

Az agrin szelektív megjelenése a hepatocellularis carcinoma erezetében: kórkeletkezési és elkülönítő diagnosztikai vonatkozások

Doktori (Ph.D.) tézisek

Tátrai Péter

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Kovalszky Ilona, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Jármay Katalin, PhD, főiskolai tanár
Dr. Firneisz Gábor, PhD, klinikai szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Szalay Ferenc, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina, PhD, egyetemi docens
Dr. Réz Gábor, CSc(PhD), egyetemi docens

Budapest
2008

Bevezetés

Doktori munkám során az agrin szerepével foglalkoztam a hepatocellularis carcinoma kórkeletkezésében és elkülönítő diagnosztikájában. Az agrin a heparánszulfát-proteoglikán (HSPG) fehérjecsaldba tartozik. A HSPG-k vázfehérjéből és ahhoz kovalensen kapcsolódó savas cukrokból, heparánszulfát (HS) glükózaminoglikánból állnak. Leginkább a sejtek felszínén, illetve az extracelluláris mátrixban (ECM-ben) találjuk meg őket. A HS láncok legfontosabb feladata a növekedési faktorok, citokinek megkötése és receptorukhoz való kapcsolódásuk elősegítése, de magas negatív töltésük folytán a biológiai barrierekben, mint pl. a veseglomerulusok bazális membránjában vagy a vér-agy gátban is nélkülözhetetlenek. A HSPG-k vázfehérjei számos fehérjével létesítenek kapcsolatot a sejtek felszínén és az ECM-ben. Az ép májszövet HSPG-kben viszonylag szegény, azonban krónikus májbetegségekben és a máj primer daganataiban - egyéb mátrix-komponensek mellett – a HSPG-k mennyisége is nagy mértékben megnő.

Az agrin a HSPG-család egyik legösszetettebb tagja, amelynek alternatív splicing folytán sejt felszíni és szekretált formája is létezik. Elsőként a neuromuscularis junctióban azonosították, ahol az acetilkolin-receptorokat és kolinészteráz-molekulákat tereli össze a posztzinaptikus membránban. Később felismerték, hogy az agrin a központi idegrendszer fejlődésében is részt vesz az axonnövekedés és a szinaptogenezis irányítása révén. Ugyanitt, ám egy eltérő szerepkörben, a vér-agy gát alkotójaként is megtaláljuk. Az idegrendszeren kívül az agrint főleg a vese glomeruláris bazális membránjában lelhetjük fel, ahol az ultrafiltrációban való közreműködésen túl a podocyták lehorgonyzásában játszik szerepet. Munkánkat megelőzően az agrin jelenlétét a májban nem írták le. Általánosságban elmondható az agrin ECM-beli formájáról, hogy egyfelől kiterjedt mátrix-kapcsolatai, másfelől a citoskeletonnal összefüggő sejt felszíni receptorai – integrinek, dystroglycan – révén mintegy hidat képez a bazális membránok és a rajtuk fekvő epithelsejtek sejt váza között. Ezen a mechanikai funkcion kívül azonban receptorain keresztül jelátviteli folyamatokat is elindíthat.

A hepatocellularis carcinoma (HCC) a leggyakoribb primer májdaganat, és ma világszerte az ötödik leggyakoribb rosszindulatú daganatként, illetve a harmadik legjelentősebb daganatos halálókként tartják számon. Bár a HCC kifejlődhet szerkezetileg ép májban is, jellemzően a krónikus májkárosodás végállapotát jelentő cirrhosis talaján alakul ki, melynek okai között Magyarországon legtöbbször az alkoholizmus, a krónikus C-vírus hepatitisz, vagy veleszületett anyagcsere-rendellenesség szerepel. A HCC patológiai differenciáldiagnosztikájának két kiemelten problematikus területe a HCC elkülönítése a cirrhotikus májban kifejlődő ún. dysplasticus nodulusoktól, valamint a jóindulatú májsejt-daganat, a hepatocellularis adenoma atípusos alakjaitól. A dysplasticus nodulusok a cirrhotikus göböktől méretükben és állományukban már makroszkóposan is elkülönülő, praemalignusnak tartott elváltozások. Enyhébb szövettani atípiával jellemezhető, ún. *low grade* formájuk malignus elfajulásra nem hajlamos, ellenben a *high grade* dysplasticus nodulusok a szövettani atípiá jegeit változatos mértékben mutató, közvetlenül praecancerosusnak tekintett laesiók, melyek elkülönítése a kis méretű, ún. *small* hepatocellularis carcinomától a szövettani kép alapján olykor erősen szubjektív. Hasonlóképpen, a leginkább fiatal nőket érintő, ritka benignus májdaganat, a hepatocellularis adenoma típusos formáinak szövettani jegei nem keltik a malignitás gyanúját, azonban az inkább férfiakban, vagy idősebb korban jelentkező atípusos formák szövettani megjelenése átmenetet képezhet a HCC felé.

