

Szegedi Tudományegyetem, Szent Györgyi Albert
Orvostudományi Kar
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

**Felhóalapú adatgyűjtés
és multidiszciplináris megközelítés
a naevoid basalsejtes carcinoma szindróma
diagnosztikájában**

PhD tézis

Dr. Vetró Éva

Témavezető:

Dr. Seres László, PhD

Szeged,

2023

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

- I. Pál M, **Vetró É**, Nagy N, Nagy D, Horváth E, Bokor AB, Varga A, Seres L, Oláh J, Piffkó J, Széll M.: Whole-Exome Sequencing Identified Two Novel Pathogenic Mutations in the *PTCH1* Gene in BCNS.
Curr Issues Mol Biol. 2023;45(7):5293-5304.
IF: 2.976 Q3

- II. **Vetró É**, Oláh J, Kalmár T, Maróti Z, Horváth E, Széll M, Piffkó J, Seres L.: Multidisciplinary approach for mapping genetic variants in naevoid basal cell carcinoma syndrome. Newly identified patched 1 mutation in half-sisters.
Asian J. Dent. Sci. 2022;5,7–14.

- III. **Vetró É**, Oláh J, Nagy D, Széll M, Piffkó J, Seres L.:
A Gorlin–Goltz-szindróma genetikai aspektusai [Genetic aspects of Gorlin-Goltz syndrome]
Orv Hetil. 2020;161:2072-2077. [Hungarian]
IF:0.54 Q4

1. Bevezetés

A naevoid basalsejtes carcinoma szindróma (NBCCS) egy ritka, örökletes betegség, amelyet fejlődési rendellenességek széles spektruma és különböző malignus folyamatokra való megnövekedett hajlam jellemez.

Epidemiológia

Az előfordulás gyakoriságát kevés tudományos közlemény vizsgálja, ezek meglehetősen nagy szórást mutatnak. A leggyakrabban idézett, 4 millió fős, északnyugat angliai populációt vizsgáló felmérés 1 : 57 000-re, míg egy ausztrál közlemény 1 : 164 000, egy olasz pedig 1 : 256 000-es értéket valószínűsít. Számos szerző felveti, hogy a szindróma előfordulási aránya magasabb, mint azt eddig feltételezték. Az incidencia 1 : 19 000-re tehető, nemek szerinti eltérést nem figyeltek meg, azonban az afroamerikaiak és az ázsiaiak csak az esetek 5 %-át teszik ki.

Etiopatogenezis - Hedgehog jelátviteli út

Az autoszómális domináns módon öröklődő kórkép kialakulásában a humán homológ *Drosophila patched 1* gén (PTCH1), a humán homológ *Drosophila patched 2* gén (PTCH2), illetve a fuzionált homológ szuppresszor gén (SUFU) mutáció játszhatnak szerepet. A PTCH1 és SUFU gének szuppresszorként vesznek részt a Sonic hedgehog (SHH) útvonalban. Az SHH-útvonal alapállapotában (inaktivált állapotban) a sejtmembránban található PTCH1-receptor-molekula gátolja a smoothed (SMO) nevű, szintén transzmembrán molekulát. Ezen gátlás miatt a citoplazmában lévő GLI2 és GLI3 transzkripciós faktorok is foszforilált, azaz inaktív állapotba kerülnek, ami miatt vagy a proteosomákban kerülnek degradációra, vagy pedig bejutnak ugyan a sejtmagba, de ott a célgének transzkripciójának csendesítését idézik elő. Ilyen esetben a sejtosztódások gátlása következik be. A jelátviteli útvonalban részt vevő, az SMO-tól 'downstream' lévő SUFU-molekula szintén a GLI transzkripciós faktorok gátlását végzi. Normál esetben az SHH-ligand PTCH1-receptorhoz való kötődése tudja

aktiválni az útvonalat az SMO-n és a GLI transzkripciós faktorokon keresztül, ezzel beindítva a sejtosztódásban szerepet játszó gének transzkripcióját. Amennyiben a PTCH1 vagy SUFU génekben patogén mutáció alakul ki, a belőlük átírt fehérjék elvesztik szuppresszori funkciójukat, és SHH-ligand kötődése nélkül is rendellenes módon aktívá válik az útvonal. Mindez embrionális korban fejlődési rendellenességekhez, postnatalisan pedig daganatos sejtek növekedéséhez és terjedéséhez vezet. A tudomány jelenlegi állása szerint, a malignus kórképek több, mint felénél bizonyítást nyert a SHH jelátviteli út szerepe.

