

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására
alkalmas hidrogél és nanogél rendszerek előállítása és
vizsgálata**

Bakó József

Témavezető: Prof. Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen

2016

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására
alkalmas hidrogél és nanogél rendszerek előállítása és
vizsgálata**

Bakó József

Témavezető:

Prof. Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2016

Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására alkalmas hidrogél és nanogél rendszerek előállítására és vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: **Bakó József**, okleveles vegyész

**Készült a Debreceni Egyetem
Fogorvostudományi Doktori Iskola keretei között**

Témavezető:

Prof. Dr. Hegedűs Csaba, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

Elnöke: Prof. Dr. Matesz Klára, a MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Zelles Tivadar, a MTA doktora

Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2016. október 17. 11.00

DE FOK 210-es előadó

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kéki Sándor, a MTA doktora

Prof. Dr. Dobó Nagy Csaba, kandidátus

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, a MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Kéki Sándor, a MTA doktora

Prof. Dr. Dobó Nagy Csaba, kandidátus

Prof. Dr. Zelles Tivadar, a MTA doktora

Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2016. október 17. 13.00
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme.

BEVEZETÉS

A hidrogélek, olyan hidrofil jellegű háromdimenziós polimer struktúrák, melyek saját tömegükhöz viszonyítva többszörös mennyiségű víz megkötésére képesek. Porozitásuk, és duzzadási képességük következtében a szövetekhez hasonlóan lágy és rugalmas tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért orvosbiológiai célokra is számos területen sikeresen alkalmazhatóak. A kontaktlencsétől kezdve, a bőr regenerációját, a csontosodást, vagy az ízületi porcszövetet helyettesítő, esetleg helyreállítását elősegítő anyagok előállítására alkalmas képviselőikre is találhatunk példákat. Napjainkban a felhasználási területek között egyre növekvő jelentőségű a különböző biológiailag aktív molekulák formulálásának a szerepe. A hatóanyagok csomagolása és meghatározott helyen, szabályozott formában történő kibocsátására képes rendszerek fejlesztése a legintenzívebben kutatott területek közé helyezi ezen anyagokat.

A nemzetközi irodalomban többféle monomert, és monomerrendszert vizsgáltak már, de a lehetőségek nagy száma, illetve az egyre újabb és egyre kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező anyagok megjelenésére tekintettel ezek a kutatások töretlenül folynak napjainkban is. A régi jól ismert anyagok, az új lehetőségeket kihasználó komponensekkel kombinálva teljesen különböző, a megváltozott igényeknek sokkal

inkább megfelelő eszközökké válhatnak. Ilyen úton jutott el ma a tudomány a szintetikus polimerek alkalmazásától a biogén körülmények között is felhasználható biokompatibilis anyagokig. S ez az út vezetett a biodegradábilis tulajdonságokkal is rendelkező új anyagokkal kapcsolatos fejlesztésekig. Ezen anyagokat nem csak önmagában tolerálja a szervezet, hanem már meghatározott időn belül képesek alkotóelemeikre bomlani, s ezek között sem találunk jelentős toxicitással rendelkező komponenseket.

Ezen biokompatibilis, biodegradábilis anyagrendszereket a fogászat területén is alkalmazzák. A teljesség igénye nélkül ide sorolható például a parodontológia területén felhasználható PerioChip®, amely egy biodegradábilis, klórhexidin glükonátot kibocsátó rendszer, vagy egy antibiotikumot a doxiciclint kibocsátó Atrisorb®. A minociklin leadására képes Arestin® egy újabb termék, ahol a formulázáshoz használt polimer már mikrogyöngyök formájában jelenik meg, ezzel is elősegítve a hatóanyag felszabadulásának a minél pontosabb szabályozási lehetőségét. A biodegradábilis polimerek sebészeti felhasználása, a sebszélek egyesítése során történő alkalmazása, illetve csontpótló anyagok alkotójaként is régóta ismert. Számos termék igyekszik a természetes eredetű, vagy mesterségesen előállított gélek adta lehetőségeket felhasználni a biológiailag aktív molekulák szabályozott kibocsátásra. Ezeket az elveket alkalmazzák a Bio-Oss

Collagen® csakúgy, mint a GEM 21S®, vagy az Easy-Graft™, ahol a hatóanyag-leadás szilárd vázanyag alkalmazása mellett valósul meg. Mindezek mellett jelentek már meg olyan anyagok is, ahol a biológiailag aktív molekula felszabadulását egyedül a kollagén mátrix szabályozza. Kereskedelmi forgalomban, mint INFUSE® Bone Graft (rhBMP-2), vagy OP-1® (rhBMP-7) találkozhatunk velük, mivel 2002, illetve 2001-óta rendelkeznek FDA engedéllyel.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja a fogászati gyakorlatban alkalmazott „kék fény” (385-515 nm) hatására bekövetkező fotopolimerizáció útján térhálós szerkezetű polimerek előállítása, amelyek a fogászati ellátás során használt hatóanyagok szabályozott kibocsátására képesek.

HEMA-PEGDMA alapanyagok felhasználásával

- különböző térhálósűrűségű hidrogélek előállítása
- nanorészecskék, és ezek felhasználásával nanokompozit hidrogélek szintézise
- a gélek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata
- hatóanyag leadási tulajdonságaik összehasonlítása

Poli- γ -glutaminsav (PGA) alapanyag alkalmazásával

- a fogorvosi gyakorlatban alkalmazott „látható fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható polimer és nanorészecske szintézise
- ezen alapanyagokból hidrogélek és nanogélek előállítása
- a gélek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata
- biokompatibilitás meghatározása
- fluoreszcens- és konfokális lézer szkennig mikroszkópos eljárásokkal a sejtekre gyakorolt hatások vizsgálata
- duzzadási és hatóanyag leadási tulajdonságok jellemzése

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

HEMA-PEGDMA-alapú nanorészecske, hidrogél és nanokompozit előállítása és jellemzése

