

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

PhD Tézis

**Humán hasnyálmirigy organoidok sejt polaritásának szabályozása
jelentősen javítja az *ex vivo* fiziológiai modellezés felbontását.**

Varga Árpád

Témavezető:

Dr. Maléth József



Szeged, 2023

1. A TÉZIS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓ

- I. Human pancreatic ductal organoids with controlled polarity provide a novel *ex vivo* tool to study epithelial cell physiology - **Árpád Varga**, Tamara Madácsy, Marietta Görög Aletta Kiss, Petra Susánszki, Viktória Szabó, Boldizsár Jójárt, Krisztina Dudás, Gyula Farkas Jr., Edit Szederkényi, György Lázár, Attila Farkas, Ferhan Ayaydin, Petra Pallagi, József Maléth Cellular and Molecular Life Sciences (**D1**); MTMT ID: 34024396
IF: 9.261

2. A TÉZIS ALAPJÁT NEM KÉPEZŐ TOVÁBBI PUBLIKÁCIÓK

- I. Orai1 calcium channel inhibition prevents progression of chronic pancreatitis - Viktória Szabó, Noémi Csákány-Papp, Marietta Görög, Tamara Madacsy, **Árpád Varga**, Aletta Kiss, Balint Tel, Boldizsár Jójárt, Tim Crul, Krisztina Dudás, Mária Bagyánszki, Nikolett Bódi, Ferhan Ayaydin, Shyam Jee, Laszlo Tiszlavicz, Kenneth A. Stauderman, Sudarshan Hebbar, Petra Pallagi, and József Maléth
JCI Insight (**D1**); DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.167645>
IF: 9.484
- II. Confinement of Triple-Enzyme-Involved Antioxidant Cascade in Two-Dimensional Nanostructure - Adel Szerlauth*, **Árpád Varga***, Tamara Madácsy, Dániel Sebők, Sahra Bashiri, Mariusz Skwarczynski, Istvan Toth, József Maléth, Istvan Szilagyi
ACS - Materials letters (**D1**); DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmaterialslett.2c00580>
IF: 11.17
- III. Thiopurines impair the apical plasma membrane expression of CFTR in pancreatic ductal cells via RAC1 inhibition - Bálint Tél, Noémi Papp, **Árpád Varga**, Viktória Szabó, Marietta Görög, Petra Susánszki, Tim Crul, Aletta Kis, Ingrid H. Sendstad, Mária Bagyánszki, Nikolett Bódi, Péter Hegyi, József Maléth & Petra Pallagi
Cellular and Molecular Life Sciences (**D1**); DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04662-y>
IF: 9.261
- IV. Impaired regulation of PMCA activity by defective CFTR expression promotes epithelial cell damage in alcoholic pancreatitis and hepatitis - Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, Noémi Papp, Bálint Tél, Petra Pallagi, Viktória Szabó, Aletta Kiss, Júlia Fanczal, Zoltan Rakonczay Jr., László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Meike Hohwieler, Alexander Kleger, Mike Gray, Péter Hegyi, József Maléth
Cellular and Molecular Life Sciences (**D1**); DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04287-1>
IF: 9.261
- V. Bile acid-and ethanol-mediated activation of Orai1 damages pancreatic ductal secretion in acute pancreatitis - Petra Pallagi, Marietta Görög, Noémi Papp, Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, Tim Crul, Viktória Szabó, Melinda Molnár, Krisztina Dudás, Anna Grassalkovich, Edit Szederkényi, György Lázár, Viktória Venglovecz, Péter Hegyi, József Maléth
The Journal of Physiology (**D1**), DOI: <https://doi.org/10.1113/JP282203>
IF: 5.182

- VI. Development of polymer-based multifunctional composite particles of protease and peroxidase activities - Szilárd Sáringer, Tamás Valtner, **Árpád Varga**, József Maléth, István Szilágyi
Journal of Materials Chemistry B (Q1); DOI: <https://doi.org/10.1039/D1TB01861B>
IF: 6.331
- VII. Modelling Plasticity and Dysplasia of Pancreatic Ductal Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells - Markus Breunig, Jessica Merkle, Martin Wagner, Michael K. Melzer, Thomas F. E. Barth, Thomas Engleitner, Johannes Krumm, Sandra Wiedenmann, Christian M. Cohrs, Lukas Perkhofer, Gaurav Jain, Jana Krüger, Patrick C. Hermann, Maximilian Schmid, Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, Joscha Griger, Ninel Azoitei, Martin Müller, Oliver Wessely, Pamela G. Robey, Sandra Heller, Zahra Dantes, Maximilian Reichert, Cagatay Günes, Christian Bolenz, Florian Kuhn, József Maléth, Stephan Speier, tefan Liebau, Bence Sipos, Bernhard Kuster, Thomas Seufferlein, Roland Rad, Matthias Meier, Meike Hohwieler, Alexander Kleger
Cell Stem Cell (D1); DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.03.005>
IF: 24.633
- VIII. TRPM2-mediated extracellular Ca²⁺ entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis - Júlia Fanczal, Petra Pallagi, Marietta Görög, Gyula Diszházi, János Almássy, Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, Péter Csernay-Biró, Xénia Katona, Emese Tóth, Réka Molnár, Zoltán Rakonczay Jr, Péter Hegyi, József Maléth
The Journal of Physiology (D1); DOI: <https://doi.org/10.1113/JP279553>
IF: 5.182
- IX. Intracellular Ca²⁺ Signalling in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis: Recent Advances and Translational Perspectives - Petra Pallagi, Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, József Maléth
International Journal of Molecular Sciences (Q1), DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21114005>
IF: 5.923
- X. Mouse pancreatic ductal organoid culture as a relevant model to study exocrine pancreatic ion secretion – Réka Molnár, Tamara Madácsy, **Árpád Varga**, Margit Németh, Xénia Katona, Marietta Görög, Brigitta Molnár, Júlia Fanczal, Zoltán Rakonczay, Péter Hegyi
Laboratory Investigation (D1), DOI: [10.1038/s41374-019-0300-3](https://doi.org/10.1038/s41374-019-0300-3)
IF: 4.197
- XI. Ca²⁺ Influx Channel Inhibitor SARAF Protects Mice From Acute Pancreatitis – Aran Son, Malini Ahuja, Daniella M Schwartz, **Árpád Varga**, William Swaim, Namju Kang, József Maléth, Dong Min Shin, Shmuel Muallem
Gastroenterology (D1), DOI: [10.1053/j.gastro.2019.08.042](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.042)
IF: 17.373

