarda ekspresyonu olduğunu bildiren araştırmalar bulunmaktadır (13-15). Fakat bu çalışmalarda örnek ya da kontrol sayısının oldukça az olduğu ve neredeyse tamamında hastalığın etiolojisinin dikkate alınmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, GPC3 mRNA seviyesinin HCC hastalarında klinik değişkenler ile korelasyonunu bildiren çalışmalar da oldukça kısıtlı olup, GPC3 mRNA seviyesi ile HCC hastalarında genel sağkalım, AFP seviyesi, viral statü, ALT seviyesi, BCLC evreleme, CLIP evreleme gibi diğer klinik parametreler ile korelasyonunu bildiren araştırma bulunamamıştır.

Çalışmanın sonuçları GPC3 mRNA seviyesinin HBV-ilişkili HCC ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusu ayırımında kullanılabilecek oldukça yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip bir diagnostik biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir. Bu sonuç görece az sayıdaki HCC hastalarında (n=31) tümöral GPC3 mRNA seviyesinin yakın eşlenik tümör içermeyen dokulara göre değerlendirildiği, GPC3 mRNA seviyesinin iyi bir diagnostik biyobelirteç olabileceğini rapor eden bir araştırmanın sonuçları ile koreledir (13). Tümöral GPC3 immünreaktivitesinin HCC hastalarında (n=300) diagnostik biyobelirteç olabilme özelliğini değerlendiren başka bir araştırmanın sonuçları (16) baz alındığında GPC3 mRNA seviyesinin GPC3 boyamasına göre daha yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olabileceği görülmüştür.

HCC'de tümöral GPC3 mRNA seviyesi ile prognoz arasındaki ilişkiyi değerlendiren tek çalışmada az sayıdaki HCC hastasında (n=31) yüksek ve düşük GPC3 ekspresyonu olan hasta gruplarında reküranssız sağkalım ve klinik değişkenler ile ilişki değerlendirilmiştir (13). Bu çalışmada ise totalde 203 HBV-ilişkili HCC hastasında GPC3 mRNA seviyesinin daha önce rapor edilmemiş olanlar da dahil klinik değişkenler ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile bahsedilen çalışma (13) arasında sonuçları etkileyebilecek temel farklılıklar bu çalışmada hasta sayısının daha fazla olması, hastalığın etiolojik kökeni olarak homojen bir hasta grubunda çalışılması ve GPC3 mRNA seviyesinin sürekli değişken olarak ele alınmasıdır.

CLIP evrelemesine göre değerlendirildiğinde GPC3 mRNA seviyesinin evre 0'a göre evre 1'de

daha yüksek olduğu gösterilmiştir. CLIP sisteminde yer alan değerlendirme kriterlerinin bazılarında olan tümörün multinodüler olması/olmaması ile GPC3 mRNA seviyesi arasında bir ilişki bulunamamış, fakat serum AFP seviyeleri yüksek olan grupta GPC3 mRNA seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. AFP seviyesi açısından elde edilen sonuç, önceki çalışmanın sonuçlarından farklı olmakla birlikte (13), GPC3 IHC boyaması ile AFP seviyeleri arasındaki ilişkiyi bildiren çalışmaların sonuçları ile koreledir (17, 18). Evre 1 ile 2-5. evreler arasında GPC3 mRNA seviyesi açısından farklılık gözlenmemesi mRNA seviyesinin hastalığın bu kriterler göze alındığında progresyonu ile korele olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte CLIP skoruna göre hastalar alt gruplara dağıtıldığında 2-3-4 ve 5. evrelerin her birine düşen hasta sayısı az olduğundan bu evrelerin birlikte değerlendirilmesi progresyon ile mRNA seviyesi arasındaki korelasyonun net olarak gösterilememesine neden olmuş olabilir. İleri CLIP evrelerinde olan hasta sayısının daha yüksek olduğu bir hasta grubunda bu verilerin valide edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada ek olarak BCLC evreleme ile de GPC3 mRNA düzeyi arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir. 0-A ve B-C evresindeki hastalar arasında ve hastalığın multinodüler olup olmaması arasında tümöral GPC3 seviyesi arasında farklılık bulunmaması bu veriyi desteklemektedir. İleri çalışmalarda BCLC D evresindeki hastaların da dahil olduğu bir kohortta GPC3 mRNA seviyesinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması gerekmektedir.