Klinikai tünetek

Az NBCCS klinikai tünetei rendkívül változatosak. Jelen ismereteink szerint száznál is többre tehető azon jellegzetességek száma, melyek a kórképben előfordulhatnak. Mind a bőr- és csontrendszer, a központi idegrendszer, a húgy- és ivarrendszer, a kardiovaszkuláris rendszer, továbbá a érzékszervek is érintettek lehetnek. A legnagyobb arányban előforduló tünetek a multiplex lokalizációban kialakuló állcsont ciszták (KCs), továbbá a basalsejtes carcinomák (BCCs).

Genetikai háttér

A NBCCS-ben szenvedők 70–80%-ánál családi halmozódást mutat a kórkép, és 20–30%-ra tehető azok aránya, akiknél de novo patogén variáns okozza az eltérést. Ritkán előfordulhat gonadalis vagy szomatikus mozaikosság. Az autoszomális domináns módon öröklődő betegség kialakulásában a PTCH1 és SUFU gének mutációinak tulajdonítanak fontos szerepet. Az esetek kb. 50–85%-ában a PTCH1-gén szekvenciális eltérése, kb. 6–21%-ában a PTCH1-génben található exon(ok) deléciója vagy duplikációja, kb. 5%-ában a SUFU-gén szekvenciális mutációja és kb. 1%-ában SUFU-deléció vagy -duplikáció áll a betegség hátterében. A betegek 15–27%-ában azonban ismeretlen marad a genetikai ok.

Diagnózis

A diagnózis a részletes családi anamnézis felvételére, a klinikai, a radiológiai, valamint a genetikai vizsgálatokra épül. A szindrómával kapcsolatban összegyűlt, több évtizedes ismeretanyag alapján leggyakoribbnak minősített tünetek a major kritériumok, míg a kevésbé gyakoriak a minor tünetek. Jelenleg a diagnózis felállításához

- (1) 1 major tünet és igazolt genetikai eltérés, vagy
- (2) 2 major tünet, vagy
- (3) 1 major és 2 minor kritérium szükséges.

A major tünetek a következők:

1. Odontogén keratociszta mandibulában/maxillában (szövettanilag igazolt)
2. Falx cerebri lamellaris kalcifikációja
3. Palmaris/plantar „pit”-ek (≥ 3)
4. Basalsejtes carcinoma (>2 , vagy egy a 20. életév előtt)
5. Elsőfokú rokon NBCCS-diagnózissal
6. Medulloblastoma

A minor tünetek a következők:

1. Macrocephalia
2. Csontrendszeri rendellenességek: hasadt bordák, ék alakú csigolyák, polydactylia, syndactylia, ajak-szájpad hasadék, Sprengel-deformitás, Pectus excavatum/ carinatum
3. Cardialis /Ovarium fibroma
4. Szemészeti eltérések: cataracta, glaucoma, szemfejlődési rendellenesség

Diagnózis genetikai aspektusai

NBCCS gyanúja esetén a következő sorrendet javasolják a szerzők, a potenciálisan kóroki tényezőként szerepet játszó gének vizsgálatánál: [1] PTCH1 szekvencia analízis; [2] PTCH1 deléció/ duplikáció analízis; [3] SUFU szekvencia analízis; [4] SUFU deléció/ duplikáció analízis; [5] PTCH1 ribonukleinsav (RNA) analízis.

Korábban a Sanger-szekvenálás volt az aranystandard a nukleotid bázissorrend meghatározásában, azonban az eljárás időigényessége és költségei egyéb vizsgálo módszerek kifejlesztésére sarkallták a kutatókat. Az új-generációs szekvenálási (NGS) technikák, köztük a teljes exom szekvenálás (WES), már könnyebben hozzáférhetőek, nagy átírási képességűek és pontmutációk felismerésére is alkalmasak. Természetéből adódóan, azonban a WES nem alkalmas nagyméretű deléciók és duplikációk detektálására. Erre a problémára nyújt megoldást a multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA), mely egy speciális PCR vizsgálat. Az MLPA előnyösen alkalmazható nagyméretű deléciók és duplikációk identifikálására, ellenben pontmutációk vagy korábban fel nem ismert eltérések azonosítására nem alkalmas.

