



**A RADIOGÉN SUGÁRKÁROSODÁS VIZSGÁLATA *IN VITRO* ÉS *IN VIVO*
ÁLLATMODELLEK FELHASZNÁLÁSÁVAL**

Ph.D. Thesis

Kiscsatári Laura

Témavezető:

Prof. Dr. Kahán Zsuzsanna, D.Sc.

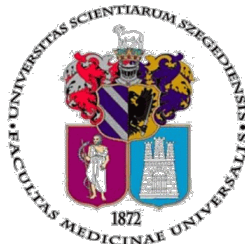
Onkoterápiás Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged

2016



KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

- I. Laura Kiscsatári, Zoltán Varga, Andrew V Schally, Renáta Gáspár, Péter Ferdinandy, Gabriella Fábián, Zsuzsanna Kahán, Anikó Görbe
The protective effect of GHRH agonists against radiation-induced damage of neonatal rat cardiac myocytes
Pharmacol Res. 2016, **111**:859-866.
IF: **4.816**

- II. Laura Kiscsatári, Márta Sárközy, Bence Kővári, Zoltán Varga, Nikolett Morvay, István Leprán, Hargita Hegyesi, Gabriella Fábián, Bálint Cserni, Gábor Cserni, Tamás Csont, Zsuzsanna Kahán
High dose radiation-induced heart damage in a rat model
IN VIVO, 2016, **30**:623-632.
IF: **0.832**

A dolgozat alapjául szolgáló közvetlen közlemények összesített impakt faktora: 5,648

PUBLIKÁLT TÁRSSZERZŐS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

- I. Fekete G, Újhidy D, Együd Z, Kiscsatári L, Marosi G, Kahán Z, Varga Z: **Partial breast radiotherapy with simple teletherapy techniques**. Med Dosim. 2015, **40**: 290-295.
IF: **1.007**

- II. Kiscsatári L, Végváry Z, Nagy N, Széll M, Haracska L, Kahán Z: **Kifejezett sugárkárosodás régiós emlőbesugárzás után**. Magyar Belorvosi Archívum 2015, **68**: 184-188.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK LISTÁJA

- I. Kiscsatári L, Varga Z, Görbe A, Morvay N, Kővári B, Ferdinandy P, Leprán I, Kahán Zs: ***In vitro* és *in vivo* állatmodellek a szív radiogén sugárkárosodásának vizsgálatára.** Magyar Onkológia 2013, **57**: (Klnsz.) 114–135.
- II. Varga Z, Kiscsatári L, Marosi G, Varga L, Kelemen Gy, Kahán Zs: **Egyedüli tumorágy besugárzás teleterápiával.** Magyar Onkológia 2013, **57**: (Klnsz.) 114–135.
- III. Kiscsatári L, Varga Z, Gorbe A, Morvay N, Kovari B, LepranI , Ferdinandy P, Kahan Z: **P689 Examination of radiation-induced heart damage using *in vitro* and *in vivo* animal models.** Cardiovascular Research 2014, **103**: S102–S141.
- IV. Kiscsatári L, Varga Z, Gáspár R, Görbe A, Ferdinandy P, Gardi J, Kahán Z: **A növekedési hormon-fel szabadító hormon (GHRH) receptorok potenciális szerepe a radiogén szív károsodás esetén.** Magyar Onkológia 2015, **59**: (Klnsz.) 169-170.

Összes impakt faktor: 6,655

BEVEZETÉS

A besugárzás okozta sugárkárosodás kialakulása és klinikai jelentősége

A sugárterápia gyógyító vagy palliatív céllal történő felhasználása fontos kezelési módja a daganatos betegek gyógyításának. A sugárterápia célja a tumoros sejtek elpusztítása, azonban sajnos számolnunk kell a potenciális mellékhatások megjelenésével. Számos sugárterápián átesett beteg szenved a súlyos, akutan kialakuló, vagy kései mellékhatásoktól, melyek rontják életminőségüket, növelik az egészségügyi kiadásokat, és néhány esetben akár halálos kimenetelűvé is válhatnak.

