

Különböző proaritmia biomarkerek
összehasonlítása izolált nyúl szíveken

A PhD tézis összefoglalása

Orosz Szabolcs

Témavezető: Dr.Farkas Attila

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai

Központ

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

2015 Szeged

A TÉZISHEZ FELHASZNÁLT CIKKEK

I. The role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, I(Na) and I(CaL) in the genesis of dofetilide-induced torsades de pointes in isolated, AV-blocked rabbit hearts.

Farkas AS, Makra P, Csík N, **Orosz S**, Shattock MJ, Fülöp F, Forster T, Csanády M, Papp JG, Varró A, Farkas A.

Br J Pharmacol. 2009 Mar;156(6):920-32. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00096.x. Epub 2009 Feb 16

IF.: 5.067

II. The assessment of efficacy of proarrhythmia biomarkers in isolated rabbit hearts with attenuated repolarization reserve.

Orosz S, Sarusi A, Csík N, Papp JG, Varró A, Farkas S, Forster T, Farkas AS, Farkas A.

J Cardiovasc Pharmacol. 2014 Sep; 64(3):266-76. doi: 10.1097/FJC.000000000000116.

IF.: 2.38

A tézishoz felhasznált folyóiratok összesített impakt faktora: 7.45

1 BEVEZETÉS

1.1 A dolgozat háttere

1900 óta az Egyesült Államokban a kardiovaszkuláris megbetegedésekből származó halálesetek száma egyre nagyobb mértékű más betegségekből származó halálesetekhez képest. Mióta a tahiaritmiák a hirtelen szívhalál (SCD) gyakori okozói, a gyógyszergyárak egyre nagyobb érdeklődést mutatnak az antiaritmiás gyógyszerek fejlesztése iránt.

“Torsades de Pointes”-t (TdP) gyakran hozzák összefüggésbe olyan proaritmiát okozó gyógyszerekkel, amelyek QT nyúlást okoznak. A TdP a polimorf ventrikuláris tahikardiák egyik fajtája, amit számos direkt szívre és nem szívre ható gyógyszer is kiválthat. A TdP-nek is kifejezett patofiziológiás hatása van, mely hirtelen csökkent pumpafunkcióban, vagy hemodinamikai instabilitásban jelenkezhet szinkópát okozva esetleg átalakulhat ventrikuláris fibrillációvá hirtelen szívhalált eredményezve.

1.2 Torsades de Pointes-t előjelező biomarkerek

A TdP előfordulása ugyan ritka, mégis nagy szükség van egy igen érzékeny és specifikus TdP-előjelező biomarkerre. A meglévők közül melyek prediktív ereje megkérdőjelezhető leggyakrabban használt és legelfogadottabb a QTc intervallum.

E probléma megoldására kifejlesztettünk egy EKG szakaszokat alkalmazó módszert, melyek mérése a TdP-t megelőző nem szinusz ritmusban verő szívekből származik és a szívritmustól független beat-to-beat variabilitás paraméterein alapszik. Ezt abszolút beat-to-beat variabilitás névvel illettük. Eltértünk ez által korábbi szerzőktől, akik a beat-to-beat variabilitás paramétereket stabil szinusz ritmusban lévő szíven mérték. Az EKG abszolút beat-to-beat variabilitás paramétereit megfelelően jelzik előre a gyógyszer indukálta TdP-t és a ventrikulás fibrilláció kialakulását.

1.3 A dolgozat célja

Gyógyszerfejlesztés során a legtöbb gyógyszergyár biztonságfarmakológiai vizsgálatokat végez mielőtt gyógyszerjelöltet választana. Vizsgálatainkhoz az in vitro izolált nyúl szív modellt választottuk, mert relatíve egyszerű és nem igényel nagy mennyiségű szert. Az első vizsgálat fő célja, hogy megvizsgáljuk a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cseremechanizmus szerepét a TdP kialakulásában AV ablált izolált nyúl szívekben. Vizsgálataink során különösen az L-típusú Ca^{2+} csatorna blokkoló Verapamil antiaritmiás hatására, valamint az I_{Na} Lidokain által történő gátlására fókuszáltunk, szemben a Dofetilid indukálta TdP-ekkel izolált Langendorff-perfundált AV ablált nyúl szívekben. Valamint megpróbáltuk meghatározni, hogy a Dofetilid indukálta TdP-k előfordulása összefüggésben van-e a frekvencia korrigált QT (QTc) intervallum nyúlásával, vagy a QT intervallum beat-to-beat variabilitásával.

