

**A gasztrointesztinális nyálkahártya védelme új NSAID konjugátumokkal,
terápiás hatékonysággal és csökkentett mellékhatásokkal**

Dr. Ugocsi Melinda

Ph.D. Thesis

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Sebészeti Műtéttani Intézet

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Varga Gabriella, PhD

2024

Szeged

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

I. Varga G, Lajkó N, **Ugocsai M**, Érces D, Horváth G, Tóth G, Boros M, Ghyczy M. Reduced mucosal side-effects of acetylsalicylic acid after conjugation with tris-hydroxymethyl-aminomethane. Synthesis and biological of a new anti-inflammatory compound. Eur J Pharmacol. 2016;781:181-9. **Q2; IF: 3.125**

II. Varga G, **Ugocsai M**, Hartmann P, Lajkó N, Molnár R, Szűcs S, Jász DK, Érces D, Ghyczy M, Tóth G, Boros M. Acetylsalicylic acid-tris-hydroxymethyl-aminomethane reduces colon mucosal damage without causing gastric side effects in a rat model of colitis.

Inflammopharmacology 2018;26(1):261-271. **Q2; IF: 2.985**

III. **Ugocsai M**, Bársony A, Varga R A, Gajda Á, Vida N, Lajkó N, Rónaszéki B, Tóth G, Boros M, Érces D, Varga G. Conjugation with Tris decreases the risk of ketoprofen-induced mucosal damage and reduces inflammation-associated methane production in a rat model of colitis. Pharmaceutics. 2023;15(9):2329. **Q1; IF: 5.8**

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK

I. Lajkó N, Varga G, **Ugocsai M**, Mészáros A, Tuboly E, Érces D, Ghyczy M, Tóth G, Boros M. Acetilszalícilsav-aminoalkohol konjugátum mikrokeringésre kifejtett hatása kísérletes colitisben. Érbetegségek, XX(1): 39. 2014.

II. Varga G, Lajkó N, **Ugocsai M**, Ghyczy M, Tóth G, Boros M. Nem-szteroid gyulladásgátlók és származékaik mikrokeringési hatásai a gasztrointesztinális traktusban. Érbetegségek, XX(1): 46-47. 2014.

III. **Ugocsai M**, Lajkó N, Strifler G, Ghyczy M, Boros M, Varga G. L- α -gliceril-foszforilkolin védőhatása acetilszalícilsav által okozott gastritisben. Magy. Seb. 68(3): 115-116. 2015.

IV. **Ugocsai M**, Varga G, Lajkó N, Strifler G, Ghyczy M, Boros M. Protective effects of L-alpha-glycerylphosphorylcholine treatment on acetylsalicylic acid induced gastric mucosal injury. European Surgical Research 2015;55(suppl 1):22

A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ LEKTORÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

I. Bari G, Szűcs S, Érces D, **Ugocsai M**, Bozso N, Balog D, Boros M, Varga G. A cardiogen sokk modellezése pericardialis tamponaddal [Experimental model for cardiogenic shock with pericardial tamponade]. Magy Seb. 2017. 70:297–302 **Q4; IF: 0**

II. Szűcs S, Bari G, **Ugocsai M**, Lashkarivand RA, Lajkó N, Mohácsi A, Szabó A, Kaszaki J, Boros M, Érces D, Varga G. Detection of intestinal tissue perfusion by real-time breath methane analysis in rat and pig models of mesenteric circulatory distress. Crit Care Med 2019. **Q1; IF: 6.6**

1. BEVEZETÉS

1.1. A gyulladás folyamata

A gyulladás komplex biológiai válaszreakcióját a szervezetre káros ingerek, például fizikai trauma, különféle kémiai anyagok, fertőzések válthatják ki. E válasz elsődleges célja a káros anyagok eliminálása, a sérült szövetek regenerálása, valamint a szövetek integritásának és funkciójának helyreállítása (Kumar et al, 2004). A folyamat központi eleme az arachidonsav (AA) felszabadulása a membrán foszfolipidjeiből, amelyet a foszfolipáz A₂ enzim közvetít. Az AA a gyulladásos kaszkád ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) útvonalainak kulcsfontosságú előanyaga. Röviden összefoglalva, a LOX útvonal leukotriének szintéziséhez vezet, míg a COX-1 enzim prosztaglandinokat termel, amelyek elengedhetetlenek az élettani sejtfunkciókhoz, többek között a vesék és a gasztrointesztinális (GI) rendszer homeosztázisához. A COX-2 fokozott expressziója gyulladásos állapotok során a prosztanoidok termelésének növekedésével jár, és különböző kórállapotokban is szerepet játszik, például rosszindulatú, rákos megbetegedésekkel és neurodegeneratív rendellenességekkel is összefüggésbe hozható (Murakami et al, 2017, Vane et al., 1998).

Az akut gyulladásos válaszreakció a keringési rendszer, ebben kiemelten a mikrokeringési-mikrovaszkuláris rendszer változásaival jellemezhető. A hiperémia és a fokozott érfal permeabilitás elősegíti a leukociták migrációját, a plazmafehérjék és folyadék extravazációját a környező szövetekbe. Amennyiben a gyulladásos állapot tartósan fennáll, krónikus gyulladás alakulhat ki, amelyet a sejtes aktiváció tartós jelenléte, makrofág infiltráció és szöveti károsodás jellemez (Treppels et al., 2006, Feletou et al., 2006). A gyulladásnak tehát jótékony és káros hatásai is lehetnek a szövetek és szervek működésére, amelyek a gyulladás okától, típusától és súlyosságától függenek. Az akut gyulladás, mint például a sebgyógyulás, jellemzően hegesedéshez és szöveti átépüléshez, remodellációhoz, regenerációhoz vezet (Maher et al., 2011, Murata et al., 2018). Ebben a folyamatban az aktivált makrofágok kulcsszerepet játszanak. Ezzel szemben a krónikus, hosszan tartó gyulladás visszafordíthatatlan szöveti károsodáshoz és kóros fibrózishoz vezethet (Oishi et al., 2018). A hisztotoxicitást számos mechanizmus vezérli, beleértve a polimorfonukleáris (PMN) leukocita-endothelin kölcsönhatásokat, valamint az oxidatív-proteolitikus útvonalakat (Dallegrí et al., 1997).

