

**Új, rekurrens *NTRK1* mutációval jellemezhető
dedifferenciált liposarcómák**

Doktori értekezés

Dr. Lippai Zoltán

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Sápi Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kulka Janina, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Pápai Zsuzsanna, Ph.D., címzetes egyetemi tanár

Dr. Antal Imre, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2024

1. Bevezetés

A dedifferenciált liposarcoma a liposarcoma egyik gyakori formája, mely leggyakrabban retroperitonealis elhelyezkedésű, noha ritkábban, de előfordulhat a mediastinumban, a fej-nyak régióban, a törzsön, illetve akár a végtagokon is. A kezelés alappillére, ahogyan az a szolid rosszindulatú daganattal rendelkező betegek ellátásában megszokott, a sebészi eltávolítás, mindazonáltal radioterápia és hagyományos, antraciklin-alapú kemoterápia alkalmazására is sor kerülhet, bár ezen modalitások eredményessége nem kifejezetten kecsegtető. Mindezek fényében feltétlenül szükséges lenne a dedifferenciált liposarcoma tekintetében a terápiás lehetőségek spektrumának kiszélesítése és további új, célozható molekuláris elváltozások identifikálása.

Az *NTRK* géncsalád három génből áll (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*), melyek három tirozin kináz receptort kódolnak (*TRKA*, *TRKB*, *TRKC*). A géncsaládot érintő géneltérések közül a legismertebbek a fúziók, minthogy azok rosszindulatú daganatok kialakulásához vezethetnek. Számos malignus tumorban leírásra kerültek már *NTRK* fúziók.

Az *NTRK* géncsalád jelenkori jelentőségét a molekuláris target terápia adja. Pár évvel ezelőtt kifejlesztésre kerültek specifikus *TRK* gátlószerek, melyek minden olyan rosszindulatú daganat esetén adhatók, melyeknél kimutatásra kerül *NTRK* fúzió. A kezelésre rezisztencia tud kialakulni, a tirozin kináz domén mutációi révén.

Csak hogy nemrégiben azonosításra kerültek nem-fúziós *NTRK* géneltérések is (pontmutációk) rosszindulatú daganatokban, melyek onkogénnek bizonyultak, mitöbb ezek reagáltak a specifikus TRK gátlószerekre. Éppen ezért érdemes lenne a nem-fúziós géneltérésekre nagyobb fókuszot helyezni a kutatások során.

A nemzetközi irodalmi adatok alapján pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálattal, mely mindhárom TRK fehérje kimutatására alkalmas, pozitívnak bizonyultak bizonyos miogén vagy miogén differenciációt mutató lágyszövetdaganatok, melyeknél a pan-TRK immunpozitivitás lehetséges okaként kizárásra kerültek *NTRK* fúziók. Éppen ezért miogén differenciációt mutató dedifferenciált liposarcoma eseteket vontunk be vizsgálatunkba, hogy a viszonylag magas negatív prediktív értékű pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálattal előszűrt, azaz immunpozitív esetek *NTRK* génjeit vizsgáljuk meg.

2. Célkitűzés

Kutatásunk során az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk az *NTRK* géneltérések lehetséges szerepét dedifferenciált liposarcomában. Mindehhez figyelembe vettük azt a tényt, hogy a dedifferenciált liposarcoma olyan sarcoma, mely miogén fenotípust mutathat. Azzal a feltételezéssel élünk, hogy a TRK fehérjét túlexpresszáló esetek egy részében *NTRK* géneltéréseket azonosíthatunk. Pan-TRK immunhisztokémiai vizsgálattal előszelektált dedifferenciált liposarcoma esetekben az *NTRK* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióinak vizsgálatát terveztük, géneltérések után kutatva. Továbbá terveztük, hogy amennyiben találunk érdemi genetikai eltérést, annak pontos jelentőségének meghatározására funkcionális vizsgálatokat végzünk majd el.