Korábbi munkánk során egy tisztázatlan specificitású ellenanyaggal (7E12 klón) erős immunhisztokémiai reakciót tapasztaltunk a kóros májban, amely cirrhosisban az erekkel és a duktuláris reakcióval, HCC-ben pedig a daganat strómájával volt kapcsolatos. A reakció a cirrhotikus nodulusok szinuszoidjait nem jelölte, míg a HCC erei erősen ábrázolódtak. Az ellenanyaggal kapcsolatban beszerezhető információ és a vonatkozó irodalmi adatok mind abba az irányba mutattak, hogy a 7E12, bár ezt sem az azt előállító kutatók, sem a forgalmazó cég nem igazolta, az agrin vázfehérjéjével reagál.

Az előzetes eredmények nyomán két sejtésünk fogalmazódott meg. Az első sejtés: a 7E12 ellenanyag immunreakciója a májban valójában az agrint tünteti fel; egy

olyan HSPG-t, amelyet a májban korábban nem mutattak ki. A második sejtés: a látott immunreakció szelektív lehet a hepatocellularis carcinoma erezetére a szinuszoidokkal szemben, ami felveti a reakció diagnosztikai alkalmazásának lehetőségét. Doktori munkám során ezeknek a sejteknek eredtem a nyomába. E feltételezések helyességének ellenőrzésén túlmenően célom volt az is, hogy vizsgáljam: milyen forrásból és milyen hatásra termelődik a fokozott mennyiségű agrin a kóros májban, és vajon milyen szerepet tölthet be a hepatocellularis carcinoma keletkezésében és progressziójában.

Célkitűzések

1. A 7E12 klónjelű, előzetes feltételezésünk szerint agrinnal reagáló ellenanyag specificitásának igazolása.
2. Az agrin expressziójának vizsgálata fehérje- és mRNS-szinten az ép májban, cirrhosisban és HCC-ben.
3. A májban található agrin sejtes eredetére és funkcionálisan fontos molekuláris kapcsolataira vonatkozó adatok gyűjtése.
4. Az agrin immunhisztokémiai kimutatása benignus és malignus hepatocellularis laesiókon. Az agrin és a CD34 immunhisztokémiai reakciók alkalmazhatóságának vizsgálata a dignitás eldöntésében.
5. Az agrin megjelenése, illetve a hepatocarcinogenesis folyamata közti kapcsolat vizsgálata. Elsődlegesen: annak tisztázása, hogy miként viszonyul az agrin feltűnése a HCC-re jellemző vaszkuláris profil kialakulásához.
6. Az agrinra vonatkozó vizsgálatok kiterjesztése kísérletes állatmodellre annak felderítése céljából, hogy a későbbiekben lehetséges lesz-e *in vivo* modellben vizsgálni az agrin szerepét.

Az eredmények a célkitűzések fenti sorrendjében kerülnek ismertetésre.

