

A gingiva keringésének szabályozásában szerepet játszó neurohumorális faktorok vizsgálata, különös tekintettel a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorra

Doktori értekezés

Dr. Gyurkovics Milán

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lohinai Zsolt egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Simon György egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Nagy Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bánóczy Jolán egyetemi tanár, Ph.D., MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hermann Péter egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Márton Ildikó egyetemi tanár, Ph.D., MTA doktora

Dr. Molnár Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések	3
2. Bevezetés	6
2.1. A gingiva.....	6
2.2. A gingiva vérellátása	7
2.3. Gingivitisz.....	8
2.4. A diabétesz mellitusz	10
2.5 A vérellátást szabályozó mechanizmusok.....	14
2.6. Neurogén szabályozás	16
2.7. A vizsgálatunkkal szoros összefüggésben álló vazokatív anyagok	19
2.7.1. Az endotelin	19
2.7.2. Kininek - a bradikinin.....	22
2.7.3. A prosztaciklin.....	24
2.7.4. A hisztamin	25
2.7.5. A nitrogén-monoxid	27
2.7.5.1. A NO szintézise	29
2.7.5.2. A NO hatásmechanizmusa	32
2.7.5.3. A NO inaktivációja	33
2.7.5.4. A NO biológiai hatásai.....	33
2.7.6. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor.....	37
2.7.6.1. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor izoformái	40
2.7.6.2. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor biológiai hatásai	41
2.7.6.3. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptorai	45
3. Célkitűzések.....	49
4. Módszerek	50
4.1. Kísérleti állatok	50
4.2. Műtéti előkészítés, a vizsgálat menete	52
4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok	54
4.4. Western blot vizsgálat	54
4.5. Statisztikai analízis.....	55
4.6. Transzparens valós 3D intravitálmikroszkópia	56

4.6.1. Rövid áttekintés.....	56
4.6.2. A szöveten belüli fényszórás geometriai alapjai.....	56
4.6.3. A transzparencia növelése.....	59
4.6.4. A valós 3D mikroszkópia.....	62
4.6.5. A sztereokonverter	64
4.6.6. A mérőrendszer	65
5. Eredmények.....	67
6. Megbeszélés	86
7. Következtetések.....	95
8. Összefoglalás	96
9. Irodalomjegyzék.....	97
10. Saját publikációk jegyzéke.....	115
11. Köszönetnyilvánítás	116

1. Rövidítések

- 5-HT – szerotonin
- A – adrenalin
- AC – adenilát cikláz
- Ach – acetilkolin
- ADH – antidiuretikus hormon
- ADMA – aszimmetrikus dimetilarginin
- Akt – antiapoptotikus kináz
- Ang II – angiotenzin II
- ANP – atriális nátriuretikus peptid
- AVP – vazopresszin
- BK – bradikinin
- cAMP – ciklikus adenzin-monofoszfát
- cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát
- CGRP α – kalcitonin gén-rokon peptid
- COX – ciklooxygenáz
- DAG – diacil-glicerol
- DEA – dietanolamin
- ECE – endotelin konvertáló enzim
- ECL – megnövelt kemilumineszcencia
- ECM – extracelluláris mátrix
- EDRF – endotéliumból származó relaxáló faktor
- EDTA – etiléndiamin-tetraecetsav
- EGF – epidermális növekedési faktor
- eNOS – endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
- ERK – extracelluláris receptor kináz
- ET – endotelin
- FAD – flavin-adenin-dinukleotid
- FAK – fokális adhézis kináz
- FMN – flavin-mononukleotid
- Fisher LSD – Fisher-féle least significant different teszt

- FMN – flavin-mononukleotid
- GC – guanil-cikláz
- Grb2 – növekedési faktor receptor-kapcsolt protein
- H – hisztamin
- HEPES – N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2-etán-szulfonsav
- HIF-1 α – hipoxia indukálta faktor-1 α
- HIV – human immunodeficiency virus
- HSPG – heparánszulfát-proteoglikán
- IDDM – inzulinfüggő diabétesz mellitusz
- IGF – inzulin-szerű növekedési faktor
- I11 – interleukin 1
- I16 – interleukin 6
- I18 – interleukin 8
- iNOS – indukálható nitrogén-monoxid szintáz
- IP₃ – inozitol trifoszfát
- L-NAME – N^G-nitro-L-arginin-metil-észter
- L-NMMA – N^G-monometil-L-arginin
- LPS – lipopoliszacharid
- MAP – mitogénaktivált protein
- MAPK – mitogénaktivált protein kináz
- MEA – monoetanolamin
- MMP – mátrix metalloproteinázok
- Na – nátrium
- NA – noradrenalin
- NADPH – nikotinsavamid dinukleotid-foszfát
- NF- κ B – nukleáris faktor κ B
- NIDDM – nem inzulinfüggő diabétesz mellitusz
- NO – nitrogén-monoxid
- NOS – nitrogén-monoxid szintáz
- nNOS – neuronális nitrogén-monoxid szintáz
- NP-40 – Nonil-fenoxi-polietoxi-etanol
- NPY – neuropeptid Y

- PAS – periodic acid-schiff reakció
- PBS – foszfát-pufferolt sóoldat
- PDGF – vérlemezke eredetű növekedési faktor
- PGG₂ – prosztaglandin G₂
- PGH₂ – prosztaglandin H₂
- PGI₂ – prosztaciklin
- PIP₂ – foszfatidil-inozitol-4,5-bifoszfát
- PI3K – foszfatidilinozitol-3-kináz
- PKC – proteinkináz C
- PLCβ – foszfolipáz Cβ
- Raf – receptor-aktivált faktor
- Ras – patkány szarkóma onkogén
- RTK – receptor tirozin-kináz
- SDS-PAGE – nátrium-dodeciszulfát-poliakrilamid-gél-elektroforézis
- sGC – szolubilis guanilát-cikláz
- SH2 – src homológ
- SP – p-anyag
- TEA – trietanolamin
- TGF β – transzformáló növekedési faktor β
- TNF – tumor nekrozis faktor
- TSH – thyreoidea stimuláló hormon Tukey's HSD
- Tukey's HSD – Tukey-féle honestly significant difference teszt
- TXA₂ – tromboxán A₂
- VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
- VEGFR – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor
- VIP – vazoaktív intesztinális peptid
- VPF – vaszkuláris permeabilitási faktornak
- VSM – vaszkuláris simaizom
- VVO – veziko-vakuoláris sejtorganellum
- ZM323881 – 5-((7-benziloxiquinazolin-4-yl)amino)-4-fluoro-2-metil-fenol-hidrochlorid

2. Bevezetés

A disszertáció bevezetésének megírása során cél volt, hogy a legújabb tudományos ismeretek összegyűjtésével egy elég bő, áttekintő anyagot kapjanak az olvasók. Ez magyarázza jelen fejezet hosszabb voltát, mely mindazonáltal olvasmányosságával remélhetőleg élvezetes élményt nyújt az érdeklődőknek.

Parodonciumnak, fogágyaknak nevezzük a fogak szilárd, ámde rugalmas elhorgonyzását biztosító szöveteket. A fogágy részei az íny, a gyökérhártya, a fogak gyökereit fedő cement és az alveoláris csont. A parodonciumot funkcionális és fejlődéstani szempontból két nagy egységre oszthatjuk, a gingivára és a fogakat közvetlenül rögzítő szövetekre, az ún. rögzítő apparátusra [1].

A fogágybetegség népbetegség, szinte nincs olyan ember, akit ne érintene. Megelőzése, kialakulását követően pedig a kezelése fontos feladat, hiszen nemcsak fogvesztéshez vezethet, hanem súlyos szisztémás betegség is kialakulhat a következtében (pl.: szívbetegség) [2]. Ennek ellenére a fogágy viszonylag kevésbé tanulmányozott területe az emberi szervezetnek. Munkánk során olyan vazoaktív anyagok vizsgálatával foglalkoztunk, melyekről feltételeztük, hogy fontos szabályozó szerepet töltenek be a fogínyben és a fogágyban lezajló élettani és kórtani folyamatokban.

2.1. A gingiva

Ínynek nevezzük a processus alveolarist fedő, a fogak cervikális részét szorosan övező, a rágófunkcióhoz speciálisan adaptálódott nyálkahártyát [1]. Az íny vesztibulárisan és lingválisan az ún. mukogingivális jukcióval határolódik el a laza nyálkahártyától. Palatinálisan az íny és a feszes nyálkahártya között nincs éles határ [1].

Megkülönböztetünk szabad ínszélt (**gingiva marginális**) és feszes ínyt (**gingiva propria**) [1].

A gingiva marginális lényegében a szulkusz külső fala, mely az orális felszínén többrétegű elszarusodó laphámmal borított. A szulkusz mélye felé fokozatosan átmegy vékony el nem szarusodó laphámba, majd el nem szarusodó köbhámba, végül éles határ nélkül folytatódik a feszes ínyben. A gingiva propria a szabad ínyszél közvetlen folytatása, elszarusodó laphámmal borított, kötőszöveti rostokkal feszesen tapad az alveoláris csonton és a fognyaki cementen [1]. Az ép íny színe halvány rózsaszín, szorosan tapad a fognyakra, a széle késpengeszerűen elvékonyodik [1, 3].

A fogíny helyzeténél fogva többszörös funkciót lát el. Elsődleges feladata a parodontium mélyebben fekvő szöveteinek védelme a szájüregben található kórokozókkal szemben. Ezen kívül - a parodontium részeként - részt vesz a fogak rögzítésében, biztosítja a szájnyálkahártya hámrétegének folyamatoságát, és nem utolsósorban immunkompetens sejtjeivel a perifériás védekezésben is fontos szerepet tölt be [1, 3, 4].

