

T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

"Glioblastom, *IDH* wild-type, DSÖ Grade 4" tanısı ile opere edilmiş olan hastalarda (*TERT* mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve *PTEN* delesyonu) moleküler bulgularının klinikle korelasyonu

Dr. Maftun ZARBIZADA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Koray ÖZDUMAN

İSTANBUL-2024



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

"Glioblastom, *IDH* wild-type, DSÖ Grade 4" tanısı ile opere edilmiş olan hastalarda (*TERT* mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve *PTEN* delesyonu) moleküler bulgularının klinikle korelasyonu

Dr. Maftun ZARBIZADA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Koray ÖZDUMAN

İSTANBUL-2024

Beyan

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

14.08.2024

Maftun Zarbizada

İçindekiler

Beyan.....	2
Teşekkürler.....	4
Kısaltmalar	5
Tablo listesi	6
Figür listesi.....	7
Özet	8
Abstract	9
Giriş ve amaç.....	10
GBM tanısının tarihçesi	10
Amaç ve hipotez	14
Gereç ve yöntem	15
Kriterler	15
Etik onam	16
Klinik olarak analiz edilen değişkenler	16
Histopatolojik değerlendirme	17
Moleküler genetik analizler	17
Moleküler genetik analiz yöntemleri:	17
Moleküler genetik bulguların karakterizasyonu	18
Hasta örnekleminin karakteristikleri	19
İstatistik analiz yöntemleri	19
Bulgular.....	21
TERT promoter mutasyon bulguları	23
PTEN kopya sayı değişikliği bulguları	23
EGFR kopya sayı değişikliği bulguları	24
Çoklu belirteç kullanılarak belirlenen gruplar	25
MGMT metilasyon bulguları ve sağkalım korelasyonu	25
Regresyon analizi	32
“Recursive Partitioning” Analizi (RPA)	32
Tartışma.....	34
Sonuç.....	37
Kaynakça	38

Teşekkürler

NPG Aquarius Laboratuvarı, başta Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer'e, Biyolog Nazan Emruşi İmrek, Biyolog Zehra Yaren Dönmez ve Biyolog Ekin Köni'ye, Acıbadem Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'na, tez çalışması süresince laboratuvar imkanlarını sağladıkları, destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının istatistik hesaplamalarının kontrolünü yaptığı için Yıldız Üniversitesi İstatistik Bölümü, Dr. Emre Rıdvan Muratlar'a teşekkürlerimi sunarım.



Kısaltmalar

AMP	: Kopya sayı artışı/amplifikasyonu gösteren, ($>2N$)
ddPCR	: Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DEL	: Kopya sayı delesyonu gösteren ($<2N$ kopya sayısında)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epitelial büyüme faktör reseptörü
GBM	: Glioblastom
HET	: Heterozigot
HL-AMP	: “High-Level” amplifikasyon ($>10N$ kopya sayısında)
HOM	: Homozigot
IQR	: “Interquartile Range” (Çeyrekler arası açıklık)
MUT	: Mutant
LL-AMP	: “Low-Level” amplifikasyon ($2N < \text{kopya sayısı} < 10N$)
NEU	: “Copy-Neutral”, kopya sayısı nötral, ($2N$) kopya sayısında
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu geni
RPA	: Recursive Partitioning Analizi
SS	: Standart sapma
STX	: Stereotaktik Biyopsi
TERT	: Telomeraz revers transkriptaz geni
TERTp	: Telomeraz revers transkriptaz geni promoter bölgesi
WT	: Wild-Type, mutasyon içermeyen

Tablo listesi

Tablo 1: Analiz edilen değişkenlere göre belirlenen grupların özellikleri

Tablo 2: Çalışma örnekleminin detayları



Figür listesi

Figür 1 : GBM patogenezinde moleküler genetik bozuklukların kabul edilen ortaya çıkış düzeni

Figür 2 : Hastaların yaş dağılımı ve sağ kalım eğrisi (Kaplan Meier)

Figür 3 : Moleküler genetik bozuklukların örneklem içinde görülme sıklıklarının Venn diagramı

Figür 4 : Moleküler genetik alt gruplarda yaş ve sağ kalım sürelerinin çeyrekler açıklığı (IQR) değerleri

Figür 5 : *TERT*-wt ve *TERT* mutant hastaların sağ kalım analizi

Figür 6 : *TERT*-mut hastaların *EGFR* ve *PTEN* kopya sayıları ve (7+/10-) paternine göre sağ kalım analizi

Figür 7 : *TERT*-wt hastaların *EGFR* ve *PTEN* kopya sayıları ve (7+/10-) paternine göre sağ kalım analizi

Figür 8 : *PTEN* kopya sayısı değişikliği durumu ile sağ kalım arasındaki karşılaştırma

Figür 9 : Yaş gruplarında *EGFR* amplifikasyonu seviyeleri

Figür 10 : *EGFR* gen kopya sayısı değişikliği durumu ile sağ kalım arasındaki karşılaştırma

Figür 11 : Triple pozitif (*TERT*-mut, *EGFR*-AMP, *PTEN*-DEL) hastaların sağ kalım analizi

Figür 12 : *MGMT* metilasyonuna göre “unmetile” ve “metile” grupların sağ kalım korelasyonu

Figür 13 : Cox regresyon analizi

Figür 14 : RPA karar ağacı modeli

Figür 15 : Özellik önem grafiği

Özet

Giriş: En sık görülen primer malign beyin tümörü olan glioblastom'un (GBM) tedavisi halen ılımlı sağkalım uzamasından fazlasını sağlayamamaktadır. Hastalığın daha iyi anlaşılması gereklidir. Günümüzde (Kromozom 10 ya da *PTEN* kaybı), (Kromozom 7 ya da *EGFR* amplifikasyonu) ve *TERT**p* mutasyonlarının GBM'in temel moleküler belirteçleri oldukları kabul edilmektedir. Bu çalışmanın hipotezi bu 3 moleküler belirtece göre tanımlanacak GBM alt gruplarının (klinik özellikler ve sağkalım açısından) farklılıklar göstereceğidir.

Materyal-metot: 100 "Glioblastom, *IDH*-wt, DSÖ Grade 4" hastasında *TERT**p* mutasyonu, *EGFR* ve *PTEN* kopya sayıları belirlendi. Bulgular, klinik parametrelerle (yaş, cinsiyet, cerrahi yöntem, preoperatif ve postoperatif kitle hacimleri ve toplam sağkalım) korele edildi.

Bulgular: *PTEN*-DEL %88, *EGFR*-AMP %87, *TERT*-mut %81 vakada saptandı. Hiçbir belirtecin olmadığı vaka yoktu. *TERT*-mut yaşla pozitif (Spearman $\rho=0,24$; $p=0,017$). *EGFR*-“high-level”-AMP yaşla ters (Spearman $\rho=0,31$, $p=0,0016$), *EGFR*-“low-level”-AMP yaşla pozitif koreleydi. (Spearman $\rho=0,3$, $p=0,0028$). *TERT*-mut daha kısa sağkalımla (log-rank, $p=0,0171$), *PTEN*-DEL ise daha uzun sağkalımla korele idi (log-rank; $p=0,043$). Cox regresyon analizinde kadın cinsiyet ve *TERT*-mut yokluğu uzun sağ kalım açısından anlamlı bağımsız değişkendi ($p=0,0195$ ve $p=0,019$). Recursive partitioning analizi ve Random forest sağlamasında anlamlı alt grup saptanmadı (doğruluk oranı %86,7). Karar ağacı kökünde ve önem grafiğinde *EGFR*, *PTEN* ve *TERT* mutasyonundan önemli idi.

Tartışma: GBM patogenezinde ilk ortaya çıkan bulgu *PTEN* kaybı, ardından *EGFR* AMPlifikasyonu ve ardından *TERT* mutasyonudur. Bulgularımız *PTEN* ve *EGFR* kopya sayı değişikliklerinin hastalığın oluşumu için yeterli ve gerekli olduklarını, *TERT* mutasyonunun hastalığı hızlı faza geçirdiğini desteklemektedir.

Sonuç: GBM'in ana moleküler belirteçleri arasında en önemlisi *EGFR* olarak saptansa da sağkalımla korele olanı *TERT* mutasyonu varlığıdır.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma, *IDH*-wild type, *TERT*, *EGFR*, *PTEN*, sağkalım

Abstract

Introduction: Glioblastoma (GBM), the most common primary malignant brain tumor, continues to offer only modest improvements in survival with current treatments. Today, it is accepted that (Chromosome 10 or *PTEN* loss), (Chromosome 7 or *EGFR* amplification), and *TERT* mutations are key molecular markers of GBM. The hypothesis of this study is that GBM subgroups defined by these three molecular markers will show differences in clinical characteristics and survival outcomes.

Materials and Methods: In 100 patients diagnosed with "Glioblastoma, *IDH*-wt, WHO Grade 4," *TERT* mutation, and *EGFR* and *PTEN* copy numbers were determined. The findings were correlated with clinical parameters.

Results: *PTEN*-DEL was identified in 88%, *EGFR*-AMP in 87%, and *TERT*-mut in 81%. No cases were found without any of these markers. *TERT*-mut was positively, (Spearman $\rho=0.24$; $p=0.017$). *EGFR*-"high-level"-AMP was negatively correlated with age (Spearman $\rho=0.31$, $p=0.0016$), while *EGFR*-"low-level"-AMP was positively correlated with age (Spearman $\rho=0.3$, $p=0.0028$). *TERT*-mut was associated with shorter survival (log rank, $p=0.0171$), while *PTEN*-DEL was associated with longer (log-rank; $p=0.043$). In Cox regression analysis, female gender and the absence of *TERT*-mut were significant independent variables for longer survival ($p=0.0195$ and $p=0.019$, respectively). Recursive partitioning analysis and Random forest validation did not identify a significant subgroup (accuracy rate 86.7%). *EGFR*, *PTEN*, and *TERT* mutation were significant at the root of the decision tree and in the importance plot.

Discussion: The initial finding in the pathogenesis of GBM is *PTEN* loss, followed by *EGFR* amplification, and then *TERT* mutation. Our findings support that *PTEN* and *EGFR* copy number alterations are sufficient and necessary for development, while the *TERT* mutation accelerates the progression of the disease.

Conclusion: Although *EGFR* is identified as the most significant among the main molecular markers of GBM, the presence of *TERT* mutation is the one correlated with survival.

Keywords: Glioblastoma, *IDH*-wild type, *TERT*, *EGFR*, *PTEN*, survival rate

Giriş ve amaç

Nadir görülmelerine rağmen, beyin tümörleri, yol açtıkları sorunların ve klinik bulguların çok dramatik olması ve tedavi başarısının düşük olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Erişkinlerde en sık rastlanan malign primer beyin tümörü cinsi “glioblastom (GBM)” denen hastalık tipidir. GBM, vücutta görülen en kötü gidişli kanser tiplerinden biridir ve bu açıdan küçük hücreli akciğer kanseri, mide kanseri, pankreas kanseri, gastrointestinal sistemin nöroendokrin tümörleri gibi, ümitsiz kanserlerle birlikte sınıflanır. GBM en sık olarak 55-65 yaş grubunda gözlenir. Bu yaş grubu, aynı zamanda toplumun sosyal, finansal, eğitimsel olarak belli zirveye ulaşmış bireylerinin yaş grubu olarak tanımlanmaktadır ve hastalığın etkilediği yaş grubunun da bu grup olması ve hastalığın kötü bir sağkalıma sahip olması topluma da büyük sosyo-ekonomik darbe vurmaktadır.

GBM konusundaki bilgimiz son 200 senedir giderek artmasına rağmen halen hastalığın fizyopatolojisi net olarak anlaşılmamıştır. Dolayısıyla tedavi de sağkalımı kısıtlı bir miktarda uzatmaktan ileri gidememiştir. Hastalık fizyopatolojisinin anlaşılması etkin tedaviler geliştirmek konusunda mutlak gereklidir.

GBM tanısının tarihçesi

1800’lü yılların başlarında, otopsi geleneğinin gelişmesi ve mikroskopi teknolojisindeki yenilikler sayesinde, beyin tümörleri ilk defa tanımlanmaya başlanmıştır. İlk başlarda farklı ekoller bu kitleleri farklı şekilde isimlendirmişlerdir. Anglosakson ekolü beyinde gözdedikleri, kötü görünümlü tümörleri “medullary sarcoma” olarak, Fransız ekolü “encephaloides”, Alman ekolü ise “fungus medullare” olarak adlandırmışlardır (1). Hücre teorisinin gelişmesi sonrasında, 1863 yılında Rudolf Virchow beyin dokusundan kaynaklanan tümörleri “gliomlar” ve “sarkomlar” olarak sınıflamıştır (1) Beyindeki tüm tümörlerin sistematik olarak sınıflandırılması ise ilk olarak Bailey ve Cushing’in 1926 çalışması ile olmuştur (2). Bu sınıflandırmada, en sık görülen kötü huylu beyin tümörü “glioblastoma multiforme” olarak isimlendirilmiştir. Bu tümör tipi görüldüğü yaş, beyinde yerleştiği anatomik bölge, büyüme hızı, klinik bulguları, histopatolojik özellikleri, klinik gidişi ve tedaviye yanıtı açısından son derece heterojen bir gruptur. Bailey ve Cushing’in ilk isimlendirmesindeki “Multiforme”, yani “çok çeşitli” kelimesinin anlamı da budur. Buna rağmen bu tümör antitesi günümüze kadar tek bir hastalık olarak algılanmaya devam etmiştir. 1970’lerde hızlanan ve 2010 sonrasında da çok

büyük bir ivme kazanan “moleküler biyoloji” dalı genetik bir hastalık olduğu bilinen bu kanser tipinin patogenezi anlamak için kullanılmıştır. Bu konuda, GBM hastalığının moleküler genetik yöntemler kullanarak sınıflandırma denemelerinin ilki 1993’te Andreas von Deimling ve David Louis tarafından yapılmıştır (3). Louis ve von Deimling GBM’leri içerdikleri kromozomal kopya sayı değişikliklerine göre sınıflamayı denemişlerdir.