Módszerek

- Immunprecipitáció és tömegspektrometria marha vesekéregből izolált HSPG-n
- Western blot humán ép és cirrhotikus májszövetből, illetve HCC-ből származó mintákból
- Valós idejű RT-PCR humán, ill. ép és cirrhosis/HCC indukción átesett patkány fagyasztott májmintákból
- Immunfluoreszcens, ill. kettős immunfluoreszcens kolokalizációs vizsgálatok humán, ill. ép és cirrhosis/HCC indukción átesett patkány fagyasztott májmintákon, valamint tenyésztett sejteken
- Immunhisztokémia patológiai és igazságügyi májmintákon
- Az agrin és CD34 immunhisztokémiai reakciók szemikvantitatív értékelése, az eredmények összevetése a hisztopatológiai diagnózissal, és immunhisztokémián alapuló diagnosztikus protokoll kidolgozása
- Agrin *in situ* hibridizáció digoxigenin-jelölt RNS próbával humán cirrhosison és HCC-n

Eredmények

1. A 7E12 klónjelzésű ellenanyag specificitásának igazolása

Kettős immunfluoreszcens jelölésekkel kimutattuk a 7E12, valamint az anti-laminin és egy kereskedelmi forgalomban kapható poliklonális anti-agrin antitest immunreakcióinak kolokalizációját. Ezt követően a 7E12 ellenanyag előállításakor immunogénnek használt marha vesekéreg proteoglikán-frakcióból a 7E12 ellenanyag és mágneses gyöngyök segítségével immunprecipitációt végeztünk, és az így izolált proteoglikán komponens tömegspektrometriás elemzésnek vetettük alá. Az elemzés három olyan triptikus fragmentet talált (FGALCEAETGR, CEPGFWNFR, IFFVNPAPPYLWPAHK), amelyek megfeleltethetők a szarvasmarha *Similar to agrin* nevű, az emberi agrinnal homológ fehérjéjének.

2. Az agrin mRNS-és fehérje-szintű expressziójának vizsgálata ép humán májban, cirrhosisban és HCC-ben

Fagyasztott emberi ép májszövet (14), cirrhosis (13) és HCC (16) mintákban valós idejű RT-PCR segítségével mértük az agrin mRNS expresszióját. Az agrin mRNS mennyisége mind a HCC-ben, mind a cirrhotikus májszövetben szignifikánsan, mintegy 5-ször magasabb volt, mint az ép májszövetben ($p < 0.0001$, ill. $p = 0.0006$); ennek megfelelően ugyanakkor a HCC és a cirrhosis között nem adódott különbség. Az agrin fehérje-szintű expresszióját az ép májban, valamint cirrhotikus májszövetben és HCC-ben Western bloton vizsgáltuk, mindegyik szövettípusból egy-egy reprezentatív mintán. Az ép máj proteoglikán frakciójában az agrin mennyiségét a kimutathatósági szint alattinak találtuk, ellenben a cirrhosisból és a HCC-ből származó mintákban a glikozilált agrin magas molekulatömegének megfelelő (400 kDa fölötti) intenzív „smear” ábrázolódt.

3. A májban található agrin sejtes eredetére és funkcionálisan fontos molekuláris kapcsolataira vonatkozó vizsgálatok

Az ember és a patkány májában az agrin a simaizom alfa-aktinnal (SMA-val) kolokalizált az erek simaizom-rétegében, és részlegesen a HCC mikrovaszkulaturájában is. Ép patkány májából izolált, SMA-pozitív, a tenyésztés hatására aktiválódott myofibroblastok mind mRNS-, mind fehérje-szinten kifejezték az agrint. Az emberi és patkány cirrhosisban ugyanakkor markáns agrin immunreakciót láttunk a duktuláris reakció hámjának bazális membránjában, amelyhez nem asszociálódtak SMA-pozitív sejtek. Halvány agrin immunreakció rajzolódott ki a cirrhotikus regeneratív nodulusok széli, duktuláris reakcióval szomszédos területein, ahol cytokeratin-7-et változó mértékben kifejező, hepatocytá-irányba differenciálódó, ún. átmeneti fenotípusú sejtek találhatóak. Az említett helyzetekben *in situ* hibridizációval is kimutattuk az agrin mRNS-ét, bár ez a reakció még technikailag tökéletesítésre szorul. Végül olykor agrin-tartalmú bazális membránt láttunk jól differenciált hepatocellularis tumorok (adenoma, magasan differenciált HCC) pseudoacinaris-trabecularis struktúrái körül is, és ez a jelölődés sem az epeúti, sem az ér-markerekkel nem mutatott együttállást.

