

# Új terápiás lehetőségek vizsgálata gyermekkori lágysz tumorokban

Doktori értekezés

**Dr. Felkai Luca**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csóka Monika, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Vízkeleti Júlia Ph.D., részlegvezető főorvos  
Dr. Szász Attila Marcell Ph.D., egyetemi oktató

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár  
Tagok: Dr. Tímár Botond, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Kriván Gergely, Ph.D., egyetemi oktató

Budapest  
2020

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	3
1. Bevezetés .....	6
1.1. Gyermekkori lágyszűrtűmörök .....	6
1.2. A gyermekkori lágyszűrtűmörök kezelése.....	9
1.3. Új terápías célpontok a szarkómák kezelésében.....	13
1.3.1. ALK.....	13
1.3.2. mTOR.....	18
1.3.3. Tumormetabolizmus.....	23
2. Célkitűzések .....	29
3. Módszerek .....	30
3.1. Betegek .....	30
3.2. Az ALK vizsgálata.....	32
3.2.1. Az ALK immunhisztokémias vizsgálata .....	32
3.2.2. ALK fluoreszcens in situ hibridizáció.....	32
3.3. Az mTOR és anyagcsere útvonalak immunhisztokémias vizsgálata .....	33
3.4. Statisztikai adatanalízis .....	36
4. Eredmények.....	37
4.1. Az ALK státusz vizsgálata.....	37
4.2. Az mTOR aktivitás vizsgálata .....	39
4.2.1. Primer minták vizsgálata.....	39
4.2.2. Kemoterápiát követően vett minták jellemzése .....	42
4.2.3. Primer és kemoterápiát követően vett minták összehasonlító analízise.....	42
4.2.4. Recidíva során vett minták jellemzése .....	44
4.2.5. Primer és recidíva során vett minták összehasonlító analízise.....	44

4.3. A metabolikus enzimek expressziójának vizsgálata .....	47
4.3.1. Primer minták jellemzése .....	47
4.3.2. Kemoterápiát követően vett minták metabolikus markereinek jellemzése ...	48
4.3.3. Recidív minták metabolikus markereinek jellemzése .....	49
4.4. A vizsgált mTOR és metabolikus markerek közötti korreláció .....	51
4.5. Esetbemutatók .....	52
4.5.1. Alveoláris rabdomioszarkóma esetbemutató .....	52
4.5.2. Inflammatorikus miofibroblasztos tumor esetbemutató .....	54
5. Megbeszélés .....	58
6. Következtetések .....	67
7. Összefoglalás .....	70
8. Summary .....	71
9. Irodalomjegyzék .....	72
10. Saját publikációk jegyzéke .....	87
11. Köszönetnyilvánítás .....	88

**Rövidítések jegyzéke**

4EBP1	eukarióta transzláció iniciáló faktor 4E kötő fehérje 1
Akt	protein kináz B
ALCL	anaplasztikus nagy sejtes non-Hodgkin limfóma
AMPK	adenozin-monofoszfát-aktivált protein kináz
ASPS	alveoláris légúrtumor
ATP	adenozin-trifoszfát
ATPB	$\beta$ -F1-ATPáz
COG	Children's Oncology Group
CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe
DAB	diamonbenzidin
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
Deptor	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DLBCL	diffúz nagy B-sejtes limfóma
DWIBS	Diffusion weighted whole body Magnetic Resonance Imaging with background body signal suppression
EML4	echinoderm microtubule-associated protein like 4
EpSSG	European paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
FATP	zsírsav transzport fehérje
FISH	fluoreszcens in situ hibridizáció
FOXO1	forkhead box protein O1
GLS	glutamináz
GLUT	glukóz transzporter
G6PDH	glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz
HGFR	hepatocita növekedési faktor
HIF1 $\alpha$	hypoxia-indukált faktor 1 $\alpha$
HK	hexokináz
Hsp70	hősokkfehérje 70
IRSG	Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group
IGF	inzulin-szerű növekedési faktor
IMT	inflammatorikus miofibroblasztos tumor

IVA	ifoszfamid, vinkrisztin, aktinomicin-D
IVAd	ifoszfamid, vinkrisztin, adriamicin
JAK	Janus-arcú kináz
LDH	laktát-dehidrogenáz
MAPK	mitogen-aktivált protein kináz
MCT1	monokarboxilát-transzporter 1
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
mRNS	messenger ribonukleinsav
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mSin1	mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mTOR komplex 1
mTORC2	mTOR komplex 2
MYC	myc avian myelocytomatosis viral oncogen
NFκB	nuclear factor κB
NPM	nucleophosmin
NSCLC	nem kissejtes tüdőkarcinóma
PAX3	paired box 3
PAX7	paired box 7
PCR	polimerase chain reaction
PFK	foszfofruktokináz
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PKC	protein kináz C
PKM2	piruvát-kináz-izoenzim M2
PLC	foszfolipáz C
PRAS40	Proline rich Akt substrate 40
Proptor	protein observed with rictor
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
Raptor	regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
Ras	Rat sarcoma virus oncogene
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin

RON	recepteur d'origine nantais
RMS	rabdomioszarkóma
SREBP	sterol regulatory elements binding protein 1-2
STAT	signal transducer and activator of transcription
TMA	tissue microarray
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex ½
VA	vinkrisztin, aktinomicin-D
VAC	vinkrisztin, aktinomicin-D, ciklofoszfamid
VACA	vinkrisztin, ciklofoszfamid és adriamicin vagy aktinomicin-D
VAIA	ifoszfamid, vinkrisztin, adriamicin vagy aktinomicin-D

## 1. Bevezetés

Az onkológiai kutatások középpontjában jelenleg a személyre szabott terápiák fejlesztése áll. Kutatásunkban lágyrész szarkómás betegek számára kerestünk új terápiás lehetőségeket. Választásunk azért erre a betegcsoportra esett, mert ezen malignitások kezelésében az elmúlt évtizedekben jelentős előrelépések nem történtek, így a túlélési eredményeik sem javultak lényegesen. Disszertációmban az anaplasztikus limfóma kináz (ALK), mammalian target of rapamycin (mTOR) és a metabolikus útvonalak jellemzését mutatom be gyermekkori lágyrészsarkómás betegek mintáin.

### 1.1. Gyermekkori lágyrésztumorok

A gyermekgyógyászati malignitások a felnőttkori megbetegedésektől eltérő entitások, biológiai viselkedésük agresszívebb, ugyanakkor kezelésre jobban reagálnak és a betegek gyógyulási esélye, túlélése is számottevően jobb a felnőttekénél. Napjainkban a betegek több mint 70 %-át meg lehet gyógyítani. Ez az eredmény azonban csak rendkívül intenzív, kombinált kezelések alkalmazásával érhető el, melyek rövid és hosszú távú mellékhatásai nem elhanyagolhatóak. (5) Fentiek miatt rendkívül fontos új terápiás eljárásokat keresni, melyekkel csökkenthetjük a késői mellékhatásokat a gyógyulási esélyek további javítása mellett.

Magyarországon évente mintegy 230-250 gyermeknél diagnosztizálnak rosszindulatú daganatos betegséget. A lágyrész tumorok az összes gyermekkori malignitás 6-8 százalékát teszik ki. A gyermekkori lágyrészsarkómák klinikai, kezelési szempontból 3 fő csoportba sorolhatók: rabdomiosarkómák (RMS-k), RMS-szerű tumorok és nem RMS-szerű tumorok. Leggyakoribb típus a RMS, mely a lágyrészsarkómás esetek mintegy felében fordul elő. A rabdomiosarkóma sejtek primitív mezenhimális sejtekből származnak és bármely testtájon megjelenhetnek. Míg a 8 évnél fiatalabb betegek esetében leggyakrabban a fej-nyaki régióban, addig kamaszok, fiatal felnőttek esetében inkább a végtagokon találhatóak meg. A megbetegedések közel két harmadát kilenc évnél fiatalabb gyermekeknél diagnosztizáljuk és enyhe fiú túlsúly figyelhető meg. (6)

Kevés olyan rizikófaktor ismert, mely a betegség kialakulásához vezethet. A prenatális röntgen sugárzás és szülői droghasználat fokozza a rabdomiosarkóma kialakulásának kockázatát. (7, 8) A megbetegedések leggyakrabban sporadikus megjelenésűek, de

bizonyos genetikai szindrómákhoz is kapcsolódhatnak. Ilyen a Li-Fraumeni-, a Beckwith-Wiedemann-, a Noonan- és a Costello-szindróma, de magasabb a rabdomyosarkóma kialakulásának esélye a neurofibromatózisban és DICER-1 mutáció jelenléte esetén, mely a pleuropulmoblasztóma genetikai markere. (9-11)

Hisztopatológiai szempontból a RMS-ák besorolhatók embrionális, alveoláris és pleomorf alosztályba, továbbá az embrionális szövettani alcsoportba tartozik a botrioid, az orsósejtes avagy szklerotizáló és az anaplasztikus variáns. Az 1. Táblázatban láthatóak a rabdomyosarkómák szövettani altípusai. Ezek a szövettani csoportok mind morfológiai megjelenésükben, mind az onkogenezist vezérlő genetikai eltéréseikben különböznek. A pontos diagnózist hematoxilin-eozin, majd különböző immunhisztokémiai festések és genetikai vizsgálatok elvégzését követően állítják fel. A rutin diagnosztika részeként Myf4, desmin és vimentin festés, illetve az alveoláris szubtypus igazolása vagy kizárása céljából fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálat készül.

**1. Táblázat: a rabdomyosarkómák szövettani besorolása, PAX-FOXO fúziós státusza.** A táblázat bal oldalán láthatóak a rabdomyosarkómák szövettani alcsoportjai, míg a jobb oldalon a fúziós státuszuk. Az embrionális, botrioid, orsósejtes/szklerotizáló, az anaplasztikus és a pleomorf variánsok PAX-FOXO fúzió negatívak. Csak az alveoláris szövettani altípust jellemzi az PAX-FOXO gének fúziója.

Szövettani alosztály	Fúziós státusz
Embrionális	
Botrioid	
Orsósejtes /szklerotizáló	PAX-FOXO
Anaplasztikus	fúzió negatív
Pleomorf	
Alveoláris	PAX-FOXO
	fúzió pozitív

Az embrionális szubtypus a leggyakoribb, közel 70 %-ban fordul elő. Habár nem társul hozzá specifikus transzlokáció, a legtöbb embrionális rabdomyosarkómának jellemzője a heterozigótaság elvesztése a 11p15 lókuszon, ahol az inzulin-szerű növekedési faktor 2 (IGF-2) gén található. (11) Ez az embrionális rabdomyosarkómák IGF-2 túltermelésével járul hozzá a sejtek növekedésének serkentéséhez. (12) A botrioid altípus az embrionális rabdomyosarkóma egy jobb prognózissal asszociált, ritka variánsa. Nevét az epiteliális felszínből szőlőfürtre emlékeztető formában előemelkedő megjelenéséről kapta. A szklerotizáló vagy orsósejtes csoport is ritka, az embrionális csoportba sorolható be, de



rosszabb kimenetellel társul. Az alveoláris szubtypus a 2. és 13. kromoszóma hosszú karja közötti, t(2;13)(q35;q14), forkhead box protein O1 (FOXO1)- paired box 3 (PAX3) gén transzlokációval jellemezhető. Ritkábban a transzlokáció az 1. kromoszóma a paired box 7 (PAX7) génjének érintettségével is történhet. Ezek a transzlokációk olyan transzkripciós faktorok aktiválásáért felelősek, melyek szerepet játszanak a tumorigenezisben, habár az érintett jelátviteli útvonalak pontosan még nem ismertek. Az alveoláris rhabdomyosarkómára jellemző a pseudo-alveolusokat formáló szerkezet. Irodalmi adatok szerint a PAX-FOXO fúzió negatív alveoláris megjelenésű rhabdomyosarkómák az embrionálishoz hasonló klinikai viselkedést mutatnak, jobb túléléssel társulnak, mint a fúzió pozitív alveoláris szerkezetű variánsok. (13) Előbbieknek megfelelően a legújabb hisztopatológiai klasszifikáció már nem morfológiai megjelenés, hanem a PAX-FOXO transzlokáció megléte illetve hiánya alapján különíti el fúzió negatív és fúzió pozitív daganatokat. (11, 14) A különböző szövettani altípusokhoz tartozó PAX-FOXO fúziós státusz az 1. Táblázatban szerepel.

Magyarországon a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően a rhabdomyosarkómák rizikóbesorolása az Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG) irányelvei alapján történik, melyet a 2. Táblázatban részletezünk.

**2. Táblázat: IRSG rizikófaktorok.** Az alábbi táblázatban láthatóak a prognosztikai faktorok, melyek alapján történik a CWS protokollban a betegek rizikóbesorolása. (3)

<b>Szövettani besorolás</b>	Kedvező	Embrionális, orsósejtes, botrioid
	Kedvezőtlen	Alveoláris, beleértve a szolid-alveoláris variánst
<b>Sebészeti eltávolítás</b>	IRSG I	Primer komplett rezekció (R0): megegyezik a SIOP pT1 beosztással
	IRSG II	Mikroszkópos maradvány (R1) vagy primeren komplett rezekció nyirokcsomó érintettséggel (N1)
	IRSG III	Makroszkópos maradvány (R2)
<b>Elhelyezkedés</b>	Kedvező	Orbita, genito-urinális (nem hólyag vagy prosztata), paratesztikuláris, vagina, méh, valamint a nem parameningeális fej-nyaki elhelyezkedés
	Kedvezőtlen	Orbita csont vagy parameningeális érintettséggel, végtagi, hólyag, prosztata, és minden más nem említett régióban elhelyezkedő daganat
<b>Nyirokcsomó érintettség</b>	Kedvező	N0
	Kedvezőtlen	N1
<b>Kor és kiterjedés</b>	Kedvező	A daganat legnagyobb kiterjedése $\leq 5$ cm ÉS a beteg $<10$ év
	Kedvezőtlen	A daganat legnagyobb kiterjedése $> 5$ cm ÉS a beteg $\geq 10$ év

A prognosztikai faktorok között szerepel a szövettani besorolás, a sebészeti rezekció kivitelezhetősége, a daganat megjelenésének helye, a nyirokcsomó érintettség, a metasztázisok jelenléte, a beteg kora és a daganat legnagyobb kiterjedése. A prognózis szempontjából kedvezőbb, ha a tumor embrionális, orsósejtes vagy botrioid altípusú, illetve, ha az R0 rezekció kivitelezhető, a daganat az orbitában, a genitouretrális rendszerben (kivéve a hólyagot és a prosztatát) és nem parameningeális fej-nyaki régióban helyezkedik el. Szintén jobb prognózist jelent, ha nincs nyirokcsomó érintettség, valamint ha a gyermek nem múlt el 10 éves és a daganat egyik kiterjedésében sem éri el az 5 centimétert. A fenti prognosztikai faktorok alapján történik meg a betegek rizikócsoportokba történő besorolása, mely meghatározza a kezelésük intenzitását és hosszát. A betegek rizikóbesorolása a 3. Táblázatban kerül bemutatásra. (3)

**3. Táblázat: CWS rizikóbesorolás.** A 3. táblázatban látható a különböző prognosztikai faktorok alapján történő rizikóbesorolás, mely a kezelés meghatározásának az alapját képezi. (3)

Rizikó besorolás						
Rizikó-csoport	Alcsoport	Szövettani besorolás	Posztoperatív besorolás	Elhelyezkedés	Nyirokcsomó érintettség	Méret és kor
Alacsony	A	Kedvező	I	Bármely	N0	Kedvező
	B	Kedvező	I	Bármely	N0	Kedvezőtlen
Standard	C	Kedvező	II, III	Kedvező	N0	Bármely
	D	Kedvező	II, III	Kedvezőtlen	N0	Kedvező
	E	Kedvező	II, III	Kedvezőtlen	N0	Kedvezőtlen
Magas	F	Kedvező	II, III	Bármely	N1	Bármely
	G	Kedvezőtlen	I, II, III	Bármely	N0	Bármely
Nagyon magas	H	Kedvezőtlen	II, III	Bármely	N1	Bármely

### 1.2. A gyermekkori lágyszövetű daganatok kezelése

A lágyszövetű daganatok kezelésének kulcsfontosságú eleme a daganat lokális ellátása sebészi eltávolítással és/vagy sugárkezeléssel, mely szisztémás kemoterápiás kezeléssel egészül ki. A kemoterápia a tumor méretének csökkentését és a metasztázisok eliminálását célozza meg. Amennyiben a primer daganat ép széllel történő eltávolítása csonkolás nélkül lehetséges, akkor mindenképp az az első választandó terápiás beavatkozás. Amennyiben ez nem lehetséges, először csak nyílt biopsziás mintavétel történik a diagnózis felállítása céljából. Ezekben az esetekben a daganat lokális ellátása

neoadjuváns kemoterápiás kezelés (kisebb tumortömeg esetén) után történik. A másodlagos helyi ellátás lehetőség szerint sebészi eltávolítás, azonban ha az R0 rezekció nem kivitelezhető, sugárkezelés válik szükségessé. (6)

A világon három nagy gyermek szarkóma munkacsoport működik, melyek a rabdioszarkómák vizsgálatában és kezelésében végeznek átfogó tanulmányokat; az észak-amerikai Children's Oncology Group (COG) Soft Tissue Sarcoma Committee, a főként európai és dél-amerikai országokat egyesítő European paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (EpSSG), és a Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS), melyben javarészt a németajkú országok munkacsoportjai egyesülnek. A gyermekek rizikóbesorolása és kezelése Magyarországon a CWS-2012 nemzetközi protokoll alapján történik, melyet az EpSSG munkacsoporttal közösen hoztak létre.

A kemoterápiás kezelés során különböző gyógyszerkombinációkat alkalmaznak; a VA blokk vinkrisztin és aktinomicin-D, a VAC blokk vinkrisztin, aktinomicin-D és ciklofoszfamid, a VACA blokk vinkrisztin, ciklofoszfamid és adriamicin vagy aktinomicin-D, az IVA blokk ifoszfamid, vinkrisztin, aktinomicin-D, az IVAd blokk ifoszfamid, vinkrisztin és adriamicin, valamint a VAIA blokk ifoszfamid, vinkrisztin, adriamicin vagy aktinomicin-D kombinációjából áll. Az alacsony rizikójú betegek, akik az A csoportba sorolhatók, 4 VA ciklust kapnak a sebészi eltávolítást követően. A standard rizikójú betegek a B csoportban 4 IVA és 5 VA2, a C csoportban 5 IVA és 4 VA2, a D csoportban 9 IVA blokkot kapnak a lokális ellátással kiegészítve. A magas rizikójú betegek (E, F, G rizikócsoportok) 9 IVA blokkot kapnak, illetve a kiemelten magas rizikójú (H csoport) betegek VAIA III séma szerint IVAd és IVA blokkokat váltva, összesen 6 ciklust, majd ezt követően 3 IVA kemoterápiás ciklust kapnak. A kezelési protokollok összesítve a 4. Táblázatban található meg. (3) RMS-szerű tumorok esetében VAIA III séma szerint részesülnek kezelésben. Nem-RMS szövettan esetén az alacsony és standard rizikócsoportba eső betegek nem részesülnek citosztatikus kezelésben, mindössze a tumor lokális ellátása történik, míg a magas rizikójú betegek esetében VAIA III séma alkalmazása javasolt. A nem-RMS-szerű tumorok közé tartozik az alveoláris lágyszarkóma (ASPS) és az inflammatorikus miofibroblasztos tumor (IMT) is. A metasztatikus betegségek esetében CEVAIE séma szerint részesülnek 9 alternáló I3VA (ifoszfamid, vinkrisztin, aktinomicin-D), CEV (karboplatin, epirubicin és vinkrisztin) valamint I3VE (ifoszfamid, vinkrisztin, etopozid) kemoterápiás blokkban.

**4. Táblázat: A RMS-ás betegek esetében alkalmazott CWS kezelési protokoll.** A korábban bemutatott IRSG rizikóbeosztás szerinti kezelési ágak láthatóak a lenti táblázatban. A betegek alacsony, standard, magas, nagyon magas rizikójú, illetve metasztatikus alcsoportba kerülnek beosztásba. Ezen rizikócsoporthoz további alcsoportokra bonthatóak. (3)

Rizikócsoporthoz	Alcsoport	Kemoterápia	Lokális ellátás
<b>Alacsony</b>	<b>A</b>	4 VA	csak sebészi
	<b>B</b>	4 IVA + 5 VA2	sebészi és sugárkezelés
<b>Standard</b>	<b>C</b>	5 IVA + 4 VA2	sebészi és sugárkezelés
	<b>D</b>	9 IVA	sebészi és sugárkezelés
	<b>E</b>	9 IVA	sebészi és sugárkezelés
<b>Magas</b>	<b>F</b>	9 IVA	sebészi és sugárkezelés
	<b>G</b>	9 IVA	sebészi és sugárkezelés
	<b>H</b>	VAIA III	sebészi és sugárkezelés
<b>Nagyon magas</b>	<b>H</b>	VAIA III	sebészi és sugárkezelés
<b>Metasztatikus ág</b>		CEVAIE	sebészi és sugárkezelés

Az elmúlt évtizedekben bebizonyosodott, hogy sem az alkiláló ágensek dózisának emelésével, sem a kemoterápia intenzitásának fokozásával, sem pedig autológ őssejt transzplantációval nem lehet a magas rizikójú betegek túlélését javítani. (15) Így a figyelem mindinkább a célzott terápiás gyógyszerek felé fordul. Gasztrointesztinális strómális tumor, IMT és ASPS esetében célzott terápiás kezelés lehetséges például tirozinkináz inhibitorok, angiogenezis gátlók alkalmazásával. (16-18) Más megközelítést alkalmazva az EpSSG munkacsoport alacsony dózisu vinorebin és ciklofoszfamid kombinációját fenntartó kezelésként vizsgálja a magas kockázatú RMS betegpopulációban. Az előzetes eredmények alapján feltételezhető, hogy ez a protokoll tud javítani a hosszú távú túlélésen. (19)

A lokális tumor kontroll elérése érdekében azon betegek, akiknél a daganatot nem lehet ében eltávolítani, sugárkezelésre kerül sor. A folyamatos technikai fejlődésnek köszönhetően egyre pontosabb a sugárkezelés tervezése, így egyre kisebb dózisban éri sugárterhelés a daganat körüli egészséges szöveteket. Bizonyos esetben, ahol a lokalizáció miatt a sugárkezelés olyan hosszútávú mellékhatásokat okozna, mely a gyermekek életminőségét rontja (mint például a kismedence, prosztatata, orbita,

parameningeális tumorok), olyan biztonságosabb sugárterápiás modalitásokat is számba kell venni, melyek a környező szövetek megkímélésével teszik lehetővé a tumor hatékony helyi kezelését. Ilyen hazánkban is elérhető cyberknife kezelés, valamint a proton besugárzás és a brachiterápia, melyek a Magyarországon kezelt gyermekek számára jelenleg csak külföldön elérhetőek. (20, 21)

A fent felsorolt intenzív, multimodális kezelési kombináció teljes gyógyulást eredményezhet, de mind kezelés közben, mind pedig a terápia befejezését követően felléphetnek súlyos, életminőséget rontó, némelykor életet veszélyeztető mellékhatások, szövődmények. Leggyakoribb akut mellékhatások között szerepel a lázas neutropénia, vérszegénység, vérzékenység, hajhullás, hányinger, hányás, nyálkahártyák gyulladása, fekélyei. Hosszútávú mellékhatások lehetnek a vese-, szív-, neuro- és májtoxicitás, a szekunder daganatok megjelenése, az infertilitás, növekedési zavarok, esztétikai és funkcionális eltérések, illetve egyéb endokrin eltérések. A gyermekonkológiában kifejezetten fontos szempont a kezelések tervezése során a mellékhatások minimalizálása annak érdekében, hogy a gyógyult gyermekek teljes értékű életet élhessenek a kezelés befejezését követően. (22)

A lokalizált rhabdomyosarkómával kezelt betegek túlélése 80 % feletti. A kiterjedt, metasztatikus daganatok esetében mindössze az esetek 25-30 %-ában remélhető teljes gyógyulás. (11) Ezen túlélési adatok elmaradnak a legtöbb gyermekkori malignitásban várhatóaktól. Továbbá az agresszív kezelési protolloknak köszönhetően a gyógyult betegek késői morbiditása és mortalitása is megnő. A késői mortalitásért a primer betegség progresszióján túl leggyakrabban a kialakuló második malignitás, valamint a késői kardiovaszkuláris toxicitás felel. (5) Ezen tényezőkön kívül a túlélőknél fellépő késői toxicitás, esetleges csontoló, torzító műtétek vagy a besugárzás okozta károsodások rontják a betegek életminőségét. (23) A túlélés javítása és a késői mellékhatások csökkentése érdekében szükséges új terápiás lehetőségeket keresni. Ilyen terápiás célpontok lehetnek az ALK, mTOR és metabolikus útvonalak résztvevői.

### 1.3. Új terápiás célpontok a szarkómák kezelésében

#### 1.3.1. ALK

Az anaplasztikus limfóma kinázt 1994-ben fedezték fel az anaplasztikus nagy sejtes non-Hodgkin limfóma (ALCL) genetikai hátterének vizsgálata közben. Igazolták, hogy a t(2;5) transzlokáció eredményeképpen létrejövő ALK-NPM (nucleophosmin) fúziós protein kulcsfontosságú szerepet tölt be az ALCL tumorgenezisében. (24).

Az ALK gén egy, az inzulin receptor családba tartozó tirozin kináz fehérjét kódol, ami egy extracelluláris ligand kötő részből, egy transzmembrán doménből és egy intracelluláris tirozin kinázból áll. Az ALK tirozin-kináz nem jelenik meg egészséges sejtekben, mindössze az embrionális időszakban, amikor a neuronális fejlődéshez járul hozzá. Csak néhány aktiváló ligandja (de nem emlős szervezetben) és a jelátviteli útvonalai közül is csak kevés ismert (25). Aktivációja létrejöhet transzlokáció, amplifikáció és pontmutáció útján is. Az ALK számos jelátviteli útvonal és ezen keresztül több onkogén transzkripció faktor aktivitását fokozhatja: a foszfolipáz C (PLC), Janus-arcú kináz (JAK)- signal transducer and activator of transcription (STAT), JUNB, mitogén aktivált protein kináz (MAPK), CRKL, nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), foszfatidilinozitol-3-kinase (PI3K) – protein kináz B (Akt) - mTOR, myc avian myelocytomatosis viral oncogen (MYC) (26), illetve a hipoxia indukált faktor 1  $\alpha$ -n (HIF1  $\alpha$ ) keresztül az angiogenezist is támogathatja.(25)

Az ALK lókuszhoz kapcsoltan más transzlokációk is ismertek; több, mint 22 partner gént és 60 fúziós proteint azonosítottak eddig. A két legtöbbet tanulmányozott fúzió az ALK-NPM és az ALK- echinoderm microtubule-associated protein like 4 (EML4). A transzlokáció ALCL-ben és bizonyos lágyrésztumorokban is konstitutív ALK aktivitáshoz vezet. A transzlokációt követő elváltozásokban partnertől függetlenül felfedezhetőek közös vonások. Az fúziós fehérje átíródását a partner gén szabályozó régiója kezdeményezi, így a fúziós fehérje sejten belüli lokalizációját is a partner fehérje határozza meg, mely megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is. Az ALK fúziós fehérje dimerizációját a partner fehérje transzautofoszforylációja indítja be. (25) ALK transzlokációt számos daganat típusban igazoltak: nem kissejtes tüdőkarinómában (NSCLC), diffúz nagy B-sejtes limfómában (DLBCL), vesesejtes és kolonkarinómában, IMT-ban, valamint emlő, ovárium és oesophagus daganatokban is. Legszélesebb körben a NSCLC esetében vizsgálták a különböző ALK variánsokat. Ugyan csak 4 %-ban

mutatható ki tüdődaganatokban, de a betegség gyakorisága miatt így is lényegesen több beteg vizsgálatát és esetleges kezelését teszi lehetővé, mint más tumorokban. (25) Gyermekonkológiai megbetegedések esetében az ALK transzlokáció ritkán fordul elő, leginkább limfómákban és inflammatorikus miofibroblasztos tumorokban mutatható ki.