Munkánk első részében, a biokompatibilis nanorészecskék előállítása nitrogén atmoszféra alatt, folyamatos keverés mellett, emulziós polimerizáció útján történt. A szerves fázist 2-hidroxietyl-metakrilát (97%, Sigma-Aldrich Kft.) (HEMA) monomer, poli(etilén-glikol)-dimetakrilát (Mn:550) (PEGDMA) (Sigma-Aldrich Kft.) térhálósító, illetve n-butyl-alkohol (Spektrum 3D Kft) alkotta. A vizes fázist nátrium-dodecyl-szulfát (Spektrum 3D Kft) (SDS) 2,4%-os oldatában, kálium-peroxid-diszulfát (98%, Reanal Co.) (KPS), mint termoiniciátor felhasználásával, N,N,N',N'-tetrametil-etylén-diamin (99%, Sigma-Aldrich Kft.) (TEMED) katalizátor segítségével állítottuk elő.

A biokompatibilis hidrogélek és a nanokompozit hidrogél (50:50 HEMA:PEGDMA mátrix, azonos összetételű nanorészecskék kombinációja) előállításához szükséges mátrix alapanyagait szintén HEMA, és PEGDMA alkották különböző mol arányok alkalmazása mellett (90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90). Fotoiniciátorként antrakinon-2-szulfonsav-nátrium sóját (Fluka AG) (1 n/n%) alkalmaztunk. A fotopolimerizáció

reakcióideje 20 perc volt, Kulzer Palatray (435 nm, ~0,1 watt/cm²) polimerizációs lámpa alkalmazása mellett.

A nanorészecskék méretét a hidrodinamikai átmérő meghatározásán keresztül fényszórás fotometria (BI-200SM, NbYAG szilárd fázisú lézerrel) (DLS) segítségével határoztuk meg. A nanokompozitok esetében pedig pásztázó-elektronmikroszkóp (HITACHI S4300) (SEM) segítségével készítettünk felvételeket tört gél felületről.

A kialakított különböző térhálósűrűségű hidrogélek és a nanokompozit hidrogélek mechanikai tulajdonságait INSTRON 4302 (erőmérő cella: 0,1 kN, nyomási sebesség: 2 mm/perc) hasonlítottuk össze. Méréseinket az MSZ EN ISO 604:2003-as szabvány szerint végeztük. A kapott eredményeket Post-Hoc Test felhasználásával elemeztük.

A gélek duzzadási paramétereit tömegméréssel, a polimerizációt követően kialakult gél tömegéhez viszonyítva határoztuk meg. A kioldódási sajátságok vizsgálatához klórhexidin-diglükonát 20%-os (Spektrum 3D Kft.) oldatát használtunk, mint a fogászatban általánosan alkalmazott hatóanyag. A mérést és az azt követő kiértékelést Merck-Hitachi LaChrom HPLC készüléken C18 Nucleosil (5µm) kolonna segítségével végeztük.

PGA-alapú hidrogél előállítása és jellemzése

Munkánk második részét képező biodegradábilis polimer alapú hidrogél szintéziséhez először laboratóriumunkban bioszintetikus úton előállított poli- γ -glutamin savat (PGA) ($M_w=1,2 \times 10^6$, GPC) használtunk alapanyagként. A karboxil-csoportok reaktivitásának növeléséhez vízoldékony 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid hidrokloridot (CDI)-t (Sigma-Aldrich Kft.) alkalmaztunk. A fotopolimerizációhoz elengedhetetlen reaktív csoport kialakítását - 24 órás intenzív keverés közben a reakcióelegyhez adagolt - 2-aminoetil metakrilát hidroklorid (AEM) (Sigma-Aldrich Kft.) alkalmazásával értük el. A reakció sikerességét –a reaktív csoportok kémiai kötődését mágneses magrezonancia (NMR) vizsgálatokkal igazoltuk (Bruker 200SY).

A reaktív csoportokkal módosított PGA alapanyagból Irgacure 2959 (~99%, CIBA), mint fotoiniciátor segítségével alakítottunk ki hidrogéleket KULZER Dentacolor XS (435 nm, ~3 watt/cm²) polimerizációs lámpa alkalmazásával.

A mechanikai vizsgálatokat INSTRON 5544 készüléken végeztük, a biokompatibilis géleknél beállított paraméterek szerint, csakúgy mint a duzzadási paraméterek meghatározása során.

A kioldódási tulajdonságok vizsgálatához metronidazolt, mint egy modernebb hatóanyagot választottunk, és méréseinket Waters 600 HPLC készüléken végeztük Nucleosil (C18, 5 μ m) kolonnát alkalmazva.

A gélek biológiai rendszerekben történő felhasználhatóságát, sejtekre gyakorolt hatásait MTT, és LDH tesztekkel vizsgáltuk, illetve figyelemmel követtük (HaCaT) keratinocita sejtek morfológia változásait is.

PGA-alapú nanorészecskék és nanorészecskékből felépülő hidrogél - nanogél - előállítása és jellemzése

Munkánk záró szakaszában PGA (Nanjing Saitaisi Biotechnology Co. Ltd ($M_w \Rightarrow 1 \times 10^6$ Da)) alapanyagból először keresztkötések kialakításával nanorészecskéket állítottunk elő, amelyen egy második lépésben az előző metodika szerint alakítottunk ki fény hatására polimerizálható csoportokat. A keresztkötések kialakítása CDI-es aktivációt követően 2,2-etiléndioxi-dietilamin (Sigma-Aldrich) segítségével történt 24 órás intenzív keverés mellett. A reaktív csoportokkal történő módosítás újabb CDI aktiválást követően történt, az előzőekben vázolt AEM alkalmazásával.

A reakciók sikerességének ellenőrzése, a részecskék méret meghatározása, a nanogélek kialakítása, a mechanikai vizsgálatok, valamint duzzadási sajátságok nyomon követése az előzőekben kidolgozott módszerekkel megegyeztek.