1.2. Gyulladás a gasztrointesztinális rendszerben

A GI területen kialakuló gyulladás megfelelő terápiájának kiválasztása jelentős kihívást jelent, mivel az orálisan alkalmazható gyógyszerek felszívódása gyakran akadályozott, ezen felül a

gyógyszerek kémiai tulajdonságai is befolyásolják a sérült GI szövetek kezelésének hatékonyságát (Barros et al., 2019, Parikh et al., 2019). A gasztritisz fekélyek kialakulásához vezethet (Sipponen et al., 2015), jellemzően felületes mononukleáris gyulladással kezdődik, amelyet akut PMN infiltráció kísér. Az állapot előrehaladását a normál mukóza mirigyek pusztulása jellemzi, a funkcionális mirigy- és epithelsejtek vesztese atrofikus gasztritiszhez vezet (Sipponen et al., 2015). Ez a folyamat gyakran *Helicobacter pylori* fertőzéssel hozható összefüggésbe és jelentős kockázati tényezője a gyomor rosszindulatú tumoros elváltozásának is (Lahner et al., 2014, Lahner et al., 2009, Kaptan et al., 2000). A gyulladással járó bélbetegségek (IBD), mint a Crohn-betegség és a colitis ulcerosa a GI traktus területén kialakuló kórfolyamatok, amelyeket az immunrendszer diszregulációja, és szöveti károsodás kialakulása, valamint a nyálkahártya barrier funkciójának felborulása jellemez. Az IBD patogenezisében először fokozódik a bél permeabilitása, amely a nyálkahártya barrier funkcionális zavarához és dysbiosis kialakulásához vezet. A helyi és szisztémás immunválasz (az effektor sejtek toborzása és a humorális mediátorok felszabadulása) tovább súlyosbítja a mukóza barrier károsodását (Appleyard et al. 2002; Hatoum et al. 2003; Hatoum and Binion 2005). A mitokondriális oxidatív foszforiláció (OxPhos) zavara kritikus szerepet játszik ebben a pathomechanizmusban, mivel IBD-s betegeknél alacsonyabb ATP szintet és csökkent mitokondriális II. komplex aktivitást figyeltek meg a nyálkahártyában (Parikh et al., 2019; Xavier et al., 2007; Stange et al., 2019; Liu et al., 2021; Kameyama et al., 1984; Santhanam et al., 2012).

1.3. Terápiás lehetőségek GI gyulladással járó állapotokban

A gasztritisz terápia a gyulladást csökkentésére, a tünetek kezelésére és a remisszió fenntartására irányul (pl. a gyomorsav-termelés csökkentése protonpumpa-gátlókkal (PPI) és H₂ receptor antagonistákkal, a *H. pylori* eradikálása, antibiotikumok és PPI alkalmazása). Az IBD kezelésében főként immunmodulátorok, gyulladáscsökkentő szerek és anti-citokin terápiaik mint pl. TNF- α blokkolók szerepelnek (Rutgeerts et al., 2004). A nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) is hasznosak lehetnek egyes betegek számára, különösen extraintesztinális izomfájdalmak esetén. A mesalamin (5-ASA) mint első vonalbeli terápia (Managlia et al., 2013) gátolja a proinflammációs pekturzorok termelését, így fontos szerepet játszik a tünetek kezelésében és a remisszió fenntartásában is, helyi hatása miatt viszonylag kevés szisztémás mellékhatással bír (Bickston és Cominelli, 2003).

1.4. NSAID-ok

A NSAID-ok heterogén gyógyszer-csoport, amit széles körben, hatékonyan alkalmaznak a gyulladást kezelésére, azonban a GI szövődmények súlyosak lehetnek: vérzést és fekélyek

kialakulását okozhatnak. Az NSAID-ok különböző szelektivitással gátolják a COX/prostaglandin-endoperoxidáz szintáz (PGHS) enzimeket (Kumar et al., 2018). Az NSAID szalicilátok dózisfüggő lázcsillapító, gyulladáscsökkentő, antitrombotikus és fájdalomcsillapító hatásai a COX enzimek gátlásán alapulnak (Rao et al., 2008). A propionsav-származékokat, amelyek nem szelektíven hatnak, gyakran alkalmazzák reumás és ízületi kórképek kezelésében (Cathcart et al., 1973). Az indometacin, mint leggyakrabban használt ecetsav-származék, ízületi betegségek és tokolízis céljából is alkalmazható (Baber et al., 1979). Ugyanakkor különös figyelmet igényelnek e gyógyszerek súlyos mellékhatásai, mint a nátrium-visszatartás, ödéma, hipertónia, tachycardia és bronchospazmus (Donker et al., 1976). A pirazon-származékok gyorsan kialakuló reverzibilis hatásokat fejtenek ki a gyulladással járó folyamatokra, míg az oxicam-származékok nem szelektív és szelektív COX-2 gátlóként is működhetnek, a molekula szerkezetétől függően. A szelektív COX-2 gátlók kevesebb GI mellékhatást okoznak, de hosszú távú használatuk fokozhatja a véralvadási zavarok és a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulását.

1.4.1. Az acetilszalicilsav és a ketoprofen

Az acetilszalicilsav (ASA) és a ketoprofen (Ket) két igen gyakran használt NSAID, amelyek eltérő hatásmechanizmusokkal rendelkeznek. Az ASA magas dózisban fájdalomcsillapító, lázcsillapító és gyulladáscsökkentő hatású, míg alacsonyabb dózisokban hatékony a szív- és érrendszeri megbetegedések megelőzésében (Baigent et al., 2009). A Ket erős gyulladáscsökkentő hatással bír, akut és krónikus reumatoid arthritis, osteoarthritis, Bechterew kór, primer dysmenorrhoea és mozgásszervi sérülések okozta fájdalom kezelésére is alkalmazzák (Kantor et al., 1986, Lastra et al., 2002, Jerussi et al., 1998). Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy mindkét NSAID súlyos GI mellékhatásokkal rendelkezik (Sørensen et al., 2000; Delaney et al., 2007).