Összes publikáció száma: 12 (ebből 2 db elő szerzős))

Összesített IF: 117.247

3. RÖVIDÍTÉSEK LISTÁJA

HCO ₃ ⁻	Bikarbonát ion
Cl ⁻	Klorid ion
ANO1	Anoctamin 1
ENaC	Epitheliális nátrium csatorna
PDAC	Hasnyálmirigy duktális adenocarcinoma
BMP	Csont morfogénikus protein
LGR5	Leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó G-fehérje kapcsolt receptor 5
OCs	Organoid kultúrák
ECM	Extracelluláris matrix
Ca ²⁺	Kalcium ion
Na ⁺	Nátrium ion
FBS	Szarvasmarha magzati szérum
G418	Geneticin
DPBS	Dulbecco foszfáttal pufferelt sóoldat
DMSO	Dimethyl szulfoxid
PFA	Paraformaldehid
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-Carboxietil)-5-(and-6)-Carboxifluoreszcein, Acetoximetil Észter
MQAE	N-(Etoxicarbonilmethyl)-6-Metoxiquinolinium Bromid
hPOCs	Emberi hasnyálmirigy organoid kultúrák
CFTR	Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
KRT19	Citokeratin 19
OCLN	Okkludin
SOX9	SRY-Box transkripció faktor 9
EPCAM	Epiteliális sejtheadhéziós molekula
CDH1	E-cadherin
HES1	Hes család BHLH transkripció faktor 1
AMY1A/B/C	Amiláz alfa 1A/B/C
PPY	Hasnyálmirigy polipeptid
INS	Inzulin
CHGA/B	Kromogranin A/B
CDH5	Vaszkuláris endotél cadherin
CaCC	Kalcium aktivált klorid csatorna
PIZO1	Piezo-típusú mechanoszenzitív ioncsatorna komponens 1
ORAI1	ORAI Ca ²⁺ felszabadítás-aktivált kalcium modulátor 1
SCNN1A	Epiteliális Nátrium csatorna 1 alfa alegysége
SCNN1D	Epiteliális Nátrium csatorna 1 delta alegysége
CBE	Klorid bikarbonát kicserélő
HNF1B	Hepatocita nukleáris faktor-1 béta
FOXA2	Forkhead Box A2
MYO7B	Myosin 7 B
CF	Cisztás fibrózis

4. BEVEZETÉS

4.1. A hasnyálmirigy ion és folyadékszekrécója

A hasnyálmirigy az emésztőrendszer egyik felső abdominális szerve, amely két különböző, de létfontosságú részből, az endokrin és az exokrin hasnyálmirigyből áll. Endokrin mirigyként a szomatosztatin, a glukagon, a hasnyálmirigy-polipeptid és az inzulin termelésével szabályozza a vércukorszintet. Az emésztőrendszer részeként, az exokrin hasnyálmirigy egyfelől az elágazó csőrendszert alkotó dukális epitél sejtekből, valamint az ezek végpontjainál csoportosuló acinus sejtekből áll. A dukális epitélsejtek naponta mintegy 2 liter bikarbonátban (HCO_3^-) gazdag, lúgos pH tartományú folyadékot választanak ki, hogy azzal a duodénumba mossák az acinusok által termelt emésztőenzimeket. A dukális sejtek vektorialis ion- és folyadékszekrécóját alapvetően az ioncsatornák és transzporter fehérjék expressziós mintázata határozza meg, amelyek szigorúan szervezett apikális-bazális polaritást mutatnak. A jelenleg rendelkezésre álló modellrendszerek limitációi miatt azonban a humán hasnyálmirigy HCO_3^- szekréciónak részletei, beleértve az ENaC, illetve más Cl^- csatornák (pl.: ANO1) szerepét, még mindig ellentmondásosak és nem teljesen tisztázottak.

4.2. A hasnyálmirigy ion- és folyadékszekrécójának vizsgálatát megcélzó *in vitro/ex vivo* modellrendszerek

A hasnyálmirigy szekréciónak vizsgálatában a szűk keresztmetszetet az jelenti, hogy jelenleg nincsenek olyan humán vonatkozású modellek, amelyek hozzáférést biztosítanak a primér dukális sejtek apikális membránjához. A gyakori fajspecifikus különbségek miatt, a modellekből származó eredmények extrapolálása vagy az alapvető kutatási eredmények rutinszerű klinikai átültetése továbbra sem megoldott.

Az egyik első *in vitro* modell a szekréciónak mechanizmusok feltárására egy adherens humán PDAC sejtvonal, a CAPAN-1 volt, amely a dukális sejtek alapvető tulajdonságait reprodukálja. A PDAC sejtvonalakkal elért kezdeti eredmények ígéretesek voltak, de ésszerű aggályok merültek fel azzal kapcsolatban, hogy a különböző mutációkat (*KRAS*, *TP53* stb.) hordozó, valódi sejtpolarizációt kialakítani nem képes tumoros sejtvonalakból levont következtetések, milyen mértékben feleltethetők meg a primer, egészséges sejtek fiziológias működésével.

Ezek a sejtvonalak szinte teljesen háttérbe szorultak a rágcsáló hasnyálmirigy duktuszok standardizált izolálási eljárása miatt, amely lehetővé teszi a primer epitélsejtekhez való hozzáférést. A hasnyálmirigy dukális fragmentumok izolálása a szövet kollagenázzal történő enzimátikus emésztésén és a fragmentumok kézi mikrodisszekcióján alapul melyet sztereomikroszkóp segítségével végeznek. Ezt a technikát még mindig széles körben

alkalmazzák a hasnyálmirigy duktális epitélium fiziológiájának és patofiziológiájának tanulmányozására.