A második vizsgálat célja az volt, hogy megvizsgáljuk melyik TdP biomarker (QTc, QT intervallum, *szinusz vagy abszolút* beat-to-beat variabilitása) tudja megfelelő módon előidézni a proaritmia emelkedett kockázatát csökkentett repolarizációs rezerv körülményei között in vitro. A redukált repolarizációs rezervet az I_{Kr} és I_{Ks} csatorna együttes farmakológiai blokkolásával alakítottuk ki.

2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mindkét vizsgálatunkban új-zélandi fehér nőtény nyulakat használtunk. A szíveket kimetszettük és Langendorff-rendszerre függesztettük fel és retrograde módon perfundáltuk. A perfúziós nyomást állandó 80 Hgmm-en tartottuk. Az elektrokardiogramot (EKG) felvételeztük és a koronária áramást mértük.

Az AV ablált nyúl szívek esetében a jobb pitvarnál egy bemetszést ejtettünk és az AV csomót egy csipesz segítségével abláltuk. Az AV-ablációt akkor tekintettük sikeresnek, amikor a P-hullám a QRS komplexumtól eltávolodott.

2.1 Izolált AV-ablált nyúlszív-vizsgálat kísérleti protokollja

A kísérleteket úgy alakítottuk ki, hogy megvizsgálhassuk lehetséges-e a Dofetilid-indukált TdP csökkentése más szerekkel. Lidokaint és Verapamilt választottunk teszt-szerként, amelyek ismert módon csökkentik a szer-indukálta TdP-k kialakulását. A kísérleteinkhez a szíveket három csoportba osztottuk.(1. táblázat)

Csoport	n	Előkezelés (20 min)	Kezelés (30 min)
Dofetilid 100 nM	8	DMSO	DMSO+Dofetilid
Lidokain 30 µM+Dofetilid 100 nM	8	DMSO+Lidocain	DMSO+Lidocain+Dofetilid
Verapamil 750 nM+Dofetilid 100 nM	8	DMSO+Verapamil	DMSO+Verapamil+Dofetilid

1.Táblázat Az alkalmazott kísérleti protokoll izolált Langendorff-perfundált AV-ablált nyúlszíveken

2.2 Izolált csökkentett repolarizációs rezervú nyúlszív-vizsgálat kísérleti protokollja

Az első kísérleti sorozatban a nyúlszívek három csoportját hasonlítottuk össze (2.táblázat)

PERIÓDUS CSOPORT	Előkezelés (30 min)	Kezelés (30 min)
Control A (n=6)	vehicle	vehicle
Dof 15 (n=8)	vehicle	Dofetilid 15 nM
HMR + Dof 15 (n=6)	HMR	HMR + Dofetilid 15 nM

Table 2. Az első csoport kísérleti protokollja. 'Dof 15': 15 nM Dofetiliddel perfundált csoport; 'HMR + Dof 15' 460 nM HMR-1556-al és 15 nM Dofetiliddel perfundált csoport HMR: 460 nM HMR-1556, vehicle: DMSO (dimethyl sulphoxide), közös oldószere a Dofetilidnek és a HMR-1556-nak.

A kísérletek első csoportjában csak néhány szer-indukálta aritmia fordult elő ezért kialakítottunk egy második kísérletes csoportot, melyben arra törekedtünk, hogy nagyobb számú aritmiát érjünk el. Ebben az esetben 4 csoportot hasonlítottunk össze, minden csoport nyolc szívet tartalmazott. (3.táblázat).