Önceki çalışmanın sonuçları ile karşılaştırıldığında (13), bu çalışmada da TNM evreleme ile GPC3 mRNA seviyesi ilişkili bulunmamıştır. Çalışmaya alınan hasta sayısının yüksek olması ve TNM evreleri arasında düzgün dağılım göstermesi sonucun güvenilirliğini artırmaktadır. Önceki çalışmalara bakıldığında GPC3 IHC boyaması ile TNM evreleme arasındaki ilişki ile ilgili çelişen sonuçlar bulunmaktadır (17, 18). Bu çalışmada TNM evrelemede de değerlendirilen kriterlerden olan tümör büyüklüğü hesaba katıldığında, önceki çalışmanın sonuçlarından farklı olarak [11], küçük tümörlerde büyük tümörlere göre GPC3 mRNA

seviyesinde anlamlı bir yüksekliğin olduğu dikkat çekicidir. Evreler arasında mRNA ifadesinde farklılık olmaması ve küçük tümörlerde daha yüksek mRNA eksresyonunun olması GPC3 mRNA ifadesinin erken tanıda faydalı olabileceğine işaret etmektedir.

Önceki çalışmada 31 hastada GPC3 mRNA yüksek eksprese eden grupta reküransız sağkalımın daha kısa olduğu bildirilmiştir, fakat genel sağkalım ile ilişkisi bildirilmemiştir (13). Bu çalışmada GPC3 mRNA seviyesi ile hastalarda rekürans zamanı ya da erken/geç rekürans ile da bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca, GPC3 mRNA seviyesi ile hastalarda genel sağkalım arasında bir ilişki bulunamamış ve GPC3 mRNA seviyesi ile ilişkili olan klinik değişkenlerin etkileri de dışlandığında bu durum değişmemiştir. GPC3 pozitif boyamanın hastalarda genel sağkalım ve hastaliksız sağkalım için bağımsız bir risk faktörü olduğu (17, 19, 20), aralarında hiçbir korelasyon ya da ilişki olmadığını (18, 21) ya da GPC3 protein seviyesi ne kadar düşükse, gözlemlenen prognoz da o kadar kötü olduğunu (16) bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Literatür taraması sonucunda elde edilen bu veriler ile çalışmaya alınan hasta sayısı arttıkça GPC3 pozitif boyaması ile genel sağkalım ve hastaliksız sağkalım arasındaki anlamlı ilişkinin de ortadan kalkma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu eğilim son gerçekleştirilen bir meta-analizde de rapor edilmiştir (22). Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, sonuçlar GPC3 mRNA seviyesinin progresyon ilerledikçe yükselmediğini ve yüksek GPC3 mRNA seviyesinin kötü prognoz ile ilişkili olmadığını göstermekte ve hasta sayıları diğer çalışmalara göre görece daha fazla olan ve

GPC3 immünreaktivitesi ile genel sağkalım arasında ilişki bulunmadığını bildiren çalışmaların sonuçları ile korele gözükmetedir (18, 21). Elde edilen bu sonuçlar, GPC3 mRNA seviyesinin prognostik bir biyobelirteç olabilme ihtimalinin HBV-ilişkili HCC'de oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmanın bulguları GPC3 mRNA seviyesinin HBV-ilişkili HCC ve yakın tümör içermeyen karaciğer doku ayırımında yüksek spesifite ve sensitivite ile iş görebilecek bir diagnostik biyobelirteç olduğunu fakat prognostik bir biyobelirteç olabilme potansiyelinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

GPC3 mRNA seviyesinin değerlendirilmesi HCC tanısında tek başına kullanılabileceği gibi, IHC analizleri sonucunda negatif GPC3 boyamasının HCC tanısını dışlamadığı (5) hesaba katıldığında, IHC analizinden daha hassas ve kantitatif sonuç veren mRNA analizi yönteminin negatif GPC3 boyaması olan tümörlerde kullanılması tanıyı netleştirmede faydalı olabilir. Tümörün derecelendirilmesinde kullanılan evreleme sistemlerinin dikkate alınması ile gerçekleştirilen analizler erken evrelerde GPC3 seviyesinin arttığını göstermiştir. Bu veriyle birlikte değerlendirildiğinde, tümör boyutunun 5 cm'den küçük/eşit olduğu hastalarda büyük olan hastalara göre tümöral GPC3 mRNA seviyesinin daha yüksek olması erken tanıda faydalı olabileceğine işaret etmektedir.