A kioldódás vizsgálat Dionex Ultimate 3000 HPLC készüléken, Accucore®aQ (C18, 2,6 μm) kolonna alkalmazásával történt, gyakorlati relevanciával bíró hatóanyagként ampicillint (Sigma-Aldrich) választva.

Az alapvető sejt-életképességi vizsgálatok Alamar Blue teszt segítségével kerültek végrehajtásra, míg a nanogélek sejtekre gyakorolt hatását SAOS-2 (osteosarcoma) sejtvonal segítségével fluoreszcens és konfokális lézer szkennig mikroszkópia módszerekkel vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

HEMA-PEGDMA-alapú nanorészecske, hidrogél és nanokompozit előállítása és jellemzése

Első kísérletsorozatunkban mind a DLS, mind pedig a SEM eredmények bizonyították az előállított nanorészecskék 100 nm körüli, vagy az alatti méretét. Szárított állapotban, a SEM képek tanulsága szerint 50-150 nm közötti méreteloszlást találtunk, míg a DLS mérés eredményeként ez 5-500 nm közé esett. Az így előállított nanorészecskékkel módosítottuk az 50/50 HEMA/PEGDMA hidrogélt, 30%-ban alkalmazva a nanorészt. Az így kialakított nanokompozit mechanikai tulajdonságait vetettük össze a 10-90% között változó térhálósűrűségű hidrogélek sajátságaival. Azt tapasztaltuk, hogy a nanokompozit esetében a stressz emelkedése gyorsabb volt, mint akár a 90%-os térhálósűrűségű hidrogél esetében, a végső erőhatás viszont, ahol a törés bekövetkezett, attól elmaradt. Azt így is kijelenthetjük, hogy a nanorészecskék alkalmazása jelentősen befolyásolta a mechanikai tulajdonságokat, növelve a hidrogél szilárdságát. A duzzadási sajátságokat tekintve az alap hidrogél, már az első fél órában elérte az egyensúlyi tömeget, míg a nanokompozit esetében ehhez 22 órára volt szükség. A tömegnövekedésben is különbség volt tapasztalható, mert míg az alap gél

esetében ez 13%-ban állapotott meg, addig a kompozitnál ez 21% körül alakult. A kioldódási tulajdonságok, mint a vizsgálat egyik központi eleme, szintén azt mutatta, hogy a nanorészecskék alkalmazása befolyással van a hidrogél sajátságaira. Az alap hidrogélhez viszonyítva a nanorész, illetve a mátrix hatóanyaggal történő töltései, azt az eredményt hozták, hogy ha csak a mátrix, vagy csak a nanorész volt töltve, akkor egyik a másik töltetlenségéből kifolyólag jelentős mértékben kioltotta egymás hatását. Mikor viszont a nano- és a mátrix-rész is töltve volt, és ezt hasonlítottuk az alap gélhez egy bizonyos mértékű elnyújtó hatás volt tapasztalható a kioldódás profiljában, mely a kezdeti szakaszban - az első 48 órában - volt megfigyelhető.

PGA-alapú hidrogél előállítás és jellemzése

A biokompatibilis modellrendszert követően biodegradábilis tulajdonságokkal is rendelkező alapanyag segítségével kívántunk fogászati gyakorlatban alkalmazott fényhatására (385-515 nm) polimerizálható, hatóanyagot elnyújtva kibocsátani képes rendszert előállítani. Ehhez először a kiválasztott PGA-t reaktív – metakril - csoporttal kellett módosítani. A reakció sikerességét NMR vizsgálatokkal igazoltuk, mely spektrumok bizonyították, hogy a számított 50% reaktív-csoport kötődése nem következett be, de a reakció

sikeressége meghaladta a 10%-ot. Ez a reaktív csoport mennyiség azonban elegendőnek bizonyult, hogy egy új iniciátor - az Irgacure 2959 - alkalmazásával elérjük a 90 másodperc alatt bekövetkező polimerizációt. A kialakított hidrogélek mechanikai tulajdonságait vizsgálva azt találtuk, hogy nyomószilárdság érték 12,99 N (SD: 5,14) volt 0,94 mm/mm (SD:0,16) összenyomódás mellett. Ez 0,77 MPa (SD: 0,27) feszültség értéknek felel meg, s a Young modulus 0,36 MPa (SD: 0,06)-nak adódott, ami jelzi, hogy egy rendkívül rugalmas, de stabil struktúrát sikerült előállítani. A hidrogélek duzzadási kinetikáját, párhuzamos módon a hatóanyagot nem tartalmazó, és a hatóanyaggal töltött esetben tömegméréssel vizsgáltuk. Az volt a tapasztalat, hogy az első fél órában végbemenő jelentős tömegnövekedés - közel 150% a töltetlen, és több mint 200% a töltött gélek esetében - üteme a továbbiakban csökkent. A második órára a töltetlen gélek több mint 200%-os duzzadása, s a töltöttek esetében megjelenő közel 300%, a 4-5. órára érték el az egyensúlyi állapotot, amely töltetlen géleknél 250%-körül, míg metronidazollal töltött esetben 310%-körül volt. A duzzadási profil felvételét követően a kioldódási sajátságok vizsgálatát végeztük el. A gélek fele (5db) hatóanyagot nem tartalmazó kontroll minta volt, míg a másik fele 3,33 mg/g metronidazolt tartalmazott. A kioldódás dinamikája a duzzadással párhuzamosan alakult. Az első két órában egy 5ng/mm² szintet elérő

gyors kioldódás „kirobbanó-effektus” volt megfigyelhető, amit a rendszer a következő hat órában bekövetkező egyensúlyi állapotba kerülése követett.

