

A RENIN-ANGIOTENZIN-ALDOSZTERON RENDSZER GÁTLÁSÁNAK SZEREPE A DIABÉTESZES VESEKÁROSODÁSBAN: KÖZPONTBAN A RENÁLIS FIBRÓZIS

Doktori tézisek

Kőszegi Sándor Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Dr. Fekete Andrea, egyetemi docens
Hivatalos bírálók:	Dr. Fintha Attila, klinikai szakorvos Dr. Molnár Gergő Attila, egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Prohászka Zoltán, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Kökény Gábor, egyetemi docens Dr. Kovács Tibor, egyetemi tanár

Budapest, 2021

BEVEZETÉS

A DKD a végstádiumú veseelégtelenség vezető oka, melynek előfordulási gyakorisága folyamatosan növekszik világszerte. Súlyosságát jelzi, hogy a kardiovaszkuláris morbiditás számottevően magasabb a DKD-ban szenvedő betegek esetében, mint az egészséges populációban. A DKD progressziója során megfigyelhető a vese hemodinamikájának felbomlása, endotél diszfunkció, strukturális (fibrotikus) elváltozások a glomerulusban, tubulusban és/vagy interstíciumban.

Jelenleg a különböző terápiák csak lassítják a DKD progresszióját, hatékony kezelési megoldás nem létezik. Ismert, hogy a DM-ben fokozódik a RAAS aktivitása mind szisztémásan, mind a vesében lokálisan, melynek jelentős szerepe van a vesefibrózis kialakulásában. A folyamatos RAAS aktiváció következtében a vese arteriolák összehúzódnak, a külső és belső ellenállás megemelkedik, melynek következtében a glomerulusok belsejében fokozódik a kapilláris nyomás. A megemelkedett nyomás következtében proteinurea és oxidatív stressz alakul ki. A folyamat többek között endoteliális diszfunkcióhoz és a mezangiális sejtek proliferációjához vezet, melynek következtében proinflammatorikus jelátviteli útvonalak és profibrotikus folyamatok aktiválódnak. A RAAS gátlása csökkenti a vérnyomást és a proteinureát, megelőzi a vese fibrózis kialakulását és lassítja a renális funkciók romlását. A RAAS-gátlókat a RAAS kaszkádban kifejtett hatásuk szerint négy osztályba soroljuk: direkt renin inhibitorok, ACE gátlók, ARB-k és aldosteron antagonisták. A klinikai gyakorlatban elsődlegesen ACE gátlót vagy ARB-t alkalmaznak a mikroalbuminúria megjelenésekor. Azonban az úgynevezett aldosteron szökés jelensége miatt előfordulhat, hogy sem az ACE gátló sem az ARB használata nem elég hatékony a proteinúria csökkentéséhez. Az aldosteron szökés során, máig tisztázatlan módon, az AngII-től függetlenül is termelődik aldosteron, amely proinflammatorikus és profibrotikus jelátviteli utakat aktivál, tubulointersticiális fibrózist és glomeruloszklerózist

indukál, fokozva a DKD progresszióját. Az aldoszteron szökés jelensége az ACE gátlóval vagy ARB-val kezelt betegek 20-40%-ában alakul ki, és ilyen esetekben aldoszteron antagonisták használata javasolt. Az aldoszteron antagonisták monoterápiában való alkalmazása jelenleg nem szerepel az ajánlásokban, azonban egyre több klinikai vizsgálat igazolja, hogy monoterápiás használatuk javítja a DKD progresszióját.

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a rutinszerűen alkalmazott ACE-gátlók, ARB-k, illetve a spironolakton mellett, a kevesebb mellékhatással járó eplerenon is ugyanolyan hatékonyan javítja a vese strukturális és funkcionális károsodását a DKD során.

Az utóbbi években számos új terápiás lehetőséget írtak le, melyek lassítják a DKD progresszióját, azonban a betegség összetettsége okán egyik terápiás lehetőség sem tökéletes, így munkánk témája ezen terápiák további vizsgálata.