Az ALK gén aktivációját transzlokáción kívül okozhatja amplifikáció is. ALK amplifikációt azonosítottak számos daganat típus esetén (melanóma, NSCLC, glioblasztóma, rhabdomiosarkóma, neuroblasztóma, retinoblasztóma, ovárium és emlőkarcinóma, asztrocitóma, Ewing-sarkóma), de ezen genetikai eltérés onkogenezisben játszott szerepe még pontosan nem ismert. (25, 27)

Az ALK expresszióját okozhatja továbbá pontmutáció is. Ez ismert sporadikus és familiáris neuroblasztómák, pajzsmirigy daganatok és nem NSCLC-k esetében. (25, 28)

A neuroblasztómákat vizsgálva jellemzően a kináz domént érinti a mutáció. A vizsgált eltérések közül két pontmutáció 85 %-os gyakorisággal fordult elő. (25)

A rhabdomiosarkómák ALK státuszát több munkacsoport is vizsgálta. Pillay és munkatársai tanulmányában a rhabdomiosarkómák 28 %-át (23/83 minta) találták ALK pozitívnak immunhisztokémiai módszert alkalmazva. Az alveoláris szövettani alcsoportban 45 %-os (14/31 minta), az embrionálisban 15 %-os (6/40 minta) pozitivitást igazoltak. (29) Yoshida és társai 116 mintát elemeztek, az embrionális szövettani altípusba sorolt minták 6 (2/33 minta), az alveoláris altípusba sorolt mintáknak pedig 69 %-ában (42/61 minta) igazoltak ALK fehérje expressziót. Más szövettani altípusba sorolt mintákat azonban negatívnak találták. A fehérje expresszió vizsgálatán túl FISH analízist végeztek az esetleges ALK amplifikáció vagy transzlokáció igazolása céljából. Transzlokációt egy esetben sem detektáltak, amplifikációt összesen az esetek 11 %-ában (7/60 minta). Eredményeiket összevetették a klinikai adatokkal is, hogy feltárják az ALK státusz klinikai jelentőségét. Az ALK pozitív rhabdomiosarkómák gyakrabban mutattak metasztatikus terjedést összehasonlítva az ALK negatívakkal, de a túléléssel nem igazolódott korreláció a vizsgált mintákban. (30) van Gaal és társai 189 mintát vetettek alá immunhisztokémiai és genetikai vizsgálatoknak. Ebben a vizsgálatban is az alveoláris minták jóval magasabb ALK immunpozitivitása igazolódott szemben az embrionális mintákkal (81 % és 32 %). Amplifikáltak találták az alveoláris minták 88 %-át, az embrionális minták 52 %-át. Továbbá teljes genom szekvenálással további 2 %-ban igazolódott az ALK gén pontmutációja. Az embrionális rhabdomiosarkómák esetében

korreláció volt igazolható a metasztázisok jelenlétével és a rossz túléléssel. (31) Corao munkacsoportja hasonlóan a korábbiakhoz az alveoláris rhabdomioszarkómákban igazolt magasabb ALK pozitivitást (alveoláris 53 %, nem-alveoláris 23 %), amplifikációt mindössze egy, míg transzlokációt egy esetben sem igazoltak. (27) Összeségében eltérnek az adatok a rhabdomioszarkómák százalékos ALK pozitivitását illetően, de mindegyik tanulmány igazolta az alveoláris variánsban megjelenő magasabb ALK expressziót szemben a többi szövettani altípussal. Továbbá az irodalmi adatok szerint a lehetséges genetikai eltérések közül az ALK amplifikáció tűnik a leghangsúlyosabbnak rhabdomioszarkómák, különösen az alveoláris variánsok esetében. Ennek lehetséges magyarázata lehet az is, hogy az ALK intronja magas affinitást mutat a PAX3-FOXO1-re, ami fokozhatja az ALK gén transzlációját. (32) A részletezett kutatások eredményeit az 5. Táblázatban foglaltuk össze.

**5. Táblázat. Rhabdomioszarkómák ALK státuszának vizsgálati eredményei korábbi publikációk alapján.** A lenti táblázatban a kutatás alapjául szolgáló fontosabb publikációk eredményeinek vázlatos bemutatása látható.

	Pillay et al.	Yoshida et al.	Corao et al.	van Gaal et al.
Metodika	IHC	IHC	IHC	IHC
antitest	poliklonális ALK	5A4 ALK	ALK1	ALK1
Betegek (esetszám)	83	116	69	189
Eredmények (pozitív/ összes eset (százalékos pozitívítás))				
nem-alveoláris	9/52 (17%)	2/55 (4%)	9/39 (23%)	40/128 (32%)
alveoláris	14/31 (45%)	42/61 (69%)	16/30 (53%)	47/61 (81%)
Kiegészítő FISH vizsgálatok	nem végeztek	részben végeztek	részben végeztek	végeztek

Más non-rabdoid lágyszarkómában kevésbé ismert az ALK státusz. Az IMT ritka lágyszarkómatumor, amely jellemzően fiatal életkorban jelentkezik. Átlagosan 50 %-ban találtak ALK pozitívnek ezeket a tumorokat. (33-35) Cessna et al. 10 összegyűjtött esetből 4-ben igazolta az ALK fehérje expresszióját, míg Cook és munkatársai 73 esetet vizsgálva 60 %-ukban mutatta ki az ALK fehérje expresszióját. (36, 37) Kis esetszámú vizsgálatok és esettanulmányok eredményei alapján az ALK gén transzlokációja a leggyakoribb genetikai eltérés, mely az ALK fehérje expresszióját okozza. (38) Griffin et. al. három vizsgált esetből kettőben igazolta FISH módszert alkalmazva. (39) Az IMT-ok esetében a transzlokáció során a két leggyakoribb fúziós partner protein a tropomiozin



3 és a tropomiozin 4. (33) A vizsgálataink szempontjából kiemelkedő jelentőségű publikációk eredményeit a 6. Táblázatban mutatjuk be. Mivel az IMT-ok kemoterápiára, valamint az esetleges sugárkezelésre csak mérsékelten reagálnak, így a gyógyulás ezeknél a betegeknél csak radikális sebészi eltávolítással lehetséges. (40) Ennek hiányában a betegség meglehetősen rossz prognózissal jár, ezért az inoperábilis IMT-ok esetében fokozott a jelentősége a célzott terápiás lehetőségeknek.

#### 6. Táblázat: Az IMT-ok ALK pozitivitását vizsgáló szakirodalom vázlatos bemutatása.

	Cessna et al.	Cook et al.	Cools et al.	Griffin et al.	Chun et al.
Betegek (esetszám)	10	73	1	3	8
Metodika:	IHC	IHC és FISH	FISH	IHC és FISH	IHC
IHC antitest	ALK1	ALK-11	-	ALK1	ALK1
Eredmények (pozitív/ összes eset (százalékos pozitívítás))					
IHC	3/10 (30%)	44/73 (60%)	0/1 (0%)	3/3 (100%)	4/8 (50%)
FISH	transzlokáció mindhárom ALK immunpozitív esetben	-	transzlokáció	amplifikáció két esetben a háromból	-

Az ALK státusz vizsgálatára három módszer áll rendelkezésre; immunhisztokémiai, FISH vagy polimerase chain reaction (PCR) módszerek. Jelenleg az arany standard eljárás a fluoreszcens in situ hibridizáció. A FISH vizsgálat meglehetősen költséges, így korábban nem volt része a rutin diagnosztikának, csak metasztatikus nem kissejtes tüdődaganatok esetében. (41, 42) NSCLC esetében összehasonlították a különböző diagnosztikus módszerek eredményeit. Lin et al 55 olyan NSCLC mintát vizsgált, melyek között legalább egy vizsgálati módszer igazolta az ALK pozitivitást. Adataik alapján legmagasabb százalékban immunhisztokémiai módszerrel igazoltak pozitivitást (94,5%). Új genom szekvenálással 92,7 %-ban FISH vizsgálattal 87,3 %-ban igazoltak pozitivitást. Ezen adatok alapján a FISH vizsgálattal legmagasabb a fals-negatív esetek aránya, habár ez ma az ALK diagnosztika arany standard vizsgálata. (43) Megbízható immunhisztokémiai próbák jelenthetnek diagnosztikai alternatívát, ezek alkalmazásával elkerülhetőek lennének a feleslegesen elvégzett FISH vizsgálatok. (44, 45) Az immunhisztokémiai vizsgálat a sejten megjelenő ALK tirozin kináz fehérjét mutatja ki *in situ*. Habár ez egy sejt felszíni fehérje, mégis a legtöbb esetben a megjelenő fúziós fehérje citoplazmatikus festődést mutat. Az immunhisztokémiai vizsgálatok megbízhatóságát ronthatja a biopsziás minták nem megfelelő - késői - fixálása, a nem

standardizált festési protokoll, a vizsgálatra alkalmatlan minta, ezért kellő körültekintéssel kell alkalmazni ezt a technikát. (41, 42, 46) Ennek ellenére egy megfelelően szenzitív és specifikus protokollal egy pontos vizsgáló eljáráshoz juthatunk. Egyéb, nem elhanyagolható előnye az immun festésnek a FISH próbával szemben, hogy a költsége alacsonyabb, így az ALK státusz meghatározására bizonyos daganatok, így akár a szarkómák esetében is a rutin diagnosztika része lehetne. A költséghatékonyságon felül további előnye az immunhisztokémiai próbának a fluoreszcens in situ hibridizációval szemben, hogy a vizsgálat az ALK fehérje sejten belüli jelenlétét igazolja, így azokban az esetekben is igazolja az ALK pozitivitást, amikor a FISH próba negatív eredményt ad, mint például pontmutációs eltérés esetén. (41, 47, 48) Nem sok daganat típusban része az ALK vizsgálata akár a rutin diagnosztikának, akár a terápia tervezésének.

Nem sokkal az ALK gén onkogenezisben játszott szerepének igazolását követően klinikai alkalmazásra került az ALK inhibitorok első generációja. Az első ALK inhibitor, a crizotinib 2011-ben került forgalomba, kompetitív inhibitora nem csak az ALK-nak hanem a hepatocita növekedési faktornak (HGFR, c-Met), „recepteur d’origine nantaisnak” (RON) és ROS1-nek is. Gátló hatását a sejtciklus G1-S ellenőrzési pontjánál fejt ki, leállítja a sejt szaporodást és apoptózist indukál. (49) Felnőttek számára ajánlott dózis 2x 250 mg naponta, de gyermekek ennél magasabb dózist is jól tolerálnak, számukra a javasolt dózis naponta 2x280 mg/m<sup>2</sup>. (50) Jelentős mellékhatást ritkán okoz, így dóziscsökkentésre is ritkán kerül sor. Leggyakoribb (>25 %) mellékhatásai között szerepel: látási zavar, hányinger, hasmenés, hányás, obstipáció, ödéma, transzamináz emelkedés, csökkent étvágy, gyengeség érzet, infertilitás férfiakban. További jelentős mellékhatások lehetnek gyakoriságuk sorrendjében: neuropátia (paresztézia, hipesztézia, egyensúly zavar, izomgyengeség, neuralgia), bradikardia, bőrelváltozások, ízérezésviz, pneumonitisz, vese ciszták, QT intervallum hosszabbodás, hepatotoxicitás, embriofötális toxicitás. A mellékhatások reverzibilisek, dóziscsökkentést vagy a terápia leállítását követően megszűnnek. (49, 51, 52)

Az ALK inhibitorok további generációit a kezdeti jó terápiás választ követően kialakuló rezisztencia miatt kezdték fejleszteni. A rezisztencia megjelenését felnőtt NSCLC betegek esetében figyelték meg először, átlagosan a kezelés megkezdését követő tizedik hónapban. (53-55) A leggyakoribb rezisztenciát okozó mechanizmusnak az ATP kötő

helynél létrejövő mutációt találták. (53, 56) Jelenleg engedélyezett második generációs inhibitorok a ceritinib, alectinib, brigatinib, és a lorlatinib, melyek közül a ceritinib, alectinib és a lorlatinib elérhetőek Magyarországon.

Kevés vizsgálat dokumentálta az ALK inhibitorok klinikai hatásosságát gyermekkori daganatos megbetegedések esetén. Az IMT betegek bevonásával végzett legnagyobb vizsgálat igazolta a crizotinib hatékonyságát, mely 2017-ben került publikálásra. 14 beteget kezelve és vizsgálva 5 esetben figyeltek meg komplett remissziót, 7 esetben parciális választ és 2 esetben stabil betegséget. (17) Ezen túl javarészt esettanulmányokat közöltek az ALK inhibitorok IMT esetében megfigyelt hatékonyságáról. (57, 58) Rabdioszarkómák esetén kevés klinikai tapasztalat állt rendelkezésünkre. Habár a crizotinib gátló hatását igazolták RMS sejtvonalakon, ez feltehetőleg nem kizárólagosan az ALK és cMET gátlás határára jön létre. (59) RMS sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok és a már leírt ALK pozitivitás alapján indultak el klinikai vizsgálatok, melyek alapján a crizotinib jól tolerálható, alkalmazható gyógykezelésnek bizonyult gyermekkori lágyszövetű daganatok esetében is. (50, 60) (61, 62)

Az ALK inhibitorok alkalmazása alternatív terápiás lehetőség lehet másodvonalbeli kezelésként magas malignitású illetve inoperábilis, kemorezisztens lágyszövetű szarkómák esetében. A fent ismertetett genetikai és fehérje expressziós vizsgálatok adatai alapján egyelőre nem egyértelmű, hogy mely eljárás a legalkalmasabb az ALK pozitivitás igazolására. A megfelelő diagnosztikus eljárás megválasztása teszi lehetővé azon betegek pontos kiválasztását, akik számára előnyt jelenthet az ALK inhibitor terápia, ezért a lágyszövetű daganatok ALK státuszának jellemzése még további vizsgálatokat igényel.

### 1.3.2. mTOR

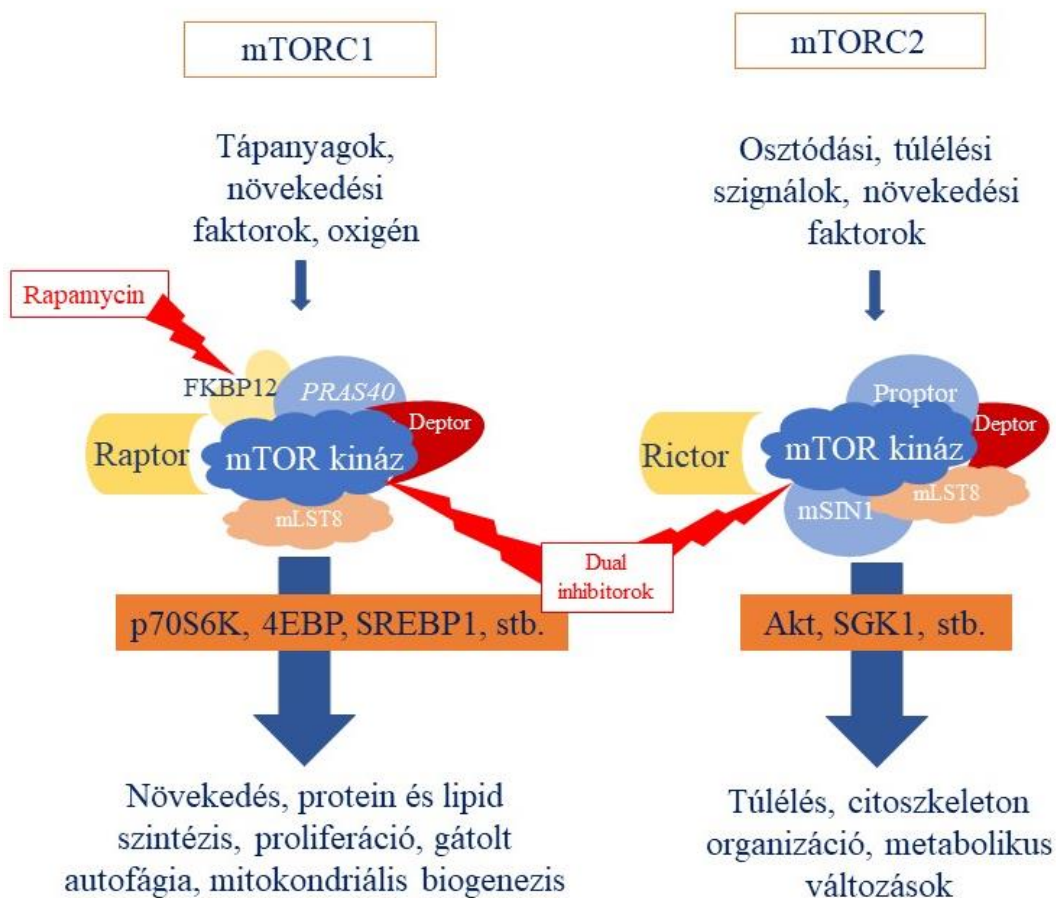
Az mTOR azonosítása az 1970-es évekre vezethető vissza. A Húsvét-szigeteken (az őslakosok nyelvén Rapa Nui) végeztek vizsgálatokat, a helyi élővilág egyedeiből próbáltak meg olyan anyagokat kivonni, melyeknek gyógyhatása lehet. Végül 1972-ben a *Streptomyces hygroscopicus* baktériumból sikerült egy olyan anyagot előállítani, melynek antifungális hatása volt. Ez volt az első mTOR inhibitor, a rapamycin. A későbbiekben igazolódott ezen hatóanyagnak az immunszuppresszív és antitumorális hatása is. Az mTOR kináz, majd az mTOR gén azonosítására a rapamycin hatásmechanizmusának feltérképezése során került sor. Azóta az mTOR szignalizációs

útvonal széleskörben kutatott, a növekedést, proliferációt támogató, és így az onkogenezisben is fontos szabályozó hatásai miatt. (63, 64)

Az mTOR egy szerin-treonin kináz amely a PI3K - Akt jelátviteli útvonal egyik résztvevője. Két fehérje komplex formájában található meg a sejtekben; 1-es komplex (mTORC1) és 2-es komplex (mTORC2). Ezen komplexek mind az őket felépítő alegységekben, mind funkciójukban, valamint inhibitor érzékenységükben különböznek. (64) Az mTOR komplexeket felépítő alegységek az 1. Ábrán láthatóak.

Az mTORC1 rapamycin érzékeny. Alegysége az mTOR kináz, a Raptor (regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin), mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), valamint két gátló egysége a PRAS40 (Proline rich Akt substrate 40) és a Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein). Foszforilálja az S6-ot és a 4EBP1-et (eukarióta transzláció iniciáló faktor 4E kötő fehérje 1), mely fehérjék a messenger ribonukleinsav (mRNS) és fehérjeszintézis szabályozásában is részt vesznek.

(1. Ábra) Aktivációját különböző növekedési faktorok, tápanyagok, stressz szignálok indíthatják el. Aminosavak, mint például az arginin, glutamin, leucin hozzájárulnak az mTORC1 aktivációjához. Ezen folyamatokat potenciózzák a növekedési szignálok. Nem csak a tápanyagok koncentrációja, hanem az energiaellátottság is szabályozza az mTOR aktivitását. Az energia éhség, azaz alacsony ATP szint, valamint a hipoxia gátolja az mTORC1-et. Az mTORC1 további pozitív szabályozó szignáljai a PI3K-Akt, MAPK, adenzin-monofoszfát-aktivált protein kináz (AMPK) útvonalakon túl a Ras (Rat sarcoma virus oncogene)- MEK (mitogen activated protein kinase kinase)-ERK (Extracellular regulated MAP kinase) jelátviteli útvonal. Az IGF receptorokon keresztül az inzulin, valamint a tumor nekrosis faktor  $\alpha$  is stimulálja az mTORC1 aktivitását. Az mTORC1 szerepet játszik a daganatos sejtek proliferációjában, terjedésében és túlélésében. A jelátviteli hálózatban elfoglalt, egyrészt a sejt aktuális állapotát felügyelő funkcióin, másrészt a sejtnövekedéséhez szükséges (például fehérje szintetikus) folyamatok irányításán keresztül az mTOR kináz, így az mTORC1 aktivitás nemcsak az előbbi folyamatok, hanem a metabolikus útvonalak szabályozásában is nagyon fontos tényező. (64, 65) (1. Ábra)



**1. Ábra: Az mTOR komplexek felépítése és funkciója.** Az mTORC1-et aktiválja a fokozott tápanyag- és oxigénellátottság, valamint a növekedési faktorok. Az mTORC2 aktivátorai az osztódási, túlélési, növekedési szignálok. A komplexeket felépítő fontosabb alegységek is láthatóak. Az aktivált mTORC1 szerepet játszik a növekedés szignalizációjában, fokozza a lipid és protein szintézist, gátolja az autofágiát és a mitokondriális biogenezist, míg az mTORC2 szerepe a túlélés, citoskeleton és a metabolikus adaptáció rendezésében van. (2)

Az mTORC2 rapamycin rezisztens, kevésbé érzékeny a tápanyag ellátottságra. Az mTOR kináz, Rictor (rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin), mSin1 (Mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1), mLST8, Proptor (protein observed with rictor), hő sokkfehérje 70 (Hsp70) és Deptor alegységek alkotják. (1. Ábra) Növekedési faktorok hatására aktiválja a protein kináz C (PKC)  $\alpha$ -t és az Aktot, részt vesz a citoskeleton szabályozásában, továbbá szabályozza a Rac és Rho GTPázokhoz kapcsolt túlélési jelátviteli útvonalakat. Habár az 1-es komplex felsőbb szabályozó mechanizmusai közül sok ismert, az mTORC2-t vezérlő hatások kevésbé ismertek. Az inzulin-IGFR-PI3K-Akt tengely az aktivitását fokozza, de más növekedési

faktorok pontos hatásmechanizmusa jelenleg még kevésbé ismert, a glutamin és glükóz hiány fokozhatja az mTORC2 aktivitását. (64, 65) (1. Ábra)

Az mTOR metabolizmusban, sejtnövekedésben, továbbá az organizmusok testi növekedésében betöltött szerepére korán felfigyeltek. Az mTORC1 funkciói közül a fehérjeszintézist befolyásoló hatását igazolták a legkorábban. Részt vesz a riboszóma alkotás, a transláció, az aminosav transzport és magának a fehérjeszintézisnek a szabályozásában is. Az mTORC1 a HIF1 $\alpha$  és MYC útvonalakon keresztül fokozza a glikolízisben résztvevő enzimek transzkripcióját (pl. laktát-dehidrogenáz (LDH), piruvát-kináz-M2 (PKM2)), a glükóz transzporterek membránba való kihelyezését, a mitokondriális fehérjék transzkripcióját. A lipid hasznosulás során fokozza a SREBP (sterol regulatory elements binding protein 1-2) transzkripciós faktorok aktiválódását, ezzel támogatva a zsírsav és koleszterin szintézist. Továbbá az 1-es komplex elősegíti a glutaminolízist (fokozza a glutamináz (GLS) translációját) és a pentóz-foszfát útvonalban résztvevő enzimek (pl.: glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH)) expressziójának fokozásán keresztül a nukleotid szintézist. Az mTORC2 aktiváció hatására fokozódik a lipid oxidáció, glükóz felvétel és a glikolitikus enzimek foszforilációja. (64, 66)

Összefoglalva, az mTOR szerepet játszik a citoszkeleton, transzkripció, transláció, metabolizmus és autofágia szabályozásában. Ennek tükrében érthető, hogy fontos szerepe van a daganatok kialakulásában, progressziójában. Számos daganat esetében ismert az mTOR hiperaktivációja, így a szarkómák esetében is. (67) Az mTOR aktivációhoz kapcsolódó protoonkogének és tumorszupresszorok például a következők lehetnek: Akt, Rictor amplifikáció, fokozott 4EBP1, Rheb (Ras homolog enriched in brain), S6 expresszió, fokozott PI3K aktiváció, LKB1, PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten), TSC1/2 (Tuberous sclerosis complex 1/2) mutációk. (64, 65, 68)

Preklinikai vizsgálatok során igazolódott az mTOR-nak a rhabdomioszarkómák tumorigenezisében játszott szerepe. (69) Az mTOR komplexekkel és aktivitásukkal összefüggő fehérjék mennyiségéről és sejten belüli lokalizációjáról *in situ* jelenleg kevés adat áll rendelkezésre. Bizonyos vizsgálatok fokozott pAkt expresszióról számolnak be RMS sejtvonalakban. Renshaw és munkacsoportja pAkt pozitívnak találta a vizsgált rhabdomioszarkómák 69%-át (44/63 minta), míg pS6 immunfestéssel csak a minták 27%-

át (17/64 minta). (70) Cen és tsai. a 32 alveoláris és 32 embrionális RMS mintán vizsgálták a pAkt expressziót. Az alveoláris minták 43 %-ában, az embrionális minták 55 %-ában volt igazolható fokozott pAkt immunpozitivitást. (71) Később publikálták további eredményeiket, melyek szerint az alveoláris RMS-ban 60 %-os pmTOR és 65 %-os p-S6, embrionális RMS-ban pedig 68 %-os pmTOR és 72 %-os p-S6 immunpozitivitást írtak le. (72) Továbbá Petricoin és munkatársai összefüggést találtak a sejtekben detektálható fokozott mTOR aktivitás és a rossz klinikai kimenetel között. (73) A fent részletezett publikációk eredményeit a 7. Táblázatban mutatjuk be vázlatosan.