Korábbi publikációk már beszámoltak róla, hogy *ex vivo*, 3 dimenziós epiteliális organoid kultúrák létrehozhatók a WNT és BMP jelátviteli útvonalak mesterséges manipulációjával. Ehhez a gyomor-bél traktus szöveteiben megtalálható LGR5 pozitív felnőtt őssejteket használnak. A nagyfokú replikációs képességet mutató organoid kultúrák új távlatokat nyitottak a sejtpolaritást mutató modellrendszerek számára, bár alkalmazási lehetőségeik még jelenleg is korai stádiumban vannak. A nemrégiben kifejlesztett, a páciensek mintáiból származó primer organoid kultúrák fiziológiailag releváns modellt nyújthatnak, amely megoldhatja a korábbi módszerekből származó nehézségeket.

Az organoidok tenyésztése során a zárt lumenébe történő vektoriális ion- és folyadéktranszport miatt megnövekedő intraluminális nyomás önmagában elegendő lehet a Piezo1 mechanoszenzitív receptoron és Ca^{2+} csatornán keresztül, az epiteliális szekréció és barrier funkciók negatív szabályozásához. Ennek leküzdésére az egyik lehetséges stratégia az organoidokon belüli sejtpolaritás manipulálása, amelyet korábban sikeresen alkalmaztak már bél- és légúti organoidokban az ECM eltávolításával, hogy ezzel gazda-patogén kölcsönhatások és fertőző betegségek molekuláris hátterét vizsgálják.

4.3. A hasnyálmirigy duktális organoid kultúrák fenntartásának alapelvei

A hasnyálmirigy organoidok az izolált duktális fragmentumok, úgynevezett extracelluláris membrán mátrixba (Matrigel) ágyazásával, valamint egy speciális tenyésztőközeg alkalmazásával hozhatók létre. Az organoidok tenyésztési médiumának alapvető összetevői között egy sor növekedési faktor, valamint az R-spondin és a BMP-szignalizáció antagonistája, a Noggin is szerepel. Ennek okán az OC tápközeg alapját jelenleg főként L-WRN sejt kultúrák állítják elő, amelyek eredetileg az L-WNT3A sejt vonal, R-spondin 3 és Noggin ko-expresszálo vektorokkal kiegészített klónjai. Az ismert izolálási technikát és tápközeget sikeresen alkalmazták betegekből származó hasnyálmirigy organoidok létrehozására és fenntartására. Az eddigi eredmények nagyon ígéretesek, azonban a duktális fragmentumok kézi izolálása megnehezíti a standardizálást és a jövőbeni automatizálást is. Az organoidok gömbszerű szerkezete miatt az apikális oldalhoz és így a szekréciós folyamatokban kulcsfontosságú szerepet játszó apikális csatornához és transzporterekhez való hozzáférés továbbra is kihívást jelent.

5. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseink között szerepelt egy a humán hasnyálmirigy organoid kultúrák generálására optimalizált, enzimátikus emésztésen alapuló sejtizolációs protokoll létrehozása, amely a következő lépés lehet az eljárás szabványosítása és jövőbeli automatizálása felé.

Célunk volt továbbá az ECM eltávolításán alapuló, apikális-bazális polaritásváltást eredményező tenyésztési eljárás adaptálása, a hasnyálmirigy primer duktális epitel sejteinek ion- és folyadéksekreció precíz vizsgálatára.

További célként jelöltük meg a polaritásváltás hatásának vizsgálatát a humán hasnyálmirigy organoidok Ca^{2+} homeosztázisára, valamint az ismert funkcionális módszerek tesztelését a polaritásváltott organoidokon.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. L-WRN kondicionált médium előállítása

Az L-WRN sejtvonalat 10% FBS-t és 0,5-0,5 mg/ml G418 és Hygromycin B-t tartalmazó szelekciós tápfolyadékban, ATCC formulált DMEM közegben tenyésztettük. A kondicionált táptalajt 10% FBS és 1-1% kanamicin-szulfát és antibiotikum-antimikotikum oldattal egészítettük ki.

6.2. A humán hasnyálmirigy organoid kultúrák generálása/fenntartása és polaritásváltásuk indukciója.

A humán hasnyálmirigy szövetminták kadaver donoroktól származtak (etikai jóváhagyási szám: 37/2017-SZTE). A szöveti mintákat felaprítottuk, és 37°C-on enzimátikusan emésztettük. Az így kapott sejtuszpenziót összegyűjtöttük, 3 alkalommal mostuk, majd Matrigel felhasználásával szuszpenzióba vittük. Egy 24 férőhelyes sejttenyésztő lemez férőhelyeibe, egyenként 10 μ l térfogatú Matrigel dómot helyeztünk, majd ezekre 500 μ l tápfolyadékot juttattunk. A 3D kultúra szubkultúrálásához/passzálásához a Matrigel eltávolítását és a sejtek szétválasztását szimultán végeztük 25V/V% TrypLE™ Express enzim alkalmazásával DPBS-ben. A teljesen kifejlett organoidok polaritásváltását az extracelluláris mátrix eltávolításával idéztük elő, egy 7 percre tartó, enzimátikus emésztéssel.

6.3. A primer epitélsejtek krioprezervációja

A krioprezerváló médium a tápfolyadékban alapul, melyet 40% FBS-sel és 5% DMSO-val egészítettünk ki.

6.4. Az polaritás váltott organoidok siRNS transzfekciója

A polaritás váltott humán hasnyálmirigy organoidokat 50 nM siRNS-sel vagy siGLOGreen transzfekciós indikátorral, Lipofectamine 2000 segítségével, a tápoldatban transzfectáltuk 48 órán keresztül.

6.5. Az siRNS csendesítések hatékonyságának validálása qRT-PCR módszerrel

A polaritás váltott organoidokból RNS-t izoláltunk NucleoZOL reagenssel. Összesen 1 µg tisztított mRNS-t használtunk cDNS minták szintézishez. A relatív génexpressziós elemzést $\Delta\Delta Cq$ technikával végeztük.

6.6. Humán hasnyálmirigy organoidok transzkriptomikai analízise RNS-szekvenálással

A konvencionális és polaritás váltott organoidokból izolált RNS minták szekvenálását Illumina NextSeq 500 műszerrel végeztük. A szekvenáláshoz és adatelemzéshez a DeltaBio2000 Ltd. szolgáltatásait vettük igénybe.

