

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Hrubai Edit

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

DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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.

Tartalomjegyzék:

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	10
3. Irodalmi áttekintés.....	12
3.1. Csontpótló anyagok a fogászatban.....	12
3.2. A csontképződés folyamata.....	17
3.2.1. A TGF- β jelátviteli útvonal.....	20
3.2.2. BMP jelátviteli útvonal.....	21
3.2.3. A WNT/ β -katenin útvonal.....	22
3.2.4. Notch jelátviteli útvonal.....	23
3.2.5. Hedgehog jelátviteli útvonal.....	24
3.2.6. NELL jelátvitel.....	24
3.3. Humán bölcsességfog pulpából származó őssejtek.....	25
3.4. Őssejtek differenciációja epigeneikai jellegek alapján.....	27
3.4.1. Trihosztatin A.....	30
3.4.2. Zeste homológ 2 gátló.....	32
3.4.3. 5-Azacidin.....	33
4. Célkitűzés.....	34
5. Anyagok és módszerek.....	35
5.1. Sejtek tenyésztése és oszteoblaszt irányú differenciáció indukálása.....	35
5.2. Alamar blue assay.....	36

5.3. Kalcium mennyiségi meghatározása.....	36
5.4. Alkalikus-foszfataz aktivitás.....	37
5.5. Real time kvantitatív PCR.....	37
5.6. Statisztikai analízis.....	38
6. Eredmények.....	39
6.1. Humán BMP-2 homodimer fehérje hatásának vizsgálata DPSC sejteken.....	39
6.2. EZH2i, 5-AZA, TSA oszteoblaszt irányú differenciációt indukáló hatásának vizsgálata DPSC sejteken.....	46
7. Megbeszélés.....	50
7.1. BMP-2 hatására létrejött oszteoblaszt irányú differenciáció értékelése.....	50
7.2. DPSC-k oszteoblaszt irányú differenciációs képességének értékelése epigenetikai jellegeket módosító anyagok hatására.....	52
8. Következtetések.....	56
9. Összefoglalás.....	57
10. Summary.....	59
11. Irodalomjegyzék.....	60
12. Tárgyszavak.....	74
13. Köszönetnyilvánítás.....	74
14. Függelék.....	75

1. Rövidítések jegyzéke:

A

AA: Ascorbic acid / Aszkorbinsav

ALP: Alkaline phosphatase / Alkalikus foszfatáz

ALPL: Alkaline phosphatase gene / Alkalikus foszfatáz gén

APR3: Apoptosis related protein 3 / Apoptózissal összefüggő fehérje 3

ATCC: American Type Culture Collection / Amerikai sejt kultúra gyűjtemény

ATF4: Activating transcription factor 4 / Aktiváló transzkripció faktor 4

5-AZA: 5-Azacytidine / 5-Azacidin

B

BFPSC: Buccal fat pad-derived stem cell / Bukkális arcpárna zsírból származó őssejt

BGLAP: Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein/ Osteocalcin / Gamma-karboxi-glutaminsavat tartalmazó fehérje / Oszteokalcin

BMP: Bone morphogenetic protein / Csont morfogenetikus fehérje

BMPR: Bone morphogenetic protein receptor / Csont morfogenetikus fehérje receptor

BSP: Bone sialoprotein / Csont szialoprotein

B-GLY: β -Glycerophosphate / Béta-glicerofoszfát

C

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate / Ciklikus adenzin-monofoszfát

CCAAT- Cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine / Citozin-citozin-adenin-adenin-timin

CD: Cluster of differentiation / Differenciációs klaszter

CDK1: Cyclin-dependent kinase 1 / Ciklin függő kináz 1

ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation assays with sequencing / Kromatin immunprecipitáción alapuló szekvenálás

CHRD: Chordin

CM: Culture medium / Tenyésztő médium

Cntnap4: Contactin Associated Protein Family Member 4 / Kontaktin-asszociált fehérje család 4

CollA1: Collagen type 1 alpha 1 / 1-es típusú kollagén alfa 1

CTGF: Connective tissue growth factor / Kötőszöveti növekedési faktor

CXC: Chemokine domain / Kemokin domén

D

DEX: Dexamethasone / Dexametazon

DFPC: Dental follicle progenitor cell / Fogzacskóból származó őssejt

Dlx5: Distal-Less Homeobox 5

DKK: Dickkopf-related protein / Dickkopfal-rokon fehérje

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium / Dulbecco által módosított Eagle médium

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 / Dulbecco által módosított Eagle médium/F12 tápoldat keverék

DNMT: DNA methyltransferase / DNS metiltranszferáz

DPSC: Dental pulp stem cell / Pulpa eredetű őssejtek

D₃ VIT: Vitamin D₃ / D₃ vitamin

E

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid / Etilén-diamin-tetraecetsav

EED: Embryonic ectoderm development protein / Embrionális ektoderma fejlődési fehérje

EGF: Epidermal growth factor / Epidermális növekedési faktor

EMEM: Eagle's minimum essential medium / Eagle féle minimál tápfolyadék

ERK: Extracellular signal-regulated kinase / Extracelluláris jelátviteli útvonal által szabályozott kináz

EZH2i: Enhancer of zeste homolog 2 inhibitor / Enhancer of zeste homolog 2 gátló

F

FBS: Fetal bovine serum / Szarvasmarha magzati szérum

FDA: Food and Drug Administration / Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal

FGF: Fibroblast growth factors / Fibroblaszt növekedési faktor

FHL-2: Four and a half LIM domains protein 2

FOXO: Forkhead box O

FRP: Frizzled related protein / Frizzled-rokon fehérje

G

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GDF10: Growth Differentiation Factor 10 / Növekedési differenciációs faktor 10

Gli1: GLI Family Zinc Finger 1 / GLI család cinkujj 1

GMSC: Gingiva derived mesenchymal stem cell / Gingiva eredetű mezenchimális őssejt

H

HAT: Histone acetyltransferase / Hiszton-acetiltranszferáz

HDAC: Histone deacetylases / Hiszton-deacetiláz

HEPM: Human Embryonic Palatal Mesenchymal cells / Humán embrionális szájpadlásból származó mezenchimális preoszteoblaszt

J

JNK: c-Jun N-terminal kinase / c-Jun N-terminális kináz

L

LPS: Lipopolysaccharide / Lipopoliszacharid

LRP5/6: Low-density lipoprotein-related receptors 5 and 6 / Alacsony sűrűségű lipoproteinnel-rokon receptor 5 és 6

M

MAPK: Mitogen-activated protein kinase / Mitogén-aktivált protein kináz

MBD: Methyl-CpG-binding domain / Metil-CpG kötő domén

MKK: Mitogen-activated protein kinase kinase / Mitogén aktivált fehérje kináz kináz

MKP-1: Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 / Mitogén aktivált fehérje kináz foszfatáz 1

MSC: Mesenchymal stem cell / Mezenchimális őssejt

MSTN: Myostatin / Miosztatin

Msx2: Msh Homeobox 2

Myc5: MYC proto-oncogene, basic Helix-Loop-Helix transcription factor / MYC protoonkogén / Bázikus Hélix-Loop-Hélix transzkripció faktor

N

NELL-1: Neural epidermal growth factor-like protein-1 / Neurális epidermális növekedési faktor-szerű fehérje-1

NF- κ B: Nuclear factor Kappa B / Nukleáris faktor-Kappa B

NICD: Notch intracellular domain / Notch intracelluláris domén

NOG: Noggin

Notch: Neurogenic locus notch homolog protein / Neurogén lókuszt notch homológ fehérje

O

OCN: Osteocalcin / Oszteokalcin

OIM: Osteoinductive medium / Oszteoindukív médium

OPG: Osteoprotegerin / Oszteoprotegerin

OPN: Osteopontin / Oszteopontin

OSX: Osterix / Oszterix

P

PBS: Phosphate-buffered saline / Foszfáttal pufferolt sóoldat

PCG: Polycomb group gene / Polycomb fehérjecsald g6n

PCP: Planar cell polarity / Plan6ris sejtpolarit6s

PDLSC: Periodontal ligament stem cell / Parodont6lis ligamentum 6ssejtek

PIC: Protease Inhibitor Cocktail / Prote6z inhibitor kokt6l

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride / Fenil-metil-szulfonil-fluorid

PPAR γ : Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ / Peroxisoma prolifer6tor-aktiv6lt receptor γ

PRC2: Polycomb repressive complex 2 / Polikomb repressz6v komplex 2

PTCH1: Protein patched homolog 1 / Protein patched homol6g 1

PTHrP: Parathyroid hormone-related protein / Parathormon-rokon fehérje

p53: Tumor protein p53 / p53 tumor fehérje

R

RANKL: Receptor activator for nuclear factor κ B ligand / Nukle6ris faktor κ B ligand receptor aktiv6tor

RUNX2: Runt-related transcription factor 2 / Runt-rokon transzkripci6s factor 2

S

Saos-2: Human osteosarcoma cell line / Hum6n oszteoszark6ma sejtvonal

SCAP: Apical papillae stem cell / Apik6lis papill6b6l sz6rmaz6 6ssejt

SET: (Su(Var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax) domain / (Su(Var)3-9, enhancer-of-zeste, trithorax) domén

SHED: Human exfoliated deciduous teeth stem cell / Humán tejfogból származó őssejtek

SMAD: Suppressor of mothers against decapentaplegia

SOST: Sclerostin / Szklerosztin

SUZ12: Polycomb repressive complex 2 subunit / Polikomb represszív komplex 2 alegység

T

TAB1: Transforming growth factor-beta activated kinase 1 binding protein 1 / Transzformáló növekedési faktor-béta aktivált kináz 1 kötő fehérje 1

TAK1: Transforming growth factor-beta activated kinase 1 / Transzformáló növekedési faktor-béta aktivált kináz 1

TAZ: Tafazzin family protein / Tafazzin fehérjecsald

TGF- β : Transforming growth factor-beta / Transzformáló növekedési faktor-béta

TLR4/5: Toll-like receptor 4/5 / Toll-szerű receptor 4/5

TNF: Tumor necrosis factor / Tumor nekrozis faktor

TSA: Trichostatin A / Trihosztatin A

Twist: Twist-related protein / Twist-rokon fehérje

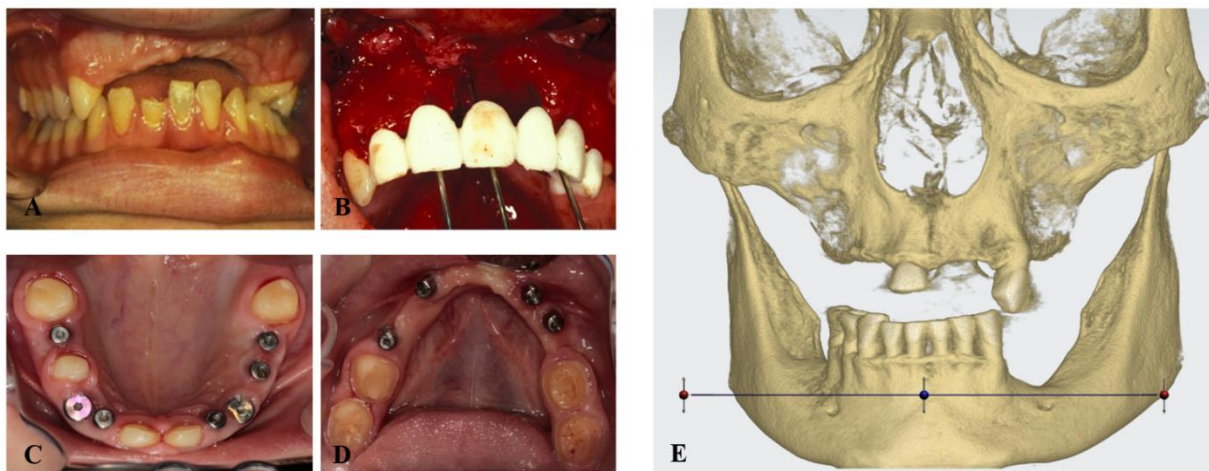
W

Wnt: Wingless-related integration site / Wingless-rokon integrációs hely

2. Bevezetés

A fogászati, általános orvosi praxis során számos esetben találkozunk, olyan páciensekkel, akik valamilyen mértékű csonthiánnyal rendelkeznek. Csontdefektus figyelhető meg a korai fogelvezetés esetén kialakult csontreszorpció következtében, tumor műtét miatti csont rezekció utáni állapotban, illetve infekció vagy baleset következtében kialakuló csonthiány miatt. Emellett csontpótlás válhat szükségessé azon páciensek esetén is, akik állcsont- és szájpadasaddékkal vagy más fejlődési rendellenességgel születtek, de a traumatológia, implantáció, parodontális szövetregeneráció, ortodonciai és például az ortopédiai kezelések során is. (1. ábra)

A WHO 2022.-ben végzett felmérése szerint a világ lakosságából 3,5 milliárd ember érintett valamilyen szájüregi betegségben. (1) Ezek közül a súlyos parodontitisz, mely csontvesztéshez is vezet, a felnőtt lakosság 19%-át, mintegy 1 milliárd embert érint, főleg a nem megfelelő szájhigiéne következtében. A szájüreg rákos elváltozása világviszonylatban a 13. leggyakoribb tumoros megbetegedés, valamint a szájüreg, illetve a fogakat érintő traumás sérülések világszerte 1 milliárd embert érintenek, melyek szintén okozhatnak csont defektust. Ezeken túl a szájüreget érintő fejlődési rendellenességek átlagosan minden 1000-1500-adik újszülöttet érintenek a világon, mely gyakoriság országoként eltérő lehet. (1)



1. ábra. Csontdefektusok a fogászati praxisban.

Baleset következtében kialakult csontdefektus (A, B), veleszületett csirahiány következtében az állcsontok növekedése is elmarad (C, D), korai fogelvezetés miatt létrejött állcsontsorvadás. (E)

Az említett okok miatt a fogászati implantológia, sebészi, parodontális szövetregeneráció területén kiemelt fontosságú a kialakult csontdefektusok kezelése. (1. ábra) A defektus mértékétől függően szükséges csontpótlást végezni az eredeti csontkontúr részleges vagy teljes helyreállítása miatt, mielőtt bármilyen fogpótlás készülhet a páciens számára. A csontpótlásra használt anyagnak ideálisan oszteokonduktívnak kell lennie, vázként kell szolgálnia az oszteoblasztok számára. Emellett oszteoinduktív tulajdonsággal is kell, hogy rendelkezzen, elő kell segítse az oszteoprogenitor sejtek oszteoblasztokká történő differenciálódását. Az oszteoinduktív sejtmediátorok legszélesebb körben tanulmányozott típusai a BMP-k. (2) Emellett a csontregeneráció elősegítésére ígéretes molekulák lehetnek a gyógyászat más területein használt hatóanyagok, pl.: TSA, EZH2 inhibitor, 5-AZA is, melyek *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján elősegíthetik a csontregenerációt. (3-14) Ezáltal ezen molekulák alkalmasak lehetnek a különböző kiterjedésű csontdefektusok kezelésére, fogászati implantátumok oszteointegrációjának, a parodontális szövetregeneráció elősegítésére, így orvosi, fogorvosi terápiás alkalmazásukban nagy lehetőségek rejlenek.

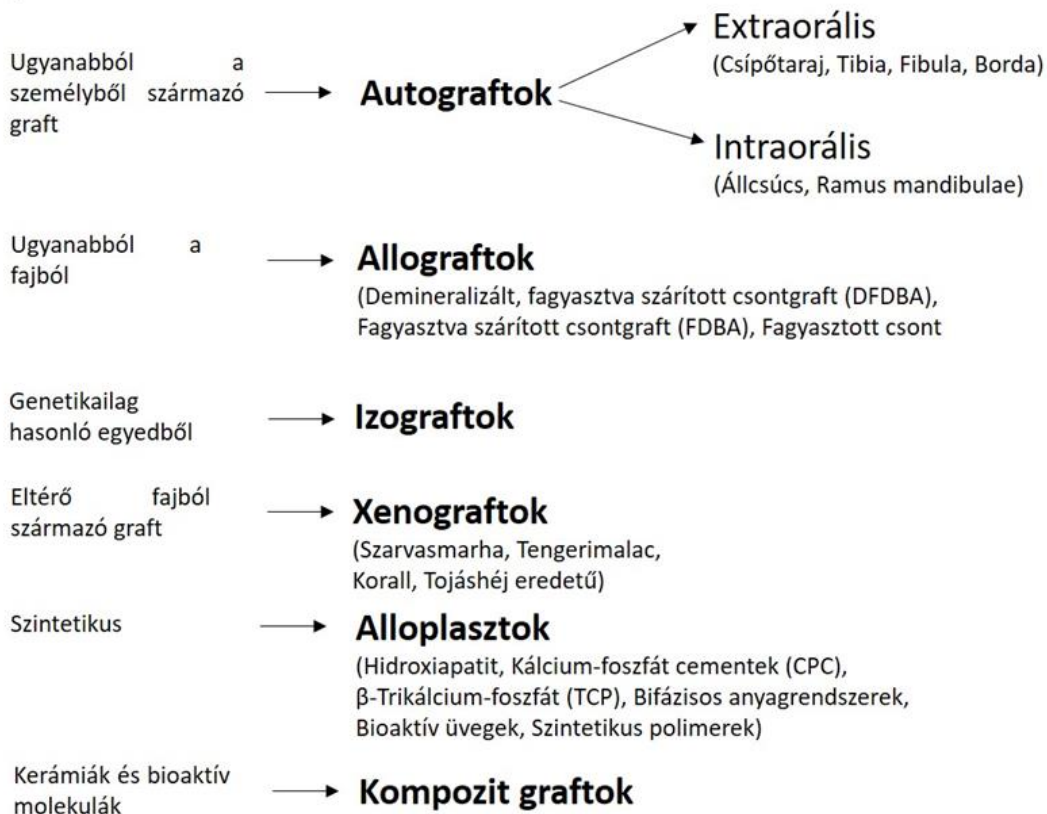
3. Irodalmi áttekintés

3.1. Csontpótló anyagok a fogászatban

A csontképződés egy nagyon komplex folyamat, a képződött csont mennyiségét és minőségét, több tényező is befolyásolja, így a csont pótlása nagyon komplex feladat. Az irodalomban számos csontpótlási technika és csontpótló anyag is fellelhető. A csont pótlása hagyományos módon történhet autológ csonttal, használhatunk allograftokat, xenograftokat és szintetikus előállított alloplastikus anyagokat. A csontgraftok (1. táblázat), csontpótlók és a bioaktív anyagok oszteokonduktív, oszteoinduktív és oszteogén mechanizmusokon keresztül elősegítik a csontgyógyulást. (15) Oszteokonduktív az az anyag, amely passzívan lehetővé teszi a kapillárisok, a perivaszkuláris szövet és a mezenchimális őssejtek (MSC) benövését. Ezeknek a graftoknak a szerkezete hasonló a szivacsos csont szerkezetéhez. Ilyen csontpótlásra használt anyagok pl. a kalcium-szulfát és a kalcium-foszfát cementek. (15) Az oszteoinduktív anyagok a gazdaszervezetből származó MSC-eket képesek toborozni, hogy kondroblasztokká és oszteoblasztokká differenciálódjanak. Ezt a folyamatot képesek szabályozni a növekedési faktorok, mint például a csontmorfogenetikus fehérjék (BMP-k), mint a BMP-2, -4 és -7, a trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF), interleukinok, fibroblaszt eredetű növekedési faktorok (FGF-k), granulocita és makrofág kolónia stimuláló faktorok és az angiogén faktorok, mint például a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF). (15) Az oszteogenezis az újonnan létrejövő csont szintézise a gazdaszervezetből vagy a graftdonorból származó donorsejtek által. A folyamatban részt vevő sejtek közé tartoznak az MSC-k, az oszteoblasztok és az oszteociták. (15)

1. táblázat

Csontgraftok csoportosítása



Az autológ csont graft esetén ugyanabból a páciensből származó graftot ültetnek át az egyik műtéti területről a másikra. Ez a gold standardnak tekintett eljárás a csontpótlásban, mivel a graft oszteokonduktív, oszteoinduktív és oszteogén tulajdonságokkal is rendelkezik. Hátránya, hogy a rendelkezésre álló csont mennyisége, mely felhasználható csontpótlásra véges, illetve egyéb mellékhatásai is lehetnek az eljárásnak, ilyen pl.: fájdalom a donor területen (a leggyakoribb szövődmény), fokozott vérvesztés, megnövekedett műtéti idő és a donor helyén történő fertőzés lehetősége. (15,16) Emellett gyors és hatékony eljárás a csontregenerációhoz, főként a kritikus méretű (>5 mm) defektusok esetén. (16) A gyógyulási idő a felhasznált anyagtól is függ, az autológ csont a leggyorsabban vaszkularizálódó, és ezért a leginkább oszteogén a jelenleg rendelkezésre álló anyagok közül. (16) Fontos hangsúlyozni, hogy a kortikális és a csontvelő kombinációja az egyik legelőnyösebb a csontregeneráció területén, mivel két fontos tulajdonságot egyesít: a kortikális a megtámasztást és mechanikai ellenállást, a csontvelő pedig az osteogén funkciót. (16)