3. Módszerek

Esetek kiválasztása

Összesen százharmincegy miogén differenciációt mutató dedifferenciált liposarcoma esetet vontunk be vizsgálatunkba. A diagnózis a klinikai jellemzőkön, a hematoxilin-eozin festett metszeten fénymikroszkóppal azonosított morfológiai eltéréseken, illetve az *MDM2* és/vagy *CDK4* gének molekuláris vizsgálatán és/vagy az általuk kódolt fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatán alapult. A simaizom aktin és/vagy dezmin antitesttel végzett immunhisztokémiai reakció segített a miogén differenciációt mutató esetek kiválasztásában.

Immunhisztokémia

Minden beteg formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkjának kettő tumorgazdag területéről vettünk mintát és helyeztük azokat szöveti multiblokkokba. Antitest specifikus epitóp feltárás követően a szöveti multiblokk metszeteken, illetve az egyes blokkok teljes metszetein az immunfestés az alábbi antitestek alkalmazásával történt: pan-TRK (pan-TRK, Ventana) simaizom aktin (smooth muscle actin, Dako), dezmin (desmin, Dako), AKT (Akt, Cell Signaling Technology), foszfo-AKT (phospho-Akt, Cell Signaling Technology), ERK (Erk1/2, Cell Signaling Technology), foszfo-

ERK (phospho-Erk1/2, Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology). Az AKT, foszfo-AKT, ERK, foszfo-ERK, simaizom aktin, és dezmin immunhisztokémiai vizsgálatokat illetőleg teljes metszeteket alkalmaztunk.

Polimeráz lánreakció

A teljes DNS-t formalinnal fixált, paraffinba ágyazott blokkokból izoláltuk. Az *NTRK1-3* gének tirozin kináz domént kódoló alrégióit lefedő primereket a Primer3Plus platform felhasználásával terveztük. A polimeráz lánreakciót az általunk tervezett primerek és az AmpliTaq Gold™ Master Mix 360 alkalmazásával hajtottuk végre.

Sanger szekvenálás

A polimeráz lánreakciót az ExoSAP-IT™ termék segítségével végrehajtott tisztítás követte. A ciklusszekvenálás a BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit és a BigDye™ Terminator v1.1 és v3.1 5X Sequencing Buffer alkalmazásával történt. A szekvenálási reakciók során létrejött termékeket Performa® DTR Gel Filtration Cartridge használatával tisztítottuk meg. A kapilláris elektroforézist 3500 Genetic Analyzer készülékkel végeztük el. Az NG_007493.1, NG_012201.2 és NG_029619.1 referencia szekvenciákat használtuk a BioEdit 7.0 szoftvert által végrehajtott szekvencia-illesztés során.

Fluoreszcens in situ hibridizáció

A fluoreszcens *in situ* hibridizációt formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkok 3 μm -es metszetein végeztük el. Az elemzéshez az *NTRK1/2/3*, *MDM2*, *CDK4* gének kereskedelmi forgalomba hozott próbáit használtuk a kromoszómák szerkezetbeli és számbeli eltéréseinek vizsgálatára. Az *NTRK* gének átrendeződését akkor állapítottuk meg, ha a tumorsejtek legalább 20%-a mutatott az alkalmazott *NTRK* próbákkal jelsztévalást ('split signal'). Poliszómiát vagy kópiaszám növekedést akkor állapítottunk meg, ha az átlagos *NTRK1/2/3* szignál kópiaszáma ≥ 3 volt. Az *MDM2* vagy *CDK4* génamplifikáció tekintetében pozitívnak tekintettük azokat az eseteket, amikor 100 megszámlált tumorsejtből legalább 20 mutatott négynél több zöld jelet (az *MDM2* vagy *CDK4* gén kópiáinak száma) és emellett csak két narancssárga jel (centromer régió kontroll próba) volt azonosítható.