GBM biyolojisinin / fizyopatolojisinin anlaşılması konusunda bulunan bir diğer önemli belirteç İzositrat dehidrogenaz (*IDH*) mutasyonlarıdır. *IDH* mutasyonları ilk olarak 2008 yılında GBM’lerin sistematik tüm genom analizleri sırasında saptanmıştır (4). *IDH* mutasyonu görülen difüz hemisferik gliomların tedavilere iyi yanıt verdiği ve GBM’lerden daha uzun sağ kalımlarının olduğu fark edilmiştir. *IDH* mutasyonlarının tanımlanması sonrasında *IDH* mutasyonlarının hemisferik düşük grade’li gliom olarak bildiğimiz klinikopatolojik antiteyi tanımladıkları anlaşılmıştır. 2013 yılında Bert Vogelstein’in çalışmasında *TERT* mutasyonunun GBM ve Oligodendrogliom’larda çok sık görüldüğünü gösterilmiştir (5). *IDH* ve *TERT* mutasyonlarının taranması erişilebilir testler olduğundan, bu belirteçler GBM tanısının objektif olarak doğrulanması açısından genel kabul görmüştür. Günümüzde *IDH* mutasyonunun olmaması, *TERTp* mutasyonunun varlığı, *EGFR* amplifikasyonu ve [kromozom-7 amplifikasyonu + kromozom-10 delesyonu anlamına gelen] (7+/10-) paterni GBM’in tipik ve tanı koydurucu moleküler genetik özellikleri olarak genel kabul görmüş ve Dünya Sağlık Örgütü, Santral Sinir Sistemi tümörleri sınıflamasına girmiştir (6). 2018 yılında Heidelberg Üniversitesince yayınlanan bir çalışma, GBM sınıflamasında kullanılan bu 3 moleküler genetik belirtecin güvenilirliğini araştırmış ve (yalnız başına) *EGFR* amplifikasyonunun %99,8, (7+/10-) paterninin %98 oranında, 3 belirteçten herhangi ikisinin veya üçlü pozitifliğinin %99,4 oranında, sadece *TERTp* mutasyonu varlığının %89,4 oranında GBM’e spesifik olduğu gösterilmiştir (7). Her ne kadar bu 3 belirtecin tanı konusundaki güvenilirlikleri araştırılmış olsa da bu belirteçlerin kendi başlarına ya da kombinasyonlar halinde görülmelerinin hastalığın klinik davranışına bir etkileri olup olmadığı net olarak ortaya konmamıştır. Bu çalışmanın amacı bu korelasyonları test etmektir.

GBM’de en önemli olan 3 moleküler genetik değişiklik *PTEN* kaybı, *EGFR* amplifikasyonu ve *TERT* mutasyonlarıdır. Bu değişikliklerin her birinin patogeneizde bir rolü olduğu düşünülmektedir.

GBM'de PTEN kayıpları:

PTEN çok fonksiyonlu bir gendir (8). Kanserde olduğu gibi santral sinir sistemi hücrelerinin gelişimi ve devamlılığının sağlanmasında da rol alır. *PTEN* fonksiyon kaybının beyindeki glial/nöral progenitör hücrelerin GBM karakteristikleri kazanmasında temel mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. (9). Düşük gradeli tümörlerde *PTEN* metilasyonla susturulur (10). GBM onkogenezi konusunda yapılan çalışmaların gösterdiği en sık ve en erken ortaya çıkan temel değişik *PTEN* tümör supresör genine ait iki kopyadan birinin heterozigot delesyon ile kaybıdır (11). GBMun ileri safhalarında *PTEN* homozigot kaybı ya da *PTEN* mutasyonları da eklenebilir. *PTEN* tümör supresör geni 10q23 kromozomal bölgesinde yerleşimlidir. *PTEN* inaktivasyonu çok farklı şekillerde ve dozlarda ortaya çıkabilir. *PTEN* tümör supresör geni “haploinsufficiency” gösteren bir gendir (11). Yani tümör supresör geninin iki kopyasından birinin kaybı, diğer kopya sağlam olmasına rağmen kansere yatkınlık oluşturur. GBM’lerdeki genetik değişikliklerin zamanlaması konusundaki çalışmalar *PTEN* kaybının en erken görülen değişiklik olduğu konusunda fikir birliği vardır (11).

GBM'de EGFR değişiklikleri

GBM tümörlerinde en sık gözlenen moleküler genetik değişikliklerden biri *EGFR* sinyal yolağının aşırı aktivasyonudur. Bir tirozin kinaz reseptörü olan *EGFR*’nin GBMda aşırı aktivasyonu birden çok mekanizma ile olabilir (12). Bu değişiklikler GBM’lerin %75-80’inde kendi başlarına ya da kombinasyonlar şeklinde görülür. *EGFR* aşırı aktivasyon olayları arasında en sık rastlanana *EGFR*’nin normalde iki olan kopya sayısının artmasıdır (12). Kopya sayısı artışı “low-level” (3-10 kopya) ya da high-level (>10 kopya, binli sayılara kadar bile çıkabilir) olabilir (12). Low level amplifikasyon genelde Kromozom 7 amplifikasyonu şeklindedir. Buna karşılık, kopya sayısının çok artması “extrachromosomal minute” olarak isimlendirilen ve sadece *EGFR*’den oluşan sirküler neo-kromozomal yapılarca sağlanır. Ayrıca *EGFR* mutasyonları ve “rearrangementleri” de görülebilir. Rearrangement’ler arasında en iyi bilineni *EGFRvIII* olarak isimlendirilen formdur. *EGFRvIII*, bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olan *EGFR*’nin ekstraselüler parçasının önemli bir kısmının olmaması ile karakterizedir ve intraselüler sinyal sürekli olarak aktive kalır. Rearrangement olayları arasında *EGFR*’nin başka proteinlerle füzyonuyla ortaya

çıkan kimerik yapılar da izlenebilir ve bunlar arasında en iyi karakterize edilmiş olanı *EGFR*-SEPT14 füzyonudur (13). Bu çok farklı *EGFR* aşırı aktivasyon olayları birbirinden çok farklı kuvvettedir. Genel olarak bakıldığında ılımlı kopya sayı artışları en hafif etkiyi; yüksek sayıda kopya artışları orta düzeyde bir etkiyi; mutasyonlar ve rerarrangement olayları ise maksimum etkiyi ortaya çıkarırlar. Bu farklı düzenlemeler tek başlarına ya da kombinasyonlar şeklinde görülebilir; GBMun farklı alanlarında farklı düzeylerde olabilir ve çevresel etkenlere (radyoterapi, kemoterapi, hipoksi) bağlı olarak kaybolup yeniden ortaya çıkabilirler. GBMun erken safhalarında bir mayotik “non-disjunction” olayı sonrasında ortaya çıkan ılımlı kopya sayı artışlarıdır (11).

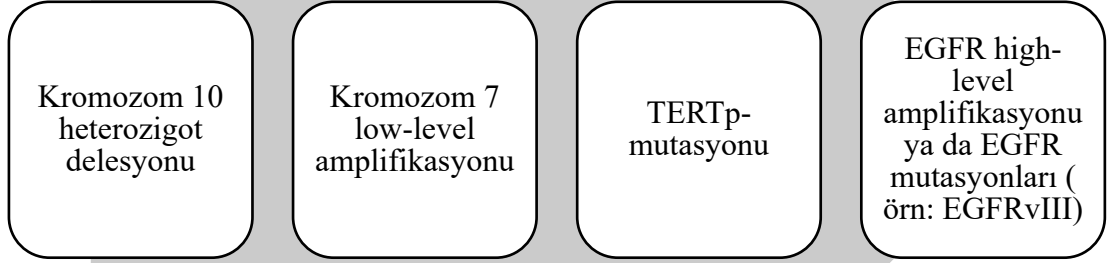
GBM’de TERT promoter mutasyonları

Telomerler memeli kromozomlarının uçlarında yerleşimli ve bu uçları korumaktan sorumlu yapılardır. Proteinlerden ve özelleşmiş, tekrarlayıcı DNA dizilerinden oluşurlar. “Telomer kısalma problemi” denen biyolojik süreç dahilinde, her bölünmede bir miktar kısalırlar. TP53 tümör supresör geninin sorunsuz çalıştığı hücrelerde, kısalma belli bir düzeyi aştığında hücrede “senescence” denen durum tetiklenir ve hücre bölünmesi geri dönüşsüz şekilde durdurulur ya da hücre apoptoza gider. Buna karşılık TP53 mutant hücreler bu kontrol basamağını aşarlar ve telomerler kıalmaya devam eder. Telomer kısalmasının sonucu, kromozomların “yapışkan” uçlarının ortaya çıkmasıdır ve bu proses hücrede kromozomal kopya sayı değişikliklerinin gelişmesine yol açar ve kromozomal instabilite oluşturur. Bölünme yetisinin sürekli kalması gereken hücrelerde (örneğin, kök hücreler) telomeraz olarak isimlendirilen bir reverse transkriptaz enzimi telomerleri yeniden yapar. Dolayısıyla hücreler “sonsuz bölünme yetisi” kazanırlar. 2013 yılında malign melanomlarda telomeraz (*TERT*) enziminin düzenleyici bölgesinde ortaya çıkan spesifik mutasyonların enzimin yapımını artırdığı gösterilmiştir. Bu yayını kısa süre sonra benzer mutasyonların gliomlarda da (özellikle GBM ve oligodendrogliomlarda) sık olarak görüldüğü gösteren yayınlar izlemiştir (87). Enzim aktivitesinin artışı mutant bölgeye GABP transkripsiyon faktörünün bağlanmasının artışı nedeniyle (11). Başka araştırmacılar *TERT* düzenleyici mutasyonları içermeyen tümörlerde buna alternatif olarak ARTX ve DAXX mutasyonlarının görüldüğünü rapor etmiştir (2). Bugün telomer uzamasının gliomlarda olmazsa olmaz bir mekanizma olduğu kabul edilmektedir. *IDH* mutant ve 1p/19q kodelesyonu olan oligodendrogliomların

tümünde ve primer GBM'lerin %80 gibi bir kısmında *TERT* düzenleyici mutasyonları izlenir. *TERT* düzenleyici mutasyonları C228T ve C250T olarak bilinen iki nükleotidde değişikliğe yol açarak etki gösterdikleri için bu mutasyonların günlük pratikte gösterilmesi kolay, emniyetli ve ucuzdur (14) (15). Mutasyonun gösterildiği tümörde *IDH* mutant ise oligodendrogliom, *IDH* normal ise GBM tanılarını destekler (14) (15). Bu enzim aktivasyonunun GBM'de stokastik olarak ortaya çıkar. Bazı araştırmacılar bu mutasyonun ortaya çıkmasının tümörün hızlı büyüme fazına girdiğinin bir göstergesi olduğunu kabul ederler (16). Kliniğimizde yapılan çalışmalarda da 2007 DSÖ sınıflamasında kabul edildiği şekilde grade IV özellikleri taşıyan diffüz gliomların %60-80 gibi bir kısmında *TERTp* mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir (14) (15). Morfomoleküler olarak tanımlanmış, yani DSÖ 2021 sınıflamasına göre (Glioblastom, *IDHwt*, grade 4) tanısı alan tümörlerde bu oranın %80 düzeyinde olduğu kabul edilir (6).

Amaç ve Hipotez

Bu çalışmanın amacı, morfomoleküler DSÖ sınıflaması kullanılarak, (glioblastom, *IDH*-wild type, DSÖ grade 4) tanısı almış olan hastalarda gözlenen ve bu hastalığın ana moleküler belirteçleri olarak kabul edilen (*TERTp* mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve *PTEN* delesyonu olaylarının) klinik karşılıklarını araştırmaktır. Hipotezimiz, tanıları aynı olmasına rağmen, bu belirteçleri taşıyan ve taşımayan tümörlerin klinik davranışlarının birbirlerinden farklı olduğudur.



Figür 1:

GBM patogenezi sırasında her moleküler genetik değişikliğin belli bir zamanlaması olduğu kabul edilmektedir. Her genetik değişikliğin, patogenezin farklı safhalarında eklenmesi kansere farklı davranış fenotipleri kazandırır. Örnek olarak *TERTp* mutasyonunun eklenmesinin GBM’de bir hızlı büyüme fazını başlattığı kabul edilir. Birçok seride *TERTp* mutasyonu içeren GBM’lerin sağkalım oranlarının düşük olduğu gösterilmiştir.

Gereç ve yöntem

Çalışmaya 100 hasta dahil edildi. Hastalar 2017-2023 yılları arasında, “Glioblastom, *IDH*-wt, DSÖ Grade 4” tanısı ile, Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı’nda opere edilmiş olan hastalar arasından belirlenen kriterlere göre, tarihsel sıra seçildi. Bu, retrospektif bir çalışmadır.