A szivacsos csont graftban nagy mennyiségben vannak jelen oszteoblasztok és oszteociták. Trabekuláris szerkezete elősegíti a revaszkularizációt és a befogadó helyen történő megfelelő beépülést, mely 6-12 hónapig tarthat. (15)

A kortikális csont graft kiváló szerkezeti tulajdonságokkal rendelkezik és mechanikai alátámasztást biztosít. Azonban a sűrű, rendkívül kompakt szerkezet miatt viszonylag korlátozott mennyiségben találhatóak meg benne az oszteoblasztok, oszteociták és más sejtes progenitorok. Így korlátozottak ezen csontgraftok oszteogén és oszteoinduktív tulajdonságai, illetve a graft revaszkularizációja is. A beépülés a kúszó szubsztitúciónak nevezett folyamaton keresztül, vagy a graft lassú, majdnem teljes felszívódásával történik, párhuzamosan az új csontképződésével. A graft méretétől függően a beépülés akár éveket is igénybe vehet. A vaszkularizált csont graftok artériával és vénával vannak ellátva, elsődleges vagy másodlagos csontosodással épülnek be, így növelhető a graft osteogén potenciálja, de megelőzhető a nem vaszkularizált kortikális graftoknál tapasztalható kezdeti graft keménység veszteség. (15)

Ritkán, de csontvelő aspirátumot is alkalmazhatnak csontpótlásra. Viszkózus folyadékként, töréseknél perkután befecskendezve a csontvelő aspirátum nem képes szerkezeti támaszt biztosítani, továbbá folyékony állaga miatt kiszivároghat a sérülés helyéről. Ezen hátrányos tulajdonságok miatt manapság a csontvelő aspirátumot inkább valamilyen féligszilárd anyaggal kombinálva használják, mint például a demineralizált csontmátrix vagy a kollagén. (15) A natív csontvelő önmagában is jelentős regenerációs potenciállal rendelkezik. (17) A csontvelő aspirátumot elsősorban ízületi artritisz, csontdefektusok, szalagszakadások, combcsont oszteonekrózis, illetve pseudarthrosis kezelésében használják. (18) A csontvelő aspirátum mononukleáris sejtekben gazdag pl.: mezenchimális stromális sejtek (BM-MSC-k), hematopoetikus őssejtek, endotél progenitor sejtek, valamint a gyulladással és immunsejtek. (17) Emellett növekedési faktorokat, többek között csontmorfogenetikus fehérjéket (BMP), trombocita eredetű növekedési faktort (PDGF), transzformáló növekedési faktort- β -t (TGF- β), vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF), interleukin-8-at (IL-8), valamint IL-1 receptor antagonistát tartalmaz. (18) Könnyen hozzáférhető és bőséges sejt készletet biztosítanak, mely néhány órán belül alkalmazható a műtéti eljárások során anélkül, hogy időigényes sejtenyésztes válna szükségessé. (17) Nyerhető a csípőtarajból, a proximális és distalis sípcsontból, vagy a sarokcsontból. Azonban a csontvelő aspirációjára a hátsó csípőtarajból a leggyakoribb. (18)

A vérlemezékében gazdag plazma (PRP) a vérlemezék autológ szuszpenziója, amelyet teljes vérből állítanak elő kettős centrifugálási technika segítségével. Az így előállított szuszpenzió növekedési faktorokban gazdag, pl.: PDGF, transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β) és a VEGF. Ezt követően a vérlemezéket kalcium-kloriddal kezelik és a kialakult vérrögöt helyezik be a defektus helyére. (15)

Az izograftok, olyan csont graftok, melyek genetikailag hasonló egyedből származnak, mint pl. az egypetűjű ikertestvérből.

Az állati eredetű anyagokat, a xenograftokat széles körben alkalmazzák a fogászatban, ezek csontpótlásra történő felhasználása több mint három évtizede tanulmányozott. Oszteoinduktív képességük a hidroxipatitból álló szeretlen szerkezetükből adódik, amelyet az összes szerves komponens eltávolításával nyernek. (16) A xenograftok a legkülönbözőbb eredetűek lehetnek, a leggyakrabban használt szarvasmarha- és sertés eredetűek (19,20), azonban lehet ló (21), korall exoskeleton (22) és tojásbélyeg eredetű is. (23) Előnyük, hogy kémiai összetételük hasonló az emberi csontéhoz, kalcium/foszfor arányuk 1,67, ami megegyezik az emberi csontéval. (24) Hátrányuk etikai, vallási és egészségügyi problémákból adódnak. A szarvasmarhából származó csontpótlók messze a leggyakrabban használt xenograftok a fogászatban. Mivel a szarvasmarhából származó csontgraft biológiailag nem lebomló, betegségek átvitelével esetenként hosszú távú szövődeményekkel is számolnunk kell alkalmazásuk során. A betegségek átvitelével kapcsolatos nézeteket számos vita övezi. A xenograftként felhasznált anyagok (pl.: Bio-Oss és Osteograf/N) szigorú tisztítási és sterilizálási folyamaton mennek át, így általános nézet, hogy a betegségek átvitelének kockázata kicsi (25,26), azonban hosszútávú klinikai szövődeményekről szóló irodalmi adatok alig állnak rendelkezésre, mint pl. a szarvasmarhák szivacsos agyvelőgyulladásának (BSE) kialakulásának lehetőségéről. Általános szövődeményként említik az irodalomban többek között az akut és krónikus arcüreggyulladást (27,28), maxilláris gombatelep kialakulását (29), a csontpótlóanyag elmozdulását, az immunreakciókat (27), a krónikus gyulladást (28,30), az idegtestreakciót (31) és a Creutzfeldt- Jakob-kór átvitelének kockázatát. (32) Akármilyen szorványosan fordulnak is elő ezek az esetek a xenograftok biztonságos fogászati alkalmazásához hosszútávú követés és vizsgálatok szükségesek, illetve fontos tájékoztatni a beteget a betegségek átvitelének kockázatáról és az esetleges csontpótlási alternatívákról.

Az allograftok olyan csontgraftok, amelyek emberekből származnak ugyan, de a graft a haláluk után került begyűjtésre steril körülmények között. Az allograftok oszteokonduktív és néha

oszteoinduktív potenciállal is rendelkeznek, de mivel nem tartalmaznak életképes sejteket, ezért nem oszteogének. Az autológ csontgraft népszerű alternatívája ugyan, de hátránya hogy magasak a beültetés költségei. Minimális kockázattal jár a használatuk, mivel a grafttal történő fertőzések átvitele ritkán, de megtörténhet. (15) A lágyrészek eltávolítása után a sejteket etanollal, majd gamma-besugárással kezelik a baktériumok, gombák és a vírusok elleni sterilizálás érdekében. Sajnos a besugárzás dóziszfüggő módon károsan befolyásolja a graft biológiai tulajdonságait is, a polipeptidláncok hasításával és a vízmolekulák radiolízisével, melynek eredményeképpen a graft szerkezeti integritása is csökken. (15)

A szintetikus bioanyagok nem rendelkeznek oszteoinduktív tulajdonságokkal. (16) A szintetikus kalciumsó alapú csontpótlók oszteokonduktív alternatívát jelentenek, ezért szerepük a törés gyógyulásában igen korlátozott. Különböző formákban kerülnek forgalomba, beleértve a porokat, pasztákat, pelleteket vagy bevonatokat az implantátumok felszínén, mint pl. a hidroxipatit bevonat. Szubsztrátként szolgálnak és mechanikai szempontból vázként funkcionálnak, ahol az oszteoblasztok vagy az oszteoprogenitor sejtek tapadhatnak, szaporodhatnak és differenciálódhatnak az új csontképződése érdekében. (16) Ezen anyagok összekeverhetőek antibiotikumokkal, kollagénnel, növekedési faktorokkal, valamint kísérletek folynak MSC-kkel történő egyidejű felhasználásukkal is. (16) Az ilyen biológiailag aktív komponensek hozzáadásával az anyag oszteoinduktív, vagy akár oszteogén tulajdonságokkal is rendelkezhet. (16)

A kalcium-szulfát graftok a leggyorsabban felszívódó szintetikus csontpótló anyagok. 1-3 hónap alatt megtörténik a felszívódásuk, még a tényleges csontképződés előtt.

A kalcium-foszfátok közé tartoznak a monokalcium-foszfát, dikalcium-foszfát, trikalcium-foszfát, hidroxipatit (alfa- és béta-kristályos formái egyaránt), ill. a tetrakalcium-foszfátok. A hidroxipatit a természetben is előforduló forma, mely a csont szerkezetének is mintegy 50 %-át alkotja. Kevés kalcium-foszfát cement áll rendelkezésre tiszta, egykomponensű készítményként, a legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható termék változó koncentrációban tartalmaz vegyes kalciumsókat. Lassú lebomlás, jó mechanikai tulajdonságok jellemzik, de *in vivo* körülmények között keménysége ezen csontpótlóknak rosszabb, mint a normál szivacsos csontnak. Ennek az az oka, hogy a kerámia cementek általában nagyon törékenyek és kevésbé állnak ellen a húzó- és nyíróerőknek, melyek *in vivo* körülmények között jelentkeznek. (15)

Különböző bioaktív szerves molekulák is alkalmasak lehetnek csont regeneráció elősegítésére, akár valamilyen szilárd hordozóval/szkaffolddal kombinálva őket. Ezek lehetnek 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, például BMP-2, BMP-7, parathormon. (33) Ezen anyagok alkalmasak lehetnek titán implantátumok felületének módosítására is, hogy ezzel elősegítsük az implantátumok oszeointegrációját és minimalizáljuk az esetleges szövődményeket. A csonthiányok kezelésének legújabb módszere lehet a páciensből izolált saját mezenchimális őssejtek (MSC-k) *in vitro* differenciációja, majd a differenciált oszteoblasztok visszaültetése, egy biológiailag aktív molekulákat hordozó biodegradábilis szkaffolddal kombinálva, ami lehetővé tenné a kritikus méretű csontdefektusok kezelését is. Ilyen biológiailag aktív molekulák lehetnek a csont morfogenetikus fehérjék (BMP-k) illetve a gyógyászat más területein használt TSA, EZH2 inhibitor, 5-AZA is, melyek bizonyítottan elősegíthetik a csontregenerációt. (3-14)

3.2. A csontképződés folyamata

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 mezenchimális szövet-prekurzorral kezdődik, de a csonttá átalakulás módja eltérő. Az intramembranosus csontosodással képződnek a calvaria, a kulcscsont és a koponya lapos csontjai, ebben az esetben közvetlenül alakulnak csonttá a mezenchimális szövetek. A létrejött oszteoblasztok klaszterekbe csoportosulnak, és csontosodási magvakat alkotnak. Az oszteoblasztok ezt követően oszteoidot választanak ki, egy nem mineralizált kollagén-proteoglikán mátrixot, amely képes a kalciumot megkötni. A kalcium oszteoidhoz való kötődése a mátrix megkeményedését és az oszteoblasztok bezáródását eredményezi, melyek ezzel együtt oszteocitákká alakulnak. Az oszteoblasztok tevékenysége által a képződött oszteoid körbeveszi a képződött ereket, ezáltal létrehozva a trabekuláris szivacsos csontállományt, a csontvelőt. A keletkezett csont felszínén elhelyezkedő MSC-k pedig kialakítják a perioszteumot. A csonthártya belső felületén lévő MSC-k pedig oszteoblasztokká alakulnak és lemezes csontot, a csont kortikálisát termelik. (34,35)

Az endochondrális csontosodás során a mezenchimális szövet először egy porc köztitermékké, majd ezt követően csonttá alakul. Endochondrális csontosodással képződnek az axiális csontváz és a hosszú csöves csontok. Első lépésként a mezodermből származó mezenchimális sejtek kondrocitákká differenciálódnak. A kondrociták gyorsan szaporodnak, és extracelluláris mátrixot választanak ki, hogy kialakítsák a csont porc telepét. A porc telep, mely alakja hasonló a későbbi csonthoz hyalinporcot, valamint egy azt körülvevő membránt, a perikondriumot tartalmaz. A középső terület közelében lévő kondrociták hipertrófiássá válnak, és elkezdnek X-es kollagént és fibronektint termelni, ez a megváltozott struktúra lehetővé teszi a kialakult porctelep mineralizációját. A meszesedés következtében a porcsejtekhez nem jut tápanyag, így apoptotizálnak. A porcsejtek helyén üregek képződnek, melyekbe erek nőnek be, melyek egyesülve kialakítják a velőűrt. A jelen lévő oszteogén irányba differenciálódni képes sejtek kiváltják a perikondrium átalakulását perioszteummá. Az oszteoblasztok ezután a csonthártya diaphysealis régiójában egy megvastagodott kompakt csontrégiót hoznak létre, amelyet periosteális gallérnak neveznek. Itt alakul ki az elsődleges csontosodási központ. Míg a diaphysisben a csont helyettesíti a porcot, a porc tovább nő a csont végeken, így növelve a csont hosszát. Ezek a proliferatív területek epifizislemezekké (növekedési lemezekké) válnak, amelyek a csontok hosszanti növekedését biztosítják a születés után is a korai felnőttkorig. Születés után ez a folyamat megismétlődik az epifízis régióban és itt jön létre egy másodlagos csontosodási központ. (34,36)

A csont dinamikus szerv, mely folyamatosan megújul, terhelés hatására képes átépülni, ezt a folyamatot remodellingnek nevezzük. A remodelling 3 fázisból áll: Első fázisban az oszteoklasztok elindítják a csontreszorpciót, második az átmeneti vagy reverzibilis fázis, amikor a reszorpciót felváltja az új csontképződés. Majd ezt követi a harmadik fázis az oszteoblasztok általi új csontképzés szakasza. A csont remodelling elengedhetetlen a törések gyógyulásához, a csontváz alkalmazkodásához a mechanikai ingerekre, illetve a kalcium homeosztázis fenntartásához. (37)

A csontszövet egy mineralizált kötőszövetes állomány, melyben oszteoblasztok, oszteociták, csont bélelő sejtek és osteoklasztok találhatóak meg. Folyamatosan megújul az oszteoblasztok és az oszteoklasztok tevékenysége révén. Az oszteociták a remodelling folyamatának a mechanoszenzoraiként és szervezőiként működnek. A csont bélelő sejtek szerepe nem tisztázott, de feltehetően szerepet játszanak a csontreszorpció és a csontképződés összekapcsolásában. Az oszteoblasztok csontképző sejtek, melyek a csont felszínén találhatóak meg, a csontban előforduló

sejtek 4-6 %-át teszik ki, élettartamuk 2-3 hónap (37,38). Fehérje szintetizáló sejtek képét mutatják: kifejezett durva felszíni endoplazmatikus retikulummal és Golgi apparátussal rendelkeznek, valamint számos különféle szekréciós vezikulát is megfigyelhetünk a sejtekben. Polarizált sejtekként az oszteoidot a csont mátrix felé választják ki. Mezenchimális őssejtekből származnak, melyek meghatározott gének expresszióját követően időben programozott lépéseket követve alakulnak oszteoblasztokká. (37) A folyamatot, mely alatt az MSC-k képesek oszteoblasztá differenciálódni oszteogenezisnek nevezzük. Az MSC-k oszteo-chondro progenitorokat hoznak létre, melyek a csont irányú differenciáció szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktor, a RUNX2, hatására oszteoprekurzorokká, míg SOX9 aktiválódása esetén, amely a porc irányú differenciációt szabályozó transzkripciós faktor, kondrocitákká képesek differenciálódni. Ezt követően az oszteoblast prekursorok tovább szaporodnak és oszteoblasztá, majd oszteocitákká érnek. Oszteoblaszt irányú differenciációs képességet figyeltek meg pl. a csontvelőből, zsírszövetből, fogból, placentából, köldökzsinór vérből származó MSC-knél. A csontvelői MSC-k magas oszteogén irányú differenciálódási képességgel rendelkeznek más MSC-khez képest, melynek során a RUNX2, osterix (OSX), Dlx5, TWIST, Msx-2, ATF4 és FOXO transzkripciós faktorok aktiválása különböző jelátviteli útvonalak (pl.: TGF- β és a Wnt/ β -katenin) közötti átfedésekkel indukálják az MSC-k differenciálódását. (39) Az oszteogenezis fő szabályozója a RUNX2, mely fontos szerepet játszik a sejt korai csont irányú elköteleződésében. RUNX2 hatására az oszteogén differenciáció különböző fázisaiban upregulálódik az egyes típusú kollagén (*Col1A1*), alkalikus foszfatáz (*ALPL*), *OSX*, csont szialoprotein (*BSP*), oszteokalcin (*OCN*) és az oszteonektin (*ONN*) gének expressziós szintje. (40,41) A kezdeti proliferációs fázisban megnő a RUNX2 és a *Col1A1* szintje, ekkor a sejtek preoszteoblaszt fázisban vannak. Ezután kezd megnőni a sejtek ALP aktivitása is. Ezt követően az érett oszteoblasztokban megemelkedik az *OSX*, *OCN*, *ONN*, *BSP I/II* és az *Col1A1* gének expressziója. Emellett indukálja a Hedgehog és a Wnt jelátviteli útvonalakat is a további éréshez. Az *OSX* magas szintje a késői csontérés során gátolja a csontképződést, de a csont homeosztázisában nélkülözhetetlen. (37,42) Az oszteogén differenciáció indukálása mellett a RUNX2 gátolja az MSC-k adipogén irányú differenciációját azáltal, hogy represszálja a *PPAR γ* és a *C/EBP α* géneket, amelyek az adipogenezist szabályozó fő transzkripciós faktorokat kódolják. (43)

Az oszteoblasztok általi csontképzés első lépéseként egy szerves mátrix képződés zajlik, majd ezt követi a mineralizáció szakasza. Az oszteoblasztok kollagéneket főleg egyes típusú kollagént és nem kollagén típusú fehérjéket (*OCN*, *ONN*, *BSPI /II*), valamint proteoglikánokat választanak ki, ezek a

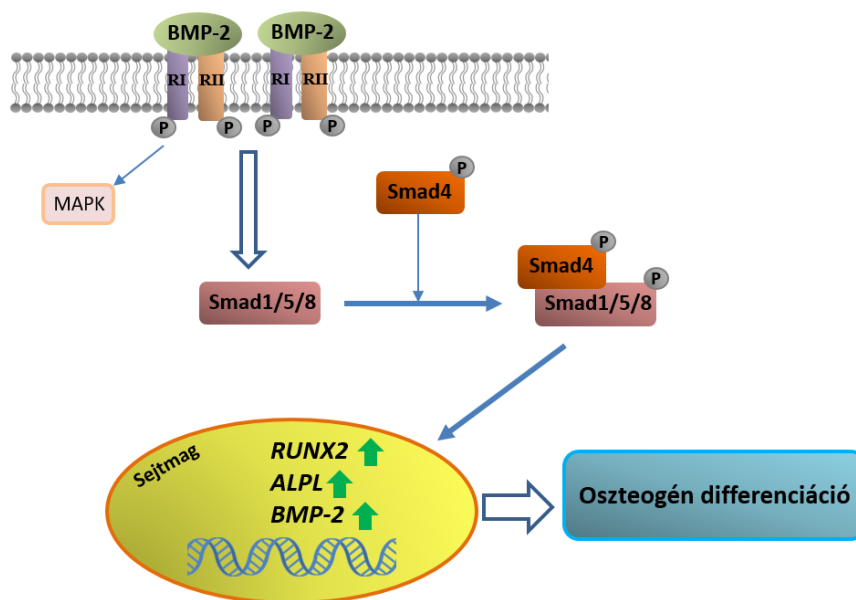
fehérjék alkotják a csont szerves mátrixát. Ezt követi a mineralizáció, melynek két fázisa van: vezikuláris és a fibrilláris fázis. A vezikuláris fázisban mátrix vezikulák szabadulnak fel az oszteoblasztok apikális részéből az újonnan képződött szerves csont mátrixba. Az oszteoblasztok olyan enzimeket választanak ki melyek hatására a kalcium ionok felszabadulnak és kalcium csatornákon keresztül a vezikulákba jutnak. Másrészt a jelen lévő foszfát tartalmú komponenseket szintén az oszteoblasztok által termelt ALP lebontja, így megnő a foszfát ionok mennyisége is a mátrix vezikulákban. Ezt követően képződnek a vezikulákban a hidroxapatit kristályok. A fibrilláris fázis során a vezikulumok túltelítetté válnak a kristályok számára, melyek ennek hatására felrepednek és a hidroxapatit kristályok a szerves mátrixba kerülnek. Ezt követően az érett csontsejtek egy része apoptotizál, mások oszteocitákká, vagy csontbélélő sejtekké alakulnak. (37)