### 7. Táblázat: mTOR markerek vizsgálatának immunhisztokémiai eredményei rabdioszarkómákban.

	Renshaw et al.	Cen et al.	Cen et al. II.
Metodika	IHC	IHC	IHC
antitestek	pAkt, pS6	pAkt	pmTOR, pS6
Betegek (esetszám)	64	64	64

Eredmények (pozitív/ összes eset (százalékos pozitívitás))

pAkt: 44/63 (69 %)	pAkt:	pmTOR:
pS6: 17/64 (27 %)	embrionális: 14/32 (43 %)	embrionális: 22/32 (68 %)
	alveoláris: 17/ 32 (55 %)	alveoláris: 20/32 (60 %)
		pS6:
		embrionális: 23/32 (72 %)
		alveoláris: 21/32 (65 %)

Az mTOR útvonal onkogenezisben játszott szerepe miatt gátlószereinek onkológiai kezelés során történő alkalmazása jelenleg is vizsgálatok tárgyát képezi. Az mTOR inhibitorok több családba sorolhatók. Az első generációs mTOR inhibitorok, az 1-es komplex inhibitorai, a rapalógok. Bár a rapalógokkal végzett preklinikai vizsgálatok ígéretes eredményekkel zárultak, klinikai alkalmazásuk során mutatott hatékonyságuk sok esetben alulmúlta a várakozásokat. A rapalógok legnagyobb limitációja, hogy allosztérikus inhibitorai az 1-es komplexnek, így teljesen nem képesek gátolni az mTOR aktivitását. Továbbá bizonyos daganatok esetén leírták a rapalógok alkalmazása során jelentkező fokozott Akt (mTORC2 útvonal) aktivitást, mely így létrehoz egy pozitív visszacsatolást a daganatos sejtek növekedéséhez. (73, 74) Ezzel szemben a második generációs inhibitorok az mTOR kináz katalitikus részét támadják, többségük ATP-kompetitív inhibitor. (64, 75) Ezen inhibitorok a preklinikumban ígéretes eredményeket

mutattak, rhabdomyosarkóma és egyéb daganatos sejtvonalakat vizsgálva igazolták az OSI-027 és PP242 dual-mTOR inhibitorok makropinocitózist, majd apoptózist kiváltó hatását. Toxicitásuk és biztonságos klinikai alkalmazásuk jelenleg még vizsgálat alatt áll. (76) Továbbá folyamatban van azon gátlószerek klinikai vizsgálata is, melyek a PI3K és mTOR dual-inhibitorai. (77) Az mTOR inhibitorok alkalmazását hátrányosan befolyásolhatják az életminőséget rontó, toxikus mellékhatásai is. Az mTOR inhibitorok immunszuppresszív hatásuk miatt fokozzák a fertőzések kialakulásának kockázatát. Továbbá mellékhatásuk lehet ödéma, mukozitisz, aftózus léziók megjelenése, infertilitás, hiperlipidémia, glükóz intolerancia, hasmenés, sebgyógyulási zavarok, vesefunkció károsodás, vérszegénység. (78)

RMS sejtvonalakon és xenograft modelleken végzett preklinikai vizsgálatok során hatásosnak bizonyultak az alkalmazott mTOR inhibitorok. (79-82) Ennek ellenére a klinikumban hatékonyságuk messze elmaradt a preklinikai eredmények alapján vártaktól. (83, 84) Mascarenhas és társai 86 beteget bevonva hasonlította össze a konvencionális kemoterápiás kezelés mellett alkalmazva az angiogenezis gátló bevacizumab és az mTOR inhibitor temsirolimus kezelés hatásait. Megfigyelésük alapján a temsirolimus ágon kezelt betegek eseménymentes túlélése szignifikánsan jobbnak bizonyult a másik ágon kezeltkéhez képest. (85) Jelenleg gyermekgyógyászatban a legszélesebb körben alkalmazott és Magyarországon is elérhető mTORC1 inhibitor a temsirolimus. Heti egyszer 150 mg/m<sup>2</sup> dózisban alkalmazva tolerálható. (86) Önmagában hetente egy alkalommal alkalmazva 75 mg/m<sup>2</sup> dózisban nem érte el a kívánt daganatellenes hatást. (83) Citosztatikumokkal kombinációban eltérő dózisokban alkalmazták, vagy hetente egy alkalommal 25-75 mg/m<sup>2</sup> dózisban, vagy hetente három alkalommal 15 mg/m<sup>2</sup> dózisban. (84, 85, 87, 88)

### 1.3.3. Tumormetabolizmus

A daganatoknak növekedésük, terjedésük során számos kihívással kell megküzdeniük, alkalmazkodniuk kell a környezeti változásokhoz és a kezelések hatásaihoz is. Méretbeli növekedésükkel párhuzamosan a tápanyag- és oxigénellátás változik, így a malignus sejteknek túlélésük érdekében adaptálódni kell a változó metabolikus környezethez. A felismerést, hogy a daganatok értelmezhetők metabolikus betegségeként is, Otto Warburg fogalmazta meg az 1920-as években. Warburg elsősorban a sejtek légzési láncát, oxigén

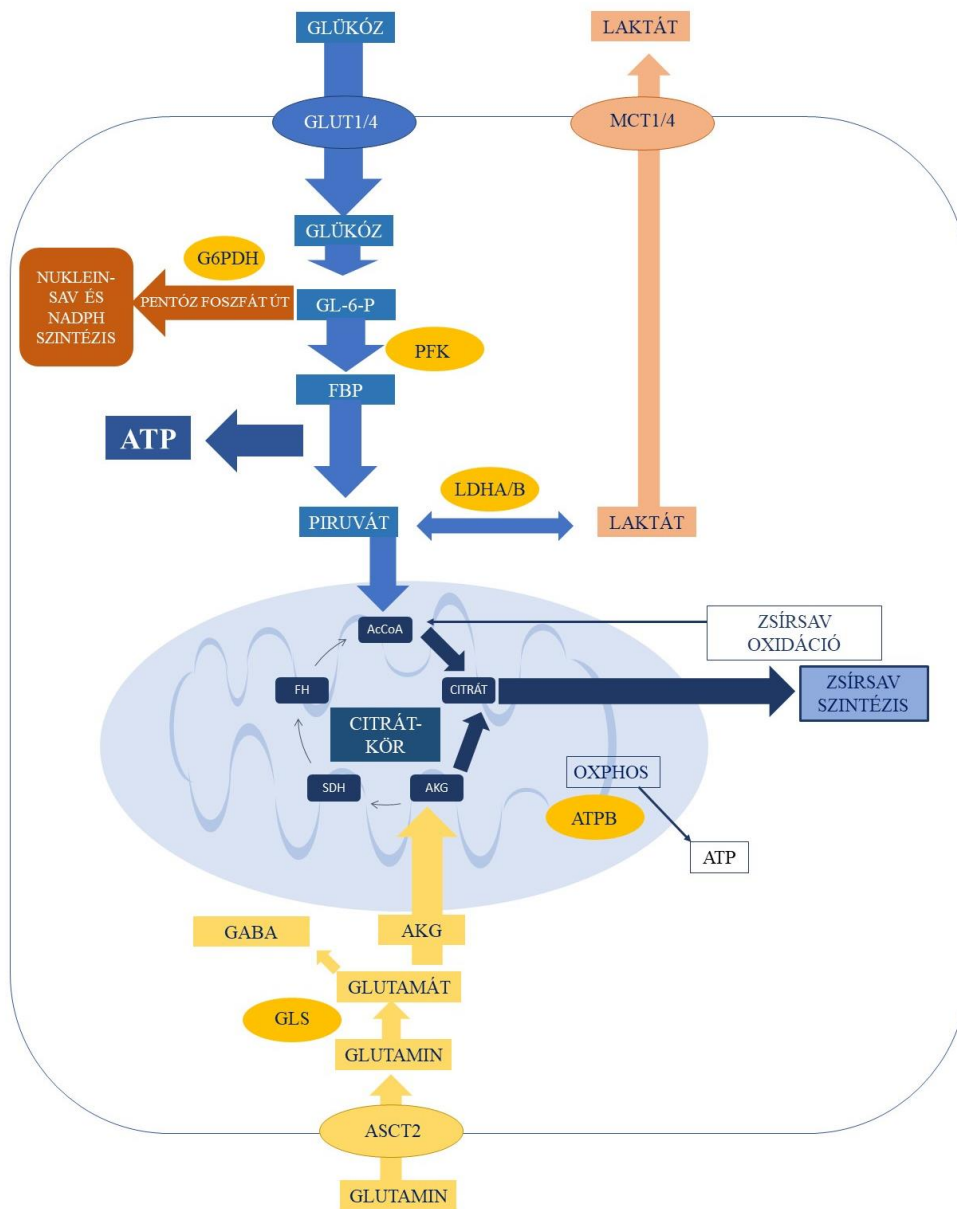


hasznosítását kutatta, mely munkájáért 1931-ben elnyerte az orvostudományi Nobel díjat. Hipotézise szerint; 1. az elégtelen oxigénellátottság iniciálja az onkogenezist, 2. az elégtelen respiráció kompenzálásaként fokozódnak a glikolitikus folyamatok, 3. a malignus sejtek oxigén jelenlétében is tejsavas glikolízist végeznek, 4. a légzési lánc elégtelensége irreverzibilissé válik. (89, 90) Vizsgálatai igazolták a malignus sejtekben fellelhető, oxigénellátottságtól független, emelkedett tejsav termelő glikolízist, melyet a felfedezőjéről ma Warburg-effektusnak nevezünk. Különböző daganatok esetében ezek a változások nem ennyire leegyszerűsítettek és fontos egyedi eltérések is megjelenhetnek. A molekuláris biológia és genetika óriási fejlődésének köszönhetően azonban az elmúlt időszakban a daganatokat jellemző proliferációs és differenciációs genetikai szignálok kutatásán volt a legnagyobb hangsúly, és csak az elmúlt évtizedben kapott újra nagyobb figyelmet daganatok anyagcsereváltozásainak jellemzése. Ezen folyamatok fontos szerepet játszanak a daganatok túlélésében, adaptációjában és terjedésében. A malignus sejtek fokozott katabolikus folyamatai szükségesek az adenzin-trifoszfát (ATP) termeléshez, a redukciós-oxidációs, redox folyamatok egyensúlyának fenntartásához és a saját növekedéshez szükséges bioszintetikus építőelemek előteremtéséhez. (91)

A fokozott energiaigény kielégítéshez általában fokozott glükóz hasznosítási igény társul. A glikolízisben, oxidatív foszforilációban résztvevő enzimek és transzporterek (glükóz transzporter (GLUT) 1 és 4, hexokináz (HK), foszfofruktokináz (PFK), PKM2, LDH A és B, monokarboxilát-transzporter 1 (MCT1)) expressziójának jellemzésével jobb képet kaphatunk a daganatos sejtek glükóz hasznosításáról. Az emelkedett glükóz igénynek növekvő számú GLUT expresszióval próbál eleget tenni a daganatsejtek nagy része. A Warburg-effektus, a fokozódó glükóz felvétel és a glikolitikus anyagcsereváltozások biztosítják a daganatos sejtek túlélését változó oxigénellátottságú környezetben. Amennyiben a felvételre került glükóz mennyisége meghaladja az oxidatív foszforilációban résztvevő enzimek kapacitását vagy az oxidatív foszforiláció képtelen a daganatsejtek gyorsan megnövekedett energia igényét kiszolgálni, a felvett glükóz piruváton keresztül laktáttá alakulhat a sejtekben. A termelődő tejsav ugyanakkor környezeti hatásokon keresztül is segíti a daganatok terjedését. A tejsavas mikrokörnyezet elősegíti a mátrix metalloproteinázok, katepszin aktivációját, így segítve a szöveti inváziót, az alacsony pH gátolja a citotoxikus immunsejtek válaszkészségét, valamint a daganatsejtek környezetébe leadott tejsav a strómasejtekkel lép metabolikus

együttműködésbe. A leadott laktátot a környező fibroblasztok, immunsejtek a reverz Warburg effektus segítségével a laktát-dehidrogenáz úton piruváttá alakítják vissza, így szolgáltatva tápanyagot a malignus sejteknek, biztosítva a glükóz hasznosítás hatékonyságát a heterogén tumor szövetben. (92, 93) Az LDHA a piruvát-laktát átalakulást segíti elő, és a piruvát ilyen irányú felhasználását a PKM2 izoforma mennyiségének emelkedése is támogatja, ami segíti a glikolízis intermedier termékeinek felhalmozódását is. A megnövekedett laktát anyagcserével párhuzamosan növekszik az LDH és MCT expressziója. (66) Emellett a sejtek mikrokozonyzetében a pH változás maga is számos különböző, a daganat növekedését támogató folyamatot indít el. (94) Fan és munkacsoportja rhabdomioszarkóma és miocita sejtvonal metabolizmusát vizsgálva és összehasonlítva, a RMS sejtekben az anaerob glikolízis aktivitásának fokozódását írta le. (95) A glikolízisben, valamint a pentóz-foszfát út működése során keletkező NADPH hozzájárul a redox egyensúly fenntartásához és zsírsav szintézishez, mely elengedhetetlen a membránok képzéséhez. A glikolízis intermedierei (glükóz-6-foszfát, ribulóz-5-foszfát, piroszőlősav, stb.) és a termelődő tejsav biztosítják a makromolekulák szintéziséhez szükséges építőköveket. (66) A 2. Ábrán látható a daganatos sejtek megváltozott anyagcseréjének sematikus vázlata.

A glikolízisből és más lebontó folyamatokból keletkező acetyl-CoA fontos eleme az új membránok képzésének, illetve a citrátkörben és oxidatív foszforiláció során zajló folyamatok eredményeként bekövetkező ATP termelésnek is. A malignus sejtekben a citrátkör folyamatainak egyensúlya gyakran változik meg, így különféle onkometabolitok (fumarát, szukcinát, 2-hidroxi-glutarát) halmozódnak fel. Ezen onkometabolitok nem csak a sejtek építő folyamataiban vesznek részt, hanem onkogenetikus szignálként jelátviteli útvonalakat indíthatnak el. (96). A citrátkör feltöltésében a glutamin hasznosulásnak is jelentős szerepe lehet. Mindezen folyamatok a glikolízissel összefüggésben a daganatok nukleotid szintéziséhez, a pentóz-foszfát út fokozott aktivitásához is elengedhetetlenek. (97)



**2. Ábra: A daganatos sejtek megváltozott anyagcseréjének sematikus ábrája.** A fokozott aktivitású anyagcsere útvonalakat vastag nyilak jelölik. A daganatos sejtek anyagcseréjére jellemző a fokozott oxigénellátottságtól független anaerob glikolízis, azaz Warburg-effektus, a fokozott zsírsav szintézis, glutamin hasznosítás, pentóz-foszfát útvonal.

A glutamin egy változatosan felhasználható nem esszenciális aminosav. Alternatív szén és nitrogén forrásként szolgálhat a sejtek bioszintetikus folyamataihoz. A glutamin a glutamináz enzim segítségével alakul át glutamáttá, majd a glutamát-dehidrogenáz segítségével  $\alpha$ -keto-glutaráttá. Az  $\alpha$ -keto-glutarát belép egy csonka citrát körbe, majd

citrát formájában szolgáltat építőkövet a zsírsavak szintéziséhez, de oxidálódva energiaforrás is lehet. Így piruvát hiányában a glutamin szolgál a citrát ciklus anapleorikus szubsztrátjaként. Másrészt a glutamin elengedhetetlen a redox egyensúly fenntartásához. Mindezeken túl aktiválja azon intracelluláris jelátviteli folyamatokat, melyek elősegítik a tumor növekedését, anti-apoptotikus tényezőként pedig gyógyszer rezisztenciát okozhat. (64, 98) A malignus sejtek fokozott glutamin igénye ismert több daganat esetében is, a jelenséget RMS sejtvonalakon Issaq és munkacsoportja igazolta. (98, 99)

A korai anyagcsere vizsgálatok a mitokondrium és az oxidatív foszforiláció mechanizmusainak károsodásával magyarázták a Warburg-effektus megjelenését. Ezt cáfolva, a legtöbb *in vitro* vizsgálat a mitokondrium defektusait ritkának véleményezte a malignus sejtekben, mivel alacsony glukóz koncentráció esetén a sejtek oxidatív foszforilációból fedezték energia szükségletüket. Habár az oxidatív foszforiláció során 18-szor annyi ATP állítható elő, de a glikolízis 100-szoros sebességgel képes az ATP előállítására. Alacsony glukóz koncentráció esetén a malignus sejtek oxidatív foszforilációból fedezik energia szükségletüket, ámde ha bőséges glukóz kínálat áll rendelkezésre, a glikolízis irányába rendezik át energia termelő folyamataikat. (91, 100) A daganatok mitokondriális rendellenességeinek felderítése jelenleg is vizsgálatok tárgyát képezi. Habár általánosságban a mitokondrium defektusait ritkának véleményezték, mégis bizonyos RMS sejtvonalakon végzett vizsgálatok igazolták a mitokondrium hibás működését. (101, 102) Ezzel szemben Fan és munkacsoportja a mitokondrium intakt működését igazolta RMS sejtvonalon. (95) Továbbá az oxidatív foszforiláció defektusainak szerepét nem csak az anyagcsere folyamatok változásaival, hanem az apoptotikus útvonalak károsodásával is összefüggésbe hozták. (66, 100)

Glükózhoz és glutaminhoz hasonlóan a zsírsavak is fontos szerepet játszanak a tumormetabolizmusban. Hozzájárulnak az energiatermeléshez és a membránok szintéziséhez. A nagy zsírsav igényű osztódó daganatos sejtekben fokozódik a zsírsav transzport fehérje (FATP) expressziója és amennyiben a zsírsav kínálat nem elégíti ki az igényeket, de novo zsírsav szintézisbe kezdenek a sejtek. Azt, hogy a sejtek zsírsav szintézist vagy degradációt végeznek, a rendelkezésre álló tápanyagok határozzák meg. (93) A fokozott lipid degradáció elősegítette a RMS sejtek túlélését és metasztázis képzését alveoláris rhabdomiosarkóma sejtvonalak kísérletes modelljében. (103)

A metabolikus adaptációs képesség nagyban hozzájárul a daganatok túléléséhez és esetenként az alkalmazott kezelések sikertelenségéhez. A daganatok anyagcseréjének megismerésével új terápiás célpontok válnak azonosíthatóvá. Több olyan gátlószer van jelenleg preklinikai vagy klinikai vizsgálatban, melyek támadáspontja a metabolikus útvonalakban található. A legígéretesebbek az újonnan fejlesztés alatt álló gyógyszerek közül a GLS inhibitorok. A célzott terápiás gyógyszerek fejlesztése nem csak rengeteg erőforrást emészt fel, hanem időigényes folyamat is. Amennyiben a gyógyszer humán alkalmazásának biztonságosságát nem kell igazolni, évtizedek nyerhetőek a gyógyszerfejlesztési folyamatban. A továbbiakban olyan gyógyszerek onkológiai alkalmazása is felmerül, melyeknek korábban más farmakológiai hatásait használták ki az orvostudomány egyéb területein. Ilyenek például a statinok, a metformin, illetve bizonyos antibiotikumok (tetraciklin, glicilciklin, doxiciklin, erithromicin, kloramfenikol). A statinok a nukleotid szintézissel, a mevalonát-útvonallal lépnek interakcióba, a metformin, a tetraciklinek, aminoglikozidok az oxidatív foszforilációt gátolják. Ezen gyógyszereknek ismert a biztonságos humán alkalmazása, így könnyebben vezethetők be klinikai vizsgálatokban, jelentősen lerövidítve a klinikumban történő alkalmazás engedélyezéséhez szükséges időt. Ez a betegek számára jelenti a legnagyobb előnyt, de a gyógyszerfejlesztési költségeket is nagyban csökkenti. (91)

A szakirodalom eredményei alapján célunk volt az ALK, mTOR és metabolikus anyagcsere útvonalak jellemzése a magyar gyermekkorú lágyrész szarkómás betegek mintáin annak érdekében, hogy új terápiás célpontokat azonosíthassunk azon betegek számára, akiknél elégtelen terápiás választ figyeltünk meg az elsővonalbeli kezelés során. Továbbá a diagnosztikus módszerek összehasonlításával célunk volt a legmegfelelőbb vizsgálati módszer megtalálása, annak érdekében, hogy a célzott terápiára történő beteg kiválasztás minél pontosabb lehessen.

## 2. Célkitűzések

A kutatás során céloim volt:

1. A gyermekkori lágyrész szarkómák ALK státuszának vizsgálata.
  - Immunhisztokémiai vizsgálatokkal az ALK fehérje expresszióját, illetve
  - FISH vizsgálattal az ALK gén lehetséges transzlokációs, amplifikációs eltéréseit jellemezni,
  - majd összevetni a két vizsgálati módszer eredményeit.
  
2. Új terápiás célpontokat keresni a gyermekkori rhabdomyosarkómák kezeléséhez.
  - Az mTOR jelátviteli útvonal aktivitásának az mTORC1 és mTORC2 komplexek fehérjeinek mennyiségi vizsgálata a kemoterápia megkezdése előtt és a neoadjuváns kemoterápia után, valamint recidíva során vett szövetmintákban.
  - A rhabdomyosarkóma sejtek anyagcsere útvonalainak jellemzése a glikolízissel összefüggésben a PFK és LDHA, az oxidatív foszforilációval a  $\beta$ -F1-ATPáz (ATPB), a pentóz-foszfát útvonallal a G6PDH, míg a glutamin hasznosítással kapcsolatban pedig a GLS enzimek mennyiségének vizsgálatával.
  
3. Azokban az esetekben, ahol a terápiás célpont azonosítását és igazolását követően a kezelésben ALK inhibitor vagy az mTOR gátló szerek alkalmazására nyílt lehetőség (ALK inhibitor crizotinib, alectinib vagy mTOR gátló temsirolimus), regisztráltuk és elemeztük a kezelés hatékonyságát és mellékhatásait.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Betegek

Vizsgálataink első szakaszában a 2010. és 2014. között a Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekgyógyászati Klinikáján lágyrészsarkóma diagnózissal kezelt betegek közül választottuk ki a magas kockázatú és recidiváló eseteket, akiknél az ALK inhibitor kezelésnek jelentősége lehet. A 18 vizsgált eset között 2 alveoláris lágyrészsarcomás, 2 alveoláris, valamint 11 embrionális rhabdomyosarkómás és 3 inflammatorikus miofibroblasztos tumoros gyermek volt.

**8. Táblázat: a betegek fontos klinikopatológiai tulajdonságai.** Vizsgálatunk első szakaszában részt vevő betegek az ALK oszlopban, a második szakaszban részt vevő betegek pedig az mTOR és metabolizmus oszlopban szerepelnek. Lent látható a szövettan, nem és rizikócsoporthoz szerinti megoszlásuk, a medián életkoruk és túlélésük.

Szövettan	ALK (esetszám)	mTOR és metabolizmus (esetszám)
Fúzió negatív	11	43
embrionális	11	39
botrioid	-	1
orsósejtes	-	3
Fúzió pozitív	2	5
IMT	3	-
ASPS	2	-
összesen	18	48

Nem	(esetszám)	(esetszám)
nő	6	20
férfi	12	28

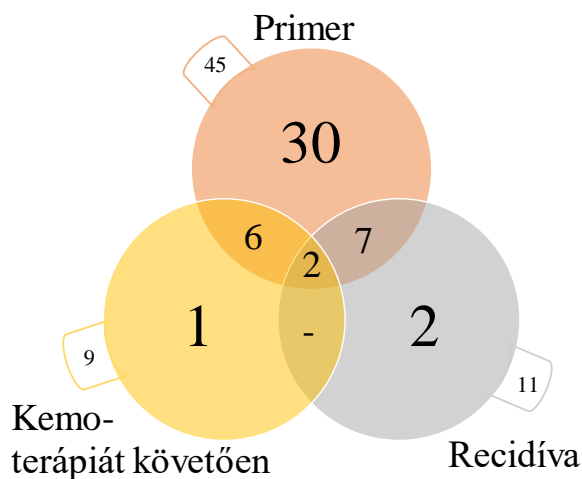
Kor	(év)	(év)
medián	8,5 (1,2-17)	5 (0-17,3)

Rizikócsoporthoz	(esetszám)	(esetszám)
SR	-	1
MR	9	11
HR	9	36
	18	48

A betegek medián életkora 8,5 év volt (1-17 év közöttiek), köztük 6 lány és 12 fiú. A daganatok változatos lokalizációban fordultak elő; az orrcimpán, a fültő előtti régióban, az orbitában, a paratesztikuláris, a pararektális régióban, a hólyagban, a kismedencében, a buccalis nyálkahártyán, a végtagokon, a gluteális régióban, a mellkas, a középfül és a frontális régióban. A diagnózis felállításakor ötnek volt távoli metasztázisa, kilenc esetben fordult elő recidíva.

Kutatásunk második szakaszában a 2007. és 2017. között a magyarországi gyermekonkológiai központokban rabdomioszarkóma miatt kezelt beteganyagon végeztük el vizsgálatainkat. 19 patológiai intézet segítségével 48 beteg 65 szövettani mintáját tudtuk összegyűjteni. A rabdomioszarkómával diagnosztizált gyermekek mintái között 53 embrionális, 7 alveoláris és 5 olyan minta volt, ami vagy a botrioid, vagy az orsósejtes altípusba tartozott. Mivel célkitűzéseink között szerepelt a kezelést követő és recidíva során bekövetkező mTOR és metabolikus változások jellemzése, ezért amennyiben lehetséges volt a kezelés megkezdése előtt, a diagnózis felállításakor vett minták mellett olyan mintákat is feldolgoztunk, amelyeket a kemoterápiás kezelés utáni tumoreltávolító műtét során, illetve a recidíva igazolásakor vettek. A minták eloszlását a 3. Ábrán mutatjuk be. A releváns klinikai információk a 8. táblázatban láthatóak feltüntetve



**3. Ábra. A vizsgálat második szakaszában vizsgált 48 beteg mintáinak megoszlása.** A Venn-diagramon láthatóak a primer, recidív és kemoterápiát követően vett minták száma, illetve a halmazok átfedő részein azon minták száma látható, mikor egy betegtől több mintát is volt lehetőségünk összegyűjteni.



A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatás-Értékelési Bizottsága engedélyezte. (TUKEB 99/2018.)

### 3.2. Az ALK vizsgálata

#### 3.2.1. Az ALK immunhisztokémiai vizsgálata

Az immunhisztokémiai vizsgálatok formalin fixált, paraffinba ágyazott biopsziás minták, 3 µm vastagságú szövettani metszetein végeztük el. A monoklonális 5A4 ALK antitestet (Novocastra, Leica) 1:10 hígításban alkalmaztuk. Pozitív kontrollként egy ALK pozitív IMT mintát alkalmaztunk. Az esetet akkor tekintettük ALK pozitívnak, ha 10 látótér vizsgálata esetében a tumorsejtek több mint 10 %-a mutatott pozitív reakciót. (104)

A xilol és alkohol soron végzett deparaffinálást követően az endogén peroxidáz aktivitásának blokkolását szobahőmérsékleten 3 %-os hidrogénperoxid oldattal 5 percig végeztük. Ezt a blokkolást követően az elsődleges antitesttel történő inkubáció (30 perc) követte, majd a másodlagos ellenanyaggal 40 percig inkubáltuk, természetesen a megfelelő mosási lépéseket közbe iktatva. Az antitest kötődés detektálására Bond Polymer Refine készítményt alkalmaztunk 15 percig. A pozitív reakciót diamonbenzidin (DAB) kromogén-szubsztrát oldat (10 perc) és Bond DAB Enhancer (6 perc) segítségével jelenítettük meg. Utolsó lépésként történt hematoxilin háttérfestés majd a metszetek víztelenítése és fedése.

A festődés intenzitása szerint negatív, egy, kettő és három kereszt erősségű csoportokba soroltuk az eseteket. Amennyiben a sejtek kevesebb, mint 10 %-a mutatott pozitív immunhisztokémiai reakciót, a mintát negatívnak értékeltük. 10 és 50 % között egy kereszt (+), 50 és 80 % között két kereszt (++) még 80 % felett három kereszt (+++) erősségűnek minősítettük a festődést. (105-107)

#### 3.2.2. ALK fluoreszcens in situ hibridizáció

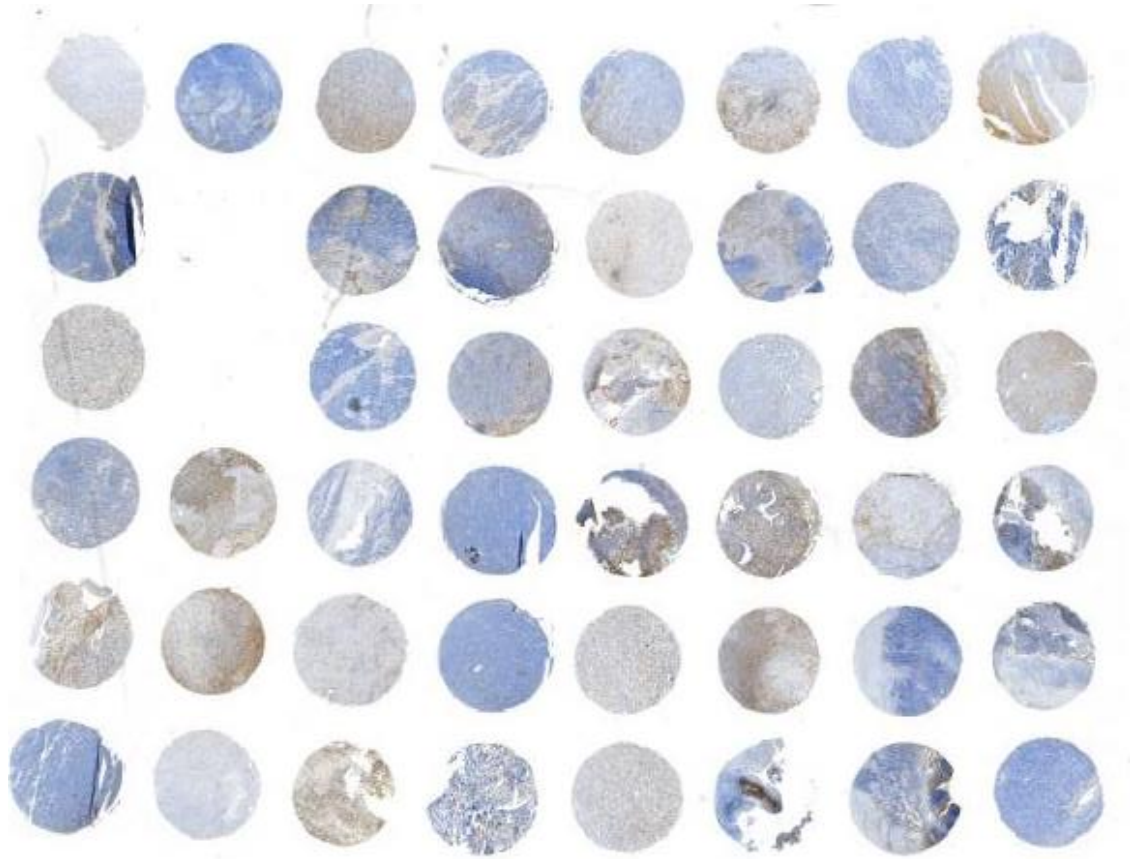
A FISH vizsgálatok is formalinban fixált, paraffinba ágyazott 3 µm vastagságú szövettani metszeteken történtek. ALK Dual Color Break Apart (Vysis, Abbott Molecular Inc.) FISH próbát alkalmaztunk. A próbát a nem kis sejtes tüdő karcinómák esetében jelentős ALK-EML4 transzlokáció kimutatására tervezték. A próba zöld jelölése az ALK gén 3' végéhez közel hibridizál a génben 5' irányban, a vörös jel, pedig a 3' véghez és a 3' vég felé folytatódó gén szakaszhoz kapcsolódik. (108)

Hibridizálás előtt a metszetek deparaffinálására került sor (háromszor váltott xilol, illetve háromszor váltott alkohol sorral). A kötőhelyek feltárása céljából a mintákat citrát oldattal kezeltük 15 percig, majd 12-15 perces pepszines emésztést végeztünk. A dehidrációt felszálló 70-85-100 %-os etanol oldattal végeztük. A próba hozzáadását követően a lemezeket fedtük, majd 80°C-on 10 percig inkubáltuk, és végül 37°C-on hibridizáltuk egy éjszakán át. Másnap a poszthibridizációs mosás után szárítás nélkül fedtük 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) tartalmazó fedőanyaggal a metszeteket. Az értékelés során, fluoreszcens mikroszkópban 8-10 látótérben számoltunk le legalább 100 sejtmagot. Amennyiben a vizsgált sejtek legalább 15 %-ában detektáltunk ALK amplifikációt vagy transzlokációt, akkor a mintát pozitívnak tekintettük. A transzlokáció igazolásához szükséges kritérium a zöld és piros szignálok közötti legalább két jelátmérőnyi szétválás volt. (109) Amplifikáció esetén a detektált jeltöbbletnek legalább négyszeresnek kellett lennie, hogy a pozitivitást kimondhassuk. (110) Azon mintákat, amelyekben kettő vörös illetve kettő zöld szignál volt látható, és a szignálok normális távolságra helyezkedtek el egymástól, negatívnak minősítettük.