Abban az esetben, ha a fent említett valamennyi vizsgálati módszer negatív eredményt mutat, viszont a klinikai tünetek alapján erős a gyanú a háttérben fennálló NBCCS-re, akkor posztzigotikus mozaicizmus magyarázhatja a tüneteket. Ennek igazolása céljából, szövettani minta vételét javasolják kettő, különböző basalsejtes carcinomából, minek után a PTCH1 és az SMO gének vizsgálata szükséges a kinyert szövetekből.

2. Célkitűzés

Célul tűztük ki egy retrospektív és prospektív kohorszvizsgálat elvégzését, naevoid basalsejtes carcinoma szindrómában szenvedő betegeken.

Vizsgálatunk fő céljai a következőképpen foglalhatóak össze:

- 1) multidiszciplináris munkacsoport felállítása olyan szakemberek bevonásával, akik NBCCS-ben szenvedő betegek vizsgálatában, utánkövetésében érintettek,
- 2) NBCCS-sel diagnosztizált betegekkel kapcsolatos retrospektív és prospektív, felhőalapú adatgyűjtés,
- 3) a vizsgált betegek major és minor tüneteinek összegyűjtése,
- 4) genetikai vizsgálat elvégzése,
- 5) összefüggést találni a genotípus és a fenotípusos jegyek között,
- 6) felmérni az MLPA és WES együttes alkalmazásának hatékonyságát az NBCCS genetikai hátterének feltérképezésében,
- 7) NBCCS-ben szenvedő betegek kezelése, utánkövetése.

3. Anyagok és módszerek

Etikai engedély

2018-ban, az Egészségügyi Tudományos Tanács Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyását követően (engedély száma: 58523-4/2017/EKU; 19.02.2018.) egy online táblázatot, illetve adatbázist hoztunk létre és tettünk elérhetővé az NBCCS-ben szenvedő páciensekkel foglalkozó szakemberek számára.

Az összes, vizsgálatba bevont beteggel, tájékoztatást követően, beleegyező nyilatkozatot íratunk alá, a Nemzeti Népegészségügyi Központ protokoljának megfelelően a Helsinkai Nyilatkozattal összhangban. Az összes, vizsgált személy a

genetikai vizsgálatokat megelőzően és azt követően genetikai tanácsadáson vett részt a Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézetében.

Adatgyűjtés

Egy multidiszciplináris munkacsoportot hoztunk létre arc-, állcsont- és szájsebész, bőrgyógyász, radiológus és klinikai genetikus bevonásával, akik számára elérhetővé tettük az online adatgyűjtő táblázatot.

Betegek

Tizenhat magyar nemzetiségű pácienszt vontunk be a vizsgálatba, tizenegy családból, akik megfeleltek az NBCCS diagnosztikai kritériumainak.

A beválasztási szempontok meghatározásánál a Bree és kollegái által, 2011-ben publikált diagnosztikai szempontrendszert vettük alapul. Ennek megfelelően az alábbi esetekben állítottuk fel az NBCCS diagnózisát:

- (1) 1 major tünet és igazolt genetikai eltérés
- (2) 2 major tünet
- (3) 1 major és 2 minor kritérium

Mindazon betegek, akik nem teljesítették a fenti kritériumokat, kizárásra kerültek a vizsgálatból.

A vizsgálat során nem volt célunk az esetlegesen szóbagövő posztzigotikus mozaicizmus igazolása.

Radiológiai vizsgálat

Panoráma röntgen, mellkas röntgen, posztero-anterior koponya röntgen és hasi-kismedencei ultrahang minden esetben készült a vizsgált páciensekről.

Abban az esetben, ha felmerült genitourinális vagy központi idegrendszeri érintettség a tünetek, vagy a képalkotók alapján, MRI vizsgálat is készült az érintett régióról.

DNS izolálása

A begyűjtött perifériás, EDTA-s vérmintákból genomiális DNS-t izoláltunk DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Germany) Kit segítségével, a gyártó ajánlását követve.