1.4.2. A NSAID-ok GI mellékhatásainak mechanizmusai

Az NSAID-ok alkalmazása során fellépő nyálkahártyát érintő mellékhatások szerkezeti és funkcionális károsodásokhoz, fekélyekhez és perforációhoz vezethetnek (Appleyard et al., 2002). A vérzéses szövődmények hátterében álló okok több tényezősök, azonban a fő mechanizmusok közé a COX-1 irreverzibilis gátlása és a nem prostaglandin-mediált irritáció tartozik (Hochain et al., 2000). Az NSAID-ok, mint az ASA, befolyásolják a mitokondriális aktivitást és apoptózist indukáló jeleket generálnak (Nulton-Persson et al., 2004; Raza et al., 2012; Redlak et al., 2005). További, kimutatott ok lehet a COX útvonal gátlása, ami csökkenti a prostaglandin-E2 (PGE2) szintet, ami gyulladáscsökkentő hatású, de növeli a vérzés

kockázatát a TXA2 szint csökkenése miatt. A prosztaciklin (PGI2) termelés csökkenése is rontja a GI mukóza védelmét (Bacchi et al., 2012; Henry et al., 1988; Vane et al., 1994). Az NSAID-ok gyengítik a GI rendszer védelmi mechanizmusait is, a savas karboxil csoportok közvetlen káros hatásai miatt (Bjarnason et al., 1993; Price et al., 1990). A mitokondriális OxPhos gátlása az ATP termelés zavarát okozhatja, amely a sejt-sejt kapcsolatok (tight-junction) károsodásán keresztül a nyálkahártya permeabilitásának fokozódásához vezethet (Chan et al., 2005; Bjarnason et al., 2018). A nefrotoxicitás is jelentős mellékhatás, mivel bizonyos NSAID-ok serkenthetik az angiotenzin-II közvetítette vazokonstriktiót, csökkentve a vese lokális keringését és a glomeruláris filtrációs rátát (Dunn et al., 1984). Összességében, bár a NSAID-ok eltérő hatásokkal és COX-2 szelektivitással rendelkeznek, a prosztaglandin szint csökkentése révén valamennyi szer befolyásolhatja a GI nyálkahártya védelmét, ami szöveti léziókhöz vezethet (Price et al., 1990; Bjarnason et al., 2018; Huang et al., 2011; Rodriguez et al., 2019).

1.4.3. Az NSAID kémiai módosítása új NSAID származékok kifejlesztése érdekében

A NSAID és megfelelő prekursorokból szintetizált új hatóanyagok esetében várhatóan csökken a nyálkahártya károsodás mértéke, ugyanakkor az eredeti biokémiai funkció megőrzése nagy kihívást jelent (Uzzaman et al., 2020, Narsinghani et al., 2014, Rahman et al., 2024). A tris(hidroximetil)aminometán vagy 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol (Tris) biokémiai alkalmazása már jól ismert (Gomori et al., 1955), a Tris gyakran szerepel pufferoldatok (7,07-9,07 közötti pH-tartományban) komponenseként. A Tris pufferek jelentős hatással vannak az artériás pH-ra és a bázisdeficitre, csökkentik a szén-dioxid parciális nyomását az artériás vérben, ezért kevert acidózisban szenvedő betegek kezelésére (Hoste et al., 2005; Kallet et al., 2000) is alkalmazzák. A Tris egyes enzimek aktivitását (aminopeptidázok és az alfa-amilázok) is gátolhatja (Desmarais et al., 2002; Ghalanbor et al., 2008), és kationos sóképző ágensként is vizsgálták a ketorolak-trometamin (1:1 arány) vízben való oldhatóságának növelésével kapcsolatban (Mroszczak et al., 1987).

2. CÉLKITŰZÉS

Hatékony, de csökkentett mellékhatásokkal rendelkező NSAID készítmények klinikai szempontból jelentős terápiás értékkel bírhatnak. Ez jelentette kutatásaink elsődleges célját: új vegyületek fejlesztését e gyógyszercsoport reprezentatív molekuláiból. A kutatási és fejlesztési tevékenység további, specifikus célja az volt, hogy olyan új molekulákat hozzunk létre, amelyek megőrzik az eredeti molekula hatékonyságát, miközben csökken, vagy megszűnik a mellékhatás, különösen a GI traktusban fellépő vérzéses szövődemény. Erre az elképzelésre

alapozva feltételeztük, hogy a NSAID-ok és a Tris konjugálása terápiás előnyöket jelenthet az eredeti nem-szteroid gyulladáscsökkentő vegyületekkel szemben. Ennek megfelelően a disszertációban bemutatott kutatások elsődleges célja annak igazolása volt, hogy az újonnan kifejlesztett NSAID-konjugátumok alkalmazásával jelentős mértékben csökkenthető-e a gyógyszer által indukált nyálkahártya-károsodás és egyéb szövődmények előfordulási aránya. E célkitűzések mentén az alábbi feladatokat tűztük ki:

- ASA-Tris és Ket-Tris molekulák konjugációja ASA, Ket és Tris prekursorokból;
- ASA és mono-, bis- és trishidroximetilaminometánból (Mono, Bis, Tris) származó vegyületek szintézise és összehasonlító vizsgálata, hogy az újonnan kifejlesztett módosított NSAID származékok tulajdonságait és lehetséges hatásmechanizmusát megvizsgáljuk;
- Az analgetikus és gyulladáscsökkentő hatékonyság tesztelése ismert preklinikai gyulladáscsökkentő modellekben, a carrageenan által indukált gyulladás és a TNBS által indukált colitis esetében;
- az újonnan kifejlesztett NSAID származékok véralvadásra és thrombocita aktiválásra kifejtett hatásának vizsgálata;
- az új konjugátumok hatásának vizsgálata a mitokondriális funkciókra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez hím, Sprague-Dawley patkányokat (200g ± 10g) használtunk, a vizsgálatokat a NIH irányelvek (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63 számú EU direktíva szerint végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával (engedélyszám: V/146/2013).