2.2. A gingiva vérellátása

Az íny erősen vaszkularizált szövete szervezetünknek, melynek oka a sejtek magas oxigénigénye. Az íny sűrű érhalózatát a felső állcsontban az a. maxillaris rendszeréből származó ágak adják, az aa. alveolares superiores, az a. infraorbitalis, az a. palatinum majus és az a. incisiva, míg az alsó állkapocs gingivális erei az a. alveolaris inferior, az a. lingualis, az a. mentalis és az a. buccalis ágaiból erednek. Ezen erek ellátják az alveoláris csontot, valamint a perioszteumot is. A felületes ágak a szabad íny irányába futva többszörösen elágazódnak, fonatot képeznek a processus alveolaris fölött, és a gyökérhártya ereivel anasztomizálva látják el a gingiva szövetét. Az íny kiserei ép szövetben nagyfokú rendezettséget mutatnak, a kötőszöveti papillák tengelyében futva bomlanak végágaikra [3, 4]. Az általunk is vizsgált, posztkapilláris venulák fontosságát mutatja, hogy a fehérvérsejtek adhéziója, rollingja, vándorlása és exudációja itt zajlik, csakúgy mint a mikrocirkuláció ellenállásának szabályozása [5, 6]. Továbbá a posztkapilláris venulák kulcs szerepet játszanak a születés utáni angiogenezisben,

együttműködve az itt található pericitákkal [7]. A vénák végül a plexus pterygoideusba ömlenek, míg a nyirokerek a submandibularis, submentalis és a mély nyaki nyirokcsomók irányába haladnak [8].

2.3. Gingivitisz

A gingivitisz az íny gyulladása, mely jellegzetes vaszkuláris változásokkal jár [9].

A gingivitisz kialakulásának mechanizmusát, a hisztopatológiai történéseket és a folyamat progresszióját Page és Schroeder négy stádiumra osztotta fel. Ily módon megkülönböztettek kezdeti (initialis), korai (early), kifejlett (established) és előrehaladott (advanced) stádiumokat [9, 10].

Az egyes stádiumokban jellegzetes vaszkuláris elváltozások figyelhetők meg:

- Kezdeti stádium

A plakk-felhalmozódás következtében jellegzetes érelváltozások figyelhetők meg a kötőszövetben [9]. Klinikailag ez a kezdeti gyulladós válasz még nem jelentős (*subclinical gingivitis*) [10]. A szulkuszhámot és a gingiva kötőszövetét érő károsodás vazoaktív mediátorok felszabadulásához vezet. Már a hámsejtekből és később minden károsodó sejtből nagy mennyiségben szabadulnak fel arachidonsav-származékok (prostaglandinok, leukotriének). A gingivális hízósejtekből az LPS direkt vagy komplement aktiválása révén, indirekt módon (C3a, C5a) hisztamin és heparint szabadít fel [9]. A szérumban egyéb vazoaktív anyagok (bradikinin, plazmin) képződnek, a vérlemezkékből pedig szerotonin, tromboxán és PDGF válik szabaddá. Ezek hatására az arteriolák és kapillárisok kitágulnak, az endotélsejtek pórusai szétnyílnak, a kapillárisok permeabilitása fokozódik. Egyre több polimorfonukleáris leukocita vándorol ki a kapillárisok pórusain keresztül a gingivális kötőszövetbe. A

gyulladásos válaszreakció karaktere és intenzitása határozza meg, hogy ez a kezdeti lézió meggyógyul-e vagy pedig továbbhalad egy krónikus gyulladás felé [10].

- Korai stádium

A plakkfelhalmozódás kezdetétől számított egy héten belül alakul ki [10]. Jellemző a képre a gingivális kapillárisok számának jelentős emelkedése, a kapillárispermeabilitás fokozódása, a kapillárisok lefutásának megváltozása. Mindezek következtében klinikailag erythema léphet fel [10]. A gyulladt ínyben a kapillárisok egyre kanyargósabb lefutást mutatnak. A celluláris infiltrátum zömét limfociták és neutrofilek adják [9].

- Kifejlett stádium

A plakkfelhalmozódás kezdete után 2-3 héttel alakul ki [10]. Mennyiségileg tovább fokozódik a kapillárisok száma, ugyanakkor a vénás elvezetés károsodása miatt megnő a szövetközi ödéma és a sejtes infiltrátum [9, 10]. Minőségileg viszont a korábban dominánsan limfociter infiltrációt egyre inkább plazmasejtek váltják fel. A fokozott plazmasejt infiltrációval párhuzamosan a kollagén tovább pusztul, az ínyszél konzisztenciája egyre puhább lesz és lokalizált anoxemia alakul ki [10]. A vörösvérsejtek kötőszöveti extravazációja, majd hemoglobin tartalmuk bomlása tovább mélyíti a krónikusan gyulladt fogíny vörös színét [10].

- Előrehaladott stádium

A gyulladás következtében a kollagén még tovább pusztul, a pusztulás már ráterjed a dentogingivális és dentoalveoláris rostok legkoronálisabb részére is. Az íny kötőszöve kezd elválni a fogtól. Mikroszkóposan fibrózis látható a fogínyben, valamint a gyulladás és az immunválasz következtében szövetpusztulás lép fel [10]. Emberben a jelentős plazmasejt infiltrációval járó hisztopatológiai állapotot már inkább kezdeti parodontitisznek kell minősítenünk [9].

2.4. A diabétesz mellitusz

A cukorbetegség (diabétesz mellitusz) olyan komplex anyagcserezavar, kezeletlen formában krónikus hiperglikémiával jellemzett kórkép, amelynek háttérében elégtelen inzulinelválasztás és/vagy –hatás, másképpen fogalmazva abszolút vagy relatív inzulinhiány áll, s amelyet változó expresszivitással megjelenő mikro- és/vagy makrovaszkuláris szövődmények kísérnek [11-13]. A kórkép sem okát, sem patogenezisét tekintve nem egységes, mindazon betegségek összefoglaló neve, amelyekben krónikus hiperglikémia észlelhető [11-13].

Ezért ma alapvetően két nagy típusát különböztetjük meg. Ezek az I. típusú (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)) és a II. típusú (Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM)) diabétesz mellitusz. E két csoporton kívül még meg kell említeni a gesztációs diabéteszt, mely várandós kismamákban jelentkezik, a csökkent glükóz toleranciát (IGT), aminél azonban manifeszt diabétesz nem kórismézhető (normo- és hiperglikémia közötti új entitás), a hiánytáplálkozáshoz társuló diabéteszt és a szekunder diabéteszt, mely utóbbi felléphet például szindrómákhoz társultan, illetve akár gyógyszerek is kiválthatják [11-13].

A cukorbetegség a XXI. század elejére az egyik legjelentősebb népegészségügyi problémává vált, az egyik legelterjedtebb népbetegség. Prevalenciája rohamosan nőtt világszerte az elmúlt évtizedek során [14]. Előrejelzések szerint előfordulási gyakorisága tovább fog nőni, 2030-ra már járványszerű méreteket ölthet. Ekkorra várhatóan a világ lakosságának 7,7 %-a, azaz 439 millió felnőtt ember lesz érintett a betegségben [14]. Ez a növekedés nagy mértékben az elhízás nagyobb arányának és a következményes II. típusú diabétesz mellitusznak (NIDDM) köszönhető, noha az I. típusú megbetegedés (IDDM) incidenciája is fokozódni látszik [14]. Európára vonatkozóan a rendelkezésünkre álló adatok alapján az várható, hogy a 2005 és 2020 közti időszakban megduplázódik az IDDM esetek száma az 5 év alatti gyerekek körében, valamint 70%-os növekedés jósolható a 15 évnél fiatalabbak között [14].

A betegség mortalitása azonban jelentős különbségeket mutat az egyes országokban és leginkább a krónikus szövődmények meglétével függ össze, különösképpen a diabéteszes vese elváltozásokkal [14]. Tény, hogy a legnagyobb problémát a diabétesz

következtében fellépő krónikus vaszkuláris szövődmények okozzák, beleértve a nagyerek és a kiserek megbetegedését egyaránt [14].

Az I. típusú cukorbetegség általában gyorsan, jellegzetes tünetek kíséretében lép fel, mégpedig annál gyorsabban, minél fiatalabb az egyén [11]. Gyermekkorban napok-hetek, fiatal felnőttkorban hónapok alatt fejlődhetnek ki a klinikai tünetek. Ennél a típusnál a hasnyálmirigy inzulintermelő β -sejtjeinek pusztulása vezet az inzulinhiányhoz. Jellegzetes tünetei: sok vizelet, fogyás, szomjúság [11].

A II. típusú cukorbetegség általában sok éven át tünetszegényen zajlik. Éveken keresztül is fennállhat anélkül, hogy diagnosztizálnák [11]. Előfordulhat, hogy a cukorbetegséget a kezdetét követő 15-20 év elteltével fedezik fel, nemegyszer súlyos késői szövődményei révén. Ebben a típusban szenved a diabéteszesek 80-90%-a [11]. A II. típusú diabétesz mellitusz patogenezisében a genetikai faktorok fontosabbak, mint az I. típusúban. Erre utal az a megfigyelés is, hogy a betegek elsőfokú rokonainak körében 60-80%-ban fordul elő a betegség. A többszörös genetikai hibák mellett életmódra visszavezethető hatások járulnak hozzá a kialakulásához [11]. Jellegzetes a glükózterhelés után elhúzódó vagy elégtelen inzulinszekréció, valamint a perifériás szövetek inzulinrezisztenciája. A II. típusú cukorbetegségben a hasnyálmirigy szigeteiben mindig található β -sejtek, bár gyakran csökkent számban. A betegség kialakulásában egy polipeptid, az amilin is szerepet játszik [11]. Az amilin normális körülmények között a β -sejtek terméke, az inzulinnal együtt tárolódik, és a szinuszoidális térbe szekretálódik. Megfigyelték, hogy a II. típusú diabéteszben szenvedőknél az amilin a β -sejtek sejtmembránjához kapcsolódva felhalmozódik. Feltételezik, hogy a β -sejtek inzulinérzékenységének zavarát ezek az extracelluláris amilindepozitumok okozzák [11].