A Ph.D. munkám során vizsgáltuk, hogy a DKD patomechanizmusában hogyan befolyásolják a RAAS-gátló kezelések a fibrózis progresszióját. Hisztológiai módszerek segítségével tanulmányoztuk a strukturális és fibrotikus elváltozásokat, vizsgáltuk a renális fibrózis markereinek kvantitatív változásait, az α -SMA fehérje lokalizációját, a fibrózis indukálta növekedési faktorok expressziójának emelkedését illetve csökkenését. Emellett in vitro megfigyeltük a PDGF fehérje és mRNS mennyiségi változását hiperglikémia, illetve a különböző RAAS-gátló kezelések hatására.

CÉLKITŰZÉS

1. DKD experimentális modelljében a RAAS-gátlók hogyan befolyásolják a funkcionális paramétereket, valamint a strukturális és fibrotikus szöveti elváltozásokat?
2. A RAAS-gátlók hogyan befolyásolják a vesefibrózis folyamatát, különös tekintettel a profibrotikus faktorok (TGF, PDGF, CTGF) expresszióját DKD experimentális állatmodelljében?
3. Az alkalmazott RAAS-gátlók közül melyik a legalkalmasabb a vesefibrózis progressziójának lassítására?
4. A PDGF központi szerepének igazolása a vesefibrózis folyamatában *in vitro* proximális tubulussejt-tenyészetben, magas glükóz kezelés után. Hogyan befolyásolják a RAAS-gátlók a proximális tubulussejtek PDGF termelését?

MÓDSZEREK

Állatkísérleteinket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával (PEI/001/1731-9-2015), valamint a Magyarországon hatályban lévő állatvédelemre és állatkísérletekre vonatkozó etikai engedélyek (1998/XXVIII.) betartásával végeztük.

In vitro kísérletek

Kísérleteinkben immortalizált humán kidney 2 (HK-2) proximális tubulussejteket használtunk. A HK-2 proximális tubulussejteket 5,5 mM glükózt tartalmazó DMEM-ben (Dulbeco's Modified Eagle Medium, tenyésztettük, melyekhez 10% FBS-t, 1% penicillin/sztreptomycin antibiotikum oldatot és 1% L-glutamint adtunk. A sejteket 95%-os páratartamon, 5% CO₂ tartalmú, 37°C-os termosztátba tenyésztettük.

A kezelés alatt a HK-2 sejteket normál (5,5 mM), magas glükóz (35 mM) koncentrációjú, illetve ozmotikus kontrollként magas mannitol (5,5 mM glükóz + 29,5 mM mannitol) koncentrációjú tápfolyadékban tartottuk 24 órán át, így vizsgálva a hiperglikémia közvetlen hatását a proximális tubulusra. A magas glükóz koncentrációjú tápfolyadékban tartott sejteken 24 órán át az alábbi dózisokban RAAS-gátló kezelést alkalmaztuk:

1. ramipril: 10 μ M
2. lozartán: 10 μ M
3. spironolakton: 200 nM
4. eplerenon: 10 μ M

A kontroll sejteket DMSO vivőanyagban tartottuk (n=6 well/csoport).

A letapadt sejteket a további vizsgálatokhoz 24 vagy 48 vagy 72 óra után 0,25% tripszin-EDTA oldattal felvettük, majd azokból fehérjét izoláltunk.

Diabétesz patkánymodell

Kísérleteinket 8 hetes, ivarérett, hím, Wistar patkányokon (Toxicoop Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. Az állatokat állandó hőmérsékleten (21 °C), páratartalom (75%) és 12 óránként váltakozó megvilágítás mellett tartottuk. Az állatok a vizsgálat során korlátlanul fogyaszthattak csapvizet és általános rágesálótápot.