### 3.3. Az mTOR és anyagcsere útvonalak immunhisztokémiai vizsgálata

Kutatásunk második szakaszában az összegyűjtött szövettani mintákból tissue microarray (TMA) blokkokat készítettünk (3DHistech TMA Master, Hungary). Összesen két TMA blokk készült, melyek egyenként 6-szor 8 darab 2 mm átmérőjű szövethengert tartalmaznak. (példa: 4. Ábra) Egy eredeti szövettani blokkból 2, esetenként 3, reprezentatív területen található szövethenger is kiválasztásra, eltávolításra került. A reprezentatív területek kijelölését hematoxin-eozin (HE), desmin és Myf4 festéseket követően digitalizált formában patológus segítségével végeztük. Kontrollként máj, garatmandula és here szöveteket alkalmaztunk. Célunk a TMA blokkok elkészítésével az erőforrásaink és a minták gazdaságosabb felhasználása, és az összehasonlító elemzések során a festések standardizáltabb kivitelezése volt. Azon betegek szövettani mintáit használtuk fel, akiknek a kezelése befejeződött, illetve a minta nagysága lehetővé tette, hogy a szövettani hengerek eltávolítását követően is elégséges mennyiségű tumor szövet maradjon, a betegek számára esetleg szükséges, későbbi diagnosztikai vizsgálatokhoz. Amely esetekben ezek a kritériumok nem teljesültek, ott külön teljes szövettani

metszeteken végeztük el a vizsgálatokat. Az immunhisztokémiai festések esetében 4 µm vastagságú szövettani metszetekkel dolgoztunk.



**4. Ábra: egy TMA blokkból készült szövettani metszet képe.**

Az mTOR útvonal *in situ* vizsgálatához anti-pmTOR (Cell Signaling, #2976), anti-pS6 (Cell Signaling, #2211) és anti-Rictor (Bethyl, A500-002A) antitesteket használtunk. Az anti-pmTOR antitest az mTOR kináz aktív formáját ismeri fel, így általánosan markere az mTOR aktivitásának. Annak érdekében, hogy a C1 és C2 aktivitást megfelelően el tudjuk különíteni, további immunfestéseket alkalmaztunk. Az mTORC1 aktivitást az anti-pS6 antitest alkalmazásával vizsgáltuk. Ezen foszfoprotein az mTORC1 aktivitásával áll összefüggésben. Az mTORC2 aktív formája foszforilálja az Akt-ot, így az anti-pAkt az mTORC2 aktivitás jó markere. Azonban a pAkt könnyen degradálódik, ezért kifejezetten érzékeny a fixálási eljárásokra (azonnali fixálás szükséges), valamint a tumor mérete is befolyásolja (nagyobb mintákba a formalin lassabban penetrál). Így szolid tumorok esetében a pAkt nem elég megbízható marker. (111, 112) Vizsgálatunk

során a Rictort alkalmaztuk mTORC2 markernek, mely protein az mTORC2 egyik alkotó eleme. A Rictor expresszió az mTORC2 mennyiségével mutat korrelációt, így az mTORC2 aktivitást a Rictor, pmTOR és pS6 koexpresszióval jellemeztük. (113, 114)

Az anyagcsere útvonalak karakterizálásához anti-PFK (Cell Signaling, #8164), anti-ATPB (Abcam, ab14730), anti-G6PDH (Abcam, ab133525), anti-LDHA (Cell Signaling, #3582), anti-GLS (Abcam, ab156876) antitesteket alkalmaztunk. A használt antitestek, jellemzőik és az alkalmazott hígítás a 9. Táblázatban láthatóak.

**9. Táblázat: az mTOR és anyagcsere útvonalak vizsgálata során alkalmazott antitestek.** A lenti táblázatban láthatóak a használt antitestek antigén tulajdonságai, celluláris lokalizációja, funkciója és a hígítás, amiben alkalmaztuk.

Antitest	Antigén	Klón	Hígítás	Celluláris lokalizáció	Szekunder	Funkció
mTOR marker	pmTOR	#2976	1:100	citoplazma és sejtmag	Novolink	mTOR kináz aktivitás
	pS6	#2211	1:100	citoplazma	Novolink	mTORC1 aktivitás
	Rictor	A500-002A	1:1000	citoplazma	Vectastain	mTORC2 mennyiség
Anyagcsere marker	PFK	#8164	1:100	citoplazma	Novolink	glikolízis
	LDHA	#3582	1:400	citoplazma és sejtmembránok	Novolink	piruvát-laktát átalakítás
	ATPB	ab14730	1:100	citoplazma	Novolink	citrát kör
	G6PDH	ab133525	1:100	citoplazma és sejtmag	Novolink	pentóz-foszfát út
	GLS	ab156876	1:200	citoplazma	Novolink	glutaminolízis

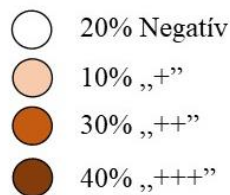
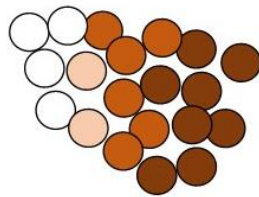
Deparaffinálást és endogén peroxidáz blokkolást követően az antigén feltárás citrát pufferrel (pH 6) történt 20-30 percen keresztül. A lemezeket a primer antitestekkel 90 percig majd a megfelelő szekunder antitestekkel 30 percig inkubáltuk. Az immunreakciót, a másodlagos antitestekhez kapcsolt peroxidáz enzimek aktivitását felhasználva DAB kromogén segítségével hívtuk elő. Végezetül a sejtmagokat hematoxilinnal festettük.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok kiértékelése ebben a munkafolyamatban a „histo-score”, azaz H-score alkalmazásával történt. A H-score megállapítása úgy történik, hogy

a festődő sejtek mennyiségét, százalékban kifejezve, össze kell szorozni a festődés kereszt erősségben kifejezett értékével, majd a kapott értékeket össze kell adni. (115, 116) Így a H-score érték lehetséges maximuma 300, minimuma 0. A 100-as H-score értéket el nem ért metszeteket értékeltük negatívnak. A H-score számítás sematikus ábrája a 5. Ábrán látható. (117)

$$\text{H-score} = 1 \times \text{„+” erősségű sejtek \% -ban} + 2 \times \text{„++” erősségű sejtek \% -ban} + 3 \times \text{„+++” erősségű sejtek \% -ban}$$

Példa:  
20 sejt



$$1 \times 10\% + 2 \times 30\% + 3 \times 40\% = 10 + 60 + 120 = 190$$

**5. Ábra: H-score számolás sematikus ábrája.** Kiszámítása során a festődés erősségét a festődésük százalékban kifejezett értékével kell összeszorozni külön, majd az értékeket összeadni.

### 3.4. Statisztikai adatanalízis

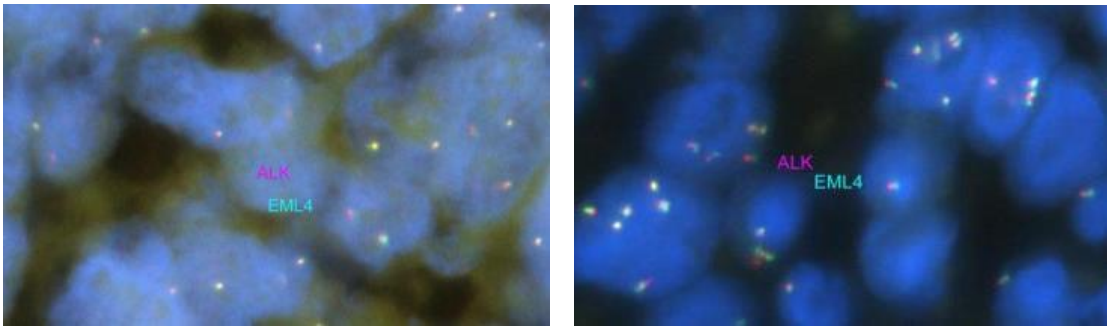
Az exploratív vizsgálat statisztikai adatanalízise az IBM SPSS Statistics 21 program segítségével készült. Az eredményeinket szövettani altípus, rizikó besorolás, túlélés és mintavételi időpont (primer, kezelést követően eltávolított vagy recidív minta) szerint elemeztük. Normál eloszlású mintáinknál (primer minták Rictor, ATPB, G6PDH eredményei) H-score értékek (skála változó) szerint a statisztikai analízist T-próbát és egy szempontos ANOVA-tesztet alkalmazva elemeztük. Nem normál eloszlású mintáink esetében Mann-Whiney U tesztet alkalmaztunk. A mintákat pozitivitas (binomiális változó) alapján is összehasonlítottuk Fisher-egzakt tesztet használva. A változóink közötti korrelációs összefüggéseket Spearman korreláció segítségével vizsgáltuk. Szignifikánsnak azokat az összefüggéseket értékeltük, amelyek p értéke kisebb volt, mint 0,05.

## 4. Eredmények

### 4.1. Az ALK státusz vizsgálata

A lágyszarkómás betegeink ALK státuszának meghatározását kétféle módszer segítségével végeztük el, hogy lehetőségünk legyen az immunhisztokémiai festés és a FISH technika eredményeinek összehasonlítására. Azokban az esetekben, ahol a betegek primer és recidív mintája is rendelkezésünkre állt, az ALK státusz változását is meg tudtuk vizsgálni.

18 beteg mintáját FISH-sel vizsgálva egy esetben amplifikációt, míg 3 esetben transzlokációt igazoltunk. Az 6. Ábrán egy amplifikációt mutató rhabdomiosarkóma, a 7. Ábrán pedig egy transzlokációt mutató sejt képe látható.

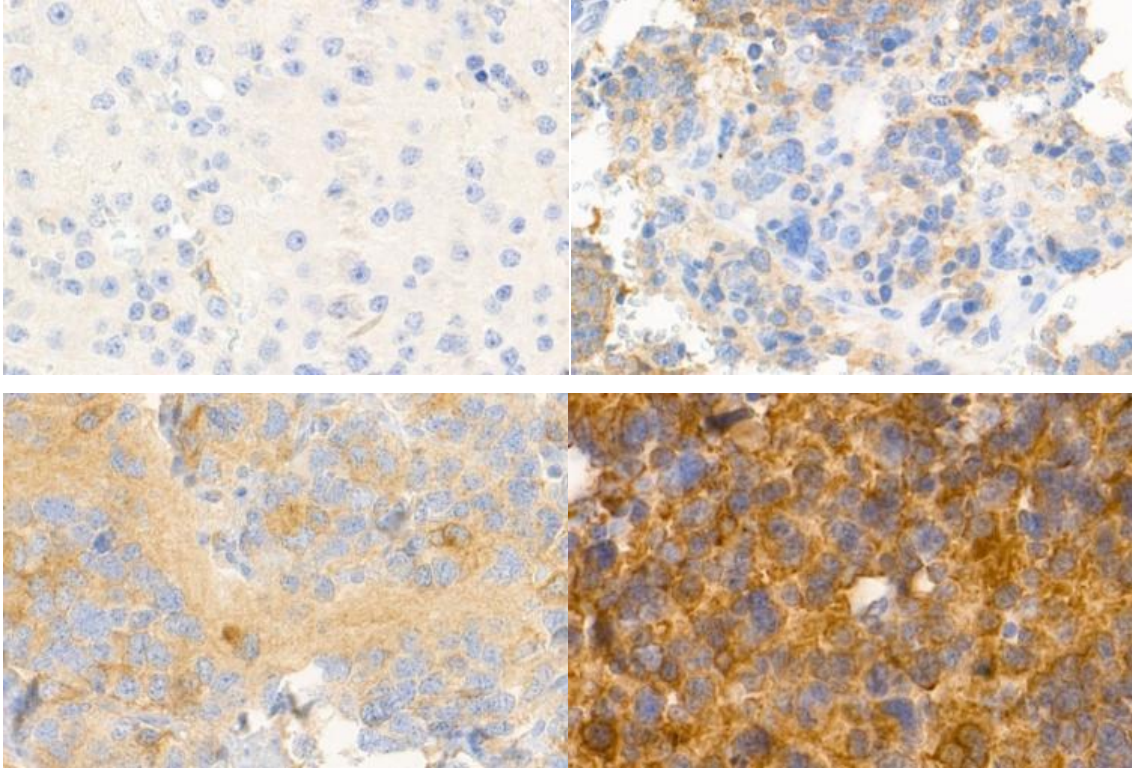


**6. Ábra: Fluoreszcens in situ hibridizációval készült képek.** A bal oldali képen egy negatív minta látható, minden sejtben egymás mellett áll a két-két jel. A jobb oldali képen egy pozitív, amplifikált elváltozás detektálható ötszörös jeltöbbséggel. (1)



**7. Ábra: Egy transzlokációt mutató minta fluoreszcens képei.** A bal oldali képen a kettős szűrővel készült felvétel látható. Középen és jobb oldalon pedig megfigyelhető a zöld és a piros jelek eltérő lokalizációja. (1)

Immunhisztokémiai festéssel mindössze 3 esetben tudtuk az ALK fehérje expressziójának jelenlétét kimutatni. Az immunhisztokémiai vizsgálatokból készült reprezentatív képek a 8. Ábrán láthatóak.



**8. Ábra: ALK immunhisztokémiai festések eredményei.** A festések előhívásához DAB kromogént (barna), majd hematoxilinnel háttérfestést használtunk. Bal oldalon fent egy negatív, jobb oldalon fent „+”, bal oldalon lent „++”, jobb oldalon lent pedig „+++” értékelésű eset látható. (40x nagyítás) (1)

Összesítve a 18 lágyszövetes tumoros beteg mintáján elvégzett immunhisztokémiai vizsgálatok 17 %-ban bizonyultak pozitívnak, míg a fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálatok az esetek 22 %-ban mutattak pozitív, az ALK aktivitására utaló eredményt. A vizsgálatok eredményeit és a betegek bizonyos klinikopatológiai jellegzetességeit a 10. Táblázatban foglaltuk össze.

A vizsgált esetek között hat beteg esetében a recidív mintákban is el tudtuk végezni a festéseket. Egy esetben változott a recidív daganat ALK státusza a primer daganathoz képest, ebben az esetben a recidív tumor a primerrel ellentétben már ALK pozitívnak bizonyult. Ez a beteg később ALK inhibitor kezelésben részesült.

**10. táblázat: Az ALK vizsgálati eredményeinek összesítése.** A 10. Táblázatban a betegek bizonyos klinikopatológiai jellegzetességei, valamint az immunhisztokémiai és FISH vizsgálatok eredményei láthatóak. ((a): amplifikáció, (t) transzlokáció) (1)

Eset száma	Neme	Életkoruk (év)	Szövettan	Recidíva	ALK IHC	ALK FISH
s1	nő	6	RME	nem	-	+(a)
s2	nő	3	RME	igen	-	-
s3	nő	6	RME	nem	-	-
s4	nő	4	ASPS	nem	-	-
s5	férfi	15	RME	nem	-	-
s6	férfi	10	RME	nem	-	-
s7	férfi	3	RME	nem	-	-
s8	férfi	10	RMA	igen	-	-
s9	férfi	4	RME	igen	-	-
s10	nő	2	RME	igen	-	-
s11	férfi	5	RME	igen	-	-
s12	férfi	10	IMT	igen	+	+(t)
s13	férfi	16	ASPS	nem	-	-
s14	férfi	8	RMA	igen	+	+(t)
s15	férfi	9	IMT	nem	+	+(t)
s16	férfi	12	IMT	igen	-	-
s17	férfi	1	RME	nem	-	-
s18	nő	1	RME	igen	-	-

#### 4.2. Az mTOR aktivitás vizsgálata

##### 4.2.1. Primer minták vizsgálata

A vizsgált 45 primer minta mTOR markereinek deskriptív elemzése a 11. Táblázatban látható. Az mTOR kináz aktivitásának vizsgálatára használt pmTOR antitest a minták 56 %-ában (25/45 minta) mutatott fokozott immunpozitivitást. Az mTORC1 aktivitásának detektálására alkalmazott pS6 festés esetében a minták mindössze 18 %-ban (8/45 minta) figyeltünk meg pozitívitást. Az mTORC2 markereként alkalmazott Rictor immunfestés a minták 82 %-ában (37/45 minta) igazolt emelkedett Rictor expressziót. A munkacsoport korábbi munkáival összhangban, a pmTOR, pS6 és Rictor festődés többségében citoplazmatikus lokalizációt mutatott (113), azonban sok esetben magi pmTOR



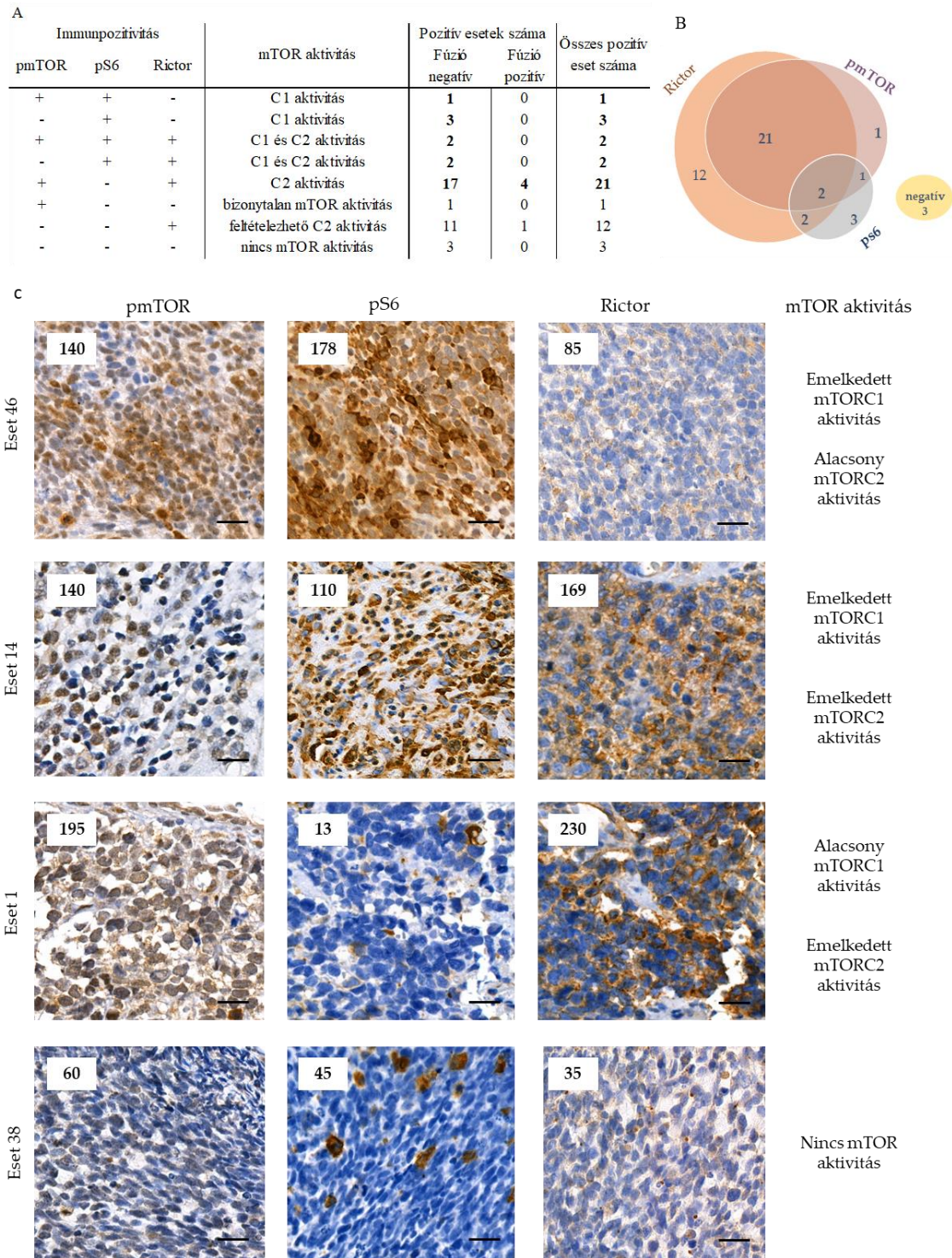
pozitivitást is megfigyeltünk. A pmTOR sejtmagi és citoplazmatikus expressziója egyaránt pozitívként értékelhető. (118)

**11. Táblázat. A primer minták mTOR markereinek immunhisztokémiai eredményei.** Az átlag, medián, minimum, maximum H-score értékei és a hozzájuk tartozó szórás láthatóak.

	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
pmTOR	108,98	121,67	0,00	230,00	65,80
pS6	53,04	31,67	0,00	210,00	55,49
Rictor	143,42	150,00	35,00	230,00	47,61

Összességében ezen eredményeink alapján a vizsgált 45 primer rabdioszarkómás minta 64 %-ában (29/45 minta) mutattunk ki pmTOR és/vagy pS6 immunpozitivitást, amely biztosan jelenlévő mTOR aktivitást igazolt. Az emelkedett Rictor és alacsony pS6 expresszió alapján mTORC2 dominancia figyelhető meg a primer rabdioszarkóma sejtekben.

A primer minták eredményeit összehasonlítottuk szövettani altípus, rizikó besorolás és túlélés szerint is. A statisztikai adatanalízist a módszerek fejezetben részletezettek szerint végeztük el. Az összes elvégzett statisztikai vizsgálat eredménye a fejezet végén található 16. Táblázatban látható. Szignifikáns eredményként emelnénk ki, hogy megfigyeléseink alapján a PAX-FOXO fúzió pozitív minták között szignifikánsan több esetet jellemezett emelkedett Rictor expresszió (T-próba,  $t(43)=-2,41$ ,  $p=0,020$ ), mint a fúzió negatívak között. A fúzió negatív esetek 80 %-ban (32/40 minta) míg a fúzió pozitív esetek 100 %-ában (5/5 minta) igazoltunk fokozott Rictor expressziót. A primer minták mTOR markereinek vizsgálati eredményeit a 9. Ábrán mutatjuk be.



**9. Ábra: a primer minták pmTOR, pS6, Rictor immunfestésének eredményei.** Fent (A) a primer minták immunhisztokémiai eredményei és az ezek alapján detektált mTOR aktivitás látható a PAX-FOXO negatív és pozitív csoportban. Bal oldalon a Venn-diagrammon (B) eredményeink grafikus ábrázolása látható. Az ábra C részén reprezentatív szövettani képek láthatóak. A bal felső sarokban a szövettani mintákhoz tartozó H-score érték van feltüntetve. A jobb alsó sarokban látható skála 25  $\mu$ m-t jelöl. (4)

#### 4.2.2. Kemoterápiát követően vett minták jellemzése

Összegejtöttük a kemoterápiás kezelés során (neoadjuváns kemoterápia után) eltávolított reziduális tumorból vett és rendelkezésre álló szövettani mintákat. Összesen 9 beteg mintáját volt lehetőségünk vizsgálni. A minták deskriptív analízise a 12. Táblázatban látható.

#### 12. Táblázat. A kemoterápiát követően vett minták mTOR markereinek átlag, medián, minimum, maximum H-score értékei és annak szórása.

	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
pmTOR	79,99	80,00	10,00	150,00	49,65
pS6	113,88	116,60	13,30	180,00	50,31
Rictor	100,56	122,50	0,00	145,00	52,69

A minták 33,3 %-a (3/9 minta) mutatott pmTOR immunpozitivitást, pS6 festéssel 66,7 %-ban (6/9 minta), Rictor festéssel 77,8 %-ban (7/9 minta) találtuk a mintákat pozitívnak.

#### 4.2.3. Primer és kemoterápiát követően vett minták összehasonlító analízise

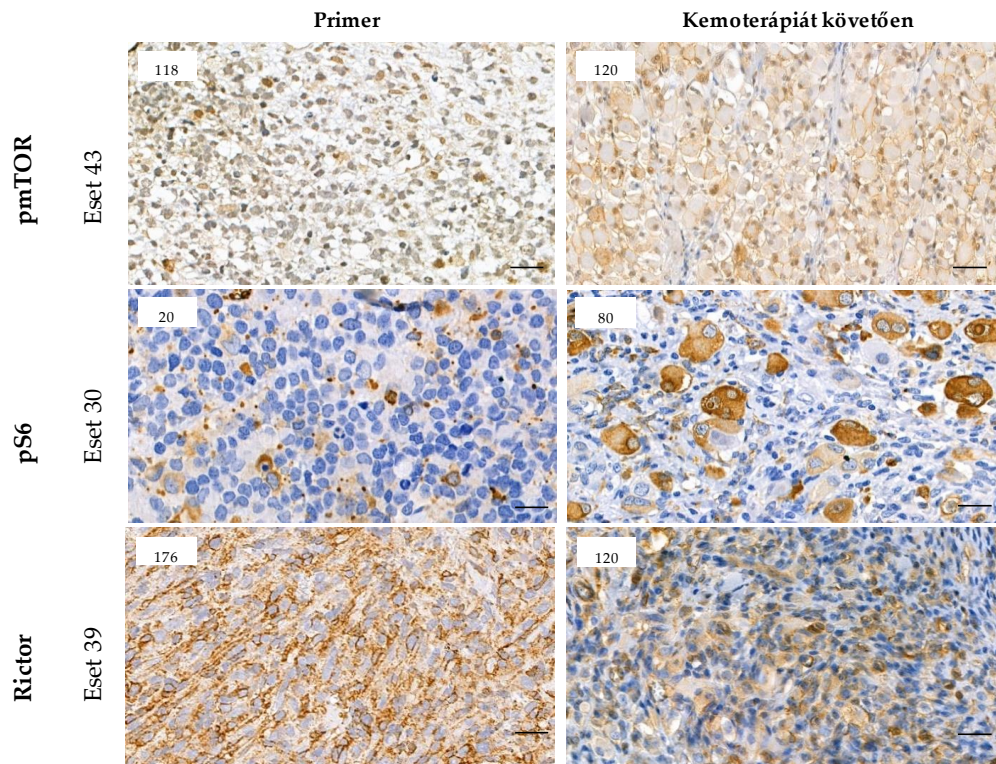
A kemoterápiás kezelés közben (neoadjuváns kemoterápia után) eltávolított reziduális tumorból vett szövettani mintákat nem csak önálló csoportként, hanem az azonos betegek primer mintáival összehasonlítva is elemeztük. Összességében 8 primer-neoadjuváns tumor pár esetében tudtuk a fehérje expresszió változásokat értékelni. A statisztikai adatanalízist a fent részletezett módszereket alkalmazva végeztük el.