A diabétesz számos szerv károsodását okozhatja, mely részben az anyagcsere-zavar súlyosságának, részben fennállása időtartamának függvénye. A betegség tünetei és szövődményei igen változatosak. Jóllehet a diabétesz fő típusai különböző patomechanizmussal és anyagcsere-jellegzetességekkel rendelkeznek, a hosszan fennálló betegség ér-, vese-, szem- és idegrendszeri szövődményei mindkét típusban előfordulnak. Ezek a cukorbetegséggel kapcsolatos morbiditás és mortalitás fő okai [11].

A diabétesz mellitusz szövődményeinek háttérében a hiperglikémia áll. Ezt támasztja alá az a klinikai megfigyelés is, mely szerint ha nem diabéteszes donor veséjét cukorbetegbe transzplantálják, a transzplantáció után 3-5 éven belül diabéteszes nefropátia jön létre [11]. A diabéteszes szövődmények két fő okra vezethetők vissza. Ezek a fehérjék nem enzimatis glikolizációja, illetve az intracelluláris hiperglikémia poliol-anyagcsere zavarral együtt [11].

A glükóz - enzimek „segítségé” nélkül - a fehérjék aminocsoportjához kapcsolódik. Számos fehérje glikolizálódik. A kapcsolódás kezdetben reverzibilis, majd az irreverzibilis szakban késői glikolizációs végtermékek keletkeznek, rendellenes keresztkötésekkel [11]. Ezek a fehérjék már nem bomlanak le, merevek, és más hozzájuk kapcsolódó anyagok lerakódását is fokozzák. Így magyarázható diabéteszben a bazális membrán megvastagodása és az erek falának merevebbé válása (mikroangiopátia) [11]. Bizonyos szövetekben, melyek nem igényelnek inzulint a glükóztranszporthoz a hiperglikémia az intracelluláris glükózsztint emelkedéséhez vezet. Az intracelluláris ozmolaritás növekedése vízfelvételt és ozmotikus sejtkárosodást okoz. Ez a poliol-anyagcsereút játszik szerepet a diabétesz szövődményeként kialakuló retinopátia, neuropátia, nefropátia és aortaszklerózis patomechanizmusában is [11]. Gyakori szövődmények még a baktériumok által okozott bőrfertőzések, melyek jellegzetesen a szőrtüszőkben alakulnak ki és mélyre terjednek (furunkulusok). Szintén gyakori bizonyos testrészek (elsősorban a hónalj, a szeméremtest környéke, emlő alatti területek) gombásodása, mely viszketéshez vezet. Jellegzetes továbbá, hogy a sebek nehezen gyógyulnak, legyen az akár sebészi metszés, akár sérülés helye [11]. Fontos beszélnünk a fogászati szövődményekről is. Kimutatták, hogy amennyiben az anyagcserezavar 14 éves kor előtt manifesztálódott, vagy az anyagcsere nem kielégítően gondozott, a diabéteszes betegek még jó szájhigiéne mellett is fogékonyabbak a karieszre, mint egészséges kortársaik, mert a karieszre fogékony életkorban az alacsony szekréciós ráta és nyál-pH következményeként csökken a mechanikus tisztulás és a dentális plakk mennyiségi növekedése útján elősegíti a karieszképződésben szerepet játszó acidogén mikroorganizmusok – a Lactobacillusok, Streptococcusok, gombák – növekedését annak ellenére, hogy a cukorbeteg szacharózmentes diétája kedvező lenne a kariesz megelőzésének [13]. A rossz szájhigiéne, a fokozott plakk-képződés gingivitiszhez, a mikroorganizmusok számának növekedése és a nyál bevonó hatásának

elmaradása nyálkahártya-fertőzésekhez vezethet, ami a diabéteszeseknél gyakori, és jellemző parodontopátia és szájnyálkahártya-gyulladás klinikai képében nyilvánul meg [13, 15].

Fontos összefüggés van a cukorbetegség és a fogágybetegség, valamint a mikroangiopátia kialakulása között is [13, 15, 16]. A diabétesz mellitusz és a destruktív fogágybetegségek összefüggését elsőként *Seiffert* írta le 1865-ben. Ebben az időben a diabéteszt a fogágybetegség jelenléte alapján diagnosztizálták [13]. A fogágygyulladás cukorbetegben fiatalabb korban jelentkezik, mint egészséges egyéneknél. A cukorbetegnek csupán 2%-ának ép a fogágya, 19,5%-ban gingivitisz, 78,5%-ban pedig parodontitisz a jellemző elváltozás [16]. A cukorbetegben, 30 év felett minden életkorban, fogágybetegség miatt több fog kerül eltávolításra, mint egészséges egyéneknél, ami a diabétesztartam növekedése szerint is összefüggést mutat. Emiatt diabéteszesekben már 30 éves kor körül is kevesebb az ép fogazatú, és a teljes fogatlanság mintegy 10 évvel előbb, 25 éves kor körül is gyakori [13]. *Glickman*, a modern parodontológia atyja szerint a diabétesz nem a közvetlen oka, hanem csak a hajlamosító tényezője a fogágybetegség kialakulásának [15].

A gingiva mikroangiopátiás elváltozását elsőként *Ray* írta le [13]. Jellemzőnek találta a kapillárisok, venulák, ill. arteriolák megvastagodását, hialinos degenerációját, a duzzadt endotélsejteket, az érfal obliterációját és számos érben trombozist. Fénymikroszkóppal a bazális membrán széttöredezését, PAS-pozitív fibrillákat és a sejtközéppont dezorientációját figyelték meg [13]. A gingiva mikroangiopátiás elváltozását szövettanilag hasonlónak találták, mint amit glomeruloszklerózisban, ill. a bőr kisereiben vagy diabéteszes retinopátiában figyeltek meg. Számos szerző a vaszkuláris permeabilitás növekedését is leírta cukorbetegben [13].

2.5. A vérellátást szabályozó mechanizmusok

Az emlősökben és így az emberekben is komplex kardiovaszkuláris keringést szabályozó mechanizmusok alakultak ki. Ezek fokozzák az aktív szövetek vérellátását és megnövelik vagy éppen csökkentik a hőleadást a vér redisztribúciója révén [17]. A homeosztázis felbomlása esetén (pl.: vérzés) a szabályozó rendszerek célja a véráramlás fenntartása a szívben és az agyban, akár a test többi részében lévő keringés rovására is [17]. A keringést szabályozó tényezők kifejthetik hatásukat egyrészt a szív pumpafunkciójára az „output” befolyásolásával, másrészt a rezisztenciaerek (főként az arteriolák) átmérőjének megváltoztatásával vagy pedig a kapacitás erek (a vénák) területén tárolt vérmennyiség módosításával [17]. Az arteriolák átmérője részben autoreguláció útján változhat, részben pedig az aktív szövetekben helyben termelt vazodilatátor metabolitok hatására is megnőhet [17]. Hatással vannak még rájuk az endotélium által lokálisan termelt anyagok, valamint szisztémásan szabályozó szerepe van a keringésben lévő vazoaktív anyagoknak és az arteriolákat beidegző idegeknek [17]. A kapacitás erek átmérőjét szintén szabályozzák a keringésben lévő vazoaktív anyagok, valamint a vazomotoros idegek. A szisztémás szabályozó mechanizmusok együttműködnek a lokálisakkal és meghatározzák a vaszkuláris választ az egész szervezetben [17]. A „vazokonstriktio” és „vazodilatáció” kifejezések általában a rezisztencia erek összehúzódására és tágulására vonatkoznak. A vénák érátmérőváltozását specifikusan „venokonstriktiónak” és „venodilatációnak” hívjuk [17].

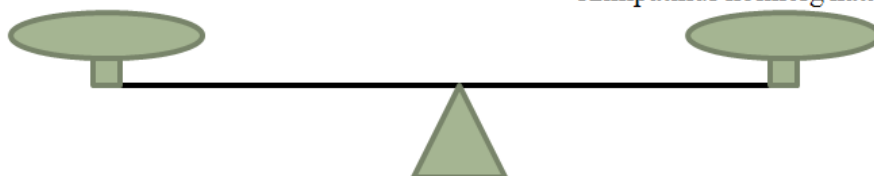
A szervezet keringésszabályozásában számos helyi és szisztémás tényező vesz részt, melyeknek jelenlegi ismereteink szerint a fogíny vérkeringésének kontrolljában is szerepe van. Meghatározó jelentőségű ebben az arteriolák és a venulák érátmérőváltozása, melynek során vagy a konstriktio, vagy pedig a dilatáció irányába tolódik el az egyensúly (1. ábra).

Vazokonstrikcio

- hőmérséklet↓
- autoreguláció
- ET1
- 5-HT
- TXA2
- A (kiv. hcs. izom és máj)
- NA
- AVP
- Ang II
- Na⁺-K⁺ ATP-áz inhibitor
- NPY
- szimpatikus idegrendszeri hatás↑

Vazodilatáció

- CO₂↑, O₂↓
- K⁺, adenzin, laktát, stb.↑
- pH↓
- hőmérséklet↑
- NO
- VEGF
- kininek
- PGI₂
- A (hcs. izomban és májban)
- CGRP_α
- SP
- H
- ANP
- VIP
- szimpatikus idegrendszeri hatás↓
- szimpatikus kolinerg hatás↑



1. ábra

Vazokonstrikcioöt okozó tényezők: hőmérséklet csökkenés; autoreguláció; endotelin-1 (ET1); szerotonin (5-HT); tromboxán A₂ (TXA₂); adrenalin (A); noradrenalin (NA); vazopresszin (AVP); angiotenzin II (Ang II); Na⁺-K⁺ ATP-áz inhibitor; neuropeptid Y (NPY); szimpatikus idegrendszeri kisélesek számának fokozódása.