Teljes exom szekvenálás (WES)

A DNS könyvtár készítésénél a SureSelectQXT (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) Kit-et használtuk. A szekvenálás Illumina NextSeq 550 NGS platform segítségével, 300-cycle Mid Output v2.5 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) Kit használatával történt.

Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA)

A nagyobb genetikai aberrációk felismerésére SALSA MLPA P067 PTCH1 (MRC-Holland, Netherlands) próbamixet használtunk, mely a PTCH1 gén 23-as és a 25-ös exonjaira specifikus próbákat tartalmazott (LRG_515; az 1-es és a 9-es exonokra specifikus próbákat nem tartalmazott).

Adatfeldolgozás

Az adatok gyűjtése és a megosztása a munkacsoport tagjai között a Google Sheets (Google LLC, CA, USA) segítségével történt.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a VassarStats alkalmazásával végeztük el.

4. Eredmények

A naevoid basalsejtes carcinoma szindrómába szenvedő betegek feltérképezését célzó kohorsz vizsgálatunkba 7 férfit és 9 nőt tudtunk bevonni 11 családból. Az NBCCS-el diagnosztizált betegek fenotípusos jegyei a következőképpen alakultak: a leggyakoribb tünet a szövettanilag igazolt odontogén keratociszta (13 beteg, 81 %) volt; multiplex basalsejtes carcinomák 9 betegnél (56%) voltak megfigyelhetőek; kongenitális malformációk 7 betegnél (43%) igazolódtak, nevezetesen hipertelorizmus (3 beteg, 18%), ajak-, és szájpadhasadék (3 beteg, 18%), fuzionált bordák (1 beteg, 6%) és polydactylia (1 beteg, 6%). A falx cerebri bilamelláris kalcifikációja, illetve makrocefália 4 betegnél (25%) volt felismerhető. Tenyéri és talpi pitek 3 beteg (18%) esetében segítették a diagnózis felállítását. A vizsgált páciensek felénél derült fény a családi anamnézis felvétele során, hogy rendelkeznek NBCCS-el érintett elsőfokú rokonnal.

A teljes exom szekvenálás (WES) során három új, PTCH1 (NM_000264.5) gén mutációt azonosítottunk, továbbá három rekurrens patogén variáció is detektálásra került.

Az összes WES által identifikált mutációt Sanger—szekvenálással is validáltunk.

Multiplex ligáció-függő próba amplifikációval (MLPA) végzett vizsgálatok során egy betegnél a PTCH1 gén második exonjának deléiója igazolódott. Ennél a betegnél a teljes exom szekvenálás nem talált kóros eltérést.

5. Megbeszélés

Tizenhat naevoid basalsejtes carcinoma szindrómával diagnosztizált beteg került bevonásra kohorsz vizsgálatunkba. Figyelembe véve a prevalenciára vonatkozó szakirodalmi adatokat, az általunk végzett vizsgálatba bevont beteganyag nagyjából reprezentálja a délkelet-magyarországi, tercier ellátó központ 1,5 millió lakosból álló vonzáskörzetét.

A vizsgálatunkba bevont pácienseknél felismert fenotípusos jegyek előfordulási gyakoriságát összehasonlítva, az idevonatkozó szakirodalomban leggyakrabban idézett szerzők adataival a következő konzekvenciákat vonhatjuk le: (1) vizsgálatunkban a hipertelorizmus (18%), a falx cerebri bilamelláris kalcifikációja (25%), illetve a makrocefália (25%) és a szeptális eltérések (25%) prevalenciája elmarad a korábban leírásra került arányokkal. Azonban a ajak-, és szájpadhasadék, mint a szindrómára jellemző tünet, előfordulási gyakorisága (18%) lényegesen meghaladja a korábban publikáltakat. Kettő, témába vágó tanulmány ismert, melyek ezen NBCCS-re jellemző tünet átlagosnál magasabb előfordulási arányát írta le. Ez egyik egy japán kutatás, ahol a hasadékosok aránya 9 %-os volt, míg a másik egy svájci, amiben 11%-os előfordulási gyakoriságról számolnak be. A basal sejtes carcinoma és az állcsontokat érintő keratociszták előfordulási gyakorisága, nem mutatott eltérést az összehasonlítás alapját képező korábbi vizsgálatokkal.