3.2.1. A TGF- β jelátviteli útvonala

A TGF- β az Extracelluláris mátrixban tárolt látens fehérjeként szintetizálódik, amelynek aktiválása az oszteoklaszt sejtek által végzett csontreszorpciótól függ. Az aktív TGF- β két I-es típusú TGF- β receptort (T β RI) és két II-es típusú receptort (T β RII) tartalmazó tetramer receptor komplexhez kötődik, melynek következtében a T β RII transzfoszforilálja a T β RI-t, hogy SMAD-függő és SMAD-független jelátviteli útvonalatokat indukáljon. A SMAD-függő jelátvitelben a foszforilált R-SMAD (SMAD2 vagy 3) komplexet képez a SMAD4-gyel, és együtt transzlokálódik a sejtmagba, ahol kofaktorokkal együtt hatva szabályozzák a célgének expresszióját. TGF- β -k egy másik R-SMAD csoportot is aktiválhatnak (SMAD1, 5 és 8) az ALK1-hez való kötődésen keresztül. A nem SMAD-függő jelátviteli útvonalon a TGF- β aktiválja a TGF- β által aktivált kináz 1-et (TAK1) és a TAK1-kötő protein 1-et (TAB1) is, majd a foszforilált TAK1 összekapcsolódik a TAB1-el, hogy elindítsa az MKK-p38, MAPK vagy MKK-ERK1/2 jelátviteli kaszkádokat. A MAPK foszforilálja a RUNX2-t, hogy fokozza annak transzkripciós aktivitását, míg a SMAD2/3 hiszton deacetilázokat (HDAC-okat) aktivál a RUNX2 aktivitásának csökkentésére. A TGF- β -SMAD jelátvitel elősegíti az oszteoprogenitorok proliferációját, kemotaxisát és korai differenciálódását. Azonban gátolja az oszteoblasztok érését, mineralizációját és az oszteocitákká való átalakulását. (44)

3.2.2. BMP jelátviteli útvonala

A csont morfogénikus fehérjék BMP-k a TGF- β fehérjecsaldba tartoznak és részt vesznek az embrionális csontfejlődés szabályozásában, illetve a csontgyógyulásban is fontos szerepet töltenek be. Eddig több mint 20 féle BMP-t fedeztek fel, melyek a BMP fehérje családon belül több alcsoportba sorolhatók be, szekvencia homológia és biológiai funkció alapján. Pl.: a BMP-2 és BMP-4, a BMP-3B/GDF10 és BMP-3/osztegenin, a BMP-5, BMP-6/Vgr1, BMP-7/OP1 és BMP-8, a BMP-9/GDF2 és BMP-10, a BMP-11/GDF11 és GDF8/MSTN, a BMP-12/GDF7, BMP-13/GDF6 és BMP-14/GDF5 és a BMP-15/GCF9B és GDF9 alcsoportok. (45-48) Ezek közül 14 olyan fehérjecsaldot azonosítottak, melyek rendelkeznek oszteoinduktív hatással. (44) A BMP-2, 4, 5, 6, 7 és 9 homodimernek van a legnagyobb oszteogén aktivitása mezenchimális őssejtekben, míg a BMP-2, BMP-4 és BMP-7, BMP-9 elősegítik az oszteoblaszt progenitorok terminális differenciálódását. (42,44,49,50) Ezek közül a BMP-2 és a BMP-7 homodimer klinikai felhasználását az Amerikai Gyógyszer - és Élelmezésügyi Hatóság (FDA) is elfogadta.



2. ábra. BMP jelátviteli útvonala.

A BMP-2 homodimer, BMP receptorokhoz (BMPRI és BMPRII) való kötődése aktiválja a Smad 1, Smad 5, és Smad 8 fehérjéket melyek a Smad 4-el komplexet képezve a sejtnagba transzlokálódnak, ahol az oszteogén differenciációban szerepet játszó gének expresszióját indukálják, pl.: RUNX2, ALPL, BMP-2. A BMP-2 aktiválja a MAPK jelátviteli útvonalat is.

A BMP-2 elsősorban homodimer formában aktív, BMPRI és BMPRII receptorhoz képes kötődni, mely intacellulárisan jelátviteli útvonalakat indít, ilyen a kanonikus SMAD-függő és nem-kanonikus, SMAD-független, MAPK, BMP, TGF- β jelátviteli útvonalak, melyek kölcsönhatnak más jelátviteli útvonalakkal, mint pl. FGF, Hedgehog, WNT/ β -katenin és a Notch, NELL-1 jelátviteli útvonalak. (42,50,51) (2. ábra) A BMPRI-B receptor által indukált jelátvitel az oszteogén irányú differenciációt segíti elő, olyan transzkripciós faktorok aktiválásán keresztül, mint pl.: RUNX2 vagy az OSX. Ezzel ellentétben a BMPRI-A receptor aktivitása főleg az CCAAT-enhancer-kötő protein illetve PPAR γ expressziós szintjét növeli, melyek az adipocita irányú differenciáció irányába hatnak. Ezek a jelátviteli útvonalak nem különülnek el egymástól élesen, számos ponton összekapcsolódnak. Például a PPAR γ az adipocita irányú differenciáció mellett, fontos szerepet játszik az oszteogenezis szabályozásában is. (42,49) A BMP-2, vagy BMP-7 homodimerrel történő kezelés amellett, hogy oszteogén differenciációt indukál, fokozza az endogén BMP-2, 3 és 8a expresszióját, ugyanakkor gátolja a BMP-3b, 4, 6 expressziót. Mindezek mellett a BMP-k fokozzák BMP antagonisták expresszióját is, melyek negatívan hatnak a BMP útvonalakra, mivel képesek kötődni a BMP fehérjékhez, BMP receptorokhoz és a SMAD proteinekhez, gátolva azok funkcióját. Ilyen antagonisták a Gremlin, Noggin, Sclerostin, Chordin, kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) és a Follistatin. (42)

A BMP-2 és BMP-4 nem csak homodimer, de más BMP fehérjékkel, így a BMP-5, BMP-6 és BMP-7 fehérjékkel heterodimert alkotva is aktívak *in vivo*. A heterodimerek hatékonyabban segítik elő az oszteogén differenciációt, mivel nagyobb affinitással kötődnek a BMP receptorokhoz, mint a homodimerek. A heterodimerek legkisebb hatásos koncentrációja így 30-50-szer kisebb, mint a homodimereké. (52)

3.2.3. A WNT/ β -katenin útvonal

A WNT jelátviteli útvonal pozitív hatással van az MSC-k oszteogenezisére és oszteoblaszt irányú differenciálódására. A WNT receptor ligandok cisztein gazdag, erősen hidrofób fehérjék, melyek 300-400 aminosavból állnak. A WNT receptoron kívül, a transzmembrán frizzled (Fzd), az alacsony denzitású lipoprotein receptorral rokonságban álló fehérje 5 és 6 (LRP5/6) és a tirozin-kináz szerű orphan receptor 1/2-re is hatnak. A WNT jelátviteli útvonal alacsony szintű aktivitása fokozza az el nem kötelezett MSC-k proliferációját. Fokozott aktivitása gátolja az adipocita irányú differenciációt és elősegíti az oszteoblaszt irányú elköteleződést. Kimutatták, hogy a WNT6, WNT10a és a WNT10b

képes elnyomni az MSC-k adipocita irányú differenciációját, valamint elősegíteni az oszteoblaszt irányú differenciálódását a kanonikus WNT jelátvitel fokozásával. (38) A WNT ligandok, a receptorhoz való kötődést követően kanonikus, valamint nem kanonikus jelátviteli útvonalakat is aktiválnak. Kanonikus útvonalak a WNT/ β -katenin függő, a WNT/PCP és a WNT/kalcium jelátviteli útvonalak. Ezek szabályozzák az oszteogén irányú differenciációt a *RUNX2* promoterére hatva, valamint gátolják a porcsejt irányú differenciációt. A WNT10b gátolja a PPAR γ -t és a *RUNX2*, *Dlx* és *Oszterix* expresszió fokozásával trabekuláris csontképződést indukál, ezáltal segíti az oszteogenezist és növeli a csonttömeget (38), emellett a BMP-9 által kiváltott oszteogenezisben is részt vesz. A kanonikus útvonalakon kívül, nem kanonikus WNT útvonalak is részt vesznek a csontképződésben, melyek nem a β -katenin által szabályozottak. A WNT5a által aktivált nem kanonikus útvonal során OSX függő módon fokozódik az *LRP5/6* expressziója, ami elősegíti az oszteoblaszt irányú differenciációt. A WNT7b ugyancsak a nem kanonikus WNT útvonalon keresztül hat, melynek során a WNT7b által aktivált PKC delta a PI3K-Akt jelátviteli útvonalon át fokozza az oszteogenezist. (38)

A WNT antagonisták szekretált molekulák, melyek gátolják a WNT jelátvitelt. Két családba tartoznak a sFRP és a DKK molekulák családjába. Az sFRP családba tartoznak a sFRP, WIF1, Sclerostin (SOST), Cerberus a DKK csoportba pedig a DKK1-DKK4 molekulák. Az sFRP molekulák gátolják a WNT receptor-ligand kötődést, így gátolják a kanonikus és nem kanonikus jelátvitelt is, míg a DKK molekulák a kanonikus jelátvitelt képesek gátolni a WNT receptorhoz való kötődéssel. A Sclerostint az oszteociták szekretálják és szintén a kanonikus WNT jelátviteli útvonalat képes gátolni, az LRP5/6 receptor BP1 doménjéhez illetve az LRP4-hez történő kötődéssel, (38) valamint kompetál a BMP-2, 4, 5, 6 fehérjékkel a BMPRI és BMPRII receptorok kötőhelyeiért, így gátolva a BMP jelátvitelt is. A Szclerosztin szintjét a parathormon képes szabályozni az oszteocitákban. (38,42)

3.2.4. Notch jelátviteli útvonal

A Notch jelátviteli útvonalnak a sejtproliferáció és a differenciálódás, folyamataiban is van szabályozó szerepe, részt vesz a vázrendszer kialakulásában az embrionális fejlődés során, valamint felnőttkorban a csont regenerálódásában. (53) A Notch útvonal szerepe a csont irányú differenciáció során kontextus függő, a korai szakaszban történő aktivációja gátolja a további differenciációt, a késői szakaszban szerepet játszik az oszteoblasztok oszteocitákká történő differenciálódásában, valamint a mineralizációban. Emlősökben 4 különböző receptort azonosítottak. (Notch 1, 2, 3, 4), melyek ligandjai

membránhoz kötött fehérjék, melyek kanonikus vagy nem kanonikus jelátvitelt közvetítenek. A kanonikus Notch ligandumok a Jag1 és 2, illetve Dll1, 2, 3. A nem kanonikus ligandumok a Dlk1, DNER és CNTN. A ligandum kötődését követően a receptorok proteolitikus hasításon mennek keresztül, a Notch intracelluláris domén (NICD) felszabadul a plazmamembránról és aktiválja a kanonikus és nem kanonikus jelátvitelt. A kanonikus Notch jelátvitel során az NICD transzlokálódik a sejtmagba, ahol a CSL transzkripciós faktorhoz és ko-aktivátorokhoz kötődve komplexet formál és indukálja a downstream target gének expresszióját, melyek elősegítik az oszteoblaszt irányú differenciációt, valamint a mineralizációt. (42,53)

3.2.5. Hedgehog jelátviteli útvonal

A Hedgehog jelátviteli útvonal jelentős szerepet tölt be az embriogenezisben, valamint a vázizomzat és a csont fejlődésében. Három szerkezetileg homológ szekretált Hedgehog fehérjecsald figyelhető meg emlősökben: Sonic (Shh), Indian (Ihh) és a Desert (Dhh). Az Shh és Ihh fontos szerepet játszik az embrió fejlődésében, de az Shh szerepe kiemelkedően fontos a szkeletogenezisben. Az Ihh a fejlődő endochondralis csontok prehipertrófiás és hipertrófiás chondrocytaiban fejeződik ki, szabályozza az enchondralis és az intramembránózus csontosodás folyamatát. MSC sejtekben az Ihh növeli a *RUNX2* expressziós szintet, míg az Shh az oszterix gén expresszióját indukálja, így mindkét fehérje elősegíti az oszteogén irányú differenciációt. A Hedgehog jelátvitel tehát pozitívan szabályozza a csontképződést, de különböző, akár ellentétes hatást is kiválthatnak eltérő szövetekből izolált MSC sejtekben. (42) Az eddigi genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a Hedgehog jelátvitel Ihh által közvetített aktiválása az endochondralis csontosodás során szinkronizálja a kondrogenezist és az oszteogenezist, a kondrocita differenciálódás, kondrocita proliferáció és a csontképző oszteoblasztokérésének szabályozásával. Az Ihh a PTHrP (Parathormon-rokon fehérje) segítségével negatív feedback útján szabályozza a kondrocita irányú differenciációt, a *Ptch1* és a *Gli1* expressziójának aktiválásával elősegíti a porcsejtek osztódását. (54)

3.2.6. NELL jelátvitel

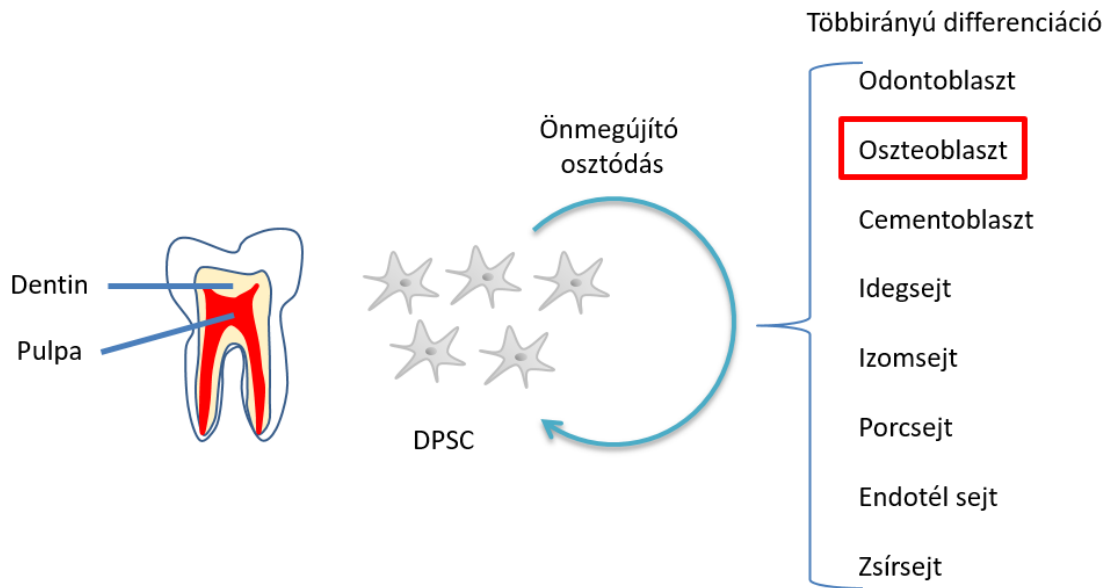
Az NELL (Neural Epidermal Growth Factor-Like) fehérjék, szekretált glikoproteinek, melyek két NELL családhoz tartoznak. A NELL-1 és a NELL-2. A NELL-1-et elsőként idegszövetben

azonosították, de szerepet játszik a csontszövet fejlődésében is, melyben a BMP fehérjékkel szinergista módon képes oszteogén irányú differenciációt indukálni. (42,55). A NELL-1 jelátviteli útvonal még csak részben feltérképezett, melyben többek között, az Integrin $\beta 1$, az Integrin $\alpha 3$ és a Cntnap4 fehérjék vesznek részt. A NELL-1 által indukált jelátviteli útvonal növeli a csont irányú differenciációt szabályozó *RUNX2* és *OSX* expresszióját, illetve hatással van más jelátviteli útvonalakra is, a Hedgehog útvonalat gátolja, a WNT/ β -katenin útvonalat aktiválja. A NELL-1 növeli a β -katenin expresszióját valamint nukleáris transzlokációját az oszteoblasztokban és oszteoklasztokban, ami fokozza az oszteoblasztok terminális differenciálódását, illetve gátolja az oszteoklasztok által végzett csontreszorpciót. Emellett a NELL-1 növeli az inorganikus foszfát (Pi) beáramlást a Pit-1 és Pit-2 csatornákon keresztül, elősegítve ezzel a mineralizáció folyamatát, serkenti az angiogenezist a csontregeneráció korai szakaszában, fokozza a mezenchimális őssejtek migrációját, továbbá gátolja a mezenchimális stromasejtek adipogén irányú differenciálódását. (42,55)

3.3. Humán bölcsességfog pulpából származó őssejtek

A szájüregben számos mezenchimális őssejt típus, un. fog eredetű őssejt (DSC) megtalálható pl.: pulpából izolálható őssejtek (DPSC-maradófog, SHED- tejfog eredetű), a follikulusból izolált őssejtek (DFPC), a parodontális ligamentumokból (PDLSC), apikális papillából (SCAP), gingivából (GMSC), a buccalis zsírpárnából származó (BFPSC) illetve a csontvelőből kinyerhető őssejtek. (56,57)

A mezenchimális őssejtek progenitor sejtek, melyek önmegújulási és differenciálódási képességgel rendelkeznek, míg a mezenchimális stromasejteket, olyan sejt populáció alkotja, amelyek jelentős szekréciós képességgel, immunszabályozással és homeing tulajdonságokkal rendelkeznek.



3. ábra. A fogbél eredetű őssejtek (DPSC).

A DPSC-k számos irányba képesek differenciálódni pl.: odontoblaszt, cementoblaszt, oszteoblaszt, idegsejt, izomsejt, porcsejt, endothél sejt és akár zsírsejt irányba is.