PERIÓDUS CSOPORT	ELŐKEZELÉS (30 min)	KEZELÉS (30 min)
Control B (n=8)	vehicles	vehicles
Cat control (n=8)	Cat. + vehicle	Cat. + vehicle
Cat + Dof 50 (n=8)	Cat. + vehicle	Cat. + Dofetilid 50 nM
Cat + HMR + Dof 50 (n=8)	Cat. + HMR	Cat. + HMR + Dofetilid 50 nM

3.Táblázat. Az második csoport kísérleti protokollja. 'Cat + Dof 50': Katekolaminokkal és 50 nM Dofetiliddel perfundált csoport; 'Cat + HMR + Dof 50': Katekolaminokkal ,460 nM HMR-1556-al és 50 nM Dofetiliddel kezelt csoport. Cat.: Katekolaminok (Adrenalin 25 nM + Noradrenalin 100 nM). A „Control B” csoportban aszkorbinsavval savanyított deszt.víz (Katekolaminok oldószere) és DMSO (a Dofetilide és a HMR-1556 közös oldószere). A többi csoportban csak DMSO volt az oldószere.

Az első kísérleti csoportban arra törekedtünk, hogy a repolarizáció csökkenését jelentős mértékű aritmia kialakítása nélkül érjük el. Ezért a szelektív I_{Kr} blokkoló Dofetilidet alkalmaztuk 15 nM-os koncentrációban, ami az I_{Kr} K^+ áram hozzávetőleges 50%-os gátlását okozta és QTc megnyúlást eredményezett szignifikáns aritmiás aktivitás nélkül.

A második kísérleti csoportban arra törekedtünk, hogy megnöveljük az aritmiák számát a további repolarizáció csökkentéséért. A Dofetilid koncentrációját 50 nM-ra növeltük azért, hogy az I_{Kr} csatorna teljes gátlása bekövetkezzen. A perfúziós oldathoz Katekolaminokat adtunk a szimpatikus aktivitás jelenlétét előidézendő.

2.3 Analízis

EKG intervallumokat (QT, QTc, RR, QRS) meghatározott időpontokban mértünk mindkét vizsgálatban.

Az RR és QT intervallumok szinusz és abszolút beat-to-beat variabilitását meghatároztuk vizsgálatainkban, mindegyik analízis alapját negyven egymást követő RR intervallum képezte.

Teljes aritmia értékelést és koronária áramlás mérést végeztünk kísérleteinkben.

3 EREDMÉNYEK

3.1 AV ablált *in vitro* izolált nyúlszív modell

3.1.1 Az RR és a QTc intervallumok

Előkezelés

Az átlag RR és QTc intervallumok szignifikánsan nem különböztek egymástól a Lidokain, Verapamil és a kontroll csoportokban Dofetilid perfúzió előtt.

Kezelés

A perfúziós folyadékba történő Dofetilid adása után a Verapamil tovább növelte a Dofetilid indukált QTc nyújtást, míg a Lidokain nem befolyásolta az átlag QTc szakaszokat.

A Verapamil szignifikánsan növelte az átlag RR szakaszt amikor a Dofetilid elérte a legmagasabb koncentrációt a perfúzió alatt.

3.1.2 Az RR és a QT intervallumok abszolút variabilitása

Az abszolút variabilitás paraméterek mindegyik csoportban növekedtek a kezelési szakaszban, annak ellenére, hogy egyetlen QT vagy RR variabilitás paraméter sem mutatott

szignifikáns különbséget a Lidokain, a Verapamil és a kontroll csoport között sem a Dofetilid perfúzió előtt sem a kezelési szakasz alatt.

3.1.3 TdP előfordulások

A Dofetilid a szívek többségében (88%) TdP-t provokált. A Lidokain szignifikánsan csökkentette a Dofetilid indukálta Tdp-k előfordulását (13%), míg a Verapamil teljes mértékben kivédte az ilyen típusú aritmia kialakulását (0%).

3.1.4 Koronária áramlás

A Verapamil perfúziója a koronária flow szignifikáns növekedését okozta. A Lidokain nem befolyásolta ezt a paramétert.

3.2 Az *in vitro* izolált, csökkentett repolarizációs rezerven alapuló nyúlszív modell

3.2.1 A szinusz ritmusban lévő QTc intervallum és szívfrekvencia

Az első kísérleti csoport

Az előkezelés során a csoportok között nem volt különbség a QTc intervallumok tekintetében. A kezelés szakaszban a 10 perces Dofetilid adagolás szignifikánsan megnyújtotta a QTc szakaszt, habár a QTc szakasz nem különbözött a 'Dof 15' és a 'HMR + Dof 15' csoportokban. 10 perc Dofetilid perfúzió után e szer által indukált aritmiák nem tették lehetővé a QTc szakaszok meghatározását. A kísérletekben nem volt szignifikáns különbség a szívfrekvenciákban a csoportok között.