3.2. NSAID-amino-alkohol konjugátumok szintézise

Az NSAID-Tris konjugátumok szintézisét a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében végezték ASA, Ket, ethanolamine (Mono), 2-amino-1,3-propanediol (Bis), Tris prekursorokból. Az újonnan kialakított származékok a következők voltak: ASA-Mono, ASA-Bis, ASA-Tris és Ket-Tris* - *Szerzőtársunk, Ghyczy Miklós 2016. 09-ig az EP 2889286A1 számú európai szabadalmi bejelentés és a WO 2015/101501 (PCT/EP2014/078296)*

„Gyógyszerészetileg aktív vegyület gyulladásgátló szerként” című nemzetközi szabadalmi bejelentés bejelentője és jogosultja volt*.

3.3. In vivo kísérleti módszerek

A mikrokeringés in vivo vizsgálata modelljeinkben *intravitális videómikroszkópiával* történt. A gyomor és a colon szeróza mikrokeringésének vizsgálata orthogonális polarizációs spektrális (OPS) technikával történt (Cytoscan A/R, Cytometrics, Philadelphia, Pennsylvania, USA), amellyel a nyálkahártya felszíni 200 µm-es mélységében levő kapillárisokban keringő vörösvértestek tehetővé láthatóvá kontrasztanyag alkalmazása nélkül. A mikrokeringésről S-VHS videofelvételek készültek (Panasonic AG-TL 700, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd, Osaka, Japán), melyeket off-line analizáltunk (IVM Pictron, Budapest, Magyarország) és meghatároztuk a vörösvértestek átlagos áramlási sebességét (RBCV; µm/s).

Az ér- és szövetkárosodás in vivo vizsgálata: rágcsáló modellünkben a gyomor és colon mukóza károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálmódszerrel, fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkópia (CLSEM; Five1, Optiscan Pty. Ltd., Australia) segítségével határoztuk meg. A gyomor és a colon lumenét megnyitottuk, a nyálkahártyát feltártuk. A mucosa mikrovaszkuláris szerkezetét fluoreszcein isothiocianát-dextran (FITC-dextran; 150 KDa, 20 mg/mL oldat fiziológias sóban, 0,3 ml *iv*) adása után vizsgáltuk. Az eszköz objektívét a colon nyálkahártyára helyeztük és 5 perccel a festék beadása után (1 scan/kép, 1024 x 512 pixel és 475 x 475 µm képenként) konfokális képeket készítettünk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akriflavin felszíni alkalmazása után különálló területeken vizsgáltunk. A kontroll és a kezelt csoportok adatait hasonlítottuk össze szemikvantitatív kiértékelő módszert alkalmazva.

Az új ASA-Tris konjugátum analgetikus hatásának tesztelésére carrageenan-indukált talpgyulladás rágcsáló modelljét alkalmaztuk. Az analgetikus hatást dinamikus talpi esztéziométer segítségével határoztuk meg, a méréseket egyenes fém filamentummal végeztük, amelyet a jobb hátsó láb talpi felülete alá helyeztünk.

3.4. In vitro kísérleti módszerek

Gyulladásos markerek vizsgálata: A kísérletek végén az állatokból gyomor, colon, máj biopsziát és vérmintákat vettünk. A szövetmintákat felhasználásig -70 °C-on tartottuk. A mérésekhez a szövetmintákat homogenizáltuk és a szöveti proteázok gátlása céljából 0,1 mM polimetilszulfonil fluoridot tartalmazó Trisz-HCl pufferrel (0,1 M, pH=7,4), majd 24 000 g-n 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A vizsgált szövet *mieloperoxidáz* (MPO) aktivitása a leukociták szöveti akkumulációját jellemzi. Aktivitását a szöveti homogenizátum üledékéből

határoztuk meg Kübler és munkatársai (Kuebler et al. 1996) metodikája alapján. A *xantin oxidoreduktáz* (XOR) enzim a szuperoxid gyök termelés jelentős forrása a szövetekben, amelynek a szintjét a homogenizátum felülúszójából Beckman (Beckman et al. 1989) módszerével mértük fluorometriás kinetikus assay segítségével. A *nitrit/nitrát* (NO_x) szintet Griess reakcióval mértük. Első lépésben a minta nitrát tartalmát enzimatis konverzióval nitritté alakítottuk, melyet a nitrit tartalom meghatározása követett 546 nm-en spektrofotométerrel (Moshage et al. 1995). A vérplazma *TNF-α* szintet ELISA módszerrel mértük, míg a *malondialdehid* (MDA) szintet a lipid-peroxidáció mértékének becslésére használtuk. A *mitokondriális funkció* vizsgálatára nagy felbontású respirometriát alkalmaztunk (Oxygraph- 2k respirometer, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a patkány máj mitokondriumok légzési aktivitásának és reaktív oxigéngyök (ROS) termelési kapacitásának meghatározására. A mitokondriumok légzési aktivitásának és reaktív oxigéngyökök (ROS) termelési kapacitásának változásait elemeztük. A mitokondriális OxPhos respirometriás vizsgálatához a szubsztrát-uncoupler-gátló titrálás (SUIT) protokollt alkalmaztuk.