Az agrin a HCC strómájában kolokalizált a proangiogén hatású bázikus fibroblaszt növekedési faktoral. Ezen kívül több, agrin-pozitív bazális membránon nyugvó epithelialis sejtípus – endothelsejtek, a duktuláris reakció hámjá – α_v -integrin immunreakciót is mutatott. Az α_v -integrin receptorcsalád egyes tagjai egyebek mellett az agrin receptoraként is ismertek.

4. Agrin immunhisztokémia benignus és malignus parenchymalis laesiókon. Az agrin immunreakció differenciáldiagnosztikai alkalmazhatósága

Szemikvantitatív vizsgálat céljára összesen 132 mintát dolgoztunk fel (25 cirrhosis, 10 focalis nodularis hyperplasia, 8 nagy regeneratív nodulus, 23 low-grade dysplasticus nodulus, 7 high-grade dysplasticus nodulus, 30 májadenoma, 8 small HCC és 21 HCC). Az ezeken végzett agrin és CD34 immunreakciókat egy 5-fokozatú skálán (0 – 4+) értékeltük. Erős, 3-4+-es immunreakciók túlnyomórészt az sHCC-k és HCC-k

körében fordultak elő; ezekben a mintacsoportokban gyengébb jelölődéssel csak elvétve találkoztunk. Kisebb arányban, de előfordult még erős jelölődés az adenomákban és a HGDN-ekben. A többi mintacsoportban kizárólag 2+-es vagy annál gyengébb reakciókat észleltünk.

A szemikvantitatív eredmények birtokában megvizsgáltuk, használható-e az agrin immunreakció értékelése a laesiók dignitásának megítélésére. A cirrhotikus és FNH-mintákat mint a dignitás-probléma szempontjából irrelevánsakat ebből a vizsgálatból kizártuk. A benignus mintacsoportok (LRN, LGDN, HGDN, HA) zömmel 0-2+-es reakciót adtak agrinnal, míg a malignus csoportokban (sHCC, HCC) a 3-4+-es reakciók domináltak. Ha az agrin immunreakció alapján 0-2+-es mintákat „immunhisztokémia szerint benignusnak”, vagyis „IHC-benignusnak”, a 3-4+-es mintákat pedig „IHC-malignusnak” osztályoztuk, és az eredményeket a patológus hisztológián alapuló döntésével összevetettük, 93,1%-os szenzitivitást, ám mindössze 88,2%-os specificitást értünk el. A gyenge specificitás oka a patológus által benignusnak ítélt, de agrinnal viszonylag erős, 3+-es reakciót adó minta bekerülése volt az „IHC-malignus” kategóriába. Javítani tudtuk a specificitást, ha az agrinnal 3+-es reakciót adó minták esetében a CD34 immunreakciót is figyelembe vettük. E második lépés hozzáadásával az alábbi döntési algoritmushoz jutottunk:

- 1) 2+-es vagy annál alacsonyabb agrin score esetén a mintát az „IHC-benignus” kategóriába soroltuk;
- 2) 4+-es agrin score esetén a mintát az „IHC-malignus” kategóriába soroltuk;
- 3) 3+-es agrin score esetén a mintán kiértékeljük a CD34 immunreakciót, amely
 - a) ha 2+ vagy annál alacsonyabb volt, az „IHC-benignus” döntést hoztuk;
 - b) ha 3+, az „IHC-benignus” döntést hoztuk, de a differenciáldiagnosztikai bizonytalanságról feljegyzést tettünk;
 - c) ha 4+, az „IHC-malignus” döntést hoztuk.

Ezzel a kiegészítéssel élve a specificitást 92,6%-ra tudtuk növelni.

5. Az agrin megjelenésének kapcsolata a hepatokarcinogenezis folyamatával. Az agrin-termelést kiváltó lehetséges okok vizsgálata

A cirrhotikus regeneratív nodulusokban az agrin nem feltétlenül jelent meg azokon a területeken, ahol emelkedett volt a PCNA immunreakció alapján becsült mitotikus aktivitás. Az erek fenotípus-változását jellemző SMA, CD34 és claudin-5 közül egyik jelenléte vagy hiánya sem járt együtt következetesen az agrin jelenlétével vagy hiányával. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy önmagában sem a fokozott hepatocytaproliferáció, sem a mesenchymalis sejtek aktiválódása, sem az endothelium fenotípusának megváltozása (vagyis a „kapillarizáció”), bár lehetnek annak szükséges feltételei, egyenként nem elégségesek az agrin termelésének beindításához.