A DSC-k mindkét mezenchimális jellegzetességgel rendelkeznek, részt vesznek az immunmodulációban és a daganatos folyamatokban, számos angiogén és neurotróf faktort képesek kiválasztani, beleértve az endoteliális növekedési faktort (VEGF), ciliáris neurotróf faktort (CNTF), agyi eredetű neurotróf faktort (BDNF), glia eredetű neurotróf faktort (GDNF) és a β -ideg növekedési faktort (β -NGF), mellyel pozitívan befolyásolják az angiogenezist és a szövetregenerációt. A mezenchimális őssejtekhez hasonlóan gyengén expresszálják az MHC II. osztályba tartozó antigént a HLA-DR-t, ezáltal alacsony immunogenitást váltanak ki. A lokális szövetregeneráció és a gyulladásos környezet befolyásolhatja a szekréciójukat, beleértve a gyulladásos és gyulladásgátló citokinek termelését és az immunsejtek szabályozását. Végül a gyulladásos mikroenvironment hatással lehet a sejtek viselkedésére is, úgymint a proliferációs potenciáljukra, a migrációjukra és a differenciálódási képességeikre. (58)

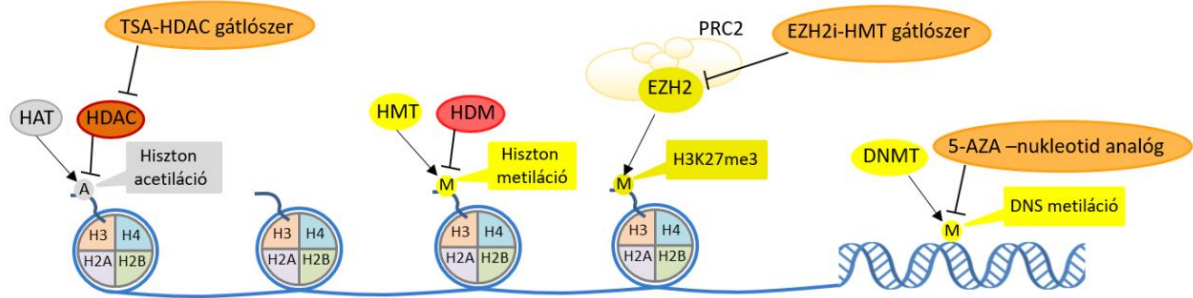
A DSC-k klinikai felhasználásra is alkalmasak, számos klinikai vizsgálatot regisztráltak parodontitis, extrakció utáni alveolus regeneráció terápiájában, fogatlan alveolaris gerinc csontdefektusainak kezelésében, ajak- és szápadhasadék, térdízületi gyulladás, fogbél nekrozis, májcirrózis, 1-es típusú cukorbetegség, akut ischaemiás stroke, Huntington-kór és COVID-19, ráncok és a hajhullás kezelésében. (58)

A DSC-k közül a fog pulpájából izolálható őssejtek (DPSC-k) kinyerése a legegyszerűbb, sebészi úton eltávolított bölcsességfog pupájából könnyen kinyerhetőek. MSC-kkel megegyező sejtfelszíni markereket expresszálnak, mint a CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD271 és STRO-1, míg a haemopoetikus markerek, köztük a CD14, CD34, CD45 és a CD117 hiányoznak, vagy nagyon alacsony szinten expresszálnak. Emellett a DPSC-k vaszkuláris endothel növekedési faktorokat is expresszálnak, mint a TLR4 és TLR5. (57,59,60) A DPSC-k heterogén sejtek csoportja, de számos irányba képesek differenciálódni pl.: odontoblaszt, cementoblaszt, oszteoblaszt, idegsejt, izomsejt, porcsejt, endothel sejt és akár zsírsejt irányba is. (57,59) (3. ábra) Egyszerű izolálhatóságuk és multipotens tulajdonságuk miatt terápiás alkalmazásukban nagy lehetőségek rejlenek a fogászat területén is a szöveti regenerációban. A DPSC-eket oszteo/odontogén indukciós tápközegben tenyésztve, az oszteoblaszt, illetve odontoblaszt irányú differenciációhoz, valamint a mineralizációhoz kapcsolódó gének expressziós szintje megnő. Ilyen az alkalikus foszfatáz (ALP), az I-es típusú kollagén (Col I), oszteopontin (OPN), oszteokalcin (OCN) és oszterix (OSX). A STRO-1 sejtfelszíni markert expresszáló DPSC-k több alpopulációból állnak, amelyek spontán módon is differenciálódhatnak odontoblasztokká, oszteoblasztokká és chondrocytákká. (61) A DPSC-k differenciálódási képessége a sejtpasszálások során változik, a 9. passzázs után az oszteogén differenciálódási potenciáljuk lecsökken. (62)

3.4. Őssejtek differenciációja epigeneikai jellegek alapján

Az őssejtek differenciációja nemcsak genetikai szinten szabályozott, a DNS-hez közvetlenül kötődő fehérjék (pl. transzkripciós faktorok) által, hanem epigenetikai mechanizmusokon keresztül is. (3. ábra) Ezek a mechanizmusok epigenetikai módosítások által érvényesülnek, melyek többek között magukban foglalják a DNS-metilációját és a hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításait is. Általánosságban az epigenetikai módosításokat az ún. „writer” típusú fehérjék hozzák létre és az „eraiser” típusú fehérjék távolítják el. A „reader” típusú fehérjék felismerik és szelektíven kötődnek bizonyos epigenetikai módosításokhoz, ahol a „reader” fehérje jellegétől függően valamilyen funkciót látnak el, pl.: szabályozzák a transzkripciót, vagy a DNS repair folyamatában vesznek részt. Ezek a fehérjék a kromatin remodelling komplexek összetevői is, melyek a kromatin szerkezetét szabályozzák (59,63,64). A kromatin remodelling komplexek szabályozzák a reverzibilis átmenetet a kevésbé kompakt, transzkripciósan aktív eukromatin és a tömörebb szerkezetű, transzkripciósan represszált

heterokromatin között, így meghatározva az aktuálisan átíródó gének mintázatát a teljes genomban. (65,66)



4. ábra. Epigenetikai jelek a kromatinban.

A DPSC sejtek differenciációjában szerep játszó gének expresszióját különböző epigenetikai jelek is befolyásolják. Ilyenek epigenetikai jelek a sejtmag kromatin állományát alkotó hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosításai, pl.: metiláció, acetiláció, illetve a hisztonok által alkotott oktamerre feltekeredő genomális DNS metilációja. Ezek a jelek befolyásolhatóak különböző kis molekulájú anyagokkal, mint pl.: a Trihosztatin A, az 5-AZA, illetve az EZH2 inhibitor. A TSA egy hiszton deacetiláz gátló, ami megakadályozza a hiszton acetiláció eltávolítását. Az 5-AZA egy nukleotid analóg, ami a replikáció során beépül a genomba. Ahol beépült, ott a DNS nem tud metilálódni. Az EZH2 inhibitor a PRC2 fehérje komplex részét képező EZH2-t gátolja ami a H3 hiszton 27-es lizinének metilációjáért felelős hiszton metiltransferáz.

Más őssejtekhez hasonlóan a DPSC sejtek oszteogén differenciációjában szerepet játszó gének kifejeződése is a kromatin epigenetikai jellegei által meghatározott (pl.: hiszton acetiláció, hiszton metiláció, DNS-metiláció). (59,63,64) A kromatin a sejtmagban található genetikai állomány és a hozzá kapcsolódó fehérjék összessége, legkisebb szerkezeti egysége a nukleoszóma, amely 8 hiszton fehérjéből álló oktamerből, valamint a köré tekeredett 146 bázispár hosszú DNS szakaszból áll. A nukleoszómából a hisztonok karboxi- és amino-terminális vége kinyúlik, melyek aminosav oldalláncain számos poszt-transzlációs módosítás (epigenetikai módosítás) jöhet létre, ilyen módosítás az acetiláció, metiláció, foszforiláció, szumoiláció és az ubiquitináció. (67) A hisztonok lizin oldalláncai a hiszton-acetil-transferáz (HAT) és a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek célpontjai. (4. ábra) A hisztonok HAT általi acetilációja a kromatint transzkripciósan aktív formává, eukromatikus állapotúvá alakítja. (68) Az acetil-csoportok képesek semlegesíteni a hiszton fehérjék pozitív töltéseit, így gyengítik az oktamer és a rátekeredett DNS közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat, elősegítve ezzel a nyitott kromatin szerkezet kialakulását, ami biztosítja a DNS-hez való hozzáférhetőséget a transzkripciót aktiváló fehérje komplexek számára. Ezzel ellentétben a lizin oldalláncai HDAC általi

deacetilációja, vagyis az acetyl csoport eltávolítása, kompaktabb szerkezetű kromatint eredményez, ami a transzkripció gátlásához vezet. (69)

A hisztonok metilációja, különösen a H3 hiszton 9-es és 27-es lizinjének metilációja a transzkripció gátlása szempontjából jelentős. Ezek közül a PRC2 fehérje komplex katalitikus alegysége, az EZH2 metil transferáz aktivitása révén a H3-as hiszton 27-es lizinjén létrejövő trimetiláció (H3K27me3) gátolja DPSC sejtek odontogén differenciációját, a *DSPP* és *DMP1* gének promóter régiójának metilációjával. (4. ábra) A *β-katenin* gén szintén az EZH2 általi hiszton metiláció révén szabályozott. Az EZH2 metilálja a *β-katenin* gén promóter régiójának hiszton fehérjéit, ami a *β-katenin* gátlásához, így a WNT/*β-katenin* jelátviteli út vonal ezzel együtt az odontogén differenciáció gátlásához vezet. A DPSC sejtek oszteogén differenciációját szabályozó gén a, *RUNX2*, a H3-as hiszton 9-es lizinjének dimetilációja (H3K9me2) szabályozott. Ezt az epigenetikai módosítást az eukromatikus hiszton metiltransferáz 1 (EHMT1) hozza létre. A BMP-2 által aktivált jelátviteli folyamat során a CBFA2T2 (core binding factor alpha subunit 2) downregulálja az *EHMT1* expresszióját, ezáltal lecsökkenti a *RUNX2* promóterében H3K9 dimetilációját, ami a *RUNX2* fokozott expressziójához, ezen keresztül a DPSC sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjához vezet (59). A H3-as hiszton 9-es lizinjének trimetilációja (H3K9me3) szintén szabályozó szerepet tölt be a csont irányú differenciációt szabályozó géneken, a transzkripciót gátolva. Apikális papillából származó őssejtek (SCAP) oszteo-/odontogén differenciációja során a KDM4B hiszton demetiláz eltávolítja a *DLX5* gén promóter régiójáról a H3K9me3 epigenetikai módosítást, ami downstream aktiválja a differenciációhoz szükséges *DSPP*, *DMP1*, *OSX* és *BSPI* géneket. A transzkripció általános aktivátora, a H3-as hiszton 4-es lizinjének trimetilációja (H3K4me3), ez a módosítás szükséges az oszteoblaszt irányú differenciációban résztvevő gének átíródásához is, így a KDM5A hiszton demetiláz, ami eltávolítja ezt a módosítást gátolja a differenciációt. (63)

A sejtmag kromatin állományában a DNS citidin nukleotidjai is hordozhatnak epigenetikai módosítást, a citozin gyűrű 5-ös pozíciójában lévő szénatom metilációjának formájában, melyet DNS metiltransferázok hoznak létre. Az emlősök genomjának metilációs mintázata bimodális: szinte minden CpG-dinukleotid metilált, kivéve a CpG-szigeteken találhatóakat, amelyek nem módosulnak konstitutívan. (67-69) A gének közel 50 %-a esetén a promóter régió CpG szigeteket tartalmaz melyek metiláltsági foka fordítottan arányos a génátíródással. Azon gének, melyek promóterében a CpG szigetek metiláltak, nem íródnak át, míg a metiláció eltávolítása aktiválja a transzkripciót. (3) A

folyamat, transzkripciós mediátorok által szabályozott, mint pl.: metil-kötő fehérjék (MBD) csoportja, melyekhez tartoznak a hiszton-deacetilázok (HDACs) is. DNS-metiláció közvetlenül is képes gátolni a transzkripciót, azáltal, hogy blokkolja a transzkripciós faktorok kötődését, mint például a MYC5. (69) A DNS-metilációt három aktív DNS-metiltransferáz (DNMT) katalizálja (3. ábra), amelyek közül egyik sem rendelkezik jelentős szekvenciaspecifitással a CpG-dinukleotidon túl. Dnmt1-et általában „fenntartó” metiltransferáznak tekintik, ami a DNS-replikációt követően felismeri az újonnan szintatizált hemimetilált CpG helyeket, és módosítja ezeket, hogy visszaállítsa az eredeti metilációs mintázatot. A DNMT3a és a DNMT3b nagymértékben homológ *de novo* metiltransferázok, melyek a CpG szigetek metilációját katalizálják. (70)

Mivel a DPSC sejtek oszteogén differenciációja epigenetikai jellegek által szabályozott, ezért olyan anyagokkal, melyek hatással vannak ezekre az epigenetikai módosításokra a csont irányú differenciáció befolyásolható. Napjainkra számos, epigenetikai jellegeket módosító gyógyszert, vagy gyógyszer jelölt molekulát fejlesztettek ki, leginkább tumoros betegségek kezelésére (71-73), melyek a tumorgátló hatásukon túlmenően befolyásolhatják az őssejtek differenciációs képességeit is, így elősegíthetik a DPSC-k oszteogén differenciációját, illetve mineralizációját. (74) Ez új lehetőségeket nyithat ezen gyógyszerek alkalmazásában, tekintettel arra, hogy a DPSC-k felhasználása ígéretes lehet a fogászat és az általános orvostudomány területén is a csontszövet regenerációjában. Ezen gyógyszerek új felhasználását korlátozó esetleges mellékhatások kiküszöbölhetőek, vagy csökkenthetőek, a DPSC-k *in vitro* történő differenciációjával és a már differenciált sejtek felhasználásával (75), illetve a gyógyszeres kezelés biológiailag irányított módon lebomló hatóanyag leadó rendszerrel történő kombinálásával. (76,77) Munkám során három ilyen molekulát vizsgáltam: a trihosztatin A-t (TSA), a zeste homológ 2 inhibitor (EZH2i) és az 5-azacitidint (5-AZA). Független tanulmányokban kimutatták, hogy a DPSC-k oszteogén/odontogén differenciálódása fokozható ezekkel a szerekkel, modulálva az epigenetikai módosítások eloszlását a kromatinban, és ez által aktiválva a kulcsfontosságú szabályozó géneket. (4,5,78-80)

3.4.1. Trihosztatin A

A Trihosztatin A (TSA), egy hidroxámsav, ami általánosan növeli az egész kromatin acetilációját azáltal, hogy hasonló affinitással képes kötődni számos hiszton-deacetilázhoz (HDAC), melyek a hiszton fehérjék acetil módosításainak eltávolításáért felelősek, gátolva azok működését. (4. ábra)

Mivel a hiszton acetiláció a transzkripcióban aktív gének promóter régiójára jellemző sajátosság, a kromatin megnövekedett acetilációja általános génaktivációhoz vezet. (69) Az oszteoblaszt irányú differenciációt szabályozó egyik kulcs gén, a *RUNX2* kifejeződése is egy HAT fehérjétől, a p300-tól függ. A TSA kezelés fenntartja a *RUNX2* promóter régiójában a hisztonok p300 általi acetilációját, így annak transzkripció aktivitását, ami a csontosodás irányába hat. A TSA több sejttípusban is képes fokozni az oszteoblasztokká történő differenciálódást, beleértve a preoszteoblasztokat, a csontvelői mezenchimális sejteket, és zsírból származó sztrómasejteket. (78) A TSA már alacsony dózisban (25 nM) is indukálja az *OPN* és a *BMP-2* expresszióját, mely koncentrációnál az esetleges mellékhatások még nem jelentkeznek, ezeket 50 nM feletti koncentrációnál tapasztalták. (4)

A csonthiányok kezelésén túl a HDAC-gátlók az orális maxillofacialis betegségek kezelésében, pl.: parodontitis, is potenciálisan alkalmazhatóak. (6) Lamour és munkatársai (2007) kimutatták, hogy az HDAC3 a csont szialoprotein (BSP) promóter deacetilációjával gátolja annak kifejeződését. (81) Emellett TSA a dentin mátrix savas foszfoprotein 1 (*DMP-1*) gén expressziójának aktivációjával indukálja a pulpából származó progenitor sejtek differenciációját és felgyorsítja azok mineralizációját. A HDAC1 és HDAC3 mRNS-ek nagy mennyiségben expresszálódnak a gyulladt parodontális szövetekben, ami arra utal, hogy a HDAC fokozott expressziója a gyulladt parodontális szövetekben hozzájárulhat a nem megfelelő parodontális regenerációhoz. (82) A TSA a gyulladással mikrokörnyezetben viszont jelentősen növeli a PDLSC-k oszteogén differenciálódási potenciálját a HDAC elnyomásával. (83) Számos gyulladással és immunválaszban részt vevő gént, mint például az *IL-6*-ot és az *IL-8*-at, az *NF-κB*-t szabályozza. A TSA, így csökkentheti a gyulladást és elősegítheti a parodontális szövetek helyreállítását az *NF-κB* jelátvitel gátlásával. (6) Emellett az *NF-κB* útvonal befolyásolja az MSC-k oszteogén irányú differenciációját és a csontképződését. A TNF és *IL-17* gyulladással citokinek által aktivált *NF-κB* útvonal, gátolja az MSC-k oszteogén differenciációját. Az *NF-κB* útvonal aktivitását poszttranszlációs módosítások is szabályozzák. A HDAC3 központi szerepet játszik az *NF-κB* egyik alegységének a p65-nek a deacetilációjában, ami ahhoz kell, hogy az *NF-κB* transzkripció faktor kötődni tudjon a DNS-hez. Az HDAC3 fehérjét is blokkoló TSA hatására a p65 acetilálódik, az *NF-κB* nem tud kötődni a DNS-hez így az oszteogén differenciációt gátló hatása nem érvényesül. (6) TSA a *RUNX2* hiperacetilációját is indukálja, ami szerepet játszik a hPDLSC-k által kiváltott oszteogenezis fokozásában. Emellett fokozza a mineralizációt *in vitro* 3D tenyészetekben anélkül, hogy hatással lenne a sejtek életképességére. (84,85)

3.4.2. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)

Az EZH2 a polycomb group gének (*PcG*) családjának tagja és a PRC2 (Polycomb repressive complex 2) fehérje komplex katalitikus alegysége, mely a H3 hiszton 27-es lizinjének trimetilációjával (H3K27me3) a transzkripció gátlásában játszik szerepet. (86,87) A PRC fehérjék evolúciósan konzerváltak, az epigenetikus memória létrehozásában, fenntartásában, az őssejtekre jellemző tulajdonságok fenntartásában, valamint az őssejtek differenciációjában is fontos szerepet játszanak. (4. ábra) (7,88) Az EZH2 mellett a PRC2 további két alapvető alegységből áll: az embrionic ectoderm development (EED) és a zeste 12 szuppresszorból (SUZ12). Az EZH2 nem csak a hisztonok metilációjában vesz részt, hanem más fehérjékkel is képes kölcsönhatásba lépni, így PRC2-független módon is szabályozza a gének transzkripció aktivitását. Az EZH2 szerepet játszik a sejtciklus, sejtek autofágiájának, apoptózisának, illetve a DNS károsodások javításának szabályozásában, emellett gátolja a sejtek öregedését és fontos szerepet játszik a sejt differenciációjában. Az EZH2 fehérjének 5 doménje van: EED-interaction domén (EID), a Domén-I, Domén-II, cisztein gazdag domén (CXC) és az enhancer of zeste and trithorax domén (SET). Az EZH2 hiszton metiltransferáz aktivitásáért a SET domén és a CXC domén felelős. Az EZH2, CDK1 (cycline dependent kinase) általi foszforilációja megszünteti az enzim metiltransferáz aktivitását, ami humán MSC-k oszteoblasztokká történő differenciálódását eredményezi. (7) Az EZH2 általi H3K27 trimetiláció gátolja az oszteoblaszt irányú differenciációt elősegítő *RUNX2* és *OPN* gének kifejeződését (8,9), míg a H3K27me3 demetiláz KDM6A aktiválja azokat, ami az oszteogén differenciáció irányába hat (10,11). Az EZH2 és a KDM6A ellentétes hatást vált ki az MSC-k osteogén és adipogén differenciálódásában is. Az EZH2 elősegíti az MSC-k adipogén differenciációját, míg a KDM6A gátolja azt. (89,90)

Az MSC-k CTR9 által szabályozott oszteogén differenciációja szintén a PRC2-H3K27me3 fehérjékhez kapcsolódik. A CTR9 az EZH2 általi H3K27 trimetiláció szabályozásán keresztül aktiválja a csontképződés egyik fő szabályozójának a BMP-2-nek a transzkripcióját, ami elősegíti az MSC-k oszteoblasztokká történő differenciációját. (12) Tovább erősíti ezt a megfigyelést egy másik tanulmány, melyben az MC3T3 preoszteoblaszt sejtvonal, BMP-2-vel és EZH2 inhibitorral történt együttes kezelése pozitívan befolyásolta ezen sejtek oszteoblasztá történő differenciációját, ami szintén arra utal, hogy az EZH2 epigenetikailag szabályozza a BMP-2-t. (13)

Az EZH2 inhibitor (EZH2i) gátolja az EZH2 hiszton metiltransferáz aktivitását, így a TSA-hoz hasonlóan az EZH2i kezelés is általános génaktivációhoz vezet a teljes genomban.

3.4.3. 5-Azacitidin

Az 5-AZA egy pirimidin-nukleozid analóg, melyet a sejtek képesek felhasználni a DNS szintézise során és így beépíteni a genomba. Hatásmechanizmusa azon alapszik, hogy a citozin 5-ös pozíciójában lévő szénatomja egy nitrogénre lett cserélve, ami gátolja a DNMT-k működését azáltal, hogy irreverzibilis kovalens kötést hoz létre a DNMT és az 5-AZA tartalmú DNS-szál között. (4. ábra) Az 5-AZA beépülése a DNS-be, a genom globális hipometilációjához, és ez által a heterokromatikus régiók dekonzenzációjához vezet, lehetővé téve az inaktív gének expresszióját (91,92). Az 5-AZA beépülésének következtében a funkcionális DNMT-k mennyisége is csökken a sejtmagban (14,93), ami tovább csökkenti a metilációs szintet. Az 5-azacitidin (5-AZA) és az 5-aza-2'-deoxicitidin molekulát először 1964-ben szintetizálták és 2004 óta rendelkeznek az FDA jóváhagyásával (92) a mielodiszplázias szindróma kezelésére.

4. 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.

5. Anyagok és Módszerek

5.1. 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). (94) 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 sztreptomicinnel (Sigma Aldrich, P0781), illetve 1% GlutaMAX hozzáadásával (Life technology, 10567014) történt, valamint a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-ban, párásított 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.

5.2. Alamar blue assay

Egy 96 lyukú sejtenyésztő 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 µl színtelen DMEM-mel (Sigma Aldrich, D5921) történő mosást követően 200 µl színtelen 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 sejt típusra 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.

