

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Humán bölcsességfog pulpából izolált DPSC őssejtek oszteoblaszt irányú differenciációjának vizsgálata BMP-2 növekedési faktor és epigenetikai jellegeket módosító anyagok hatására

Dr. Hrubai Edit

Témavezető: Prof. Dr. Hegedűs Csaba



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

Humán bölcsességfog pulpából izolált DPSC őssejtek oszteoblaszt irányú differenciációjának vizsgálata BMP-2 növekedési faktor és epigenetikai jellegeket módosító anyagok hatására

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Klinikai orvostudományok tudományágban.

Írta: Dr. Hrubai Edit okleveles fogorvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi doktori iskolája keretében.

Témavezető: Prof. Dr. Hegedűs Csaba, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Radnai Márta, PhD

Dr. Csík Attila, PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja:

Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar Dékáni tárgyaló. (Régi épület 2. emelet 228)

2025.10.01. 11:00

Az értekezés bírálói: Dr. Kerémi Beáta, PhD

Dr. Szöőr Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Radnai Márta, PhD

Dr. Csík Attila, PhD

Dr. Kerémi Beáta, PhD

Dr. Szöőr Árpád, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme. 2025.10.01.13:00

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
3. Célkitűzés.....	6
4. Anyagok és módszerek.....	7
5. Eredmények.....	11
6. Megbeszélés, fontosabb eredmények és következtetések	14
7. Összefoglalás.....	16
8. Irodalomjegyzék.....	18
9. Tárgyszavak.....	23
10. Köszönetnyilvánítás	24

1. Bevezetés

A fogászati praxis során számos esetben találkozunk, olyan páciensekkel, akik valamilyen mértékű csont hiánnyal rendelkeznek. A fogászati implantológia, sebészet és a parodontális szövet regeneráció területén kiemelt fontosságú a kialakult csontdefektusok kezelése. Az irodalomban számos csontpótlási technika és csontpótló anyag fellelhető, ugyanakkor számos előnyük mellett ezen anyagok alkalmazása többnyire hátrányokkal is jár. Vagy nem állnak kellő mennyiségben rendelkezésre, mint pl az autológ csont graftok vagy csontszöveté történő átépülésük és így felszívódásuk nem tökéletes. A csontpótlási törekvések legújabb irányzata, hogy saját mezenchimális őssejtek felhasználásával történjen meg a csontpótlás, akár a sejteket egy degradábilis szkaffolddal kombinálva vagy a sejteket közvetlenül differenciáltatva oszteoblasztokká, majd visszaültetve váljanak képessé a kritikus méretű csontdefektusok kezelésére is. A szájüregben számos mezenchimális őssejt típus megtalálható pl.: pulpából izolálható őssejtek (DPSC-maradófog, SHED- tejfog eredetű), a folliculusból izolált őssejtek (DFPC), a parodontális ligamentumokból (PDLSC), apikális papillából (SCAP), gingivából (GMSC), a buccalis zsírpárnából származó (BFPC) illetve a csontvelőből kinyerhető őssejtek. (1,2) Ezek közül a fog pulpájából izolálható őssejtek kinyerése a legegyszerűbb, sebészi úton eltávolított bölcsességfog pupájából könnyen izolálhatóak, MSC-kkel megegyező sejtfelszíni markereket expresszálnak. A DPSC-k heterogén sejtek csoportja, de számos irányba képesek differenciálódni pl.: odontoblaszt, cementoblaszt, oszteoblaszt, idegsejt, izomsejt, porcsejt, endothél sejt és akár zsírsejt irányba is. (2,3) Így terápiás alkalmazásukban nagy lehetőségek rejlenek a szövetregenerációban a fogászat területén.

Mindezek mellett az irodalomban számos bioaktív szerves molekula hatását vizsgálják, melyek szintén alkalmasak lehetnek csont regeneráció tökéletesítésére valamilyen szilárd hordozóval/szkaffolddal kombináltan alkalmazva ezen anyagokat, vagy az őssejtek oszteoblaszt irányú differenciációjának elősegítésével. Ilyen molekulák lehetnek az extracelluláris mátrix fehérjék, például kollagén, kondroitin-szulfát, sejt-sejt kölcsönhatásban szerepet játszó adhéziós molekulák, például integrinek, oszteoblaszt progenitor sejtek differenciációját, valamint oszteoblaszt sejtek proliferációját elősegítő növekedési faktorok, mint például a BMP-2, BMP-7, parathormon. (4) Ezen anyagok alkalmasak lehetnek titán implantátumok felületének módosítására is, hogy ezzel elősegítsük az implantátumok oszeointegrációját és minimalizáljuk az esetleges szövődményeket. Ígéretes molekulák lehetnek a csontregeneráció elősegítésében a csont morfogenetikus fehérjék (BMP-k) illetve a

gyógyászat más területein használt TSA, EZH2 inhibitor, 5-AZA is, melyek bizonyítottan elősegíthetik a csontregenerációt. (24, 25, 26, 27, 28, 29)