Vazodilatációöt okozó tényezők: CO₂ szint növekedése a vérben; O₂ szint csökkenése a vérben; K⁺, adenzin, laktát; pH csökkenés; hőmérséklet növekedés; nitrogén-monoxid (NO); vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF); kininek; prosztaciklin (PGI₂); adrenalin (A; harántcsíkt izomban és májban); kalcitonin gén-rokon peptid alfa (CGRP_α); P-anyag (SP); hisztamin (H); atriális nátriuretikus peptid (ANP); vazoaktív intesztinális peptid (VIP); szimpatikus idegrendszeri kisélesek számának csökkenése; szimpatikus kolinerg hatás fokozódása.

A következőkben a főbb szabályozó tényezőket beszéljük át úgy, mint neurogén szabályozás és a vizsgálatunkban szerepet játszó legfontosabb vazoaktív anyagok.

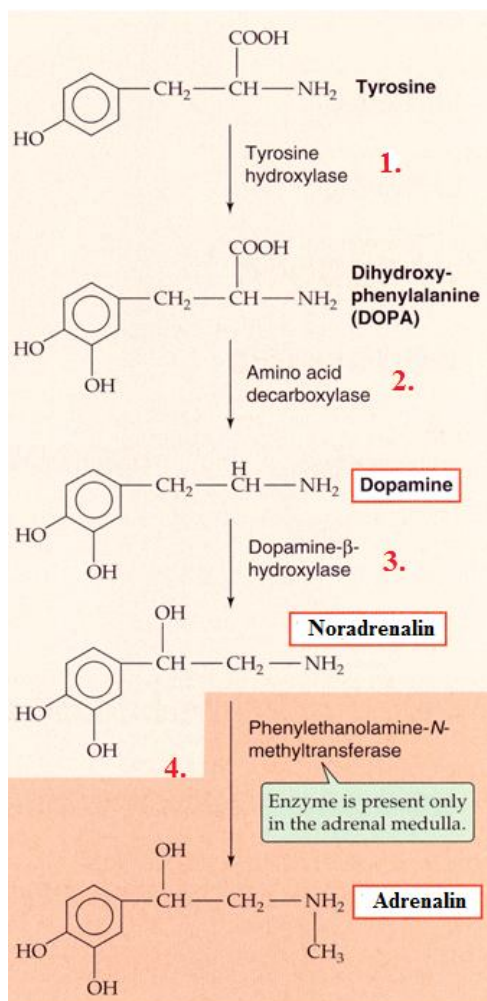
- Ez utóbbiak:
 - endotelin
 - NO
 - kininek - bradikinin
 - VEGF
 - eikozanoidik - prosztaciklin
 - hisztamin

2.6. Neurogén szabályozás

Az erek beidegzése:

Noha az arteriolák és az egyéb érszegmentumok beidegzése elég sűrű, mindegyik ér, kivéve a kapillárisokat simaizmot is tartalmaz és motoros beidegzést kap az autonóm idegrendszer szimpatikus rostjai felől [17]. Ezek az idegrostok szabályozzák a rezisztencia ereken keresztül a szövetek véráramlását és az artériás nyomást. A vénás oldalon, a kapacitás erek beidegzése szabályozza a vénákban tárolt vér mennyiségét [17]. A vénák beidegzése általánosságban véve elég szórványos, de például a szplanknikus ereké nagyon denz. A venokonstriktiót okozó stimulus az arteriolák vazokonstriktor idegeit is aktiválja. Az ennek következtében létrejövő vénás térfogat csökkenés megnöveli a vénás visszaáramlást és ezáltal a keringés artériás oldalán lévő vérmennyiséget [17].

A posztganglionáris axon-terminálisok fő neurotranszmittere a noradrenalin. Ez a vegyület egy fenil-etil amin, mely szintézise tirozinból történik a sejtek citoplazmájában (2. ábra) [18]. Noradrenerg rostok végződnek a test minden egyes részén. Ezek a rostok működésüket illetően vazokonstriktorok [17].



2. ábra

A noradrenalin szintézisének lépései [18]

A catecholamin szintézise a sejtek citoplazmájában indul meg: a tirozin a tirozin-hidroxiláz (1) hatására dihidroxi-fenilalaninná (DOPA) alakul, amiből dekarboxileződéssel a DOPA dekarboxiláz (2) hatására dopamin keletkezik. A képződött dopamin a kromaffin granulomokban a dopamin-β-hidroxiláz (3) hatására noradrenalinná alakul. A sejtek 80%-ában a noradrenalin elhagyja a kromaffin granulomokat, és a citoplazmában a jelenlévő feniletanolamin-N-metiltranszferáz (4) hatására adrenalinná metilálódik.

A perifériás keringés centrális szabályozásának fő eszköze a prekapillaris rezisztenciaerekhez futó szimpatikus vazokonstriktor aktivitás módosítása, az akciós potenciál frekvenciájának fokozása vagy csökkentése [18, 19]. A szimpatikus noradrenerg érszűkítő hatás a simaizmoknál lévő α₁ receptorokon keresztül érvényesül.

Az α_1 receptorokat bénító farmakonok lokálisan alkalmazva helyi értágulatot, általánosan adva pedig vérnyomáscsökkenést okoznak [19].

A szimpatikus noradrenerg rostokban különböző kotranszmitterek is jelen vannak, melyek vazokonstriktióban betöltött fiziológiás szerepe nem teljesen ismert.

A szimpatikus noradrenerg vazomotor szabályozásnak van egy beépített negatív visszacsatolású eleme is. Az idegvégződésekből felszabadult noradrenalin nemcsak az α_1 -es receptorokra hat, hanem reakcióba lép az endotélsejteken lévő α_2 -es receptorokkal is, és azokból NO-felszabadulást vált ki [19].

A szervezet nagy részén az érkaliber változását a szimpatikus tónus szabályozza, és vazodilatációt legfőképpen a vazokonstriktor tónus gátlásával lehet kiváltani. Egyes érterületeken a funkcióval párhuzamosan külön vazodilatátor innerváció is érvényesül, melyben non-adrenerg non-kolinerg neurotranszmitterek váltják ki a prekapilláris rezisztenciaerek dilatációját. A legrégebben ismert terület a szecernáló nyálmirigy, melyben a szekréciót jelentős véráramlás-fokozódás kíséri [19].

Bizonyított, hogy a nyálmirigyek rendelkeznek paraszimpatikus beidegzéssel is. A paraszimpatikus rostok fő transzmittere az acetilkolin. Ezen kívül számos neuropeptid is részt vesz a mirigyműködés szabályozásában, melyek közül a leggyakoribb a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) [19]. Ismeretes továbbá, hogy kísérletesen indukált neurogén gyulladásban a SP fontos szerepet játszik [20, 21]. Újabb kutatások bizonyították, hogy ezen anyagokon kívül a NO is jelentős szerepet játszik a mirigyek működésében. A neuropeptidok és a NO is közvetlenül a mirigysejteken fejtik ki hatásukat, de közvetve a vérerek tágasságának változtatásával is befolyásolhatják a mirigyek működését [3, 22], azonban az erek paraszimpatikus beidegzése még mindig vitatott terület.

A vérkeringés-szabályozás központjai a nyúltvelői formáció retikuláriszban és a gerincvelőben helyezkednek el [19]. A gerincvelő preganglionáris szimpatikus rostjainak spontán aktivitása nincs, az agytörzs presszor központja aktiválja, a depresszor központja pedig gátolja az állandó tónusos ingerület leadást. Az agytörzsi formáció retikulárisz egyes rostroventrolaterális neuroncsoportjainak eltroncsolása, vagy a gerincvelővel való összeköttetésük megszakítása a szimpatikus vazokonstriktor tónus csökkenéséhez/megszűnéséhez vezet [17]. A rostroventrolaterális area olyan integráló sejtek halmaza, melyeknek spontán aktivitásuk van [17, 19]. A sejtek az ingerületeket

integrálják, és ezek összességének megfelelően aktiválják a gerincvelői szimpatikus preganglionáris rostokat. Az erről a területről kiváltható vérnyomás-emelkedés alapján nevezték el ezeket a sejteket presszor központnak. A formáció retikulárisz kaudális sejtcsoportjának ingerülete vérnyomás- és szívfrekvencia-csökkenést eredményez. Régebben ezeket a sejtcsoportokat depresszor központnak nevezték [17-19].

2.7. A vizsgálatunkkal szoros összefüggésben álló vasoaktív anyagok

2.7.1. Az endotelin (ET)

Az endotelin a cisztein-gazdag fehérjék sorába tartozó, 21 aminosavból álló peptid. Highsmith fedezte fel, mint az endotélből származó vazokonstriktor faktort [23]. Ezt követően Yanagisawa 1988-ban sertés aortájából származó endotélsejt-kultúrában izolálta, majd meghatározta a molekuláris szerkezetét, illetve elnevezte endotelinnek [24, 25].

Az endotelinnek eddig 3 izoformáját írták le. Ezek az endotelin-1, az endotelin-2, és az endotelin-3 [26]. Az izoformák közül a leggyakoribb az ET1. Az ET1 gén egy 212 aminosavból álló prekursor-fehérjét kódol, a preproendotelint. Neutrális endopeptidáz hatására a preproendotelinből egy 39 aminosavból álló előanyag, a proendotelin-1 keletkezik, amelyet nagy-endotelinnek is nevezünk (big endothelin) [25]. A proendotelin-1-ből az endotelin konvertáló enzim (ECE) aminosavakat hasít le, ezáltal létrehozva az ET1-et [27].