5.3. Kalcium mennyiségi meghatározása

Egy 6 lyukú sejtenyésztő 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 × 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 sejtlizátumából Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, 23227) segítségével (a gyártó utasításainak megfelelően) határoztuk meg. Az ábrákon a mineralizáció mértékét kifejező számértékeket az összfehérje mennyiségre normált

abszorbancia formájában adtuk meg, OD/ μ g fehérje tengely jelöléssel, ahol az OD az optikai denzitást jelenti (abszorbanciával ekvivalens kifejezés).

5.4. 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 MgCl₂, ZnCl₂, 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.

5.5. 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 sejtlyízist, 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-aldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz) housekeeping génexpressziós szintjére normalizáltuk.

5.6. Statisztikai analízis

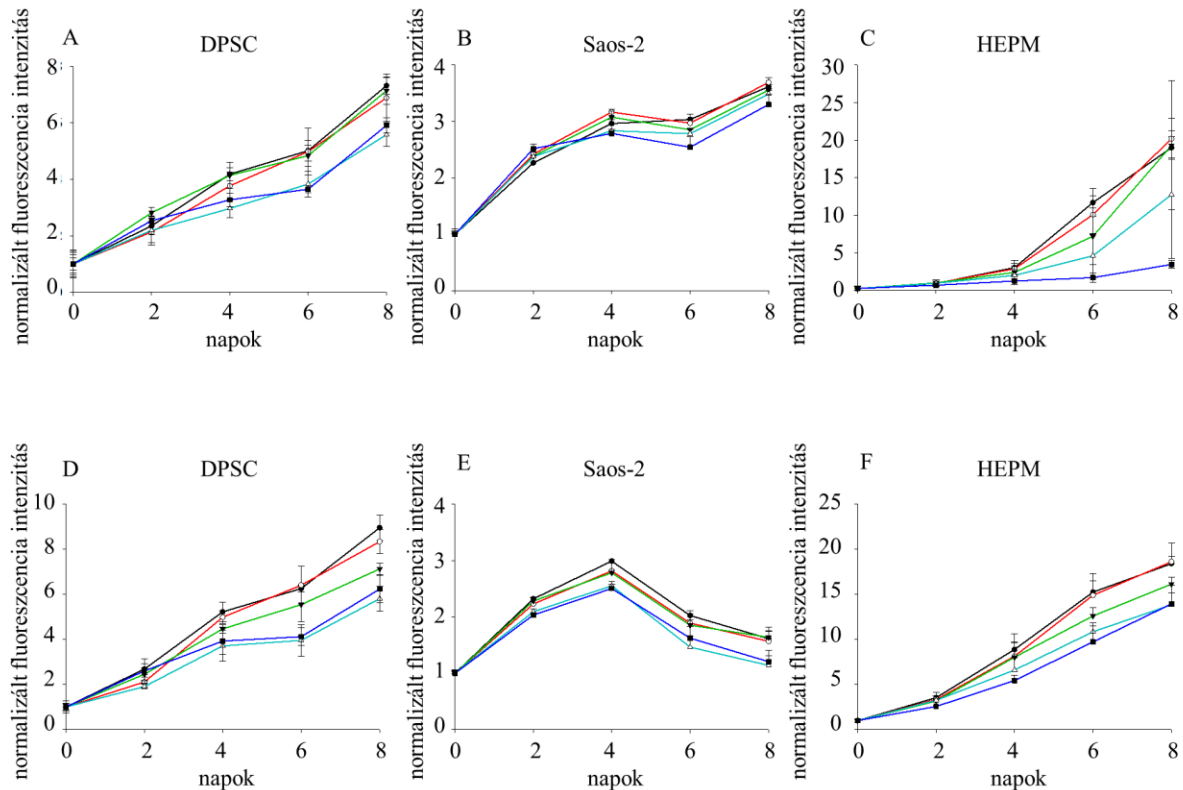
Az ábrákon a hibasávok a korrigált empirikus szórást (SD) jelentik három párhuzamos (1-5. ábrák), vagy három független (6-8. ábrák) mérésből számítva. A statisztikai elemzés többszörös összehasonlítás esetén ANOVA és Bonferroni post hoc statisztikai teszttel (1-5. ábrák), egy kontroll méréshez történő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

6. Eredmények

6.1. Humán BMP-2 homodimer fehérje hatásának vizsgálata DPSC sejteken

Munkám során először a BMP-2 sejtproliferációra gyakorolt hatását tanulmányoztam DPSC, Saos-2 és HEPM sejteken, a CM-ben (5. A-C. ábra) vagy OIM-ben hígított (5. D-F. ábra) BMP-2 koncentráció sorsal történő 8 napos kezelés hatására. A BMP-2-vel kiegészített CM-ben növesztett mindhárom sejtípus esetén, a sejtnövekedés mértéke koncentrációfüggő módon csökkent az idő előrehaladtával. Ugyanezt a jelenséget figyeltem meg OIM-ben növesztett sejteken is, a Saos-2 sejtvonallal kivételével, melyek növekedése OIM médiumban a 4. napon leállt, majd ezt követően a sejtek száma csökkent a 6. és a 8. napra. Ez utóbbi esetben feltehetően az oszteoblaszt irányú differenciáció gyorsabban ment végbe 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. (95)

Az OIM összetevőit külön megvizsgálva azt találtam, hogy csak a β -GLY volt hatással mindhárom sejtvonallal, csökkentve a sejtek proliferációját. A DEX önmagában csak a DPSC sejtek osztódására volt gátló hatással, a másik két sejtvonallal nem (6. A-C. ábra). Az OIM médium többi összetevője az AA és D₃ VIT minimális hatással volt a sejtekre. Ezek alapján az OIM médium összetevői közül, meglepő módon, elég, ha csak az inorganikus foszfát forrásként szolgáló β -GLY-al egészítjük ki a sejtenyésző médiumot a sejtproliferáció csökkentéséhez, ami feltehetőleg a csont irányú differenciáció következménye lehet. Továbbá szinergikus hatás volt megfigyelhető a β -GLY és a BMP-2 között Saos-2 sejtek esetén (6. D. ábra). A BMP-2 kombinációja β -GLY-tal vagy DEX-al nem eredményezett ilyen kölcsönhatást DPSC, vagy HEPM sejteken (6. D, F. ábra).



A-C: CM+BMP-2 D-F: OIM+BMP-2

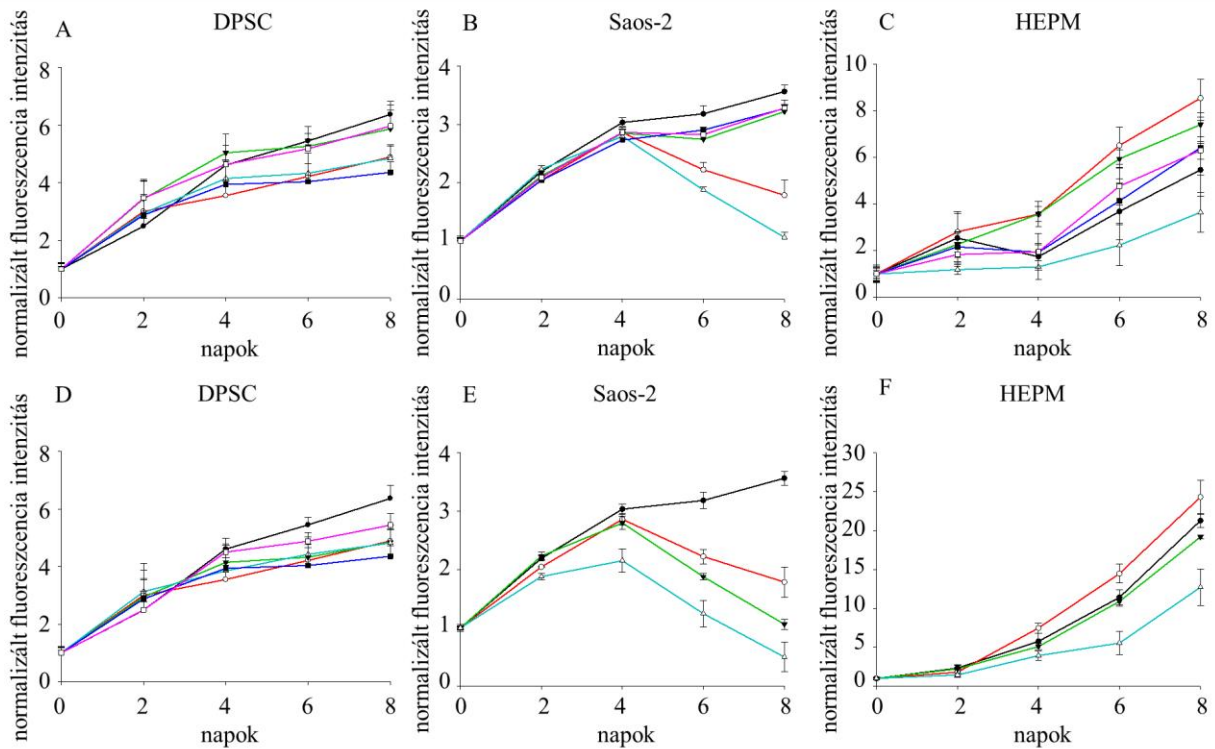
A-F: ● kontroll ○ 0,001 µg/ml ▼ 0,01 µg/ml ▲ 0,1 µg/ml ■ 1 µg/ml

Statistikai analízis:

minta párok \ napok	2	4	6	8
Kontroll vs. 0,001 µg/ml		B*		
Kontroll vs. 0,01 µg/ml				D*, F*
Kontroll vs. 0,1 µg/ml	E*	A*, D*, E**	D*, E*	A*, D*, F*
Kontroll vs. 1 µg/ml	E**	E**	B**, C*, D*, F*	B*, C*, D**, F*

5. ábra. BMP-2 hatásának vizsgálata oszteoblaszt progenitor, illetve DPSC sejtek proliferációjára.

(A-C) Proliferáció vizsgálata alamar bluea assay-vel, különböző koncentrációjú BMP-2-vel kiegészített CM médiumban növesztett, (A) DPSC, (B) Saos-2 és (C) HEPM sejteken. (D-F) Proliferáció vizsgálata alamar bluea assay-vel, különböző koncentrációjú BMP-2-vel kiegészített OIM médiumban növesztett, (D) DPSC, (E) Saos-2 és (F) HEPM sejteken. A szignifikáns eltéréseket táblázatos formában foglaltuk össze, melyek oszlopai az adott kezelési időponthoz tartozó mérési pontok közül a kontrollhoz képest szignifikánsan eltérő kezeléseknél mutatják a p-értéket. (átlag±SD, * p < 0,05 és ** p < 0,005).



A-C: OIM komponensek D-F: OIM komponensek + BMP-2
 A-C: ● CM ○ OIM ▼ AA ▲ β-GLY ■ DEX □ D3 VIT
 D: ● CM ○ OIM ▼ β-GLY ▲ β-GLY+BMP-2 ■ DEX □ DEX+BMP-2
 E, F: ● CM ○ OIM ▼ β-GLY ▲ β-GLY+BMP-2

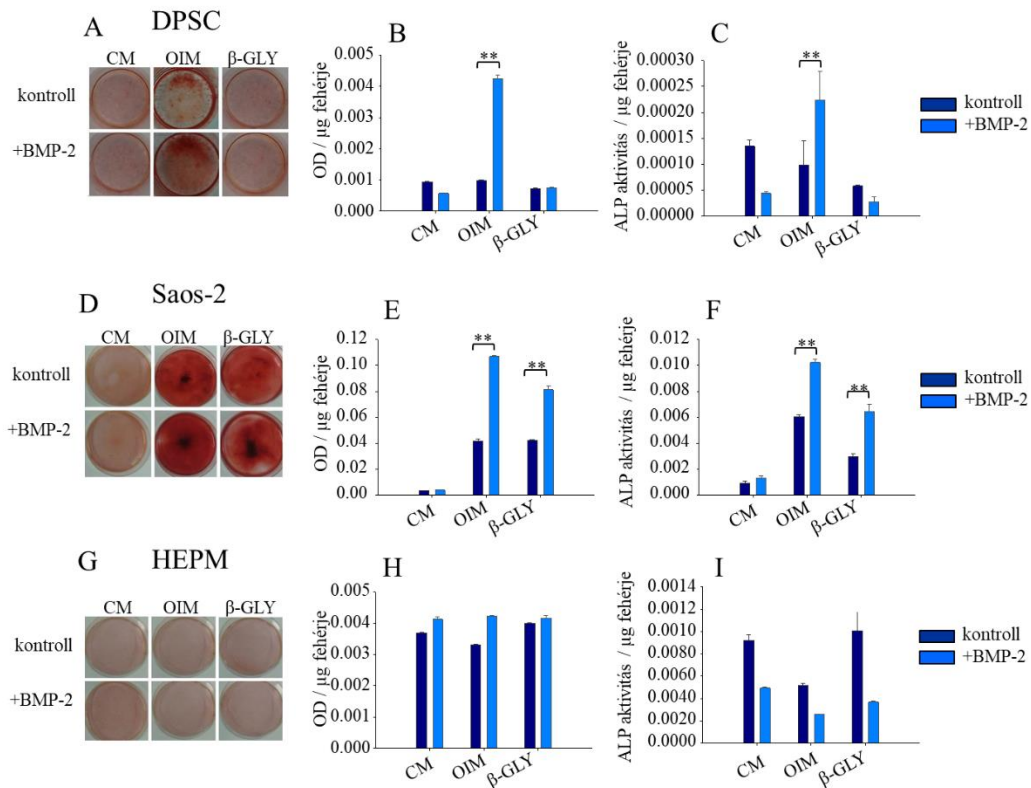
minta párok \ napok	2	4	6	8
CM vs. OIM	E*	C*	B**, C*, E**	B**, C*, D*, E**
CM vs. AA		C*	B*	
CM vs. B-GLY			B**, F**	B**, D*, E**
CM vs. B-GLY+BMP-2	E**	E**	E**, F**	D*, E**, F**
CM vs. DEX				A*, D**
CM vs. D3 VIT			B*	

6. ábra. Az OIM összetevőinek, valamint a β-GLY és DEX, BMP-2-vel kombinált hatásainak vizsgálata oszteoblaszt progenitor, illetve DPSC sejtek proliferációjára.

(A-C) Proliferáció vizsgálata alamar bluea assay-vel, az OIM médium egy-egy komponensével (aszorbinsav (AA), β-glicerofoszfát (β-GLY), dexametazon (DEX), D₃-vitamin (D₃ VIT) kezelt (A) DPSC, (B) Saos-2 és (C) HEPM sejteken. (D-F) Proliferáció vizsgálata alamar bluea assay-vel, β-GLY és DEX, valamint azok BMP-2-vel történő kombinációjával kezelt (D) DPSC, (E) Saos-2 és (F) HEPM sejteken. A szignifikáns eltéréseket táblázatos formában foglaltuk össze, melyek oszlopai az adott kezelési időponthoz tartozó mérési pontok közül a kontrollhoz képest szignifikánsan eltérő kezeléseknél mutatják a p-értéket. (átlag±SD, * p < 0,05 és ** p < 0,005).

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 hidroxipapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) volt megfigyelhető az OIM-ban tenyésztett Saos-2 sejtek (7. D, E. ábra) extracelluláris mátrixában, HEPM sejtek (7. G, H. ábra) esetén azonban ilyen nem volt tapasztalható. Kismértékű festődés látható volt DPSC sejteken is, azonban a kioldott festék kvantitatív analízise során nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll CM médiumhoz képest (7. A, B. ábra). A festésre adott pozitivitás a proliferáció csökkenése alapján feltételezett csontsejt irányú differenciációt bizonyítja. A BMP-2 hatását vizsgálva jelentős növekedés volt megfigyelhető a DPSC és Saos-2 sejtek mineralizációjában, amikor az OIM médiumot BMP-2-vel egészítettem ki (7. A, B. és D, E. ábra), illetve Saos-2 sejtek esetén a β -GLY és BMP-2 kombinációjának hatására (7. D, E. ábra).

Az oszteogén differenciáció kimutatásának egy további módszere a sejtek ALP aktivitásának mérése (96), amely szintén jelentősen megemelkedett OIM médiumban Saos-2 sejtek (7. F. ábra), illetve OIM+BMP-2 kezelés hatására Saos-2 és DPSC sejtek esetén (7. C, F. ábra). Jelentős ALP aktivitásnövekedés volt megfigyelhető továbbá β -GLY-al és β -GLY+BMP-2 kombinációjával kezelt Saos-2 sejtekben is (7. F. ábra). A DPSC és Saos-2 sejtekkel ellentétben nem sikerült megnövekedett alkalikus foszfatáz aktivitást kimutatni HEPM sejteket vizsgálva (7. I. ábra). A BMP-2 hatása tehát molekuláris környezet és sejtípus függőnek bizonyult, az alkalikus foszfatáz aktivitás jól korrelált a mineralizáció mértékével és mindkét módszerrel szinergikus hatást figyeltem meg BMP-2 és OIM, valamint BMP-2 és β -GLY között.

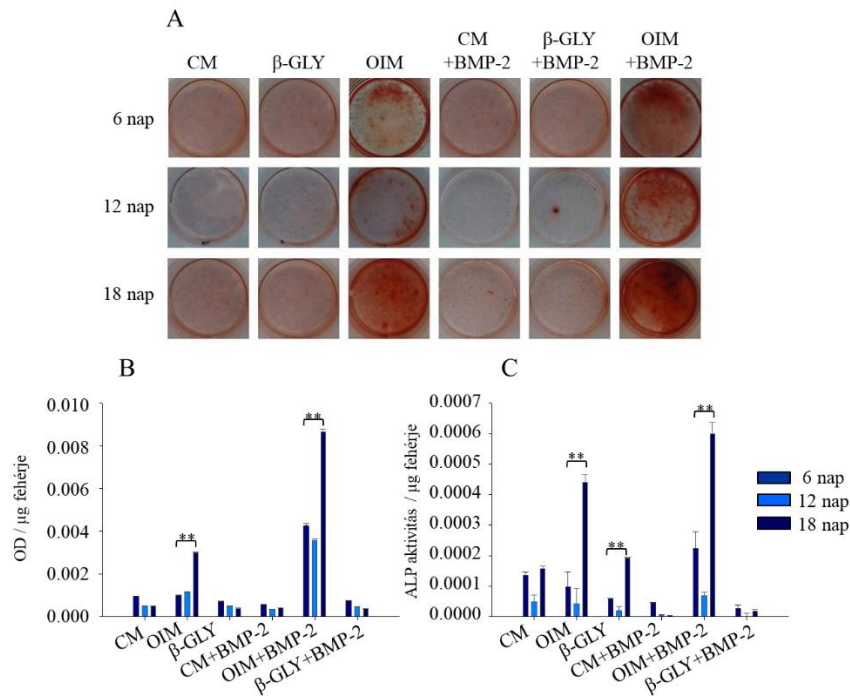


7. ábra. BMP-2 és β-GLY hatásának vizsgálata oszteoblaszt progenitor, illetve DPSC sejtek mineralizációjára és alkalikus foszfatáz aktivitására.

(A és B) DPSC sejtek mineralizációjának vizsgálata 6 napos differenciációt követően Alizarin Red S festéssel. (C) DPSC sejtek alkalikus foszfatáz aktivitásának vizsgálata 6 napos differenciációt követően. (D és E) Saos-2 sejtek mineralizációjának vizsgálata 6 napos differenciációt követően Alizarin Red S festéssel. (F) Saos-2 sejtek alkalikus foszfatáz aktivitásának vizsgálata 6 napos differenciációt követően. (G és H) HEPM sejtek mineralizációjának vizsgálata 6 napos differenciációt követően Alizarin Red S festéssel. (I) HEPM sejtek alkalikus foszfatáz aktivitásának vizsgálata 6 napos differenciációt követően. Az ábrán összekapcsolt oszlopok között szignifikáns különbség volt mérhető. (átlag±SD, * p < 0,05 és ** p < 0,005).

Az oszteoblaszt irányú differenciációt nem csak 6 napig, hanem 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 lecsökkent (5 E, 2B, E. ábra). A 8. napon már nem sikerült elegendő sejtlizátumot gyűjteni a pontos mérések végrehajtásához. A Saos-2-vel ellentétben a DPSC-eket ill. a HEPM sejteket tovább lehet tenyészteni és differenciáltatni. 12 nap után 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 (8. ábra).