6.7. Immunfluoreszcens jelölés és konfokális mikroszkópia

Az organoidok fagyasztott metszetein az immunfluoreszcens jelölést 4%-os PFA-PBS oldattal történő fixálás után végeztük. Az antigén feltárást 94 °C-on nátrium-citrátos Tween20 oldattal végeztük, amelyet blokkolási lépés követett. Az elsődleges antitesteket egy éjszakán át 4 °C-on alkalmaztuk, míg a másodlagos antitestekkel 2 órán át inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. A képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük 40X olajimmerziós objektívvel (Zeiss, NA: 1,4).

6.8. Pásztázó elektronmikroszkópia

Az organoidokat 2,5% (v/v) glutáraldehid és 0,05 M kakodilát puffer (pH 7,2) PBS oldatában, 4°C-on fixáltuk. 8 µL térfogatú mintát 0,01% (w/v) poli-L-lizin bevonatú szilíciumkorongra futtattunk. A korongokat kétszer mostuk PBS oldattal, majd felszálló alkohol sorral dehidratáltuk (30%, 50%, 70%, 80%, 80%, 100% etanol (v/v), egyenként 2 órán át 4°C-on majd 100% EtOH egy éjszakán át tartó alkalmazásával). A dehidratálást követően a mintákat 5 percre tiszta hexametil-diszilazánba merítettük, majd levegőn szárítottuk. Minden mintát kétoldalas szénszalaggal alumínium tönkökre rögzítettünk, majd porlasztó bevonó berendezésben 15 nm-es aranyréteggel borítottuk be. A mintákat Zeiss Sigma 300 pásztázó elektronmikroszkóp alatt figyeltük meg.

6.9. Fluoreszcens mikroszkópia és reverz swelling assay

A konvencionális és polaritásváltott organoidokat poli-L-lizinnel bevont fedőlemezekre erősítettük, és HEPES-oldatban inkubáltuk. BCECF-AM, Fura2-AM (5-5 $\mu\text{mol/L}$), MQAE (2 $\mu\text{mol/L}$) és SBFI-AM (10 $\mu\text{mol/L}$) fluoreszcens indikátorokat alkalmaztunk a pH, Ca^{2+} , Cl^- és Na^+ mérésekhez.

7. EREDMÉNYEK

7.1. Az enzimatisz izolálási technikával létrehozott humán hasnyálmirigy organoidok megtartják az epitelsejtek sajátosságait

Kadaver donoroktól (N=11) gyűjtöttünk hasnyálmirigy szöveti mintákat. A donoroknál nem volt dokumentált exokrin vagy endokrin hasnyálmirigy-betegség. A mechanikai aprítást és enzimatisz szöveti emésztést követően, humán hasnyálmirigy organoid kultúrákat (hPOC) hoztunk létre ECM-ben (Matrigel), melyeket organoid tápközegben tenyésztettük. Mind a 11 mintából sikeresen hoztunk létre konvencionális (apical-in) polaritású organoidokat. Az első szubkultúrálási lépést követően a nagy mennyiségben tenyésztett primer sejteket, a további felhasználásig krioprezerváltuk. Későbbi munkánk során az organoidok egyik alkalmazási módja a polaritásváltott (apical-out) organoidok létrehozása volt. Bizonyítottuk, hogy az apical-in organoidok létrehozásához nem szükséges a humán hasnyálmirigy duktális fragmentumok kézzel történő izolálása, valamint az általunk ismertett jelenlegi módszerrel a kiindulási organoidok száma sem függ a duktális fragmentumok számától, ami jelentős hatékonyságnövelést jelent. Az RNS-szekvenálás kimutatta a felnőtt őssejt marker (*LGR5*) és számos duktális marker, mint *CFTR*, *KRT19*, *OCLN*, *SOX9*, *EPCAM*, *CDH1*, *HES1* aktív expresszióját, míg az acináris (*AMY1A-C*), endokrin (*PPY*, *INS*, *CHGA-B*) és hematopoetikus (*CDH5*) markerek hiánya megerősítette, hogy az organoid kultúráink tisztán duktális epitelsejteket tartalmaznak. Ezt követően fehérjeszinten is megerősítettük a kulcsfontosságú duktális markerek expressziós és lokalizációs mintázatát.

7.2. Az extracelluláris mátrix eltávolítása indukálja az organoidok polaritásváltását és csökkenti a sejtekre nehezedő mechanikai feszültséget.

A humán hasnyálmirigy-organoidok polaritásváltásának indukációjához először hagyományos, úgynevezett apical-in polaritású organoidokat hoztunk létre ECM segítségével. A felnőtt organoidokról enzimatisz módszerrel eltávolítottuk a Matrigel mátrixot, majd ezeket szuszpenziós kultúrába vittük. Megfigyeltük, hogy 48 óra elteltével az organoidok morfológiája megváltozott, és a jellegzetes cisztikus formát felváltotta egy oszlopos sejtréteg által alkotott

sűrűbb szerkezet. Az apikális CFTR, ACTIN és OCLN immunfluoreszcens jelölése kimutatta, hogy a morfológiai változásokkal, az apikális membrán az organoidok külső oldalára helyeződött át. Eredményeink azt mutatták, hogy a polaritásváltáskor nem volt szignifikáns különbség az F-aktin szerveződésében, a membrán citoszkeleton keresztmetszésében vagy az intermikrovilláris adhézióban részt vevő gének expressziójában. A miozin 7B expressziója azonban szignifikánsan magasabb volt a polaritásváltott organoidokban. Ezek a transzkriptomikai adatok arra utalnak, hogy a polaritásváltás fokozhatja a mikrovillusok és a kefeszegély szerveződését. Az apikális membránra jellemző kefeszegély vizualizációjára pásztázó elektronmikroszkópiás képalkotást (SEM) alkalmaztunk, amely során képeket rögzítettünk a polaritásváltott organoidok mikrovillusokkal sűrűn fedett felszínéről.

Az organoidok átmérője a polaritásváltással jelentősen csökkent, míg a sejtsűrűségük nőtt.