Ezen biodegradábilis hatóanyag-leadó rendszer további felhasználhatósága szempontjából elengedhetetlen volt a biokompatibilitás bizonyítása is. Ezt CaCo-2 sejtvonalon végrehajtott MTT-formázán, mint életképesség, és LDH, mint citotoxicitás vizsgálat segítségével demonstráltuk mind az alapanyagokra, mind pedig az elkészült gélek esetében. Ezen túlmenően pedig immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonal morfológiai tulajdonságainak megfigyelésével vizsgáltuk a gél közvetlenül a sejtekre gyakorolt hatásait. Az MTT-teszttel az alapanyagok között vizsgáltuk az alap PGA-t, a reaktív-csoporttal módosított polimert (10-40 mg/ml konc. tartományban) és az iniciátort is (0,25-2,5 mg/ml között), illetve magát az elkészült hidrogélt. A tapasztalat az volt, hogy jelentős változást a sejtek életképességében, egyik esetben sem lehetett tapasztalni a változások a 2%-os csökkenést sem érték el. Ugyanezen koncentráció tartományokban került sor a citotoxicitás vizsgálatokra is. Az előző tapasztalatokhoz hasonlóan, ez a vizsgálat is azt mutatta, hogy az anyagok jelentős citotoxicitással nem rendelkeznek, 4%-nál nagyobb érték nem volt mérhető sem az alapanyagok esetében, sem az elkészített polimerekre. Ez az érték az iniciátor esetében sem emelkedett 5% fölé. A sejt morfológiai vizsgálatok is előző vizsgálatainkkal összhangban arra az eredményre

vezetettek, hogy a kontrollként használt kezeletlen felületre letapadt sejtekhez hasonlóan, a géllal bevont felületen növekedő sejtek alakja nem változott számottevően. A 6- és 24-órás megfigyelést követő felvételek alapján kijelenthetjük, hogy a módosított polimer alapú hidrogélek nem toxikusak, biokompatibilis jellegük megerősítést nyert azáltal, hogy a normál keratinociták morfológiai tulajdonságait sem befolyásolják jelentős mértékben.

PGA-alapú nanorészecskék és nanorészecskékből felépülő hidrogél – nanogél - előállítása és jellemzése

Munkánk záró szakaszában a biodegradábilis alapanyagként alkalmazott PGA-t egy közbevetett módosításnak köszönhetően nanorészecskékké formáltuk. Ezt követően az előzőlegesen kidolgozott eljárással kapcsolunk rá reaktív csoportot így a fogászati gyakorlatban alkalmazott fényforrások által polimerizálható tulajdonsággal rendelkező nanorészecskéket alakítottunk ki. A reakciók sikerességét NMR vizsgálatokkal igazoltuk. A keresztkötő diamin és a metakril-csoportok jelenlétét bizonyító csúcsok a spektrumokban egyértelműen azonosíthatóak. A kialakított alapanyag nano mérettartományba eső dimenzióinak vizsgálatait SEM és DLS módszerekkel

történtek. Óvatos dehidratálást követően, kritikus ponton történő szárítást alkalmazva állítottuk elő a vizsgálatok során alkalmazott felületi és töret felszíneket. A felvételeken jól kivehetőek a 100 nm alatti objektumok, melyek az egész struktúrát alkotják, és a különböző szálak és a részecskék melyek mérettartománya szintén 50-100 nm között található. A DLS vizsgálat eredményei natív vizes közegben is jó egyezést mutattak az elektronmikroszkóp által mutatott képpel. A 100 nm körüli vagy az alatti mérettartományok közül az alacsonyabb mérettartomány képviseli a jelentősebb hányadot. A metakrilált-PGA-nanorészecse (MPGA-NP) felhasználásával Irgacure 2959 fotoiniciátor (2n/n%) alkalmazása mellett sikerült 3 perces polimerizációs idő alatt hidrogélt/nanogélt kialakítani. Az így kapott nanogél mechanikai tulajdonságait vizsgálva a Young-modulus mért értéke 0,37 MPa (SD:0,20), míg a törési feszültség érték 0,38 MPa (SD:0,10) volt, s mindez átlag 85%-os összenyomódás elviselésével párosult. Ezen értékek azt mutatják, hogy egy az előzőleg kialakított hidrogéltől kevésbé erős, de még mindig a gyakorlati felhasználáshoz megfelelő fizikai tulajdonságokkal rendelkező struktúrát sikerült előállítani. A nanogélek duzzadási sajátságait tanulmányozva, azt tapasztaltuk, hogy az alap hidrogélek duzzadási szintjét sem érik el, nagyságrendileg a 110% körül értékeket kaptunk. Ez a felhasználás szempontjából kedvező tulajdonságként vehető számításba, az alkalmazási hely korlátolt

térfogatából kifolyólag. A kialakított nanorendszer által kibocsátandó hatóanyagként egy az orvosi gyakorlatban is általánosan alkalmazott vegyületet, az ampicillint választottunk. A hatóanyaggal töltött nanogél kioldódási sajátosságainak vizsgálata kumulatív kioldódási módszerrel történt, 1 hetes vizsgálati idő alatt, fiziológias sóoldatot alkalmazva kioldódási közegként. A minták HPLC-s elemzését követően az eredmények jól mutatják a - már korábban is említett - kezdeti „kirobbanó effektus” megjelenését, majd ezt követően kísérhetjük figyelemmel az egyensúlyi állapot kialakulását a 24. órára. A fő különbség az alap hidrogél és a nanogél között az volt, hogy a nanorendszer esetében a kioldódott hatóanyag mennyisége 80%-os szinten maradt. Ez a visszatartó hatás a szabályozási lehetőség egy alapját képezheti. A nanogélek biokompatibilitásának vizsgálata Alamar-Blue teszt segítségével történt. A sejtek életképességét és növekedési potenciálját SAOS2 sejtvonalon morfológiai vizsgálatain keresztül állapítottuk meg. Az eredményeink alátámasztására, konfokális lézer szkennig mikroszkópia segítségével is bizonyítottuk a kialakított rendszer biokompatibilis sajátosságait.