Kriterler

Çalışmaya dahil edilen hasta kriterleri:

1. On sekiz yaştan büyük hastalar
2. Hemisferik yerleşimli diffüz infiltratif gliomlar
3. İlk tanı anında morfolomoleküler olarak (Glioblastom, *IDH*-wt, DSÖ Grade 4) tanısı olan hastalar

4. Histomorfolojik olarak (grade IV) morfolojisinde olan hastalar (Nekroz ve / veya vasküler endotelyal proliferasyon olması gereklidir
5. Patoloji örneğinin erişilebilir olması gereklidir
6. Tanı ve takip verilerinin erişilebilir olması gereklidir
7. Sadece cerrahi geçirmiş hastalar kabul edilir
8. Sadece cerrahi sonrasında radyoterapi almış ve en az 6 kür temozolomid almış hastalar kabul edilir

Çalışma dışı bırakma kriterleri:

1. Pediatrik yaş grubundaki hastalar (<18 yaş)
2. Ana tanıdan bağımsız, başka sistemik kanseri olan hastalar
3. Bilinen sendromik hastalar.
4. Primer talamik, beyin sapı, serebellum merkezli infiltratif gliomlar
5. *IDH1/2*-mutant astrositomlar ve oligodendrogliomlar.
6. Histomorfolojik olarak grade II ya da grade III görünümünde olan ve içerdikleri moleküler belirteçler nedeniyle “Glioblastom, *IDH*-wt, DSÖ Grade 4” olarak sınıflanan (“lower grade”) tümörler.
7. Daha önce herhangi bir yöntemle tedavi almış, nüks tümörler
8. Doku tanısı olmayan hastalar

Etik onam

Bu çalışma, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Yerel Etik Kurul’u (ATADEK) tarafından onaylanmıştır (Karar No; 2023-20/692).

Klinik olarak analiz edilen değişkenler

Klinik değişken olarak hastaların yaşı, cinsiyeti, uygulanan cerrahi yöntem (biyopsi ya da cerrahi rezeksiyon), pre-operatif ve postoperatif kitle hacmi, toplam sağ kalım (“overall survival”) parametreleri analiz edilmiştir.

Histopatolojik değerlendirme

Çalışmaya kabul edilen yüz hastanın Patoloji Anabilim Dalındaki lamları bu konuda 20 seneyi aşkın tecrübesi olan patolog Doç. Dr. Ayça Erşen Danyeli tarafından, DSÖ 2021 sınıflama kriterleri kullanılarak yeniden gözden geçirilmiştir. Hastaların %93'ünde immünohistokimya ile Ki67 labeling indeksi değerlendirilebilmiştir.

Moleküler genetik analizler

Hastaların ilk tanı anında yapılmış olan moleküler genetik testlerinden *IDH1/2* mutasyonları ve *MGMT*-metilasyon testleri, çalışmaya kabul kriterleri arasında ve analiz için kullanıldı. Hastaların tümünde *IDH1/2* mutasyonları değerlendirildi ve mutasyon varlığı bir dışlama kriteri olarak kullanıldı. *MGMT*-metilasyonu hastaların %64'ünde çalışıldı. Diğer hastalarda örnek yetersizliği nedeniyle bu analiz uygulanamadı. Çalışmaya katılan tümör örneklerinin tümünde *TERT*p mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu, *PTEN* delesyonu moleküler genetik yöntemlerle analiz edildi.

Moleküler genetik analiz yöntemleri:

Kriterlere uygun seçilmiş hastaların ameliyat sırasında elde edilmiş tümör preparatları Acıbadem Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi. Elde edilen tümör preparatları, geriye arşiv dokusu kalacak şekilde ayrılarak, işleme alındı. Seçilen preparatlar Acıbadem Üniversitesi Moleküler Patoloji Laboratuvarında işleme alındı. Parafin blokları mikroskop altında yoğun tümör dokusu içeren alanlar işaretlendi. Dokular deparafinize edildi. Dokulardan DNA izolasyonu yapılması için 4 adet 10 mikron kalınlığında kesit alındı. DNA izolasyonu için "Maxwell RSC FFPE Plus DNA kiti" (Promega , katalog #AS1135) kullanıldı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonunun yeterliliği "dsDNA Quantitation, High Sensitivity" (Termofisher Scientific , katalog #Q32851) kiti kullanılarak fluorometre ile ölçüldü.

IDH1, *IDH2* ve *TERT* genlerindeki mutasyonların araştırılması Sanger sekans yöntemi ile yapıldı. *IDH1* geni kodon 132 ve *IDH2* geni kodon 172, *TERT* geni promoter bölgesi, 228 ve 250. pozisyonlarındaki tek nükleotid değişikliklerine spesifik amplikonlar, Nested PCR ile çoğaltıldı. İlgili mutasyonlar

"ABI 3500 Genetic Analyzer" (Termofisher ®, katalog #4405673) cihazında kapiler elektroforez ile analiz edildi.

EGFR ve *PTEN* genlerinin kopya sayısı değişikliklerinin değerlendirilmesi Dijital PCR yöntemi ile yapıldı. DNA, ddPCR Supermix for probes (no UTP) (BIO-RAD ®, katalog #1863023) ve prob (TaqMan Copy Number Assay, Termofisher ®) önceden belirlenen ölçüler ile karışım hazırlanarak DG32 AutoDG Cartridges'e (BIO-RAD ®, katalog #1864108) yerleştirildi. Her çalışmada kontrol amaçlı su, kopya sayısı normal olan DNA örneği ve kopya sayı "*EGFR* amplifiye" veya "*PTEN* delesyonu" olan DNA örneği de Cartridge'e yerleştirildi. Oluşturulan karışım droplet oluşturma yağı (AutoDG Oil for probes, BIO-RAD ®, katalog # 1864110) ile zenginleştirilerek, QX200 Droplet Generator (BIO-RAD®) ile droplet oluşturuldu. QX200 Droplet Generator ile oluşturulan droplet'ler ddPCR plates 'e (ddPCR Plates 96-well, Semi-skirted, BIO-RAD ®, katalog #12001925) cihaz tarafından otomatik aktarıldı. Droplet oluşturulduktan sonra kopya sayısı değişiklikleri QX200 Droplet Reader (BIO-RAD ®, katalog #10026321) cihazı ile ölçüldü. QuantaSoft (BIO-RAD, katalog #10031906) bilgisayar uygulaması ile sonuçlar vizualize edilerek kaydedildi.

Moleküler genetik bulguların karakterizasyonu

*TERT*p mutasyonu varlığı:

- mutasyon görülen hastalar: "*TERT*-mut"
- mutasyon görülmeyen hastalar: "*TERT*-wt"

EGFR kopya sayısı:

- $n=2$ (+/-0,3): "*EGFR* copy-neutral"
- $2 < n < 10$: "*EGFR* low-level amplifiye"
- $n > 10$: "*EGFR* high-level amplifiye"
- *EGFR* amplifikasyonu olmayan hastalar yani kopya sayısı nötral olanlar "*EGFR*-NEU" olarak isimlendirildi.

PTEN kopya sayısı:

- $n=2$: "*PTEN* copy neutral"

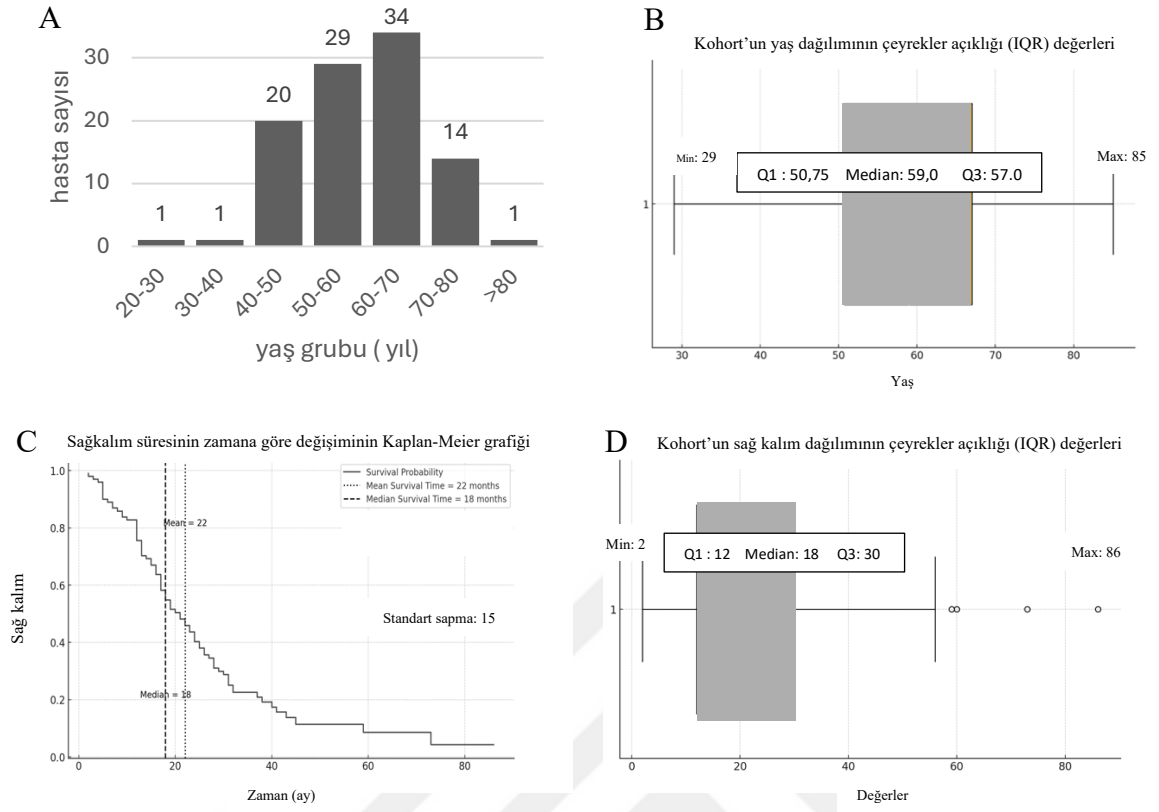
- $1 < n < 2$: “*PTEN* heterozigot delesyon”
- $n=0$: “*PTEN* heterozigot delesyon”
- *PTEN* delesyonu olmayan hastalar yani kopya sayısı nötral olanlar “*PTEN-NEU*” olarak isimlendirildi.

Hasta örnekleminin karakteristikleri

Hastaların ortalama yaşı 58 (+/- 11 ss), ortanca yaşı 59'du (min 29 – max 85). 56 hasta erkek ve 44 hasta kadındı. Erkek:kadın oranı 1.3 olarak belirlendi. Hastaların 20'de (%20) tümör multifokal yerleşimli idi. Pre-operatif, radyolojik ölçülen kitle hacmi ortalama değer, 91,7 (+/- 60,9 ss) cm³, ortanca değeri 77,4 cm³-dir (min 5,2 – max 309,4). Hastaların 23'ne (%23) Stereotaktik biyopsi, 77'ne (%77) cerrahi rezeksiyon uygulandı. Post-operatif, radyolojik ölçülen kitle hacmi ortalama değeri 53,8 (+/- 47,1 ss) cm³, ortanca değeri 43,3 cm³-dir (min 1,8 – max 271,9 cm³). Rezeksiyon oranı ortalama değeri 0,58 (+/- 0,31 ss), ortanca değeri 0,54 (min 0,03 – max 1) idi. Hastaların ortalama sağ kalım süresi 22 ay (+/- 15 ss), ortanca sağ kalım süresi 18 aydı (min 2 – max 86). Hastaları yaş dağılımı ve sağ kalım eğrisi Figür 2'de gösterilmiştir. Tüm kohort özellikleri Tablo 1'te gösterilmiştir.

İstatistik analiz yöntemleri

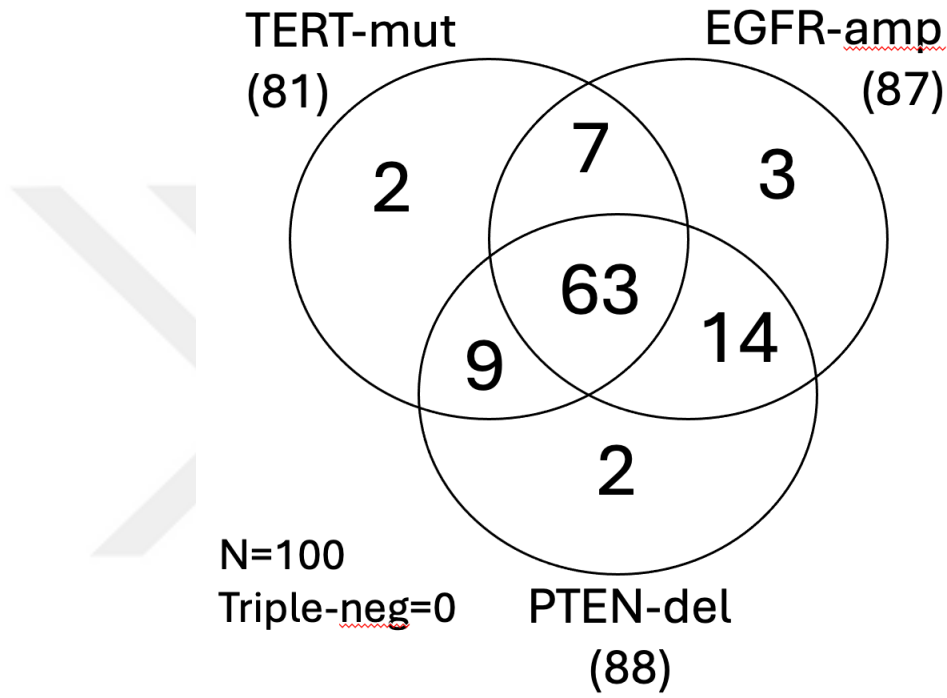
Farklı değişkenlerle belirlenen gruplar Kaplan-Meier grafikleri ile karşılaştırıldı. Farklı değişkenlere göre oluşturulan gruplar arasındaki istatistiksel fark log-rank ve t-testi ile değerlendirildi. İki grup arasında pozitif veya ters korelasyon varlığı Spearman Korelasyon analizi ile değerlendirildi. Yaş ve sağ kalım parametrelerinin ortalama değeri, 1. ve 3. çeyreklerdeki değerleri ve IQR'ı boxplot grafikleri ile görselleştirildi. Multiparametrik analiz için Cox regresyon analizi yapıldı. Karar ağacı oluşturulması için “Recursive Partitioning Analizi” ve “Random Forest Analizi” yapıldı. İstatistik analizleri Dr. Emre Rıdvan Muratlar (Yıldız Üniversitesi, İstatistik bölümü) tarafından kontrol edilmiştir. İstatistik analizler SPSS programı kullanılarak yapılmıştır.