A pmTOR expresszió változatlan maradt (Mann-Whitney U teszt,  $U=143,5$ ,  $p=0,171$ ), a Rictor (T-próba,  $t(52)=-2,12$ ,  $p=0,019$ ) expresszió halványabbnak bizonyult, míg a pS6 H-score értékek az előbbiekkal ellentétben emelkedettnek találtuk (Mann-Whitney U teszt,  $U=75$ ,  $p=0,003$ ). Ennek háttérében azonban nem diffúzan erősebb pS6 festődést, hanem az egyedül álló „3+” intenzitással festődő sejtek számának növekedését figyeltük meg. 13. Táblázatban láthatóak a minták összehasonlító értékelése, valamint a 10. Ábrán reprezentatív szövettani képek jelennek meg.

**13. Táblázat: A primer és kemoterápiás kezelést követően vett minták összehasonlító értékelése.** A hőtésképen az esetek szerepelnek egymás mellett, a színezés a festődés erősségével (H-score értékével) változik a lent látható skála szerint. A túlélési adatok, PAX-FOXO fúziós státusz, valamint az értékek átlaga és mediánja is prezentáltak a táblázatban. (4)

Eset száma	Fúziós státusz	Remisszió	pmTOR		pS6		Rictor	
			primer	kemoterápiát követően	primer	kemoterápiát követően	primer	kemoterápiát követően
Eset 9	neg.	Igen						
Eset 19	neg.	Igen						
Eset 29	neg.	Igen						
Eset 30	poz.	Igen						
Eset 37	neg.	Igen						
Eset 39	neg.	Igen						
Eset 43	neg.	Igen						
Eset 42	poz.	Nem						
átlag			76	78	53	113	136	98
medián			69	73	30	116	131	124

H-score



**10. Ábra: A primer és kemoterápiás kezelést követően vett minták reprezentatív szövettani képei.** Reprezentatív pmTOR, pS6 and Rictor festések láthatóak. DAB (barna) festés hívja elő az immunhisztokémiai reakciót. A bal felső sarokban szereplő számok a H-score értékeket jelölik. A képek CaseViewer 2.3 software (3DHitech Ltd., Budapest, Hungary) programmal készültek. A jobb alsó sarokban látható skála 25 µm-t jelöl. (4)

#### 4.2.4. Recidíva során vett minták jellemzése

Vizsgálatunkban célul tűztük ki a recidíva során létrejövő változások jellemzését is. Összesen 11 beteg recidív mintáját volt lehetőségünk vizsgálni. A minták deskriptív analízise a 14. Táblázatban látható.

#### **14. Táblázat. A recidíva igazolása során vett minták mTOR markereinek átlag, medián, minimum, maximum H-score értékei és annak szórása.**

	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
pmTOR	125,08	155,00	0,00	250,00	91,87
pS6	59,39	60,00	0,00	160,00	50,61
Rictor	126,75	136,25	20,00	207,50	62,90

A pmTOR a minták 64 %-ában (7/11 minta), a pS6 9 %-ában (1/11 minta), míg a Rictor a minták 55 %-ában (6/11 minta) mutatott fokozott expressziót. A recidív mintákat összehasonlító elemzésnek vetettük alá szövettani alcsoport, fúziós státusz, túlélés és rizikóbesorolás szerint. Az összes elvégzett statisztikai vizsgálat eredménye a fejezet végén található 16. Táblázatban látható. Vizsgálataink egy esetben igazoltak szignifikáns összefüggést. A pS6 expresszió a magas rizikójú csoportban szignifikánsan emelkedett volt a kezdetben nem magas rizikócsoportba eső betegekhez képest (Mann-Whitney U teszt,  $U=0$ ,  $p=0,014$ ). Bár ezen összefüggés szignifikáns, de a jelentősége mégis kérdéses, mivel mindkét csoportban kifejezetten alacsony pS6 expresszió volt megfigyelhető. Továbbá a kezelésre nem reagáló betegek esetében kifejezetten fokozott pmTOR expressziót észleltünk azon betegekhez képest, akik a recidív kezelés hatására ismételt remisszióba kerültek. Ezen eredményünket statisztikai szignifikanciával nem tudtuk alátámasztani, további vizsgálatot igényel nagyobb esetszámú tanulmányban.

#### 4.2.5. Primer és recidíva során vett minták összehasonlító analízise

A 11 recidív beteg mintáját 9 esetben volt lehetőségünk azonos betegől vett primer mintapárjával összehasonlítani. Habár a mintapárok elemzésekor a pmTOR expresszió fokozódását figyeltük meg (Mann-Whitney U teszt,  $U=216$ ,  $p=0,516$ ) továbbra megtartott Rictor pozitivitás (T-próba,  $t(53)=1,54$ ,  $p=0,446$ ) és csökkent pS6 festődés (Mann-Whitney U teszt,  $U=224,5$ ,  $p=0,635$ ) mellett, ezen megfigyeléseink nem bizonyultak

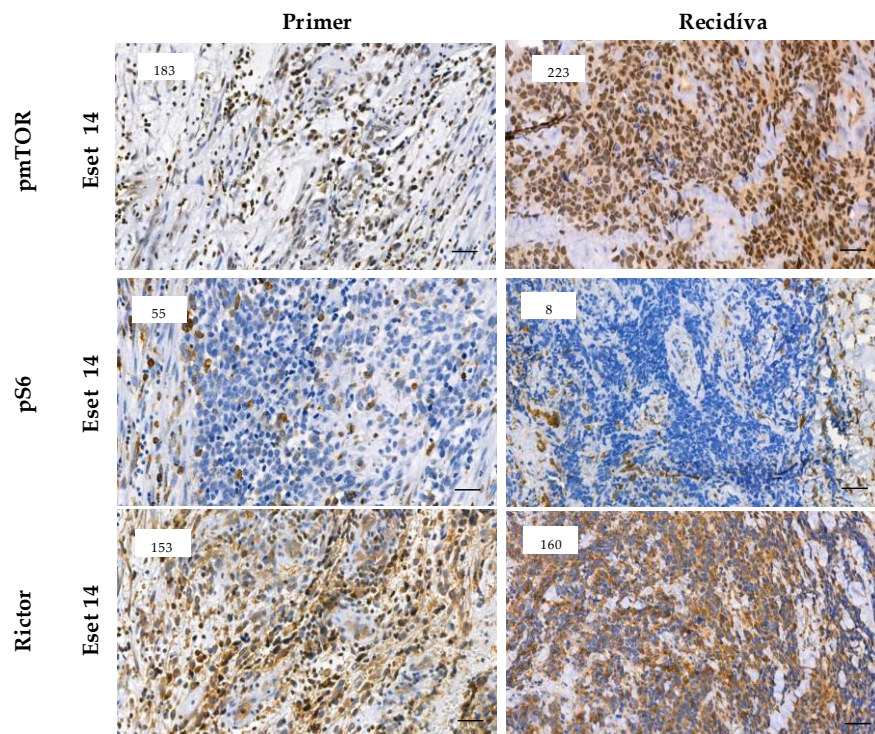
statisztikailag szignifikánsának. 15. Táblázatban az minták összehasonlító elemzése, valamint a 11. Ábrán hozzá tartozó reprezentatív képek láthatóak.

**15. Táblázat: A primer és recidív minták összehasonlító táblázata.** A táblázatban az esetek párosított primer-recidív mintái láthatóak. A színezés erősségét a kapott H-score szabja meg, az alul láthat skála szerint. A túlélési adatok, PAX-FOXO fúziós státusz valamint a H-score értékek átlaga és mediánja is látható. (4)

Eset száma	Fúziós státusz	Remisszió	pmTOR		pS6		Rictor	
			primer	recidíva	primer	recidíva	primer	recidíva
Eset 13	neg.	Igen						
Eset 29	neg.	Igen						
Eset 37	neg.	Igen						
Eset 28	poz.	Nem						
Eset 3	neg.	Nem						
Eset 10	neg.	Nem						
Eset 14	neg.	Nem						
Eset 33	neg.	Nem						
Eset 11	neg.	Nem						
átlag			90	132	74	70	140	118
medián			95	135	63	63	143	121

H-score

0 100 150 250



**11. ábra: Primer-recidív mintapárok reprezentatív festései.** Fent reprezentatív pmTOR, pS6 és Rictor festések láthatóak. A bal felső sarokban szereplő számok a H-score értékeket jelölik. A jobb alsó sarokban látható skála 25 µm-t jelöl. (4)

**16. Táblázat. Az mTOR aktivitáshoz kapcsolt markerek vizsgálatának eredményei primer és recidív mintákban.** A felső táblázatban a primer és recidív minták fúzió pozitivitás, rizikó besorolás, valamint túlélés szerinti csoportjainak átlag és medián H-score értékei láthatóak. Az alsó táblázatban a pozitivitásuk százalékos értéke látható. Az összehasonlítások mellett a hozzátartozó statisztikai szignifikancia látható. (4)

	N=45	pmTOR			pS6			Rictor		
		átlag	medián	P	átlag	medián	P	átlag	medián	P
<b>Primer</b>										
Fúzió negatív	40	<b>107</b>	<b>120</b>	0.366	51	38	0.148	<b>140</b>	<b>140</b>	0.02
Fúzió pozitív	5	<b>137</b>	<b>143</b>		16	13		<b>189</b>	<b>193</b>	
Nem magas rizikójú	12	<b>133</b>	<b>153</b>	0.095	49	58	0.418	<b>149</b>	<b>143</b>	0.668
Magas rizikójú	33	<b>101</b>	<b>115</b>		46	20		<b>145</b>	<b>150</b>	
Gyógyult	32	<b>108</b>	<b>121</b>	0.634	48	32	0.773	<b>146</b>	<b>150</b>	0.599
Progresszív	13	<b>115</b>	<b>122</b>		44	30		<b>138</b>	<b>135</b>	
<b>Recidív N=11</b>										
Fúzió negatív	9	<b>170</b>	<b>178</b>	0.099	73	76	0.637	<b>111</b>	<b>105</b>	0.068
Fúzió pozitív	2	10	10		36	36		<b>189</b>	<b>189</b>	
Nem magas rizikójú	3	<b>202</b>	<b>202</b>	0.838	8	8	0.014	<b>140</b>	<b>140</b>	0.794
Magas rizikójú	8	<b>122</b>	<b>125</b>		80	76		<b>123</b>	<b>121</b>	
Gyógyult	3	90	90	0.133	80	80	0.776	<b>179</b>	<b>179</b>	0.4
Progresszív	8	<b>150</b>	<b>178</b>		62	60		<b>114</b>	<b>105</b>	
	N=45	pmTOR		P	pS6		P	Rictor		P
		Poz. (%)	Neg. (%)		Poz. (%)	Neg. (%)		Poz. (%)	Neg. (%)	
<b>Primer</b>										
Fúzió negatív	40	<b>55</b>	45	0.286	18	<b>82</b>	0.411	<b>80</b>	20	0.357
Fúzió pozitív	5	<b>80</b>	20		0	<b>100</b>		<b>100</b>	0	
Nem magas rizikójú	12	<b>75</b>	25	0.142	0	<b>100</b>	0.094	<b>92</b>	8	0.302
Magas rizikójú	33	<b>52</b>	48		21	<b>79</b>		<b>79</b>	21	
Gyógyult	32	<b>57</b>	48	0.745	16	<b>84</b>	0.68	<b>81</b>	19	0.58
Progresszív	13	<b>62</b>	38		15	<b>85</b>		<b>85</b>	15	
<b>Recidív N=11</b>										
Fúzió negatív	9	<b>78</b>	22	0.109	11	<b>89</b>	0.818	<b>50</b>	<b>50</b>	0.333
Fúzió pozitív	2	0	<b>100</b>		0	<b>100</b>		<b>100</b>	0	
Nem magas rizikójú	3	<b>67</b>	33	0.721	0	<b>100</b>	0.727	<b>67</b>	33	0.333
Magas rizikójú	8	<b>63</b>	37		13	<b>87</b>		<b>57</b>	43	
Gyógyult	3	33	<b>67</b>	0.279	0	<b>100</b>	0.727	<b>100</b>	0	0.333
Progresszív	8	<b>75</b>	25		13	<b>88</b>		<b>50</b>	<b>50</b>	

### 4.3. A metabolikus enzimek expressziójának vizsgálata

#### 4.3.1. Primer minták jellemzése

A glükóz hasznosítás útvonalainak jellemzéséhez a PFK és LDHA (glikolízis markerek) és az ATPB (oxidatív foszforiláció markere) enzimek vizsgálatának eredményeiből következtettünk. A primer minták vizsgálata során a PFK 18 %-ban (8/45 minta), az LDHA 53 %-ban (24/45 minta), valamint az ATPB 36 %-ban (16/45 minta) mutatott fokozott expressziót. Az emelkedett LDHA, az alacsony PFK és ATPB expresszió összességében a rhabdomyosarkóma sejtekben a Warburg-effektus jelentőségére hívják fel a figyelmet a mitokondriális oxidatív foszforilációval szemben. A PFK, LDHA és ATPB expresszió során leírt átlag, medián, minimum és maximum, valamint szórás értékek számszerűen a 17. Táblázatban, grafikusan pedig a 12. Ábrán láthatóak. Statisztikai adatanalízist végeztünk szövettani alcsoport, túlélés, valamint rizikóbesorolás szerint. Az eredmények részletesen a 20. Táblázatban láthatóak. Statisztikailag szignifikáns különbséget egy esetben detektálunk, a PAX-FOXO fúzió pozitív minták esetében szignifikánsabb több PFK immunpozitív esetet detektáltunk a fúzió negatív esetekkel összehasonlítva (Fisher-egzakt teszt,  $p=0,033$ ).

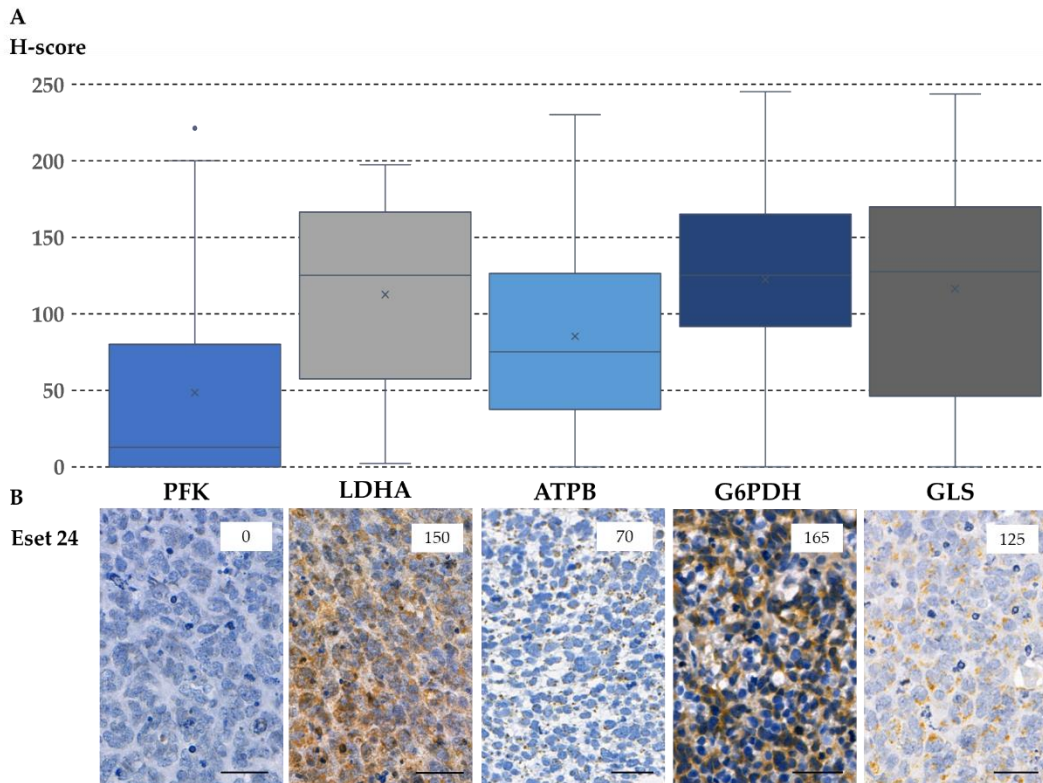
**17. Táblázat. A primer minták metabolikus enzim expressziójának deskriptív analízise.** A táblázatban a primer minták H-score értékeinek átlaga, mediánja, szórása, valamint minimum és maximum értékei láthatóak.

	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
PFK	45,29	10,00	0,00	221,25	63,42
LDHA	109,22	110,00	12,50	196,67	63,12
ATPB	81,73	70,00	0,00	230,00	56,68
G6PDH	136,46	145,00	0,00	245,00	48,81
GLS	120,53	133,33	2,00	243,75	66,22

A G6PDH festések mintázatának értékelésével a pentóz-foszfát út aktivitásának jellegzetességeit igyekeztünk megismerni. A primer szövettani mintákon végzett vizsgálatok figyelemre méltó immunpozitivitást mutattak, a minták 82 %-ában (37/45 minta) volt látható erős enzim expresszió. A medián, átlag értékek a 16. Táblázatban, míg az adatok eloszlása grafikusan a 12. Ábrán láthatóak. Ezen eredményeink alapján feltételezhető a pentóz-foszfát útvonal aktivitásának jelentősége a primer tumorok esetében. Szignifikáns különbség nem igazolódott szövettani beosztás, túlélés és rizikó besorolás szerint. (20. Táblázat)



A GLS (glutaminolízis markere) expresszió magas volt a primer esetek 69 %-ában (31/45 minta). Eredményeink alapján valószínűsíthető a rhabdomyosarkóma sejtek emelkedő glutamin hasznosítási igénye. Szignifikáns különbség nem igazolódott szövettani beosztás, túlélés és rizikó besorolás szerint. (20. Táblázat) Az értékek pontosabb megoszlása a 16. Táblázatban és 12. Ábrán látható.



**12. Ábra. A primer minták metabolikus markereinek expressziója.** A fenti ábrán a metabolikus enzimek expressziójának grafikus ábrázolása, valamint alatta reprezentatív szövettani képek láthatóak. A reprezentatív képek egy PAX-FOXO fúzió negatív eset anyagából származnak. A jobb felső sarokban szereplő számok a H-score értékeket jelölik. A képek 40x nagyítással készültek. (4)

#### 4.3.2. Kemoterápiát követően vett minták metabolikus markereinek jellemzése

Kemoterápiát követő mintát 9 betegről tudtunk gyűjteni és 8 esetben tudtuk párba állítani primer mintával. Kemoterápia hatására létrejövő szignifikáns változást egy esetben sem tudtunk igazolni. A PFK 22 %-ban (2/9 minta), az LDHA 56 %-ban (5/9 minta), a ATPB 44 %-ban (4/9 minta), a G6PDH 67 %-ban (6/9 minta), valamint a a GLS 56 %-ban (5/9

minta) mutatott immunpozitivitást. Az adatok deskriptív jellemzése a 18. Táblázatban látható.

**18. Táblázat. A kemoterápiát követően vett minták metabolikus enzim expressziójának deskriptív analízise.** A táblázatban a kemoterápiát követően vett minták H-score értékeinek átlaga, mediánja, szórása, valamint minimum és maximum értékei láthatóak.

	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
PFK	57,36	20,00	0,00	192,50	71,27
LDHA	103,13	125,00	2,00	197,50	68,81
ATPB	110,60	81,25	0,00	227,50	74,19
G6PDH	105,42	110,00	0,00	211,25	68,25
GLS	105,92	130,00	0,00	177,50	74,30

#### 4.3.3. Recidív minták metabolikus markereinek jellemzése

11 a recidíva során vett mintát jellemeztünk, valamint 9 esetben tudtuk a primer- recidív párok enzimexpresszióját összehasonlítani. A PFK 27 %-ban (3/11 minta), az LDHA 82 %-ban (9/11 minta), ATPB 91 %-ban (10/11 minta), a G6PDH 27 %-ban (3/11 minta), valamint a GLS 46 %-ban (5/11 minta) mutatott immunpozitivitást. A H-score értékek a 19. Táblázatban szerepelnek. Szignifikáns különbséget a primer és recidív minták enzimexpressziója között mindössze a G6PDH esetében tudunk igazolni. A recidív minták immunpozitivitása gyengébbnek mutatkozott (T-próba,  $t(54)=4,06, p=0,004$ ). G6PDH expresszió alapján progresszió során már nem igazolható a pentóz-foszfát útvonal jelentős szerepe RMS sejtekben.

**19. Táblázat. A recidív minták metabolikus enzim expressziójának deskriptív analízise.** A táblázatban a recidív minták H-score értékeinek átlaga, mediánja, szórása, valamint minimum és maximum értékei láthatóak.

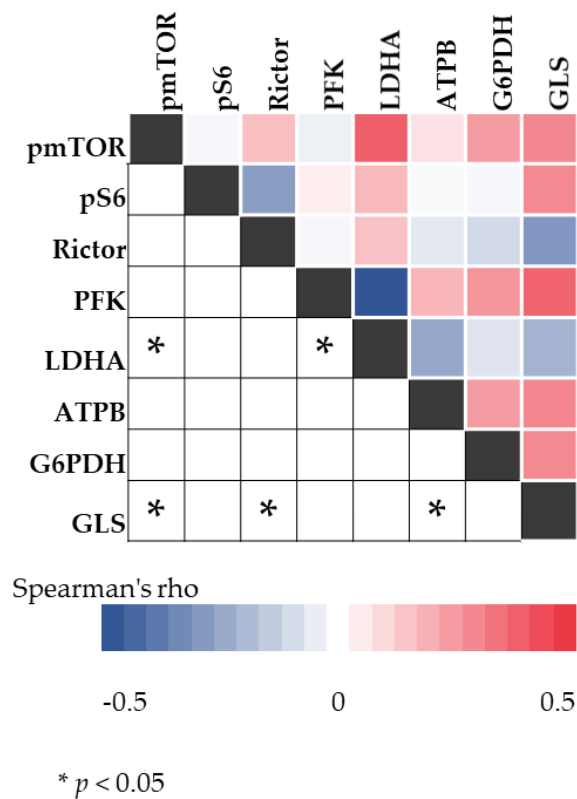
	Átlag	Medián	Minimum	Maximum	Szórás
PFK	53,33	5,00	0,00	190,00	72,63
LDHA	133,26	140,00	55,00	175,00	39,15
ATPB	79,02	68,33	0,00	193,33	66,78
G6PDH	78,25	70,00	20,00	175,00	51,88
GLS	108,11	92,50	0,00	200,00	73,32

**20. Táblázat. A metabolikus aktivitáshoz kapcsolt enzim expresszió vizsgálatának eredményei primer és recidív mintákban.** A felső táblázatban a primer és recidív minták analízise fúzió pozitivitás, rizikó besorolás, valamint túlélés szerinti csoportjainak átlag és medián H-score értékei láthatóak. Az alsó táblázatban a pozitivitásuk százalékos értéke látható. Az összehasonlítások mellett a hozzátartozó statisztikai szignifikancia látható. (4)

	N=4 5	PFK			LDHA			G6PDH			ATPB			GLS		
		átlag	medián	P	átlag	medián	P	átlag	medián	P	átlag	medián	P	átlag	medián	P
<b>Primer</b>																
Fúzió negatív	40	43	8	0.214	110	110	0.985	139	146	0.597	100	98	0.485	120	137	0.448
Fúzió pozitív	5	79	103		104	80		125	124		99	63		101	108	
Nem magas rizikójú	12	30	3	0.185	132	149	0.126	142	151	0.626	65	54	0.626	122	129	0.626
Magas rizikójú	33	53	18		100	94		135	133		83	75		116	135	
Gyógyult	32	44	12	0.723	114	125	0.475	141	146	0.288	83	70	0.79	115	129	0.867
Progresszív	13	54	10		99	78		124	124		78	95		124	135	
<b>Recidív</b>																
Fúzió negatív	9	73	58	0.458	138	148	0.906	86	82	0.813	88	84	0.239	127	143	0.637
Fúzió pozitív	2	3	3		131	131		67	67		21	21		86	86	
Nem magas rizikójú	3	58	58	1	144	144	0.608	67	67	0.609	84	85	0.414	143	143	0.759
Magas rizikójú	8	59	3		135	148		86	82		73	43		113	106	
Gyógyult	3	60	60	0.63	115	115	0.497	108	108	0.776	83	83	0.497	155	155	0.921
Progresszív	8	58	13		142	148		76	82		73	49		110	90	
<b>Total</b>																
	no.	Pos. (%)	Neg. (%)	P	Pos. (%)	Neg. (%)	P	Pos. (%)	Neg. (%)	P	Pos. (%)	Neg. (%)	P	Pos. (%)	Neg. (%)	P
<b>Primer</b>																
Fúzió negatív	40	13	87	0.033	53	47	0.411	87	13	0.643	35	65	0.592	72	28	0.467
Fúzió pozitív	5	60	40		40	60		80	20		40	60		60	40	
Nem magas rizikójú	12	8	92	0.302	67	33	0.26	92	8	0.302	25	75	0.3	83	17	0.223
Magas rizikójú	33	21	79		48	52		79	21		39	71		66	34	
Gyógyult	32	16	84	0.672	58	42	0.347	84	16	0.42	34	66	0.528	71	29	0.589
Progresszív	13	23	77		46	54		77	23		38	62		69	31	
<b>Recidív</b>																
Fúzió negatív	9	33	67	0.509	89	11	0.345	22	78	0.491	56	44	0.273	56	44	0.273
Fúzió pozitív	2	0	100		50	50		50	50		0	100		0	100	
Nem magas rizikójú	3	0	100	0.339	100	0	0.509	0	100	0.339	67	33	0.424	33	67	0.576
Magas rizikójú	8	38	62		75	25		38	62		38	62		50	50	
Gyógyult	3	33	67	0.661	67	33	0.491	33	67	0.661	67	33	0.424	67	33	0.424
Progresszív	8	25	75		88	13		25	75		38	63		38	63	

#### 4.4. A vizsgált mTOR és metabolikus markerek közötti korreláció

A vizsgált immunhisztokémiai markerek közötti korrelációt Spearman korrelációs analízissel elemeztük. Összesen 28 korrelációt vizsgáltunk. Az elvégzett elemzések igazolták az mTOR aktivitás, az LDHA és a GLS expresszió között összefüggéseket a vizsgált esetekben. Pozitív összefüggéseket találtunk az pmTOR és az LDHA expresszió között ( $R = 0,403$ ,  $p < 0,05$ ), valamint az pmTOR és a GLS expresszió között ( $R = 0,302$ ,  $p < 0,05$ ). A többi talált szignifikáns korreláció jelentősége kérdéses. (LDHA-PFK ( $R = -0,508$ ,  $p < 0,05$ ), GLS- Rictor ( $R = -0,306$ ,  $p < 0,05$ ), GLS-ATPB ( $R = 0,306$ ,  $p < 0,05$ )) A korreláció grafikus ábrázolása a 13. Ábrán látható.



**13. Ábra. A Spearman korrelációs analízis eredményei.** A táblázat hőértékének intenzitása a hozzá tartozó korrelációs érték intenzitása szerint változik. A szignifikáns összefüggéseket csillaggal jelöltük. (4)

#### 4.5. Esetbemutatók

Az általunk elvégzett vizsgálatok célja azon betegek azonosítása volt, akiknél relapszus vagy tumorprogresszió esetén előnyt jelenthet célzott terápiás kezelés alkalmazása. A vizsgált tumorok ALK, illetve mTOR pozitivitásának igazolásával lehetőség nyílik inhibitoraik alkalmazására. Az általunk vizsgált gyermekek közül ketten meg is kapták az célzott terápiás kezelést. A kezelés hatásait és mellékhatásait retrospektíven elemeztük és vetettük össze *in situ* vizsgálataink eredményeivel.