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatásunk első részében sikerült biokompatibilis alapanyagok (HEMA, PEGDMA) felhasználásával különböző térhálósűrűségű hidrogéleket előállítani, melyeket mechanikai tulajdonságaikon keresztül jellemeztünk. Azonos alapanyagokból sikeresen alakítottunk ki nanorészecskéket, melyek felhasználásával nanokompozit hidrogél szintézisét valósítottuk meg. A hidrogélek, és a nanokompozit előállítása is a fogászati gyakorlatban alkalmazott látható „kék” fény alkalmazásával, fotopolimerizáció útján történt. A nanokompozit hidrogél (66% térhálósított alapgél, 33% térhálósított nanorészecskével módosítva) nyomószilárdsága, a 90% térhálósító komponenst tartalmazó hidrogéltől is magasabb értéket mutatott. A kioldódási paramétereket vizsgálva bizonyítást nyert, hogy a nanorészecskék nagymértékben befolyásolni képesek ezen sajátságokat. Az alap néhány órás profil helyett, akár 48 órás elnyújtott hatóanyag kibocsátás elérése is lehetséges alkalmazásukkal.

A második és harmadik részben biodegradábilis PGA polimer módosításain keresztül került sor fogászatban alkalmazott fényforrás hatására polimerizálható anyagok előállítására. Reaktív metakril-csoporttal történő módosítás során, fényre polimerizálható hidrogél, keresztkötő ágens és reaktív csoport egymást követő alkalmazásával pedig, nanogél

alapanyagául szolgáló polimereket alakítottunk ki. Megfelelő - Irgacure 2959 - fotoiniciátor alkalmazása mellett sikerült elérni a 90-180 másodperces reakcióidő intervallumot. A kialakított hidrogél és nanogél mechanikai tulajdonságai és duzzadási sajátságai, az alkalmazás területén szükséges elvárásoknak - szájon belül, pl. a fog melletti gyulladással területeken - eleget tesznek.

A hidrogél biokompatibilitás vizsgálatai bizonyították, hogy sem az MTT teszttel felmérhető életképességet nem befolyásolják jelentősen, sem az LDH-aktivitás mérésével kimutatható citotoxikus tulajdonságokat nem mutatnak, sem a polimerizált gélek, sem az alapanyagok. Sejtmorfológia vizsgálatok során, HaCaT sejtek tanulmányozásán keresztül is ezzel azonos eredményeket kaptunk 6 és 24-órás megfigyeléseket követően is. A nanogél esetében Alamar Blue teszt segítségével került sor a biokompatibilitás bizonyítására, amit fluoreszcens és konfokális lézer szkennelési mikroszkópiás vizsgálatokkal támasztottunk alá. A biokompatibilitási teszt 3 napos intervallumon mutatta be a sejtek életképességét, míg a mikroszkópiás vizsgálatokkal egy héten keresztül követtük a proliferációs hajlamot SAOS2 sejtek esetében. Minden vizsgálat a nanogél biokompatibilitását bizonyította, illetve, hogy a sejtek növekedéséhez alkalmas környezetet képes biztosítani.

A hidrogél kioldódási tulajdonságait tekintve

elmondható, hogy a metronidazol, mint antibakteriális hatóanyag leadása a kísérlet körülményei között viszonylag gyorsan, néhány óra leforgása alatt lezajlott. Ez a jövőben egyéb anyagcsoportokkal történő kombináció, vagy az alkalmazás helyén fennálló körülmények következtében szándékunk szerint változtatható. A nanogél esetében ampicillint, mint hatóanyagot vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy a hidrogélhez viszonyítva egy bizonyos mértékű – ~20% - visszatartás volt megfigyelhető, mely egyfajta szabályozási lehetőség alapját képezheti.

Így ezen hidrogél, és nanogél rendszerek potenciális jelöltként tekinthetők biológiai környezetben - pl. intraorális alkalmazás során fogágy betegségek kezelésében, vagy felületmódosított implantátumok integrációját elősegítő eszközként - történő felhasználásra. In-situ polimerizálható hatóanyag-leadó rendszerként történő alkalmazása számos előnyt rejthet magában, melyek kombinációi további kutatások alapját képezhetik.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

HEMA-PEGDMA alapanyagok felhasználásával:

- I. Különböző térhálósűrűségű hidrogéleket, nanorészecskéket, és „nanokompozit”-hidrogélt állítottunk elő.
- II. Bizonyítottuk a nanorészecskék által elérhető erősítő hatást a gélek mechanikai tulajdonságainak vizsgálatával.
- III. Kimutattuk a nanorészecskék által elérhető szabályozó hatást a hatóanyag-leadás tekintetében nanokompozit rendszerek esetében.

PGA alapanyag alkalmazásával:

- I. Fogászati gyakorlatban alkalmazott „látható-fény” (385-515 nm) hatására polimerizálható anyagot alakítottunk ki, amely felhasználásával fotopolimerizáció útján hidrogélt állítottunk elő.
- II. Több lépéses reakció során, „látható-fény” hatására polimerizálható-PGA nanorészecskéket állítottunk elő.
- III. Kizárólag nanorészecskék alkotta hidrogélt - nanogélt - állítottunk elő fogászati gyakorlatban használt „kék fény” (385-515 nm) hatására bekövetkező fotopolimerizáció útján.
- IV. Fizikai, és biokompatibilitási tulajdonságain keresztül bizonyítottuk a PGA alapú hidro- és nanogélek felhasználhatóságát hatóanyag-leadó rendszerekben.