A sejtek és a sejtmagok átmérőjét az apical-in és apical-out organoidokban összehasonlítottuk, ahol azt találtuk, hogy a hosszanti átmérőjük a sejtpolaritás megváltozásával jelentősen csökkent és ez egy kolumnáris epitél sejtréteg kialakulásához vezetett.

Az epitelsejtekben a PIEZO1 csatorna fehérje mechanoszenzorként működik, amely fokozott intraluminális feszültség esetén extracelluláris Ca^{2+} beáramlást közvetít. Eredményeink azt is kimutatták, hogy a hPOC sejteji PIEZO1-et expresszálnak, amely az intraluminális nyomás megváltozásával feltételezhetően részt vehet az ion- és folyadékszekréció szabályozásában. Végül kimutattuk, hogy a polaritásváltás csökkenti a ciklinek génexpresszióját, ami a sejtproliferációs ráta csökkenésére utal.

7.3. A bazális intracelluláris Ca^{2+} koncentráció egységesebb az apical-out organoidokban.

Összehasonlítottuk a Ca^{2+} jelátvitelt a hagyományos és polaritásváltott organoidokban. A nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint vizsgálatakor, szignifikánsan magasabb bazális Ca^{2+} szintet mértünk az apical-out organoidokban, a hagyományos apical-in organoidokhoz képest. Érdekes módon, ha minden egyes organoidot külön-külön ábrázoltunk a összes mintavételi terület átlagértékével, egyértelműen látható, hogy az apical-in organoidok 2,8-szor nagyobb bazális Ca^{2+} szint eltérést mutatnak, mint apical-out társaik. Sem a Ca^{2+} kiáramlást, sem pedig a Ca^{2+} beáramlást vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget. Az apical-in organoidokban megfigyelt, a bazális intracelluláris Ca^{2+} szintet érintő eltérések, az apical-in organoidok egyfajta stimulált állapotára utalhatnak (például a PIEZO1 nyomásfüggő, mechanikai stressz általi aktiválására), amely mértéke a különböző organoidok között nagymértékben eltérhet.

Annak kizárására, hogy az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisban megfigyelt változásokat a Ca^{2+} jelátvitelben részt vevő fehérjék megváltozott expressziója okozza, több gén kifejeződését transzkriptomikai módszerrel elemeztük és hasonlítottuk össze. Biológiai releváns változásokat azonban nem figyeltünk meg az apical-in és apical-out organoidok között.

7.4. Működőképes Anoctamin 1 és ENaC fehérjék jelen vannak a humán hasnyálmirigy duktális sejteinek apikális membránjában.

Az RNS-szekvenálással kimutattuk, hogy a kalcium aktivált Cl^- csatornák (CaCC) közül, a génexpressziós értékeket tekintve, első helyen áll az *Ano1*, amely 45,73-szor nagyobb kifejeződést mutat, mint a *Cftr*. Érdekes módon a transzkriptomikai elemzések az *ANO1* és az *SCNN1A* viszonylag magas expresszióját mutatták ki az apical-in humán hasnyálmirigy-organoidokban is. Az ANO1 és az ENaC fehérjéket humán hasnyálmirigy-szöveti metszeteken végzett immunhisztokémiával és az apical-out organoidokon végzett immunfluoreszcens jelöléssel mutattuk ki. Az ANO1 és az ENaC jelen van a duktális epitélisejtek apikális membránjában.

Az ANO1 által közvetített Cl^- kiáramlás követésére egy intracelluláris Cl^- koncentrációra érzékeny fluoreszcens indikátort, az MQAE-t használtuk. A 10 μM T16inhAO1 ANO1 gátlószer jelentősen csökkentette a Cl^- kiáramlást. Az ANO1 gátlószerrel 10 μM CFTR(inh)-172 CFTR inhibitorral kombinálva, a kiáramlás maximális válasza tovább csökkent. A siRNS közvetlen alkalmazását a Matrigel használata akadályozza, mivel korlátozza a siRNS molekulák sejtekbe való bejutását. Ezt azonban kiküszöböltük a polaritás váltott organoidok szuszpenzióban történő tenyésztésével, ami lehetővé tette a *CFTR* és az *ANO1* géncsendesítését. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy mind az siCFTR, mind az siANO1 jelentősen csökkentette az Cl^- kiáramlást, amit a két siRNS kombinációja tovább redukált.

Az ENaC 4 alegysége közül az *SCNN1A* magas és az *SCNN1D* mérsékelt expresszióját mutattuk ki a humán hasnyálmirigy organoidokban. Az α alegység (*SCNN1A*) apikális membrán való lokalizációjának kimutatására immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk az apical-out organoidokon. Az ENaC csatorna aktivitásának méréséhez sejtpermábilis Na^+ indikátort, az SBFI-t használtuk. Az *SCNN1A* és *SCNN1D* közvetlen hozzájárulását az ENaC működéséhez siRNS kezelésekkel vizsgáltuk, ahol mindkét alegység csendesítése jelentősen redukált Na^+ beáramlást eredményezett.

7.5. A polaritásváltás javítja az organoidok kapacitását a rendelkezésre álló funkcionális vizsgálatokban.

A polaritás váltott organoidokon fordított forskolin-indukált hízásos (reverz swelling assay) kísérletet végeztünk a vad típusú CFTR aktivitásának kimutatására. 10 μM forskolin csökkentette az apical-out organoidok relatív térfogatát, amit a 10 μM CFTR(inh)-172 adagolása megszüntetett.

Az apical-in organoidokban a Cl^- kiáramlást a 10 μM CFTR(inh)-172 jelentősen csökkentette, ami arra utal, hogy a Cl^- kiáramlás feltehetően nagyrészt CFTR-függő folyamat. Amikor azonban ugyanezt a protokollt apical-out organoidokon alkalmaztuk, a Cl^- elvonásra adott válasz jelentősen nagyobb volt, mint a hagyományos organoidokban. Az apical-out modell fokozott felbontása miatt még 20 μM CFTR(inh)-172 inhibitor adagolása sem tudta teljesen megszüntetni a Cl^- kiáramlást.