3.5. Kísérleti protokollok

1. tanulmány – az ASA-Mono, ASA-Bis, ASA-Tris vizsgálata

A *GI mellékhatások vizsgálatára* 35 állat 5 csoportját (n=7, csoportonként) alkalmaztuk. Az 1. csoport kontrollként szolgált, az állatok oldószert kaptak (10 ml/kg puffereelt 0,11 M kálium-hidroxid (KOH; naponta háromszor, három egymást követő napon) *per os*. A 2. csoport tagjai ASA-kezelésben (0,55 mmol/kg, 10 ml/kg térfogatban; naponta háromszor 3 napon keresztül; gyomorszonda) részesültek. A 3-5. csoportok egyedeit ASA-konjugátumokkal kezeltük, az ASA-hoz képest ekvimoláris dózisban (naponta háromszor 3 napon keresztül). A 3. csoportot ASA-Mono-val, a 4. csoportot ASA-Bis-szel, az 5. csoportot pedig ASA-Tris-szel kezeltük. A kezeléseket követően az állatokat *ad libitum*, szénhidrát-dús étrenden voltak. A 3. napon, 2 órával az utolsó kezelése után, az állatokat elaltattuk (nátrium-pentobarbital; 50 mg/kg i.p.). Medián laparotómiát követően OPS mikrokeringési vizsgálatokat végeztünk a gyomor szerózán. Az *in vivo* hisztológiai vizsgálatok a gyomor mukóza területén CLSEM alkalmazásával történtek. A kísérletek végén gyomor és máj biopsziákat vettünk a gyulladásos paraméterek meghatározására (XOR és MPO enzimaktivitás, NO_x, MDA szint, Cyt c oxidáz felszabadulás), valamint vénás vérmintát a plazma TNF-α szint meghatározására.

Trombocita aggregáció mérés: Az ASA-Tris trombocita funkcióra gyakorolt hatását 15 patkány három csoportján (kontroll, ASA, ASA-Tris; kezeléseket ld. fentebb; n=5,

csoportonként) vizsgáltuk. A trombocita aggregáció mérést aggregométerrel (Multiplate analyzer, Roche, Basel, Svájc) végeztük két órával az utolsó kezelést követően.

Fájdalomcsillapító hatás vizsgálata: A carrageenan által indukált talpgyulladás modelljében, 18 patkány három csoportján (pozitív kontroll, ASA, ASA-Tris; kezeléseket ld. fentebb; n=6, csoportonként) teszteltük az ASA-Tris fájdalomcsillapító hatását. Carrageenant (300 µg/30 µl) injektáltunk a jobb hátsó végtag tibiotarsalis ízületébe majd 3 óra múlva kezdtük meg aASA-, illetve ASA-Tris kezeléseket a 2. és 3. csoport állatainál. Az 1. csoport egyedei pozitív kontrollként szolgáltak. A fájdalomcsillapító hatást dinamikus talpi esztéziométer (mod-37450; Ugo Basile, Comerio, Olaszország) segítségével határoztuk meg.

2. tanulmány – az ASA-Tris gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

A gyulladáscsökkentő hatás vizsgálatához TNBS-indukált patkány colitis modellt alkalmaztunk. Vizsgálatainkat 30 állat öt csoportján végeztük (kontroll, Col, Col+ASA, Col+ASA-Tris, Col+Mes, n=6, csoportonként). A 2-5. csoportban colitist indukáltunk TNBS beöntéssel (40 mg/kg). A 3., 4. csoportban elvégeztük az ASA- és ASA-Tris kezeléseket, míg az 5. csoport egyedei mesalamin (Col+Mes; 0,77 mmol/kg (118 mg/kg, 10 ml/kg térfogatban; napi három alkalommal, három napon keresztül) ismételt adagjait kapták 12 órával a colitis indukciója után. Az utolsó kezelés után 2 órával mikrokeringési és *in vivo* hisztológiai vizsgálatokat végeztünk, majd szövetmintákból gyulladásos markereket határoztunk meg (XOR és MPO enzimaktivitás, NO_x, MDA szint, Cyt c oxidáz felszabadulás), vérmintából plazma TNF- α szint meghatározása történt.

ASA-Tris mitokondriális funkcióra kifejtett hatásainak vizsgálatát 15 patkány három csoportján végeztük (kontroll, ASA, ASA-Tris; kezeléseket ld. fentebb; n=5, csoportonként). A harmadik napon, 2 órával az utolsó kezelést követően az altatott állatokból májmintákat vettünk a mitokondriális funkció vizsgálatára.

3. tanulmány – a Ket-Tris GI mellékhatásainak vizsgálata

A protokollban 18 állat 3 csoportját vizsgáltuk (kontroll, Ket, Ket-Tris; n=6, csoportonként). A kontroll állatokat a Ket oldószerével (10 ml/kg, 0,11 M kálium-hidroxid pufferolt) kezeltük. A 2. csoportban Ket oldatot (0,56 mmol/kg, 10 ml/kg térfogatban), a 3. csoport rágszálói Ket-Tris konjugátum (0,56 mmol/kg, 10 ml/kg térfogatban) kezelésben részesültek. A második napon az állatokat elaltattuk, medián laparotómiát követően OPS mikrokeringési vizsgálatokat végeztünk a gyomor szerózán. Az *in vivo* hisztológiai vizsgálatok a gyomor mukóza területén

CLSEM alkalmazásával történtek. A kísérletek végén gyomor és máj biopsziákat vettünk a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek meghatározására (XOR és MPO enzimaktivitás, NO_x, MDA szint, Cyt c oxidáz felszabadulás), valamint vénás vérmintát a plazma TNF- α szint meghatározására.

Ket-Tris gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata: TNBS-indukált patkány colitis modellben történt. Vizsgálatainkat 24 állat négy csoportján végeztük (kontroll, Col, Col+Ket, Col+Ket-Tris, n=6, csoportonként). A 2-4. csoportokban TNBS beöntéssel (40 mg/kg) colitist indukáltunk. A 3. és 4. csoportban az állatok 12 órával a colitis indukciója után Ket (0,08 mmol/kg, 20 mg/kg, 10 ml/kg térfogatban) vagy Ket-Tris (0,09 mmol/kg, 30 mg/kg, 10 ml/kg térfogatban) kezelést kaptak. A kontroll és a nem kezelt colitis csoportok állatait a Ket oldószerével (10 ml/kg, 0,11 M kálium-hidroxid pufferolt) kezeltük. A második napon, 24 órával a Ket vagy Ket-Tris kezelése után az állatokat elaltattuk, median laparotómiát követően minden csoportban in vivo mikrokeringési és hisztológiai vizsgálatokat végeztünk. A kísérletek végén colon és máj biopsziákat vettünk a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek meghatározására (XOR és MPO enzimaktivitás, NO_x, MDA szint, Cyt c oxidáz felszabadulás), valamint vénás vérmintát a plazma TNF- α szint meghatározására.