2. Irodalmi áttekintés

A csontképződés folyamatát oszteogenezisnek nevezzük, mely folyamat az embrionális fejlődés hatodik és hetedik hete között kezdődik, és körülbelül huszonöt éves korig tart. A csontfejlődésnek két típusát különböztetjük meg az intramembranosus és endochondralis csontosodást. Ezen folyamatok mindegyike egy mezenchymális szövet prekuzorral kezdődik, de a csonttá átalakulás módja eltérő. Az intramembranosus csontosodással képződnek a calvaria, a kulcscsont és a koponya lapos csontjai is, ebben az esetben közvetlenül alakulnak csonttá a mezenchymális szövetek. Az endochondrális csontosodás során a mezenchymális szövet először egy porc köztitermékké, majd ezt követően csonttá alakul. Ilyen módon képződik az axiális csontváz és a hosszú csöves csontok. Mivel a csont egy dinamikus szerv, képződést követően is folyamatosan megújul, terhelés hatására képes átépülni, ezt a folyamatot remodellingnek nevezzük. A csont homeosztázisa viszont nagyon komplex folyamat, a képződött csont mennyiségét és minőségét, több tényező is befolyásolja. Számos jelátviteli folyamat által szabályozott. Ilyen jelátviteli útvonalak többek között a TGF- β , BMP, Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog és a NELL jelátviteli útvonalak. De az őssejtek differenciálódása nem csak genetikai szinten szabályozott a különböző DNS mintázatokhoz közvetlenül kötődő fehérjék (pl. transzkripciós faktorok) által, hanem epigenetikai mechanizmusokon keresztül is. Ezek a mechanizmusok magukban foglalják a DNS-metilációt és a hiszton poszttranszlációs módosításait. Számos epigenetikai jelleget módosító ágens fejlesztettek ki klinikai felhasználásra a rákterápiában a sejtproliferáció gátlására a kromatin remodelling komplexek funkciójának módosításával. (5-7) Ezek a gyógyszerek befolyásolják az őssejtek sorsát is (8), és felgyorsítják a DPSC-k oszteogén differenciálódását és mineralizációját (8), ami új lehetőségeket nyit meg, ezen gyógyszerek alkalmazásában. Tekintettel arra, hogy a DPSC-k felhasználása ígéretes a szövetregenerációban a fogászat és az általános orvostudomány területén, előnyös lenne az oszteogén differenciálódásuk fokozása. Epigenetikai módosító szerek, akkor használhatók erre a célra, ha a DPSC-eket *in vitro* differenciálják (9), vagy ha a gyógyszeres kezelést biológiailag irányított módon lebomló polimerekkel kombinálják (10,11) a mellékhatások elkerülése érdekében.

3. Célkitűzés

A DPSC-k oszteogén és odontogén differenciációját szabályozó mechanizmusok megértése rendkívül fontos, ezen sejtek klinikai alkalmazása szempontjából. A sejtek oszteogén irányú elköteleződéséhez nem csak specifikus transzkripciós faktorokra van szükség, hanem epigenetikai szabályozó mechanizmusokra is. Ahhoz, hogy reprodukálhatóan tesztelni tudjuk az oszteoblaszt irányú differenciációt kiváltó anyagok (BMP-2, TSA, EZH2i és 5-AZA) hatását megbízható *in vitro* rendszerekre van szükség. **Munkám során a humán DPSC sejteket választottam ilyen rendszerként, amely sejtek potenciálisan alkalmasak csontpótlást célzó szöveti regenerációs célokra is.**

Vizsgálataim célja:

- Megvizsgáljam a csontregeneráció területén klinikai felhasználásra elfogadott BMP-2 homodimer hatását DPSC sejtek csont irányú differenciációjára.
- Megvizsgáljam az OIM médium komponenseinek egyedi, valamint BMP-2-vel kombinált hatását.
- Összehasonlítsam a DPSC sejtek BMP-2 kezelés hatására bekövetkező oszteoblaszt irányú differenciációs képességét egyéb oszteogén differenciálódási potenciállal rendelkező sejtvonalakkal (Saos-2, HEPM).
- Szintén megvizsgáljam epigenetikai jellegeket befolyásoló molekulák (TSA, EZH2i és 5-AZA) hatását, a DPSC-k oszteogén differenciációja során, melyek kombinált hatásait eddig még nem vizsgálták.
- További célunk között szerepel az általunk oszteogén differenciációra alkalmazott epigenetikai jellegeket módosító molekulák (TSA, EZH2i és 5-AZA) rövid és hosszú távú (1-3 hét) hatásainak összehasonlító vizsgálata.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtek tenyésztése és oszteoblaszt irányú differenciáció indukálása

A humán pulpából izolált őssejteket (DPSC-k) a szájüreggel nem közlekedő egyéb okból eltávolított impaktált bölcsességfogak pulpaszövetéből izoláltuk, korábban a munkacsoportunk által publikált közleményben leírt protokollnak megfelelően. (etikai engedély sz.F0102/1ST). (83) A Humán embrionális szájpadlásból származó mezenchimális preoszteoblasztokat (HEPM, ATCC No.: CRL-1486) Eagle's Minimum Essential Médiumban (EMEM, Sigma Aldrich, M5650), a Saos-2 oszteoszarcóma sejteket (ATCC No.: HTB-85), Dulbecco's Modified Eagle's médiumban (DMEM, Sigma Aldrich, D6046) és a DPSC sejteket pedig Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM-F12, ThermoFisher Scientific, 1132003) médiumban tenyésztettük. A médiumok kiegészítése 10% FBS-sel (Sigma Aldrich, F9665), 100 U/ml penicillinnel és 100 mg/ml sztreptomocinnel (Sigma Aldrich, P0781), illetve 1% GlutaMAX hozzáadásával (Life technology, 10567014) történt, valamint a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-ban, párasított atmoszférát biztosító termosztátban tenyésztettük. Továbbiakban az ábrákon és a szövegben a sejtenyésztésre használt általános médiumokban történő kezelések esetén „CM” (culture medium) az oszteoinduktív médiumokban történő kezelés esetén „OIM” (osteo inductive medium) megnevezéseket használjuk. Az OIM médiumba a CM médiumhoz képest, még 10 mM β-glicerofoszfát (Sigma Aldrich, G9891), 50 μg/ml aszkorbinsav (Sigma Aldrich, 1043003), 0,1 μM dexametazon (Sigma Aldrich, D4902) és 50 nM D₃-vitamin (Sigma Aldrich, 740292) került. Az ábrákon β-GLY, AA, DEX és a D₃ VIT-el jelölt minták esetén a CM médiumot külön-külön egészítettük ki 10 mM- β-glicerofoszfáttal (β-GLY), 50 μg/ml aszkorbinsavval (AA), 0,1 μM dexametazonnal (DEX) vagy 50 nM D₃-vitaminnal (D₃ VIT). A BMP-2-t (Antibodies-online GmbH, Z00327), 0,1 μg/ml végkoncentrációban használtuk. A BMP-2 törzsoldat liofilizált rekombináns humán BMP-2-ből készült a gyártó utasítása szerint, 1 mg/ml koncentrációban és a felhasználásig 10 μl-es aliquatokban –80 °C-on tároltuk. A kromatin epigenetikai változásainak indukálására a CM, illetve az OIM médiumokat 5 μM EZH2i-vel (ab269816; Abcam, Cambridge, UK), 10 μM TSA-val (ab146598; Abcam) vagy 1 μM 5-AZA-val (ab142744) egészítettük ki külön-külön vagy különböző kombinációkban. Az