Jelölt: Bakó József
Neptun kód: SG9XWE
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036858

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

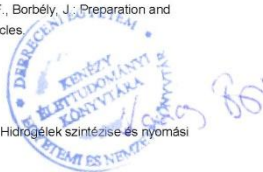
- Bakó, J.**, Kerényi, F., Hrubí, E., Varga, I., Daróczy, L., Dienes, B., Csernoch, L., Gáll, J., Hegedűs, C.: Poly-[gamma]-Glutamic Acid Nanoparticles Based Visible Light-Curable Hydrogel for Biomedical Application.
J. Nanomater. 2016, 1-10, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7350516>
IF:1.644 (2014)
- Bakó, J.**, Vecsernyés, M., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Borbíró, I., Bíró, T., Borbély, J., Hegedűs, C.: Composition and characterization of in situ usable light cured dental drug delivery hydrogel system.
J. Mater. Sci.-Mater. Med. 24 (3), 659-666, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4825-x>
IF:2.379
- Bakó, J.**, Szepesi, M., Veres, A.J., Cserháti, C., Borbély, Z.M., Hegedűs, C., Borbély, J.: Synthesis of biocompatible nanocomposite hydrogels as a local drug delivery system.
Colloid Polym. Sci. 286 (3), 357-363, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-007-1793-7>
IF:1.736





További közlemények

4. **Bakó J.**, Kelemen M., Szalóki M., Vítályos G., Radics T., Hegedűs C.: Fogszor alaplemezből kioldódó allergének kötődésének vizsgálata Fourier-Transzformációs Felületi Plazmon Rezonancia (FT-SPR) módszerrel.
Fogorv. Szle. 107 (1), 13-18, 2015.
5. Bukovinszky K., Molnár L., **Bakó J.**, Szalóki M., Hegedűs C.: Folyékony kompozitok és töltetlen kompozit gyanta polimerizációs zsugorodásának összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 106 (4), 3-8, 2014.
6. Kúttor, A., Szalóki, M., Rente, T., Kerényi, F., **Bakó, J.**, Fábián, I., Jenei, A., Lázár, I., Hegedűs, C.: Preparation and application of highly porous aerogel-based bioactive materials in dentistry.
Front. Mater. Sci. 8 (1), 46-52, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11706-014-0231-2>
IF:1
7. Katona B., Daróczy L., Jenei A., **Bakó J.**, Hegedűs C.: Implantátumok felületi sajátosságainak összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 106 (4), 135-143, 2013.
8. Maroda, M., Bodnár, M., Berkó, S., **Bakó, J.**, Erős, G., Csányi, E., Szabó-Révész, P., Hartmann, J.F., Kemény, L., Borbély, J.: Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system.
Carbohydr. Polym. 83 (3), 1322-1329, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.039>
IF:3.628
9. Bodnár, M., Daróczy, L., Batta, G., **Bakó, J.**, Hartmann, J.F., Borbély, J.: Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles.
Colloid Polym. Sci. 287 (8), 991-1000, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-009-2061-9>
IF:2.057
10. Szepesi M., **Bakó J.**, Márton S., Borbély J., Hegedűs C.: Hidrogélek szintézise és nyomási szilárdságuk vizsgálata.
Fogorv. Szle. 100 (1), 27-32, 2007.





11. **Bakó J.**, Szepesi M., Márton I., Borbély J., Hegedűs C.: Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására alkalmas nanorészecskék szintézise.
Fogorv. Szle. 100 (3), 109-113, 2007.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,444

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,759

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.06.16.



*Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia
megjelenések:*

Előadások:

1. **Bakó József**, Hegedűs Csaba, In situ –kék fény hatására-polimerizálható nanogél előállítás, és fogászatban alkalmazható hatóanyag-leadó tulajdonságának vizsgálata, Árkövy Vándorgyűlés, Szeged, 2016. május 5-7.
2. **Bakó József**, Hegedűs Csaba, Látható fény hatására polimerizálódó, poli- γ -glutaminsav nanorészecskékből felépülő nanogél, mint hatóanyag leadó rendszer. Fogpótlástani Napok, Pécs, 2015. Szeptember 24-26.
3. **Bakó József**, Dr. Hegedűs Csaba: Poli- γ -glutaminsav nanorészecskék alkotta nanogél, mint hatóanyag-leadó rendszer XV. Debreceni Fogászati Napok, Debrecen, 2014. Április 3- 5.
4. **Bakó József**: Biokompatibilis és biodegradábilis polimerek a fogászatban, Dr. Hegedűs Csaba, Dr. Alberth Márta és Dr. Redl Pál 60. születésnapja alkalmából tartott rendhagyó tudományos ülés, Debrecen, 2013. Szeptember 20.
5. **Bakó József**, Borbély János, Hegedűs Csaba, Kizárólag poli- γ -glutaminsav nanorészecskékből felépülő hatóanyag leadó rendszer előállítás, Debrecen, Magyar Fogorvosok Egyesületének Fogpótlástani Társaságának XX. jubileumi kongresszusa, 2013. Szeptember 27- 28.

6. **Bakó József**, Ujhelyi Zoltán, Kovácsné Bácskay Ildikó, Borbíró István, Biró Tamás, Borbély János, Hegedűs Csaba, Látható fényre polimerizálódó, biodegradábilis hatóanyagleadó rendszer előállítása és vizsgálata, XIV. Debreceni Fogászati Napok, Debrecen 2013. Április 12-13.
7. **Bakó József**, Ujhelyi Zoltán, Kovácsné Bácskay Ildikó, Borbíró István, Biró Tamás, Borbély János, Hegedűs Csaba, Fogászatban alkalmazható hatóanyagok leadására képes, fényre polimerizálódó hidrogél rendszer előállítása és jellemzése, Pécs, Árkövy Vándorgyűlés, 2012. Szeptember 20-22.
8. **Bakó József**, Ujhelyi Zoltán, Kovácsné Bácskay Ildikó, Borbíró István, Biró Tamás, Borbély János, Hegedűs Csaba, In-situ alkalmazható fogászati hatóanyagleadó rendszerek előállítása és jellemzése, Hévíz, Magyar Fogorvosok Egyesületének fogpótlástani Társasága továbbképző tanfolyama és XIX. Kongresszusa 2011. Október 7.
9. **Bakó József**, Szepesi Márta, Borbély János, Hegedűs Csaba, Hatóanyag leadására alkalmas rendszerek a fogászatban, XII. Debreceni Fogászati Napok, Debrecen, 2011. Április 8-9.
10. Hegedűs Csaba, **Bakó József**: Hatóanyag kibocsátásra alkalmas hidrogélek a fogászatban, Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése Budapest, 2009. Augusztus 27-29.