A mellékhatások egyik legsúlyosabbika a szívkárosodás, amely megelőzésére nagy hangsúlyt fektetnek az onkológiai gyakorlatban. A szív sugárexpozíciója kardiovaszkuláris betegségek, mint miokardiális infarktus vagy szívizom károsodás kialakulásához vezethet. A sugárzás okozta progresszív szívkárosodás klinikai jelentősége nagy, különösen a hosszan túlélő emlőrákos és limfómás betegek esetében. A sugárkárosodására utaló jelek a kezelés után mintegy 10 évvel, a betegek hosszú távú megfigyelése során észlelhetők. A radiogén szívkárosodás mértéke függ a besugárzott volumentől, a teljes dózistól, a frakció dózistól, a többi szerv károsodásától, az egyéb kardiotoxikus kezelések alkalmazásától, az egyéni sugárérzékenységtől és az életkortól. Habár a modern besugárzás tervezés és kivitelezés révén szignifikánsan javul a szív és más egészséges szerv védelme, néhány esetben a szív teljes egészét, vagy egy részét jelentős dózis éri, amely később ischaemiás szívbetegség, pangásos szívelégtelenség, ingerületvezetési hiba vagy billentyű abnormalitás megjelenését eredményezheti.

A besugárzás okozta szívbetegség patomechanizmusa

Az ionizáló sugárzás káros lehet a szív valamennyi struktúrájára, és vezethet patofiziológiai mechanizmusok, mikro- és makrovaszkuláris károsodások kialakulásához.

A korai események közül az endoteliális sejtek sérülése, elvesztése gyulladással válaszreakciók kialakulását indukálja, mely végül vaszkuláris károsodáshoz vezet. A mikrovaszkulátúra károsodása (kapilláris sűrűség csökkenése), cardiomyocyták degenerációjával, pusztulásával, fibrózissal, diasztolés diszfunkcióval és szívelégtelenséggel társul. A makrovaszkulátúra károsodása atherosclerosis-t, koszorúér-szűkületet okoz, amely később miokardiális infarktus kialakulásához vezethet. A koronáriák radiogén károsodása genetikai és külső tényezők hatására felerősödhet.

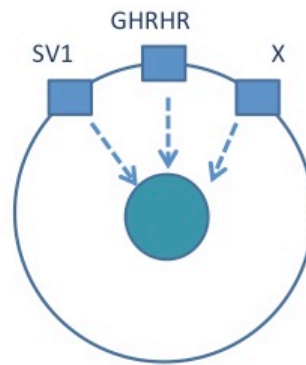
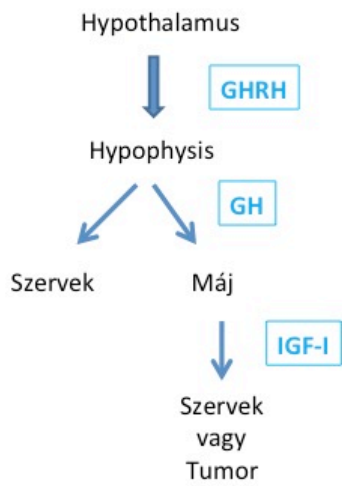
A radiogén szöveti károsodás funkcionális romlással járhat. A szívelégtelenséget általában

megelőzi, mintegy válaszul a megnövekedett munkaterhelésre a kamrai hypertrófia. A szív megnagyobbodását a szívműködés méretének növekedése és a kamra falainak megvastagodása jellemzi. Ez a kezdeti változás adaptív válasz a szívműködés zavartalan fenntartására; ha ez a tartós stressz állapot nem rendeződik, szívelégtelenség alakul ki.

A növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH) szerepe a szívműködés károsodása során

A növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH) a hipotalamuszban szekretálódik, szabályozva a növekedési hormon felszabadulását a hipofízis elülső lebenyében. A neuroendokrin tengelyen közvetett, autokrin és parakrin mechanizmusok útján pedig közvetlen szerepet játszik az egészséges sejtek és kóros esetben a tumorok növekedésében. Korábbi tanulmányokban kimutatták a GHRH és receptora, a GHRH receptor jelenlétét a perifériás szövetekben, beleértve a szívet is. Számos közlemény bizonyítja, hogy a GHRH közvetlenül, a GH/IGF-I rendszertől független módon, különféle javító mechanizmusok révén vehet részt a szívműködés stressz válaszában. A GHRH agonista analógjainak *in vivo* patkány modellben történt alkalmazása az infarktus méretét hatékonyan csökkentette, így felmerült, hogy ezek alkalmasak lehetnek a besugárzás okozta szívkárosodás kialakulásának megelőzésében vagy mértékének csökkentésében.