A T1DM-et mesterségesen indukáltuk citrátban (0,1 M; pH=4,5) oldott, egyszeri, nagy dózisú streptozotocin (STZ, 65 mg/ttkg, Sigma Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) intraperitoneális injekcióval. STZ nélküli citrát pufferrel a kontroll állatokat is kezeltük. A vércukor értékét Dcont Trend digitális vércukormérő készülékkel (77 Elektronika Kft, Budapest, Magyarország) farokvénából vett vérből mértük 72 órával az injekció beadását követően. A patkányokat akkor tekintettük cukorbetegnek, ha háromszori random mérés után a perifériás vér glükóz koncentrációja meghaladta a 15 mmol/l értéket. Az ennél alacsonyabb vércukorszint esetén kizártuk az állatokat a további kísérletekből.

A T1DM kiváltását követő 5. héten az állatokat randomizálva csoportokba osztottuk (n=7-8 patkány/csoport) és 2 hétig *per os* izotóniás sóoldatban oldott RAAS-gátlókkal kezeltük:

1. izotóniás sóoldat, mint vivőanyag (D)
2. enalapril (D+ ENA; 40 mg/ttkg/nap)
3. ramipril (D+ RAM; 10 µg/ttkg/nap)
4. lozartán (D + LOS; 20 mg/ttkg/nap)
5. spironolakton (D + SPI; 50 mg/ttkg/nap)
6. eplerenon (D + EPL; 50 mg/ttkg/nap)

A RAAS-gátlók dózisát korábbi vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján úgy választottuk, hogy antihipertenzív tulajdonságuktól függetlenül hatékonyan gátolják a RAAS egyes elemeinek expresszióját, illetve aktivitását.

Metabolikus és renális paraméterek

A szérum (glükóz, kreatinin és karbamind) és vizelet paramétereit (kreatinin clearance) a protokoll végén meghatároztuk.

Vese szövettan, immunohisztokémia és immunfluoreszcencia

A mezangiális mátrix expanziót mértékét Perjódsav - Schiff festett metszeteken értékeltük. A tubulointersticiális fibrózist Masson-féle Trichome, a kollagén felhalmozódást Sirius-red festett veséken vizsgáltuk. A fibronectin mennyiségét fibronectin immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltuk. Az α -SMA lokalizációját konfokális mikroszkóp segítségével, immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk.

qRT-PCR

Meghatároztuk a *Tgfb1*, *Pdgfb*, *Ctgf*, *Mmp2*, *Timp1*, *Rn18S*, *TGFBI*, *CTGF*, *PDGFB*, *GAPDH* és *RNI8S* mRNS expressziókat. A célgéneket *Rn18S* vagy *RNI8S* mRNS háztartási génekre korrigáltuk.

Áramlási citometria

Vizsgáltuk a HK-2 sejtek PDGF-B mennyiségét.

Western blot

Western blottal vizsgáltuk az α SMA mennyiségét és a HK-2 sejtekbe lévő PDGF fehérje mennyiségét. A kapott jelet denzitometráltuk és a Ponceau S festés által kapott összfehérje mennyiségre és belső kontrollra korrigáltuk.

Statisztikai elemzés

Az eredményeket átlag \pm SEM vagy medián és 5-95 percentilisben adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékeléséhez GraphPad Prism statisztikai programot használtunk. Normál eloszlás esetén egyutas ANOVA-t és Bonferroni Post Test tesztet használtunk. A nem parametrikus adatoknál Kruskal-Wallis ANOVA és Dunns féle

korrekciót használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

RAAS-gátlók javították a veseműködést T1DM állatmodellben

A két hetes kezelési periódus végére a vérnyomás nem változott egyik csoportban sem, ami igazolja a megfelelő, non-depresszor dózisok kiválasztását, tehát hatásukat antihipertenzív tulajdonságuktól függetlenül értékeltük. A diabéteszes csoportban a megemelkedett szérumban glükóz- és fruktózamin igazolja a DM hosszútávú fennállását. Emellett megfigyelhető a diabéteszes állatoknál a testsúlynövekedésének elmaradása, valamint a magasabb koleszterin és triglicerid szintek, melyek a lipidanyagcsere zavarára utalnak. A RAAS-gátlók közül a losartán, spironolakton és eplerenon szignifikánsan javította a koleszterin szintjét.