Újgenerációs szekvenálás

A genomikus DNS-t, illetve a teljes RNS-t formalin fixált, paraffinba ágyazott blokkokból származó mintákból izoláltuk. A minták tumorsejt százalékos arányának becslését kórszöveti vizsgálatokkal végeztük. 120 ng DNS 52 μl térfogatban történő vágását kiviteleztük a Covaris E220 Focused-ultrasonicator alkalmazásával. A kettős szálú DNS-fragmentumok és az RNS-molekulák méretének ellenőrzése a TapeStation 2200 használatával

történt. Az Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay könyvtár-előkészítési munkafolyamata a gyártó protokollja szerint történt. Az újgenerációs szekvenálást az Illumina NextSeq 2000 platformon hajtottuk végre. A bioinformatikai elemzést az Illumina TruSight Oncology 500 Local App v2.1 alkalmazással végeztük. Röviden, nyers BCL fájlokat töltöttünk le, a FASTQ generálást a bcl-convert szoftver végezte. A hg19 referenciagenomhoz való szekvencia-illesztést a Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM) végezte a SAMtools segédprogrammal együtt. Read összeesési analízist végeztünk annak érdekében, hogy eltávolítsuk az ismétlődő read-eket, amelyeket egyedi molekuláris azonosítók jelöltek meg. Az indel átrendezést és összeillesztést a Gemini végezte. Az alacsony frekvenciában jelen lévő variánsok azonosítását a PISCES hajtotta végre, amely kimenetet a Pepe szoftverkomponens szűrte. Az Illumina Annotation Engine a COSMIC (v84), ClinVar (2019-02-04), dbSNP (v151), 1000Genomes (Phase 3 v5a), gnomAD (2.1), RefSeq és Ensembl (VEP build 91) adatait felhasználva annotálta a kisebb variánsokat. A kópiaszám variáció hívást a CRAFT végezte. Az RNS-alapú analízishez minden mintát 30 millió leolvasásra csökkentettünk, majd a STAR segítségével a hg19 referencia genomhoz és a GENCODEv19 referencia transzkriptomhoz igazítottuk. A duplikátumokat a Picard duplikátumjelölő algoritmussal jelöltük, a fúziós hívást Manta végezte. A 'splice' variánsokat, a tumor mutációs terhelést és a mikroszatellita instabilitását belső fejlesztésű algoritmusok határozták meg. A további klinikai értelmezéshez a Qiagen Clinical Insight Interpret

szoftvert használtuk, amely variánszűrést és további annotációkat alkalmaz. A genomikai adatok vizuális megjelenítésére az Integrative Genomics Viewer (IGV) programot alkalmaztuk.

A vad típusú, illetve a mutáns NTRK1 ORF klónozása lentivirális expressziós vektorba

A humán *NTRK1* cDNS-t a GenScript cégtől szereztük be. Ezt a plazmidot helyspecifikus mutagenezissel módosítottuk, egy- és kettő pontmutációt tartalmazó vektorok létrehozására. A mutációk jelenlétét a módosított plazmidklónok inzertjének Sanger szekvenálásával igazoltuk. A vad típusú és a mutált (H604Y; G613V; H604Y és G613V) *NTRK1* inzerteket PCR amplifikáltuk. A PCR termékeket egy pLV-CMV-Puro lentivírus vektor XhoI és XbaI helyére építettük be hagyományos ligálással. A rekombináns lentivírus klónokban kolónia PCR-rel és XhoI-XbaI, valamint NdeI-NotI kettős emésztéssel vizsgáltuk az inzert jelenlétét, majd pontos szekvenciájukat Sanger szekvenálással határoztuk meg. Humán sejtek transzfekciójához a validált rekombináns lentivírus plazmidokat *E. coli* sejtekből izoláltuk.

Lentivírus termelés és transzdukció

Az *NTRK1* variánsok lentivirális termeléséhez HEK 293T sejtek transzfekciója történt lentivirális „csomagoló” plazmidokkal és

NTRK1 p.H604Y; *NTRK1* p.G613V; *NTRK1* p.H604Y+G613V; vad típusú *NTRK1*; vagy GFP-pLV-CMV-Puro tartalmazó plazmidokkal. A lentivirus-mediált transzdukciós kísérletekhez VH10 fibroblast, valamint VH10-hTERT immortalizált fibroblast, illetve T449 liposarcoma sejtek kerültek megfertőzésre az *NTRK1* gént tartalmazó, harmadik generációs lentivírusok által.