A sugárterhelés okozta szívkárosodás előrejelzésére, mechanizmusainak és megelőzésének kísérletes és klinikai kutatására nagy igény van. Az *in vitro* modellek gyors és egyszerű lehetőséget teremtenek a sejtkárosodás pathomechanizmusának vizsgálatára, illetve potenciális protektív molekulák szűrővizsgálatára. Az *in vivo* állatmodellek komplex rendszerként szolgálhatnak különböző biokémiai, genetikai, funkcionális vagy morfológiai végpontok vizsgálatára.



Autokrin és parakrin GHRH hatás

A Growth Hormon Releasing Hormon (GHRH) és GHRH agonisták stimuláló hatásának lehetséges mechanizmusai egészséges szervekben és daganatokban.

CÉLKITŰZÉS

A tanulmány célkitűzése megbízható *in vitro* és *in vivo* állatmodell kidolgozása volt, amely alkalmas a radiogén szívkárosodás mechanizmusának és potenciális sugárvédő anyagok hatásának tanulmányozására.

***In vitro* kísérletek célkitűzései**

- I. Megfelelő *in vitro* modell kifejlesztése besugárzás okozta szívkárosodás vizsgálatára újszülött patkány szívizomsejt kultúrán
- II. A GHRH receptor jelenlétének vizsgálata az *in vitro* újszülött patkány szívizomsejt kultúrákon
- III. A GHRH agonistáinak (JI-34, MR-356) hatásának tesztelése nem besugárzott és besugárzott tenyészeteken

***In vivo* kísérletek célkitűzései**

- I. Olyan *in vivo* modell kifejlesztése, melynek segítségével átfogóan tanulmányozható a szelektív szív táji besugárzás utáni szívizomkárosodás
- II. Szívkárosodást előrejelző korai keringő markerek detektálása: gyulladáshoz köthető mediátorok jelenlétének vizsgálata
- III. A szív funkcionális és morfológiai változásainak tanulmányozása, echocardiográfiás és patológiai vizsgálatokkal

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

***In vitro* kísérletek**

Az *in vitro* kísérletekben újszülött patkányokból szívizomsejteket izoláltunk, és tenyésztettünk. A 24 órás tenyészeteket különböző dózisu (5, 10, 15, 20 Gy) sugárzásnak tettük ki, majd a hatást különböző időtartamú (0, 24, 48, 72, 96, 120 h) latencia idő után vizsgáltuk. A megfelelő besugárzási dózis és latencia idő kiválasztása után a tenyészeteket különböző koncentrációkban (1, 10, 50, 100 és 500 nM) elsőként szintetikus humán GHRH (hGHRH)-val, majd a GHRH JI-34 és MR-356 agonista analógjaival kezeltük. A sejteket 1%-os főtális marha szérumot (FBS) tartalmazó médiumban tenyésztettük, de a kísérleteket szérummentes körülmények mellett is elvégeztük. A sugárhatás toxicitásának mértékét calcein fluoreszcens viabilitás teszttel értékeltük. A sejtek proliferációs képességét 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) teszttel vizsgáltuk. Western blot analízissel detektáltuk a GHRH receptorok jelenlétét, és az ERK és AKT kinázok foszforilációs arányának kifejeződését nem besugárzott és besugárzott kultúrákon. A sejtek szuperoxid és reaktív oxigéngyök (ROS) tartalmát dihidroetídium (DHE) és 2', 7'- dichlorofluorescein-diacetát (DCFH-DA) festéssel mértük. A toxicitási eredmények kiértékelésénél egy utas variancia analízist (ANOVA) követően Fisher próbát vagy legkisebb szignifikáns differencia (LSD) post-hoc tesztet vagy Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. A Western blot eredmények összehasonlítására két utas variancia analízist (ANOVA) alkalmaztunk.