A vizsgálat végére a diabéteszes állatokban a DKD-ra jellemző funkcionális károsodások jelentkeztek: megemelkedett a vese/testtömeg arány és a szérumban kreatinin, karbamid szint, fokozódott a glükózürítés és a mikroalbuminúria, valamint csökkent a kreatinin-clearance. A RAAS-gátlók csökkentették a vese hipertrófiát, és a glükóz ürítést, valamint javították az urea nitrogén és kreatinin clearance paramétereket, igazolva renoprotektív hatásukat.

A RAAS-gátlók mérsékeltek a DKD-ra jellemző strukturális és fibrotikus elváltozásokat T1DM állatmodellben

A kontroll állatok veséjében egészséges vesestruktúrát figyeltünk meg, míg a DM-ben a kapilláris lumenek beszűkültek és a glomerulusok belsejében az extracelluláris mátrix mennyisége megemelkedett. A RAAS-gátlók jelentősen csökkentették az extracelluláris mátrix felhalmozódását.

A diabéteszes állatok veséjében az intersticiumban jelen lévő kollagénben dús kötőszöveti lerakódás szignifikáns mértékben felszaporodott a kontroll állatok egészséges veseszövetéhez képest. A RAAS-gátló kezelések csökkentették a kötőszöveti lerakódások mennyiségét.

A kezeletlen diabéteszes állatok veséjében megemelkedett kollagén mennyiségét a RAAS- gátlók jelentősen csökkentették.

A RAAS-gátlók - az enalapril kivételével - a fibronectin felszaporodást szignifikánsan csökkentették, azaz anti-fibrotikus hatásúnak bizonyultak.

A RAAS-gátlók között nem észleltünk különbséget a mezangiális mátrix expansió és kollagén vizsgálat (Masson-féle Trichome és Sirius-red eljárással) során, azonban az aldoszteron antagonistáknak jelentősebb volt a fibronectin szintézist gátló hatása.

A RAAS-gátlók csökkentették az α -SMA mennyiségét az T1DM állatmodellben

A kontroll állatok veséjében az α -SMA intenzitása gyenge, ezzel ellentétben a kezeletlen diabéteszes állatok vesemetszetein az α -SMA intenzitása megemelkedik az intersticiális térben. Az intenzitást minden egyes RAAS-gátló kezelés csökkentette, az intenzitás erősségét nem kvantifikáltuk, a konfokális mikroszkóp összetett beállításából adódóan. Az immunfluoreszcens eredményeket azonban western blottal végzett vizsgálattal megerősítettük: igazoltuk, hogy a diabéteszes állatok veséiben α -SMA mennyisége szignifikánsan megemelkedett az egészséges kontroll állatokhoz képest, és az összes RAAS-gátló kezelés mérsékelte az emelkedést.

A RAAS-gátlók mérsékelték a fibrózis indukálta növekedési faktorok mennyiségét T1DM állatmodellben

A növekedési faktoroknak, - úgymint TGF β , PDGF és CTGF- kulcsfontosságú szerepe van a DKD indukálta vesefibrózis patomechanizmusában.

Valós idejű reverz transzkripciós polimeráz-lánreakció segítségével megvizsgáltuk a kontroll, kezeletlen diabéteszes és RAAS-gátlókkal kezelt diabéteszes állatok TGF β , PDGF és CTGF expresszióját. Vizsgálataink megerősítették, hogy mindhárom növekedési faktor mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedik a diabéteszes állatok veséiben. A RAAS kezelés a TGF β mRNS

expressziót nem befolyásolta, a PDGF és CTGF expressziót az aldoszteron antagonisták szignifikánsan csökkentették

A RAAS-gátlók mérsékelték az extracelluláris mátrix komponensek mennyiségét az T1DM állatmodellben

A vesében található ECM proteinek lebontását és felépítését az MMP-k és inhibitoraik a TIMP-ek szabályozzák. Vizsgálatainkban a gelatináz típusú MMP2 és ennek inhibitorának, a TIMP1-nek az mRNS expresszióját vizsgáltuk.