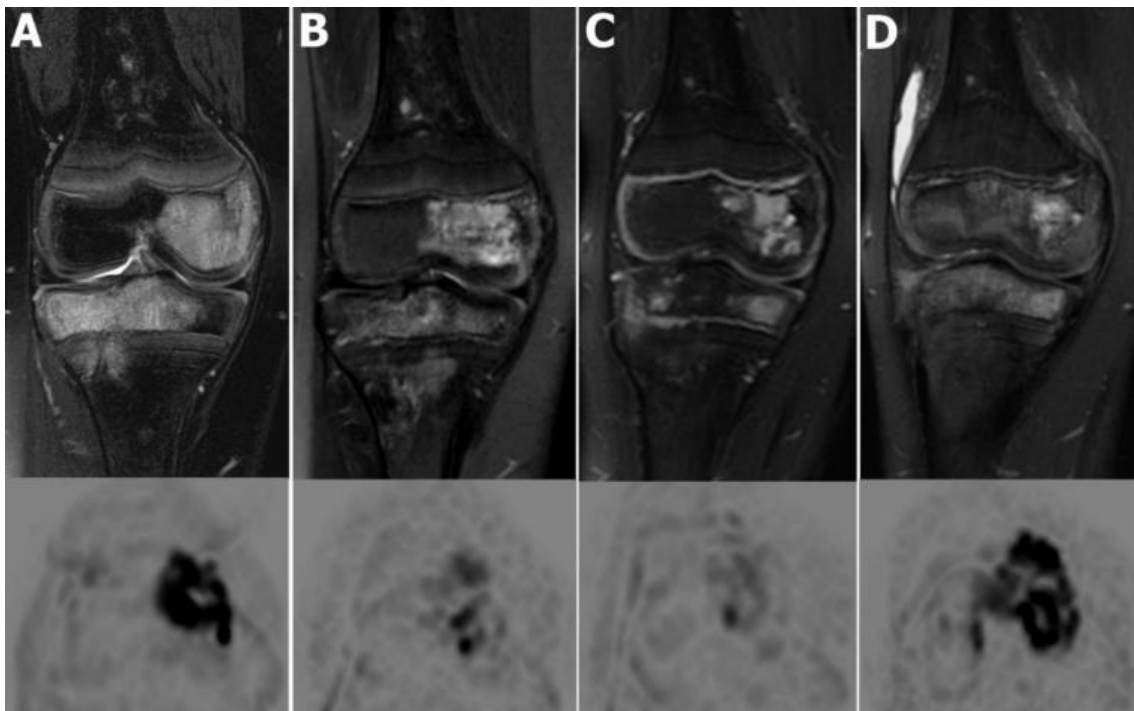
##### 4.5.1. Alveoláris rhabdomiosarkóma esetbemutató

A 8 éves fiúgyermek láz és jobb alsó végtagi fájdalom miatt jelentkezett kivizsgálásra. MR vizsgálat igazolta a multiplex, oszteolitikus csontfolyamatot, mely érintette a gerincet, a medencét, illetve a térd régiójában valamennyi csontot. Az L4-5 csigolya kompressziós törése igazolódott, illetve a felvételeken látható volt, amint a tumoros folyamat a torakális és lumbális gerincszakaszon extramedulláris propagációt is mutatott, gerincvelő felé bedomborodott. (14. ábra, A kép) A biopsziás mintavétel csontra lokalizált alveoláris rhabdomiosarkómát igazolt.

Kemoterápiás kezelése a CWS 2012 metasztatikus ágán megkezdődött, melyre jól reagált, a betegsége remisszióba került. A kezelés befejezését követően hét hónappal kontroll képalkotó MR vizsgálaton a jobb femur disztális és a jobb tibia proximális részében megjelenő aktivitásfokozódás vetette fel a recidíva lehetőségét, amelyet biopszia igazolt. (14. ábra, B kép) Ezt követően kemoterápiás kezelése a CWS 2012 protokoll recidív ágán folytatódott. A gyermek súlyosan elesett állapotú volt. Fájdalma nehezen volt csillapítható, mozgásban súlyosan korlátozta a beteget. Az általános jóllétet felmérő Karnofsky-Lansky skálán 20 %-ot ért el.

A recidív mintában ALK pozitívitas igazolódott, mely eredmény alapján crizotinib terápia indult 2x280 mg/m<sup>2</sup> adag alkalmazásával (reggel 200 mg, este 400 mg dózisban). A kezelés hatására a követett elváltozások jelentősen regrediáltak. A betegnél súlyos mellékhatások nem jelentkeztek, mindössze enyhe fokú, átmeneti szikralátás és ízérzés zavar, valamint a gyógyszer szedésének kezdeténél hányinger, hányás. A gyermek általános állapota is jelentősen javult, fájdalmai megszűntek, aktivitásában alapbetegsége nem korlátozta, a jólléti skálán 100 %-os volt az aktivitása. (14. ábra, C kép)

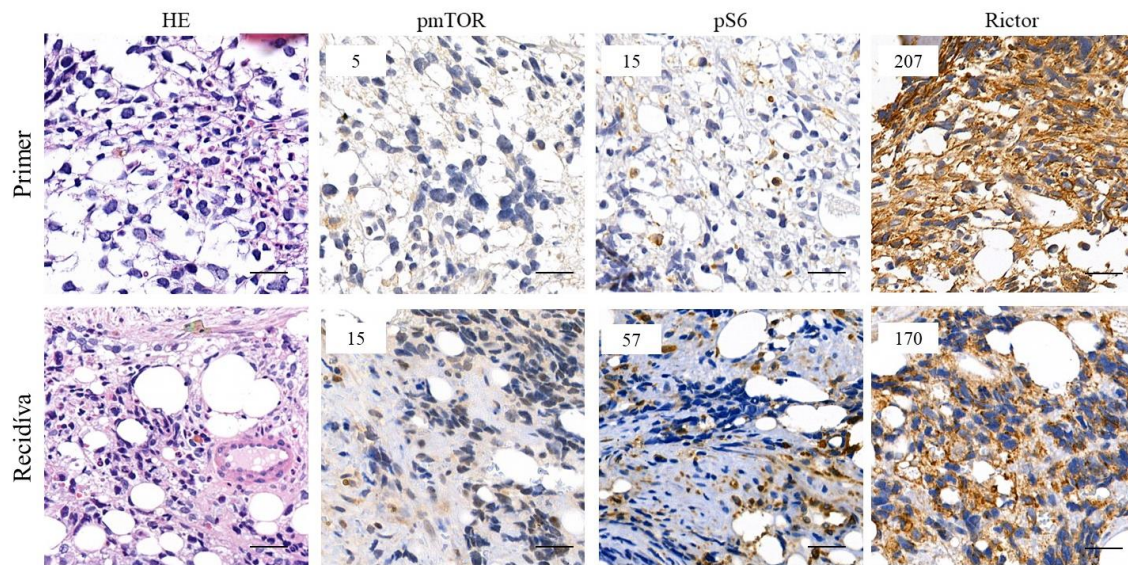
A crizotinib kezelés harmadik hónapjában kiújuló jobb térdre lokalizálódó fájdalma miatt, MR vizsgálat történt, amely igazolta a tumoros folyamat progresszióját. (14. ábra, D kép) Ezután egy ciklus kombinált topotecan, karboplatin kezelésben részesült, mely mellett panaszai fokozódtak. Enyhe pmTOR és pS6 pozitivitás alapján tizenkét ciklus mTOR gátló temsirolimus kezelést kezdtünk, mely mellett folyamatos tumorprogresszió volt észlelhető, ezért kezelését leállítottuk. A megkezdett palliatív ellátás mellett a gyermeket három hónappal később veszítettük el.



**14. Ábra: az alveoláris RMS miatt gondozott fiúgyermek MR felvétele.** A felső sorban a hagyományos MR felvétel, míg az alsó sorban a DWIBS (Diffusion weighted whole body Magnetic Resonance Imaging with background body signal suppression) felvételek láthatóak. **A:** a jobb térd MR felvétele a diagnózis felállításakor. A képen láthatóak a multiplex oszteolitikus csontléziók. **B:** felvételek a recidiváról. **C:** crizotinib kezelés hatására a tumor regrediál. **D:** a további progressziót igazoló felvételek. (1)

Jelen vizsgálatunk során ezen beteg mintái ismételt patológiai vizsgálatoknak vetettük alá, melyek a Rictor emelkedett expresszióját igazolták, alacsony pS6 immunpozitivitás mellett, ami a korábbi vizsgálatban még nem meghatározott emelkedett mTORC2 aktivitásra utal ebben az esetben. A retrospektív elemzés szövettani képei a 15. Ábrán

láthatóak. Ezen eredmények magyarázatul szolgálhatnak az mTORC1 inhibitor kezelésre elmaradó terápiás válaszra.



**15. Ábra: Az alveoláris RMS miatt gondozott fiú mTOR aktivitásának vizsgálata.** A retrospektív elvégzett vizsgálatokból készült szövettani metszetek láthatóak a képeken. A felső sorban a primer, az alsóban a recidív minták láthatóak. Látható az alacsony pS6 és a magas Rictor expresszió. A képek 20x nagyítással készültek. (4)

#### 4.5.2. Inflammatorikus miofibroblasztos tumor esetbemutató

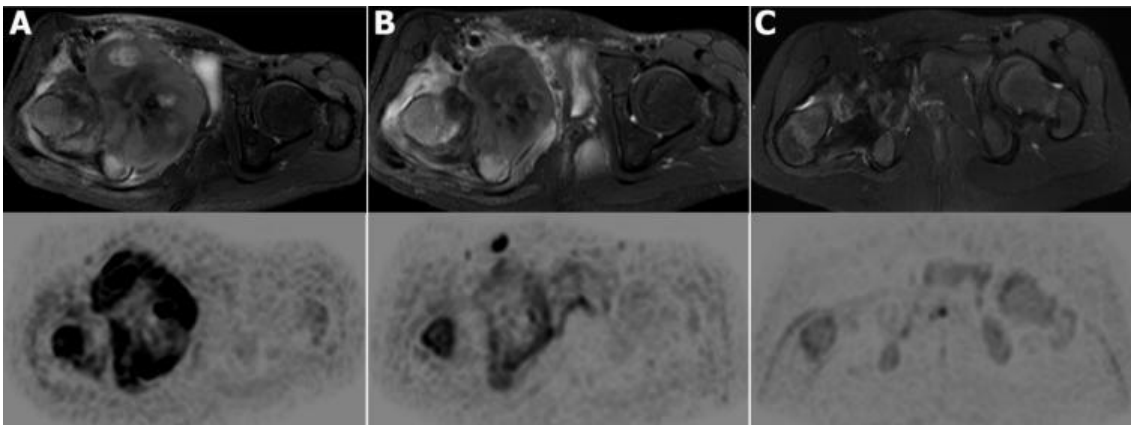
A hatéves fiúgyermek panaszai bizonytalan jobb csípőtáji fájdalommal kezdődtek. A jobb medencelapát és az abduktor izomzat nyomásérzékeny volt. A panaszos régióról készült első MR vizsgálat gyulladós folyamatot véleményezett, de a röntgenfelvételen diffúz atrófia ábrázolódott, így aspirációs citológia készült, mely tumoros folyamatot nem mutatott.

Két évvel később a beteg panaszai fokozódtak, kontroll MR és ismételt aspirációs citológia után feltárásos biopszia történt, a szövettan inflammatorikus miofibroblasztos tumort igazolt. A többgócú tumor gluteális és adduktor inak jelentős részével került eltávolításra. A beteg gyógyulását eredményező, onkológiai radikalitású műtét a tumor infiltratív terjedése miatt nem volt kivitelezhető.

Szövettani vizsgálat során immunhisztokémiai módszerrel ALK pozitívitas igazolódott, melyet a FISH vizsgálat megerősített. Két hónap elteltével kifejezett progresszió és kismedencei propagáció mutatkozott. Kortikoszteroid kezeléssel kiegészített

kemoterápiát kezdtünk a CWS 2009 protokoll magas kockázatú ágán. Kontroll MR felvételen az előzetes vizsgálatokhoz képest gyakorlatilag változatlan kép ábrázolódt. Az elmaradt terápiás válasz miatt a kemoterápiás kezelést felfüggesztettük, majd ALK pozitívítás igazolását követően crizotinib kezelés indult napi kétszer 250 mg dózisban (2x280 mg/m<sup>2</sup>). (16. ábra, A kép)

A crizotinib kezelés megkezdése előtt gyermek általános állapota rendkívül rossz volt, fájdalmai erősek voltak, nyugalomban is jelentkeztek, csak passzív, mozgást nem igénylő tevékenységekben tudott részt venni, csendes, nyugodt játékokra is csak segítséggel volt képes. A Karnofsky-Lansky skálán az állapota 20-30 %-ot ért el. Otthonában folyamatos ellátásra és kábító fájdalomcsillapító adására szorult.



**16. Ábra: Az IMT miatt gondozott fiúgyermek MR felvételei. A: a crizotinib kezelés előtti felvételek.** A csípőízület területén karéjos, az izmokat és csontokat is infiltráló tumorok folyamat látható cisztikus felritkulásokkal és régebbi bevérzés nyomaival. Legnagyobb kiterjedése 11x10 centiméter. A lézió infiltrálja az acetabulumot, az os ischiit és az os pubist is. Az alsó sorban a tumorról készült DWIBS felvétel látható. **B: a képek egy hónappal a crizotinib kezelés megkezdése után készültek.** Az előző felvételekkel összehasonlítva 20 %-os tumor regresszió látható. **C: A másfél éve tartó kezelést követő kontroll felvételek.** A tumor mérete jelentősen csökkent az aktivitása pedig teljesen megszűnt az alsó, diffúzió súlyozott felvételen. (1)

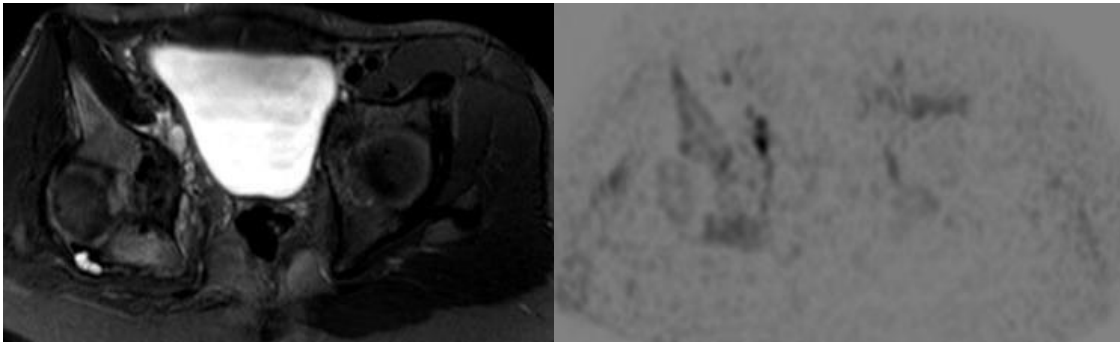
Crizotinib kezelés hatására jelentős mértékben csökkent a tumor mérete. Korábbi panaszai gyorsan javultak, a kezelés megkezdése utáni első hónap végére a Lansky jólléti skálán elérte a 80 %-ot. A gyermek fájdalomcsillapításként hetente 2-3 alkalommal igényelte NSAID adását, mely mellett iskolába tudott járni. (16. ábra, B kép) A kezdeti



mellékhatások szikralátás, ízérzés zavar, bradikardia, elektrolit eltérések voltak, de nem jelentkeztek olyan erősen, hogy a kezelést meg kellett volna szakítani.

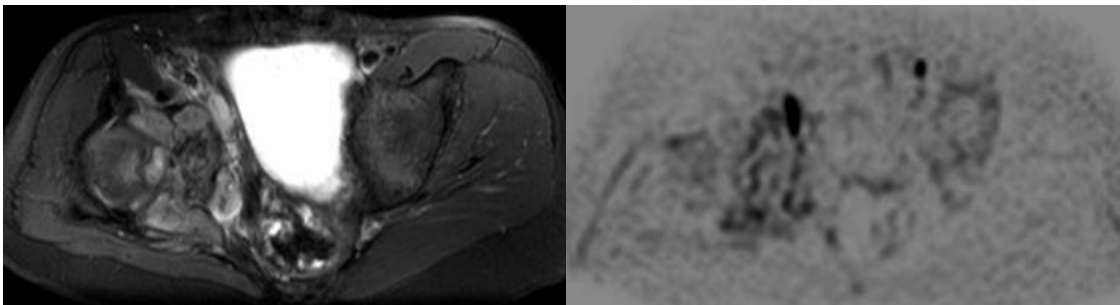
A több, mint két évig tartó crizotinib kezelés mellett folyamatos regresszió volt látható a kontroll MR felvételeken. A gyermek, akit betegsége mozgáskorlátozottá, ágyhoz kötötté tett iskolába járt, még a testnevelés órán is részt tudott venni. (16. ábra, C kép) Ezen beteg számára a teljes gyógyulást a tumor sebészi eltávolítása jelentheti, de ez csak jelentős csonkolás mellett lett volna kivitelezhető, így a cél a betegség remisszióban tartása addig, míg a gyermek el nem éri azt a testméretet, feltehetőleg a kamaszkora végén, amikor a protézis beültetés lehetővé válik számára.

Mivel a tumor aktivitása az MR felvételeken teljesen megszűnt, huszonöt hónap után a crizotinib kezelést felfüggesztettük. (17. ábra)



**17. Ábra:** a kezelés leállítását megelőzően készült MR felvétel. A tumor aktivitása lényegében megszűnt.

A kezelés leállítását követő hetekben a gyermek fájdalma visszatért, az MR progressziót igazolt, így a crizotinib terápiát visszaállították. (18. ábra)



**18. ábra:** a kezelés leállítását követően egy hónappal készült MR felvétel. Mind a reziduális tumor mérete, mind az aktivitása növekedett.

2019. áprilisában végzett MR vizsgálat új elváltozás megjelenését igazolta a korábbi követett tumortömeg mellett. Júniusban történt biopsziás mintavétel igazolta a daganat megtartott ALK pozitivitását. Crizotinib rezisztencia miatt, egyedi engedélyezést követően, 2019. szeptemberében megkezdődött a fiú alectinib, egy második generációs ALK-inhibitor, kezelése napi egyszer 600 mg dózisban. A követett elváltozás már a kezelés első hónapjának végére 30 %-os regressziót mutatott, a gyermek továbbra is panaszmentes, mellékhatásokat nem tapasztalt.

## 5. Megbeszélés

A gyermekkori lágyszarkómák agresszív gyermekkori malignitások. Lokalizált betegség és jó kemoterápiás válasz esetén ugyan jók a betegek túlélési esélyei, azonban a metasztatikus, magas kockázatú megbetegedések túlélése továbbra is alacsony. Recidív megbetegedések esetében a korábban alkalmazott kemoterápia és sugárkezelés mellékhatásai tovább szűkítik a kezelési lehetőségeket. Annak érdekében, hogy a magas kockázatú betegek túlélését és életminőségét javítani tudjuk a mellékhatások csökkentése mellett fontos új terápiás lehetőségek után kutatni. Ennek érdekében további vizsgálatok szükségesek a lágyszarkómák tumorgenezisét és progresszióját meghatározó molekuláris mechanizmusok azonosítására.

Kutatásunk első szakaszában a 2010. és 2014. között a II. számú Gyermekklinikán kezelt illetve akkoriban is kezelés alatt álló lágyszarkómás betegek mintáin tanulmányoztuk az ALK státuszt és annak változását két különböző diagnosztikus eljárást alkalmazva. Az ALK eltéréseit legszéleskörűbben nem kissejtes tüdőcarcinómák esetében vizsgálták, jelenleg a diagnosztikában az arany standard eljárás a FISH módszer. NSCLC estében igazolták, hogy mind az immunhisztokémiai, mind a FISH módszer megbízhatóan alkalmazható a daganat ALK pozitivitásának vizsgálatára. (45, 107) Azonban a gyermekkori lágyszarkómákat más genetikai eltérések jellemzik, ezért célunk volt igazolni az ALK vizsgálat jelentőségét ezen betegcsoport esetében is. (25) Továbbá összehasonlítottuk az immunhisztokémiai és FISH vizsgálatok eredményeit. Vizsgálatunk kezdetekor mindössze a nem kissejtes tüdőcarcinómák esetében végeztek rutinszerűen ALK FISH vizsgálatokat.

Különböző munkacsoportok eltérő adatokat publikáltak a lágyszarkómák ALK pozitivitásáról. A RMS-k vizsgálata során az embrionális daganatok esetében kis százalékban, míg az alveoláris variánsban jóval nagyobb arányban írtak le ALK pozitivitást. FISH vizsgálatokkal a leggyakoribb genetikai eltérésként az ALK gén amplifikációját igazolták. Továbbá korrelációt írt le több tanulmány az ALK pozitivitás és a metasztázisok megjelenésével, valamint a rossz kimenetellel. (30, 31) IMT-ok között 50 %-os ALK immunpozitivitást írtak le, valamint a transzlokációs eltérést találták a leggyakoribbnak. (33-35) Más lágyszarkómákban kevésbé jellemzett az ALK státusz.

18 beteg mintáit vetettük alá vizsgálatoknak, köztük szerepelt 11 embrionális, 2 alveoláris rhabdomioszarkómás, 3 inflammatorikus miofibroblasztos és 2 alveoláris légyszarkómás szövettani minta. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal 3 esetben volt igazolható ALK pozitivitás. FISH metodikával 4 ALK pozitív esetet igazoltunk, 1 amplifikált és 3 transzlokált esetet. Abban az esetben, ahol immunpozitivitás nem igazolódott, amplifikáció volt az észlelt genetikai eltérés, ennek a klinikai jelentősége kérdéses. Százalékokban kifejezve az eredményeinket az alveoláris RMS-k 50 %-a (1/2 minta), az embrionális RMS-k 9 %-a (1/11 minta), az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok 67 %-a (2/3 minta) volt ALK pozitív. Az alveoláris légyszarkómás két eset közül mindkettő ALK negatívnak bizonyult. Eredményeink eltérnek az irodalomban fellelhető adatoktól, ennek háttérében az alacsony esetszám, valamint az eltérő beválogatási kritériumok is állhatnak, de a tendencia, hogy az IMT és RMA eseteket jellemzi az ALK pozitivitás, a mi vizsgálatunkban is igazolódott.

Vizsgálatunk kezdetekor még kevés eset került publikálásra a crizotinib gyermekkori légyszarkómákban való alkalmazásáról. Mindössze esettanulmányok jelentek meg ALK pozitív IMT esetekben a crizotinib klinikai hatékonyságáról. IMT esetében a CWS protokoll szerint is a kezelés részét képezheti az ALK inhibitor terápia azon betegek esetében, ahol a teljes rezekció nem kivitelezhető. (3, 50) Rhabdomioszarkómák esetében alkalmazott ALK inhibitor kezelésről még kevesebb tanulmány jelent meg. Mindössze biztonságos alkalmazását igazolták gyermekek esetében is. (50) További kérdéseket vetett fel a felnőttkori nem kissejtes tüdődaganatokban leírt crizotinib rezisztencia, mely leküzdésére fejlesztés alatt álltak második generációs ALK inhibitorok. (25, 54) Két betegünkönél alkalmaztunk crizotinib kezelést. Az inflammatorikus miofibroblasztos tumor miatt gondozott beteg esetében kezdetekben komplett remissziót, majd crizotinib rezisztencia kialakulását követően alectinib alkalmazásával ismételt remissziót, az alveoláris rhabdomioszarkómával gondozott beteg esetében pedig parciális választ figyeltünk meg. Az irodalom legfrissebb fejleményeit követve, a vizsgálat első szakaszának lezárását követően jelent meg egy közlemény, mely magyarázattal szolgált az ALK pozitív alveoláris rhabdomioszarkómával diagnosztizált betegünk esetében megfigyelt crizotinib rezisztenciára. Peron és társai nem csak az ALK fehérje megjelenését vizsgálták RMS sejteken, hanem annak foszforiláltságát is. Vizsgálatuk során fény derült rá, hogy sok esetben az ALK fehérje egy defoszforilált, inaktív

állapotban található meg a RMS sejtekben, mely magyarázza az inhibitor hatástalanságát. Továbbá igazolták a vad típusú ALK fehérje inhibitor érzéketlenségét, illetve felvetették annak lehetőségét, hogy a crizotinib, mint multi-receptor-tirozin-kináz inhibitor fejt ki hatását *in vitro* az RMS sejteken, nem az ALK szignalizációs útvonalon keresztül. (119) Továbbá 2018-ban Wierdl és munkatársai ALK pozitív RMS xenograft modellben crizotinib kezelés hatására felgyorsult daganat növekedést írtak le, ami szintén felhívja a figyelmet a crizotinib kezelés óvatos alkalmazására RMS betegeknél. (120) Valamint klinikai vizsgálat is igazolta már az ALK inhibitor kezelésre elmaradó terápiás választ alveoláris rhabdomyosarkómák esetében. (61, 62)

Az ALK pozitív szarkómák crizotinib kezelésével szerzett tapasztalatok eltérőek, de azon IMT betegek számára, akiknél a konzervatív kezelésre a terápiás válasz elmarad, az ALK inhibitorok jelenthetik a gyógyulást. Ezen daganatos betegségek esetén a teljes gyógyulást a sebészi eltávolítás hozza. A crizotinib terápiával elérhető lehetne, hogy a daganat remisszióba kerüljön, vagy legalább a mérete és aktivitása annyira csökkenjen, hogy lehetővé váljon egy későbbi tumoreltávolító műtét.

Így összegezve eredményeinket arra a következtetésre jutottunk a vizsgálat első szakaszának végeztével, hogy célszerű lenne az ALK gén vizsgálatát a rutin diagnosztika részévé tenni az inflammatorikus miofibroblasztos betegek esetében, hiszen ennek a populációnak előnyt jelenthet a crizotinib kezelés. Jelenleg az ALK immunhisztokémia elvégzése az IMT betegek esetében már a rutin diagnosztikus festésekkel egy ütemben történik meg a Semmelweis Egyetemen.

Vizsgálatunk második szakaszában a gyermekkori rhabdomyosarkómák mTOR és metabolikus profilját jellemeztük. A 2007. és 2017. között Magyarországon rhabdomyosarkómával diagnosztizált vagy kezelt összes beteg elérhető szövettani mintáját összegyűjtöttük, összesen 48 betegről 65 mintát. Az irodalmi adatoknak megfelelően, túlsúlytal szerepeltek benne embrionális RMS minták (53 szövettani minta), jóval kevesebb volt az alveoláris (7 minta) és más szövettani altípusba tartozó RMS szövettani minta (5 minta). A primer, diagnózis felállításakor vett minták mellé lehetőség szerint összegyűjtöttük a kezelés közben és a recidíva igazolásakor vett szövettani mintákat is. Így összesen 8 primer-kezelés közben vett mintapár és 9 primer-recidív párosított minta gyűlt össze. Tissue microarray blokkokat hoztunk létre azokból a

szöveti mintákból, amelyekben a tumor mérete lehetővé tette, hogy a szövethenger eltávolítását követően is maradjon kellő mennyiségű értékelhető tumorszövet.

Preklinikai vizsgálatok alapján feltételezhető az mTOR útvonalnak a rhabdomyosarkóma sejtek tumorigenezisében és túlélésében játszott szerepe. (69-71, 79-82) *In vitro* vizsgálatokon túl csak limitált adatok állnak rendelkezésre a rhabdomyosarkómák *in situ* általános mTOR, valamint részletekbe menő mTORC1 és C2 aktivitásáról. (72) Az mTOR útvonal vizsgálatát az pmTOR (az mTOR kináz markere), a pS6 (az mTORC1 markere) és a Rictor (az mTORC2 markere) immunhisztokémiai módszerrel meghatározott fehérje expressziójával vizsgáltuk. A primer mintáink 56 %-ában (25/45 minta) figyeltünk meg magas pmTOR expressziót, mely arra utal, hogy az RMS esetek jelentős részében megnövekedett az mTOR kináz aktivitása. A fúzió pozitív esetek 80 %-a (4/5 minta), a fúzió negatív esetek 53 %-a (21/40 minta) mutatott immunpozitivitást. Azonban sok esetben magi pmTOR pozitivitás volt megfigyelhető, mely összefüggése a klinikumban megfigyelt kimenetellel rhabdomyosarkómák esetében nem igazolt, habár más tumorokban vizsgálat alatt áll. (121, 122) Ezenkívül a Rictor fokozott expresszióját detektáltuk a vizsgált primer minták 82 %-ában, valamint a fúzió pozitív minták között szignifikánsan több esetet jellemzett immunpozitivitás (T-próba,  $t(43)=-2,41$ ,  $p=0,020$ ), mint a fúzió negatívak között. Ezzel szemben a pS6 expressziója, amely az mTORC1 aktivitás markere, a legtöbb esetben alacsony volt. Eredményeink az esetek többségében az mTORC2 emelkedett aktivitására utalnak alacsony mTORC1 aktivitás mellett. Ennek jelentősége a későbbiekben szükségessé váló mTOR inhibitor kezelés megválasztásában van.