3.6. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem parametriás módszereket alkalmazva. A csoporton belüli eltéréseket Friedman próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontroll értéktől való eltérést Dunn próbával teszteltük. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–Wallis és Dunn próbával történt. A grafikonokon a medián értéket és az interquartilis félterjedelmet ábrázoltuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

1. tanulmány

ASA-Mono, ASA-Bis, ASA-Tris vizsgálata és GI mellékhatásainak vizsgálata: Az ASA kezelés követően szignifikáns testsúlycsökkenés, súlyos mikrokeringési destrukció, mukóza károsodás alakult ki, amellyel párhuzamosan jelentősen megemelkedett a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterek szintje (MPO, XOR, NO_x, MDA, plazma TNF- α , Cyt c szint). Az ASA-Mono kezelés nem okozott súlyvesztést, azonban mérsékelt mikrokeringési és szöveti károsodások voltak kimutathatók a gyomor mukózában. Ezzel párhuzamosan emelkedett értékeket mértünk a következő vizsgált paraméterekben: MPO, XOR, NO_x, plazma TNF- α , Cyt c szint. Az ASA-Bis kezelés mellett súlyvesztés nem volt megfigyelhető, de mikrokeringési és szöveti károsodások mutattunk ki a

gyomornyálkahártyán, emelkedett NO_x szint kíséretében. ASA-Tris kezeléssel káros mellékhatásokat nem tapasztaltunk. Az állatok súlyában nem volt eltérés, sem nyálkahártya károsodást, sem a vizsgált markerekben emelkedés nem volt kimutatható.

Az ASA-Tris trombocita aggregációra kifejtett hatása: ASA kezelés után az aggregáció körülbelül 80%-kal csökkent (ASPI-, ADP- és Col-teszt), míg ASA-Tris kezelés után az ASPI-teszt esetében 20%-kal alacsonyabb trombocita aggregáció sebességet mutattunk ki a kontroll csoporthoz képest.

ASA-Tris fájdalomcsillapító hatásának vizsgálata: carrageenan-indukciót követően a 3. órában méréseinkkel mindhárom csoportban igazoltuk a fájdalom kialakulását. Az ASA és ASA-Tris beadását követően igazoltuk, hogy ASA kezelésünk átmenetileg, míg az ASA-Tris konjugátum tartósan csökkentette a fájdalomérzetet.

2. tanulmány

ASA-Tris gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata: A Col csoportban a TNBS-indukció véres széklet megjelenését, hasmenést, testsúlycsökkenést eredményezett. *In vivo* hisztológiai vizsgálataink a colon területén súlyos szövethárosodást (ödéma képződése, teljes mukóza epitélium vesztés), mutattak ki, míg a gyomor mukóza normál szövettani képet mutatott. Az MPO és a XOR enzimaktivitás mind a colon és a gyomor szöveteiben emelkedett. A NO_x-szint szignifikánsan magasabb volt a colon szövetben, valamint a plazma TNF- α szintén emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez képest. Az ASA kezelés mérsékelte a colon mukóza károsodását és súlyos gyomornyálkahártya károsodást okozott. A colonból csökkent, míg a gyomorból emelkedett gyulladáscsökkentő mediátor szinteket mértünk. Az ASA kezeléssel mérséklődött a plazma TNF- α szintje. Az ASA-Tris kezelés hatására nem alakult ki károsodás sem a colon, sem a gyomor mukózájában. A vizsgált szöveti gyulladáscsökkentő paraméterszintek nem mutattak emelkedést a gyomor és a colon szöveteiben. A plazma TNF- α szintje kontroll csoport értékétől nem mutatott eltérést. A mesalamin kezelés ASA-Tris kezeléshez hasonló eredményességet mutatott.

ASA-Tris mitokondriális funkcióra kifejtett hatásai: A vizsgálat során kimutattuk, hogy a komplex IV-hez kapcsolódó légzési aktivitás az ASA csoportban szignifikánsan csökkent a kontroll és az ASA-Tris csoportokhoz képest, ami arra utal, hogy az ASA kezelés gátolja a mitokondriális légzést, amely a sejtek energiaellátásának csökkenéséhez vezethet. Ezzel szemben az ASA-Tris csoportban a nátrium-azid hatására a légzési fluxus visszaállt a kontroll csoport szintjére, ami azt mutatja, hogy az ASA-Tris kezelés képes kompenzálni az ASA által

okozott gátlást és normalizálja a mitokondriális légzést. *Mitokondriális funkcióváltozások, a mitokondriumok ROS termelése:* Eredményeink azt mutatták, hogy sem az ASA, sem az ASA-Tris alkalmazása nem befolyásolta szignifikánsan a mitokondriális H₂O₂-termelést.

3. tanulmány

Ket-Tris GI mellékhatásainak vizsgálata: igazoltuk, hogy 24 órával a Ket-kezelést követően jelentős szöveti károsodás alakult ki a gyomor nyálkahártyán, amely együtt járt a pro-inflammációs markerek szignifikáns emelkedésével (MPO, XOR, NO_x, MDA, Cyt c és TNF- α) a kontrollcsoportéhoz képest. OPS vizsgálatainkkal emelkedett RBCV szinteket mértünk a gyomor, duodenum, jejunum és az ileum területén. Ezzel szemben a Ket-Tris konjugátum kezelés nem okozott sem szöveti károsodást, sem emelkedett gyulladási marker szinteket; a RBCV minden vizsgált bélszakaszon a normál értéken maradt.

Ket-Tris gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata: Kísérletes colitisben igazoltuk, hogy a TNBS hatására kialakuló vastagbél szöveti károsodása és a colon szeróza mikrokeringésének jelentős csökkenése alakult ki emelkedett gyulladási paraméterek mellett. A Ket, illetve a Ket-Tris kezelések hatékonyak voltak a szövetkárosodás és a mikrokeringés romlásának kialakulásával szemben. A Ket kezelés szignifikánsan csökkentette a XOR, MDA, Cyt c szinteket, ezzel szemben a Ket-Tris konjugátum az MPO enzim aktivitását is csökkentette a csökkent XOR, MDA, Cyt c szintekkel párhuzamosan.