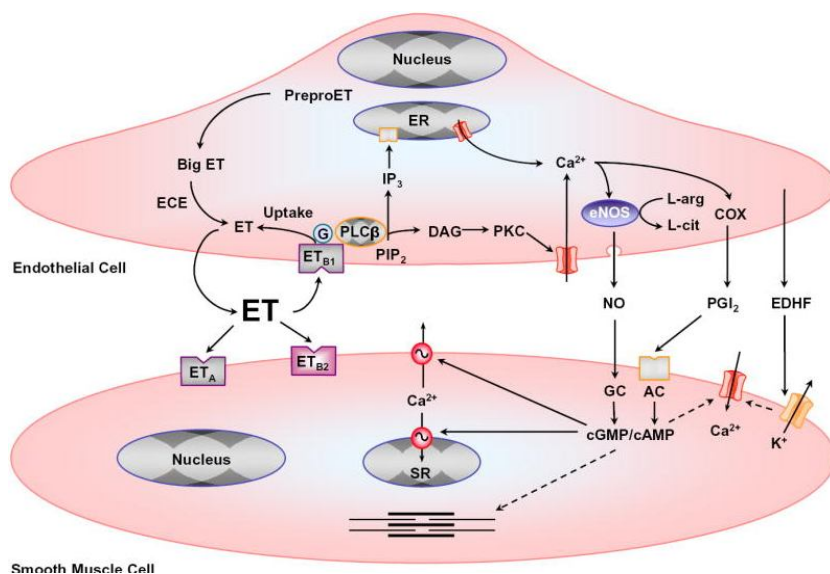
Az ET1 egy multifunkcionális szabályozó molekula. Fontos regulációs szerepe van az értónus, a vérnyomás, valamint a Na^+ - és vízháztartás szabályozásában [28]. Újabb kutatások eredményeként feltételezhető, hogy az ET1-nek szerepe van számos

gyulladásos folyamat patogenezisében is (gyomornyálkahártya, intraokuláris, légúti infekciók, parodontitisz) [28]. Mára már sikerült igazolni, hogy az ET1-nek közvetlen szerepe van a vaszkuláris gyulladás kialakulásában és a mikrovaszkuláris permeabilitás növekedésében. Habár ez utóbbi hatást olyan különböző mediátoroknak tulajdonítják, mint például a hisztamin vagy a VEGF, az edotelin nem csak hozzájárul a szöveti ödémához, de elősegíti a rollingot és a fehérvérsejtek kapillárisfalhoz való kitapadását is. Ez gyulladáshoz vezet, a vér viszkozitása nő és stázis áll be a mikrocirkuláció területén. Ez végül azt eredményezi, hogy csökken a mikrocirkulációs oxigén felhasználása és sejt diszfunkció lép fel.

A gyulladás hatására termelődő citokinek (Il-1 α , Il-1 β , TNF- α) pedig tovább fokozzák az ET1 termelődését.

Az ET1, mint pro-inflammatórikus faktor, fokozza az elasztáz felszabadulását a neutrofil granulocitákból, aktiválja a hízósejtek által szintetizált citokinek (Il-1 α , Il-1 β , Il-6, Il-8, TNF- α) termelését, amelyek fontos szerepet játszhatnak a parodontitisz kialakulásában és progressziójában [29]. Ezidáig mindössze néhány publikáció jelent meg, melyben az ET1 gingivális szulkuszfolyadékban mért szintjéről számolnak be. Fujioka és mtsai. az ET1 szintjét vizsgálták egészséges (kontroll) és parodontitiszben szenvedő páciensek gingivális szulkuszfolyadékában. A parodontitiszes csoportba tartozó betegek szulkuszváladékában magasabb ET1 értéket mértek a kontrollhoz viszonyítva [30]. Ugyanakkor Pradeep és mtsai. egészséges, gingivitiszes, parodontitiszes valamint parodontális kezeléssel túlesett páciensek szulkuszváladékát ELISA-val (érzékenység: 0,14 pg/ml) vizsgálva egyik csoportban sem tudtak számottevő mértékben ET1-et kimutatni [28].

Az ET1-et az endotélsejtek, a makrofágok, a vaszkuláris simaizomsejtek, a fibroblasztok, valamint a neuronok termelhetik. Az ET2-t az intesztinális epitel sejtek, az ET3-at pedig az intesztinális epitel sejtek mellett az agyi idegsejtek, valamint a vesetubulusok epitel sejtjei termelik [31]. A felszabaduló ET1 a célsejtek receptoraihoz kötődik. A receptoroknak a humán sejtekben két alapvető típusa ismert, ET-A és ET-B. Mindkét receptor a G-protein kapcsolt receptorcsaládba tartozik. A ligand bekötődését követő szignáltranszdukció eredményeként fokozódik a szarkoplazmatikus-retikulumból a Ca²⁺ kiáramlás, minek következtében az izom összehúzódik, vazokonstriktció jön létre [24].



3. ábra

Az ET-B receptor aktiválódását követő szignáltranszdukció és hatása a vaszkuláris simaizomsejteken [32]

Az ET kötődését követően a receptorhoz kapcsolt G fehérje aktiválja a PLC β enzimet. Az enzim hasítja a PIP $_2$ -t, a keletkező két termék a DAG és az IP $_3$. Az IP $_3$ Ca $^{2+}$ -ot szabadít fel a szarkoplazmatikus retikulumból. A Ca $^{2+}$ stimulálja az eNOS-t, minek hatására L-argininből L-citrullin és NO keletkezik. A NO a VSM sejtekhez diffundál és ingerli a GC enzimet, fokozza a cGMP szintjét. A cGMP relaxációt hoz létre a VSM sejteken azáltal, hogy csökkenti az intracelluláris Ca $^{2+}$ koncentrációt, valamint a miofilamentumok Ca $^{2+}$ iránti érzékenységét. Az ET-B receptor aktiválódása következtében megnőtt Ca $^{2+}$ szint fokozza a COX működését, és a PGI $_2$ termelését. A PGI $_2$ aktiválja az AC-t, és növeli a cAMP koncentrációját, ami a cGMP-hez hasonlóan a VSM sejtek relaxációját okozza.

Az ET-A receptorokon keresztül – amelyek elsődlegesen a vaszkuláris simaizomsejteken találhatók, de megfigyelhetők a szívizomsejteken, májsejteken, zsírsejteken, neuronokon is – jön létre az ET1 vazokonstriktiót, hipertenziót és Na $^+$ retenciót okozó hatása. Az ET-A receptorok elsősorban a mikrovaszkuláris endotéliumban találhatók [25]. Az ET-B receptorok elsősorban az endotélsejteken találhatók, de előfordulnak a vaszkuláris simaizomsejteken is. Az ET1 ET-B receptorhoz való kötődését követő jeltovábbítás eredményeként fokozódik a NOS

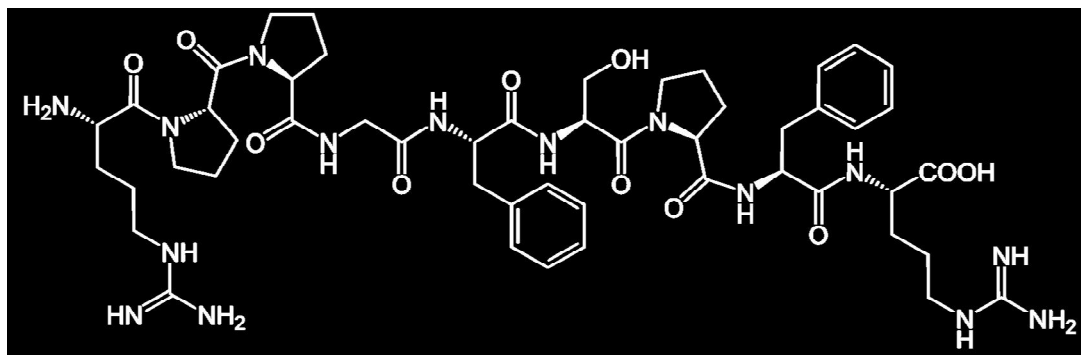
működése, ezáltal a NO termelése, nátriurézis és diurézis jön létre (3. ábra) [25, 32]. Mindezek eredményeként csökken a vérnyomás [32].

Mindkét ET-receptor típus megtalálható az idegrendszerben is, ahol a neurotranszmisszió és a vaszkuláris funkciók szabályozásában vesznek részt [33].

Az ET1 szintézisét és felszabadulását a különböző citokinek, hormonok szabályozhatják. Az ADH, az Ang II, a reaktív oxigén-gyökök, a hipoxia stimulálják, míg az ANP, a prosztaciklin, valamint a NO gátolják a termelődését [25]. Azáltal, hogy autokrin módon irányítja a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expresszióját, az ET1 fontos komponense az angiogenezisnek, ezáltal pedig a tumorsejtek proliferációjának [25]. Ebből következik, hogy az ET1 a tumor növekedés, neovaszkularizáció és metasztázis képződés egyik meghatározó eleme. Az ET-A receptorokról bebizonyosodott, hogy blokkolásuk közvetlenül akadályozza meg a tumorsejtek növekedését és a VEGF termelés csökkentésével antiangiogenetikus hatás lép fel [25]. Továbbá mivel az ET-A receptorok a mikrovaszkuláris endotélsejtekben expresszálódnak, ezért gátlásuknak szerepe van a kapillárképzésben és növekedésben egyaránt. Éppen ezért nem meglepő, hogy az endotelin receptorok blokkolását nagyon ígéretes, új tumorelles stratégianak tartják [25].