5-AZA esetében a 0. napon 24 órás kezelést alkalmaztunk; a TSA és az EZH2i esetében a kezelés folyamatos volt. A médiumokat a mintákon 2 naponta cseréltük.

4.2. Alamar blue assay

Egy 96 lyukú sejttenyésztő plate (VWR, 89093- 608) minden well-jébe, 1000 sejt került a HEPM és a Saos-2 esetén és 7000 sejt a DPSC esetén. Overnight inkubálást követően a CM médiumot eltávolítottuk a sejtekről (0. nap) majd, 200 μ l szintelen DMEM-mel (Sigma Aldrich, D5921) történő mosást követően 200 μ l szintelen DMEM-ben 1:10 arányban hígított alamar blue reagenssel (Life Technologies, DAL 1100) a HEPM és Saos-2 sejteket 3 órán át, a DPSC sejteket 2 óráig 37 °C-on 5% CO₂-ban inkubáltuk. Az Alamar blue assay során alkalmazott inkubálási idők minden sejtípusra optimalizálva lettek. Az inkubáció után, a redukált Alamar blue fluoreszcenciáját Hidex Sense Microplate reader segítségével 535 nm-es gerjesztő fényvel és 595 nm-es emissziós szűrővel mértük. A mérés után a mintákon az Alamar blue reagenst az adott kísérletben alkalmazott, oszteoinduktív anyagokkal kiegészített médiumokra cseréltük. A méréseket minden második napon ismételtük, 8 napon keresztül. A fluoreszcencia intenzitás a 0. napon mért fluoreszcencia értékekre lett normalizálva.

4.3. Kalcium mennyiségi meghatározása

Egy 6 lyukú sejttenyésztő plate minden well-jébe 300 000 sejt került. Overnight inkubálást követően a CM médiumot másnap (0. nap) lecseréltük az adott kísérletben alkalmazott, oszteoinduktív anyagokkal kiegészített médiumokra. A médiumokat minden második napon cseréltük. 6, 12 és 18 nap után a sejteket mostuk kétszer 2 ml 1 \times PBS-sel (Sigma Aldrich, P5493), ezt követően 2 ml jéghideg (-20 °C) metanollal (Sigma Aldrich, 322415) 30 fixáltuk. A metanol eltávolítása után a minták 5 percig szobahőmérsékleten történő szárítását követően 2%-os (w/v) Alizarin Red S oldattal megfestettük (Sigma Aldrich, A5533), melynek pH-ját 4,2-re állítottuk be a HEPM és Saos-2 sejtek esetén és pH 7-re a DPSC esetén. Ezt követően a minták fotó dokumentálása történt. A képződött Alizarin Red S-kalcium komplexek kioldása 10 mM pH 7 nátrium-foszfát (Sigma Aldrich, P5244) pufferben beoldott 10% cetilpiridinium-klorid (Sigma Aldrich, C0732) oldattal történt. Az abszorbancia értékeket Hidex Sense Microplate readerrel mértük 570 nm-en. A mérések standardizálásához

a sejtek összfehérje tartalmát, Alizarin Red S-sel nem festett párhuzamos minták sejtlyizátumából Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, 23227) segítségével (a gyártó utasításainak megfelelően) határoztuk meg.

4.4. Alkalikus-foszfátáz aktivitás

Egy 6 lyukú sejttenyésztő plate minden well-jébe 300 000 sejt került. A sejtek overnight letapasztása után, másnap (0. nap) a CM médiumot lecseréltük, az adott kísérletben alkalmazott, oszteoinduktív anyagokkal kiegészített médiumokra. A médiumokat minden második napon lecseréltük a mintákon. 6, 12 ill. 18 nap illetve 7, 21 nap elteltével a médiumok eltávolítását követően a sejteket kétszer mostuk 2 ml $1 \times$ PBS-sel. Ezt követően a sejtek lizálását végeztük lízispufferben [10 mM Tris-HCl pH: 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% proteáz inhibitor koktél (PIC), 1% fenil-metil-szulfonil-fuorid (PMSF)] és a felkapart lizátum Eppendorf-csővekbe került. Centrifugálás után (10 000 g, 10 perc, 4 °C), a felülúszóból történt az enzimaktivitás, valamint a fehérjekoncentráció meghatározása (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, 23227). Az alkalikus foszfátáz aktivitás méréséhez a sejtlyizátumhoz 0,1% p-nitro-fenil-foszfáttal (Sigma Aldrich, N7653; 0,1 M glicin, 1 mM $MgCl_2$, $ZnCl_2$, pH 10,4) szubsztrátot adtunk, majd 6 perc inkubálás után az abszorbanciát Hidex Sense Microplate readerrel mértük 405 nm-en, kinetikus mérési módban 3 percenként ismételve a mérést 1 órán keresztül. A mért abszorbancia értékeket (ALP aktivitás) a fehérjekoncentrációkra normalizáltuk.