Megvizsgáltuk egy ismert CFTR-potenciátor, a VX-770 hatását a hasnyálmirigy duktális sejtek CFTR-aktivitására. A 10 μM VX-770 az apical-out organoidokhoz való adagolása jelentősen fokozta a Cl^- kiáramlást és emelte a $[\text{Cl}^-]_i$ plató fázisának relatív magasságát, ami bizonyítja az apical-out humán hasnyálmirigy organoidok alkalmazhatóságát az *in vitro* gyógyszerkísérletekben.

A Cl^- és HCO_3^- cserélő (CBE) aktivitását BCECF pH-érzékeny festékkel mértük CFTR gátlással párhuzamosan, $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ pufferelt oldatban. A Cl^- megvonást követően, a Cl^- tartalmú HCO_3^- oldat közvetlen apikális perfúziója, 10 μM CFTR(inh)-172 egyidejű adagolásával csökkentette a BCECF (F495/F440) intenzitásváltozásának meredekségét a kontrollcsoporthoz képest. Ez a közvetett kimutatási módszer a humán hasnyálmirigy organoidokban jelenlévő a működőképes CBE fehérjékre utal.

8. DISZKUSSZIÓ

Munkánk során a továbbfejlesztett tenyésztési eljárással nagy számban hoztunk létre humán hasnyálmirigy organoidokat, melyeken polaritásváltást indukáltunk. A polaritás manipulációjával az apical-in organoidokban megfigyelt megnyúlt sejt morfológia az apical-out kultúrákban oszlopszerűvé alakult át, amihez konzisztensebb nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint társult. Az apikális plazmamembrán jobb hozzáférhetőségét kihasználva azonosítottuk az ANO1 és az ENaC kifejeződését, lokalizációját és demonstráltuk működőképességüket a humán duktális epitelsejtekben. Végül kimutattuk, hogy a funkcionális vizsgálatok (mint

például a forskolin-indukált hízás vagy a CFTR-aktivitás mérése) jobb dinamikai tartományt mutatnak, ha apical-out organoidok felhasználásával végezzük őket.

Az elmúlt években az Lgr5+ felnőtt őssejtekből származó organoid kultúrák az egyedfejlődés és a különféle betegségek új modelljeiként jelentek meg. A Wnt/ β -Catenin jelátviteli kaszkád aktivitásának fenntartásával, az organoid kultúrák hosszú távon fenntarthatóak 3D extracelluláris mátrixokban *in vitro*, miközben a kultúrákban lévő epitelsejtek megőrzik a származási szervre jellemző eredeti diverzitását és szerveződését. Csoportunk korábban morfológiai és funkcionális összehasonlítást végzett az egerekből izolált dukális fragmentumokban és hasnyálmirigy organoid kultúrákban lévő primer epitelsejteken. Kimutattuk, hogy az epitelsejtek apikális-bazális polaritása, gén és fehérje expressziója, valamint iontranszport-aktivitása az egér hasnyálmirigy organoidokban jelentős átfedést mutatott a frissen izolált primer dukális fragmentumokban korábban megfigyelttel.

A hasnyálmirigy organoidok létrehozásának széles körben ismert protokollja a hasnyálmirigy-szövet feltárása után a dukális fragmentumok kézi leválasztásán alapul. A módszer során a dukális fragmentumok izolálása manuális munkát és tapasztalatot igényel. A disszertáció egyik jelentős újítása, hogy a teljes hasnyálmirigyszövet enzimatis emésztésével izolálunk sejteket az organoidok létrehozásához, amely jelentős javulást eredményezett az organoidok mennyiségében és maximalizálta a kultúrák létrehozásának sikerességi arányát. Az organoidok epitelsejtjei olyan jól ismert dukális markereket fejeztek ki, mint a CFTR, KRT19, SOX9, HNF1B vagy FOXA2, míg a hasnyálmirigy egyéb sejtípusaira jellemző markerek, mint az amiláz vagy az inzulin teljesen hiányoztak a kultúrákból. Ez arra utal, hogy izolálási technikánk nagy hatékonysággal alkalmas, más sejtípusok jelenléte nélküli, tiszta hasnyálmirigy dukális sejt-kultúrák létrehozására. A hasnyálmirigy betegségek tanulmányozásának másik potenciális modellje a humán indukált pluripotens őssejteken alapuló organoidok, amelyek egyedülálló platformot biztosítanak az organogenezis és a regeneratív orvoslás tanulmányokhoz. Bár a pluripotens őssejtek endokrin hasnyálmirigy progenitor irányba történő differenciálódását már publikálták, a tisztán dukális vagy exokrin sejtek generálását még nem sikerült megfelelő hatékonysággal megvalósítani. Egy nemrégiben bemutatott tanulmányban Hohwieler és munkatársai új differenciációs protokollt dolgoztak ki, amivel sikeresen hoztak létre humán hasnyálmirigy acináris/dukális organoidokat egészséges és cisztás fibrózisos betegekből. A sejtek ebben a kultúrában olyan acináris sejtmarkereket is kifejeztek, mint például amiláz, ami arra utal, hogy acináris és dukális sejtek vegyesen találhatóak meg a modellben. Az általunk közzétett protokoll előnye, hogy alkalmazásával viszonylag rövid időn belül tiszta dukális organoid kultúrákat tudunk előállítani.