***In vivo* kísérletek**

Kísérleteinkben felnőtt hím Sprague-Dawley patkányokat 2 csoportra osztottunk. Az első csoportot nem kezeltük, a második csoportot 50 Gy egyszeri dózissal szelektív szív táji besugárzásban részesítettük altatásban. A besugárzást követően az állatokat 6 hónapon keresztül terveztük folyamatosan monitorozni (súlymérés, vitális funkciók, vérvételek), de az utolsó kísérletben állapotromlás miatt a tervezettnél hamarabb, 19 hét után befejeztük a vizsgálatot. Echocardiográfiával 0, 12 és 19 hét elteltével a besugárzás után a szív funkcionális változásait tanulmányoztuk. A vérben keringő citokinek (GDF-15, TGF-beta1) szintjét (a besugárzás előtt, illetve 3, 8, 12 és 26 héttel a besugárzás után) ELISA technika segítségével határoztuk meg. A megfigyelési időszak elteltével az állatokat leöltük, szerveiket megvizsgáltuk, és szívüket Langendorff perfúziós rendszerrel átmostuk illetve előkészítettük a patológiai vizsgálatokhoz. Szövetani és morfológiai vizsgálatokhoz 5 µm paraffinba ágyazott formalinban fixált metszeteket vizsgáltunk a bal kamra subvalvuláris régiójából,

melyeket hematoxin-eosin és picosirius red festékekkel festettünk a besugárzás utáni fibrózis detektálásához. A szív különböző struktúráinak (bal kamra, septum, jobb kamra) értékelését számítógépes képanalízis segítségével végeztük. A statisztikai elemzéshez a csoportokat két utas varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. A $p < 0.05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

***In vitro* kísérletek**

Ahhoz, hogy optimalizáljuk a kísérleti körülményeket, megelőző méréseket követően meghatároztuk az újszülött szívizomsejt kultúrák megfelelő besugárzási dózist; az 50%-os sejtvészesség eléréséhez a 10 Gy dózis és 48 h latencia idő volt alkalmas. Ezt a kezelési protokollt alkalmaztuk minden további kísérletben.

Az életképesség tesztekben, 1% FBS-t tartalmazó közegben a hGHRH nem befolyásolta a sejtek túlélését a kontrollhoz viszonyítva. A hGHRH 50 nM koncentrációban a besugárzott és nem besugárzott sejteknél kis mértékben stimulálta sejtproliferációt. Nem besugárzott kultúrákhoz adva a GHRH agonista JI-34 és MR-356 1% FBS-t és szérumot nem tartalmazó környezetben egyaránt nem befolyásolta a sejtek túlélését. Besugárzás után, 1% FBS-t tartalmazó környezetben a JI-34 10 nM és 100 nM koncentrációban adva növelte a sejtek életképességét, illetve az MR-356 500 nM koncentrációban mutatott védő hatást a túlélésben a kontroll csoporthoz képest. A JI-34 anti-proliferációs hatást nem besugárzott sejtek esetében 50 nM-os koncentrációban, besugárzott sejtek esetében 1-50 nM-os koncentrációban adva mutatott. Az MR-356 nem volt hatással a sejtek proliferációjára egyik esetben sem.

Western blot analízissel 52 kDa hypophysis-specifikus GHRH receptornak megfelelő fehérje-izoforma volt kimutatható a be nem sugárzott és besugárzott újszülött patkány szívizomsejteken. A besugárzás után 48 órával a receptor kifejeződése csökkent. A sejtek JI-34 kezelése a GHRH receptor kifejeződésére nem volt hatással.

Az Akt és ERK fehérjék foszforilációs aránya jelentősen megemelkedett a 10 Gy besugárzáson átesett kultúrákon a kontroll csoporthoz képest, amelyet mindkét esetben csökkentett a JI-34 kezelés 48 órával a besugárzás után mérve.

A 10 Gy dózis leadása után 48 órával megemelkedett szuperoxid és ROS szintet sikeresen csökkentette a 10 nM JI-34 és 500 nM MR-356 kezelés.

***In vivo* kísérletek**

Első kísérleteinkben célul tűztük ki az optimális besugárzási dózis és megfigyelési időszak hosszának meghatározását. Végso vizsgálatunkban az egyszeri 50 Gy dózist és a 6 hónapos követési időtartamot választottuk a kitűzött végpontok vizsgálatához.

A besugárzott állatok súlyban, fejlődésben elmaradtak nem besugárzott társaiktól. Három hónap után a besugárzott állatok között minimális (2 állat) elhullás volt tapasztalható. A besugárzott állatok gyenge általános állapota miatt a tervezettnél hamarabb, 19 hét megfigyelés után a végso kísérletet befejeztük.