Második kísérleti csoport

Dofetilid adagolás előtt az alapszakaszban és az előkezelés során a QTc nem különbözött a csoportok között. A 10 perces Dofetilid adagolás a kezelési szakaszban szignifikánsan nyújtotta a QTc szakaszt, azonban a QTc nem különbözött a 'Cat + Dof 50' és a 'Cat + HMR + Dof 50' csoportokban.

3.2.2 Az aritmiák előfordulásai és megjelenési időpontjai

Az első kísérleti csoport

Az előkezelési szakasz alatt szívek szinusz ritmusban voltak, a HMR-1556 (Dofetilid nélkül) nem eredményezett aritmiákat. A 'Dof 15' és a 'HMR + Dof 15' csoportokban a

kezelési szakasz alatt a Dofetilid növekvő aritmia számot indukált, mely nem volt szignifikáns. A 'Dof 15' csoportban a Dofetilid egy szívben (13%) indukált TdP-t, és a szer nem eredményezett VF-t. Az aritmiák megjelenési időpontjaiban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között.

Második kísérleti csoport

Az elvárásnak megfelelően a Katekolaminok növelték az aritmiák előfordulását. Az előkezelési szakaszban a Katekolamin perfúzió meglehetősen sok VPB-t idézett elő, míg más típusú aritmiák (BG, salvo, VT) száma alacsony volt. A Katekolaminok legmagasabb koncentrációja esetén a HMR-1556 egyetlen egy aritmia előfordulását sem növelte, nem volt szignifikáns különbség az aritmiák előfordulásában a csoportok között. TdP és Vf nem fordult elő ebben a kísérleti szakaszban.

A kezelési szakaszban az általunk legnagyobb mennyiségben adott HMR-1556 mellett a Dofetilid és a Katekolaminok növelték a BG, a salvo, VT és VF előfordulását, de a hatás a kontrollal összevetve nem volt szignifikáns. A Dofetiliddel kezelt csoportok közül csak egy szívben alakult ki TdP. A Dofetilid, a HMR-1556 és a Katekolaminok együttes adása esetén szignifikáns növekedést tapasztaltunk a vezetési blokkban, ami egy indirekt jele a jelentősen megnyúlt repolarizációnak. Az aritmiák megjelenési időpontjaiban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között.

3.2.3 A repolarizáció időbeni inhomogenitása és a ciklushossz

Az első kísérleti csoport

Az RR és QT szakaszok STV és LTV paramtereit (a *szinusz* variabilitás paraméterei) határoztuk meg szinusz ritmusban. A *szinusz* STV QT és a *szinusz* LTV QT paraméterek sem az alapszakaszban sem az előkezelés során nem különböztek egymástól. A kezelési szakaszban az 5 perces Dofetilid perfúzió hatására a *szinusz* STV QT és a *szinusz* LTV QT értékek emelkedtek. A 'HMR + Dof 15' csoportban mind a *szinusz* STV QT és a *szinusz* LTV QT szignifikánsan emelkedett összehasonlítva a 'Dof 15' és 'Control A' csoporttal. Nem volt szignifikáns különbség egyetlen egy RR intervalum variabilitás paraméterben a csoportok között egyetlen időpontban sem.

Második kísérleti csoport

Az RR és QT szakaszok STV és LTV paramétereit szinusz és nem szinusz ritmusban is meghatároztuk.

Az EKG intervallumok szinusz variabilitás paramétereit

A QT és RR szakaszok szinusz variabilitás paramétereit szignifikáns különbséget nem mutattak a csoportok között egyetlen mért pontban sem. A Dofetilid HMR-1556-al történő 5 perces együtt adása emelte a szinusz STV QT-t és LTV QT-t a 'Cat + HMR + Dof 50' csoportban összehasonlítva a 'Cat + Dof 50' és kontroll csoport értékeivel. Habár a hatás szignifikánsnak nem volt mondható vélhetően azért mert csak a 'Cat + HMR + Dof 50' csoport 5 szívében volt meghatározható a Dofetilid indukált aritmiák előfordulása miatt.