Çıkar çatışması: Bu makale ile ilgili herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Kim E, Viatour P. Hepatocellular carcinoma: Old friends and new tricks. *Experimental & Molecular Medicine* 2020; 52: 1898-907.
2. Yang H-C, Kao J-H. Persistence of hepatitis b virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: Molecular mechanisms and clinical significance. *Emerging Microbes & Infections* 2014; 3: 1-7.
3. Allweiss L, Dandri M. The role of cccDNA in hbv maintenance. *Viruses* 2017; 9: 156.
4. Zhou F, Shang W, Yu X, Tian J. Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. 2018; 38: 741-67.
5. Anatelli F, Chuang ST, Yang XJ, Wang HL. Value of glypican 3 immunostaining in the diagnosis of hepatocellular carcinoma on needle biopsy. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 219-23.
6. Sharov AA, Schlessinger D, Ko MS. Exatlas: An interactive online tool for meta-analysis of gene expression data. *J Bioinform Comput Biol* 2015; 13: 1550019.
7. Atay S. Integrated transcriptome meta-analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma and matched adjacent pancreatic tissues. *PeerJ* 2020; 8: e10141.

8. Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, et al. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis c virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101: 1501-10.
9. Wang H, Huo X, Yang XR, He J, Cheng L, Wang N, et al. Stat3-mediated upregulation of lncrna hoXd-as1 as a cerna facilitates liver cancer metastasis by regulating sox4. *Mol Cancer* 2017; 16: 136.
10. Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Identification and validation of a novel gene signature associated with the recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6275-83.
11. Melis M, Diaz G, Kleiner DE, Zamboni F, Kabat J, Lai J, et al. Viral expression and molecular profiling in liver tissue versus microdissected hepatocytes in hepatitis b virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 2014; 12: 230.
12. Roessler S, Jia HL, Budhu A, Forgues M, Ye QH, Lee JS, et al. A unique metastasis gene signature enables prediction of tumor relapse in early-stage hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res* 2010; 70: 10202-12.
13. Wang Y-L, Zhu Z-J, Teng D-H, Yao Z, Gao W, Shen Z-Y. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of hcc after liver transplantation. *World journal of gastroenterology* 2012; 18: 2408-14.
14. Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Sagliocco F, et al. A functional screening identifies five micrnas controlling glypican-3: Role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. 2013; 57: 195-204.
15. Lü Z-L, Luo D-Z, Wen J-M. Expression and significance of tumor-related genes in hcc. *World journal of gastroenterology* 2005; 11: 3850-4.
16. Pan C, Wang X, Chen W, Tao C, Xu X, Jin L, et al. Reevaluation of glypican-3 as a prognostic marker in hcc using x-tile software. *Med Oncol* 2015; 32: 359.
17. Fu S-J, Qi C-Y, Xiao W-K, Li S-Q, Peng B-G, Liang L-J. Glypican-3 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery* 2013; 154: 536-44.
18. Jeon Y, Kim H, Jang ES, Hong S, Kim JW, Yoon Y-S, et al. Expression profile and prognostic value of glypican-3 in post-operative south korean hepatocellular carcinoma patients. *APMIS* 2016; 124: 208-15.
19. Cui X, Li Z, Gao PJ, Gao J, Zhu JY. Prognostic value of glypican-3 in patients with hbv-associated hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2015; 14: 157-63.
20. Ning S, Bin C, Na H, Peng S, Yi D, Xiang-hua Y, et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancer patients. *Molecular Biology Reports* 2012; 39: 351-7.
21. Liang J, Ding T, Guo ZW, Yu XJ, Hu YZ, Zheng L, Xu J. Expression pattern of tumour-associated antigens in hepatocellular carcinoma: Association with immune infiltration and disease progression. *British journal of cancer* 2013; 109: 1031-9.
22. Moudi B, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H. Meta-analysis and systematic review of prognostic significance of glypican-3 in patients with hepatitis b-related hepatocellular carcinoma. *Virusdisease* 2019; 30: 193-200.