2.7.2. Kininek - a bradikinin (BK)

A kininek egy fehérjeprekurzorból, a kininogénből jönnek létre kallikrein nevű fehérjebontó enzim hatására. A kininek fő képviselője a bradikinin (4. ábra), amely egy 9 aminosavból álló nonapeptid (Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg). A BK mellett jelentős még – az egy aminosavval nagyobb méretű decapeptid – a kallidin is [34].



4. ábra

A bradikinin nonapeptid sémás szerkezete [35]

A BK-t Maurício Rocha e Silva brazil fiziológus és farmakológus fedezte fel 1948-ban, amikor megfigyelte, hogy a *Bothrops jararaca* nevű kígyó mérgeének beadását követően megemelkedik egy fehérje szintje a plazmában, majd csökken a vérnyomás, valamint lassú és tartós simaizom-kontrakció alakul ki [34].

A kininek egyaránt keletkezhetnek az érpályán belül, és kívül, azaz a szövetekben is. Egy fehérje-előanyagból, a kininogénből hasítódnak ki proteolitikus enzimek, a kallikreinek hatására [17, 36]. Ép körülmények között a kallikrein inaktív formában, mint prekallikrein van jelen. A plazmában lévő prekallikrein az aktiválódott XII-es alvadási faktor (Hageman-faktor) hatására alakul át plazma-kallikreinné [36]. A plazma-kallikrein szubsztrátja az ún. nagy molekulatömegű kininogén. A szöveti prekallikrein szövetkárosodás, gyulladás vagy allergiás reakció kapcsán aktiválódik szöveti kallikreinné, amely a nagy és kis molekulatömegű kininogénből egyaránt képes kinint kihalászni [17, 36].

A kininek eliminációja gyors, féléletidejük a plazmában kevesebb, mint harminc másodperc. Metabolizmusukban két enzim játszik szerepet, a kinináz-I és a kinináz-II [36]. A kinináz-II, amely azonos az angiotenzin-konvertáló enzimmel (ACE), elsősorban a tüdőben található az endotélsejtek lumen felületéhez kapcsolva. A BK C-terminális végéről két aminosavat lehasítva inaktív terméket eredményez. A kinináz-I csak a C-terminális aminosavat hasítja le a BK-ről [36]. Az így létrejövő molekula még rendelkezik biológiai aktivitással.

A kininogénekből keletkező kininek G-protein mediált kininreceptorhoz kapcsolódnak, melyeknek két típusa ismeretes, a B-1 és B-2 receptorok. A B-2 receptorok állandóan jelen vannak a szövetekben, és egyaránt aktiválhatók BK-nel és kallidinnel is [36]. A B-1 receptorok indukálható receptorok, ugyanis fiziológiás körülmények között csak kismértékben expresszálódnak, ám szövetkárosodás, gyulladás hatására jelenlétük fokozódik. Főként kallidinnel indukálhatók. A kétféle receptor által közvetített hatások igen hasonlóak.

A kininek hatékony értágítók, mely hatásuk részben endotélfüggő [36]. Az endotélfüggő hatás közvetítésében a NO és a prosztaciklin vesz részt. Normális vérnyomás-értékek mellett a kinineknek nincs lényeges szerepük a vérnyomás szabályozásában, azonban bizonyos típusú hipertenziókban jelentős mértékben felszaporodnak, és vazodilatátor hatásuk révén részt vesznek a vérnyomás-emelkedés szabályozásában [36].

A kininek gyulladáshoz mediátoroknak tekinthetők. Kísérleti adatok szerint szerepet játszanak számos gyulladáshoz, allergiás megbetegedésben [36]. Brunius és mtsai. a BK parodontitiszben kiváltott szerepét vizsgálták. Kísérletük során azt tapasztalták, hogy a BK stimulálta az IL-8 termelődését a humán gingivális fibroblasztokban in vitro, mely hatás a B-2 receptorokon keresztül jött létre. A BK az IL-8 felszabadulását stimuláló hatásán keresztül hozzájárulhat a fogínygyulladás fenntartásához, és jelentős rizikótényezőt jelenthet a gyulladás progressziójában [37].

2.7.3. A prosztaciklin (PGI₂)

A PGI₂ az eikozanoidok csoportjába tartozó lipid [38]. Arachidonsavból keletkezik egy többlépcsős folyamat eredményeként. Az arachidonsavból ciklooxygenáz (COX) hatására oxidáció és gyűrűzárás révén prosztaglandin G₂ (PGG₂) keletkezik. A PGG₂ egy instabil közttermékké, prosztaglandin H₂-vé (PGH₂) alakul, amelyből végül, egyéb vegyületek (prostaglandinok) mellett, PGI₂ képződik [38]. A PGI₂ G-protein kapcsolt plazmamembrán receptorhoz kapcsolódik (IP-receptor) [38].

A PGI₂ erős értágító. Feltehetően szerepet játszik a mikrocirkuláció fokozásában. A gyulladós folyamat során felszabaduló PGI₂ tágítja a prekapilláris arteriolákat, és elősegíti más gyulladós mediátorok vaszkuláris hatásait. Ez a hatás a posztkapilláris venulákon is érvényesül, ahol a PGI₂-ek növelik a plazmakiáramlást [38].

A prosztaglandinok jelentős szerepet játszanak a mukózális gyulladásokban, és valószínűleg fontos szerepet töltenek be a parodontitisz patogenezisében is.

Alpagot és mtsai. HIV+ személyeknél vizsgálták a prosztaglandin szintjének és a parodontitisz progressiójának viszonyát. A több hónapig tartó követéses vizsgálatban azt állapították meg, hogy a szulkuszfolyadék magasabb prosztaglandin szintje együtt jár a parodontitisz progressiójával a HIV+ egyéneknél [39].

2.7.4. A hisztamin

A hisztamin biológiai hatásait valamint feltételezett szerepét az anafilaxiás reakciókban Sir Henry Dale és mtsi írták le 1910-ben. A hisztamin emlősszövetekben és -szövetnedvekben, állati mérgekben és növényi szövetekben széles körben megtalálható. Ezt jelzi az elnevezése is: görög hisztosz = szövet [40].

A hisztamin hisztidinből képződik a hisztidin dekarboxiláz enzim hatására. A szintézis (és egyben a tárolás) legfontosabb helye a hízósejtek és a vér bazofil granulocitái. A bázikus jellegű hisztamin a hízósejtek intracelluláris granulumaiban tárolódik savas jellegű fehérjékhez és heparinhoz kötődve [40]. Gyulladós vagy allergiás reakciókban a hízósejtek degranulációjával szabadul fel az egyéb preformált mediátorokkal (heparin, proteáz) együtt. E reakció kapcsán gyulladós mediátorok (prosztaglandinok, leukotriének, citokinek) de novo szintézise is végbemegy [40].

A hisztamint főleg az imidazol-N-metil-transzferáz metabolizálja, és a keletkezett N-metil-hisztamin a MAO hatására N-metil-imidazol-ecetsavvá alakul. A hisztamin metabolizmusában szerepet játszik a nem specifikus diamino-oxidáz is. A hatástalan metabolitok a vizelettel ürülnek ki [40].

Szelektív ligandumok segítségével négy hisztaminreceptor-típust sikerült jellemezni, majd molekuláris klónozás után meghatározták a szerkezetüket és jelátviteli mechanizmusukat. A hisztamin affinitása a négy receptor iránt jelentősen különbözik. A H1-receptoron keresztül valósul meg a hisztamin vazodilatációs, bronchokonstriktív, viszketést okozó hatása [40]. A H2-receptoron hatva szintén létrejön vazodilatáció, valamint ezen a receptoron keresztül szabályozza a sósavszekréciót is. A H3-receptoron ható hisztamin gátolja a neurotranszmitter felszabadulást, míg a H4-receptoron keresztül hat a mieloblastok, promielociták differenciálódására valamint a hízósejtek, a bazofil és eozinofil sejtek kemotaxisára [40].

A hisztamin számos biológiai hatással rendelkezik, melyek közül a legfontosabbak a következők:

- Keringési hatások, gyulladás:

Az arteriolák tágulása a perifériás ellenállás csökkenésével és bőrkipirulással jár. Ez a hatás a H1-receptorok izgatása révén jön létre, mely emberben endotélfüggő és NO-közvetített [40]. Egyes állatfajokban a hatásban az érfal simaizomzat H2-receptorainak izgatása is részt vesz.

A posztkapilláris venulák endoteljének citoskeletonja átrendeződve összehúzódást vált ki, és ezáltal interendoteliális rések keletkeznek, melyeken át plazma áramlik ki, duzzanat jön létre, és kialakul a gyulladás korai stádiuma [40].

Újabb adatok szerint a hisztamin a H1-receptoron keresztül képes aktiválni egy transzkripciós faktort, az NF- κ B-t, és ennek révén fokozza számos, a gyulladásos reakciókban részt vevő peptid és fehérje termelődését. Ennek eredményeképpen a hisztamin az allergiás mechanizmusú gyulladás sejtes fázisára is hat a T-limfociták, az eozinofil sejtek és a fibroblasztok funkciójának serkentésével, illetve szerepe van az immunválasz kialakulásában is [40]. A hisztamin a hízósejteken, a bazofil granulocitákon és az eosinofil sejteken lévő H4-receptorok aktiválása révén közvetlenül fokozza e gyulladásos sejtek kemotaxisát, illetve különféle kemokinek eozinofil granulocitákra kifejtett kemotaktikus aktivitását [40].

- **Simaizom hatások:**

A hisztamin a H1-receptorok izgatása révén az IP₃ okozta Ca²⁺ szignál közvetítésével a simaizmokat, köztük a hörgők és bronchiolusok izomzatát összehúzza [40].