4.5. Real time kvantitatív PCR

Egy 6 lyukú sejttenyésztő plate minden well-jébe 300 000 sejt került. A sejtek overnight letapasztása után, másnap (0. nap) a CM médiumot lecseréltük az adott kísérletben alkalmazott, megfelelő oszteoinduktív anyagokkal kiegészített médiumokra. A médiumokat minden második napon lecseréltük. 4 nap után a Saos-2, 6, 12, 18 illetve 21nap után a DPSC-k esetén a médiumokat eltávolítottuk és a sejteket kétszer mostuk 2 ml $1 \times$ PBS-sel. A sejtlyizist, a teljes RNS extrakciót, a Real-Time qPCR-t és a relatív expressziók kiszámítását egy korábbi közlemény alapján végeztük (61). A PCR reakciót a 5x HOT FIREPOL Probe

qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) Master Mix-ben végeztük. A *RUNX2* (Hs00231692_m1; Applied Biosystems), *ALPL* (Hs01029144; Applied Biosystems) és *BMP-2* (Hs00154192_m1; Applied Biosystems) expressziós szintjeit minden minta esetén a *GAPDH* (glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) housekeeping génexpressziós szintjére normalizáltuk.

4.6. Statisztikai analízis

Az ábrákon a hibasávok a korrigált empirikus szórást (SD) jelentik három párhuzamos (1-5. ábrák), vagy három független (6-8. ábrák) mérésből számítva. A statisztikai elemzés többszörös összehasonlítás esetén ANOVA és Bonferroni post hoc statisztikai teszttel (1-5. ábrák), egy kontroll méréshez történő viszonyítás esetén ANOVA és Dunnett post hoc statisztikai teszttel (6-8. ábrák) végeztük. A szignifikancia szint minden esetben 5%-os volt ($\alpha=0,05$).

5. Eredmények

Munkám során először a BMP-2 sejtproliferációra gyakorolt hatását tanulmányoztam DPSC, Saos-2 és HEPM sejteken, a sejtenyésző (CM) vagy a differenciáltató médiumban (OIM) hígított BMP-2 koncentráció sorral történő 8 napos kezelés hatására. A sejtnövekedés mértéke mind három sejt típus esetén időfüggő módon csökkent a CM és OIM médiumok alkalmazása esetén is, kivéve a Saos-2 sejteket, ahol OIM médiumban a 4. napon a sejtnövekedés leállt, majd az idő előrehaladtával újra csökkenni kezdett. Az OIM összetevőit külön megvizsgálva azt találtam, hogy csak a β -GLY volt hatással mindhárom sejtvonagra, csökkentve a sejtek proliferációját. A DEX önmagában csak a DPSC sejtek osztódására volt gátló hatással, a másik két sejtvonagra nem.

A továbbiakban a csont irányú differenciációt a sejtek ALP aktivitásának, valamint az extracelluláris mátrix mineralizációjának (kálcium lerakódásainak) mérésével vizsgáltam. A mineralizációt CM-ben, OIM-ben, valamint az OIM összetevői közül a proliferációs mérések során a leghatásosabbnak bizonyult β -GLY-tal kiegészített CM-ben mértem 6 napos inkubációt követően. 6 nap után Alizarin Red S festéssel jól festődő kalciumfoszfát volt megfigyelhető az OIM-ban tenyésztett Saos-2 sejtek extracelluláris mátrixában. Kismértékű festődés látható volt DPSC sejteken is, azonban a kioldott festék kvantitatív analízise során nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll CM médiumhoz képest. A BMP-2 hatását vizsgálva jelentős növekedés volt megfigyelhető a DPSC és Saos-2 sejtek mineralizációjában is, amikor az OIM médiumot BMP-2-vel egészítettem ki, illetve Saos-2 sejtek esetén a β -GLY és BMP-2 kombinációjának hatására is.

Az oszteogén differenciáció kimutatásának egy további módszere a sejtek ALP aktivitásának mérése, amely szintén jelentősen megemelkedett OIM médiumban Saos-2 sejtek, illetve az OIM+BMP-2 kezelés hatására Saos-2 és DPSC sejtek esetén. Jelentős ALP aktivitásnövekedés volt megfigyelhető továbbá β -GLY-al és β -GLY+BMP-2 kombinációjával kezelt Saos-2 sejtekben is. Az oszteoblaszt irányú differenciációt 12 és 18 napig is vizsgáltam. Ezt a hosszabb vizsgálatot nem lehetett elvégezni OIM-ben tenyésztett Saos-2 sejtekkel, mivel a 6. nap után az élő sejtek száma jelentősen 12 nap után az OIM-ben tenyésztett DPSC sejtekben függetlenül attól, hogy a BMP-2 jelen volt-e a mintákban vagy hiányzott, nem mértünk mineralizációban növekedést, és úgy tűnt, hogy az alkalikus foszfatáz aktivitás is lecsökkent. Ez a különbség azonban nem volt statisztikailag szignifikáns. 18 nap elteltével viszont az OIM kezelés hatására ismét nőtt a mintákban a kalcium lerakódások mennyisége

és az alkalikus foszfatáz aktivitás is, emellett ha az OIM médiumot BMP-2-vel egészítettem ki, szinergikus hatás volt megfigyelhető az OIM és a BMP-2 között.

Az oszteoblaszt irányú differenciációt szabályozó korai marker géneket (*RUNX2*, *BMP-2*) is vizsgáltam real-time qPCR módszerrel. A Saos-2 esetében a *RUNX2* expressziós szintje nem változott a negyedik napon egyik kezelés esetén sem. Az endogén BMP-2 szintje azonban szignifikánsan megnőtt a β -GLY-tal kezelt sejtekben, valamint az OIM-ben. A BMP-2 továbbá szinergikus hatást fejtett ki OIM médiában. Mivel a mineralizáció és az alkalikus foszfatáz aktivitás mérések alapján a DPSC sejtek differenciációja hosszabb időt vesz igénybe, a génexpressziós vizsgálatot is ezek alapján 6, 12 és 18. napos differenciációt követően vizsgáltam. A sejteket CM-ben, OIM-ben, CM + BMP-2-ben és OIM + BMP-2-ben növesztettem. Eredményeim alapján a *RUNX2* expressziós szintje a 6. napon volt a legmagasabb, ami ezután fokozatosan csökkent a 12.-ik, illetve 18.-ik napra. Ez a trend megfigyelhető volt az OIM, CM+BMP-2 és OIM+BMP-2 kezelések esetén is, valamint a BMP-2 szinergista módon hatott OIM médiumban a *RUNX2* expressziójára. Ezzel szemben a BMP-2 szintje fokozatosan nőtt a 6. naptól a 18. napig OIM, CM+BMP-2 és OIM+BMP-2 kezelések esetén is. A BMP-2 ebben az esetben is szinergizmust mutatott az OIM médiummal.