6. Az agrin expressziójának vizsgálata ép, ill. cirrhosis-HCC indukción átesett patkány májában

Munkánk során négy kezelt patkány máját vetettük össze a kezeletlen kontroll állat májával. A kezelt állatokban cirrhosis és többgócú hepatocellularis carcinoma fejlődött ki. Az agrin immunhisztokémiai és immunfluoreszcens lokalizációja mind az ép, mind a károsodott májban hasonló volt az emberi májban megfigyelthez. Megmértük az agrin mRNS-szintű expresszióját is az állatok májában, a kezelt májak közül kettőből két-két helyről mintát véve, hogy a kifejeződés szerven belüli egyenetlenségéről is képet kapjunk. Erre főleg azért volt szükség, mert a malignus gócok kis mérete miatt nem tudtunk tisztán csak cirrhotikus, vagy tisztán csak tumoros szövetet nyerni. Bár a mintavétel helyétől függően ingadozott az eredmény, mégis valamennyi kezelt mintában a kontrollhoz képest emelkedett (1,8-szoros – 4-szeres) mRNS-szintet mértünk.

Következtetések

1. Bizonyítottuk, hogy a korábban tisztázatlan specificitású, 7E12 klónjelzetű monoklonális ellenanyag a szarvasmarha *Similar to agrin* jósolt fehérjéjével reagál, ezért agrin ellenanyagként történő használatát megalapozottnak tartjuk. Ennek jelentőségét az adja, hogy pillanatnyilag nincs a kereskedelmi forgalomban humán agrinra specifikus monoklonális ellenanyag.
2. Western bloton, valamint mRNS-szintű génexpressziós mérésekkel igazoltuk az agrin felhalmozódását a cirrhotikus májban és a HCC-ben.
3. Az agrin és különböző sejttípus-specifikus immunmarkerek egymáshoz viszonyított lokalizációja, valamint szövetekben és sejttenyészetekben mért génexpressziók alapján úgy véljük, hogy az agrint a májban vaszkuláris simaizomsejtek, aktivált mesenchymalis sejtek, az ép epeutak hámja, a duktuláris reakció epiteliális komponense és az abból hepatocytá-irányba differenciálódó átmeneti fenotípusú sejtek, valamint egyes jól differenciált hepatocellularis tumorok daganatsejtjei termelik. A májban az agrin a bázikus fibroblaszt növekedési faktorra és α_v -integrin receptorokkal állhat kölcsönhatásban, ami felveti a duktuláris reakció és az újdonszerű erek keletkezésében betöltött szerepét.
4. Nagy számú benignus és malignus parenchymalis laesio vizsgálatával megállapítottuk, hogy az agrin megjelenése a máj mikrovaszkulaturájában erősen specifikus a hepatocellularis carcinomára, ami az agrin elleni immunhisztokémiát hasznossá teszi a dysplasticus nodulusok grade-jét, valamint a parenchymalis laesiók dignitását illető kérdések megválaszolásában.
5. Tisztázatlanok maradtak az agrin-termelést kiváltó okok. Az agrin megjelenése sem a proliferációs aktivitással, sem a kapillarizációval nem korrelál egyértelműen.
6. Igazoltuk, hogy az agrin a patkány májcirrhosisában és májrákjában az emberhez hasonló módon jelenik meg. Ezzel utat nyitottunk az agrin krónikus májbetegségekben betöltött szerepének rágszáló modellen történő *in vivo* vizsgálataira felé.

Saját publikációk jegyzéke

A doktori dolgozat témájába vágó publikációk:

Tatrai P. Dudas J, Batmunkh E, Mathe M, Zalatnai A, Schaff Z, Ramadori G, Kovalszky I. Agrin, a novel basement membrane component in human and rat liver, accumulates in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Lab Invest. 2006 Nov;86(11):1149-60.

IF (2006): 4.453

Batmunkh E, **Tatrai P.** Szabó E, Lodi C, Holczbauer A, Paska C, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z, Kovalszky I. Comparison of the expression of agrin, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. Hum Pathol. 2007 Oct;38(10):1508-15.