Abban az esetben, ha a Kimonis által bevezetett és elterjedt, sok tanulmány alapját képező diagnosztikai kritérium rendszert alkalmaztuk volna, egy beteg, a vizsgálatunkban nem teljesítette volna az NBCCS diagnózisához szükséges feltételeket. Ez a vizsgált páciens, fenotípusos jegyei alapján egy major és egy minor kritériummal bírt. Másrésztől, hét betegnél, akik tüneteik alapján teljesítették a diagnózis felállításához szükséges kritériumokat, sem a teljes exom szekvenálás (WES) sem pedig a multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA) nem talált patogenikus variánst. Érdekes módon, ezen hét páciensből, négy esetében három major kritérium is felismerésre került, amely alapján bármelyik, eddig bevezetésre került diagnosztikai rendszer alapján felállítható az NBCCS diagnózisa. Ezen eredmények egyértelműen rámutatnak az eddig bevezetésre került diagnosztikai megközelítések hiányosságaira, hátulütőire.

Eredményeinket és az alkalmazott vizsgáló eljárásokat összehasonlítottuk a szakirodalomban fellelhető kohorsz vizsgálatokéval. 2007-ben Rupprecht és kollegái publikálták, 12 év alatt szerzett ismereteiket, nyolc NBCCS-ben szenvedő beteggel

kapcsolatban. Retrospektíven elemezték a szindrómás betegek epidemiológiai, klinikai, radiológiai és szövettani leleteit. Azonban a tanulmánynak nem volt célja a szindróma genetikai aspektusainak vizsgálata. 2016-ban Rehefeldt társával szisztematikusan átnézte a Zürich regiszterben megtalálható harminc NBCCS-es beteg klinikai tüneteit, viszont nekik sem állt szándékukban a genetikai háttér vizsgálata, tisztázása. 1 évvel később hoztak nyilvánosságára egy ausztrál vizsgálatot, amely a legtöbb hasonlóságot mutatja az általunk végzett kutatással. A bevont 19 páciensnél Sanger-szekvenálással és MLPA vagy microarray-komparatív genomhibridizálással (aCGH) keresték a háttérben megbúvó mutációkat. Eljárásuk nem volt következetes, mivel a vizsgálat elején csak Sanger-szekvenálást alkalmaztak, és pusztán a későbbiekben alkalmaztak új-generációs szekvenálási (NGS) technikákat. Végül, a vizsgálatban résztvevő tizenegy páciensből hatnál (54.5%) találtak patogén PTCH1 mutációt. Ugyanebben az évben a Maastrichti Egyetem Orvosi Központja tette közzé az 1999 és 2005 közötti periódus során szerzett ismereteit. Retrospektív, multicentrikus, kohorsz vizsgálatukban az NBCCS-re jellemző karakterisztikus jegyeket magukon viselőknél genetikai tesztet végeztek. Érdeklődésük középpontjában a PTCH1 gén állt, a vizsgált mintákon Sanger-szekvenálást végeztek. Önmagában a Sanger-szekvenálás alkalmazásával az esetek 21%-ában találtak mutációt a PTCH1 génben. Ugyancsak ebben az évben tette közzé Gianferante 18, fenotípusos jegyei alapján, naevoid basalsejtes carcinoma szindrómában szenvedő pácienssel kapcsolatos eredményeit. WES és aCGH kombinálásával vizsgálták az NBCCS kialakulásában potenciálisan szerepet játszó géneket, továbbá arra is kíváncsiak voltak, hogy az SHH jelátviteli út egyéb fontos fehérjéit kódoló gének valamelyikében találnak-e eltérést. A PTCH1, PTCH2 és SUFU-n kívül összesen 155 gént vettek górcső alá. A vizsgált családok 89%-ánál találtak genetikai eltérést, azonban csak a PTCH1 gén volt érintett. a többi vizsgált gén nem mutatott eltérést.

A fentiekből következően megállapíthatjuk, hogy az NBCCS tüneteivel foglalkozó tanulmányok általában kis esetszámúak, a genetikai háttér vizsgálatát különböző

eljárásokkal végzik és az eddigi ismeretanyag alapján genotípus-fenotípus összefüggés nem állapítható meg.