Célunk volt, hogy olyan korai markereket azonosítsunk a vérben, amelyek előre jelezhetik a besugárzás káros késői hatásait. Két különböző kísérletben egybehangozóan a besugárzást követő 3., 12. és 26. heti vérmintákban jelentős GDF-15 szint emelkedést észleltünk, mely a radiogén stresszre adott korai jel (3. hét) volt, illetve a szívelégtelenség kialakulását (12., 26. hét) erősítette meg. A keringő TGF- β 1 szint emelkedése a fibrózis kialakulását jelzi előre. Kísérletünkben 12 héttel a besugárzás után észleltünk jelentős különbséget a besugárzott és kontroll állatok TGF- β 1 szintje között, melyet a később kimutatott fibrózis prediktorának tekintünk.

A besugárzott csoportban a megfigyelési időszak 12. hetétől egyre romló balkamrai funkciók mellett hipertrófiát észleltünk, mellyel aritmia társult. A fizioiógias szívritmus csökkenés a besugárzott állatoknál elmaradt. A 12. héttől fokozódó diasztolés diszfunkciót is tapasztaltunk.

Az állatok leölését követően, a mellkas felnyitásakor minden besugárzott állatnál kiterjedt mellkasi folyadékgyülemet észleltünk. Megtekintéssel, majd a mellkasi szervek patológiai analízise során makroszkópos elváltozásokat nem észleltünk, de a besugárzott állatok szervei kisebb súlyúak voltak. Az, hogy a tüdőn nem jelentkeztek kimutatható változások, alátámasztja a valóban szelektív szív besugárzást. A Picrosirius red festést követően számítógépes képanalízissel kifejezett fibrózist mértünk a szív valamennyi vizsgált struktúrájában, ugyanakkor tipikus érkárosodásra utaló jeleket nem tudtunk azonosítani.

ÚJ EREDMÉNYEK

Elsőként figyeltük meg, hogy a GHRH agonista analógjai a tanulmányozott újszülött szívizomsejt kultúrában csökkentik a besugárzás okozta sejtvesztést. A hatásmechanizmus részeként igazoltuk a foszforilált ERK és AKT fehérjék arányának megváltozását, és a

sugárhatás-indukálta szuperoxid képződés csökkentését. Ez alapján megalapozottnak látjuk a GHRH agonisták a radiogén szívkárosodás kivédésére *in vivo* történő tanulmányozását.

A radiogén szívkárosodás átfogó tanulmányozására *in vivo* patkánymodellt dolgoztunk ki. Vizsgálataink olyan biokémiai, funkcionális és patológiai tényezőket azonosítottak, melyek megbízható végpontként, illetve a sugárkárosodás prediktív faktoraként szolgálnak további vizsgálatokban. A kísérletekben gyűjtött szövetminták jövőbeni vizsgálata a sugárkárosodás pathomechanizmusának további elemzését szolgálják. A modellt alkalmasnak látjuk a szívkárosodás kivédését szolgáló lehetséges molekulák részletes tesztelésére.

KÖVETKEZTETÉSEK

In vitro kísérleteink arra utalnak, hogy a GHRH és receptora szerepet játszanak a szívműködés radiogén stresszre adott válaszában. A GHRH agonista analógjai védő hatást gyakorolnak a szívműködésre a radiogén károsodás folyamatában, ezért megalapozottnak látjuk a GHRH agonisták ilyen irányú *in vivo* vizsgálatát is. A bemutatott *in vitro* modellt alkalmasnak tartjuk egyéb radioprotektív anyagok tesztelésére.

In vivo patkány modellünk a bemutatott reprodukálható szívkárosodás végpontok tanulmányozásával alkalmasnak látszik jövőbeni sugárbiológiai vizsgálatok végzésére. A korai (keringő gyulladáscsökkentő citokinek), illetve középtávú (szív funkcionális paraméterek) szívkárosodási prediktorok mérésével protektív anyagok tesztelése lehetséges, míg ha átfogó analízisre, vagy a szív interstitialis fibrózisának mérésére van szükség, akkor elengedhetetlen a dózis csökkentése és/vagy a megfigyelési idő kinyújtása. Az ismertetett patkány modellt sugárvédő anyagok (beleértve a GHRH agonistákat is) átfogó tesztelésére is javasoljuk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egy doktori értekezés megszületése sohasem a kezdő kutató egyedüli érdeme.