5. MEGBESZÉLÉS

A nyálkahártya élettani barrier funkciója alapvető szerepet játszik a szervezet homeosztázisának fenntartásában. A barrier funkció integritása gyakran sérül NSAID-ok alkalmazása során, ami súlyos szövődényekhez, például GI fekélyek és vérzések kialakulásához vezethet. Az NSAID-ok által kiváltott GI-károsodás patogenezisét a mukózában kialakuló emelkedett érpermeabilitás és a leukocita akkumuláció jellemzi (Vallace et al., 1990). Az NSAID-k a gyomor-nyálkahártya sejteinek funkcióit befolyásolhatják (Alino és mtsai, 2008; Pizzuto és mtsai, 1997), és paradox módon stimulálhatják az aktivált makrofágok Ca²⁺-függő TNF- α felszabadulását, ami közvetlen citotoxikus hatású lehet (Fiorucci et al., 1998).

Az NSAID-kezeléssel kapcsolatos kedvezőtlen hatások mérséklésére több, különböző stratégiát vizsgáltak, beleértve a gyógyszerek biohasznosulásának fokozását (Kumar et al., 2022), valamint az NSAID-ok más fájdalomcsillapítókkal vagy adjuváns szerekekkel való kombinálását (Pergolizzi et al., 2023). A fekélyek megelőzésére irányuló jelenlegi kezelési stratégiák általában “módosított felszabadulású”, bélben oldódó bevonatú készítményeket, savtermelést

gátló szereket és antacidokat foglalnak magukban; azonban a hatékony multimodális terápia elérése kihívást jelent, különösen a nem együttműködő betegeknél (Evans et al., 1983, Scheen et al., 1983). Az NSAID-ok molekuláris módosítása ígéretes lehet a fekélyképző potenciál csökkentésére, például diklofenák származékok esetében kísérletes környezetben jelentősen csökkent fekélyképző hatást lehetett kimutatni (Bhandari et al., 2008, Ilango et al., 2015).

Jelen kutatásunk célja olyan vegyületek szintézise volt, amelyek megőrzik az eredeti NSAID-ok terápiás hatékonyságát, miközben kevesebb GI mellékhatással rendelkeznek. Az NSAID és amino-alkoholok konjugációjának lehetőségét és azok hatásmechanizmusát korábban még nem vizsgálták, ezért ebből a célból az ASA és/vagy Ket és a Tris prekursorok konjugálásával új molekulákat fejlesztettünk ki. Eredményeink azt igazolták, hogy ezek a konjugátumok hatékony gyulladáscsökkentők, miközben kevésbé, vagy egyáltalán nem károsítják a gyomornyálkahártyát.

Kísérleteink során az ASA által indukált hemorrhagiás nyálkahártya károsodást in vivo rágsáló modelleinkben és in vitro vizsgálatainkkal igazoltuk. Intravitalis hisztológiai vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az ASA jelentős mukóza barrier funkció veszteséget okozott, ami mind a szeróza, mind a mukóza mikrokeringésének romlásához és súlyos endothel sérüléséhez vezetett. A PMN leukociták jelentős szerepet kapnak ebben a folyamatban, a PMN akkumulációt a megemelkedett szöveti MPO szint jelez. Ezek a változások együtt jártak a ROS termelésében kulcsszerepet játszó XOR aktivitásának emelkedésével. Megnövekedett szöveti MDA, NO_x és Cyt c felszabadulás és emelkedett plazma TNF- α koncentráció mellett jelentős Cyt c felszabadulást mutattunk ki májszövetből is. Mindez igazolja a gyulladási szignálizáció terjedését - a lokalizált károsodás szisztémás károsodásokat eredményezett.

Mindezekkel szemben az ASA-Tris konjugátum nem okozott PMN felhalmozódást, gyulladási enzimaktivációt, és nem emelte meg a gyulladási markerek szintjét, sem a gyomorban, sem a májban. In vivo szövettani vizsgálataink kimutatták, hogy ASA-Tris alkalmazását követően nem alakult ki nyálkahártya károsodás, így ez a molekula potenciálisan biztonságos alternatívát jelent a hagyományos NSAID-okkal szemben. A különböző ASA-konjugátumok (ASA-Mono, ASA-Bis) között megfigyelt eltérő válaszok arra utalnak, hogy a szerkezeti módosítások jelentősen befolyásolhatják a GI-károsodás mértékét, az ASA-Tris pedig a legkedvezőbb terápiás lehetőséget mutatja. Standardizált thrombocita funkció vizsgálatainkkal (Boer et al., 2010) megállapítottuk azt is, hogy az ASA kezelés jelentősen csökkenti a COX-függő aggregáció mértékét és a thrombociták aktiválódását. Az ASA-Tris

mérsékelt hatást gyakorolt a COX-függő aggregációra, amely a molekula alternatív gyulladáscsökkentő mechanizmusára utal, amiben nem csupán a COX gátlása játszhat szerepet.

A ROS kulcsfontosságú szerepet játszik az ASA által kiváltott akut nyálkahártya fekélyesedésben (Fiorucci et al., 1998), mivel lipidperoxidációhoz vezethet, ami veszélyezteti a biomembránok integritását és felborítja a sejtek homeosztázisát (DeCuyper és Joniau, 1980; Slater és mtsai, 1984). A lipidperoxidáció, amelyet az MDA szintek jeleznek, károsítja a membrán foszfolipideket és a folyamat Cyt c felszabadulásához vezethet a mitokondriumokból. Ez a felszabadulás a kaszpáz útvonal aktiválásán keresztül apoptózist indít el (Linkermann et al., 2014). ASA kezelést követően megemelkedett a MDA és Cyt c szintet és mitokondriális károsodást is igazoltunk, míg az ASA-Tris nem váltott ki ilyen hatásokat. Az ASA-Tris beadása nem emelte meg az NOx szintet sem, amelyek így együtt az oxidatív és nitrozatív stressz hiányára engednek következtetni. Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy az ASA-Tris védi a sejtek energiaállapotát, megőrzi a sejtek működését és csökkenti a nyálkahártya sérülését. Az ASA-Tris hatásának hátterében álló pontos mechanizmus azonban továbbra is tisztázatlan. Az ASA-Tris maszkolt karboxilcsoportja minimálisra csökkentheti a gyomorirritációt, és a hatékonyság látszólag arányos az egyes ASA-konjugátumokban (Mono, Bis, Tris) lévő hidroxilcsoportok számával. Az ASA-Tris szerkezete valószínűleg elősegíti a redox szabályozási mechanizmust; például a hidroxilcsoportokon keresztül, a flavonoidokhoz hasonlóan, amelyekről ismert, hogy védőhatásúak az oxidatív károsodással szemben. Az ASA-Tris redox-puffer mechanizmuson keresztül is működhet, az etanolhoz hasonlóan, ami például növeli a NADH-szintet, ami megemeli a csökkent glutationszintet, és a sejt redox egyensúlyi állapotát az élettani helyzet felé tolja el (Watson és mtsai, 2011).