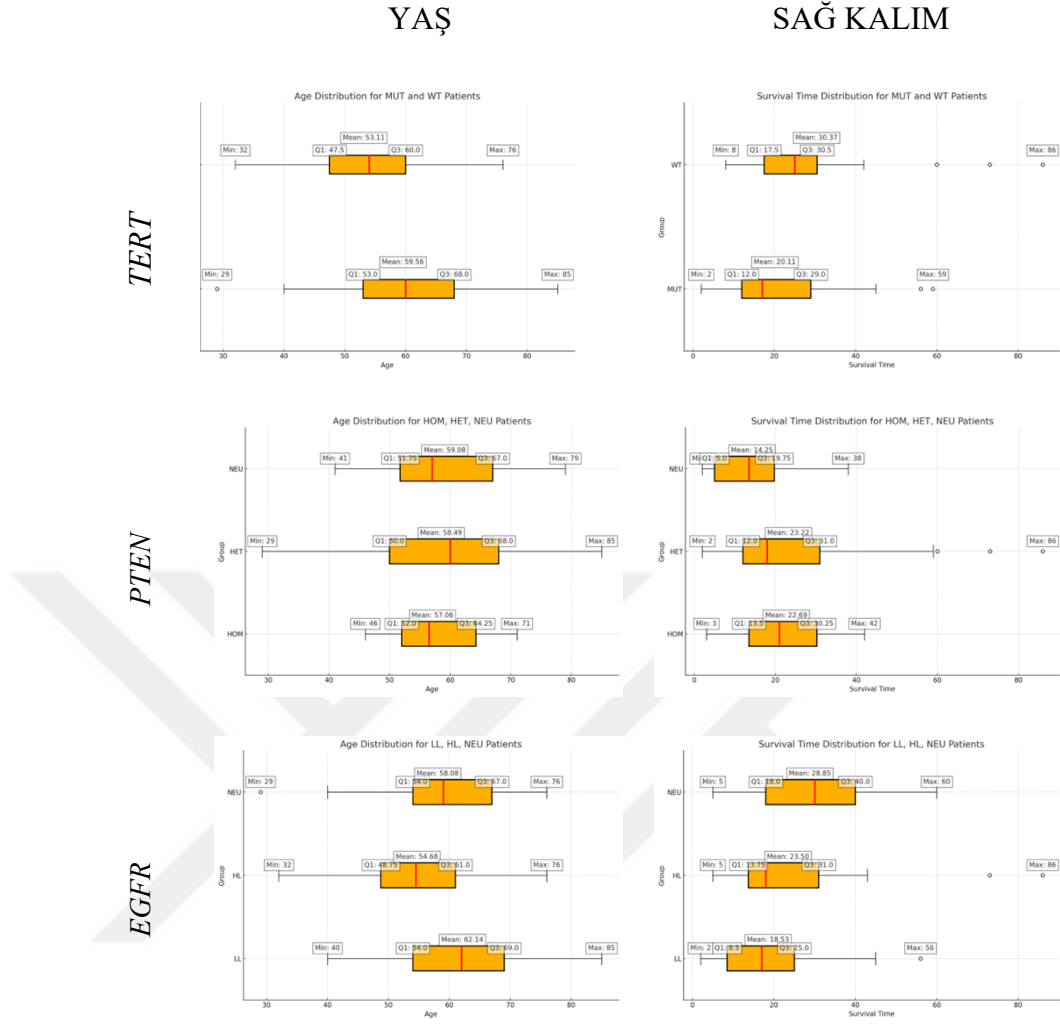
Figür 2: A) Hastaların yaş dağılımı B) Yaş verilerinin Q1, Q3 ve IQR değerleri C) Hastaların zamana göre sağ kalım eğrisi D) sağ kalım verilerinin Q1, Q3 ve IQR değerleri

Bulgular

EGFR amplifikasyonu, *PTEN* delesyonu ve *TERT* mutasyonuna göre hasta sayılarının dağılımı Figür 3'te Venn diagramı ile gösterilmiştir. Farklı değişkenlere göre belirlenen grupların ortalama yaş ve ortalama sağkalım değerleri Figür 4'te gösterilmiştir. Tüm örneklem özellikleri Tablo 2'te gösterilmiştir.



Figür 3. Hastaların *EGFR* gen amplifikasyonu(*EGFR*-AMP), *PTEN* gen kopya sayı kaybı (*PTEN*-del) ve *TERT* promoter mutasyonu (*TERT*-mut) durumuna göre dağılımı (Venn diagramı ile).



Figür 4: Moleküler genetik alt gruplarda yaş ve sağ kalım sürelerinin çeyrekler açıklığı (IQR) değerleri.

***TERT* promoter mutasyon bulguları**

Sıklık ve demografik bulgularla korelasyon

TERT mutasyonu hastaların 81 (%81) tanesinde saptandı. *TERT* mutasyonu olan ve mutasyonu olmayan gruplar arasında yaş (60 +/- 11 ss vs 53 +/- 10 ss), cinsiyet (E:K oranları 1,25:1 vs 1,3:1), uygulanan cerrahi yöntemi (%74 cerrahi rezeksiyon vs %89 cerrahi rezeksiyon), tümör yerleşim tarafı açısından fark saptanmadı (Tablo 1).

TERT mut ve *TERT*-wt hastaların yaş ortalamaları arasında istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmedi (Chi-kare; $p=0,42$). *TERT* mutasyonu varlığının yaş ile pozitif korelasyon gösterdiği izlendi (Spearman korelasyon analizi; $p=0,24$; $p=0,017$). *TERT* mut ve *TERT*-wt hastaların ortalama Ki67 değerleri (0,34 vs 0,29) arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (Chi-kare; $p=0,54$).

Sağkalım korelasyonu

TERT mut ve *TERT*-wt gruplarının ortalama sağ kalım süreleri arasında anlamlı istatistiksel farklılık görüldü (t-testi, $p=0,007$).

TERT-mutant ve *TERT*-wild type grupları arasındaki karşılaştırmada *TERT*-wild type grubun istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun yaşadığı gözlemlendi (log rank, $p=0,0171$) (Figür 5).

Her iki grup, ayrı ayrı, *PTEN* delesyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve ((7+/10-)) paterni bulgularının sağkalıma etkisi açısından karşılaştırıldı. *TERT* mutant ya da *TERT* mutasyonu içermeyen hastalarda, her üç alt-grup analizde anlamlı farklılık gözlenmedi (Figür 6 ve 7).

***PTEN* kopya sayı değişikliği bulguları**

Sıklık ve demografik bulgularla korelasyon

PTEN delesyonu hastaların 88 (%88) tanesinde saptandı. 88 hastanın 72 (%82) tanesi heterozigot, 16 (%18) tanesi homozigot kayıptı. Bu gruplar arasında yaş (58 +/- 12 ss vs 57 +/- 8 ss), cinsiyet (E:K oranları 1,1:1 vs 2,2:1), uygulanan cerrahi yöntemi (%79 cerrahi rezeksiyon vs %75 cerrahi rezeksiyon), tümör yerleşim tarafı açısından fark saptanmadı.

PTEN kopya sayı kayıplarının yaş ile korele olmadıkları gözlemlendi (Spearman korelasyon analizi; $p=-0,014$, $p=0,89$)

Sağkalım korelasyonu:

Homozigot ve heterozigot delesyonu olan hastalar arasında sağkalım açısından anlamlı istatistiksel fark bulunmadı (log rank, $p=0,6306$) (Figür 8a). Buna karşılık *PTEN* delesyonu içeren grubun içermeyenle karşılaştırıldığında, sınırda anlamlı bir şekilde daha uzun yaşadı gözlemlendi (log-rank; $p=0,043$) (Figür 8b). Heterozigot delesyon, homozigot delesyon ve copy-neutral grupların üçlü karşılaştırması da sınırda anlamlı olarak saptandı. (log-rank; $p=0,0482$) (Figür 8c).

EGFR kopya sayı değişikliği bulguları

Sıklık ve demografik bulgularla korelasyon

EGFR amplifikasyonu hastaların 87 (%87) tanesinde saptandı. 87 hastanın 44 (%51) tanesi HL amplifikasyon, 43 (%49) tanesi LL amplifikasyondur. *EGFR* amplifikasyonu olan ve olmayan gruplar arasında yaş (58 ± 10 ss vs 58 ± 14 ss), cinsiyet (E:K oranları 1,3:1 vs 1,2:1), uygulanan cerrahi yöntemi %77 cerrahi rezeksiyon vs %77 cerrahi rezeksiyon), tümör yerleşim tarafı açısından fark saptanmadı (Tablo 1).

“Low level” ve “High level” amplifikasyon hastalarının yaş ortalamaları arasında fark izlenmedi (62 ± 10 ss vs 55 ± 9 ss). Buna karşılık, hasta yaşı ve “high-level” amplifikasyon arasında ters korelasyon (Spearman korelasyon analizi, $\rho = -0,31$, $p=0,0016$); hasta yaşı ve “low-level” amplifikasyon arasında pozitif korelasyon izlendi (Spearman korelasyon analizi, $\rho = 0,3$, $p=0,0028$) (Figür 9). HL *EGFR* amplifiye grup ile LL *EGFR* amplifiye grup sağ kalım açısından karşılaştırıldı, istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (log rank, $p=0,1598$) (Figür 10a). “*EGFR* amplifikasyonu olan” ve “*EGFR* amplifikasyonu olmayan” grup sağ kalım açısından analiz edildi ve gruplar arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmadı ($p=0,0984$) (Figür 10b). HL, LL ve copy-neutral gruplar sağ kalım açısından analiz edildiğinde anlamlı fark gözlemlendi (log-rank, $p=0,0275$) (Figür 10c).

Çoklu belirteç kullanılarak belirlenen gruplar

Diğer moleküler bulgularla korelasyon:

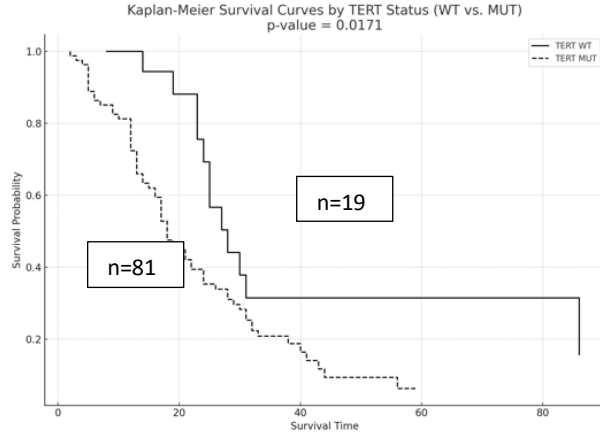
TERT-mut grubun içinde *PTEN* delesyonu %89 oranında, *TERT*-wt grubun içinde *PTEN* delesyonu %84 oranında izlendi. *TERT*-mut grubun içinde *EGFR* amplifikasyonu %86 oranında, *TERT*-wt grubun içinde *EGFR* amplifikasyonu %89 oranında izlendi. Her üç değişkenin de olmadığı (*TERT*-wt + *EGFR*-NEU +*PTEN*-NEU) hasta saptanmadı.

EGFR amplifikasyonu, *PTEN* delesyonu ve *TERT* mutasyonu bir arada görülen hastalar “triple pozitif” hastalar olarak gruplandırıldı. Bu hasta grubu, diğer hastalar ile ve (herhangi iki belirteç pozitif olan hastalar) ile sağ kalım açısından karşılaştırıldı. Her iki analizde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (log rank, $p=0,0647$ ve log rank, $p=0,0997$) (Figür 11)

***MGMT* metilasyon bulguları ve sağkalım korelasyonu**

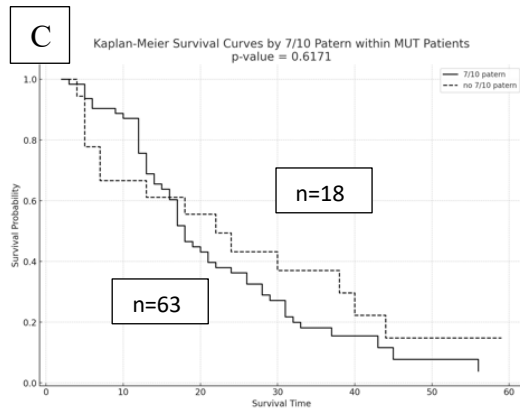
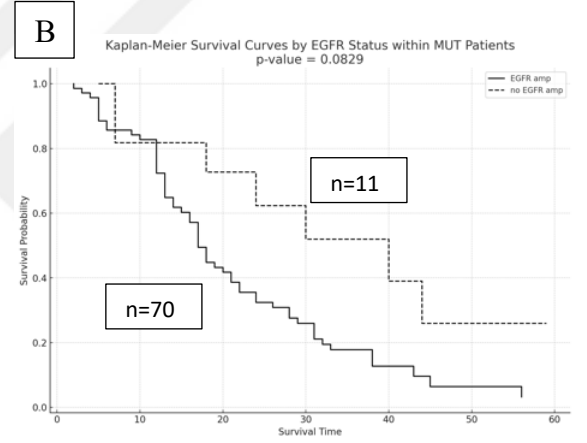
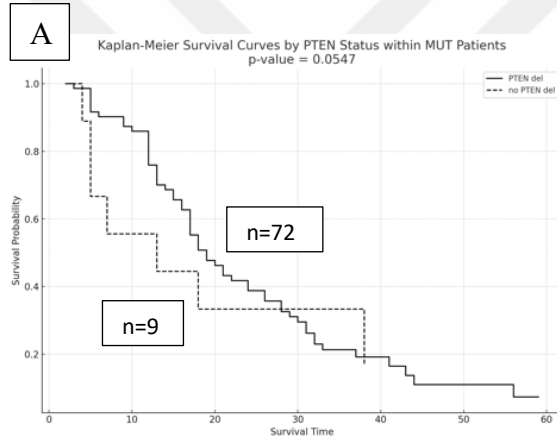
Hastaların 64’te (%64) *MGMT* metilasyon test sonucu vardı. *MGMT* metilasyon testi sonucu 23 (%36) hastada metile olarak, 41 (%64) hastada unmetile olarak sonuçlandı. Metile ve unmetile grup sağ kalım açısından karşılaştırıldı. Unmetile grubun daha uzun sağkalıma sahip oldukları görüldü ve bu bulgu istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulundu (Mann-Whitney U, $p= <0,01$) (Figür 12).