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat arra, hogy köszönetemet és tiszteletemet fejezhessem ki mindazoknak, akik hozzájárultak ennek a kutatásnak létrejöttéhez.

Elsőként hálámat és tiszteletemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, **Prof. Dr. Kahán Zsuzsannának**, aki mérhetetlen jelentőségű szakmai és személyes támogatásával, mindvégig rendkívüli segítőkészséggel, türelemmel, szakmai tudásanyaggal, biztos hátteret teremtett tudományos munkámhoz, fejlődésemhez, a kutatás, számos publikáció és eme disszertáció létrejöttéhez.

Hálával tartozom **Prof. Dr. Andrew V. Schallynek**, akinek GHRH témájával és felbecsülhetetlen anyagaival dolgozhattam. A kezdetektől fogva nélkülözhetetlen szakmai javaslatai, személyes iránymutatásai és tanácsai nélkül jelen munka nem készülhetett volna el.

Dr. Fábíán Gabriellának és **Dr. Varga Zoltánnak**, mérhetetlenül hálás vagyok, hiszen a magas színvonalú precíz szakmai munkájuk, önzetlen támogatásuk, mindig segítők, emberi hozzáállásuk nélkül ez a kutatás nem állhatott volna össze. Köszönöm, hogy soha ki nem fogyó türelmetekkel mindig, mindenkor mellettem álltatok!

Köszönöm **Prof. Dr. Dux Lászlónak** a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Intézet vezetőjének, **Dr. Görbe Anikó** és **Dr. Csont Tamás** egyetemi docenseknek, **Dr. Sárközy Mártánnak**, hogy kiváló környezetet és lehetőséget biztosítottak számomra a kutatás kísérletes részeinek megvalósításához, amelyben mindvégig szilárdan támogattak. Hálás vagyok **Bodor László** és **Motzwickler Róbert** állatgondozóknak az *in vivo* kísérletek alatt nyújtott segítségéért.

Hálás köszönetem **Prof. Dr. Cserni Gábornak** és **Dr. Kővári Bencének** a patológiai vizsgálatok precíz, pontos elvégzéséért és kiértékeléséért, valamint **Cserni Bálintnak** az értékeléshez szükséges nélkülözhetetlen számítógépes program kifejlesztéséért.

Köszönöm **Leprán István Professzor Úrnak** végig az *in vivo* projekt alatt nyújtott hasznos szakmai tanácsait, gyakorlati útmutatásait. Köszönöm **Dr. Morvay Nikolett** PhD hallgatónak a megelőző kísérletekben végzett munkáját. Hálás köszönetem **Deákné Tóth Anikónak** az *in vivo* kísérletekben nyújtott segítségéért, munkájáért.

Hálás vagyok **Dr. Hegyesi Hargitának** nélkülözhetetlen szakmai tanácsaiért és kísérletes munkájáért a GDF-15 és TGF-beta mérések alkalmával.

Köszönöm a **Szegedi Tudományegyetem Onkoterápiás Klinika** valamennyi dolgozójának a felbecsülhetetlen értékű szakmai segítséget, támogatást, akik időt nem sajnálva közreműködtek, mind a kísérletek lebonyolításában, mind egyéb Klinikai munkafolyamat elsajátításában.

Köszönöm a **Szegedi Tudományegyetem Biokémiai Intézet** valamennyi munkatársának, a szakmai támogatás mellett a baráti légkört, amit teremtettek, befogadtak és hogy szinte saját PhD hallgatójukként tekintettek rám.

Hálával tartozom drága **barátaimnak**, akik a jó és nehéz időkben is mellettem álltak, és soha ki nem fogyó jókedvvel, és biztatással segítették eltölteni ezt az időszakot. **PhD társaimnak** köszönöm, hogy összetartó, barátságos légkört teremtettek a Klinikán.

Végül, de ami a legfontosabb, szeretném megköszönni a **Nagymamámnak, Szüleimnek** és **Testvéremnek** a feltétel nélküli szeretetet, gondoskodást és végtelen támogatást, nemcsak az egyetemi és PhD éveim alatt, hanem egész életemben; hálámra nincsenek szavak. A disszertációmát Nekik ajánlom.

A tudományos munkát támogatta: a TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 és a TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012.