Kemoterápiás kezelést követően valamint a progresszió során változhat a malignus sejtek genetikai állománya, metabolikus aktivitása. Ezért célul tűztük ki, hogy összehasonlítsuk az mTOR aktivitást és egyes metabolikus enzimek expresszióját párosított mintáinkban. Eredményeink arra utalnak, hogy a kemoterápia nem okozott lényeges csökkenést az mTOR aktivitásban. A pmTOR és Rictor H-score értékek összességében kismértékű csökkenést mutattak. A pS6 protein H-score értékeiben azonban emelkedést észleltünk, ez azonban nem a diffúzan erősebb festődés következménye volt, hanem az egyedülálló, erős festődésű sejtek számának növekedése okozta. Ezt nem a daganat fokozott mTORC1 aktivitásának tudjuk be, hanem az alkalmazott mitózist gátló szerek (pl. aktinomycin-D) hatásának. Az aktinomycin-D hatása csökkenti az mTORC1-hez kapcsolódó riboszómális

S6 kináz aktivitást tumorsejtekben. (123) Mivel a tumoreltávolító műtét elvégzését egy kemoterápiás kezelési szünet idejére időzítik, így ezek a sejtek rövid időre felszabadulnak a mitotikus gátlás alól, proliferációjuk újraindul. A mitotikus fázisba belépő sejtek foszforilált riboszomális S6 mennyisége jelentősen megnő. (124) Ennek tudható be a detektált emelkedett pS6 expresszió bizonyos, a feltehetően éppen mitotikus fázisban levő sejtekben.

Recidív minták esetén fokozott pmTOR expressziót és mindemellett továbbra is alacsony pS6 valamint emelkedett Rictor H-score értéket detektáltunk. Ami szembetűnő volt, hogy azon betegeinknél, akik jó terápiás választ mutattak a recidív kezelési protokollra, alacsonyabb pmTOR expressziót észleltünk mind a primer tumor, mind a recidív minta esetében. Ezzel szemben azon betegeink többségében, akiket elvesztettünk a recidív kemoterápia hatástalansága miatt, a primer daganat szövettani mintában is igazolható volt emelkedett pmTOR expresszió, mely további emelkedést mutatott a betegség kiújulásakor. Ezen eredményeink alapján feltételezhető összefüggés a kimenetel és az mTOR aktivitás között, de ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

Az mTOR útvonal gátlására több generációs inhibitorok érhetőek el. A legszéleskörűbben alkalmazottak az első generációs mTOR inhibitorok, a rapalógok, amelyek az mTORC1 gátlói. A preklinikumban ígéretes eredményeket mutattak, de a klinikumban mégsem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. (79, 82) Sem monoterápiában, sem más inhibitorokkal kombinálva nem igazolódott a klinikai hatásosságuk. (83, 84) Habár a legutóbbi klinikai vizsgálat eredményei mást mutatnak. Ebben a vizsgálatban a konvencionális kezelési protokollok mellett egyik ágon temsirolimus (mTORC1 inhibitor), a másik ágon pedig bevacizumab kezelésben részesültek a betegek. Az eredmények alapján a temsirolimus kezelés az össz-túlélésen (overall survival) nem javított, de az eseménymentes túlélése a temsirolimus ágon kezelt betegeknek jobb volt. (85) Más szövettani csoportba eső szarkómák esetén igazolták, hogy a pS6 jó prognosztikus marker annak előjelzésére, hogy a hatásos lesz-e az mTORC1 inhibitor kezelés. (125) A fent részletezett vizsgálatban a betegek tumorának mTOR aktivitását, illetve annak C1 és C2 komplexek közötti megoszlását nem vizsgálták, a kezelés megkezdéséhez nem volt feltétel az mTORC1 aktivitásának igazolása. (85) Eredményeinket és az egyelőre limitált klinikai tapasztalatainkat figyelembe véve, javasoljuk az mTOR státusz részletes vizsgálatát az mTOR inhibitor kezelés megkezdése

előtt, mivel az alacsony pS6 expresszió mellett, a Rictor fokozott expressziója is előre jelezheti a rapalóg kezeléssel szembeni rezisztenciát. Az mTORC1 inhibitor, rapalóg kezelést csak olyan betegek számára javasoljuk, akinél fokozott az mTORC1 útvonal emelkedett aktivitása, de nem jellemzi az mTORC2 komplex emelkedett aktivitása. A túlélési eredmények további javulása remélhető mind az mTORC1-C2, mind pedig a PI3K-mTOR útvonal kettős inhibitorainak klinikumban való alkalmazásától. (76, 77, 81, 126) Az mTOR státusz vizsgálata segítheti a klinikus döntését, hogy elégséges-e a betegnél mTORC1 gátló alkalmazása vagy inkább a dual-inhibitoroktól várható hatékonyság.

A rhabdomyosarkómás szövettani minták mTOR státuszának vizsgálata mellett a tumoros sejtek metabolikus profilját is jellemeztük. A malignus sejteknek túlélésükhöz és növekedési ütemük fenntartásához alkalmazkodniuk kell a folyamatosan változó környezethez, tápanyag ellátottsághoz valamint az alkalmazott kezelések hatásaihoz. Ezen metabolikus adaptációban fontos szerepet játszik az mTOR szignalizációs útvonal aktivitása. (127-129)

A PI3K-Akt-mTOR jelátviteli útvonal aktivitás fokozódásának hatására emelkedhet a sejtek glukóz felvétele, változhat a hasznosulásának útvonala. Az oxigénellátottságtól független anaerob glikolízis, a Warburg-effektus, jellemzi a malignus sejtek többségének szénhidrát anyagcseréjét. Az mTOR útvonal hozzájárul a glukóz transzporterek számának emeléséhez, a glikolitikus enzimek expressziójának fokozásához. Az mTOR a HIF1 $\alpha$  és MYCN transzkripció faktorokon keresztül segíti a glikolitikus gének átírását. Mind az mTORC1 és mTORC2 fontos szerepet játszik a glukóz anyagcsere adaptációjában. (64, 66) A glukóz hasznosulását RMS sejtekben a PFK és LDHA enzimek expressziójával jellemeztük. A PFK a glikolízis egyik résztvevője, a fruktóz-6-foszfát – fruktóz-1,6-biszfoszfát átalakulásért felelős és a glikolízis egyik legjobban szabályozott enzime. A PFK gyenge festődést mutatott a mintáinkon. A primer szövettani minták mindössze 18 %-a (8/45 minta) mutatott immunpozitivitást. Az fúzió negatív alcsoportban 13 % (5/40 minta), a fúzió pozitív alcsoportban 60 %-os (3/5 minta) pozitivitást detektáltunk, ez a különbség szignifikáns volt (Fisher-egzakt teszt,  $p=0,033$ ). A recidíva során és a kemoterápiás kezelést követően vett minták enzim expressziója még alacsonyabbnak bizonyult. Ezzel szemben az LDHA, a piruvát-laktát átalakításért felelős enzim, erős pozitivitást mutatott a primer minták 55 %-ában és az enzim expressziója



fokozódott a recidív mintákban (82 % pozitív). Előbbiek mellett korreláció mutatkozott a primer minták esetében a mTOR kináz aktivitás fokozódása és az LDHA expresszió között ( $R=0,403$ ;  $p<0,05$ ). Ezen eredményeink tükrében feltételezhető a Warburg-effektus jelenléte, illetve ennek kapcsolata az emelkedett mTOR aktivitással a rhabdomyosarkóma sejtekben.

Az oxidatív foszforiláció változásai is hozzájárulnak a Warburg-effektus kialakulásához, így a mitokondriális működésben létrejövő rendellenességek jelenleg vizsgálatok alatt állnak. Rhabdomyosarkóma sejtvonalakat tanulmányozva ellentmondásos eredmények születtek. Bizonyos munkacsoportok igazolták, mások cáfolták a mitokondrium hibás működését. (95, 100-102) Az oxidatív foszforiláció működését az ATPB enzim expressziójának vizsgálatával jellemeztük. Az ATPB a mitokondrium belső membránján található meg, az ATP szintézis utolsó lépését katalizálja. Az ATPB expressziót alacsonynak találtuk a vizsgált RMS mintákon, ami alapján az oxidatív foszforiláció elhanyagolható szerepe feltételezhető a RMS sejtek anyagcseréjében.

A pentóz-foszfát út ribóz-5-foszfát, ami a nukleinsav anyagcsere építőköve, és NADPH termeléssel járul hozzá a daganatos sejtek anyagcseréjéhez, redox egyensúlyuk fenntartásához. Mind az mTORC1, mind az mTORC2 fokozza a pentóz-foszfát útvonal enzimeinek transzkripcióját és aktivációját. A pentóz-foszfát út sebesség meghatározó lépését a G6PDH katalizálja. A G6PDH redukálja a NADP-ot NADPH-ra, miközben oxidálja a glükóz-6-foszfátot. (64, 97) A G6PDH expresszióját vizsgálva jellemeztük a RMS sejtek pentóz-foszfát útvonal aktivitását. A G6PDH kifejezetten erős immunpozitivitást mutatott a primer mintáinkban. Fúzió negatív daganatok 87 %-ában (35/40 minta), a fúzió pozitívak 80 %-ában (4/5 minta) tapasztaltunk erős G6PDH expressziót. A recidív daganatokban szignifikánsan csökkent expressziót detektáltunk a primer daganatokhoz képest (T-próba,  $t(54)=4,06, p=0,004$ ). Eredményeink alapján feltételezhető a pentóz-foszfát út fokozott aktivitása primer tumorok esetén, ezzel szemben recidíva esetén nem igazolható az útvonal jelentősége RMS sejtekben.

A fokozott glutamin igény több malignitás esetében ismert. Az mTORC1 komplex fokozza a glutaminolízishez kapcsolt gének transzkripcióját, továbbá maga a glutamin túlkínálat lehet pozitív visszakapcsolás az mTORC1 útvonalnak. A glutamin hasznosítási útvonalaknak fontos szerepe van a reaktív oxigén gyökök eliminációjában, a nem esszenciális aminosavak, a purin, pirimidin és zsírsavak szintézisében. (98) Glutamin

dependenciát *in vitro* RMS sejtvonalakon igazolt Issaq és munkacsoportja. (99) Fentiekkal összhangban a mi vizsgálataink során is kifejezetten magas GLS expresszió volt igazolható a primer mintákban. Recidív RMS sejtekben az erős expresszió kissé mérséklődött, a minták közel fele mutatott már csak pozitivitást. Továbbá korrelációt lehetett igazolni a primer minták vizsgálata során az mTOR kináz aktivitás fokozódása és a GLS expresszió között ( $R=0,302$ ;  $p<0,05$ ). Eredményeink alapján feltételezhető a RMS sejtek fokozott glutamin igénye.

A metabolikus útvonalak vizsgálata során nyert adatok klinikai jelentősége a lehetséges új terápiás célpontok azonosításában rejlik. Rabdomyosarkómák esetében a fokozott aktivitást mutató metabolikus útvonalak, amelyeken érdemes támadáspontokat keresni a glikolízis, a pentóz-foszfát útvonal, illetve a glutamin anyagcsere. Bizonyos metabolikus enzimek gátlása okozhat szisztémás toxicitást, mivel a normál szövetekben is fontos fiziológiás szerepe van ezeknek az enzimeknek. Az útvonalak terápiás célpontként való alkalmazhatósága attól függ, hogy tolerálható-e az út szisztémás blokádjá.

Számos olyan metabolikus inhibitor létezik, amely a glikolízist célozza meg, mint például a GLUT1 and GLUT4 (WZB117, silibin), hexokináz (2-deoxiglukóz, 3-bromopiruvátsav), foszfofruktokináz (PFK158), piruvátkináz M2 (TLN-232, ionidamine), LDHA (FX11, GNE-140, FX11, galloflavin) inhibitorai, melyek jelenleg is fejlesztés alatt állnak. A malignus sejtek mikro környezetével való szimbiózisa a laktát metabolizmuson keresztül gátolható a laktát transzporterek gátlásával is. Előbbi hatóanyagok közül több is fázis kettő vizsgálatban van. (91)

A pentóz-foszfát útvonalon a foszfoglicerát mutáz enzim inhibitorának (PGMI-004A) preklinikai vizsgálata zajlik, mely ez idáig *in vitro* és *in vivo* is hatásosnak bizonyult. (91)

A glutamin anyagcsere támadására több célzott terápiás gyógyszer is fejlesztés alatt áll. Támadáspontjaik a glutamin transzporterek, a glutamináz, glutamát-dehidrogenáz. A benzilszerin és az L- $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilide a glutamin transzporter inhibitorai. A GLS gátlására fejlesztették a BPTES, a Telaglenastat (CB-839), és a compound 968 nevű hatóanyagokat. Az epigallokatekin gallát, a glutamát-dehidrogenáz inhibitora. Az AOA transzamináz inhibitor a proliferációt a glutamin citrátkörbe lépésén keresztül gátolja. Ezen hatóanyagok prelinikumban ígéretes daganat ellenes hatással bírtak *in vitro*. (98) A szarkómákon végzett preklinikai vizsgálatok száma igen alacsony, de a Telaglenastatnak a szarkómák proliferációjára kifejtett gátló hatását igazolták *in vivo*.

(130) Fázis kettő vizsgálatok a Telaglenastat, epigallokatekin gallát hatóanyagok humán medicinában történő alkalmazását tolerálhatónak és biztonságosnak találták, ámbar az utóbbival végzett vizsgálatok nem igazolták a klinikai hatékonyságát. (131, 132)

Mindezen kutatási eredmények, az általunk RMS sejteken leírt enzim expresszió tükrében, új terápiás célpontokkal szolgálhatnak a jövőben.

Meg kell említenünk a vizsgálat legnagyobb limitációját, amely az alcsoportokra bontás során az esetszámokban megfigyelhető nagy eltérésben jelentkezik. A keletkező kis esetszámú csoportok rontják a szignifikáns eltérések igazolásának esélyét. Habár az adott ritka betegségek előfordulásához képest jelentős esetszámmal dolgozhattunk, a továbbiakban megfontolandó prospektíven folytatni a vizsgálatok elvégzését az esetszám növelése érdekében.

## 6. Következtetések

Kutatásunk eredményeit összefoglalva:

1. A gyermekkori lágyszarkómákban
  - az ALK státusz immunhisztokémiai vizsgálata során igazoltuk az ALK gén eltéréseit és az újonnan megjelenő fehérje expresszióját: a vizsgált esetekben az alveoláris rhabdomyosarkómák 50 %-a, az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok 67 %-a volt ALK pozitív, míg a vizsgált embrionális rhabdomyosarkómák és alveoláris lágyszarkómák negatívak voltak.
  - Az ALK immunpozitív esetekben a genetikai eltérést, transzlokációt is kimutattuk. Egy további esetben mutattunk ki amplifikációt ALK fehérje expresszió nélkül, így ennek az eltérésnek a klinikai jelentősége kérdéses.
  - Eredményeink alapján az ALK pozitivitás megítélésére célszerű a tumorigenezis során a sejtekben újonnan megjelenő ALK fehérje immunhisztokémiai kimutatását alkalmazni és ehhez kiegészítésként végezni FISH vizsgálatot.
  
2. A rhabdomyosarkóma szövettani minták mTOR jelátviteli útvonalhoz kapcsolt fehérjéinek és metabolikus enzimeinek *in situ* expresszió vizsgálatával a következőket állapítottuk meg:
  - A kezelés előtti, primer szövettani minták daganatsejtjeiben fokozott mTOR aktivitást, a detektált fehérje expressziós mintázat alapján jellemzően mTORC2 aktivitást mutattunk ki, amellyel az mTORC2 jelátviteli útvonal fokozott aktivitását igazoltuk rhabdomyosarkómákban. Az mTORC2 aktivitás szignifikánsan nagyobb volt a PAX-FOXO fúzió pozitív esetekben a fúzió negatívakhoz képest. Kemoterápiát követően az mTOR aktivitás szöveti szinten nem változott, míg recidív szövetmintákban, elsősorban azokban a betegekben ahol a másodvonalbeli kezelés hatástalan volt, a primer mintákban tapasztaltakhoz képest fokozódott az mTOR aktivitás, megtartott mTORC2 dominancia mellett.
  - A rhabdomyosarkóma sejtek metabolikus folyamatainak átrendeződését figyeltük meg:

- A gyenge ATPB és erős LDHA immunpozitivitás a rhabdomioszarkóma sejtekben Warburg-effektus jelenlétére utal.
- A G6PDH enzim fokozott expressziója alapján jelentős a pentóz-foszfát útvonal aktivitása is.
- Az intenzív GLS immunpozitivitás a rhabdomioszarkóma sejtek fokozott glutaminhasznosítására hívja fel a figyelmet.
- Az mTOR aktivitás szerepét támasztja alá a primer mintákban igazolt korreláció az mTOR aktivitás (pmTOR expresszió) és az LDHA, illetve a GLS expresszió között.
- A fenti anyagcsere útvonalak azonban kevésbé változtak a kemoterápiás kezelés hatására. A G6PDH szignifikáns csökkenést mutatott a recidív szövetmintákban.

3. Két esetben dokumentáltuk az alkalmazott célzott terápiás kezelések hatásait.

- az ALK inhibitor kezelés IMT esetben rendkívül hatékony lehet (IMT diagnózisú gyermek a több éve tartó folyamatos ALK inhibitor, crizotinib, majd alectinib kezelés mellett panaszmentes, remisszióban van és jelentkező mellékhatások is csak enyhék voltak), míg más szarkómák esetében csak parciális válasz érhető el (alveoláris RMS miatt gondozott gyermek esetében a crizotinib kezeléssel mindössze parciális választ lehetett elérni)
- Egyes szarkómák kezelése során, terápia rezisztencia vagy relapszus esetében, felmerülhet az mTOR gátlók alkalmazása, de ezekben az esetekben a rapalógok hatástalanságának hátterében az mTORC2 komplex aktivitása fontos tényező lehet.

Az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok esetében az ALK inhibitor kezelés hatékony lehet, jelenleg az ALK immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzése a rutin diagnosztikával egy ütemben megtörténik. Egyedi off label engedéllyel szükség esetén valamennyi ALK pozitív IMT-ral diagnosztizált gyermek megkaphatja a szükséges ALK inhibitor kezelést. Az ALK inhibitor kezelés rhabdomioszarkóma esetében nem bizonyult hatásosnak. Feltehetőleg az ALK nem játszik fontos szerepet a tumorigenezisben akkor

sem, ha expressziója, genetikai eltérése a daganatos szövetben igazolható. Továbbá az általunk kimutatott emelkedett mTORC2 aktivitás miatt a magas kockázatú esetekben érdemes az mTOR aktivitást pontosan jellemezni, hiszen ezen betegcsoport profitálhat az új mTOR inhibitor kezelésekből. A jövőben új terápiás célpontokként a megváltozott anyagcsere különböző útvonalai is szerepelhetnek.

## 7. Összefoglalás

A rhabdomyosarkóma (RMS), a leggyakoribb gyermekkori lágyrésztumor, egy agresszív malignitás. A lokalizált elváltozások esetében a túlélés jó, de előrehaladott, metasztatikus esetekben csak a betegek harmada remélhet teljes gyógyulást. A túlélési esélyek és a hosszú távú életminőség javítása érdekében szükséges új terápiás célpontok után kutatni. Magas kockázatú lágyrészsarkómás betegek mintáin végeztük el az anaplasztikus limfóma kináz (ALK) státuszának vizsgálatát immunhisztokémiai és FISH módszert alkalmazva. Eredményeinket összefoglalva az alveoláris RMS-k 50 %-a, az embrionális RMS-k 9 %-a, az inflammatorikus miofibroblasztos tumorok (IMT-ok) 67 %-a bizonyult ALK pozitívnak. Az alveoláris lágyrésztumorok között egy esetben sem volt igazolható az ALK fehérje expressziója, genetikai eltérése. Az ALK inhibitorokkal szerzett klinikai tapasztalatunk alapján alkalmazásuk az ALK pozitívítás igazolását követően javasolt IMT esetén, azonban RMS-k esetén nem. (L. Felkai et al., The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors ,2019, Pathol Oncol Res 25, 217-224)

Kutatásunk második szakaszában az mTOR szignalizációs és anyagcsere útvonalak jellemzését végeztük az aktivitásukkal összefüggésbe hozható fehérjék *in situ* immunhisztokémiai vizsgálatával 65 RMS mintán. A RMS sejteket jellemezte a fokozott mTOR aktivitás és mTORC2 dominancia. Összehasonlítva a rendelkezésre álló primer - kemoterápiás kezelést követően vett, illetve primer - recidív minta párokat arra a következtetésre jutottunk, hogy a kemoterápia nem változtat a daganat mTOR aktivitás profilján. Fokozódik azonban az mTOR aktivitás a másodvonalban terápia rezisztens betegekben megjelenő recidív tumorszövetekben. A fenti patológiai és klinikai tapasztalatunk alapján a jelenleg elérhető mTORC1 inhibitor kezelést csak olyan betegek számára javasoljuk, akinél igazolt az mTORC1 útvonal emelkedett aktivitása, de nem jellemzi az mTORC2 komplex hiperaktivitás. Azon betegek esetében, akiknél mTORC2 aktivitás igazolódott, dual-inhibitor alkalmazása merül fel a jövőben.

Továbbá vizsgálati eredményeink alapján érdemes alternatív terápiás célpontok után kutatni RMS-ákban a glikolízis, a glutaminolízis, valamint a pentóz-foszfát útvonalon. (L. Felkai et al., Characterization of mTOR activity and metabolic profile in pediatric rhabdomyosarcoma, 2020, Cancers)

## 8. Summary

Rhabdomyosarcoma (RMS), the most common pediatric soft tissue tumor, is an aggressive malignancy. The overall survival of localized cases is good, however only one third of the patients with advanced, metastatic disease could hope for total remission. To improve outcome and long-term quality of life it is important to look for new therapeutic options.

We evaluated the anaplastic lymphoma kinase (ALK) status of the patients diagnosed with high risk solid tumors using immunohistochemistry and FISH. 50 % of the alveolar RMSs, 9 % of the embryonal RMSs, 67 % of the inflammatory myofibroblastic tumors (IMTs) were found to be ALK positive. None of the alveolar soft part sarcoma patients was ALK positive. Our clinical experience suggests that using ALK inhibitors in ALK positive IMT patients is efficient, but not in RMS patients. (L. Felkai et al., The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors. (2019) *Pathol Oncol Res* 25, 217-224)

In the second phase of our investigations, we characterized the mTOR and metabolic profile of 65 RMS samples through the *in situ* expression of proteins related to these pathways. We observed enhanced mTOR activation with an mTORC2 dominance in primary cases. Comparing primary and neoadjuvant treated samples, we found that chemotherapy did not alter the mTOR profile. We detected enhanced mTOR activity in relapsed cases in which second line treatment was shown to be ineffective compared to primary samples. Our pathological and clinical experience confirm the importance of screening of RMS patients before administering mTOR inhibitor therapy. We suggest mTORC1 inhibitor treatment only for patients with enhanced mTORC1 activity without mTORC2 pathway activation. For patients with activated mTORC2 pathway the dual-inhibitor treatment could be a future therapeutic option.

In addition, our results shed light to further alternative therapeutic targets on the glycolytic, glutaminolytic and pentose-phosphate pathway in RMSs. (L. Felkai et al., Characterization of mTOR activity and metabolic profile in pediatric rhabdomyosarcoma, 2020, *Cancers*)



## 9. Irodalomjegyzék

1. Felkai L, Bánusz R, Kovalszky I, Sápi Z, Garami M, Papp G, Karászi K, Varga E, Csóka M. (2019) The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors. *Pathol Oncol Res*, 25: 217-224.
2. Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, Micsik T, Kopper L, Sebestyén A. (2017) mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. *J Clin Pathol*, 70: 410-416.
3. Koscielniak E, Klingebiel T. (2012) CWS-guidance for risk adapted treatment of soft tissue sarcoma and soft tissue tumours in children, adolescents, and young adults. Eigenpublikation Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe: 310.
4. Felkai L, Krencz I, Kiss DJ, Nagy N, Petővári G, Dankó T, Micsik T, Khor A, Tornóczky T, Sápi Z, Sebestyén A, Csóka M. (2020) Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cancers (Basel)*, 12.
5. Jakab Z, Garami M, Bartyik K, Csoka M, Erdelyi DJ, Hauser P, Juhasz A, Kelemen A, Krivan G, Masat P, Müller J, Nagy C, Peter G, Renyi I, Szegedi I, Vojcek A, Zombori M, Bardi E, Kovacs G. (2020) Late mortality in survivors of childhood cancer in Hungary. *Sci Rep*, 10: 10761.
6. Wexler LH SS, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma, Principles and Practice of Pediatric Oncology. PD Pizzo PA. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2011: 798-827
7. Grufferman S, Ruymann F, Ognjanovic S, Erhardt EB, Maurer HM. (2009) Prenatal X-ray exposure and rhabdomyosarcoma in children: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 1271-1276.
8. Grufferman S, Schwartz AG, Ruymann FB, Maurer HM. (1993) Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children. *Cancer Causes Control*, 4: 217-224.
9. DeBaun MR, Tucker MA. (1998) Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr*, 132: 398-400.

10. Gripp KW. (2005) Tumor predisposition in Costello syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 137C: 72-77.
11. Skapek SX, Ferrari A, Gupta AA, Lupo PJ, Butler E, Shipley J, Barr FG, Hawkins DS. (2019) Rhabdomyosarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, 5: 1.
12. El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. (1990) Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ*, 1: 325-331.
13. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, Thway K, Orbach D, Laé M, Fréneaux P, Pritchard-Jones K, Oberlin O, Shipley J, Delattre O. (2010) Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 28: 2151-2158.
14. Parham DM, Barr FG. (2013) Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol*, 20: 387-397.
15. Arndt CAS, Bisogno G, Koscielniak E. (2018) Fifty years of rhabdomyosarcoma studies on both sides of the pond and lessons learned. *Cancer Treat Rev*, 68: 94-101.
16. Pappo AS, Janeway KA. (2009) Pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 23: 15-34, vii.
17. Mossé YP, Voss SD, Lim MS, Rolland D, Minard CG, Fox E, Adamson P, Wilner K, Blaney SM, Weigel BJ. (2017) Targeting ALK With Crizotinib in Pediatric Anaplastic Large Cell Lymphoma and Inflammatory Myofibroblastic Tumor: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 35: 3215-3221.
18. Paoluzzi L, Maki RG. (2019) Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Alveolar Soft-Part Sarcoma: A Review. *JAMA Oncol*, 5: 254-260.
19. Bisogno G, De Salvo GL, Bergeron C, Gallego Melcón S, Merks JH, Kelsey A, Martelli H, Minard-Colin V, Orbach D, Glosli H, Chisholm J, Casanova M, Zanetti I, Devalck C, Ben-Arush M, Mudry P, Ferman S, Jenney M, Ferrari A, Group EpStsS. (2019) Vinorelbine and continuous low-dose cyclophosphamide as maintenance chemotherapy in patients with high-risk rhabdomyosarcoma (RMS 2005): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20: 1566-1575.