Ez a különbség azonban nem volt statisztikailag szignifikáns. 18 nap elteltével viszont OIM kezelés hatására ismétlett 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 OIM médium hatása kifejezettebb volt, amikor a differenciálást 18 napig végeztük. (8. ábra)

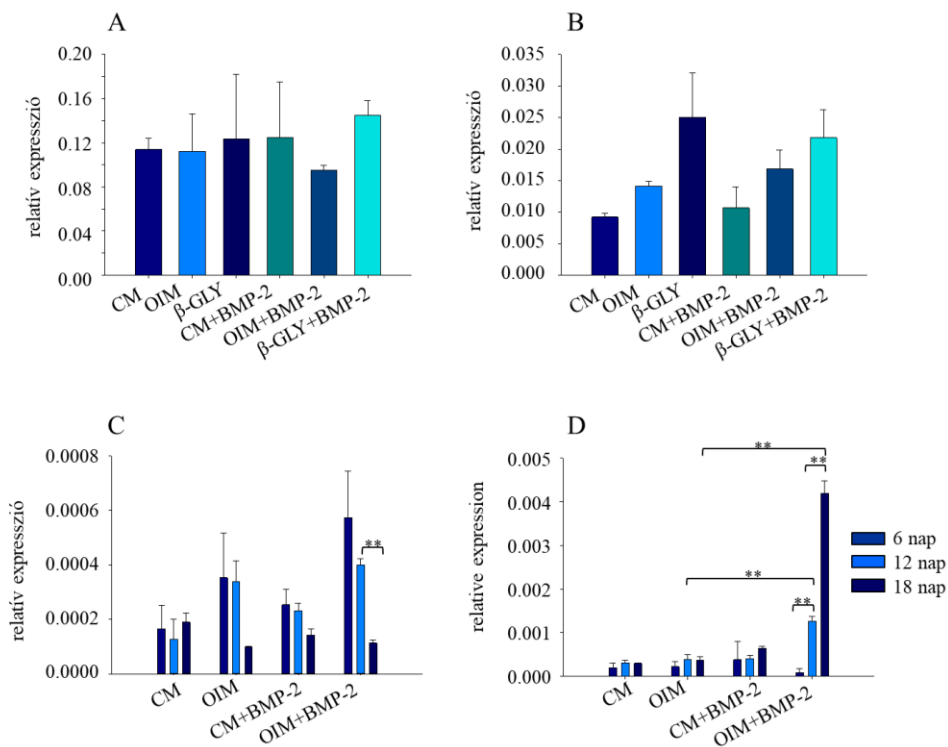


8. ábra. BMP-2 és β-GLY hatásának vizsgálata DPSC sejtek mineralizációjára és alkalikus foszfatáz aktivitására 6, 12 és 18 napos kezelést követően.

(A) DPSC sejtek extracelluláris mátrixában lerakódott kalcium lerakódás vizsgálata Alizarin Red S festéssel 6, 12 és 18 napos differenciációt követően. (B) A megkötött Alizarin Red S festék kvantitatív analízise. (C) Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése párhuzamos mintákból. Az ábrán összekapcsolt oszlopok között szignifikáns különbség volt mérhető. (átlag±SD, * p < 0,05 és ** p < 0,005).

A mineralizáció, illetve alkalikus foszfatáz aktivitás mérésével párhuzamosan az oszteoblaszt irányú differenciációt szabályozó korai marker géneket (*RUNX2*, *BMP-2*) is vizsgáltam real-time qPCR módszerrel. Ezekben a kísérletekben már csak azokat a kezeléseket használtam, amelyekről a korábbi mérések során bebizonyosodott, hogy fokozzák a mineralizációt és növelik az alkalikus foszfatáz aktivitást, illetve azokat a sejtvonalakat vizsgáltam, Saos-2 és DPSC, amelyek érzékenyek voltak ezekre a kezelésekre. A génexpressziós analízishez a Saos-2 sejteket 4 napig CM, OIM vagy β-GLY

tápközegben növesztetem BMP-2 jelenlétében vagy annak hiányában. A 4 napos kezelési időt irodalmi adatok alapján választottam (61). A Saos-2 esetében a *RUNX2* expressziós szintje nem változott a negyedik napon egyik kezelés esetén sem (9. A. ábra). Az endogén BMP-2 szintje azonban szignifikánsan megnőtt a β -GLY-tal kezelt sejtekben, valamint az OIM-ben (9. B. ábra). 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 növesztetem. 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 OIM, CM+BMP-2 és OIM+BMP-2 kezelések esetén is, valamint a BMP-2 szinergista módon hatott OIM médiumban a *RUNX2* expressziójára (9 C. ábra). Ezzel szemben a *BMP-2* szintje fokozatosan nőtt az idő múlásával a 6. naptól a 18. napig OIM, CM+BMP-2 és OIM+BMP-2 kezelések esetén is (9. D. ábra). A BMP-2 ebben az esetben is szinergizmust mutatott OIM médiummal.



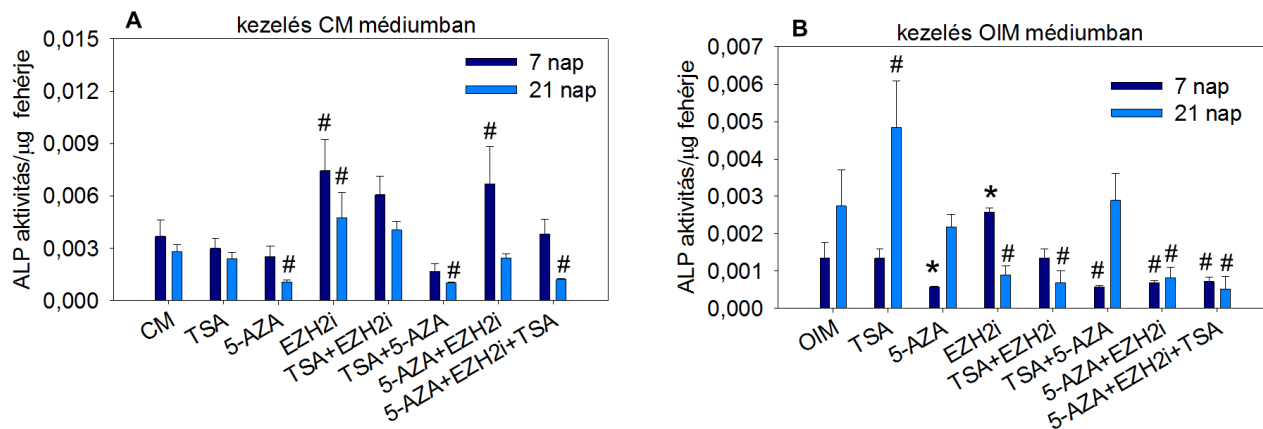
9. ábra. BMP-2 és β -GLY hatása *RUNX2* és *BMP-2* gének expressziójára Saos-2 és DPSC sejteken.

(A) *RUNX2* és (B) *BMP-2* gének expressziós szintjének változása 4 napos kezelést követően Saos-2 sejtekben. (C) *RUNX2* és (D) *BMP-2* gének expressziós szintjének vizsgálata DPSC sejtek esetén 6. 12. és 18. napos kezeléseket követően. Az ábrán összekapcsolt oszlopok között szignifikáns különbség volt mérhető. (átlag \pm SD, * p < 0,05 és ** p < 0,005).

6.2. EZH2i, 5-AZA, TSA oszteoblaszt irányú differenciációt indukáló hatásának vizsgálata DPSC sejteken

Az epigenetikai jelleget 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 *ALPL*) expressziójának vizsgálatával.

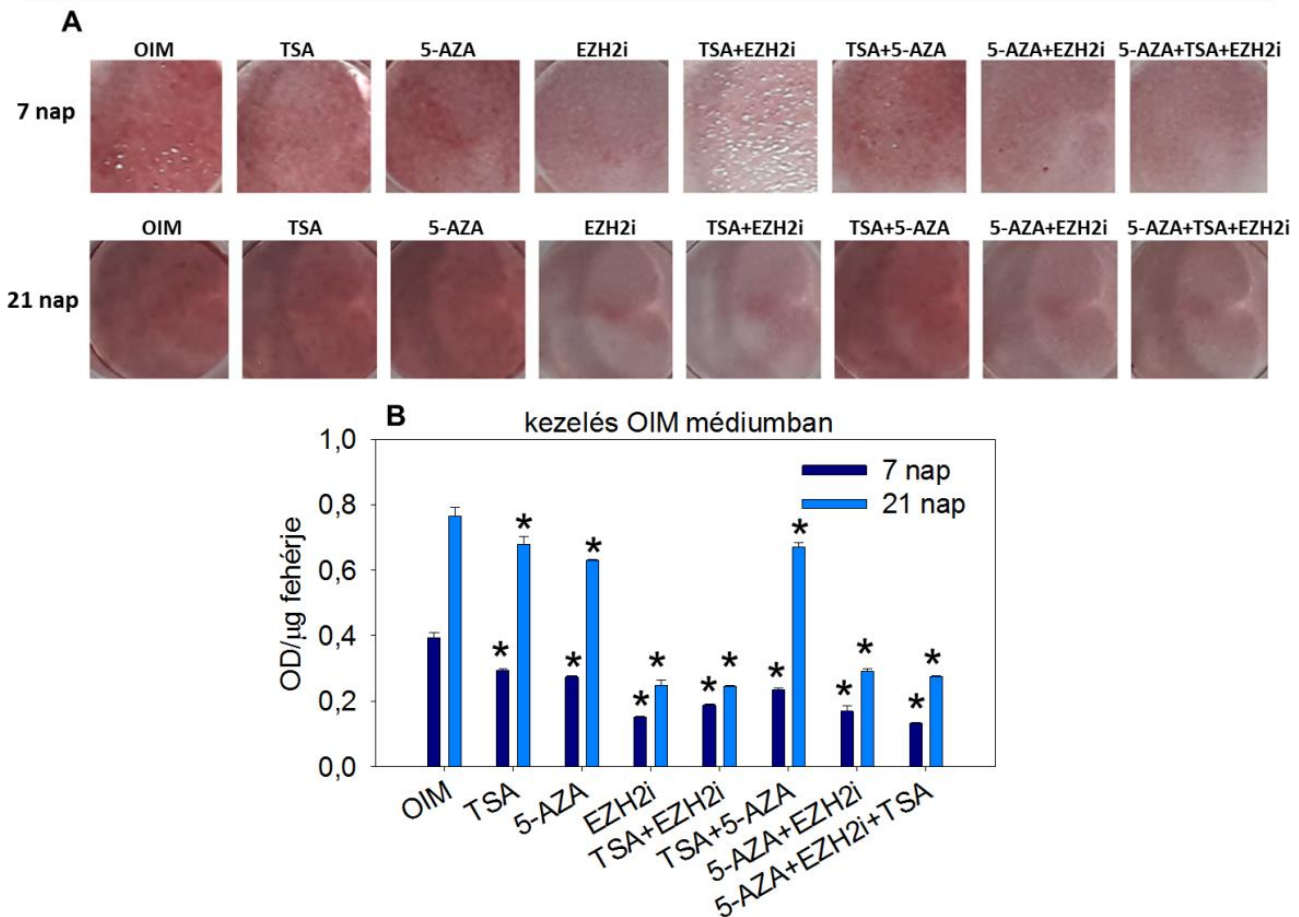
A sejtek ALP aktivitását EZH2i, TSA vagy 5-AZA különböző kombinációival kiegészített CM-ben vagy OIM-ben történő 7, illetve 21 napos kezeléseket követően mértem. CM médiumban végzett kezelés hatására, az ALP-aktivitás a 7. napon nőtt meg, ha EZH2i-vel önmagában, vagy EZH2i+TSA vagy EZH2i+5-AZA kombinációival egészítettem ki a CM médiumot (10. A. ábra). 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 (10. A. ábra). CM-ben a TSA-val végzett rövid (7 napos) vagy hosszú távú (21 napos) kezelés nem volt hatással a sejtek ALP aktivitására (10. A. ábra). 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 (10. B. ábra). Az ALP aktivitás tekintetében szinergista hatás nem volt megfigyelhető egyetlen gyógyszer kombináció esetében sem, függetlenül attól, hogy CM vagy OIM médiumban történt a kezelés.



10. ábra. EZH2i, TSA és 5-AZA hatása DPSC sejtek ALP aktivitására.

(A) ALP aktivitás mérése TSA-val, 5-AZA-val, EZH2i-vel vagy azok kombinációival kezelt DPSC sejtek esetén. A sejtek kezelése 7 vagy 21 napig történt CM médiumban. (B) ALP aktivitás mérése TSA-val, 5-AZA-val vagy EZH2i-vel vagy azok kombinációival kezelt DPSC sejtek esetén. A sejtek kezelése 7 vagy 21 napig történt OIM médiumban. A szignifikáns eltéréseket mindig az adott mintasor kontroll mintájához képest (CM, vagy OIM) számoltuk. (átlag±SD, # $p \leq 0,036$; * $p \leq 0,001$).

A gyógyszer hatóanyagokkal kezelt DPSC-k mineralizációját csak OIM médiumban történő kezelés után vizsgáltam (11. ábra), 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 faktorról végezzük a kezelést, amely a csont irányú differenciációnak kedvező körülmények között hatásos (pl.: BMP-2) (7. A-C., 8., 9. C, D. ábrák). Meglepő módon a mineralizáció nem nőtt semmilyen gyógyszeres vagy kombinált gyógyszeres kezelés hatására a 7. és a 21. napon sem, 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.

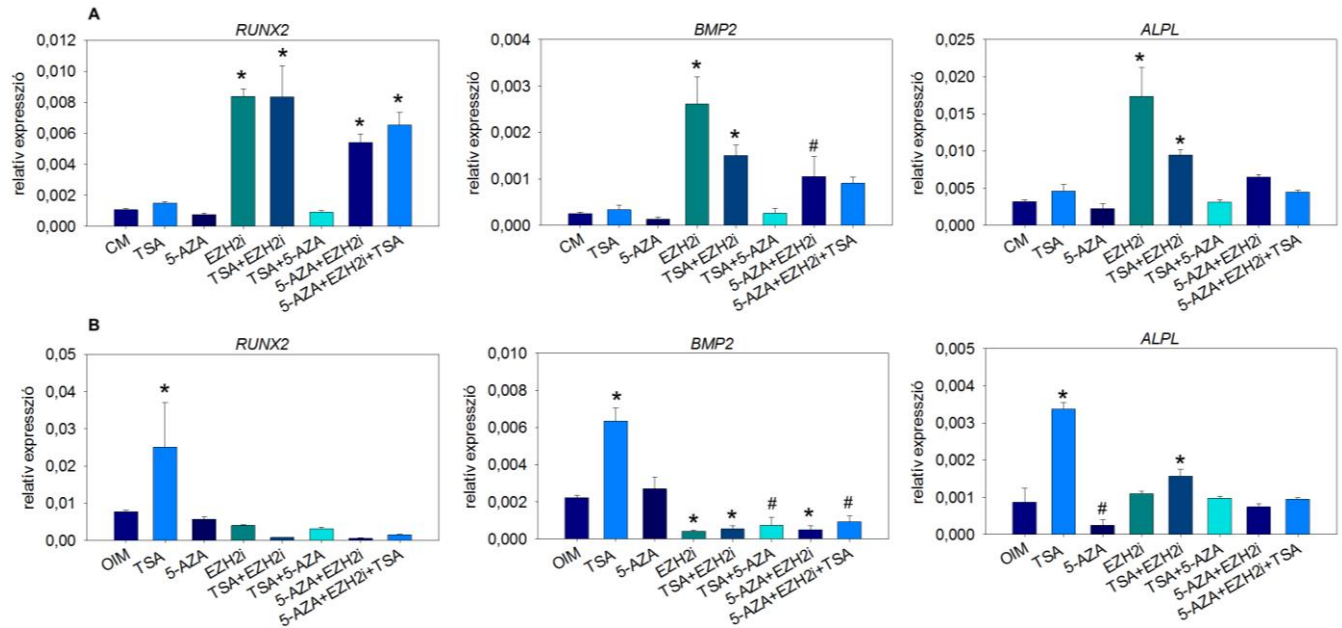


11. ábra. EZH2i, TSA és 5-AZA hatása DPSC sejtek mineralizációjára.

(A) TSA-val, 5-AZA-val, EZH2i-vel, vagy azok kombinációival kezelt DPSC sejtek extracelluláris mátrixban képződött kalcium lerakódások vizsgálata Alizarin Red S-sel, 7 vagy 21 napos kezelést követően. (B) A kalciumhoz kötött festék kvantitatív analízise spektrofotometriás analízissel. A szignifikáns eltéréseket a kontroll mintához képest (OIM) számoltuk. (átlag±SD, * $p < 0,001$).

Az epigenetikai jellegeket módosító gyógyszer molekulák oszteoblaszt irányú differenciációjára kifejtett hatását megvizsgáltam a *RUNX2*, *BMP-2* 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 (12. A. ábra). Az OIM médiumban kezelt mintákban csak a TSA önmagában emelte meg mindhárom vizsgált gének expressziós szintjét (12. B. ábra), míg az EZH2i önmagában, valamint TSA-val és 5-AZA-val

kombinálva gátolta a *BMP-2*-t, illetve nem szignifikáns mértékben a *RUNX2*-t (12. B. ábra). Ezek az eredmények konzisztensek és korrelálnak az ALP aktivitásmérésekkel. Egyik vizsgált gyógyszer-kombinációban sem figyeltünk meg szinergikus hatást.



12. ábra. EZH2i, TSA és 5-AZA hatása oszteogén markergének expressziójára DPSC sejteken.

(A) *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* gének expressziója TSA-val, 5-AZA-val vagy EZH2i-vel vagy azok kombinációival kiegészített CM médiumban 21 napig kezelt DPSC sejteken. (B) *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* gének expressziója TSA-val, 5-AZA-val vagy EZH2i-vel vagy azok kombinációival kiegészített OIM médiumban 21 napig kezelt DPSC sejteken. A szignifikáns eltéréseket mindig az adott mintasor kontroll mintájához képest (CM, vagy OIM) számoltuk. (átlag±SD, #p ≤ 0,015; *p ≤ 0,001).

7. Megbeszélés

7.1. BMP-2 hatására létrejött oszteoblaszt irányú differenciáció értékelése

A BMP-2 a csont fejlődésben és regenerációban kulcsfontosságú, így klinikai felhasználás szempontjából is fontos növekedési faktor. A sejtek BMP-2-vel történő kezelésének hatása azonban sejtípustól függően eltérhet, illetve a sejtek környezetének egyéb faktoraitól is függhet. (97,98) Vizsgálataimban a BMP-2-t önmagában, vagy az általánosan használt oszteoinduktív médium (OIM) komponenseivel kombinálva használtam, amely médium elősegíti különböző őssejt és preoszteoblaszt sejtípusok oszteoblaszt irányú differenciálódását. Két preoszteoblaszt sejt vonal, a Saos-2 és a HEPM, valamint egy primer őssejt típus, a DPSC sejtek csontirányú differenciációját vizsgáltam. A sejtek proliferációja tekintetében a BMP-2 mindhárom sejtípus esetén koncentráció függő módon gátolta a sejtek osztódását, egyéb faktoroktól mentes CM médiumban, illetve az OIM komponenseivel kombinálva. Az OIM médium komponenseit egyenként vizsgálva azt találtam, hogy a β -GLY mindhárom sejtípusban gátolta a sejtproliferációt, továbbá BMP-2-vel kombinálva szinergista hatást tapasztaltam HEPM és a Saos-2 sejtekben. Irodalmi adatok alapján a sejtek proliferációjának csökkenése összefügghet a sejtek differenciációjával. (99-102)

A BMP-2 által indukált oszteogén differenciáció további vizsgálata során megállapítottam, hogy a BMP-2 önmagában, egyéb faktoroktól mentes CM médiumban, nem volt hatással az ALP aktivitásra. OIM médiumban pozitív hatással volt DPSC és Saos-2 sejtek esetén, illetve az OIM komponensei közül a β -GLY-tal szinergista módon hatott Saos-2 sejtekben. A β -GLY, ami az alkalikus foszfatáz enzim szubsztrátja, megnövekedett enzim aktivitást eredményez érett oszteoblasztokban. (96,103,104) A β -GLY hidrolízise a szerves foszfát extracelluláris felhalmozódását eredményezi, amely spontán reakcióba lép a médium kalcium ionjaival szilárd kristályokat képezve, amelyek felhalmozódnak az extracelluláris mátrixban. (1,96,104) Ennek megfelelően amikor a differenciációs kísérletek során megnövekedett ALP aktivitás volt mérhető, a lerakódott kalcium-foszfat kristályok mennyisége is a megnőtt.