Proliferációs vizsgálat és dózis-válasz görbék

A különböző sejtvonalakba transzdukált különböző *NTRK1* konstrukciók növekedési sebességre gyakorolt hatásának nyomon követésére a sejteket 96 lyukú lemezre oltottuk és 7 nap elteltével metabolikus vizsgálatot végeztünk PrestoBlue reagens, valamint kristályibolya festés segítségével a viábilis sejtek mennyiségének meghatározásához. A dózis-válasz görbe becslésekhez a következő sejtűrűségek kerültek fel a lemezre: VH10-hTERT: 5000, T449: 5000, duplikátumban, és legalább két független oltásból történtek a mérések. Egy nappal azután, hogy az oltóközeget feltöltöttük megfelelő tápközeggel, amely vagy 250 μ M és 80 nM közötti koncentrációban LOXO-101-et (larotrectinib) vagy 200 μ M és 0,2 nM közötti koncentrációban LOXO-195-öt (selitrectinib) tartalmazott. A sejteket két tápközeg körülmény között teszteltük, nevezetesen: NGF hozzáadásával vagy hozzáadása nélkül. Az összes viabilitás mérés Victor PerkinElmer 2030 Explorer által került kivitelezésre, az adatokat Microsoft Excelbe exportáltuk további

feldolgozás és normalizálás céljából, végül a dózis-válasz számításokat a Graphpad Prism szoftvereszköz segítségével végeztük.

H604Y/G613V in silico modellezése LOXO-101 és LOXO-195 jelenlétében

A LOXO-101 és a LOXO-195 TRK inhibitorok az aktív konformációjú, vad típusú TRKA fehérjeszerkezethez történő kötődésének vizsgálata történt, a Glide szoftver alkalmazásával. Ezt követően a kötődési helyzet értékelése az irodalomban található kötődési helyzetekkel való összehasonlítás alapján történt. A mutált modellek (G595R; G613V; H604Y; G613V/H604Y) megalkotása a Maestro-val történt a kötődési helyzetek használatával. A molekuláris dinamikai szimulációkat a Desmond szoftverben végeztük el. A pályákat a Desmond Simulation Event Analysis és a pályagörbe vizualizáció segítségével elemeztük. Az ábrák PyMOL Molecular Graphics System segítségével készültek.

4. Eredmények

A dedifferenciált liposarcoma diagnózisának felállítása a kórszövettani eltéréseken, továbbá az MDM2 és/vagy CDK4 immunhisztokémiai reakciók, vagy szükség esetén FISH vizsgálat pozitívításán alapult. A vizsgálatunkba bevont betegek medián életkora 65 év (szórás: 12,1, tartomány: 30-90 év) volt, a férfi:nő arány 1,3 (74:57).

A 131 dedifferenciált liposarcomából 116 esetben sikerült a pan-TRK immunhisztokémiai reakciót elvégezni, melyek közül 75 esetben volt pozitív a reakció. Az immunreakciók erőssége és kiterjedése széles tartományban mozgott.

A pan-TRK immunpozitivitást mutató esetek (75) közül 46 esetben végeztük el az *NTRK1-3* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióinak Sanger szekvenálását. Az *NTRK3* gén tirozin kináz domént kódoló régiójában nem azonosítottunk semmilyen eltérést sem. Az *NTRK1* és *NTRK2* gének esetében szinonim pontmutációk voltak jelen, továbbá, misszensz mutációk is detektálásra kerültek az *NTRK1* génben 6 esetben is. Mind a hat esetben pontosan ugyanaz a misszensz mutáció pár (*NTRK1* c.1810C>T, p.H604Y; *NTRK1* c.1838G>T, p.G613V) került azonosításra. Ezen kettős egy pontmutációt tartalmazó 6 eset egészséges, tumormentes szövetmintáit is megvizsgáltuk Sanger szekvenálással. Négy esetben az egy pontmutáció pár nem volt jelen az egészséges, tumormentes

szövetmintákban. Sajnos, a további kettő esetben nem volt elérhető egészséges, tumormentes szövetminta.