		<i>TERT</i>		<i>EGFR</i>			<i>PTEN</i>			Toplam
		<i>TERT</i> MUT	<i>TERT</i> WT	<i>EGFR</i> HL	<i>EGFR</i> LL	<i>EGFR</i> NEU	<i>PTEN</i> HOM	<i>PTEN</i> HET	<i>PTEN</i> NEU	
n		81	19	44	43	13	16	72	12	100
CİNSİYET	Erkek-kadın (E:K) oranı	45-36 (1,3)	11-8 (1,4)	24-20 (1,2)	24-19 (1,3)	7-5 (1,4)	11-5 (2,2)	38-34 (1,1)	7-5 (1,4)	56-44 (1,3)
YAŞ	Ortalama	60 (+/- 11)	53 (+/- 10)	55 (+/- 9)	55 (+/- 10)	58 (+/- 14)	57 (+/- 8)	58 (+/- 12)	59 (+/- 11)	59 (+/- 11)
	Ortanca	60	54	55	62	59	57	60	57	59
	Min-max	29 - 85	32 - 76	32 - 76	40 - 85	29- 76	46 - 71	29 - 65	41 - 79	29 - 85
MGMT	MGMT bakılabilenlerin oranı	57/81 (%70)	6/19 (%32)	28/44 (%64)	28/43 (%65)	8/13 (%62)	8/16 (%50)	48/72 (%67)	9/12 (%75)	64 (%64)
	Metile olanlar/tüm bakılabilenler (oran)	19/57 (%34)	3/6 (%50)	11/28 (%40)	7/28 (%25)	5/8 (%63)	3/8 (%38)	18/48 (%38)	2/9 (%22)	23/64 (%36)
Ki67	Ortalama +/-ss	0,31 (+/- 0,14)	0,29 (+/- 0,19)	0,32 (+/- 0,14)	0,31 (+/- 0,15)	0,22 (+/- 0,15)	0,29 (+/- 0,15)	0,31 (+/- 0,14)	0,3 (+/- 0,22)	0,31 (+/- 0,15)
	Ortanca	0,3	0,28	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
TARAF	Sağ	33 (%41)	8 (%42)	19 (%43)	17 (%40)	5 (%38)	4 (%25)	35 (%49)	2 (%16)	41 (%41)
	Sol	34 (%43)	8 (%42)	20 (%45)	17 (%40)	5 (%38)	11 (%69)	24 (%34)	7 (%58)	42 (%42)
	Bilateral	14 (%16)	3 (%16)	5 (%12)	9 (%20)	3 (%24)	1 (%6)	31 (%17)	3 (%25)	17 (%17)
CERRAHİ YÖNTEM	Cerrahi	60 (%74)	17 (%90)	36 (%82)	31 (%72)	10 (%77)	12 (%75)	57 (%79)	8 (%67)	77 (%77)
	Stereotaktik biyopsi	21 (%26)	2 (%10)	8 (%18)	12 (%28)	3 (%23)	4 (%25)	15 (%21)	4 (%33)	23 (%23)
SAĞ KALIM	Ortalama +/- Ss	20 (+/- 13)	30 (+/- 21)	24 (+/- 16)	19 (+/- 13)	29 (+/- 18)	23 (+/- 12)	23 (+/- 16)	14 (+/- 11)	22 (+/- 15)
	Ortanca	17	25	18	17	30	21	18	14	18
	Min-max	2 - 59	8 - 86	5 - 86	2 - 56	5 - 60	3 -42	2 - 86	2 - 38	2 - 86
Tablo 1: Analiz edilen değişkenlere göre belirlenen grupların özellikleri										



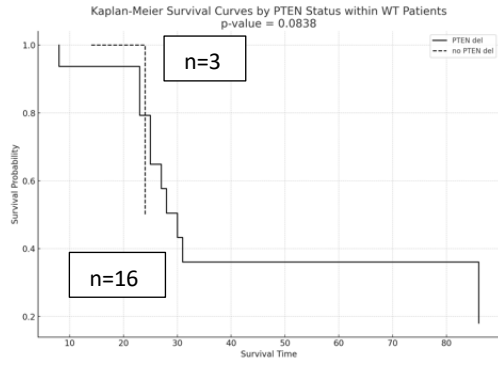
Figür 5. *TERT*-wt ve *TERT*-mut hastaların sağ

kalım analizi

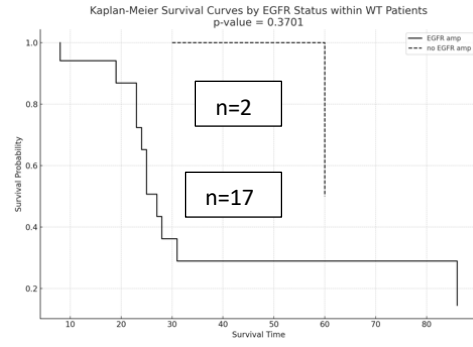


Figür 6. *TERT* mutant hastaların *EGFR* ve *PTEN* kopya sayıları ve (7+/10-) paternine göre sağ kalım analizi. a) *PTEN*-DEL olan ve olmayan grup arasında; b) *EGFR*-AMP olan ve olmayan grup arasında; c) (7+/10-) paterni olan ve olmayan grup arasında

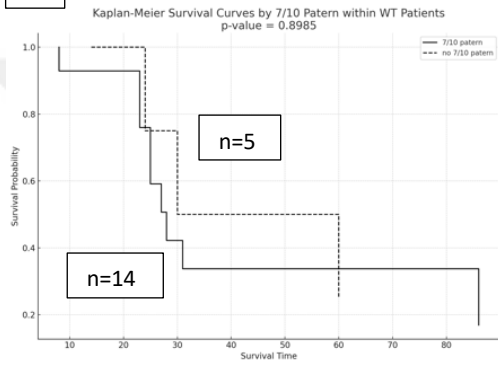
A



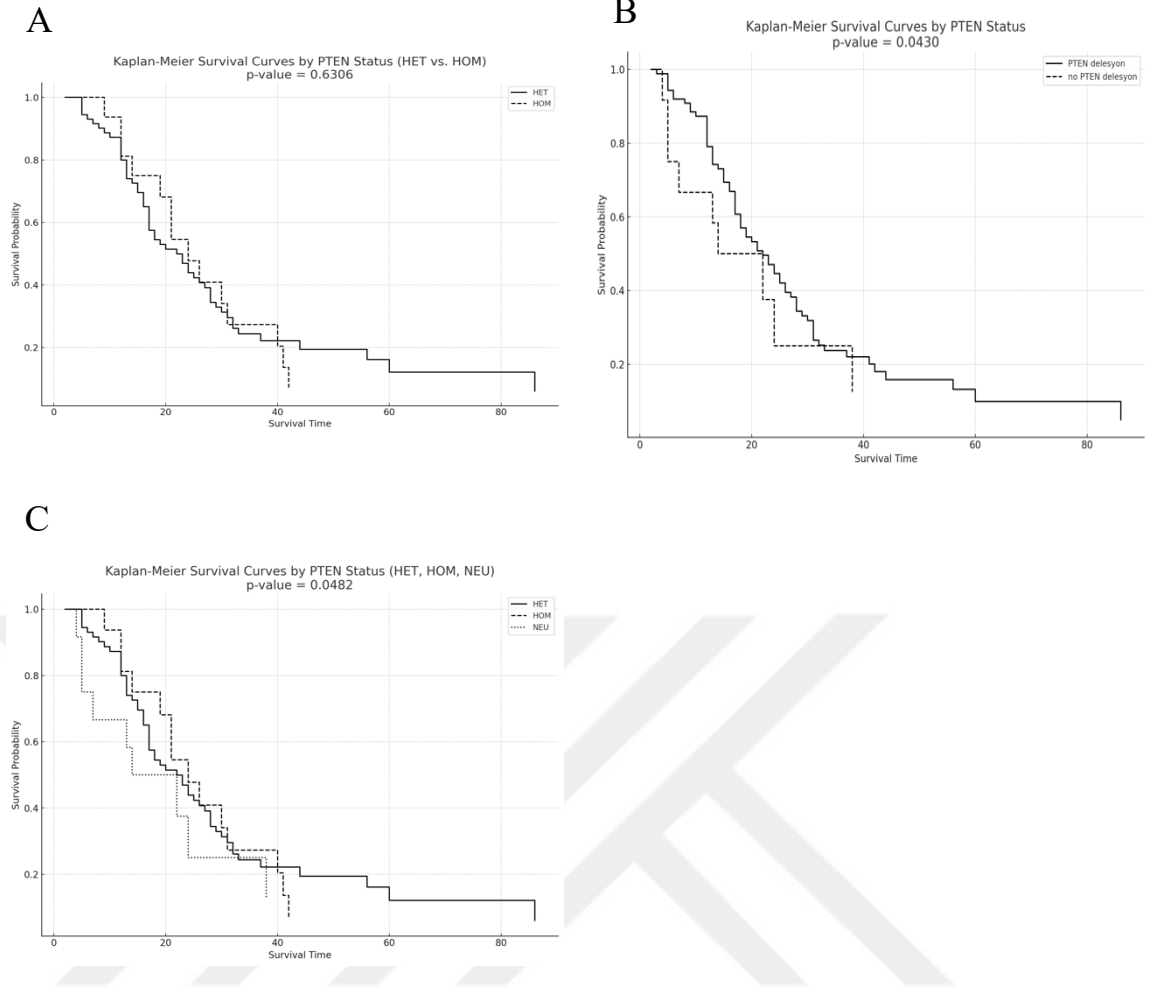
B



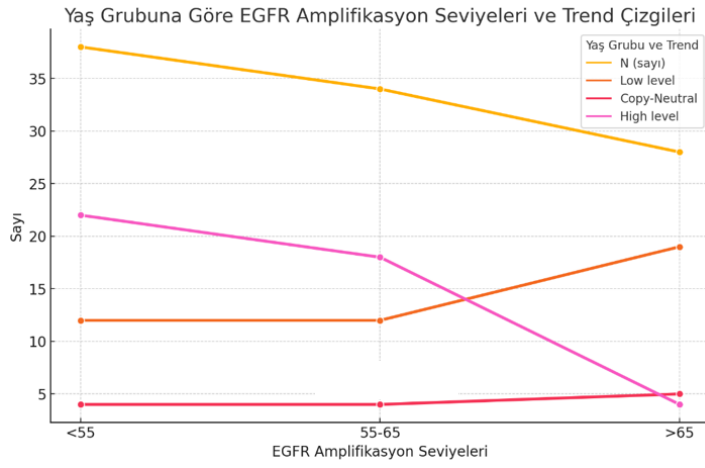
C



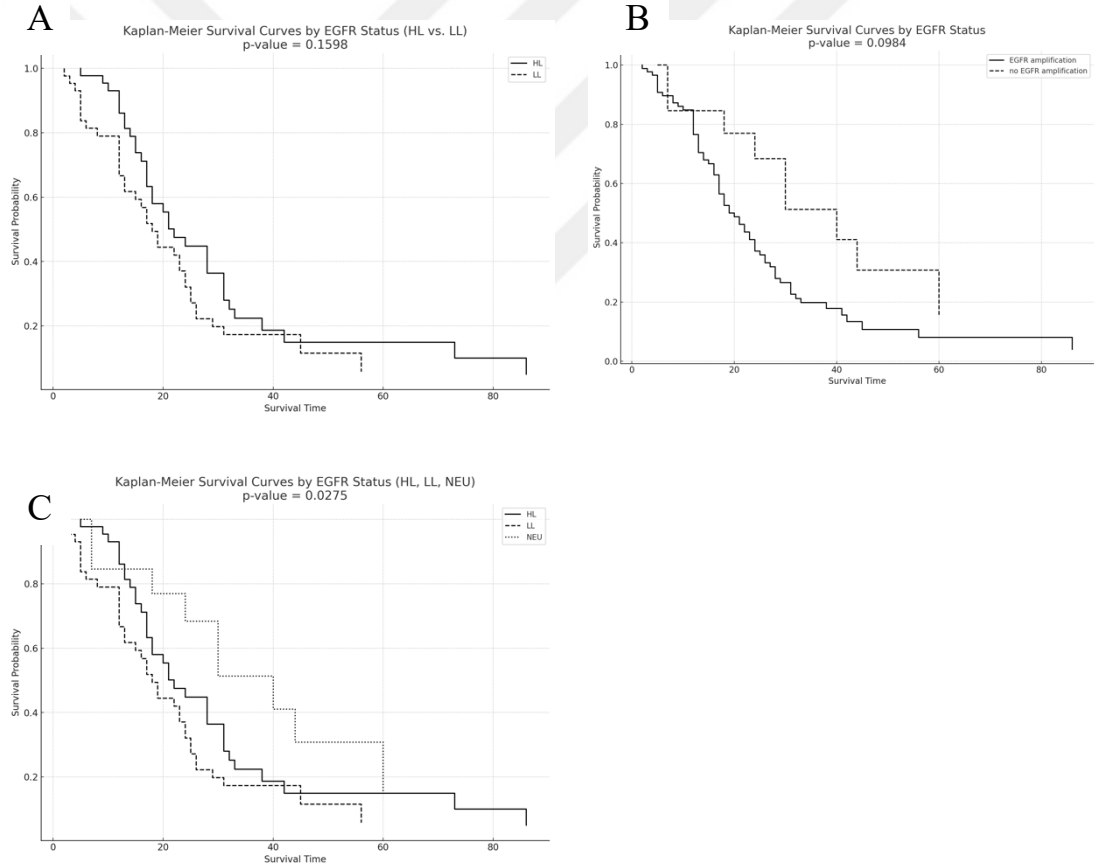
Figür 7. *TERT* wild-type hastaların *EGFR* ve *PTEN* kopya sayıları ve (7+/10-) paternine göre sağ kalım analizi. a) *PTEN*-DEL olan ve olmayan grup arasında; b) *EGFR*-AMP olan ve olmayan grup arasında; c) (7+/10-) paterni olan ve olmayan grup arasında.