Az oszteogén marker gének tanulmányozása során a várakozásnak megfelelően az OIM növelte a *RUNX2* korai marker gén expresszióját DPSC sejtekben, rövid, 6 napos kezelést követően, ami tovább nőtt BMP-2-vel kombinált kezelés esetén. Irodalmi adatok alapján az OIM komponensei közül

a DEX, az AA és a β -GLY is képes növelni a *RUNX2* gén expresszióját különböző jelátviteli útvonalakon keresztül, pl.: WNT, MAPK, ERK jelátviteli útvonalak. (105) Mivel a *RUNX2* korai marker gén és a csont irányú differenciáció kezdeti szakaszában van jelentősége a DPSC sejtek hosszabb idejű differenciációja során, a *RUNX2* szint fokozatosan csökkent az érés előrehaladtával, ami összhangban van az irodalmi adatokkal. (106) Az oszteoprogenitorokban a *RUNX2* expressziója alacsony, ami a differenciáció során a preoszteoblasztokban és az éretlen oszteoblasztokban megemelkedik, majd ismét lecsökken az érett oszteoblasztokban és az oszteocitákban. (107,108)

A Saos-2 sejtekben, irodalmi adatokkal is összhangban (95) a differenciáció rövidebb idő alatt ment végbe, a DPSC sejtekkel összehasonlítva, illetve nem volt mérhető különbség a *RUNX2* expresszió szintjében a kontroll és a differenciáltatott minták között. Ennek egyrészt az lehet az oka, hogy a *RUNX2* mRNS szintje már négy napnál hamarabb lecsökkent a rövidebb differenciálási idő következtében, vagy a szintje már eleve magasabb, mint más sejt típusokban, pl.: primer DPSC őssejtekben. Ez utóbbit támasztja alá He és munkatársai közleménye (109), melyben kimutatták, hogy a p53 tumorszuppresszor közvetve képes gátolni a *RUNX2* expresszióját a mikroRNS-ek (mikroRNS34 család) aktivációján keresztül. Mivel a Saos-2 sejtek nem expresszálják a p53-at a *RUNX2* expressziós szintje magas ezekben a sejtekben. (109) A magas *RUNX2* expresszió pedig nem fokozódik tovább az oszteogén differenciációt kiváltó faktorok hatására.

Az endogén *BMP-2* expressziós szintje korrelált a fokozott ALP enzim aktivitással. Ez a magas ALP enzimaktivitás következtében megemelkedett extracelluláris szerves foszfát koncentrációjával magyarázható, amelyről ismert, hogy képes foszfát transzportereken (Pit-1 és Pit-2) keresztül bejutni a sejtbe, ahol intracelluláris szignál molekulaként aktiválja az ERK és cAMP/protein kináz A jelátviteli útvonalakat, melyek következtében oszteogén differenciációt szabályozó géneket aktivál és növeli többek között a *RUNX2* és *BMP-2* expresszióját. (1,105) Mindezek összhangban vannak a DPSC és Saos-2 sejtek differenciációja során tapasztalt *RUNX2* és *BMP-2* expressziós szint növekedéssel. Eredményeim alapján megállapítható, hogy a *BMP-2* önmagában nem elegendő az oszteoblaszt irányú differenciáció elindításához, azonban megfelelő molekuláris környezetben, elősegíti azt.

7.2. DPSC-k oszteoblaszt irányú differenciációs képességének értékelése epigenetikai jellegeket módosító anyagok hatására

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 (110,111) mindkét anyag növelte a *RUNX2*, a *BMP-2* 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. Ez arra utal, hogy az EZH2i közvetlenül aktiválja a *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* géneket, amit alátámasztanak kromatin immunprecipitátumok szekvenálásából (ChIP-seq) származó irodalmi adatok, melyek azt mutatják, hogy ezek a gének az EZH2 specifikus célpontjai (112). Mivel az EZH2i nem volt hatásos OIM médiumban, ezért az OIM komponensei feltehetően befolyásolhatják az EZH2i hatását. Ezen anyagok közül a dexametazon (105) és a D₃-vitamin (113,114) képes aktiválni a Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonalat, amely részt vesz az oszteogén differenciálódás szabályozásában és részben fokozza (105,113,114) részben gátolja ezt a folyamatot, ez utóbbit a WNT1 és WNT3A esetén mutatták ki. WNT1 gátolja a DPSC-k odontogén differenciálódását (115), a WNT1 és WNT3A pedig a humán MSC-k oszteogén differenciálódását. (116-118) Tekintettel arra, hogy az EZH2 kötődik a WNT1 és a WNT3A gének promóteréhez is (112), az EZH2i kezelés aktiválhatja ezeket a géneket, ami csökkent ALP aktivitáshoz és a mineralizáció hiányához vezethet (6, 7. ábra), hasonlóan a WNT1 kezeléshez (115). A BMP antagonistáknak a *noggin* (119) és *chordin* (120) gátló aktivitása szintén a H3K27, EZH2-függő metilációjával szabályozódik. (112,121) A *noggin* és a *chordin* kötődik az oszteogén differenciáció során autokrin szignálként expresszálódó és szekretált BMP-khez, gátolva azok BMP receptorokhoz való kötődését, ezen keresztül a BMP-k által indukált jelátviteli útvonalakat aktivációját. Az EZH2-célpontok közül a HDAC-k (112) is gátolják az oszteogén differenciálódást azáltal, hogy a folyamatot szabályozó és az HDAC fehérjék célpontjai közé tartozó *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* gének (112) promóter régiójában deacetilálják a hisztonokat, vagy a *RUNX2*-höz közvetlenül kötődve gátolják annak funkcióját. (122)

Az EZH2i-vel ellentétben a TSA pozitív hatással volt a vizsgált gének expressziójára az oszteogén differenciációt elősegítő OIM-mel kombinált tenyésztési körülmények között, de CM-ben nem, ami arra utal, hogy a TSA-nak nincs közvetlen hatása a *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* expressziójára, annak

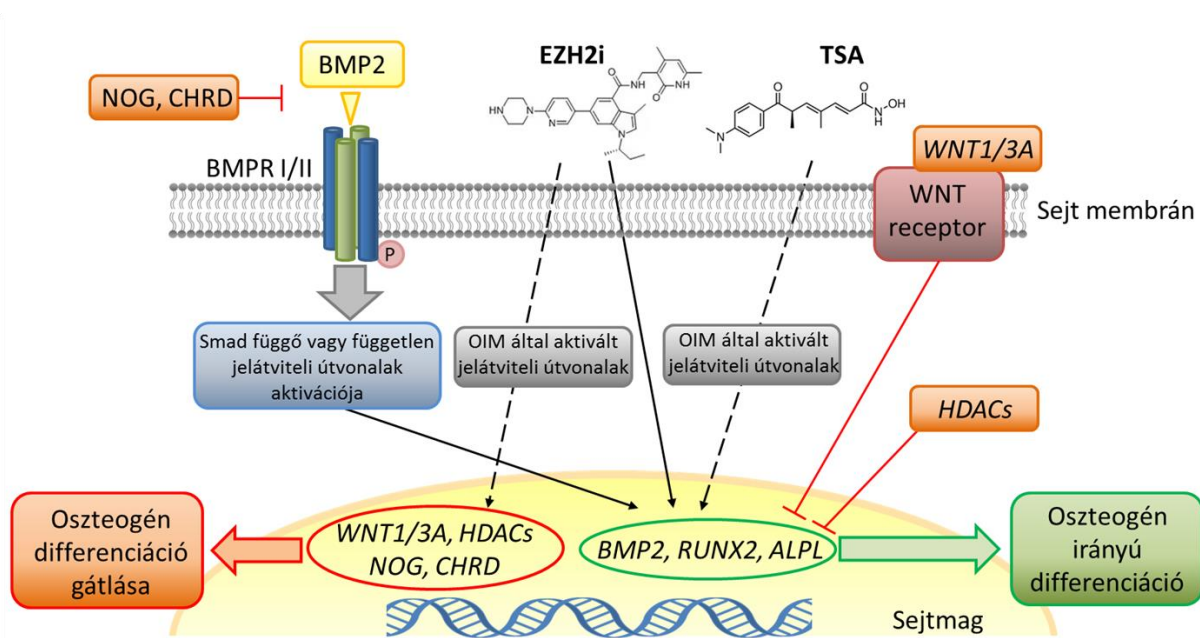
ellenére, hogy ezek a gének a TSA-val is gátolható (123) HDAC1, HDAC2 és a HDAC6 deacetilázok specifikus célpontjai. (112) A TSA valószínűleg más, az OIM komponensei által indukált jelátviteli útvonalak által aktivált vagy azokban részt vevő fehérjéken keresztül hat ezekre a génekre, pl.: *WNT*, *BMP*, *BMP receptor*, *SMAD* és *MAPK*, amelyek szintén HDAC célpontok (112). Az OIM komponensei közé tartozó dexametazon kezelés hatására pl.: a *RUNX2* és koaktivátora, a PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor (*TAZ*) expressziója megnő. (105) A dexametazon kezelés a mitogén által aktivált protein kináz foszfatáz 1 (*MKP1*) és az 1-es típusú kollagén (*COL1*) expresszióját is indukálja (105), amelyek mind HDAC célpontok is. (112) Az *MKP1* defoszforilálja a *RUNX2*-t, amely a *TAZ*-kötéshez szükséges (105), míg a *COL1* a mineralizáció szempontjából fontos extracelluláris mátrix fehérje. Egy másik OIM komponens az AA szerepet játszik a *COL1* szekréciójában, ami az integrinekhez kapcsolódva, azokon keresztül aktiválja a *MAPK* jelátviteli útvonalat, ami az extracelluláris szignál-szabályozott kináz foszforilált formájának (pERK) felhalmozódásához vezet a sejtmagban. A pERK a *RUNX2*-vel együtt az oszteokalcinhoz (*OCN*) és a csontszialoproteinhez (*BSP*) kötődik, amelyek az osteogén differenciálódás késői szakaszában bekövetkező mineralizációért felelősek (105), melynek során egy további OIM komponens, a β -GLY, foszfát forrásként szolgál a hidroxipatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) előállításához. Ezenkívül a foszfát bejuthat a sejtekbe, ahol intracelluláris jelátviteli molekulaként szabályozza az oszteopontin (*OPN*) és a *BMP-2* expresszióját. (105) Mivel a kísérletek során a mineralizáció nem változott, a TSA feltehetően nem volt hatással a differenciálódás késői szakaszában aktivált és a mineralizációért felelős génekre. Ez összhangban van irodalmi ChIP-seq adatokkal amely, azt mutatja, hogy az *OCN*, *OPN* és *BSP* gének nem célpontjai a HDAC-oknak. (112)

A három vizsgált anyag közül az 5-AZA esetén nem tapasztaltam pozitív hatást a DPSC sejtek differenciációja során, sem önmagában, sem a TSA-val vagy EZH2i-vel kombinálva, ami eltérő a DPSC-re vonatkozó irodalmi adatoktól. (5) Ez az eltérés egyrészt az 5-AZA szuboptimális dózisának lehet az eredménye, vagy annak is lehet a következménye, hogy az 5-AZA nem csak a DNS-be, hanem az RNS-be is beépülhet, ellentétben a Zhang és munkatársai által használt 5-aza-2-dezoxicitidinnel (5), ami csökkenti a sejtmagban a DNS-be beépülhető 5-AZA relatív mennyiségét. Az 5-aza-2-dezoxicitidin hatásosnak bizonyult nemcsak DPSC-k (5), hanem PDLSC (3) sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjában, valamint az érfal simaizom sejteinek mineralizációjában (124), a *BMP-2* transzkripciójának aktivációja révén. Az általam kapott eltérő eredmények egy másik oka lehet az, hogy az azonos (125) vagy különböző (126) donorokból izolált DPSC-k heterogenitása miatt a

független laborokban végzett vizsgálatok eltérő következtetésekhez vezethetnek. Kobayashi és munkatársai (125) jelentős variabilitást mutattak ki a proliferáció mértékében, a sejtfelszíni markerek expressziós mintázatában, valamint az odontogén, adipogén és kondrogén irányú differenciációs képességekben ugyanazon donorból izolált DPSC populációból származó sejt klónokban. Macrin et al. (126) kimutatta, hogy a DPSC sejtek oszteogén potenciálja nem elsősorban a sejtfelszíni őssejt markerekkel függ össze, hanem a sejtek metabolikus állapotával, valamint a TGF- β útvonal és a citoszkeleton bizonyos fehérjéinek expressziójával. Ezek alapján un. lassan és gyorsan öregedő DPSC sejt populációkat különböztettek meg, melyek oszteogén potenciálja nagy mértékben eltérő volt. Az, hogy egy adott személytől származó DPSC sejt populáció lassan vagy gyorsan öregedő nem korrelált a donor személy életkorával.

Munkám során azt tapasztaltam, hogy nem volt szinergikus hatás a TSA, EZH2i és 5-AZA gyógyszerkombinációk alkalmazásakor, a TSA csak olyan körülmények között volt pozitív hatással a korai oszteogén marker gének expressziójára és az alkalikus foszfatáz aktivitásra, amelyben több, olyan jelátviteli útvonal is aktiválódott, melyek részt vesznek az oszteogén differenciációban, ezzel ellentétben az EZH2i csak akkor volt hatásos ezekben a vizsgálatokban, ha ezek a jelátviteli útvonalakat aktiváló faktorok nem voltak jelen. Ezek alapján alapján feltételezhető, hogy a TSA és az EZH2i eltérő mechanizmusokon keresztül hatnak: az EZH2i közvetlenül hat a célgénekre, míg a TSA közvetett módon a csont irányú differenciációban részt vevő jelátviteli útvonalak fehérjéivel kölcsönhatásban. (13. ábra). Ezeknek a mechanizmusoknak a részletesebb vizsgálata és az összefüggések feltárása további kísérleteket igényel.

Mivel az 5-AZA esetén nem volt megfigyelhető pozitív hatás, az EZH2i hatását pedig az oszteoblaszt irányú differenciációban fiziológiásan szerepet játszó faktorok negatívan befolyásolták, klinikai felhasználás szempontjából a TSA alkalmas DPSC sejtek differenciációjának elősegítésére a csontregenerációt célzó orvosi alkalmazásokban. Figyelembe kell venni azonban, hogy a DPSC-k egyéneken belüli és egyének közötti heterogenitása miatt, az epigenetikai modulátorok hatása eltérő lehet ezért további nagyobb számú donorral végzett összehasonlító vizsgálatok szükségesek.



13. ábra. Az EZH2i és a TSA lehetséges hatásmechanizmusai a DPSC-k oszteogén differenciációja során.

Az EZH2i és a TSA különböző mechanizmusokon keresztül közvetlenül (nyíl folytonos vonallal), vagy közvetett módon a csont irányú differenciációban részt vevő jelátviteli útvonalak fehérjéivel kölcsönhatásban (nyíl szaggatott vonallal) fejtik ki hatásukat az oszteoblaszt irányú differenciációban szerepet játszó szabályozó gének *RUNX2*, *BMP-2* és *ALPL* expressziójára. Ezen kívül az EZH2i olyan géneket is aktiválhat, amelyek negatív hatással vannak az oszteogén differenciációra, gátolva a BMP jelátvitelt (*NOG* és *CHR*), csökkentve az *ALPL* expressziót (*WNT1* és *WNT3A*), vagy deacetilálva a kulcsfontosságú szabályozó és jelátviteli útvonal gének promoter régióit (*HDAC*).

8. Következtetések

Ph.D. értekezés alapjául szolgáló kutatások új megállapításai:

- A BMP-2 előnyösen hatott a DPSC sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjára. CM médiumban ez a hatás, csak a proliferáció csökkenésében nyilvánult meg már 1 hetes kezelés hatására, míg OIM médiumban minden vizsgált paraméter (proliferáció, ALP aktivitás, mineralizáció, génexpresszió) és minden kezelési idő esetén hatásos volt.
- Méréseim alapján az OIM médium összetevői közül, elég, ha csak az inorganikus foszfát forrásként szolgáló β -GLY-al egészítettük ki a sejttenyésztő médiumot a Saos-2 sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjának elősegítésére, amivel a BMP-2-vel szinergizmusban hatott. Mindezek mellett az OIM médium a BMP-2-vel ugyancsak szinergizmusban hatékonyabb volt a DPSC és a Saos-2 sejtek esetén is.
- A BMP-2 önmagában csak a proliferációt csökkentette a HEPM és Saos-2 sejtek 1 hetes kezelése után. Saos-2 sejtek esetén OIM médiumban, valamint β -GLY-al kombinálva azonban jelentősen elősegítette az oszteoblaszt irányú differenciációt, ami minden paraméterben kimutatható volt.
- Az általam vizsgált epigenetikai jellegeket befolyásoló molekulák (TSA, EZH2i és 5-AZA) együttes alkalmazása során egyik hatóanyag kombináció esetén sem figyeltem meg szinergista hatást DPSC sejtek oszteoblaszt irányú differenciációjára.
- A három molekula közül a TSA és az EZH2i bizonyult pozitív hatásúnak az ALP aktivitás valamint a génexpresszió tekintetében. A két anyag azonban eltérő molekuláris körülmények között volt hatékony, a rövid (1 hetes) és hosszú távú (3 hetes) kezelések során. Az EZH2i csak akkor volt hatással a vizsgált génekre, valamint az ALP aktivitásra, ha a kezelés CM médiumban történt, amiben nem voltak más olyan faktorok, amelyek hatással vannak a DPSC sejtek csont irányú differenciációjára. A TSA, az oszteogén differenciációt elősegítő OIM-mel kombinált tenyésztési körülmények között volt pozitív hatással, de CM-ben nem.

9. Összefoglalás

A szájüregből 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 sejtvonalak: 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.

10. Summary

Among the stem cells derived from the oral cavity, dental pulp stem cells (DPSCs) hold great potential for clinical application due to their ease of isolation and multipotent properties. Thanks to their ability to differentiate toward the osteoblast lineage, DPSCs may be suitable for stem cell therapies in dentistry aimed at bone defect regeneration and improved osseointegration of dental implants. Materials that promote osteogenic differentiation could greatly contribute to such applications. To this end, I investigated the effects of a commercially available and clinically approved growth factor, the human recombinant BMP-2 protein, as well as drug or drug candidate compounds that influence epigenetic features including TSA, EZH2i, and 5-AZA which are known to enhance the expression of endogenous BMP-2 and other osteogenic regulatory genes, either individually or in combination during the osteoblastic differentiation of DPSC cells. The effect of BMP-2 was studied through comparative analysis involving different pre-osteoblast cell lines (Saos-2 and HEPM), as well as primary DPSC cultures isolated from wisdom teeth. BMP-2 treatment was assessed over various time intervals and under different molecular environments: in both standard culture medium (CM) and in osteogenic induction medium (OIM) supplemented with osteogenic differentiation factors. To monitor the progression of differentiation, I measured cell proliferation, ALP activity, mineralization, and the expression of osteogenic regulatory genes, particularly *RUNX2* and *BMP-2*. My results showed that BMP-2 inhibited cell proliferation in a concentration-dependent manner in all three cell types. However, BMP-2 alone was not sufficient to activate osteogenic differentiation. In OIM supplemented with components favorable for osteogenic differentiation BMP-2 enhanced the differentiation of DPSC and Saos-2 cells more effectively than OIM alone. Furthermore, in the case of Saos-2 cells, providing only a phosphate source from the OIM components was sufficient for differentiation. Thus, in DPSC cells, BMP-2 was only effective when accompanied by the simultaneous activation of appropriate signaling pathways. The individual and combined effects of TSA, EZH2i, and 5-AZA were studied in DPSC cells. Treatments were conducted over varying durations in both CM and OIM media, and their impact on differentiation was evaluated through ALP activity, mineralization, and the expression of the *RUNX2*, *BMP-2*, and *ALPL* genes. Among the three substances, positive effects were observed following the individual application of TSA and EZH2i. Based on my findings, TSA and EZH2i influence genes regulating osteoblastic differentiation in DPSCs through different mechanisms: EZH2i acts directly on target genes, while TSA has an indirect effect, interacting with proteins involved in bone-related signaling pathways. No synergistic effects were observed with any combination of TSA, EZH2i, and 5-AZA.

11. Irodalomjegyzék

1. Kim, H.J., Delaney, J.D. and Kirsch, T. (2010) The role of pyrophosphate/phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. *Bone*, **47**, 657-665.
2. Kumar, P., Vinitha, B. and Fathima, G. (2013) Bone grafts in dentistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, **5**, S125-127.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Cao, Y., Li, L. and Fan, Z. (2021) The role and mechanisms of polycomb repressive complex 2 on the regulation of osteogenic and neurogenic differentiation of stem cells. *Cell proliferation*, **54**, 1-13.
10. Rojas, A., Sepulveda, H., Henriquez, B., Aguilar, R., Opazo, T., Nardocci, G., Bustos, F., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S. *et al.* (2019) Mll-COMPASS complexes mediate H3K4me3 enrichment and

transcription of the osteoblast master gene Runx2/p57 in osteoblasts. *Journal of cellular physiology*, **234**, 6244-6253.