- **Transzmitter felszabadulás szabályozása:**

A hisztaminerg neurotranszmissziós mechanizmusok posztzinaptikus receptorai – a helyi hormonális szöveti hisztamin receptorokhoz hasonlóan – H1-és H2-típusba tartoznak [40]. A hisztamin H3-receptorok preszinaptikus receptorok, amelyek aktivációja a cAMP szintjének csökkenése révén gátolja a hisztaminerg neuronok végződéseiből történő hisztamin felszabadulást. E receptorok más neurotranszmitterek (acetilkolin, dopamin, noradrenalin) felszabadulását is hasonló módon szabályozzák. A H3-receptorok számos agyterületen és a perifériás szövetekben is kimutathatók [40].

2.7.5. A nitrogén-monoxid

A NO egy gáz halmazállapotú ingerületátvivő anyag, melynek felfedezése átformálta az ingerületátvivő anyagokról addig alkotott elképzelést. Ez a molekula egy igen reaktív, rövid életidejű, fontos kardiovaszkuláris, neurológiai és immunfunkciókkal bíró hírvivő anyag [41].

A múltban elsősorban toxikus vegyületként tartották számon, mint a szmog, cigarettafüst alkotója, vagy mint az ózonréteg sérülését okozó anyag. 1979-ben Robert Furchgott, amerikai kutató, megfigyelte, hogy az erek acetilkolinra adott relaxációs válasza az endotél jelenlétét igényli [41]. 1980-ban a Nature-ben megjelent cikkében arról számolt be, hogy az Ach képes összehúzni és elernyeszteni az erek simaizomzatát, de az elernyedés csak akkor jelentkezik, ha az endotélium ép. Az endotélsejtekből származó, ismeretlen, rövid élettartamú (5–30 s) értágító anyagot endotéliumból származó relaxáló faktornak (endothelium-derived relaxing factor – EDRF) nevezte el [42].

1988-ban Furchgott valamint Louis Ignarro egymástól függetlenül arra a következtetésre jutottak, hogy az EDRF nem más, mint a NO szabad gyök [42-44]. Ezt a rákövetkező évek kutatásai be is bizonyították. Kiderült tehát, hogy az addig kizárólag légszennyező anyagként ismert NO az élő szervezet fontos ingerületközvetítő eleme. Világméretű, és igen eredményes kutatómunka indult el a bejelentés hatására [45]. A NO vizsgálata az egyik legkedveltebb kutatási témává vált. Az orvostudomány szinte valamennyi ága foglalkozik ezzel a molekulával, és a megjelenő publikációk száma folyamatosan növekszik. A XX. század egyik legnagyobb orvosbiológiai felfedezésének tartják a NO-ot, és a neves orvosi folyóirat, a Science 1992-ben az év molekulájává választotta [45].

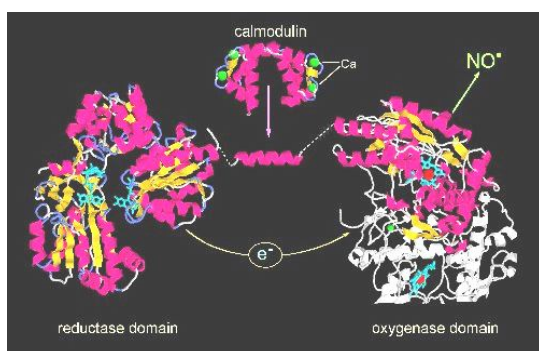
Ferid Murad és Ignarro munkája azt is bizonyította, hogy a NO a célsejteken fokozza a guanilil-cikláz aktivitását, és a NO a cGMP sejten belüli szintjének emelésével fejt ki hatásait [46-48]. 1991-ben Ignarro megfigyelte, hogy a NO felszabadulása áll a korábban csak non-adrenerg, non-kolinerg relaxációs válaszként ismert mechanizmus hátterében [46]. Kimutatta, hogy stimuláció hatására NO szabadul fel az idegvégződésekből, amely cGMP-t indukál és a simaizom relaxációját okozza. Murad már 1977-ben felfedezte, hogy a különböző szívpanaszok, főleg az angina pectorisz tüneti kezelésére alkalmazott nitroglicerinnel aktív bomlásterméke a NO [46]. Nitroglicerinnel bomlásának hatására tehát NO szabadul fel. Ezzel magyarázható a koszorúereket jótékonyan tágító terápiás hatás.

Furchgott, Ignarro és Murad 1998-ban orvosi és élettani Nobel-díjat kapott a NO kardiovaszkuláris rendszerben betöltött szerepének megismeréséért [46].

A NO-nak kulcsszerepe van a szív működés, valamint az érrendszer, a vérnyomás, és az egyes szervek perfúziójának szabályozásában. Hatására az erek simaizomzata elernyed, az erekben csökken a vérrögök képződése azáltal, hogy a NO képes gátolni a trombocita-aggregációt. Hatással van az immunrendszerre és az idegrendszerre is [46].

2.7.5.1. A NO szintézise

A NO az egyik legkisebb súlyú molekula (30 Da). Az élő szervezet különböző típusú sejtjei szintetizálják. Előállítását a NO szintáz (NOS) nevű enzim végzi, amely egy igen bonyolult szerkezetű, hem aleggységet is tartalmazó enzim. 1989-ben identifikálták és írták le először, majd 1991 és 1994 között tisztították és klónozták [49]. Két globuláris doménből áll, melyeket egy flexibilis fehérje-híd köt össze. Az oxigenáz domén, amely a hem prosztetikus csoportot tartalmazza, felelős a NO termeléséért, a reduktáz domén pedig a NO termeléséhez szükséges elektronokat biztosítja (5. ábra). Az elektrontranszportot a kalmodulin nevű kofaktor kötődése aktiválja [49].



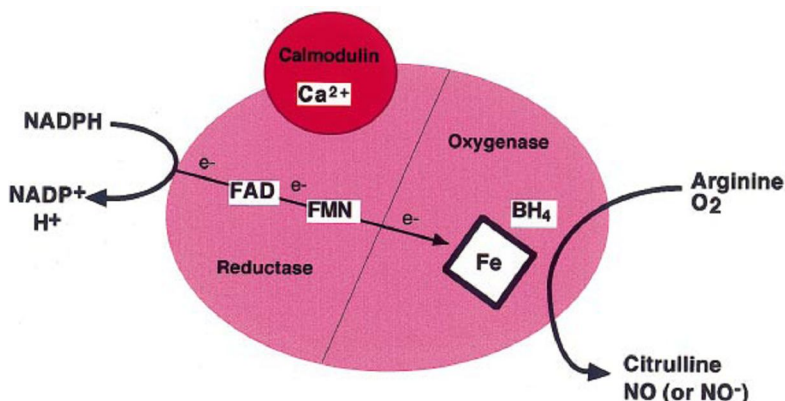
5. ábra

A NOS elemi felépítése[49]

A NOS két globuláris doménből álló enzim. A reduktáz és oxidáz doméneket egy helikális szerkezetű peptid kapcsolja össze. Az enzim egyik kofaktora a kalmodulin, amely a Ca^{2+} ionok kötését követően az enzim összekötő részéhez kapcsolódva aktiválja azt. Habár az oxigenáz domén szerkezete ismert, a reduktáz doméné pedig hasonló a citokróm P450 enziméhez, a NOS teljes

struktúrájának, valamint a pontos működési mechanizmusának megismerése a mai napig kutatás tárgyát képezi [49].

A folyamat során – két lépcsőben L-argininből NO és L-citrullin képződik. A reakció létrejöttéhez oxigénre, valamint különböző kofaktorokra van szükség (6. ábra) [50]. A szintetizált NO nem raktározódik, hanem azonnal felszabadul. A sejtmembránokon akadálytalanul áthatol, igen könnyen diffundál minden irányba, ezért rövid, csupán néhány másodperces felezési ideje ellenére is jelentős távolságok megtételére képes sejtszinten.



6. ábra

A NO szintézise L-argininből [51]

Az elektronokat a NADPH szolgáltatja a reductáz domén számára. Az elektronok a FAD és FMN karriereken keresztül jutnak el az oxigenáz doménhez, ahol reakcióba lépnek a hemben lévő vassal és tetrahydrobiopterinnel. Ez az aktivált komplex indítja el a reakciót oxigén jelenlétében, aminek eredményeként NO és L-citrullin keletkezik [51].

A NOS-nak két nagy típusát különböztetjük meg. Az első az élettani körülmények között a sejtek állandó enzimekészetében jelenlevő konstitutív forma, míg a második nagy csoport az indukálható forma, amely kóros körülmények között (pl. bakteriális

fertőzés, gyulladásos mediátorok), vagy tumorokból felszabaduló szöveti anyagok hatására képződik [51-53]. A NOS működése N-szubsztituált argininszármazékokkal (pl. N^G-monometil-L-arginin /L-NMMA/, N^G-nitro-L-arginin-metil-észter /L-NAME/) szelektíven gátolható [51-53]. A NO bioszintézisének endogén gátlószere az ADMA. Vizsgálatok igazolják, hogy az ADMA szintje számos kardiovaszkuláris betegségben megemelkedik [51-53]. A konstitutív és az indukálható NOS számos tulajdonságban különbözik egymástól. Ilyen pl. a felszabadulásuk időtartama, vagy a mellékvesekéreg-hormonok (szteroidok) iránti érzékenysége [51-53].

A NOS-nak a két nagy típusán belül jelenleg három izoformája ismert, melyek működéséhez kofaktorokra van szükség. Az enzimek mindegyike igényli a flavin-adenin-dinukleotid, a flavin-mononukleotid, a tetrahidrobiopterin, valamint a kalmodulin, a hem és a cink kofaktorok jelenlétét. Szubsztrátjuk a NADPH, a molekuláris oxigén és az L-arginin aminosav [51-53].