Az EKG szakaszok abszolút beat-to-beat variabilitásai

Az RR és QT intervallumok egyetlen abszolút variabilitás paramétere sem különbözött a csoportok között az alapszakasz és az előkezelési periódusban. A kezelési szakaszban a Dofetilid és a HMR-1556 5 perces együtt adása növelte a QT és RR szakaszok abszolút variabilitás paramétereit. Hangsúlyozandó, hogy az abszolút STV QT és abszolút LTV QT paraméterek különböztek a 'Cat + Dof 50' és 'Cat + HMR + Dof 50' csoportok között; a QT intervallum abszolút variabilitás paramétereit szignifikáns növekedést mutattak a 'Cat + HMR + Dof 50' csoportban, összehasonlítva a 'Cat + Dof 50' csoport értékeivel.

3.2.4 Koronária áramlás

A kísérletek minden csoportjában kis mértékű időben csökkenő koronária flow értékeket mértünk.

4 Diszkusszió

4.1 AV ablált *in vitro* izolált nyúlszív modell

4.1.1 AV blokk által előidézett kaotikus ritmus és elektromos instabilitás

Az AV block kaotikus idioventrikuláris ritmust alakított ki a szermentes szakaszban, ami az RR és QT intervallumok beat-to-beat variabilitás emelkedését okozta. A Lidokainnal történő Na⁺ csatorna, valamint a Verapamillal történő L-típusú Ca²⁺ csatorna gátlás szignifikánsan megakadályozta a Dofetilid indukálta TdP keletkezését. Annak ellenére, hogy a Verapamil tovább emelte a Dofetilid által előidézett QT nyúlást, sem a Verapamil, sem a Lidokain nem csökkentette a Dofetilid indukálta növekedését a QT intervallum beat-to-beat

variabilitásának. Így sem a QTc növekedés sem a QT intervallum beat-to-beat variabilitásának növekedése nem volt elégséges a nyúlshívekben történő TdP kialakulásához.

4.1.2 A Verapamil és a Lidokain antitorzadogén hatásai

A I_{CaL} csatorna blokkoló Verapamil szignifikánsan növelte a QT intervallumot Dofetilid jelenlétében és megakadályozta a TdP-k kialakulását. A Verapamilről ez idáig nem írták le hogy TdP-t okozna, valójában a hosszú QT aritmiák terápiájában használatos, így a Verapamil egy relatíve biztonságos antiaritmiás szernek tekinthető. Annak ellenére, hogy a Verapamil képes az I_{Kr} csatorna gátlására, hasonló koncentráció tartományban mint a Kinidin és az Amiodaron, így megmagyarázható, hogy miért nyújtotta a mi kísérleteinkben a QT intervallumot amikor csak kis mértékű repolarizációs rezerv szűkítés volt létrehozva a Dofetilid perfúzióval.

A Lidokain csökkentette az I_{Kr} blokkoló Almokalant indukálta repolarizáció diszperzióját és az EAD-ok kialakulását in vitro nyúl purkinje rostokban. Kísérleteinkben a Verapamil és a Lidokain antiaritmiás hatásuk révén szintén okozhatták az EAD és/vagy repolarizációs diszperzió kialakulását.

4.2 Az in vitro izolált, csökkentett repolarizációs rezervon alapuló nyúlshív modell

4.2.1 A QTc téves előrejelzője a megnövekedett proaritmiás rizikónak redukált repolarizációs rezerv mellett

A Dofetilid önmagában és a HMR 1556 együtt adásával közel hasonló QTc nyúlást eredményezett, ami azt mutatja, hogy a QTc nyúlás független az I_{Ks} gátló jelenlététől. Ezen eredmények alapján a QTc szakasz nem megfelelő biomarker redukált repolarizációs körülmények közötti megnövekedett TdP hajlam azonosítására.