Mind az MMP2 mind a TIMP1 mRNS expressziója megemelkedett a diabéteszes állatok veséjében. A RAAS-gátlók csökkentették az MMP2 mRNS expressziót, a ramipril kivételével. Az aldoszteron antagonisták MMP2 expresszió gátló hatása erősebb, mint az angiotenzin II receptor blokkoló lozartáné. A TIMP1 mRNS expresszióját a lozartán és eplerenon csökkentette szignifikáns mértékben.

Magas glükóz hatására a proximális tubulussejtekben megemelkedett a PDGF fehérje mennyisége

A növekedési faktorok közül a PDGF-nek kitüntetett szerepe van a DM-indukálta vesefibrózisban. A PDGF receptorral rendelkező mezenhimális sejtek (fibroblasztok, vaszkuláris simaizomsejtek) PDGF hatására aktiválódnak és sejtproliferációs jelátviteli útvonalakat indítanak be, melyek hozzájárulnak a fibrotikus folyamatok progressziójához.

Humán proximális tubulus (HK-2) sejtekben in vitro vizsgáltuk a PDGF fehérje mennyiségét, normál (5,5 mM) és magas (35 mM) glükóz koncentrációjú kezelések után. A PDGF fehérje mennyisége 24 óra után szignifikánsan megemelkedett a magas (35 mM) glükóz koncentrációjú kezelés hatására, ezért a további vizsgálatokhoz 24 órás kezelést alkalmaztunk. Az áramlási citométeres vizsgálattal kimutattuk, hogy a magas (35 mM) glükóz koncentrációval kezelt sejtekben a PDGF fehérje mennyisége szignifikánsan magasabb volt, a normál kontroll csoporthoz

viszonyítva (5,5 mM glükóz). A 35 mM izoozmotikus mannitol kezelt és a kontroll csoport PDGF fehérje mennyisége között nem volt különbség, mely igazolja a direkt glükóz hatást.

4.2.1 A RAAS-gátlók csökkentették a PDGF fehérje mennyiségét a proximális tubulussejtekben

A 24 órás magas glükóz (35 mM) kezelést követően megemelkedett a PDGF mRNS expressziója HK-2 sejtekben. Ezt az emelkedést a ramipril és a spironolakton szignifikánsan, a lozartán és eplerenon pedig tendenciálisan csökkentette.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Igazoltuk, hogy a DKD experimentális modelljében a RAAS-gátlók monoterápiás alkalmazásban javítják a vese funkcionális paramétereit; mérséklék a strukturális és fibrotikus szöveti elváltozásokat.

2. Kísérletsorozatunkban elsőként mutattuk ki, hogy a RAAS-gátlók közül az aldoszteron antagonisták, azon belül az eplerenon monoterápiás alkalmazása a legalkalmasabb - a fibronektin szintézist gátolva és a PDGF, CTGF expressziót csökkentve – a vesefibrózis progressziójának lassítására, a metabolikus paraméterek javítása mellett.

3. Kimutattuk, hogy az aldoszteron antagonisták (spironolakton és eplerenon) hatékonyabban csökkentik a profibrotikus faktor PDGF és CTGF expresszióját, mint az ACE-gátlók vagy ARB-k a DKD experimentális állatmodelljében. A TGF expresszió azonban az általunk alkalmazott kísérleti modellben nem változott a RAAS-gátló kezelések hatására.