Az epigenetikai jellegeket befolyásoló molekulák, EZH2i, TSA és 5-AZA, oszteoblaszt irányú differenciációt befolyásoló egyedi és kombinált hatását DPSC sejteken vizsgáltam a kezelt sejtek ALP aktivitásának, mineralizációjának, valamint oszteogén marker gének (*RUNX2*, *BMP-2* és *ALP*) expressziójának vizsgálatával.

A sejtek ALP aktivitását EZH2i, TSA vagy 5-AZA különböző kombinációival kiegészített CM-ben vagy OIM-ben történő 7, illetve 21 napos kezeléseket követően mértem. CM médiumban végzett kezelés hatására, az ALP-aktivitás a 7. napon nőtt meg, ha EZH2i-vel önmagában, vagy EZH2i+TSA vagy EZH2i+5-AZA kombinációival egészítettem ki a CM médiumot. Szintén CM médiumban 21. napos kezelés után az ALP aktivitás továbbra is szignifikánsan magasabb maradt az EZH2i-vel önmagában kezelt DPSC-kben, míg az 5-AZA kezelés negatív hatással volt az ALP aktivitásra önmagában, illetve a másik két anyaggal bármely kombinációban alkalmazva. CM-ben a TSA-val végzett rövid (7 napos) vagy hosszú távú (21 napos) kezelés nem volt hatással a sejtek ALP aktivitására. OIM médiumban az EZH2i a CM-hez hasonlóan növelte az ALP aktivitást 7 napos kezelés után. A TSA önmagában vagy más anyagokkal kombinációban nem volt hatékony ebben az időpontban, míg az 5-AZA negatív hatást fejtett ki. 21 napos kezelést követően csak a TSA-val kezelt

DPSC-k mutattak fokozott ALP aktivitást OIM médiumban, ezzel szemben az EZH2i és az 5-AZA csökkentette az enzim aktivitást. Az ALP aktivitás tekintetében szinergista hatás nem volt megfigyelhető egyetlen gyógyszer kombináció esetében sem, függetlenül attól, hogy CM vagy OIM médiumban történt a kezelés.

A gyógyszer hatóanyagokkal kezelt DPSC-k mineralizációját csak OIM médiumban történő kezelés után vizsgáltam, CM-ben nem, mivel korábbi kísérleteim alapján CM-ben, a szerves foszfát hiánya miatt, akkor sem várható a DPSC sejtek mineralizációja, ha olyan oszteogén differenciációt indukáló faktorral végezzük a kezelést, amely a csont irányú differenciációnak kedvező körülmények között hatásos (pl.: BMP-2) (14). Meglepő módon a mineralizáció nem nőtt semmilyen gyógyszeres vagy kombinált gyógyszeres kezelés hatására a 7. és a 21. napon sem, az OIM médiumban növesztett sejtekhez képest. EZH2i jelenlétében jelentős csökkenés volt megfigyelhető a 21. napon, ez megfigyelhető volt más gyógyszerekkel kombinációban történő alkalmazás során is, ami összhangban van az ALP aktivitás mérésekor tapasztalt negatív hatással.

Az epigenetikai jellegeket módosító gyógyszer molekulák oszteoblaszt irányú differenciációjára kifejtett hatását megvizsgáltam a *RUNX2*, *BMP2* és *ALPL* oszteogén marker gének expressziós szintjének mérésén keresztül is. A méréseket 21 napos kezelést követően végeztem el, mivel a hosszú távon fennmaradó epigenetikai változások következtében megemelkedett génexpresszió kimutatása volt a cél. CM médiumban az EZH2i-vel végzett kezelés önmagában vagy más hatóanyagokkal kombinálva pozitív hatással volt a vizsgált gének expressziós szintjére. Az OIM médiumban kezelt mintákban csak a TSA önmagában emelte meg mindhárom vizsgált gének expressziós szintjét, míg az EZH2i önmagában, valamint TSA-val és 5-AZA-val kombinálva gátolta a *BMP2*-t, illetve nem szignifikáns mértékben a *RUNX2*-t. Ezek az eredmények konzisztensek és korrelálnak az ALP aktivitásmérésekkel. Egyik vizsgált gyógyszer-kombinációban sem figyeltünk meg szinergikus hatást.