20. Ladra MM, Szymonifka JD, Mahajan A, Friedmann AM, Yong Yeap B, Goebel CP, MacDonald SM, Grosshans DR, Rodriguez-Galindo C, Marcus KJ, Tarbell NJ, Yock TI. (2014) Preliminary results of a phase II trial of proton radiotherapy for pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 32: 3762-3770.
21. Chargari C, Haie-Meder C, Guérin F, Minard-Colin V, de Lambert G, Mazeron R, Escande A, Marsolat F, Dumas I, Deutsch E, Valteau-Couanet D, Audry G, Oberlin O, Martelli H. (2017) Brachytherapy Combined With Surgery for Conservative Treatment of Children With Bladder Neck and/or Prostate Rhabdomyosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 98: 352-359.
22. Wendy Landier SHA, Anna T. Meadows, and Smita Bhatia. Late Effects of Childhood Cancer and its Treatment. In: PA Pizzo ,DG Poplack (szerk.), *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins , Philadelphia, PA, USA, 2015: 1173-1196.
23. Schwartz CL. (1999) Long-Term Survivors of Childhood Cancer: The Late Effects of Therapy. *The Oncologist*, 4: 45-54.
24. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer K, Shapiro DN, Look AT, Saltman DL. (1995) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 267: 316-317.
25. Hallberg B, Palmer RH. (2013) Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 13: 685-700.
26. Schönherr C, Ruuth K, Kamaraj S, Wang CL, Yang HL, Combaret V, Djos A, Martinsson T, Christensen JG, Palmer RH, Hallberg B. (2012) Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 31: 5193-5200.
27. Corao DA, Biegel JA, Coffin CM, Barr FG, Wainwright LM, Ernst LM, Choi JK, Zhang PJ, Pawel BR. (2009) ALK expression in rhabdomyosarcomas: correlation with histologic subtype and fusion status. *Pediatr Dev Pathol*, 12: 275-283.
28. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. (2008) Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*, 455: 967-970.

29. Pillay K, Govender D, Chetty R. (2002) ALK protein expression in rhabdomyosarcomas. *Histopathology*, 41: 461-467.
30. Yoshida A, Shibata T, Wakai S, Ushiku T, Tsuta K, Fukayama M, Makimoto A, Furuta K, Tsuda H. (2013) Anaplastic lymphoma kinase status in rhabdomyosarcomas. *Mod Pathol*, 26: 772-781.
31. van Gaal JC, Flucke UE, Roeffen MH, de Bont ES, Sleijfer S, Mavinkurve-Groothuis AM, Suurmeijer AJ, van der Graaf WT, Versleijen-Jonkers YM. (2012) Anaplastic lymphoma kinase aberrations in rhabdomyosarcoma: clinical and prognostic implications. *J Clin Oncol*, 30: 308-315.
32. van Erp AEM, Hillebrandt-Roeffen MHS, van Houdt L, Fleuren EDG, van der Graaf WTA, Versleijen-Jonkers YMH. (2017) Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) in Rhabdomyosarcoma (RMS) with the Second-Generation ALK Inhibitor Ceritinib. *Target Oncol*, 12: 815-826.
33. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. (2010) Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol*, 3: 416-428.
34. Janeway KA, Maki RG. (2012) New strategies in sarcoma therapy: linking biology and novel agents. *Clin Cancer Res*, 18: 5837-5844.
35. Murga-Zamalloa C, Lim MS. (2014) ALK-driven tumors and targeted therapy: focus on crizotinib. *Pharmgenomics Pers Med*, 7: 87-94.
36. Cessna MH, Zhou H, Sanger WG, Perkins SL, Tripp S, Pickering D, Daines C, Coffin CM. (2002) Expression of ALK1 and p80 in inflammatory myofibroblastic tumor and its mesenchymal mimics: a study of 135 cases. *Mod Pathol*, 15: 931-938.
37. Cook JR, Dehner LP, Collins MH, Ma Z, Morris SW, Coffin CM, Hill DA. (2001) Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in the inflammatory myofibroblastic tumor: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol*, 25: 1364-1371.
38. Cools J, Wlodarska I, Somers R, Mentens N, Pedoutour F, Maes B, De Wolf-Peeters C, Pauwels P, Hagemeijer A, Marynen P. (2002) Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 34: 354-362.

39. Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman EJ. (1999) Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res*, 59: 2776-2780.
40. Chun YS, Wang L, Nascimento AG, Moir CR, Rodeberg DA. (2005) Pediatric inflammatory myofibroblastic tumor: anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression and prognosis. *Pediatr Blood Cancer*, 45: 796-801.
41. Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, O'Toole S, Yip P, Wright GM, Wainer Z, Horvath LG, Boyer M, McCaughan B, Kohonen-Corish MR, Fox S, Cooper WA, Solomon B. (2013) Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, 26: 1545-1553.
42. Murakami Y, Mitsudomi T, Yatabe Y. (2012) A Screening Method for the ALK Fusion Gene in NSCLC. *Front Oncol*, 2: 24.
43. Lin C, Shi X, Yang S, Zhao J, He Q, Jin Y, Yu X. (2019) Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 131: 62-68.
44. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, Cohen DW, Johnson BE, Jänne PA, Iafrate AJ, Rodig SJ. (2010) A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*, 16: 1561-1571.
45. Minca EC, Portier BP, Wang Z, Lanigan C, Farver CF, Feng Y, Ma PC, Arrossi VA, Pennell NA, Tubbs RR. (2013) ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH. *J Mol Diagn*, 15: 341-346.
46. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, Crino L, Franklin WA, Varella-Garcia M. (2010) Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res*, 16: 5581-5590.
47. Sun JM, Choi YL, Won JK, Hirsch FR, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. (2012) A dramatic response to crizotinib in a non-small-cell lung cancer patient with IHC-positive and FISH-negative ALK. *J Thorac Oncol*, 7: e36-38.

48. Cabillic F, Gros A, Dugay F, Begueret H, Mesturoux L, Chiforeanu DC, Dufrenot L, Jauffret V, Dachary D, Corre R, Lespagnol A, Soler G, Dagher J, Catros V, Le Calve M, Merlio JP, Belaud-Rotureau MA. (2014) Parallel FISH and immunohistochemical studies of ALK status in 3244 non-small-cell lung cancers reveal major discordances. *J Thorac Oncol*, 9: 295-306.
49. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. (2013) Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*, 2: 91-97.
50. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern C, Adamson PC, Blaney SM. (2013) Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol*, 14: 472-480.
51. Food and Drug Administration (2011) Crizotinib Full Prescribing Information, 3-6
52. Lowe EJ, Lim MS. (2013) Potential therapies for anaplastic lymphoma kinase-driven tumors in children: progress to date. *Paediatr Drugs*, 15: 163-169.
53. Landi L, Cappuzzo F. (2014) Management of NSCLC: focus on crizotinib. *Expert Opin Pharmacother*, 15: 2587-2597.
54. Loong HH, Mok K, Leung LK, Mok TS. (2015) Crizotinib in the management of advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*, 11: 735-745.
55. Muller IB, De Langen AJ, Honeywell RJ, Giovannetti E, Peters GJ. (2016) Overcoming crizotinib resistance in ALK-rearranged NSCLC with the second-generation ALK-inhibitor ceritinib. *Expert Rev Anticancer Ther*, 16: 147-157.
56. Perez CA, Velez M, Raez LE, Santos ES. (2014) Overcoming the resistance to crizotinib in patients with non-small cell lung cancer harboring EML4/ALK translocation. *Lung Cancer*, 84: 110-115.
57. Butrynski JE, D'Adamo DR, Hornick JL, Dal Cin P, Antonescu CR, Jhanwar SC, Ladanyi M, Capelletti M, Rodig SJ, Ramaiya N, Kwak EL, Clark JW, Wilner KD, Christensen JG, Jänne PA, Maki RG, Demetri GD, Shapiro GI. (2010) Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor. *N Engl J Med*, 363: 1727-1733.

58. Gaudichon J, Jeanne-Pasquier C, Deparis M, Veyssi re A, Heyndrickx M, Minckes O, Orbach D. (2016) Complete and Repeated Response of a Metastatic ALK-rearranged Inflammatory Myofibroblastic Tumor to Crizotinib in a Teenage Girl. *J Pediatr Hematol Oncol*, 38: 308-311.
59. Megiorni F, McDowell HP, Camero S, Mannarino O, Ceccarelli S, Paiano M, Losty PD, Pizer B, Shukla R, Pizzuti A, Clerico A, Dominici C. (2015) Crizotinib-induced antitumour activity in human alveolar rhabdomyosarcoma cells is not solely dependent on ALK and MET inhibition. *J Exp Clin Cancer Res*, 34: 112.
60. van Gaal JC, Roeffen MH, Flucke UE, van der Laak JA, van der Heijden G, de Bont ES, Suurmeijer AJ, Versleijen-Jonkers YM, van der Graaf WT. (2013) Simultaneous targeting of insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: a rational choice. *Eur J Cancer*, 49: 3462-3470.
61. Sch ffski P, Wozniak A, Leahy MG, Aamdal S, Rutkowski P, Bauer S, Richter S, Gr nwald V, Debiec-Rychter M, Sciot R, Georger B, Marr aud S, Collette S, Nzokirantevye A, Strauss SJ. (2018) The tyrosine kinase inhibitor crizotinib does not have clinically meaningful activity in heavily pre-treated patients with advanced alveolar rhabdomyosarcoma with FOXO rearrangement: European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase 2 trial 90101 'CREATE'. *Eur J Cancer*, 94: 156-167.
62. Lewin J, Desai J, Smith K, Luen S, Wong D. (2019) Lack of clinical activity with crizotinib in a patient with FUS rearranged rhabdomyosarcoma with ALK protein overexpression. *Pathology*, 51: 655-657.
63. WARBURG O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314.
64. Magaway C, Kim E, Jacinto E. (2019) Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells*, 8.
65. P pulo H, Lopes JM, Soares P. (2012) The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13: 1886-1918.
66. Sebesty n A, Hujber Z, Jeney A, Kopper L (2016) Tumormetabolizmus. *Klinikai onkol gia*. 3: 51–58
67. Helman LJ, Meltzer P. (2003) Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer*, 3: 685-694.

68. Gkoutakos A, Pilotto S, Mafficini A, Vicentini C, Simbolo M, Milella M, Tortora G, Scarpa A, Bria E, Corbo V. (2018) Unmasking the impact of Rictor in cancer: novel insights of mTORC2 complex. *Carcinogenesis*, 39: 971-980.
69. Le X, Pugach EK, Hettmer S, Storer NY, Liu J, Wills AA, DiBiase A, Chen EY, Ignatius MS, Poss KD, Wagers AJ, Langenau DM, Zon LI. (2013) A novel chemical screening strategy in zebrafish identifies common pathways in embryogenesis and rhabdomyosarcoma development. *Development*, 140: 2354-2364.
70. Renshaw J, Taylor KR, Bishop R, Valenti M, De Haven Brandon A, Gowan S, Eccles SA, Ruddle RR, Johnson LD, Raynaud FI, Selfe JL, Thway K, Pietsch T, Pearson AD, Shipley J. (2013) Dual blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) pathways synergistically inhibits rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 19: 5940-5951.
71. Cen L, Hsieh FC, Lin HJ, Chen CS, Qualman SJ, Lin J. (2007) PDK-1/AKT pathway as a novel therapeutic target in rhabdomyosarcoma cells using OSU-03012 compound. *Br J Cancer*, 97: 785-791.
72. Cen L, Arnoczky KJ, Hsieh FC, Lin HJ, Qualman SJ, Yu S, Xiang H, Lin J. (2007) Phosphorylation profiles of protein kinases in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol*, 20: 936-946.
73. Petricoin EF, Espina V, Araujo RP, Midura B, Yeung C, Wan X, Eichler GS, Johann DJ, Qualman S, Tsokos M, Krishnan K, Helman LJ, Liotta LA. (2007) Phosphoprotein pathway mapping: Akt/mammalian target of rapamycin activation is negatively associated with childhood rhabdomyosarcoma survival. *Cancer Res*, 67: 3431-3440.
74. Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J, Lichtenstein A. (2005) Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*, 4: 1533-1540.
75. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. (2011) Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 868-880.



76. Srivastava RK, Li C, Khan J, Banerjee NS, Chow LT, Athar M. (2019) Combined mTORC1/mTORC2 inhibition blocks growth and induces catastrophic macropinocytosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 24583-24592.
77. Anderson JL, Park A, Akiyama R, Tap WD, Denny CT, Federman N. (2015) Evaluation of In Vitro Activity of the Class I PI3K Inhibitor Buparlisib (BKM120) in Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas. *PLoS One*, 10: e0133610.
78. Waldner M, Fantus D, Solari M, Thomson AW. (2016) New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation. *Br J Clin Pharmacol*, 82: 1158-1170.
79. Kaylani SZ, Xu J, Srivastava RK, Kopelovich L, Pressey JG, Athar M. (2013) Rapamycin targeting mTOR and hedgehog signaling pathways blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenograft murine model. *Biochem Biophys Res Commun*, 435: 557-561.
80. Wan X, Shen N, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. (2006) CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1alpha/VEGF signaling. *Neoplasia*, 8: 394-401.
81. McKinnon T, Venier R, Yohe M, Sindiri S, Gryder BE, Shern JF, Kabaroff L, Dickson B, Schleicher K, Chouinard-Pelletier G, Menezes S, Gupta A, Zhang X, Guha R, Ferrer M, Thomas CJ, Wei Y, Davani D, Guidos CJ, Khan J, Gladdy RA. (2018) Functional screening of FGFR4-driven tumorigenesis identifies PI3K/mTOR inhibition as a therapeutic strategy in rhabdomyosarcoma. *Oncogene*, 37: 2630-2644.
82. Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, Lock R, Carol H, Reynolds CP, Maris JM, Keir ST, Billups CA, Smith MA. (2008) Initial testing (stage 1) of the mTOR inhibitor rapamycin by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*, 50: 799-805.
83. Georger B, Kieran MW, Grupp S, Perek D, Clancy J, Krygowski M, Ananthakrishnan R, Boni JP, Berkenblit A, Spunt SL. (2012) Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*, 48: 253-262.

84. Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A, Krailo MD, Weigel B, DuBois SG, Doyle LA, Chen H, Blaney SM. (2015) Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 62: 440-444.
85. Mascarenhas L, Chi YY, Hingorani P, Anderson JR, Lyden ER, Rodeberg DA, Indelicato DJ, Kao SC, Dasgupta R, Spunt SL, Meyer WH, Hawkins DS. (2019) Randomized Phase II Trial of Bevacizumab or Temsirolimus in Combination With Chemotherapy for First Relapse Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*: JCO1900576.
86. Spunt SL, Grupp SA, Vik TA, Santana VM, Greenblatt DJ, Clancy J, Berkenblit A, Krygowski M, Ananthkrishnan R, Boni JP, Gilbertson RJ. (2011) Phase I study of temsirolimus in pediatric patients with recurrent/refractory solid tumors. *J Clin Oncol*, 29: 2933-2940.
87. Becher OJ, Gilheeny SW, Khakoo Y, Lyden DC, Haque S, De Braganca KC, Kolesar JM, Huse JT, Modak S, Wexler LH, Kramer K, Spasojevic I, Dunkel IJ. (2017) A phase I study of perifosine with temsirolimus for recurrent pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 64.
88. Thornton KA, Chen AR, Trucco MM, Shah P, Wilky BA, Gul N, Carrera-Haro MA, Ferreira MF, Shafique U, Powell JD, Meyer CF, Loeb DM. (2013) A dose-finding study of temsirolimus and liposomal doxorubicin for patients with recurrent and refractory bone and soft tissue sarcoma. *Int J Cancer*, 133: 997-1005.
89. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. (2014) Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, 35: 515-527.
90. Warburg O, Wind F, Negelein E. (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*, 8: 519-530.
91. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol*, 14: 11-31.

92. Gupta S, Roy A, Dwarakanath BS. (2017) Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy. *Front Oncol*, 7: 68.
93. McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. (2020) Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends Cancer*, 6: 49-61.
94. Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, Gillies RJ. (2012) Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Adv Pharmacol*, 65: 63-107.
95. Fan TW, Kucia M, Jankowski K, Higashi RM, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Lane AN. (2008) Rhabdomyosarcoma cells show an energy producing anabolic metabolic phenotype compared with primary myocytes. *Mol Cancer*, 7: 79.
96. Sciacovelli M, Frezza C. (2016) Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radic Biol Med*, 100: 175-181.
97. Zhu J, Thompson CB. (2019) Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 436-450.
98. Yang L, Venneti S, Nagrath D. (2017) Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*.
99. Issaq SH, Mendoza A, Fox SD, Helman LJ. (2019) Glutamine synthetase is necessary for sarcoma adaptation to glutamine deprivation and tumor growth. *Oncogenesis*, 8: 20.
100. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11: 85-95.
101. Jahnke VE, Sabido O, Defour A, Castells J, Lefai E, Roussel D, Freyssenet D. (2010) Evidence for mitochondrial respiratory deficiency in rat rhabdomyosarcoma cells. *PLoS One*, 5: e8637.
102. Kuhnt T, Pelz T, Qu X, Hänsgen G, Dunst J, Gellerich FN. (2007) Mitochondrial OXPHOS functions in R1H rhabdomyosarcoma and skeletal muscles of the rat. *Neurochem Res*, 32: 973-980.
103. Liu L, Wang YD, Wu J, Cui J, Chen T. (2012) Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A): a transcriptional target of PAX3-FKHR and mediates PAX3-FKHR-dependent motility in alveolar rhabdomyosarcoma cells. *BMC Cancer*, 12: 154.
104. Passoni L, Longo L, Collini P, Coluccia AM, Bozzi F, Podda M, Gregorio A, Gambini C, Garaventa A, Pistoia V, Del Grosso F, Tonini GP, Cheng M,

- Gambacorti-Passerini C, Anichini A, Fossati-Bellani F, Di Nicola M, Luksch R. (2009) Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients. *Cancer Res*, 69: 7338-7346.
105. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools J, Versteeg R, Speleman F. (2010) Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res*, 16: 4353-4362.
106. Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, Lee JS, Jheon S, Chung JH. (2011) Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol*, 6: 466-472.
107. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, Erickson-Johnson MR, Caron BL, Li Y, Tang H, Stoddard S, Wampfler J, Kulig K, Yang P. (2011) Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol*, 6: 459-465.
108. Food and Drug Administration (2011) Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit. Summary of Safety and Effectiveness Data, 2-8.
109. Kim H, Shim HS, Kim L, Kim TJ, Kwon KY, Lee GK, Chung JH, Group KCPS. (2014) Guideline Recommendations for Testing of ALK Gene Rearrangement in Lung Cancer: A Proposal of the Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group. *Korean J Pathol*, 48: 1-9.
110. Subramaniam MM, Piqueras M, Navarro S, Noguera R. (2009) Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas. *Hum Pathol*, 40: 1638-1642.
111. Espina V, Edmiston KH, Heiby M, Pierobon M, Sciro M, Merritt B, Banks S, Deng J, VanMeter AJ, Geho DH, Pastore L, Sennesh J, Petricoin EF, Liotta LA.

- (2008) A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1998-2018.
112. Theiss AP, Chafin D, Bauer DR, Grogan TM, Baird GS. (2014) Immunohistochemistry of colorectal cancer biomarker phosphorylation requires controlled tissue fixation. *PLoS One*, 9: e113608.
113. Sebestyén A, Sticz TB, Márk A, Hajdu M, Timár B, Nemes K, Nagy N, Váradi Z, Kopper L. (2012) Activity and complexes of mTOR in diffuse large B-cell lymphomas--a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 25: 1623-1628.
114. Krencz I, Sebestyén A, Papay J, Lou Y, Lutz GF, Majewicz TL, Khor A. (2019) Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma. *Hum Pathol*, 93: 74-80.
115. Vicentini C, Cantù C, Antonello D, Simbolo M, Mafficini A, Luchini C, Rusev B, Porcaro AB, Iacovelli R, Fassan M, Corbo V, Brunelli M, Artibani W, Scarpa A, Lawlor RT. (2018) ERG alterations and mTOR pathway activation in primary prostate carcinomas developing castration-resistance. *Pathol Res Pract*, 214: 1675-1680.
116. Uhlyarik A, Piurko V, Vizkeleti L, Pápai Z, Rásó E, Lahm E, Kiss E, Sikter M, Vachaja J, Kenessey I, Timár J. (2019) EGFR Protein Expression of KRAS Wild-Type Colorectal Cancer: Predictive Value of the Sidedness for Efficacy of Anti-EGFR Therapy. *Pathol Oncol Res*.
117. Krencz I, Sebestyén A, Papay J, Jeney A, Hujber Z, Burger CD, Keller CA, Khor A. (2018) In situ analysis of mTORC1/2 and cellular metabolism-related proteins in human Lymphangioliomyomatosis. *Hum Pathol*, 79: 199-207.
118. Zhang X, Shu L, Hosoi H, Murti KG, Houghton PJ. (2002) Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem*, 277: 28127-28134.
119. Peron M, Lovisa F, Poli E, Basso G, Bonvini P. (2015) Understanding the Interplay between Expression, Mutation and Activity of ALK Receptor in Rhabdomyosarcoma Cells for Clinical Application of Small-Molecule Inhibitors. *PLoS One*, 10: e0132330.

120. Wierdl M, Tsurkan L, Chi L, Hatfield MJ, Tollemar V, Bradley C, Chen X, Qu C, Potter PM. (2018) Targeting ALK in pediatric RMS does not induce antitumor activity in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*, 82: 251-263.
121. Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, Yamada H, Kojima K, Kumagai J, Kawano T, Sugihara K. (2009) Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer. *Br J Cancer*, 100: 782-788.
122. Yoshida Y, Kurokawa T, Horiuchi Y, Sawamura Y, Shinagawa A, Kotsuji F. (2010) Localisation of phosphorylated mTOR expression is critical to tumour progression and outcomes in patients with endometrial cancer. *Eur J Cancer*, 46: 3445-3452.
123. Krzeńskiak M, Zajkiewicz A, Matuszczyk I, Rusin M. (2014) Rapamycin prevents strong phosphorylation of p53 on serine 46 and attenuates activation of the p53 pathway in A549 lung cancer cells exposed to actinomycin D. *Mech Ageing Dev*, 139: 11-21.
124. Egervári G, Márk A, Hajdu M, Barna G, Sági Z, Krenács T, Kopper L, Sebestyén A. (2011) Mitotic lymphoma cells are characterized by high expression of phosphorylated ribosomal S6 protein. *Histochem Cell Biol*, 135: 409-417.
125. Iwenofu OH, Lackman RD, Staddon AP, Goodwin DG, Haupt HM, Brooks JS. (2008) Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy. *Mod Pathol*, 21: 231-237.
126. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. (2019) Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 12: 71.
127. Kennedy BK, Lamming DW. (2016) The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab*, 23: 990-1003.
128. Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 169: 361-371.
129. Medvetz D, Priolo C, Henske EP. (2015) Therapeutic targeting of cellular metabolism in cells with hyperactive mTORC1: a paradigm shift. *Mol Cancer Res*, 13: 3-8.
130. Lee P, Malik D, Perkons N, Huangyang P, Khare S, Rhoades S, Gong YY, Burrows M, Finan JM, Nissim I, Gade TPF, Weljie AM, Simon MC. (2020)

- Targeting glutamine metabolism slows soft tissue sarcoma growth. *Nat Commun*, 11: 498.
131. Reis LMD, Adamoski D, Ornitz Oliveira Souza R, Rodrigues Ascensão CF, Sousa de Oliveira KR, Corrêa-da-Silva F, Malta de Sá Patroni F, Meira Dias M, Consonni SR, Mendes de Moraes-Vieira PM, Silber AM, Dias SMG. (2019) Dual inhibition of glutaminase and carnitine palmitoyltransferase decreases growth and migration of glutaminase inhibition-resistant triple-negative breast cancer cells. *J Biol Chem*, 294: 9342-9357.
132. Trudel D, Labbé DP, Araya-Farias M, Doyen A, Bazinet L, Duchesne T, Plante M, Grégoire J, Renaud MC, Bachvarov D, Têtu B, Bairati I. (2013) A two-stage, single-arm, phase II study of EGCG-enriched green tea drink as a maintenance therapy in women with advanced stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 131: 357-361.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke:

- **Felkai L**, Krencz I, Kiss DJ, Nagy N, Petővári G, Dankó T, Micsík T, Khor A, Tornóczky T, Sápi Z, Sebestyén A, Csóka M (2020) Characterization of mTOR Activity and Metabolic Profile in Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Cancers (Basel)*  
**IF: 6.126**
- **Felkai L**, Bánusz R, Kovalszky I, Sápi Z, Garami M, Papp G, Karászi K, Varga E, Csóka M (2019) The Presence of ALK Alterations and Clinical Relevance of Crizotinib Treatment in Pediatric Solid Tumors. *Pathol Oncol Res* 25:217-224.  
**IF: 2.826**

A disszertációtól független publikációk jegyzéke:

- Bots B, Eipel O, Terkovics L, **Felkai L**, Csóka M (2018) Treatment results of pediatric soft tissue sarcomas at the 2nd Department of Pediatrics, Semmelweis University. *Magyar onkologia* 62:222-229  
**IF: -**



## 11. Köszönetnyilvánítás

Legfőbb köszönet illeti témavezetőimet. Dr. Csóka Monika 2014-ben negyedéves orvostanhallgatóként karolt fel. A közös munka során nem csak a kutatás szépségeit mutatta meg nekem, hanem annak a klinikai hasznát is. Szakmai és emberi példamutatása a legmeghatározóbb volt a pályaválasztásom során. A medikus éveim és a tudományos diákköri munkám hatására döntöttem el, hogy a II. sz Gyermekklinikán szeretnék dolgozni mint gyermekgyógyász és mint az ő PhD hallgatója.

Dr. Sebestyén Anna témavezetőmet köszönet illeti a PhD munkám során az mTOR és metabolikus utak vizsgálata során végzett kutatás irányításáért. Tisztánlátása tette lehetővé, hogy ez a munka kerek egészé állhasson össze. Laborja otthont adott a PhD munkámnak. Fáradhatatlanul igyekezett mindenben támogatni, minden kérdésemre a lehető leghamarabb választ adni.

Szakmai és emberi támogatásuk mellett köszönöm nekik azt a rengeteg időt, amit az én munkám előrehaladásának szenteltek a munkaidejük letelte után jóval is.

Dr. Sebestyén Anna laborjából kiemelkedő hálával tartozom Dr. Krencz Ildikónak. Minden vizsgálat elvégzésében látszik gondos munkájának a keze nyoma. Végtelen türelme és segítőkészsége adott biztos hátteret a kutató munkám teljes ideje alatt. Továbbá a soha el nem fogyó segítségért és támogatásért köszönet illeti Dankó Titanillát, Petővári Gábort, Nagy Noémit, Zsibai Zsófiát és Csépai Máriát.

Kiemelt hálámat fejezném Dr. Micsik Tamásnak a rengeteg leletezéssel töltött óráért és a patológiai iránymutatásáért.

Hálával tartozom az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet további két laborjának is. Elsősorban Dr. Kovalszky Iлона egyetemi tanárnak és Dr. Sági Zoltán egyetemi tanárnak az útmutatásért valamint, hogy a laboratóriumaikban dolgozhattam. Továbbá Karászi Katalin tudományos munkatársat, Gyurcsó-Deák Linda analitikust, Dr. Papp Gergő tudományos munkatársat és Polgár Zoltánné szakasszisztenst emelném ki, akikhez mindvégig fordulhattam.

Dr. Varga Edit radiológusnak hálával tartozom a munkámhoz rendelkezésemre bocsátott MR képekért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Szabó András egyetemi tanárt és a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika korábbi igazgatóját, hogy lehetővé tette még annak idején a tudományos diákköri és PhD munkám létrejöttét. Valamint köszönet illeti Prof. Kovács

Gábor egyetemi tanárt, a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika jelenlegi igazgatóját, aki a PhD munkám során minden lehetséges támogatás megadott nekem a rezidensi munkaköröm mellett, hogy lehetséges legyen a PhD munka befejezése. A pályázatokon nyert anyagi támogatásért, ami nélkül a vizsgálatok nem válhattak volna valóra, köszönettel tartozom a Magyar Gyermekonkológiai Hálózatnak.

Végül és nem utolsó sorban hálával tartozom Dr. Róth Györgynek, akitől habár a legtöbb időt vette el a tudományos munkám, mindvégig teljes mellszélességgel mögöttem állt, valamint szüleimnek a példamutatásért amivel mindig többre sarkalltak.