4.2.2 Redukált repolarizációs rezerv esetén a repolarizáció szinusz beat-to-beat variabilitás jobb előrejelzője a TdP-nek

Általános nézet, hogy a repolarizáció temporális diszperziója a proaritmiás eseményeket előre tudja jelezni. A első kísérleti csoportban a mérés során a QT beat-to-beat variabilitás intervallumok meghatározhatóak voltak szinusz ritmusban és az aritmiás aktivitás alacsonynak bizonyult a nyúlshívekben az I_{Ks} és I_{Kr} csatorna együttes farmakológiai gátlása során. A Dofetilid és a HMR 1556 együttes adása a QT szakasz beat-to-beat variabilitását szignifikánsan megemelte a kontroll csoporthoz képest és ennél még fontosabb, hogy a csak Dofetiliddel perfundált csoporthoz képest is.

A második kísérleti csoportban a Katekolaminok és az emelt Dofetilid koncentráció növelte az aritmiás aktivitást, ami megakadályozta a QT intervallumok szinusz beat-to-beat variabilitásának mérését. Így ezek a paraméterek tévesen jelezték a szerek megnövekedett proaritmiás aktivitását a szűkített repolarizációs rezervű szívekben. Ezek az eredmények azt mutatják hogy a repolarizáció szinusz beat-to-beat variabilitás paraméterei (*szinusz STV QT és LTV QT*) a TdP jobb előjelzői mint a QTc redukált repolarizációs rezerv esetén.

4.2.3 A repolarizáció abszolút beat-to-beat variabilitása a legjobb proaritmia előjelző redukált repolarizációs rezerv esetén

Gyakran keletkeztek egyszerű aritmiák a második kísérletes csoportban in vitro körülmények között, amikor a szíveket beérzékenyítettük azáltal, hogy Katekolaminokat és emelt koncentrációjú Dofetilidet kaptak. Spontán ritkán fordultak elő TdP-k, azt megelőző aritmiák nélkül. Habár az aritmiás ütések száma nem volt megfelelő előjelzője a szer indukálta TdP-k kialakulásának, új TdP biomarkerekre volt szükség, amelyek képesek ritmus függetlenül mérni akár aritmiák közben is. A szinusz repolarizáció beat-to-beat paramétere előre tudja jelezni a TdP kialakulását, de ennek a prediktív ereje nem állandó különösen akkor, amikor egy aritmiában igen gazdag szakaszt mérünk. Az újonnan kifejlesztett abszolút beat-to-beat variabilitás paraméterek sokkal jobb előjelző biomarkerei a TdP-nek. Jelen munkánkban a második kísérleti csoportban, ahol a szinusz beat-to-beat variabilitás nem volt prediktív a repolarizáció abszolút beat-to-beat variabilitás paraméterei előre tudták jelezni a Dofetilid által megnövekedett proaritmiás állapotot csökkentett repolarizációs rezerv körülmények között.

4.2.4 Az alkalmazott proaritmia biomarkerek hatékonysága a TdP előjelzésben

Összefoglalva a tapasztalainkat a TdP előjelzőkről a két hasonló Langendorff modellben azt a konklúziót tudjuk levonni, hogy a beat-to-beat variabilitás paraméterek nagyobb eséllyel tudják előrejelezni a TdP-k kialakulását. Az abszolút variabilitás paraméter alkalmazható az EKG szakaszok analízisére aritmiák közben is, így a beat-to-beat EKG analízis nem csak szinusz ritmusban végezhető el. A beat-to-beat variabilitás paraméterek érzékenyebbnek bizonyulnak, mint önmagában a QTc vagy az egyszerű aritmia analízis a TdP előjelzésére. A variabilitás paraméterek specifitását a továbbiakban még természetesen vizsgálnunk kell.

5 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr.Varró Andrásnak a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet vezetőjének a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani Dr. Farkas Attilának, témavezetőmnek, aki a kutatói munkámat irányította, valamint folyamatos segítséget nyújtott a dolgozat elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Farkas Andrásnak a PhD munkámmal kapcsolatos szakmai felügyeletért és tanácsokért.

Köszönettel tartozom Dr. Farkas Sándornak, aki nagy segítséget nyújtott tudományos gondolkodásom fejlesztésében és előadói gyakorlatom növelésében.

Szeretném megköszönni Kajtár Tímeának hozzáértő technikai segítség nyújtását.

Családomnak hálával tartozom támogatásukért, amelyet munkám során, valamint a dolgozat elkészítése alatt részemre nyújtottak.