6. Megbeszélés, fontosabb eredmények és következtetések

- A BMP-2-ről ismert, hogy fokozza az oszteogén irányú differenciációt. A sejtek BMP-2-vel történő kezelése azonban a sejtípustól és az oszteoinduktív molekuláktól (molekuláris környezettől) függően különböző kimeneteket eredményezhet. (15,16)
- A BMP-2 gátolta a mindhárom sejtípus proliferációját koncentráció függő módon önmagában, CM-ben és kombinációban is oszteoinduktív anyagokkal.
- β -glicerofoszfát is mindhárom sejtípusban gátolta a sejtproliferációt. A BMP-2-vel kombinálva szinergista hatást találtunk a proliferáció gátlására a HEPM és a Saos-2 sejtekben. A publikált adatok szerint a proliferációs ráta csökkenése összefügghet a differenciálódási folyamattal.(17-20)
- A Saos-2 sejtekben feltehetően az oszteoblaszt irányú differenciáció gyorsabban következik be és a 4-dik naptól a differenciáció késői szakasza ment végbe, ahol elkezdődött a terminálisan differenciált oszteoblasztok által végzett mineralizáció és a későbbiekben a sejtek egy része apoptózis útján elpusztult. A Saos-2 sejtek általunk tapasztalt proliferáció csökkenése oszteogén irányú differenciációt indukáló környezetben megegyezik más szerzők által tapasztalt megfigyelésekkel. (13)
- Az OIM médium összetevői közül, elég, ha csak az inorganikus foszfát forrásként szolgáló β -GLY-al egészítjük ki a sejttenyésztő médiumot a sejtproliferáció csökkentéséhez.
- BMP-2 önmagában nem volt hatással az alkalikus foszfatáz aktivitásra. A BMP-2-t β -GLY-tal vagy OIM médiummal kombinálva viszont a Saos-2 és a DPSC sejtek esetén szinergikus hatások voltak kimutathatók.
- A megnövekedett az ALP aktivitás a lerakódott kalcium-foszfat kristályok mennyiségével a várakozásoknak megfelelően pozitív korrelációt mutatott.
- DPSC sejtekben az OIM médium hatása kifejezettebb volt a differenciáció, amikor a differenciálást 18 napig végeztük.
- A festésre adott pozitivitás a proliferáció csökkenése alapján feltételezett csontsejt irányú differenciációt bizonyítja.
- Az oszteogén markergének tanulmányozása során az OIM növelte a *RUNX2* expresszióját, ami tovább nőtt BMP-2-vel kombinált kezelés esetén a DPSC sejtekben. A kezelés további folytatásával a *RUNX2* szint fokozatosan csökkent az érés előrehaladtával, ami összhangban van irodalmi adatokkal. (21)

- Az endogén BMP-2 expressziós szintje korrelált a fokozott alkalikus foszfatáz enzim aktivitással.
- BMP-2 önmagában nem elegendő az osteoblast progenitorokérésének indukálásához. Azonban megfelelő molekuláris környezetben, amely lehetővé teszi az oszteogén differenciálódást, és olyan molekulákat tartalmaz, mint a β -GLY, BMP-2 szinergikusan hathat a DPSC és a Saos-2 sejtek oszteoblaszt irányú differenciálódására.
- Az általam vizsgált epigenetikai jellegeket befolyásoló molekulák közül a TSA és az EZH2i bizonyult pozitív hatásúnak a DPSC sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjára a génexpresszió tekintetében, ahol az irodalmi adatokkal összhangban (22,23) mindkét anyag növelte a *RUNX2*, a *BMP2* és az *ALPL* gének expressziós szintjét.
- A két anyag azonban eltérő körülmények között volt hatékony, az EZH2i csak akkor volt hatással a vizsgált génekre ha a kezelés CM médiumban történt amiben nem voltak más olyan faktorok, amelyek hatással vannak a DPSC sejtek csont irányú differenciációjára.
- TSA pozitív hatással volt a vizsgált gének expressziójára az oszteogén differenciációt elősegítő OIM-mel kombinált tenyésztési körülmények között, de CM-ben nem.
- A három vizsgált anyag közül az 5-AZA esetén nem tapasztaltam pozitív hatást a DPSC sejtek differenciációjára során, sem önmagában, sem a TSA-val vagy EZH2i-vel kombinálva, ami eltérő a DPSC-re vonatkozó irodalmi adatoktól. (24)

7. Összefoglalás

A szájuéregből származó őssejtek közül a DPSC sejtek klinikai felhasználásában nagy lehetőségek rejlenek, egyszerű izolálhatóságuk és multipotens tulajdonságuk miatt. A DPSC-k, oszteoblaszt irányú differenciációs képességüknek köszönhetően, alkalmasak lehetnek a fogászat területén is csonthiány pótlását és fogászati implantátumok jobb összeintegrációját célzó őssejt terápiában. Ilyen irányú felhasználásukhoz nagyban hozzájárulnának olyan anyagok, melyek elősegítik az oszteogén differenciációt. Ennek érdekében vizsgáltam egy kereskedelmi forgalomban kapható és klinikai felhasználásra engedélyezett növekedési faktor, a humán rekombináns BMP-2 fehérjét, valamint epigenetikai jellegeket befolyásoló gyógyszer, vagy gyógyszer jelölt hatóanyagok közül az endogén BMP-2 és más oszteogén szabályozó gének expresszióját serkentő TSA, EZH2i és 5-AZA egyedi és kombinált hatását DPSC sejtek oszteoblaszttá történő differenciációja során.

A BMP-2 hatását különböző preoszteoblaszt sejt vonalak: a Saos-2 és HEPM, valamint bölcsességfogból izolált primer DPSC sejt kultúra összehasonlító analízise során vizsgáltam. A BMP-2 kezelést különböző idő intervallumokban és különböző molekuláris környezetben, általános (CM) és oszteogén differenciációt indukáló faktorokkal kiegészített (OIM) sejttenyésztő médiumokban vizsgáltam. A differenciáció előrehaladásának monitorozására, mértem a sejtek proliferációját, ALP aktivitását, mineralizációját és az oszteogén szabályozó gének közül a *RUNX2* és *BMP-2* expresszióját. Eredményeim alapján a BMP-2 koncentráció függő módon gátolta a sejtek proliferációját, mindhárom vizsgált sejt típus esetén, önmagában azonban nem volt elegendő az oszteogén differenciáció aktiválásához. Az oszteogén differenciációnak kedvező komponensekkel kiegészített OIM médiumban a BMP-2 jobban elősegítette a DPSC és Saos-2 sejtek differenciációját, mint az OIM médium önmagában, továbbá Saos-2 sejtek esetén elegendő volt az OIM komponensei közül csupán a foszfát forrást biztosítani, a differenciációhoz. DPSC sejtekben a BMP-2 tehát csak megfelelő jelátviteli útvonalak együttes aktivációjával együtt volt hatékony.