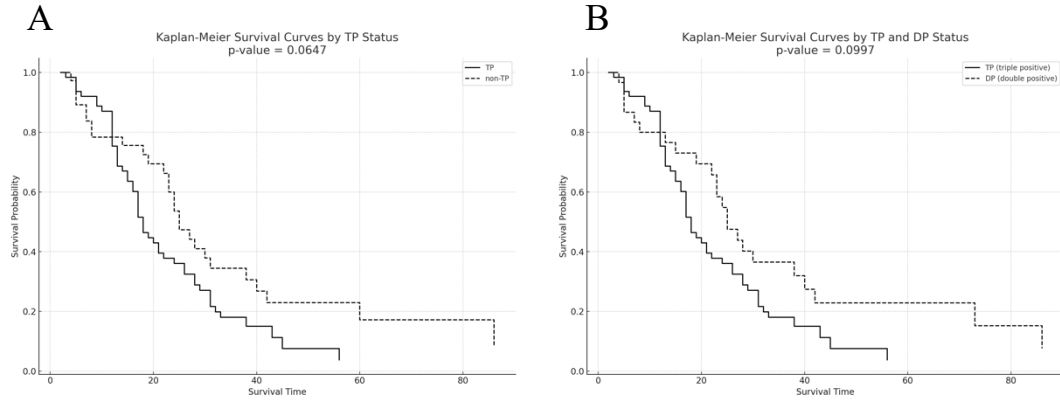
Figür 8. *PTEN* gen kopya sayısı değişikliği durumu ile sağ kalım arasındaki karşılaştırma. a) Homozigot grup ile heterozigot grup arasında; b) *PTEN*-DEL olan grup ile *PTEN*-DEL olmayan grup arasında; c) Hetezigot grup, homozigot grup ve copy-neutral grup arasında.



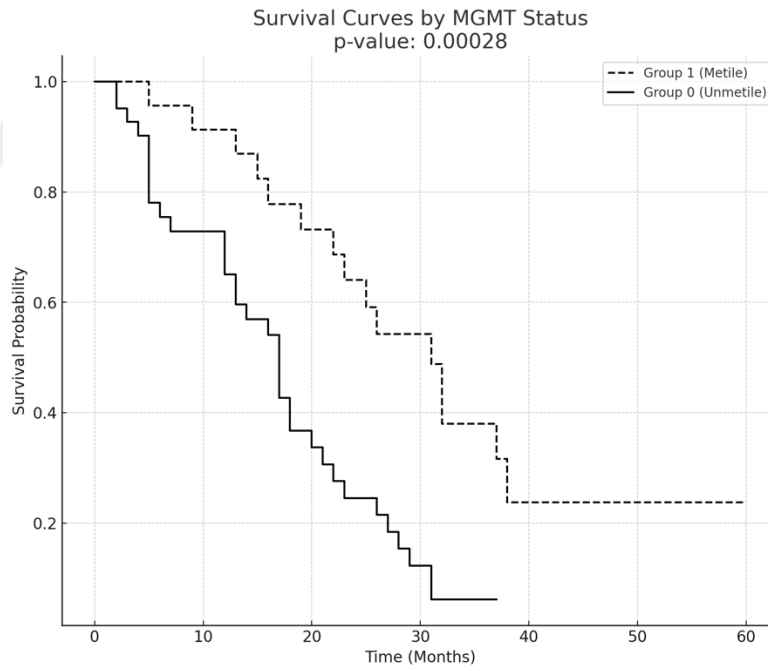
Figür 9. Yaş gruplarında *EGFR*-AMP seviyeleri.



Figür 10. *EGFR* gen kopya sayısı değişikliği durumu ile sağ kalım arasındaki karşılaştırma. a) HL grup ile LL grup arasında; b) *EGFR*-AMPolan grup ile *EGFR*-AMP olmayan grup arasında; d) HL grup, LL grup ve copy-neutral grup arasında.



Figür 11. Triple pozitif hastaların sağ kalım analizi. a) triple pozitif hastalar ile diğer hastalar arasında; b) triple pozitif hastalar ile herhangi iki belirteç pozitif olan hastalar arasında



Figür 12: *MGMT* metilasyonuna göre “unmethyle” ve “methyle” grupların sağ kalım korelasyonu

Regresyon analizi

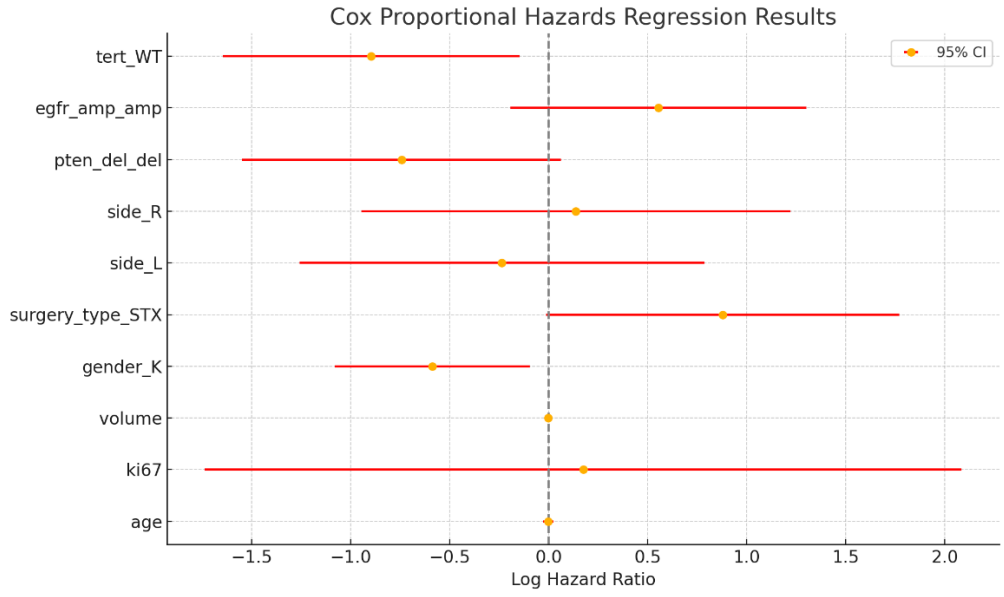
Hastaların yaş, cinsiyet, tümörün lokalize olduğu taraf, cerrahi yöntemi, ameliyat öncesi tümör hacmi, *PTEN* delesyonu, *EGFR* amplifikasyonu, *TERT* mutasyonu varlığı, Ki67 değeri dahil edilerek regresyon analizi yapıldı. Analiz sonucunda:

- **Kadın cinsiyet daha uzun sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bağımsız bir değişken olarak saptandı ($p=0,0195$)**
- ***TERT* mutasyonu yokluğu daha uzun sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bağımsız bir değişken olarak saptandı ($p=0,019$)**
- *PTEN* delesyonunun sağkalım üzerinde istatistiksel eğilim izlendi fakat bu anlamlılık düzeyine ulaşmıyordu ($p=0,0704$)
- Stereoraktik cerrahi yapılan hastalarda daha uzun sağkalıma bir istatistiksel eğilim izlendi fakat bu anlamlılık düzeyine ulaşmıyordu ($p=0,0535$).
- *EGFR* amplifikasyonu sağkalım üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir ($p=0,1465$)
- Yaşın sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ($p=0,8133$)
- Ki67'nin sağkalım üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır ($p=0,8582$)
- Tümör hacmi ve sağkalım arasında bir istatistiksel eğilim izlendi fakat bu anlamlılık düzeyine ulaşmıyordu. ($p=0,965$)
- Tümörün hangi tarafta olduğu sağkalım üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir ($p=0,6506$, $p=0,8038$)

Analiz sonuçları Figür 13'te sunulmuştur.

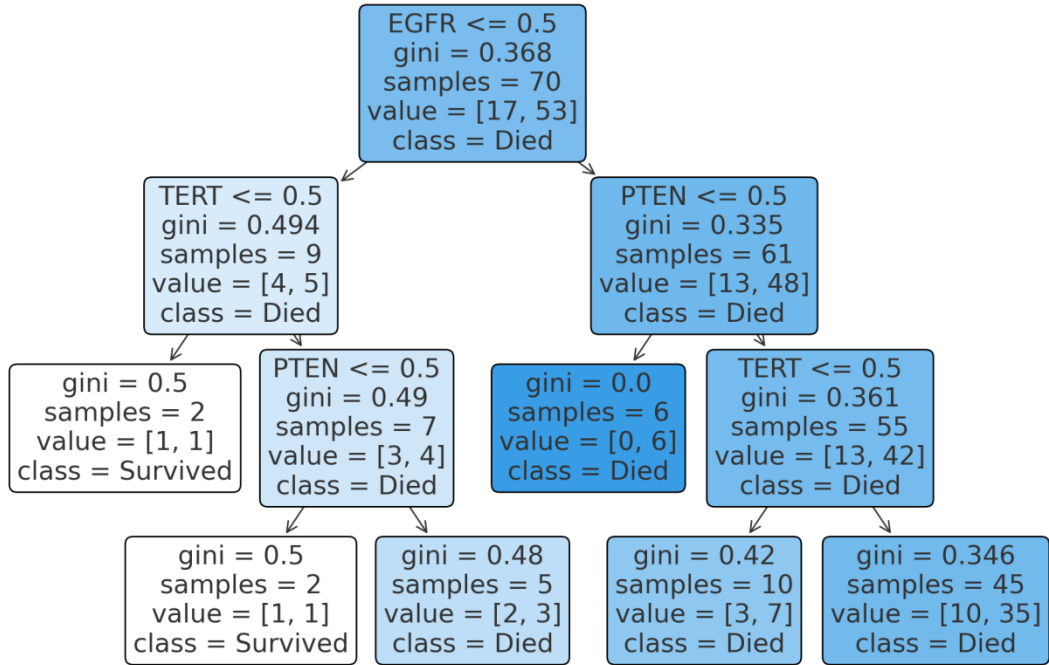
“Recursive Partitioning” Analizi (RPA)

RPA için hastaların *TERT* mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve *PTEN* delesyonu durumları ele alındı ve RPA modeli oluşturuldu. Modelin doğruluğu %86,7 olarak hesaplandı. Bu, modelde sadece üç belirteç kullanılmış olmasına rağmen, güçlü ve etkili bir model olduğunu göstermekte idi. RPA sonucunda karar ağacının kökünde *EGFR* yer almakta idi (Figür 14). Karar ağacı modeli Random Forest modeli ile karşılaştırıldı. Random Forest modelinin de doğruluk oranı %86,7 olarak hesaplandı. Oluşturulan model ile özellik önem grafiği yapıldı (Figür 15). Özellik önem grafiğine göre, en önemli özellik *EGFR* amplifikasyonudur.



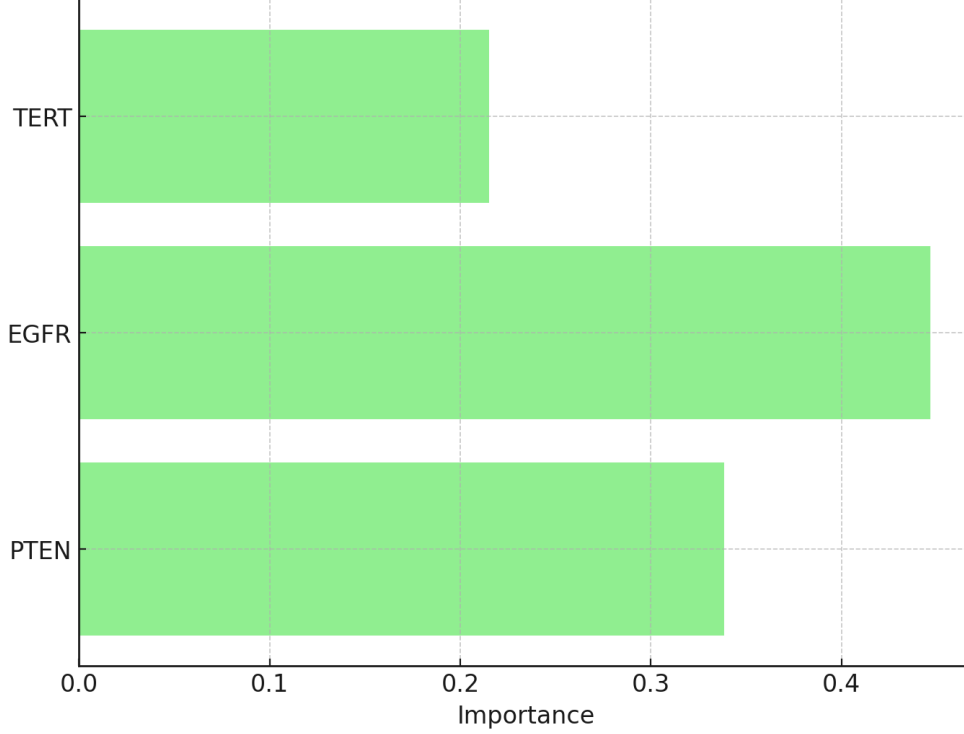
Figür 13: Cox regresyon analizi.