Az MLPA és WES együttes alkalmazásával, kohorsz vizsgálatunkban, 3 eddig nem ismert PTCH1 mutációt tudunk azonosítani, illetve 3 rekurrens variáns is felismerésre került.

Az MLPA technika nagyméretű deléciók felismerését is lehetővé teszi. Vizsgálatunkban ezen módszer segítségével tudunk azonosítani egy, a PTCH1 gén, 2. exonját érintő deléciót az egyik páciens esetében. Ennél a betegnél a WES nem talált a PTCH1 gén vizsgálata során patogénikus variánst, mely jól mutatja, a különböző technikák kombinálásának szükségességét az NBCCS genetikai vizsgálata során.

Eredményeink továbbá azt is igazolják, hogy még az olyan nagy áteresztőképességű genetikai vizsgáló eljárásoknak is, mint a WES, megvannak a korlátai és a hiányzó örökölhetőség (“missing heritability”) komoly tényező a ritka betegségek hátterének megértésében. mint az NBCCS.

Mivel a naevoid basalsejtes carcinoma szindróma egy ritka, örökletes betegség, így a témával foglalkozó kutatóknak kis esetszámmal bíró, hosszú ideig futó kohorsz vizsgálatokból származó adatok alapján kell levonni azokat a következtetéseket, amelyek közelebb vihetnek minket a kórkép hátterének tisztázásához. Ebben a genetikai puzzle-ban az újonnan felfedezésre kerülő mutációk, alapvető jelentőséggel bírnak a szindróma megértésében, továbbá a genotípus-fenotípus összefüggés tisztázásában. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az új generációs szekvenálási technológiák, mint a teljes-genom szekvenálás, illetve az epigenetikai megközelítés, klinikai gyakorlatban való alkalmazásának elterjedése alapvető fontosságú a naevoid basalsejtes carcinoma szindróma és a hiányzó örökölhetőség hátterének megértésében.

6. Összefoglalás

- 1.) Sikeresen alkalmaztunk egy felhőalapú, mulidiszciplináris, valós idejű adatgyűjtési módszert, hogy klinikai és genetikai adatokat nyerjünk egy ritka kórképben szenvedő beteg csoportról.
- 2.) Legjobb tudomásunk szerint, Európában, ez az első olyan genetikai kohorsz vizsgálat amelyben a naevoid basalsejtes carcinoma szindrómával diagnosztizált valamennyi betegtől nyert minta, mind teljes exom szekvenáláson, mind pedig multiplex ligáció-függő próba amplifikáción is átment.
- 3.) A teljes exom szekvenálás és multiplex ligáció-függő próba amplifikáció kombinált alkalmazásával sikeresen azonosítottunk három, eddig ismeretlen PTCH1 mutációt, illetve három, rekurrens, patogén variánst.
- 4.) Az ajak-, és szájpadhasadék prevalenciája a mi tanulmányunkban mutatkozott a legmagasabbnak ez eddig megjelent vizsgálatok között.
- 5.) Eredményeink alátámasztják azt a felvetést, miszerint a naevoid basalsejtes carcinoma szindróma diagnosztizálására jelenleg alkalmazott kritérium rendszerek az esetek egy részében nem alkalmasak a diagnózis felállítására.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk a vizsgálatban résztvevő valamennyi páciensnek, hogy nyitottságukkal lehetővé tették a kutatásunkat.

Szeretném őszinte hálámat kifejezni, témavezetőm, Dr. Seres László felé, a folyamatosan támogatásért a kutatás és publikálás jelentette, sokszor rögös úton.

Témavezetőmön kívül őszinte tisztelettel és hálával tartozom Dr. Pál Margitnak és Széll Márta Professor asszonynak azért a felbecsülhetetlen támogatásért és munkáért, amivel hozzájárultak a kutatás és a publikációk elkészültéhez.

Piffkó József Professor úr az elmúlt tizennégy évben nyújtott folyamatos segítségével és támogatásával, előítéletmentes attitűdjével nagyban hozzájárult ahhoz, hogy egy olyan közösségben végezhettem munkámat, ami lehetőséget teremtett az egyéni érdekek képviselésére.

Köszönöm a kutatásban részt vevő valamennyi munkatárs segítségét és munkáját.

Kimondhatatlan hálát érzek egész családom és barátaim felé folyamatos támogatásukért, bátorításukért és türelmükért.