IF (2006): 2.810

A doktori munka témájához kapcsolódó, de nem a dolgozat témájába vágó publikáció:

Mathe M, Suba Z, Nemeth Z, **Tatrai P.** Fule T, Borgulya G, Barabas J, Kovalszky I. Stromal syndecan-1 expression is an adverse prognostic factor in oral carcinomas. Oral Oncol. 2006 May;42(5):493-500.

IF (2006): 2.103

A doktori munka témájától független publikációk:

Barna G, Reiniger L, **Tatrai P.** Kopper L, Matolcsy A. The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. Közlés alatt: Hematological Oncology

IF (2006): 1.875

Botos E, Turi A, Mullner N, Kovalszky I, Tatrai P, Kiss AL. Regulatory role of kinases and phosphatases on the internalisation of caveolae in HepG2 cells. *Micron*. 2007;38(3):313-20.

IF (2006): 1.200

Fule T, Mathe M, Suba Z, Csapo Z, Szarvas T, Tatrai P, Paku S, Kovalszky I. The presence of human papillomavirus 16 in neural structures and vascular endothelial cells. *Virology*. 2006 May 10;348(2):289-96.

IF (2006): 3.525

Fule T, Csapo Z, Mathe M, Tatrai P, Laszlo V, Papp Z, Kovalszky I. Prognostic significance of high-risk HPV status in advanced cervical cancers and pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol*. 2006 Mar;100(3):570-8.

IF (2006): 2.319

Magyar nyelvű, nem impakt-faktoros közlemények:

Kovalszky I, Dudás J, Gallai M, Hollósi P, Tátrai P, Tátrai E, Schaff Z. Proteoglikánok a májban. [Proteoglycans in the liver] *Magy Onkol*. 2004;48(3):207-13.

Füle T, Baghy K, Tátrai P, Péterfia B, Kovalszky I. A stroma szerepe a daganatok biológiai viselkedésében. [Role of stroma in the neoplastic growth] *Orvosképzés* 2006; 3:196-9.

Köszönetnyilvánítás

Első helyen szeretnék köszönetet mondani Prof. Kovalszky Ilonának, témavezetőmnek a TDK és PhD munkám évei alatt nyújtott felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi segítségért; a soha nem fogyó türelemért és bizalomért; azért, hogy a munkavégzéshez mindig támogató és családias légkört biztosított; és amiért továbbhaladásomat doktori munkám befejeztével is elősegítette.

Köszönöm Prof. Kopper Lászlónak, hogy az I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben töltött éveim során munkámat lehetővé tette és támogató figyelemmel kísérte.

Köszönöm Prof. Nagy Péternek, hogy segített a felhasznált minták gyűjtésében és értékelésében, majd disszertációm bírálatát aprólékos alaposággal és megalkuvást nem ismerő kritikával végezte el, s ezzel nagyban hozzájárult a dolgozat hibáinak, pontatlanságainak felismeréséhez és javításához.

A dolgozatban ismertetett kísérletek kivitelezésében, eredmények elérésében és értékelésében rengeteg segítséget kaptam kollégáimtól, Egedi Krisztinától, Oláhné Nagy Juliannától, Csorba Gézáné Maricától, Kovács Anitától, Dr. Dudás Józseftől, Dr. Füle Tibortól, Dr. Paku Sándortól és Dr. Tímár Ferencről, valamint Dr. Zalatnai Attilától, Dr. Krenács Tibortól, Madarassy Zsuzsannától és Péterfia Bálinttól. Technikai jellegű feladatokban mindig bizalommal fordulhattam Tamási Annához, Klucsik Nicolette-hez és Kaminszky Zsuzsannához. Különösen sok munkával járult hozzá a bemutatott eredményekhez Dr. Somorác Áron. Az említettekén kívül is köszönet illeti az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi munkatársát, amiért ott töltött éveim alatt minden feladat megoldásában segítettek, és baráti légkörrel vettek körül.

Végezetül köszönöm Prof. Schaff Zsuzsának és Dr. Kiss Andrásnak, hogy doktorandusz éveim befejeztével munkalehetőséget teremtettek számomra a II. Patológiai Intézetben, és itt minden eszközzel támogatták doktori disszertációm elkészítését.