11. Wang, P., Li, Y., Meng, T., Zhang, J., Wei, Y., Meng, Z., Lin, Y., Liu, D. and Sui, L. (2018) KDM6A promotes chondrogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by demethylation of SOX9. *Cell proliferation*, **51**, 1-13.
12. Chan, N.T., Lee, M.S., Wang, Y., Galipeau, J., Li, W.J. and Xu, W. (2022) CTR9 drives osteochondral lineage differentiation of human mesenchymal stem cells via epigenetic regulation of BMP-2 signaling. *Science advances*, **8**, 1-18.
13. Dudakovic, A., Samsonraj, R.M., Paradise, C.R., Galeano-Garces, C., Mol, M.O., Galeano-Garces, D., Zhan, P., Galvan, M.L., Hevesi, M., Pichurin, O. *et al.* (2020) Inhibition of the epigenetic suppressor EZH2 primes osteogenic differentiation mediated by BMP2. *The Journal of biological chemistry*, **295**, 7877-7893.
14. Zhang, P., Tao, F., Li, Q., Wu, S., Fu, B. and Liu, P. (2019) 5-Azacytidine and trichostatin A enhance the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells isolated from steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rabbit. *Journal of biosciences*, **44**, 1-10.
15. Roberts, T.T. and Rosenbaum, A.J. (2012) Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, **8**, 114-124.
16. Ferraz, M.P. (2023) Bone Grafts in Dental Medicine: An Overview of Autografts, Allografts and Synthetic Materials. *Materials*, **16**, 1-22.
17. Haeusner, S., Jaukovic, A., Kupczyk, E. and Herrmann, M. (2023) Review: cellularity in bone marrow autografts for bone and fracture healing. *American journal of physiology. Cell physiology*, **324**, C517-C531.
18. Lana, J.F., da Fonseca, L.F., Azzini, G., Santos, G., Braga, M., Cardoso Junior, A.M., Murrell, W.D., Gobbi, A., Purita, J. and Percope de Andrade, M.A. (2021) Bone Marrow Aspirate Matrix: A Convenient Ally in Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*, **22**.
19. Crespi, R., Cappare, P. and Gherlone, E. (2011) Comparison of magnesium-enriched hydroxyapatite and porcine bone in human extraction socket healing: a histologic and histomorphometric evaluation. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, **26**, 1057-1062.
20. Iezzi, G., Degidi, M., Piattelli, A., Mangano, C., Scarano, A., Shibli, J.A. and Perrotti, V. (2012) Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. *Clinical oral implants research*, **23**, 1369-1376.

21. Zecha, P.J., Schortinghuis, J., van der Wal, J.E., Nagursky, H., van den Broek, K.C., Sauerbier, S., Vissink, A. and Raghoobar, G.M. (2011) Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, **40**, 533-542.
22. Schwartz, Z., Doukarsky-Marx, T., Nasatzky, E., Goultshin, J., Ranly, D.M., Greenspan, D.C., Sela, J. and Boyan, B.D. (2008) Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clinical oral implants research*, **19**, 1233-1245.
23. Moreno-Jimenez, I., Lanham, S.A., Kanczler, J.M., Hulsart-Billstrom, G., Evans, N.D. and Oreffo, R.O.C. (2018) Remodelling of human bone on the chorioallantoic membrane of the chicken egg: De novo bone formation and resorption. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, **12**, 1877-1890.
24. Kurkcu, M., Benlidayi, M.E., Cam, B. and Sertdemir, Y. (2012) Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *The Journal of oral implantology*, **38 Spec No**, 519-526.
25. Wenz, B., Oesch, B. and Horst, M. (2001) Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*, **22**, 1599-1606.
26. Sogal, A. and Tofe, A.J. (1999) Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *Journal of periodontology*, **70**, 1053-1063.
27. Lutz, R., Berger-Fink, S., Stockmann, P., Neukam, F.W. and Schlegel, K.A. (2015) Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. *Clinical oral implants research*, **26**, 644-648.
28. Cannizzaro, G., Felice, P., Leone, M., Viola, P. and Esposito, M. (2009) Early loading of implants in the atrophic posterior maxilla: lateral sinus lift with autogenous bone and Bio-Oss versus crestal mini sinus lift and 8-mm hydroxyapatite-coated implants. A randomised controlled clinical trial. *European journal of oral implantology*, **2**, 25-38.
29. Scolozzi, P., Perez, A., Verdeja, R., Courvoisier, D.S. and Lombardi, T. (2016) Association between maxillary sinus fungus ball and sinus bone grafting with deproteinized bovine bone substitutes: a case-control study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, **121**, e143-147.
30. Jensen, T., Schou, S., Stavropoulos, A., Terheyden, H. and Holmstrup, P. (2012) Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clinical oral implants research*, **23**, 263-273.

31. Bannister, S.R. and Powell, C.A. (2008) Foreign body reaction to anorganic bovine bone and autogenous bone with platelet-rich plasma in guided bone regeneration. *Journal of periodontology*, **79**, 1116-1120.
32. Rodriguez, A.E. and Nowzari, H. (2019) The long-term risks and complications of bovine-derived xenografts: A case series. *Journal of Indian Society of Periodontology*, **23**, 487-492.
33. 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.
34. Breeland, G., Sinkler, M.A. and Menezes, R.G. (2025), *StatPearls [Internet]*, Treasure Island (FL), pp. 1-13.
35. Percival, C.J. and Richtsmeier, J.T. (2013) Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **242**, 909-922.
36. Ortega, N., Behonick, D.J. and Werb, Z. (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology*, **14**, 86-93.
37. Florencio-Silva, R., Sasso, G.R., Sasso-Cerri, E., Simoes, M.J. and Cerri, P.S. (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*, **2015**, 1-17.
38. Maeda, K., Kobayashi, Y., Koide, M., Uehara, S., Okamoto, M., Ishihara, A., Kayama, T., Saito, M. and Marumo, K. (2019) The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *International journal of molecular sciences*, **20**, 1-37.
39. Choi, H., Kim, T.H., Yang, S., Lee, J.C., You, H.K. and Cho, E.S. (2017) A Reciprocal Interaction between beta-Catenin and Osterix in Cementogenesis. *Scientific reports*, **7**, 1-13.
40. Jang, W.G., Kim, E.J., Kim, D.K., Ryoo, H.M., Lee, K.B., Kim, S.H., Choi, H.S. and Koh, J.T. (2012) BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 905-915.
41. Villanueva, F., Araya, H., Briceno, P., Varela, N., Stevenson, A., Jerez, S., Tempio, F., Chnaiderman, J., Perez, C., Villarroel, M. *et al.* (2019) The cancer-related transcription factor RUNX2 modulates expression and secretion of the matricellular protein osteopontin in osteosarcoma cells to promote adhesion to endothelial pulmonary cells and lung metastasis. *Journal of cellular physiology*, **234**, 13659-13679.
42. Thomas, S. and Jaganathan, B.G. (2022) Signaling network regulating osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Journal of cell communication and signaling*, **16**, 47-61.

43. Madsen, M.S., Siersbaek, R., Boergesen, M., Nielsen, R. and Mandrup, S. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Molecular and cellular biology*, **34**, 939-954.
44. Wu, M., Chen, G. and Li, Y.P. (2016) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone research*, **4**, 1-21.
45. Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C. and Granjeiro, J.M. (2014) Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of dental research*, **93**, 335-345.
46. Katagiri, T. and Watabe, T. (2016) Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **8**, 1-27.
47. Salazar, V.S., Gamer, L.W. and Rosen, V. (2016) BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews. Endocrinology*, **12**, 203-221.
48. da Silva Madaleno, C., Jatzlau, J. and Knaus, P. (2020) BMP signalling in a mechanical context - Implications for bone biology. *Bone*, **137**, 115416.
49. Cho, J.H., Lee, J.H., Lee, K.M., Lee, C.K. and Shin, D.M. (2022) BMP-2 Induced Signaling Pathways and Phenotypes: Comparisons Between Senescent and Non-senescent Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcified tissue international*, **110**, 489-503.
50. Ueharu, H. and Mishina, Y. (2023) BMP signaling during craniofacial development: new insights into pathological mechanisms leading to craniofacial anomalies. *Frontiers in physiology*, **14**, 1-7.
51. Chen, X., Li, J., Xiang, A., Guan, H., Su, P., Zhang, L., Zhang, D. and Yu, Q. (2024) BMP and activin receptor membrane bound inhibitor: BAMBI has multiple roles in gene expression and diseases (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, **27**, 1-9.
52. Christian, J. (2021) A tale of two receptors: Bmp heterodimers recruit two type I receptors but use the kinase activity of only one. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **118**, 1-3.
53. Luo, Z., Shang, X., Zhang, H., Wang, G., Massey, P.A., Barton, S.R., Kevil, C.G. and Dong, Y. (2019) Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *The American journal of pathology*, **189**, 1495-1500.
54. Ohba, S. (2016) Hedgehog Signaling in Endochondral Ossification. *Journal of developmental biology*, **4**.
55. Li, C., Zhang, X., Zheng, Z., Nguyen, A., Ting, K. and Soo, C. (2019) Nell-1 Is a Key Functional Modulator in Osteochondrogenesis and Beyond. *Journal of dental research*, **98**, 1458-1468.

56. 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.
57. Zhao, J., Du, W., Guo, D., Wang, S. and Du, W. (2023) Mechanical Signaling in Dental Pulp Stem Cells. *Frontiers in bioscience*, **28**, 1-12.
58. Song, W.P., Jin, L.Y., Zhu, M.D., Wang, H. and Xia, D.S. (2023) Clinical trials using dental stem cells: 2022 update. *World journal of stem cells*, **15**, 31-51.
59. 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**, 1-16.
60. Smeda, M., Galler, K.M., Woelflick, M., Rosendahl, A., Moehle, C., Lenhardt, B., Buchalla, W. and Widbillier, M. (2022) Molecular Biological Comparison of Dental Pulp- and Apical Papilla-Derived Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, **23**, 1-18.
61. Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G.C., Gomes Massironi, S.M., Pereira, L.V., Caplan, A.I. and Cerruti, H.F. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells, tissues, organs*, **184**, 105-116.
62. Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Shi, J. and Jin, Y. (2010) Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC cell biology*, **11**, 1-7.
63. Bayarsaihan, D. (2016) Deciphering the Epigenetic Code in Embryonic and Dental Pulp Stem Cells. *The Yale journal of biology and medicine*, **89**, 539-563.
64. Hussain, A., Tebyaniyan, H. and Khayatan, D. (2022) The Role of Epigenetic in Dental and Oral Regenerative Medicine by Different Types of Dental Stem Cells: A Comprehensive Overview. *Stem cells international*, **2022**, 1-15.
65. Klemm, S.L., Shipony, Z. and Greenleaf, W.J. (2019) Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature reviews. Genetics*, **20**, 207-220.
66. Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R. and Peterson, C.L. (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **18**, 407-422.
67. Cedar, H. and Bergman, Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics*, **10**, 295-304.

68. Cho, Y.D., Kim, B.S., Kim, W.J., Kim, H.J., Baek, J.H., Woo, K.M., Seol, Y.J., Ku, Y. and Ryoo, H.M. (2020) Histone acetylation together with DNA demethylation empowers higher plasticity in adipocytes to differentiate into osteoblasts. *Gene*, **733**, 1-26.
69. Yoo, C.B. and Jones, P.A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews. Drug discovery*, **5**, 37-50.
70. Rose, N.R. and Klose, R.J. (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et biophysica acta*, **1839**, 1362-1372.
71. 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**, 1-17.
72. Ghasemi, S. (2020) Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *The pharmacogenomics journal*, **20**, 367-379.
73. 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.
74. 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.
75. Soudi, A., Yazdanian, M., Ranjbar, R., Tebyanian, H., Yazdanian, 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.
76. 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**, 1-39.
77. 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.
78. Jin, H., Park, J.Y., Choi, H. and Choung, P.H. (2013) HDAC inhibitor trichostatin A promotes proliferation and odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells. *Tissue engineering. Part A*, **19**, 613-624.
79. Li, B., Yu, F., Wu, F., Hui, T., A, P., Liao, X., Yin, B., Wang, C. and Ye, L. (2018) EZH2 Impairs Human Dental Pulp Cell Mineralization via the Wnt/beta-Catenin Pathway. *Journal of dental research*, **97**, 571-579.

80. Hui, T., A, P., Zhao, Y., Wang, C., Gao, B., Zhang, P., Wang, J., Zhou, X. and Ye, L. (2014) EZH2, a potential regulator of dental pulp inflammation and regeneration. *Journal of endodontics*, **40**, 1132-1138.
81. Lamour, V., Detry, C., Sanchez, C., Henrotin, Y., Castronovo, V. and Bellahcene, A. (2007) Runx2- and histone deacetylase 3-mediated repression is relieved in differentiating human osteoblast cells to allow high bone sialoprotein expression. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 36240-36249.
82. Huynh, N.C., Everts, V., Pavasant, P. and Ampornaramveth, R.S. (2016) Inhibition of Histone Deacetylases Enhances the Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. *Journal of cellular biochemistry*, **117**, 1384-1395.
83. Wang, H., Chen, Q., Liu, W.J., Yang, Z.H., Li, D. and Jin, F. (2016) [Effect of trichostatin A on the osteogenic differentiation potential of periodontal ligament stem cells in inflammatory microenvironment induced by tumor necrosis factor-alpha stimulation]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*, **51**, 235-241.
84. Huynh, N.C., Everts, V., Nifuji, A., Pavasant, P. and Ampornaramveth, R.S. (2017) Histone deacetylase inhibition enhances in-vivo bone regeneration induced by human periodontal ligament cells. *Bone*, **95**, 76-84.
85. Sukpaita, T., Chirachanchai, S., Chanamuangkon, T., Nampuksa, K., Monmaturapoj, N., Sumrejkanchanakij, P., Pimkhaokham, A. and Ampornaramveth, R.S. (2022) Novel Epigenetic Modulation Chitosan-Based Scaffold as a Promising Bone Regenerative Material. *Cells*, **11**, 1-16.
86. Duan, R., Du, W. and Guo, W. (2020) EZH2: a novel target for cancer treatment. *Journal of hematology & oncology*, **13**, 1-12.
87. Dudakovic, A., Camilleri, E.T., Riester, S.M., Paradise, C.R., Gluscevic, M., O'Toole, T.M., Thaler, R., Evans, J.M., Yan, H., Subramaniam, M. *et al.* (2016) Enhancer of Zeste Homolog 2 Inhibition Stimulates Bone Formation and Mitigates Bone Loss Caused by Ovariectomy in Skeletally Mature Mice. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 24594-24606.
88. Batool, A., Jin, C. and Liu, Y.X. (2019) Role of EZH2 in cell lineage determination and relative signaling pathways. *Frontiers in bioscience*, **24**, 947-960.
89. Hemming, S., Cakouros, D., Isenmann, S., Cooper, L., Menicanin, D., Zannettino, A. and Gronthos, S. (2014) EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem cells*, **32**, 802-815.
90. Yang, D., Okamura, H., Teramachi, J. and Haneji, T. (2015) Histone demethylase Utx regulates differentiation and mineralization in osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, **116**, 2628-2636.

91. Haaf, T. (1995) The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmacology & therapeutics*, **65**, 19-46.
92. Stresemann, C. and Lyko, F. (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer*, **123**, 8-13.
93. Kadler, S., Vural, O., Rosowski, J., Reiners-Schramm, L., Lauster, R. and Rosowski, M. (2020) Effects of 5-aza-2 -deoxycytidine on primary human chondrocytes from osteoarthritic patients. *PLoS one*, **15**, 1-18.
94. Kerenyi, F., Tarapcsak, S., Hrubai, 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.
95. Robaszekiewicz, A., Erdelyi, K., Kovacs, K., Kovacs, I., Bai, P., Rajnavolgyi, E. and Virag, L. (2012) Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free radical biology & medicine*, **53**, 1552-1564.
96. Chung, C.H., Golub, E.E., Forbes, E., Tokuoka, T. and Shapiro, I.M. (1992) Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified tissue international*, **51**, 305-311.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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**, 1-17.
101. 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.

102. 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.
103. Ahlers, J. (1975) The mechanism of hydrolysis of beta-glycerophosphate by kidney alkaline phosphatase. *The Biochemical journal*, **149**, 535-546.
104. Boskey, A.L., Guidon, P., Doty, S.B., Stiner, D., Leboy, P. and Binderman, I. (1996) The mechanism of beta-glycerophosphate action in mineralizing chick limb-bud mesenchymal cell cultures. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **11**, 1694-1702.
105. Langenbach, F. and Handschel, J. (2013) Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*, **4**, 1-7.
106. 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.
107. Luther, G., Wagner, E.R., Zhu, G., Kang, Q., Luo, Q., Lamplot, J., Bi, Y., Luo, X., Luo, J., Teven, C. *et al.* (2011) BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. *Current gene therapy*, **11**, 229-240.
108. Yildirim, S., Zibandeh, N., Genc, D., Ozcan, E.M., Goker, K. and Akkoc, T. (2016) The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem cells international*, **2016**, 1-16.
109. He, Y., de Castro, L.F., Shin, M.H., Dubois, W., Yang, H.H., Jiang, S., Mishra, P.J., Ren, L., Gou, H., Lal, A. *et al.* (2015) p53 loss increases the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem cells*, **33**, 1304-1319.
110. Montecino, M., Carrasco, M.E. and Nardocci, G. (2020) Epigenetic Control of Osteogenic Lineage Commitment. *Frontiers in cell and developmental biology*, **8**, 1-9.
111. 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**, 1-22.
112. Rouillard, A.D., Gunderson, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G. and Ma'ayan, A. (2016) The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and

- mine knowledge about genes and proteins. *Database : the journal of biological databases and curation*, **2016**, 1-16.
113. Xiong, Y., Zhang, Y., Xin, N., Yuan, Y., Zhang, Q., Gong, P. and Wu, Y. (2017) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) promotes osteogenesis by promoting Wnt signaling pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **174**, 153-160.
 114. van de Peppel, J. and van Leeuwen, J.P. (2014) Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Frontiers in physiology*, **5**, 1-11.
 115. Scheller, E.L., Chang, J. and Wang, C.Y. (2008) Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *Journal of dental research*, **87**, 126-130.
 116. Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J. and Tuan, R.S. (2004) Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, **93**, 1210-1230.
 117. de Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R. and van Blitterswijk, C. (2004) Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, **34**, 818-826.
 118. Cho, H.H., Kim, Y.J., Kim, S.J., Kim, J.H., Bae, Y.C., Ba, B. and Jung, J.S. (2006) Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue engineering*, **12**, 111-121.
 119. Wan, D.C., Pomerantz, J.H., Brunet, L.J., Kim, J.B., Chou, Y.F., Wu, B.M., Harland, R., Blau, H.M. and Longaker, M.T. (2007) Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 26450-26459.
 120. Kwong, F.N., Richardson, S.M. and Evans, C.H. (2008) Chordin knockdown enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis research & therapy*, **10**, 1-9.
 121. Akizu, N., Estaras, C., Guerrero, L., Marti, E. and Martinez-Balbas, M.A. (2010) H3K27me3 regulates BMP activity in developing spinal cord. *Development*, **137**, 2915-2925.
 122. Jensen, E.D., Schroeder, T.M., Bailey, J., Gopalakrishnan, R. and Westendorf, J.J. (2008) Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, **23**, 361-372.
 123. Bouyahya, A., El Omari, N., Bakha, M., Aanniz, T., El Menyiy, N., El Hachlafi, N., El Baaboua, A., El-Shazly, M., Alshahrani, M.M., Al Awadh, A.A. *et al.* (2022) Pharmacological Properties of Trichostatin A, Focusing on the Anticancer Potential: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, **15**, 1-53.

124. Azechi, T., Sato, F., Sudo, R. and Wachi, H. (2014) 5-aza-2'-Deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, facilitates the inorganic phosphorus-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, **21**, 463-476.
125. Kobayashi, T., Torii, D., Iwata, T., Izumi, Y., Nasu, M. and Tsutsui, T.W. (2020) Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells. *Human cell*, **33**, 490-501.
126. Macrin, D., Alghadeer, A., Zhao, Y.T., Miklas, J.W., Hussein, A.M., Detraux, D., Robitaille, A.M., Madan, A., Moon, R.T., Wang, Y. *et al.* (2019) Metabolism as an early predictor of DPSCs aging. *Scientific reports*, **9**, 1-19.



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





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

5. **Hrubi, E.**, Imre, L., Bacsó, Z., Biró, S., Jenei, A., Hegedűs, C.: BMP-2 hatása a humán embrionális szápadlásból 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.



12. Tárgyszavak

Őssejt, DPSC, oszteoblaszt, differenciáció, BMP-2, Trihosztatin A, 5-azacitidin, EZH2i.
Stem cells, DPSC, osteoblast, differentiation, BMP-2, Trichostatin A, 5-azacitidine, EZH2i

13. 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 iránymutatásáért, 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 fogból eredetű őssejtek izolálását és tenyésztését.

Szintén köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet korábbi munkatársának Dr. Agnieszka Robaszkievicz-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.

14.Függelék