11. **Bakó József**, Hegedűs Csaba: Biodegradábilis nanokompozit hidrogélek szintézise és vizsgálata, A klinikai orvostudományok doktori iskola 2009.évi PhD szimpóziuma, Debrecen, 2009. Június 29.
12. **Bakó József**: Hatóanyag leadására alkalmas polimerek a fogászatban, Magyar Fogorvostanhallgatók Egyesülete találkozó, Debrecen 2008. Október 10-12,
13. Szepesi Márta, **Bakó József**, Borbély Zsuzsanna, Veres Adrienn Judit, Borbély János, Hegedűs Csaba: Nanokompozit hidrogélek szintézise, fizikai tulajdonságaiknak, valamint kioldódási sajátságaiuknak vizsgálata; Magyar Fogorvosok Egyesülete Árkövy Vándorgyűlése, Debrecen 2006. Augusztus 31-Szeptember 2.
14. Szepesi Márta, **Bakó József**, Borbély Zsuzsa M., Veres Adrienn Judit, Borbély János, Hegedűs Csaba: Nanokompozit hidrogélek szintézise, fizikai tulajdonságaiknak, valamint kioldódási sajátságaiuknak vizsgálata, Doktorandusz Konferencia, Debrecen, 2006. Április 10.
15. Szepesi Márta, **Bakó József**, Borbély Zsuzsa M., Veress Adrienn Judit, Borbély János, Hegedűs Csaba, Hatóanyag leadására alkalmas hidrogélek előállítása és vizsgálata, Tudományos továbbképző konferencia és fogorvostalálkozó, Szeged 2006. Április 22.
16. Szepesi Márta, **Bakó József**, Borbély Zsuzsa, Borbély János, Hegedűs Csaba, Hidrogélek szintézise és hatóanyagtartalmuk kioldódásának vizsgálata, MFE

Fogpótlástani társasága XVI. Kongresszusa, Sopron, 2005. Október13-15.

Poszterek

1. Csaba Hegedűs, **József Bakó**, Farkas Kerényi, Edit Hrubí, Lajos Daróczi, Beatrix Dienes, Poly- γ -glutamic acid created, visible light-curable nanogel as in situ useable drug delivery system. World Congress on Dental Research, Dubai, UAE., 2015. November 23-25.
2. **József Bakó**, Farkas Kerényi, Edit Hrubí, Lajos Daróczi, Beatrix Dienes, Csaba Hegedűs, Visible light-curable, nanoparticles created hydrogel for in situ useable drug delivery system, 27th European Conference on Biomaterials, Lengyelország, Krakkó, 2015. Augusztus 30 - Szeptember 3.
3. Csaba Hegedus, **Jozsef Bako**, Tunde Rente, Light cured nanocomposite hydrogel as dental drug delivery system. 93rd General Session & Exhibition of the IADR/44th Annual Meeting of the AADR/39th Annual Meeting of the CADR, Boston Massachusetts, USA., 2015. Március 11-14.
4. **Jozsef Bako**, Marta Szepesi, Andrea Kuttor, Farkas Kerényi, Attila Jenei, Csaba Hegedus A poszter címe: Drug release from visible-light curable biodegradable nanocomposite hydrogel systems, 6th International Conference on Drug Discovery and Therapy, Egyesült Arab Emírségek, Dubai, 2014. Február 10-12.

5. **Bakó József**, Szepesi Márta, Borbély János, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó, Hegedűs Csaba, Biodegradable and photopolymerizable hydrogels in dentistry, Budapest, IADR CED 2011. Augusztus 31-Szeptember 3.
6. **József Bakó**, Márta Szepesi, János Borbély, Csaba Hegedűs: Photocurable biodegradable nanocomposite hydrogels, IADR-Continental European Division (CED), München, 2009. Szeptember 10-12.
7. **Bakó József**, Szepesi Márta, Hegedűs Csaba: Nanokompozit hidrogélek szintézise és vizsgálata, Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése Budapest, 2009. Augusztus 27-29.
8. **Jozsef Bako**, Csaba Hegedus, Janos Borbely: Biodegradable Nanocomposite Hydrogels From PGA, Polymer Networks Group conference, Cyprus, Larnaca 2008. Június 22-26.
9. **Jozsef Bako**, Marta Szepesi, Janos Borbely, Csaba Hegedus: Biocompatible nanocomposite hydrogels in dentistry, 32nd Annual Congress of European Prosthodontic Association (EPA), Pécs, 2008. Szeptember 4-6.
10. **Jozsef Bako**, Marta Szepesi, Csaba Hegedus and Janos Borbely: Drug release from nanocomposite hydrogels, 9th conference on colloid chemistry, Siófok, 2007. Október 3-5.
11. **Jozsef Bako**, Marta Szepesi, Csaba Hegedus and Janos Borbely: Drug release from nanocomposite hydrogels, European Polymer Congress, Portoroz, 2007. Július 2-6.

12. **J. Bako**, M. Szepesi, Z. M. Borbely, C. Hegedus, and J. Borbely: Synthesis of Biocompatible Nanocomposite Hydrogel as a Local Drug Delivery System, NSTI Nanotech, Santa Clara, 2007. Május 20-24.
13. **József Bakó**, Márta Szepesi, Adrienn Judit Veres, Zsuzsa M. Borbély, Csaba Hegedűs, János Borbély: Chlorhexidine release from nanocomposite hydrogels, ACS Meeting, Atlanta, USA, 2006. Március 24-29.
14. **Bakó József**, Szepesi Márta, Bodnár Magdolna, Hegedűs Csaba, Borbély János: Nanocomposit hydrogels, International Symposium on Polymer Conetworks, Gels and Membranes, Budapest, 2005. Szeptember 11-13.