Recursive Partitioning Analysis (RPA) Decision Tree - Simplified Data



Figür 14. RPA karar ağacı modeli. Modelin doğruluk oranı %86,7 olarak hesaplandı.

Feature Importance from Random Forest Model - Simplified Data



Figür 15. Özellik önem grafiği. Bu grafiğe göre en önemli faktör *EGFR* amplifikasyonudur.

Tartışma

Bu çalışmaya neden gerek duyuldu?

Glioblastom (GBM), görüldüğü yaş, beyinde yerleştiği anatomik bölge, büyüme hızı, klinik bulguları, histopatolojik özellikleri, klinik gidişi ve tedaviye yanıtı açısından son derece heterojen bir gruptur (1). Bu hastalık heterojenitesinin altında yatan biyolojik mekanizma hala bilinmemektedir. Moleküler biyolojik yöntemleri kullanarak yapılan çalışmalar, ilk olarak *IDH* mutasyonu taşıyan bir alt gruba işaret etmiş, sonradan bu grubun çok daha uzun sağkalım gözlenen hastalardan oluştuğu gözlenmiş, daha sonra yapılan çalışmalar ise GBM sanılan bu grubun aslında Astrositom denen tümörün, glioblastomu taklit eden patolojik bulguları gösteren bir tipi olduğu kanıtlanmıştır (1). Yani GBM’de beklenen histopatolojik bulguları içeren tümörlerin arasına başka tümör antitelerinin karışabildiği anlaşılmıştır. Diğer bir yandan, GBM gibi grade 4 histomorfolojik bulgularını göstermeyen, ama klinik davranışı GBM gibi olan hastaların da varlığı fark edilmişti (1). Daha sonraları bu

hastaların GBM’de beklenen bazı moleküler genetik bulguları taşıdıkları gözlenmiş ve sonuçta bu moleküler genetik bulguların varlığında, histopatolojik grade ne olursa olsun bu hastaların (Glioblastom, *IDHwt*, DSÖ grade 4) olarak isimlendirilmesi kararlaştırılmıştır (17). Bu bulgu Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından da benimsenmiştir (6). Dolayısıyla, DSÖ sınıflaması, *IDH1/2*-mutasyonu yokluğu, *TERT* promoter mutasyonu varlığı, *EGFR* gen amplifikasyon ve (Kromozom 7 amplifikasyonu, Kromozom 10 delesyonundan oluşan “(7+/10-)“ paterni) moleküler genetik bulgularını, GBM hastalığının moleküler belirteçleri olarak kabul etmiştir. Moleküler belirteçler o hastalığın varlığına objektif şekilde işaret eden moleküler genetik bozukluklardır. Stichel ve ark. (7) tümörün kökenini gösteren metilom analizlerinin GBM olarak tanımladığı tümörlerle bu üç moleküler belirtecin varlığı da korele edilmiştir. Bu çalışma GBM için (7+/10-) paterninin %98 *EGFR* amplifikasyonunun %99,8 ve *TERTp* mutasyonunun %89,4 spesifik olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın hipotezi GBM tanısında kullanılan bu 3 moleküler belirtecin (*TERTp* mutasyonu, *EGFR* amplifikasyonu ve *PTEN* delesyonu) yalnız başlarına ya da kombinasyon halinde, sağkalım açısından farklı gruplara işaret edecekleridir. Bir yandan da analiz sırasında bu hasta örnekleminde bu belirteçlerin görülme özellikleri (Sıklık, görülme yaşı gibi) belirlenmesi amaçlanmıştır.

Moleküler belirteçlerin hasta örnekleminde dağılımı

Her 3 belirteç çalışma örnekleminde birbirine yakın oranlarda izlendi. En sık görülen *PTEN* delesyonu (%88), ikinci sıklıkta görülen *EGFR* amplifikasyonu (%87), en nadir görüleni ise *TERTp* mutasyonu (%81) idi. Moleküler belirteçlerin bu kadar yüksek oranlarda görülmesi ve hiçbirini içermeyen tümör görülmemesi, bu belirteçlerin GBM patogenezinde çok merkezi bir yerleşimlerinin olduğu fikrini desteklemektedir.

GBM oluşum mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, patogeneze sırasında ilk oluşan değişikliğin *PTEN* delesyonu olduğu genel kabul görür (11) (16). Bunun ardından *EGFR*’de low-level amplifikasyon olaylarının geliştiği kabul edilir (11) (16). *TERT* mutasyonunun eklenmesinin glioblastomların hızlı büyüme fazına girmeleri ile korele olduğu düşünülmektedir. Tümör içi hücresel heterojenitenin artması ve tümör büyümesinin hızlanması sonrasında tümörde ekstrakromozomal mini-ring kromozomlar olarak *EGFR* amplifikasyonunun arttığı kabul edilir (18). Bu

dönemde *EGFRvIII* gibi mutant formların da görülme sıklığının arttığı bilinmektedir (19). Bu çalışmada her üç molekül belirtecin de görülme sıklıkları, genel kabul gören bu patogenezdaki ortaya çıkış zamanlamaları ile paralellik göstermektedir. Ayrıca *TERTp* mutasyonunun görülme sıklığının yaş ile korele olması da bu fikri desteklemektedir. Aynı bulgu, kliniğimizde daha önce yapılmış olan çalışmalarla da paralellik göstermektedir (15) (20). Benzer bir korelasyonun *EGFR* amplifikasyonu ya da *PTEN* delesyonu ile olmaması da *TERTp* mutasyonunun tersine, *EGFR* ve *PTEN* değişikliklerinin tümör oluşumunda daha erken fazlarda ortaya çıktıklarını ve tümör oluşumundan sonra geç dönemde ortaya çıkan bozukluklar olmadıklarını desteklemektedir. Yine benzer bir şekilde, *TERT*-wt tümörlerin, *TERT*-mut olanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha uzun yaşıyor olmaları bulgusu da bu genetik belirtecin görülmesinin tümörün daha agresif bir hale dönüşmesi ile korele olduğu fikrini desteklemektedir.

Bu gelişim hipotezine göre, tümör gelişiminde erken safhalarda ortaya çıktığını kabul ettiğimiz (*PTEN* delesyonu, *EGFR* low-level amplifikasyonu içeren, fakat *TERT*wt) olan tümörlerle diğerleri karşılaştırıldığında daha iyi klinik gidiş yönünde bir eğilim izlenmiş fakat bu istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır.

Bu örnekte analiz hedeflerimiz içinde bulunmayan, ama başka çalışmaların sağkalım açısından değerli olduğunu bildirdiği *MGMT* metilasyonu da analiz edildi. Hastaların 64 tanesinde (%64) *MGMT* metilasyon test sonucu vardı. *MGMT* metilasyon testi sonucu 23 (%36) hastada metile olarak, 41 (%64) hastada unmetile olarak sonuçlandı. Unmetile grubun daha uzun sağkalıma sahip oldukları görüldü ve bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Mann-Whitney U, $p = <0,01$).

TERTmut varlığı yalnız başına anlamlı bir prognostik faktör müdür?

Tekil faktörlerin, sağkalım konusunda bağımsız ve anlamlı değişkenler olup olmadıklarını anlayabilmek için çok değişkenli analizler kullanılır. Bu çalışmada bu amaçla, genel kabul gören cox regresyon analizi kullanıldı. Bu analizde 3 molekül belirteç yanında demografik/klinik özellikler de (Yaş, cinsiyet, cerrahi yöntemi, tümör hacmi, postop tümör hacmi, lateralite, Ki67 indeksi ve tümörün multifokal olup olmaması) analiz edildi. Analizde kadın cinsiyet ve *TERT* mutasyonunun olmaması istatistiksel olarak daha uzun sağkalımı gösteren bağımsız değişkenler

olarak saptandılar. Bu bulgular (Kaplan Meier analizlerinde anlamlı bir prognostik belirteç olarak ortaya çıkan) *TERT* mut varlığının aynı zamanda bağımsız bir belirteç olduğu ve başka faktörlerin (confounding variable) etkisinde kalmadığı gösterildi.

Bu üç belirtecin farklı kombinasyonları, GBM olmayan farklı tümörlere ya da tümör alt gruplarına işaret edebilir mi?

Daha önce belirtildiği şekilde, eskiden histopatolojik olarak GBM olduğu düşünülen bir alt grubun, daha sonradan *IDH* mutasyonu içerdiği ve astrositom olarak isimlendirilen tümör olduğu fark edilmiştir. Bu ayrımın yapılmasında en önemli yol gösterici *IDH*-mutant tümörlerin çok daha uzun olan sağkalımları olmuştur. Benzer bir korelasyon açısından, bu çalışmanın odağı olan 3 moleküler belirteç incelendiğinde, kendi başlarına ya da kombinasyonlar halinde çok net ayrılabilen bir farklı-sağkalım grubu izlenmemiştir.

Direk gözlemde fark edilememiş olabilecek grupların saptanabilmesi için yapılan “Recursive Partitioning” Analizi (RPA) sonuçları örneklem içinde belirgin alt gruplara işaret etmemiştir. Ayrıca “random forest analizi” kullanılarak değişkenlerin önem sıralarının belirlenmesi için yapılan analizde *EGFR* en önemli değişken olarak ortaya çıkmış, bunu *PTEN* ve *TERT* mutasyonları izlemiştir. Bu değişkenlerin arasında her ne kadar *TERT* tek başına anlamlı olarak ortaya çıksa da biyolojik olarak diğer iki değişkenin de bu etkide katkılarının olduğunu göstermiştir.

Sonuç

GBM patogeneğinde ilk ortaya çıkan bulgu *PTEN* kaybı, ardından *EGFR* amplifikasyonu ve ardından *TERT* mutasyonudur. Bulgularımız *PTEN* ve *EGFR* kopya sayı değişikliklerinin hastalığın oluşumu için yeterli ve gerekli olduklarını, *TERT* mutasyonunun hastalığı hızlı faza geçirdiğini desteklemektedir. GBM’in ana moleküler belirteçleri arasında en önemlisi *EGFR* olarak saptansa da sağkalımla korele olanı *TERT* mutasyonu varlığıdır.

Kaynakça

1. Ozduman K, Hacıhanefioğlu M, Pamir M. Glioblastom. Türk Nöroşirürji Dergisi. 2019;29(3):305-34.
2. Bailey P, Cushing H. A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. JB Lippincott, Philadelphia 1926.
3. von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. Brain Pathol. 1993;3(1):19-26.
4. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science. 2008;321(5897):1807-12.
5. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(15):6021-6.
6. Board WCoTE. Central Nervous System Tumours; WHO Classification of Tumours, 5th Edition. WHO Classification of Tumours, 5th edition 2021.
7. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. Acta Neuropathol. 2018;136(5):793-803.
8. Ma L, Teruya-Feldstein J, Behrendt N, Chen Z, Noda T, Hino O, et al. Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor suppression. Genes Dev. 2005;19(15):1779-86.
9. Duan S, Yuan G, Liu X, Ren R, Li J, Zhang W, et al. PTEN deficiency reprogrammes human neural stem cells towards a glioblastoma stem cell-like phenotype. Nat Commun. 2015;6:10068.
10. Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamgüney T, et al. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. Neuro Oncol. 2007;9(3):271-9.
11. Ozawa T, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, et al. Most human non-GBM glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. Cancer Cell. 2014;26(2):288-300.
12. Francis JM, Zhang CZ, Maire CL, Jung J, Manzo VE, Adalsteinsson VA, et al. EGFR variant heterogeneity in glioblastoma resolved through single-nucleus sequencing. Cancer Discov. 2014;4(8):956-71.
13. Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. Nat Genet. 2013;45(10):1141-9.
14. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. N Engl J Med. 2015;372(26):2499-508.
15. Akyerli CB, Yüksel Ş, Can Ö, Erson-Omay EZ, Oktay Y, Coşgun E, et al. Use of telomerase promoter mutations to mark specific molecular subsets with reciprocal clinical behavior in IDH mutant and IDH wild-type diffuse gliomas. J Neurosurg. 2018;128(4):1102-11.
16. Körber V, Yang J, Barah P, Wu Y, Stichel D, Gu Z, et al. Evolutionary Trajectories of IDH. Cancer Cell. 2019;35(4):692-704.e12.
17. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". Acta Neuropathol. 2018;136(5):805-10.

18. Nikolaev S, Santoni F, Garieri M, Makrythanasis P, Falconnet E, Guipponi M, et al. Extrachromosomal driver mutations in glioblastoma and low-grade glioma. *Nat Commun.* 2014;5:5690.
19. Gan HK, Cvriljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* 2013;280(21):5350-70.
20. Ülgen E, Karacan S, Gerlevik U, Can Ö, Bilguvar K, Oktay Y, et al. Mutations and Copy Number Alterations in. *Biomedicines.* 2020;8(12).