A TSA, EZH2i és 5-AZA egyedi és kombinált hatását DPSC sejteken vizsgáltam. A kezeléseket különböző ideig, CM és OIM médiumokban végeztem, differenciációra gyakorolt hatásukat pedig a sejtek ALP aktivitásának, mineralizációjának, valamint a *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* gének expressziós vizsgálatán keresztül mértem. A három anyag közül, a TSA és az EZH2i önmagában történő alkalmazása esetén figyeltem meg pozitív hatásokat. Eredményeim alapján a TSA és az EZH2i különböző módon hatnak a DPSC sejtek oszteoblaszt irányú differenciációját szabályozó génekre: az EZH2i közvetlenül hat a célgénekre, míg a TSA

közvetett módon a csont irányú differenciációban részt vevő jelátviteli útvonalak fehérjéivel kölcsönhatásban. A TSA, EZH2i és 5-AZA együttes alkalmazása során egyik hatóanyag kombináció esetén sem figyeltem meg szinergizmust.

8. Irodalomjegyzék

1. Shi, X., Mao, J. and Liu, Y. (2020) Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem cells translational medicine*, **9**, 445-464.
2. Zhou, D., Gan, L., Peng, Y., Zhou, Y., Zhou, X., Wan, M., Fan, Y., Xu, X., Zhou, X., Zheng, L. *et al.* (2020) Epigenetic Regulation of Dental Pulp Stem Cell Fate. *Stem cells international*, **2020**, 8876265.
3. Zhao, J., Du, W., Guo, D., Wang, S. and Du, W. (2023) Mechanical Signaling in Dental Pulp Stem Cells. *Frontiers in bioscience*, **28**, 274.
4. Hrubí, E., Imre, L., Bacso, Z., Biro, S., Jenei, A. and Hegedus, C. (2015) [Effect of BMP-2 treatment on the morphology and proliferation of human embryonic palatal derived mesenchymal preosteoblast cells]. *Fogorvosi szemle*, **108**, 99-105.
5. Ganesan, A., Arimondo, P.B., Rots, M.G., Jeronimo, C. and Berdasco, M. (2019) The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. *Clinical epigenetics*, **11**, 174.
6. Ghasemi, S. (2020) Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *The pharmacogenomics journal*, **20**, 367-379.
7. Heerboth, S., Lapinska, K., Snyder, N., Leary, M., Rollinson, S. and Sarkar, S. (2014) Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genetics & epigenetics*, **6**, 9-19.
8. Duncan, H.F., Smith, A.J., Fleming, G.J. and Cooper, P.R. (2016) Epigenetic modulation of dental pulp stem cells: implications for regenerative endodontics. *International endodontic journal*, **49**, 431-446.
9. Soudi, A., Yazdani, M., Ranjbar, R., Tebyanian, H., Yazdani, A., Tahmasebi, E., Keshvad, A. and Seifalian, A. (2021) Role and application of stem cells in dental regeneration: A comprehensive overview. *EXCLI journal*, **20**, 454-489.
10. Bhushan, S., Singh, S., Maiti, T.K., Sharma, C., Dutt, D., Sharma, S., Li, C. and Tag Eldin, E.M. (2022) Scaffold Fabrication Techniques of Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Critical Review. *Bioengineering*, **9**.
11. Szwed-Georgiou, A., Plocinski, P., Kupikowska-Stobba, B., Urbaniak, M.M., Rusek-Wala, P., Szustakiewicz, K., Piszko, P., Krupa, A., Biernat, M., Gazinska, M. *et al.* (2023) Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery Systems. *ACS biomaterials science & engineering*, **9**, 5222-5254.

12. Kerenyi, F., Tarapcsak, S., Hrubí, E., Barathne, S.A., Hegedus, V., Balogh, S., Bagyi, K., Varga, G. and Hegedus, C. (2016) [Comparison of sorting of fluorescently and magnetically labelled dental pulp stem cells]. *Fogorvosi szemle*, **109**, 29-33.
13. Robaszkiewicz, A., Erdelyi, K., Kovacs, K., Kovacs, I., Bai, P., Rajnavolgyi, E. and Virag, L. (2012) Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosylation) regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free radical biology & medicine*, **53**, 1552-1564.
14. Hrubí, E., Imre, L., Robaszkiewicz, A., Virag, L., Kerenyi, F., Nagy, K., Varga, G., Jenei, A. and Hegedus, C. (2018) Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin. *Human cell*, **31**, 139-148.
15. Khanna-Jain, R., Agata, H., Vuorinen, A., Sandor, G.K., Suuronen, R. and Miettinen, S. (2010) Addition of BMP-2 or BMP-6 to dexamethasone, ascorbic acid, and beta-glycerophosphate may not enhance osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Growth factors*, **28**, 437-446.
16. Kim, I.S., Song, Y.M., Cho, T.H., Park, Y.D., Lee, K.B., Noh, I., Weber, F. and Hwang, S.J. (2008) In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation. *Development, growth & differentiation*, **50**, 553-564.
17. Beederman, M., Lamplot, J.D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S.H. *et al.* (2013) BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of biomedical science and engineering*, **6**, 32-52.
18. Xia, K., Xue, H., Dong, D., Zhu, S., Wang, J., Zhang, Q., Hou, L., Chen, H., Tao, R., Huang, Z. *et al.* (2006) Identification of the proliferation/differentiation switch in the cellular network of multicellular organisms. *PLoS computational biology*, **2**, e145.
19. Kartsogiannis, V. and Ng, K.W. (2004) Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, **228**, 79-102.
20. Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P. and Tobiasch, E. (2015) The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and structural biotechnology journal*, **13**, 75-84.
21. Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Sugito, T., Yoshimi, R., Nagasaka, T. and Ueda, M. (2010) A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived

- mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue engineering. Part A*, **16**, 1891-1900.
22. Montecino, M., Carrasco, M.E. and Nardocci, G. (2020) Epigenetic Control of Osteogenic Lineage Commitment. *Frontiers in cell and developmental biology*, **8**, 611197.
 23. Oton-Gonzalez, L., Mazziotta, C., Iaquina, M.R., Mazzoni, E., Nocini, R., Trevisiol, L., D'Agostino, A., Tognon, M., Rotondo, J.C. and Martini, F. (2022) Genetics and Epigenetics of Bone Remodeling and Metabolic Bone Diseases. *International journal of molecular sciences*, **23**.
 24. Zhang, D., Li, Q., Rao, L., Yi, B. and Xu, Q. (2015) Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*, **41**, 640-645.
 25. Sacramento, C.M., Assis, R.I.F., Saito, M.T., Coletta, R.D., da Rocha Dourado, M., Sallum, E.A., Nociti, F.H., Jr., Viana Casarin, R.C., Andia, D.C. and Silverio, K.G. (2022) BMP-2 and asporin expression regulate 5-aza-dC-mediated osteoblast/cementoblast differentiation of periodontal dental ligament mesenchymal progenitor cells. *Differentiation; research in biological diversity*, **124**, 17-27.
 26. Duncan, H.F., Smith, A.J., Fleming, G.J. and Cooper, P.R. (2013) Histone deacetylase inhibitors epigenetically promote reparative events in primary dental pulp cells. *Experimental cell research*, **319**, 1534-1543.
 27. Li, Q., Liu, F., Dang, R., Feng, C., Xiao, R., Hua, Y., Wang, W., Jia, Z. and Liu, D. (2020) Epigenetic modifier trichostatin A enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting NF-kappaB (p65) DNA binding and promoted periodontal repair in rats. *Journal of cellular physiology*, **235**, 9691-9701.
 28. Rajasekhar, V.K. and Begemann, M. (2007) Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem cells*, **25**, 2498-2510.
 29. Sepulveda, H., Aguilar, R., Prieto, C.P., Bustos, F., Aedo, S., Lattus, J., van Zundert, B., Palma, V. and Montecino, M. (2017) Epigenetic Signatures at the RUNX2-P1 and Sp7 Gene Promoters Control Osteogenic Lineage Commitment of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular physiology*, **232**, 2519-2527.



Nyilvántartási szám: DEENK/492/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hrubí Edit
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hrubí, E.**, Imre, L., Hegedűs, C.: Effects of EZH2 inhibitor, trichostatin A, and 5-azacytidine combinatorial treatment on osteogenic differentiation of dental pulp stem cells.
Heliyon. 10 (12), 1-7, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32553>
IF: 3.4 (2023)
2. **Hrubí, E.**, Imre, L., Robaszkiewicz, A., Virág, L., Kerényi, F., Nagy, K., Varga, G., Jenei, A., Hegedűs, C.: Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin.
Hum. Cell. 31 (2), 139-148, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-018-0202-5>
IF: 2.333

További közlemények

3. Kerényi, F., Tarapcsák, S., **Hrubí, E.**, Baráthné Szabó, Á., Hegedűs, V., Balogh, S., Bágyi, K., Varga, G., Hegedűs, C.: Fogbél eredetű őssejtek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata.
Fogorv. Szle. 109 (1), 29-33, 2016.
4. 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: 1.871





5. **Hrubi, E.**, Imre, L., Bacsó, Z., Biró, S., Jenei, A., Hegedűs, C.: BMP-2 hatása a humán embrionális szájpadlásból származó mesenchymalis preosteoblast sejtek morfológiájára és proliferációjára.
Fogorv. Szle. 108 (3), 99-105, 2015.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,604

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,733**

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

Debrecen, 2024.09.25.



9. Tárgyszavak

Őssejt, DPSC, oszteoblaszt, differenciáció, BMP-2, Trichostatin A, 5-azacitidnin, EZH2i.

Stem cells, DPSC, osteoblast, differentiation, BMP-2, Trichostatin A, 5-azacitidine, EZH2i

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a Debreceni Egyetem, Fogászati Klinika és a Fogorvostudományi Kar vezetőjének Dr. Bágyi Kingának.

Emellett szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Hegedűs Csabának szakmai irányításáért, segítő szándékú tanácsaiért illetve, hogy lehetővé tette dolgozatom megírásának tárgyi feltételeit. További köszönettel tartozom a DE FOK Alapozó Orvosi Ismeretek Intézet vezetőjének Prof. Dr. Jenei Attilának, akinek társ témavezetésével, mint TDK hallgató betekintést nyerhettem a kutatás világába.

Hálás vagyok Prof. Dr. Varga Gábornak a Semmelweis Egyetem Fogorvostudományi Kar Orálbiológiai Tanszék Egyetemi Tanárának és Dr. Simonné Dr. Nagy Krisztinának a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Tanszék munkatársának, akiktől lehetőségem volt megtanulni a fogbél eredetű összejtek izolálását és tenyésztését. Szintén köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet korábbi munkatársának Dr. Agnieszka Robaszkiewicz-nek és vezetőjének Prof. Dr. Virág Lászlónak, akik lehetővé tették, hogy megismerjem és megtanuljam a Real-time qPCRanalízisek kivitelezését és kiértékelését. Valamint rendelkezésemre bocsátották a Saos-2 oszteoszarkóma sejtvonalat.

Emellett köszönetet szeretnék mondani munkacsoportunk korábbi és jelenlegi tagjainak, akik szakmailag vagy emberileg mellettem álltak és tanácsaikkal támogatták munkámat: Dr. Szalóki Melindának, Dr. Keczánné Üveges Andreának, Dr. Kerényi Farkasnak, Dr. Bakó Józsefnek, Dr. Tóth Ferencnek.

Végül hálás vagyok a családomnak, gyermekeimnek és férjemnek Dr. Imre Lászlónak, akik türelemmel és szeretettel, rengeteg támogatással álltak mellettem a nehezebb időkben is.