*Az értekezés témájához nem kapcsolódó konferencia
megjelenések:*

Előadások:

1. **Bakó József**, Hegedűs Csaba, Szövettervezési (tissue engineering) céllal felhasználható anyagok, XVII. Debreceni Fogászati Napok, Debrecen, 2016. április 14-16.
2. **Bakó József**, Hegedűs Csaba, Csontosodást elősegítő anyagrendszerek (scaffolds) a fogászatban. XV. Debreceni Fogászati Napok, Debrecen 2015. Április 16-18.

3. **József Bakó**, Máté Kelemen, Csaba Hegedűs, Analysis of benzoyl peroxide and formaldehyde as dental allergens by FT-SPR method, Miskolc-Lillafüred, The 2nd International Conference on Competitive Materials and Technology Process (ic-cmtp 2), 2012. Október 8-12.
4. **Bakó József**, Osszeintegrációt elősegítő Ti-felületmódosítási eljárások, Fogorvos fogtechnikus találkozó. Debrecen 2010. Március 20.

Poszterek

1. T. Varga, J. Budai, I. Hanyecz, **J. Bakó**, C. Hegedus, K. Turzó, M. Radnai, Ellipsometric analysis of enamel bleached with tooth whitening agents, Budapest, IADR CED 2011. Augusztus 31-Szeptember 03.

Idézhető absztraktok:

1. Rácz R., Biri S., Hajdu P., Csik A., Vad K., Kökényesi S., Csarnovich I., Hegedűs Cs., Radics T., **Bakó J.**, Hegedűs V., Pálinkás J. *Application of an ECR ion source for ionic functionalization of implant materials on the nanoscale.* 21st International Workshop on ECR Ion Sources. ECRIS 2014. Nizhny Novgorod, Russia, ISBN 978-3-95450-158-8. 135-139.o.
2. **J Bakó**, M Kelemen and Cs Hegedus, *Analysis of benzoyl-peroxide and formaldehyde as dental allergens by FT-SPR method*, 2nd International Conference on

- Competitive Materials and Technological Processes IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 47 (2013) 012001, doi:10.1088/1757-899X/47/1/012001
3. **Bakó József**, Szepesi Márta, Borbély János, Vecsernyés Miklós, Bácskay Ildikó, Hegedűs Csaba, *Biodegradable and photopolymerizable hydrogels in dentistry*, Budapest, IADR CED 2011. 261
 4. T. Varga, J. Budai, I. Hanyecz, **J. Bakó**, C. Hegedus, K. Turzó, M. Radnai, *Ellipsometric analysis of enamel bleached with tooth whitening agents*, Budapest, IADR CED 2011. 46
 5. **József Bakó**, Márta Szepesi, János Borbély, Csaba Hegedűs: *Photocurable biodegradable nanocomposite hydrogels*, IADR-Continental European Division (CED), 2009. 270
 6. **Bako J**, Szepesi M, Hegedus C: *Synthesis and analysis of nanocomposite hydrogel*, ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 2010; 97(1): 91, IF: 1,226
 7. Hegedus C, **Bako J**: *Hydrogels as a drug delivery system in dentistry*, ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 2010; 97(1): 84, IF:1,226
 8. **J. Bako**, M. Szepesi, Z. M. Borbely, C. Hegedus, and J. Borbely: *Synthesis of Biocompatible Nanocomposite Hydrogel as a Local Drug Delivery System*, NSTI Nanotech 2007.
 9. Marta Szepesi, **Jozsef Bako**, Adrienn Judit Veres, Zsuzsa M. Borbely, Janos Borbely, Csaba Hegedus: *Nanocomposite Hydrogels as a drug delivery system in*

dentistry, International Association for Dental Pan
European Federation, Dublin, 2006. 0295

10. **József Bakó**, Márta Szepesi, Adrienn Judit Veres, Zsuzsa M. Borbély, Csaba Hegedűs, János Borbély: *Chlorhexidine release from nanocomposite hydrogels*, *Polymeric Materials: Science & Engineering* 2006, 94(1), 367-368.

Bejelentett szabadalom:

János Borbély, **József Bakó**, Márta Szepesi, Adrienn Judit Veres, Zsuzsa Mária Borbély, Csaba Hegedűs: *Chlorohexidine Release from Nanocomposite Hydrogels*, US Patent, 2006.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani, témavezetőmnek Professor Dr. Hegedűs Csabának támogatásáért, iránymutatásáért, valamint a kutatás feltételeinek biztosításáért.

Külön köszönöm, a Fogorvostudományi Doktori Iskola vezetőjének Professor Dr. Márton Ildikónak, hogy biztosította a dolgozat elkészítésének lehetőségét.

Köszönet illeti Dr. Borbély Jánost, a polimerekkel kapcsolatosan nyújtott elméleti és gyakorlati tanácsaiért.

Köszönöm minden jelenlegi, és korábbi kollégámnak, mind a közlemények, mind pedig a dolgozat elkészítése során nyújtott közreműködését, és segítségét.

Köszönettel tartozom szüleimnek, a tanulmányaim elvégzéséhez szükséges háttér megteremtéséért, és az élet minden területén megnyilvánuló támogatásukért.

S végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, feleségemnek, és lányomnak, Annának valamint fiamnak, Dávidnak végtelen türelmükért, és támogatásukért, mellyel biztosították a szükséges háttérrel, hogy ez a munka elkészülhessen.



Nemzeti
Kiválóság
Program



SZÉCHENYI TERV

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



KÖZIGAZGATÁSI ÉS IGAZSÁGÜGYI HIVATAL

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyierv.gov.hu
06 40 630 630



HÁLYKORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.