4. *In vitro* vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a RAAS-gátlók csökkentik a hiperglikémia által megnövekedett PDGF termelését a proximális tubulussejtekben, ami hozzájárulhat az antifibrotikus hatásukhoz.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Koszegi Sandor* ; Molnar Agnes* ; Lenart Lilla ; Hodrea Judit ; Balogh Dora Bianka ; Lakat Tamas ; Szkibinszkij Edgar ; Hosszu Adam ; Sparding Nadja ; Genovese Federica et al. RAAS inhibitors directly reduce diabetes-induced renal fibrosis via growth factor inhibition JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON 597 : 1 pp. 193-209. , 17 p. (2019) **IF: 4,950**

Gellai Renata, Hodrea Judit, Lenart Lilla, Hosszu Adam, **Köszei Sandor**, Balogh Dora, Ver Agota, Banki Nora F, Fülöp Norbert, Molnar Agnes, Wagner Laszlo, Vannay Adam, Szabo J Attila, Fekete Andrea. The role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY In press: p. In press. (2016). **IF: 3,39**

Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, **Koszegi S**, Zelena D, Balogh D, Szkibinszkij E, Veres-Szekely A, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. PSYCHOPHARMACOLOGY 234: pp. 1-10. (2016). **IF: 3,54**

Hodrea Judit, Lénárt Lilla, Gellai Renáta, **Köszei Sándor**, Wagner László, Bánki N Fanni, Vér Ágota, Vannay Ádám, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea. A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 66:(4) pp. 198-203. (2013)

Bánki Nóra Fanni, **Köszei Sándor**, Wagner László, Lénárt Lilla, Varga Dóra, Gellai Renáta, Hodrea Judit, Vér Ágota, Szabó J Attila, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea. Új terápiás támpontok a diabéteszes nephropathia kezelésében: a renin–angiotenzin–aldoszteron-rendszer

és a Na/K ATP-áz szerepe. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 64:(2) pp.
70-73. (2013)

Egyéb közlemények

Hodrea Judit ; Balogh Dora B ; Hosszu Adam ; Lenart Lilla ; Besztercei Balazs ; **Koszegi Sandor** ; Sparding Nadja ; Genovese Federica ; Wagner Laszlo J ; Szabó Attila J et al. Reduced O-GlcNAcylation and tubular hypoxia contribute to the antifibrotic effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin in the diabetic kidney AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY 318 : 4 pp. F1017-F1029. (2020). IF:

Hosszu A ; Antal Z ; Lenart L ; Hodrea J ; **Koszegi S** ; Balogh DB ; Banki NF ; Wagner L ; Denes A ; Hamar P et al. Sigma1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY 28 : 1 pp. 152-165. , 14 p. (2017) **IF: 8,491**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Fekete Andreának a Ph.D. munkám során nyújtott fáradhatatlan szakmai segítségéért, tudományos szemléletformálásomért, valamint a feltétlen bizalmáért.

Köszönettel tartozom Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak a lehetőségért, hogy Ph.D. munkámat az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem.

Köszönettel tartozom az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának dolgozóinak a segítségéért, kiemelve Reusz György professzor úr, Antal Zsuzsanna, Vannay Ádám, Pap Domonkos, Kis Zoltán, valamint Veres Székely Apor önzetlen támogatását.

Hálás köszönettel tartozom a „Lendület” munkacsoport volt és jelenlegi tagjainak: Bánki Fanninak, Hodrea Juditnak, Hosszú Ádámnak, Lénárt Lillának, Balogh Dóranak, Sz kibinszkij Edgárnak és Gellai Renátának, a kísérletek tervezésében és kivitelezésében nyújtott segítségükért, köszönöm, hogy egymást támogatva, baráti légkörben dolgozhattunk a mindennapi munkánk során.

Külön köszönettel tartozom Bernáth Máriának, aki kísérletek technikai kivitelezése során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom a családomnak az önzetlen támogatásukért és véget nem értő biztatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni feleségemnek, Fehér Szilviának, fiamnak, Sebőnek, hogy biztattak és támogattak a mindennapi munka, feladatok mellett a disszertáció elkészítésében.