Az organoidok széleskörű alkalmazhatóságának másik jól ismert limitációja, az extracelluláris membrán mátrix (Matrigel) felhasználása. A mátrix az egyes molekulák mérete és töltési sajátosságai miatt korlátozhatja az egyes vizsgált vegyületek és farmakonok diffúzióját, valamint bizonyítottan gátolja az siRNS-ek és plazmidok bejutását a sejtekbe. Ezenkívül további problémát jelent, hogy a hagyományos apical-in organoidokban az epitelsejtek apikális membránja közvetlenül nem hozzáférhető a gyógyszerek vagy a fiziológias vizsgálati módszerek számára. Ráadásul apical-in organoidokban az ionok és a folyadék vektoriális transzportja miatt az intraluminális nyomás minden előzetes stimuláció nélkül megemelkedik, ami befolyásolhatja az epitélium szekréciónak folyamatait. E korlátok leküzdése érdekében az organoidok apikális-bazális polaritásának felcserélését úgy idéztük elő, hogy az apical-out organoidokat extracelluláris membrán mátrix mentes, szuszpenziós kultúrába vittük. Nemrégiben Co és munkatársai fejlesztették ki ezt technikát az organoidok polaritásának megváltoztatására, amellyel a gazdatest-patogén kölcsönhatások tanulmányozását vizsgálták. Munkánk során a CFTR, az aktin és az okkludin immunfluoreszcens jelölése, valamint a kefeszegély vizualizálása igazolta az organoidok polaritásváltását, a szuszpenziós kultúrába helyezésétől számított 48 óra elteltével. A polaritásváltás az epitelsejtek morfológiájának megváltozását is eredményezte, megnyúlt sejtek oszlopszerűvé alakultak, ami arra utal, hogy az intraluminális nyomás megszüntetése a sejt homeosztázisát is befolyásolhatja. Kimutattuk, hogy a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint a nem stimulált apical-out organoidokban konzisztensebb, mint az apical-in organoidokban. Ez a megállapítás jelentős hatással lehet a hasnyálmirigy organoidok különböző vizsgálatokban való alkalmazására, mivel az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitel határozza meg a duktális sejtek fiziológias szekréciónak és patológias funkcióit. Az apical-out organoidok ezen tulajdonsága kiküszöbölheti az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitelre ható farmakonok hatásának torzítását, így ezen kultúrák alkalmazása előnyös választásnak bizonyulhat.

Kimutattuk továbbá a megnyúlást és intraluminális nyomást érzékelni képes, PIEZO1 mechanoszenzitív receptor és Ca^{2+} csatorna jelenlétét a humán hasnyálmirigy duktális epitelsejteken. A PIEZO1 a mechanikai megnyúlást érzékelve felelős a gyors epitél sejtosztódás indukciójáért, így szabályozza az epitelsejtek turnover mechanizmusát, amelyet amplitúdóját polaritásváltás enyhíteni látszik. Ezt az apical-out organoidokban megfigyelt, a sejtciklussal kapcsolatos gének csökkent expressziója is megerősítette.

Figyelemre méltó megfigyelés, hogy a polaritásváltás a *MYO7* expressziójának növekedését idézte elő. Mivel a *MYO7* alapvetően a mikrovillusok közötti kölcsönhatásért felelős, megnövekedett expressziója feltehetően a lumen redukálódásával és az ezzel párhuzamos

nyomáscsökkenéssel függhet össze. Korábban is megfigyeltük már egér hasnyálmirigy organoidok metszetein, hogy az apikális membránjukban elhelyezkedő mikrovillusok sűrűsége és mérete is kisebb az izolált duktális fragmentumokban megfigyeltékhez képest. A cisztikus organoidokban az intraluminális nyomás tehát több okból is olyan tényező lehet, amely eliminálása a fiziológiás és a gyulladásos állapotok precíz összehasonlításakor kulcsfontosságú tényező.

Az új sejtizolálási eljárást és az apikális membrán hozzáférhetőségét kihasználva a poláris humán duktális epitélisejtek iontranszport mechanizmusait vizsgáltuk. A duktális sejtek nagy mennyiségű HCO_3^- kiválasztása az $\text{SLC26A6 Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cserélő és a CFTR Cl^- csatorna kölcsönhatásától függ. Bővült eszköztárunk segítségével két olyan ioncsatornát azonosítottunk, amelyek a duktális sejtek plazmamembránján helyezkednek el, és amelyek szerepét korábban a tudományterület nem azonosította a hasnyálmirigy ionszekréciónak. Eredményeink kimutatták, hogy a primer duktális epitélisejtek funkcionálisan aktív ANO1 fehérjét expresszálnak, amely egy Ca^{2+} aktivált Cl^- csatorna. Az ANO1 apikális elhelyezkedéséről korábban csak a hasnyálmirigy acináris sejtjei kapcsán számoltak be, ahol az ANO1-en keresztül történő HCO_3^- szekréciónak mérsékelte a pH eltolódást az akut hasnyálmirigy gyulladás során. Ezen kívül az ENaC kifejeződését és funkcionális aktivitását is kimutattuk a duktális sejtek apikális membránján. Ez meglehetősen meglepő eredmény, mivel a területen dolgozó kutatók korábban egyetértettek abban, hogy az ENaC nem vesz részt a hasnyálmirigy duktális funkcióiban, holott számos epitélisejt típusban széles körben expresszálódik és elsősorban a lumenális Na^+ reabszorpciójában és a lumenális folyadék térfogatának és összetételének szabályozásában játszik szerepet. Ezen csatornák részvétele a fiziológiás szekréciónak folyamatokban egyrészt további elemzést igényel, másrészt a két új ioncsatorna bevezetése a szekréciónak részletes felülvizsgálatát teszi szükségessé. Megfigyeléseink jelentősen javítják a jelenlegi szekréciónak modellt, ami a humán exokrin hasnyálmirigy ionszekréciónak részletesebb megértéséhez vezet. Ennek jelentősége továbbá, hogy mind az ENaC, mind az ANO1 potenciális terápiás célpont a cisztás fibrózisban.

Végezetül példákon keresztül mutattuk be az a polaritás váltott organoidok felhasználási lehetőségeit a jelenleg rendelkezésre álló funkcionális vizsgálatok javítására. A humán rektális organoidokon végzett forskolin indukált hízás teszteket a cisztás fibrózisos betegek gyógyszerre adott válaszána előrejelzésére használják. Az általunk bemutatott apical-out organoidok előnye kettős: egyrészt a Matrigel kiküszöbölése alkalmassá teheti a vizsgálatot az automatizálásra és nagyszabású szűrésre, másrészt a jobb dinamikai tartomány az eredmények jobb felbontásához és a klinikai előrejelzések nagyobb pontosságához vezethet. Összességében

a polaritás váltott apical-out humán hasnyálmirigy-organoidok új lehetőségeket kínálnak a cukorbetegség, az akut vagy krónikus hasnyálmirigy-gyulladás vagy a hasnyálmirigy cisztás fibrózisának regeneratív terápiáinak vizsgálata és specifikus gyógyszerjelöltek tesztelésére.