Az IBD etiológiájának és patomechanizmusának tisztázatlansága miatt is fontos az új terápiás lehetőségek kifejlesztése, amelyek pozitívan befolyásolhatják a betegség kimenetelét. Jelenleg a NSAID-ok szerepe az IBD kezelésében ellentmondásos, mivel a COX gátlók súlyosbíthatják, vagy enyhíthetik is a betegség aktivitását (Takeuchi et al., 2006; Ding et al., 2014). A hemorrhagiás GI mellékhatások tovább nehezítik, akadályozzák alkalmazásukat. Ennek ellenére az NSAID-ok értékesek lehetnek IBD-s betegek számára, különösen azoknál, akiknek egyidejűleg mozgásszervi rendellenességeik vannak (Jose és Heyman, 2008). Ezért az új konjugátumok bioaktivitását megvizsgáltuk TNBS patkány colitis modellben is, az eredményeket összehasonlítottuk a mesalamin és az eredeti molekulák hatásaival. Adataink azt mutatták, hogy az ASA-Tris és a Ket-Tris hatékony a colitis által kiváltott testsúlycsökkenés és a gyulladós markerek emelkedésével szemben, miközben a GI mukóza integritása

megmaradt, ellentétben az eredeti (ASA, Ket) molekulákkal. Eredményeink arra is utalnak, hogy az új konjugátumok kedvező hatásai valószínűleg ez esetben is az oxidatív biomembrán károsodással szembeni védőpotenciálhoz kapcsolódnak. Összegzésül tehát vizsgálataink azt mutatják, hogy az ASA- és Ket-Tris konjugátumok ígéretes alternatívát jelentenek a hagyományos NSAID terápiákhoz képest, a GI-mellékhatások minimalizálásával, miközben megőrzik a terápiás hatékonyságot.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

- **Új NSAID származékok sikeres szintézise:** ASA és Ket valamint amino-alkohol prekursorok konjugálásával. Igazoltuk, hogy ígéretes farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező biológiailag aktív termékek állíthatók elő ASA vagy Ket és Tris kombinációkkal.
- **Hatékony GI védelem Tris konjugációval:** az NSAID-ok által kiváltott GI-mellékhatások minimalizálására. Az új Tris vegyületek jelentős védelmet nyújtanak a mukóza károsodásával szemben, megőrzik az epithel integritását a citokin által vezérelt gyulladós folyamatok csökkentésével.
- **ASA-Tris konjugátum GI hatásai:** a kevésbé hatékony ASA-Mono és ASA-Bis származékokkal ellentétben az ASA-Tris konjugátum nem okozott GI károsodásokat, amiből arra következtethetünk, hogy az ASA-Tris kevesebb mellékhatása miatt biztonságosabban alkalmazható.
- **ASA-Tris fájdalomcsillapító és trombocita funkcióra gyakorolt hatása:** az ASA-Tris erős fájdalomcsillapító hatású carrageenan indukált talpgyulladásban, anélkül, hogy jelentősen befolyásolta volna a trombocita funkciót, ellentétben az ASA trombocita aggregációra gyakorolt hatásával.
- **Gyulladáscsökkentő hatékonyság colitis modellben:** az ASA-Tris és Ket-Tris konjugátumok jelentős gyulladáscsökkentő hatásokat mutattak a TNBS által indukált colitis modellben, mindezt anélkül, hogy gyomor mukóza károsodást okoztak volna. A mitokondriális vizsgálatok arra utalnak, hogy az ASA-Tris hatékonysága nem közvetlen gyökfogó képességen alapul, hanem valószínűleg az oxidatív biomembrán károsodással szembeni védőhatás vezet a sejtek életképességének javulásához és a nyálkahártya morfológiájának megőrzéséhez a hagyományos NSAID-okhoz képest.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetemet fejezem ki Boros Mihály Professzor Úrnak, a Sebészeti Műtéttani Intézet vezetőjének azért a felbecsülhetetlen értékű lehetőségért, hogy intézetében dolgozhattam, és a projekt során nyújtott tudományos útmutatásáért. Őszintén köszönöm Tóth Gábor Professzor Úrnak, az Orvosi Vegytani Intézet vezetőjének az újonnan kifejlesztett NSAID származékok konjugálását. Hálás vagyok Ghyczy Miklósnak a kutatási alapötletért és a projekt során nyújtott felbecsülhetetlen értékű tanácsaiért. Köszönetemet fejezem ki Greksa Ferenc egyetemi adjunktusnak és Sohár Gellért egyetemi docensnek, a Traumatológiai és Ortopédiai Klinika Ortopédiai Centrum vezetőjének, hogy kitartóan támogatják tudományos munkámat. Köszönettel tartozom a Sebészeti Műtéttani Intézet munkatársainak kiemelkedő technikai segítségükért és minden kollégámnak az együttműködésért és támogatásért. Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak és szüleimnek határtalan szeretetükért, türelmükért és bizalmukért, amelyek a legnagyobb erőt jelentették ezen az úton.

A kutatás az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (MB) támogatásból valósult meg.