Sıra no.	Yaş	Cinsiyet	Cerrahi yöntemi	Taraf	PTEN kopya sayı değişikliği	PTEN kopya sayısı	EGFR kopya sayı değişikliği	EGFR kopya sayısı	TERT	Ki67	MGMT (metile=1)	Multifokalite	Preop. T2 hacim	Postop. T2 hacim	Event data (öldü=1)	Sağ kalın süresi
Vaka 1	76	K	CERRAHİ	R	NEU	1,65	LL	4,67	WT	0,28	0	0	130,29	112,15	0	31
Vaka 2	51	K	CERRAHİ	L	HET	1,13	LL	2,56	MUT	0,53	0	0	37,84	9,04	1	31
Vaka 3	61	E	STX	BIL	HOM	0,69	LL	3,94	MUT	0,14	0	0	N/A	N/A	0	12
Vaka 4	51	E	CERRAHİ	L	NEU	1,85	LL	4	WT	0,80	0	0	N/A	N/A	1	19
Vaka 5	47	K	STX	BIL	HET	1,57	NEU	2,04	MUT	0,35	0	1	88,66	88,66	1	13
Vaka 6	57	E	CERRAHİ	R	HET	1,24	HL	51,3	MUT	0,30	0	0	116,00	27,27	1	45
Vaka 7	42	K	CERRAHİ	R	HET	1,29	HL	84,6	MUT	0,40	0	0	58,41	34,32	1	17
Vaka 8	69	E	CERRAHİ	L	HET	0,77	LL	2,43	MUT	0,20	0	0	76,51	37,95	1	17
Vaka 9	54	K	CERRAHİ	L	NEU	1,73	LL	3,5	WT	N/A	0	0	74,09	43,66	0	14
Vaka 10	42	E	CERRAHİ	R	NEU	2,12	LL	5,14	MUT	0,25	0	0	48,25	9,44	1	28
Vaka 11	64	E	CERRAHİ	L	HET	1,51	LL	3,87	MUT	0,40	1	0	169,88	134,71	1	18
Vaka 12	68	E	CERRAHİ	L	HET	1,22	LL	4,9	MUT	0,60	0	0	59,95	22,04	1	12
Vaka 13	66	E	CERRAHİ	R	HET	1,32	LL	2,87	WT	0,10	0	0	309,36	85,53	1	30
Vaka 14	56	E	CERRAHİ	R	NEU	1,65	NEU	2,32	MUT	0,30	N/A	0	192,89	120,49	1	43
Vaka 15	79	K	STX	L	HET	0,97	NEU	1,33	MUT	0,30	0	1	41,44	41,44	1	2
Vaka 16	67	E	CERRAHİ	R	HET	1,51	LL	7,09	MUT	0,20	N/A	0	53,96	38,79	1	7
Vaka 17	40	K	STX	BIL	HET	1,35	HL	34,4	WT	0,10	N/A	1	59,95	59,95	0	60
Vaka 18	42	K	CERRAHİ	R	HOM	0,23	HL	51,8	MUT	0,20	1	0	166,30	82,88	1	28
Vaka 19	65	E	CERRAHİ	L	HET	1,16	LL	3,01	MUT	0,32	N/A	1	147,36	113,56	1	41
Vaka 20	62	E	CERRAHİ	L	HET	1,02	HL	84	MUT	0,40	N/A	1	14,12	3,20	0	56
Vaka 21	54	K	CERRAHİ	L	HET	1,1	LL	9,71	MUT	0,10	N/A	0	88,38	62,63	1	59
Vaka 22	53	E	STX	L	HET	1,47	LL	2,56	MUT	0,15	0	0	271,95	271,95	1	21
Vaka 23	64	K	CERRAHİ	L	HET	1,36	HL	150	MUT	0,22	N/A	0	92,15	61,87	1	40
Vaka 24	68	K	STX	R	HOM	0,08	LL	2,42	MUT	0,15	0	0	38,91	38,91	1	5
Vaka 25	60	K	CERRAHİ	R	HOM	0,68	HL	63	MUT	0,40	N/A	0	127,53	16,05	1	16
Vaka 26	47	E	CERRAHİ	R	HET	0,9	LL	3,5	WT	0,30	N/A	0	63,53	30,02	1	8
Vaka 27	67	E	STX	BIL	HET	1,4	LL	2,72	MUT	0,10	0	0	54,70	54,70	1	4
Vaka 28	62	E	CERRAHİ	R	HET	0,84	HL	91,4	MUT	0,33	0	1	109,09	6,62	1	13
Vaka 29	41	E	CERRAHİ	L	NEU	2,23	LL	2,54	MUT	0,10	0	1	171,06	85,27	0	18
Vaka 30	57	E	STX	BIL	HET	1,39	LL	2,82	MUT	0,12	0	0	48,18	48,18	1	5
Vaka 31	63	E	CERRAHİ	BIL	HET	0,79	HL	59,3	MUT	N/A	1	0	180,10	116,66	1	12

Vaka 32	60	E	CERRAHİ	R	HET	0,79	HL	28,3	WT	0,50	N/A	0	93,50	35,40	1	25
Vaka 33	55	K	CERRAHİ	L	HET	1,21	HL	68	MUT	0,40	N/A	1	73,19	19,69	1	9
Vaka 34	46	E	CERRAHİ	L	NEU	1,76	HL	108	MUT	0,40	0	0	52,77	12,70	1	12
Vaka 35	74	E	CERRAHİ	L	HOM	0,46	HL	19,8	MUT	0,60	1	1	109,68	69,54	1	24
Vaka 36	55	E	CERRAHİ	R	HET	1,5	HL	131	MUT	0,30	0	0	16,27	3,00	1	12
Vaka 37	69	K	CERRAHİ	R	HET	0,88	LL	6,6	MUT	0,35	N/A	0	60,26	23,52	0	37
Vaka 38	64	E	CERRAHİ	BIL	HET	0,87	HL	28,7	MUT	0,40	1	0	40,48	27,16	1	10
Vaka 39	53	E	STX	L	HET	0,99	HL	36,1	MUT	N/A	N/A	0	81,05	81,05	0	14
Vaka 40	49	E	CERRAHİ	L	HET	1,34	LL	2,63	MUT	0,37	0	0	15,10	12,76	1	12
Vaka 41	70	K	STX	BIL	HET	0,94	HL	22,9	MUT	0,15	1	1	10,18	10,18	1	17
Vaka 42	41	E	CERRAHİ	R	HET	1,53	HL	152	WT	0,40	N/A	0	68,04	1,93	1	28
Vaka 43	59	K	CERRAHİ	BIL	HET	1,26	HL	106	MUT	0,45	N/A	0	77,52	24,20	1	20
Vaka 44	49	E	CERRAHİ	L	HET	1,55	LL	2,46	MUT	0,40	0	1	21,17	2,50	1	29
Vaka 45	76	K	CERRAHİ	R	HET	1,28	LL	2,98	MUT	0,25	0	0	111,52	41,43	0	44
Vaka 46	61	K	STX	L	HET	1,39	HL	16,2	MUT	N/A	0	0	11,50	11,50	1	5
Vaka 47	61	K	CERRAHİ	R	HET	0,84	HL	73,5	MUT	0,30	0	1	110,03	61,17	1	13
Vaka 48	60	E	CERRAHİ	BIL	HET	1,41	HL	61,2	MUT	0,20	0	0	66,10	15,72	1	5
Vaka 49	50	K	CERRAHİ	R	NEU	1,77	NEU	2,31	MUT	0,20	0	0	203,24	74,40	1	26
Vaka 50	46	K	STX	BIL	HET	1,36	HL	75	MUT	0,50	0	1	108,31	108,31	1	19
Vaka 51	50	K	CERRAHİ	R	HOM	0,34	LL	2,61	WT	0,40	N/A	0	81,66	56,13	1	23
Vaka 52	54	E	CERRAHİ	L	NEU	1,98	LL	3,79	WT	0,40	N/A	0	22,73	12,30	1	25
Vaka 53	69	E	CERRAHİ	R	HOM	0,55	LL	2,79	MUT	0,40	N/A	1	51,50	38,72	1	13
Vaka 54	76	K	CERRAHİ	R	HET	1,03	NEU	2,39	MUT	0,20	1	1	119,37	23,02	0	33
Vaka 55	60	E	CERRAHİ	L	HET	0,99	HL	128	WT	0,25	0	1	58,87	31,39	1	27
Vaka 56	75	E	CERRAHİ	R	HOM	0,59	HL	40,3	MUT	0,30	N/A	0	13,98	1,85	1	32
Vaka 57	69	K	CERRAHİ	R	HOM	0,57	HL	87	MUT	0,29	0	0	49,45	2,20	1	15
Vaka 58	73	K	STX	BIL	NEU	1,62	LL	2,55	MUT	0,25	1	1	70,09	70,09	0	6
Vaka 59	58	K	CERRAHİ	R	HET	0,78	HL	58,6	MUT	0,20	0	0	5,19	3,11	1	21
Vaka 60	55	K	STX	L	HET	0,94	LL	3,11	MUT	0,45	1	0	113,56	113,56	1	32
Vaka 61	64	E	STX	R	HET	1,45	LL	2,93	MUT	N/A	0	0	113,56	113,56	1	18
Vaka 62	66	E	CERRAHİ	R	HET	1,25	HL	92,1	MUT	N/A	1	0	116,76	82,75	1	26
Vaka 63	58	K	CERRAHİ	R	HET	1,06	LL	2,89	MUT	0,70	N/A	0	16,47	14,92	1	37
Vaka 64	64	K	CERRAHİ	L	HOM	0,27	NEU	1,62	WT	0,07	N/A	0	165,03	80,28	0	86
Vaka 65	52	E	STX	BIL	NEU	1,82	LL	2,84	MUT	0,10	N/A	0	196,27	196,27	1	22
Vaka 66	71	E	CERRAHİ	R	HET	1,08	LL	2,51	MUT	0,40	N/A	0	173,47	91,71	0	24

Vaka 67	68	E	CERRAHİ	R	HET	1,2	LL	2,67	MUT	0,24	1	0	148,96	43,96	1	9
Vaka 68	51	E	STX	BIL	HET	1,13	LL	2,55	MUT	0,10	0	0	109,36	109,36	0	5
Vaka 69	48	K	CERRAHİ	R	HOM	0,37	LL	2,71	MUT	0,16	1	0	37,06	23,85	1	13
Vaka 70	53	K	CERRAHİ	R	HET	1,43	HL	153	MUT	0,45	0	0	77,21	42,95	1	16
Vaka 71	50	E	CERRAHİ	R	HET	1,34	HL	14,1	WT	0,13	N/A	0	86,92	29,14	1	73
Vaka 72	40	E	CERRAHİ	L	HET	1,13	HL	71,3	MUT	0,40	N/A	0	91,24	4,21	1	2
Vaka 73	60	K	CERRAHİ	L	HET	1,13	HL	161	MUT	0,55	0	1	97,39	46,52	0	35
Vaka 74	40	E	CERRAHİ	R	HET	0,74	LL	3,69	MUT	0,30	0	0	89,99	44,89	1	17
Vaka 75	70	E	CERRAHİ	L	HOM	0,57	NEU	1,92	MUT	0,30	N/A	0	53,43	50,18	1	5
Vaka 76	57	E	STX	BIL	HET	0,99	NEU	2,34	MUT	0,40	1	0	48,37	48,37	1	19
Vaka 77	72	K	CERRAHİ	L	HET	1,11	LL	3,69	MUT	0,30	N/A	0	18,00	-	0	38
Vaka 78	46	E	CERRAHİ	L	HOM	0,59	HL	158	WT	0,16	0	0	61,92	48,70	0	42
Vaka 79	79	K	CERRAHİ	R	HET	1,08	HL	186	MUT	0,30	1	1	153,36	72,47	0	35
Vaka 80	70	K	CERRAHİ	R	HET	1,21	HL	98,9	MUT	0,20	0	0	87,12	47,13	1	7
Vaka 81	54	K	STX	BIL	HET	0,88	NEU	2,25	WT	0,30	1	0	93,40	93,40	1	23
Vaka 82	59	E	STX	R	HET	0,82	HL	99	MUT	0,50	1	0	105,59	105,59	1	15
Vaka 83	41	E	CERRAHİ	R	HET	1,75	HL	36,9	MUT	0,19	0	0	108,87	54,36	1	12
Vaka 84	71	K	CERRAHİ	L	HET	0,92	LL	3,93	MUT	0,37	N/A	0	10,09	9,78	1	18
Vaka 85	59	E	CERRAHİ	L	HET	0,77	HL	33,2	MUT	0,60	1	0	65,79	18,55	1	24
Vaka 86	49	E	CERRAHİ	L	HET	1,21	LL	3,27	MUT	0,25	0	0	143,33	66,05	1	14
Vaka 87	53	E	CERRAHİ	L	HET	0,94	HL	90	MUT	N/A	1	0	56,05	11,90	1	22
Vaka 88	60	K	STX	L	HET	1,27	LL	8,02	MUT	0,10	1	0	182,12	182,12	1	12
Vaka 89	48	E	CERRAHİ	R	NEU	1,76	HL	296	WT	0,28	1	0	48,06	25,87	0	15
Vaka 90	49	E	CERRAHİ	L	HOM	0,6	NEU	2,25	MUT	0,30	N/A	0	103,13	13,57	1	31
Vaka 91	60	K	CERRAHİ	L	HOM	0,67	LL	2,93	MUT	0,40	N/A	0	54,99	25,07	1	38
Vaka 92	62	E	CERRAHİ	L	HOM	0,64	HL	45,9	WT	0,20	N/A	0	263,12	113,83	0	8
Vaka 93	54	K	CERRAHİ	L	HET	1,31	HL	26,2	WT	0,10	N/A	0	35,83	21,75	1	24
Vaka 94	63	K	CERRAHİ	L	HET	1,21	NEU	2,13	MUT	0,22	1	0	63,07	50,17	1	31
Vaka 95	85	K	STX	R	HET	1,16	LL	2,9	MUT	0,30	N/A	1	70,26	70,26	1	6
Vaka 96	29	K	CERRAHİ	L	HET	1,31	LL	3,7	MUT	N/A	1	0	21,70	6,76	0	30
Vaka 97	58	E	STX	L	HET	0,82	NEU	1,39	MUT	0,12	N/A	0	150,77	150,77	1	3
Vaka 98	67	E	CERRAHİ	R	HET	0,98	NEU	1,99	MUT	0,50	1	0	162,23	78,55	1	5
Vaka 99	32	K	CERRAHİ	BIL	HET	1,01	HL	19,4	WT	0,50	N/A	0	222,44	94,48	1	16
Vaka 100	69	E	CERRAHİ	L	HET	0,63	HL	50,5	MUT	0,20	N/A	0	76,51	37,95	1	17

Tablo 2: Çalışma örnekleminin detayları