A strukturális génátrendeződés lehetőségének kizárása végett *NTRK1-3* break-apart FISH vizsgálatokat végeztünk a kettős egypontmutációt mutató 6 esetben, negatív eredménnyel, ugyanis jelszétválás nem volt azonosítható.

Ezt követően, a mutációpárt hordozó 6 eset újgenerációs szekvenálása történt az Illumina TruSight Oncology 500 segítségével. Az *NTRK1* mutáció pár mind a hat esetben detektálásra került. Ugyanakkor, semmilyen egyéb rekurrens mutáció nem volt azonosítható ezeken kívül. A genomikus adatok vizualizációja alapján megállapítható, hogy a két egypontmutáció *cis* pozícióban van, tekintettel arra, hogy a két mutáció szinte mindig ugyanazon a read-eken helyezkedik el.

A kettős egypontmutációt hordozó esetek jelátviteli útvonalainak vizsgálata foszfo-ERK és foszfo-AKT immunhisztokémiai reakciókkal történt, összehasonlítva 6 véletlenszerűen kiválasztott, pan-TRK negatív, a kettős egypontmutációt nem hordozó dedifferenciált liposarcomával. Hasonló foszfo-ERK immunfestődés volt azonosítható, mind a mutációkat hordozó, mind a mutációkat nem hordozó dedifferenciált liposarcomák esetén. A mutációkat nem hordozó dedifferenciált liposarcomák negatívnak bizonyultak foszfo-AKT antitesttel, míg a kettős egypontmutációt hordozó esetek egyértelmű pozitívítást mutattak.

Három különféle sejtvonal (fibroblast, immortalizált fibroblast, dedifferenciált liposarcoma) lentivirális transzdukciója történt *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y) vagy *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) vagy *cis* pozícióban lévő *NTRK1* c.1810C>T (p.H604Y), *NTRK1* c.1838G>T (p.G613V) vagy *NTRK1*-WT (vad típus) tartalmazó vagy üres pLV vektorokkal. A különböző lentivirális konstrukciók proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata a populáció megkettőződési idő mérésén alapult a fibroblast sejtvonalon, melynek eredménye alapján nem volt különbség e tekintetben a különböző lentivirális konstrukció típusok között. Azaz a variánsok nem voltak képesek a normál fibroblastokat transzformálni. Az immortalizált fibroblast, illetve dedifferenciált liposarcoma sejtvonalak esetén dózis-válasz mérések történtek LOXO-101, illetve LOXO-195 hatóanyagokat alkalmazva, a természetes ligand jelenlétében vagy annak hozzáadása nélkül egyaránt. Minden esetben a TRK inhibitor gátló hatása volt megfigyelhető az *NTRK1*-WT konstrukció esetén, valamint teljes rezisztencia üres vektor esetén, kivéve rendkívül nagy dózisok alkalmazásakor. Az *NTRK1* c.1838G>T variáns, illetve a *cis* pozícióban lévő *NTRK1* c.1810C>T, *NTRK1* c.1838G>T kombináció rezisztenciát mutatott a TRK inhibitor kezeléssel szemben minden transzdukált sejtvonalban, függetlenül a természetes ligand jelenlététől vagy hiányától.

Molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk annak érdekében, hogy a G613V és H604Y aminosavcserek által a LOXO-101 hatóanyaggal szemben mutatott rezisztencia mechanizmusát

megvizsgáljuk molekuláris szinten. Ennek megfelelően, szimulációkat futtattunk mind a vad típusú fehérjével, mind a kettős mutációt hordozó fehérjével. Továbbá, az egész szimuláció során megmértük a LOXO-101 hatóanyag és a 603-617 fehérjehurok között fennálló távolságot. Noha az előbb említett fehérjehurok a kettős mutált fehérjében közelebb van a TRK inhibitorhoz, mint a vad típusú fehérje esetében, de a szimuláció során tapasztalt távolságok egyike sem elég kicsi ahhoz, hogy a fent nevezett gátlószert akadályozza a kötődésében. Ezzel szemben a nemzetközi irodalomban leírt rezisztenciát okozó mutációk, mint a G595R vagy a G667C, közvetlenül gátolják a TRK inhibitor kötődését szterikus akadályoztatás révén.