9. ABSZTRAKT

Bevezetés: Az epiteliális ion- és folyadékszekréció számos szerv, közöttük a tüdő, a máj vagy a hasnyálmirigy élettani funkcióit határozza meg. Mivel a funkcionális humán primér duktális epitelsejtekhez való hozzáférés korlátozott, a hasnyálmirigy ionszekréciójának molekuláris mechanizmusait vizsgálni a mai napig nagy kihívás jelent. A betegekből származó organoidok képesek áthidalni ezt a korlátot, azonban az apikális membránhoz való közvetlen hozzáféréshez továbbra sincs megfelelő elérhető módszer. További probléma, hogy a korábban alkalmazott, izolált hasnyálmirigy duktális fragmentumokat igénylő organoid előállítási technika, korlátozta az organoid előállítási mennyiségét, ami limitálja a nagy áteresztőképességű alkalmazásokban rejlő lehetőségeket. Továbbá aggodalomra ad okot, hogy az organoidokban az intraluminális nyomás az ionok és a folyadék vektoriális transzportja miatt megemelkedik, ami akadályozhatja az élettani folyamatok vizsgálatát.

Célkitűzés: Ezért célul tűztük ki egy optimalizált, enzimátikus emésztésen alapuló sejtizolációs protokoll beállítását az organoidok létrehozására, valamint egy olyan tenyésztési módszer adaptálását, amely az ECM eltávolítása által kiváltott apikális-bazális polaritásváltáson alapul, hogy az így létrehozott apical-out organoidokat az ion- és folyadékszekréció vizsgálata használjuk fel.

Módszerek: A hasnyálmirigy szövetmintákat 11, nem cukorbeteg kadaver donortól gyűjtöttünk, és azokat hasnyálmirigy organoid kultúrák előállítására használtuk fel. A cisztikus organoidok polaritásváltását az extracelluláris membrán mátrix (Matrigel) eltávolításával idéztük elő. Az apical-in és apical-out organoidokat RNS-szekvenálással, immunfluoreszcens jelöléssel, fluoreszcens Cl^- , Ca^{2+} , Na^+ és folyadékszekréciós mérésekkel vizsgáltuk siRNS csendesítés vagy gátlószeres kezelésekk mellett. Az organoidokról pásztázó elektronmikroszkópiával készítettünk felvételeket.

Eredmények: Optimalizáltuk a szöveti mintákból, enzimátikus emésztésen alapuló sejtizolációs protokollunkat. A hagyományos apical-in organoidok ECM eltávolítással történő polaritásváltását a CFTR, OCLN, ANO és ENaC immunfluoreszcens jelölésével demonstráltuk. A mikrovillusok jelenlétét SEM technikával mutattuk ki az apical-out organoidok külső felületén.

Az apical-out organoidokban lévő sejtek kolumnárisává váltak, a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjuk kiegyensúlyozottabb volt az apical-in organoidokhoz viszonyítva. Az apical-out organoidok alkalmasnak bizonyultak olyan genetikai perturbációs technikák használatára, mint a siRNS géncsendesítés. Két új ioncsatorna, a Ca^{2+} aktivált Cl^- csatorna, az ANO1 és az epiteliális Na^+ csatorna, az ENaC expresszióját és működését mutattuk ki a dukális epitelsejteken. Végül demonstráltuk, hogy a rendelkezésre álló funkcionális vizsgálatok, mint például a forskolin-indukált hízás vagy az intracelluláris Cl^- mérés, jobb dinamikai tartományt biztosítanak, ha azokat apical-out organoidok felhasználásával végezzük.

Konklúziók: Adataink összességében arra utalnak, hogy a polaritásváltott humán hasnyálmirigy dukális organoidok megfelelő modellnek bizonyulnak az alap- és transzlációs kutatás eszköztárának bővítésére.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos fejlődés végső soron mindig csapatmunka, és ezt az elmúlt években, az engem körülvevő leginspirálóbb emberektől tanulhattam meg. Szavakkal nem tudom kifejezni hálámat mentoromnak és témavezetőmnek, **Dr. Maléth Józsefnek** a támogatásáért, útmutatásáért és barátságáért. Az ő kiváló témavezetése nélkül ez a doktori értekezés és a mögöttünk álló gyümölcsöző évek nem valósulhattak volna meg.

Hálás vagyok **Prof. Dr. Lengyel Csabának**, a Belgyógyászati Klinika jelenlegi vezetőjének, aki lehetőséget adott rá, hogy az intézetében dolgozhassak. Őszinte hálával tartozom **Dr. Pallagi Petrának** az együttműködésért, értékes meglátásaiért és barátságáért.

Szeretném kifejezni legmélyebb elismerésemet és hálámat azoknak, akikkel együtt kísértük végig egymást ezen az úton: **Madácsy Tamara, Szabó Viktória, Jójárt Boldizsár, Kiss Aletta, Susánszki Petra, Papp Noémi**. Hálás vagyok minden segítségükért, bátorításukért, és az együtt töltött szép pillanatokért. Az ő inspirációjuk nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Hálával tartozom továbbá minden kollégámnak, akik az évek során tanítottak, segítettek és támogattak: **Molnár Tünde, Tim Crul, Tél Bálint, Ingrid Hegnes Sendstad, Görög Marietta, Dudás Krisztina, Molnár Melinda, Sáriné Konczos Zsuzsanna, Magyarné Pálfi Edit, Pritz Tünde, Fritz Rea, Mikósné Árva Zsuzsa**.

Nem vállalkozhattam volna erre az útra a szeretett, bátorító és türelmes barátaim nélkül, akik végig mellettem álltak, **Kocsy Klaudia, Szabó Dorottya, Gaál Péter, Sárközi Kata, Kiss Nikolett, Ney Eszmeralda, Kelle István**, köszönöm a támogatásukat.

Végül, de nem utolsósorban, a leghálásabb azok áldozatos munkájért vagyok akik soha nem szüntek meg támogatni engem a tudományos pálya és eredmények felé vezető úton. Legnagyobb köszönettel tartozom csodálatos édesanyámnak, **Répási Editnek**, édesapámnak, **Varga Lászlónak** és testvéremnek, **Varga Tamásnak**. Ti voltatok az én védőpajzsom, ami soha nem hagyott cserben, megvédett, miközben én a tudománynak szenteltem magam. Soha nem tudok ezért nekik elég hálás lenni.