5. Következtetések

A dedifferenciált liposarcomák 64%-ában (75/116) volt pan-TRK immunpozitivitás.

A pan-TRK immunpozitív dedifferenciált liposarcomák 13%-ában (6/46) kettő olyan misszensz mutációt (*NTRK1* c.1810C>T, p.H604Y; *NTRK1* c.1838.G>T, p.G613V) azonosítottunk az *NTRK1* gén tirozin kináz doménjét kódoló régióban, melyek mindig együtt vannak jelen (Sanger szekvenálás).

A pan-TRK pozitív dedifferenciált liposarcomákban az *NTRK2* és *NTRK3* gének tirozin kináz doménjét kódoló régióiban Sanger szekvenálással nem azonosítottunk eltérést.

A hat kettős mutációt hordozó eset *NTRK* break-apart FISH vizsgálatai kizárták *NTRK* fúziók jelenlétét, mint a pan-TRK immunpozitivitás lehetséges okát.

A hat kettős mutációt hordozó esetből négyenél állt rendelkezésre tumormentes szövetminta, melyek Sanger szekvenálásával a kettős mutáció egyik esetben sem volt jelen. Ezzel kizártuk csírvonal mutáció lehetőségét és igazoltuk azt, hogy a mutációk szomatikusak.

Fibroblast sejtvonal lentivirális transzdukcója révén az *NTRK1* variánsok transzformatív hatását vizsgáltuk, mely nem igazolódott, ugyanakkor az *in vitro* sejtmódel vizsgálatoknak egyértelmű korlátai vannak.

Immortalizált fibroblast és dedifferenciált liposarcoma sejtvonalakat lentivirális transzdukciót követően TRK gátlószeres környezetben inkubáltuk, s így vizsgáltuk a viábilis sejtek arányát. A G613V önmagában, illetve a H604Y variánssal kombinációban is rezisztenciához vezetett.

Fehérje modellezéssel nem találtuk a variánsok által közvetített rezisztencia egyértelmű mechanizmusát, ugyanakkor ezek akár potenciális biomarkerek is lehetnek olyan klinikai vizsgálatokban, ahol TRK gátlószereket alkalmaznak.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Zoltán Lippai, Bálint Péterfia, Gergő Papp, Katalin Dezső, Gábor Bedics, Zsuzsanna Pápai, Meindert H Lamers, Rosan CM Kuin, Károly Szuhai#, Zoltán Sági#. A recurrent NTRK1 tyrosine kinase domain mutation pair is characteristic in a subset of dedifferentiated liposarcomas. Eur. J. Cancer. 2024 May;202:114005. *IF*: 8,4

Lippai Zoltán, Sági Zoltán. A neurotrofikus tropomiozin receptor-tirozin-kináz génfüziót tartalmazó daganatok diagnosztikai megközelítése. Orv Hetil. 2020; 161(41): 1753–1763. *IF*: 0,540

Lippai Zoltán, Sági Zoltán. Az NTRK génfüziók, mint szöveta-gnosztikus biomarker szerepe különböző daganatok diagnosztikájában és célzott kezelésében. Orvoképzés. 2021; XCVI. évfolyam, 3:455-468. *IF*: -

Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent közlemények

Rónai Zsolt, **Lippai Zoltán**, Elek Zsuzsanna, Somogyi Anikó. Komplex jellegek genetikai hátterének elemzése. Orv Hetil. 2018; 159(31): 1254–1261. *IF: 0,564*

Zoltán Sági*, **Zoltán Lippai***, Gergő Papp, Lajos Hegyi, Johanna Sági, Katalin Dezső, Károly Szuhai. Nodular fasciitis: a comprehensive, time-correlated investigation of 17 cases. Mod. Pathol. (2021) 34:2192–2199. *IF: 8,209*

Imre Antal, Zsuzsanna Pápai, Miklós Szendrői, Tamás Perlaky, Katalin Dezső, **Zoltán Lippai**, Zoltán Sági. Pathol. Oncol. Res. (2022) 28:1610633. *IF: 2,8*