A NOS 3 izoformája:

- Endotéliumban előforduló endoteliális forma (eNOS)
- Idegsejtekben található neuronális forma (nNOS)
- Makrofágokból kimutatott indukálható forma (iNOS)

Az nNOS és az eNOS folyamatosan jelen vannak a sejtekben, konstitutív NOS-nak is hívjuk őket. Esetükben akkor indul be a NO szintézis, amikor az intracelluláris Ca²⁺ szint megemelkedik [51-53]. A megemelkedett Ca²⁺ szint következtében a kalmodulin Ca²⁺-ot köt és a NOS-hoz kötődik. Ez a kapcsolat reverzibilis. A kötődés következtében az enzim két alegysége közelebb kerül egymáshoz, és beindulhat a NO termelése [51-53]. A folyamat addig tart, míg a kalmodulin le nem disszociál az enzimről.

Az iNOS normális körülmények között nincs jelen a sejtekben, de a különböző stimulusok (infekció, bakteriális toxinok) hatására expresszálódik. A makrofágokon kívül más sejtekben is kimutatták már, többek közt az érfal simaizomsejtjeiben, a szívizomban, a bélben, a hepatocitákban, illetve a különböző immunsejtekben [51-53]. Megjelenése után nagyobb mennyiségben termeli a NO-ot, mint a konstitutív izoenzimek, ugyanis irreverzibilisen köti a kalmodulint, amely így képtelen ledisszociálni róla. Míg a konstitutív NOS izoformák NO termelésének előfeltétele az

intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése, addig az indukálható NOS alacsony Ca^{2+} szinten is képes NO-ot termelni [51-53]. Az iNOS expressziójának inhibitorai a glükokortikoidok. A fiziológias mennyiségben termelt NO-nak fontos élettani szerepe van a mikroorganizmusok elleni védekezésben és a citotoxikus reakciókban [51-53].

2.7.5.2. A NO hatásmechanizmusa

A NO-nak fiziológias körülmények között a fő támadáspontja a szolubilis guanilát-cikláz (sGC). Mivel gáz halmazállapotú, ezért szabadon diffundálva jut el a célsejtekig (pl. trombocita, az erek simaizomsejtjei, stb.), ahol a sGC hemcsoportjához hozzákapcsolódva aktiválja az enzimet [17]. Megemelkedik a cGMP szint, és így működésbe lép egy cGMP dependens protein-kináz [41]. A protein-kináz csökkenti a miozin könnyű lánc kináz aktivitását azáltal, hogy foszforilálja az enzimet [17]. A csökkent aktivitású könnyű lánc kináz a trombocitákban gátolja az aggregációt, a simaizomban pedig elernyedést okoz. Az endogén termelődésű NO fiziológias vazodilatátor szerepet játszik, ami a NO-bioszintézis gátlásával megakadályozható [17]. A NO-ra jellemző, hogy párosítatlan elektronja van a külső héjon, így ún. szabadgyökként funkcionál, igen reakcióképes gáz. Könnyen reakcióba lép más szabadgyökökkel, és gyorsan eliminálódik, miközben nitrit és nitrát képződik. A szuperoxid-anionok képesek inaktiválni a NO-ot, ugyanakkor ebben a reakcióban újabb reaktív molekulák képződnek (pl. peroxinitrit, nitroxilgyök) [17]. A NO, illetve a NO-ból keletkező egyéb reaktív gyökök gyakran mediálnak különféle kórélettani funkciókat, melyek többnyire nem a cGMP-függő utakon zajlanak (pl. a túltermelt NO-nak kórélettani szerepe van a hiperreaktív lokális gyulladásos megbetegedésekben, valamint szisztémás gyulladásban) [17]. A NO károsan befolyásolhatja számos enzim – elsősorban a fémionokat tartalmazó enzimek – működését. A NO káros hatásai közé tartozik az is, hogy befolyásolja az arachidonsav-metabolizmusban részt vevő enzimek

működését, fokozza a tioltartalmú fehérjék nitrozilálódását, és gátolja a DNS-szintézist [17].

2.7.5.3. A NO inaktivációja

A NO-ot a hemoglobin, a mioglobin és a szabadgyök szuperoxidok inaktiválják [46]. A glutation, amely fontos kénhidrogén csoportot hordozó vegyület a szervezetben, élettani körülmények között kölcsönhatásba léphet a NO-dal, és még stabilabb formává – S-nitroso-glutationná – alakítja azt. Ez a vegyület tartós NO-hordozóként funkcionálhat a szervezetben [46]. Az ér glutation tartalmának csökkenését mutatták ki pl. cukorbetegségben és érlelmeszesedésben. Ez a tény jól magyarázhatja a kardiovaszkuláris komplikációk fellépését ezekben a betegségekben. Az érszűkületek vagy más okok miatt bekövetkező keringési zavarok hatására a károsodott érfali sejtek szabadgyököket termelnek, így a NO-képződés csökken [46].

2.7.5.4. A NO biológiai hatásai

A NO-ról alkotott első ismeretek kizárólag annak vazodilatátor szerepére irányultak, ma már azonban tudjuk, hogy hatása sokrétű [41]. A NO-nak számos fiziológiás és patológias hatása van.

Az arteriolákban folyamatosan érvényesül a NO vazodilatátor hatása [41]. Ezt bizonyítják azok a kísérletek, amelyek során az a. brachialisba beadott L-NMMA helyi érszűkületet okozott. Állatkísérletekben a beadott L-NMMA mintegy 30%-kal növelte az artériás vérnyomást. Ez a hatás vélhetően a tónusos NO-felszabadulás gátlásán alapul [41]. A későbbiekben leírt kísérletünk során is ehhez hasonló eredményt tapasztaltunk. A vizsgálati állatok L-NAME-rel történő előkezelése növelte a szisztémás vérnyomást.

A NO főbb hatásai:

- **Kardio-vaszkuláris hatások:**

Számos vizsgálat igazolta, hogy a NO folyamatosan jelen van az arteriolák falában, szerepe van az érfal simaizomzatának relaxációjában és a bazális értónus beállításában. Az érendotélben tónusos NO termelést számos tényező stimulálja: a véráramlásból adódó nyíróerők, acetilkolin, bradikinin, ATP, ADP, hisztamin, trombin [54]. A NO vazodilatátor hatását ún. másodlagos hírvivők útján fejt ki. Aktiválja a sGC enzimet, amely a célsejtekben megemeli a cGMP szintjét [17]. Ez a folyamat végül a simaizmok ellazulását váltja ki. Megtalálható a vérlemezkékben is, ahol nemcsak a trombocita-aggregáció gátlására van hatással, hanem megakadályozza azt is, hogy a trombociták az endotélhez tapadjanak. Az endokardium által termelt NO szerepet játszik a szívizom relaxációjának szabályozásában.

- **Az immunrendszer működésének szabályozása:**

A szervezetet érő különböző károsító tényezők hatására fokozódik az iNOS működése, ezáltal a NO termelődése. Az így keletkező NO szerepet játszik a szervezet védekező mechanizmusaiban. A makrofágokban (iNOS) termelt NO citotoxikus hatású [55]. A NO tulajdonképpen egy nem specifikus védekező anyag a kórokozók vagy a daganatsejtek ellen, ugyanis a NO-ból képződő reaktív gyökök (nitroxilgyök, peroxinitrit) sejtmérgek. A baktériumok elleni hatásukat azáltal fejtik ki, hogy károsítják azok légzéséért felelős vastartalmú enzimeit. Amennyiben azonban a NO krónikus mennyiségben termelődik, az már káros hatású nem csak a baktériumokra, hanem a fogágyra is [56]. A NO azáltal is védi a szervezetet, hogy indukálja a sejtek apoptózisát, meggátolva ezáltal a daganatok kialakulását [46].

- Az idegrendszer működésének szabályozása:

Mint köztudott, a NO a non-adrenerg, non-kolinerg idegek neurotranszmittere. Emellett mint modulátor is ismeretes, fokozza egyéb neurotranszmitterek (adrenalin, dopamin) illetve neuropeptidek felszabadulását is [50].

A NO szerepe az orális megbetegedésekben:

- Parodontitisz:

Megfigyelések szerint krónikus gyulladásos állapotokban fokozódik a makrofágok infiltrációja a fogágy szövetei közé. A makrofágokban fokozódik az iNOS expressziója, ezáltal megnő a NO szintézise parodontitisz során [54, 56]. További kutatások kimutatták az iNOS aktivitás fokozódását a makrofágokon kívül a limfocitákban és a polimorfonukleáris sejtekben egyaránt [56]. Valószínűsíthető, hogy a bakteriális plakk a felelős az iNOS aktivitásának növekedéséért, ugyanis steril állatok ínyszövetében nem tapasztalható iNOS aktivitás [57]. Újabb tanulmányok arról számolnak be, hogy krónikus parodontitiszben szignifikánsan növekszik az iNOS expressziója a gingivális fibroblasztokban az egészséges csoporthoz képest [58]. A NO azáltal is szerepet játszhat a parodontitisz progressziójában, hogy szabályozza a különböző proinflammatorikus citokinek termelődését. Daghigh és mtsai. laboratóriumi körülmények között vizsgálták az iNOS gátlók hatását. Azt tapasztalták, hogy az inhibitor hatására csökkent a fibroblasztok NO termelése [58]. Lohinai és mtsai. munkájukban pedig bizonyították, hogy az iNOS gátlása jótékony hatású a fogágygyulladás tüneteire [56].

- Odontogén ciszták és periapikális infekciók:

Már számos olyan publikáció jelent meg, melyben a periapikális szövetek elváltozásaival foglalkoznak, de csak kevés számol be olyan kutatásról melyben a NOS expresszióját tanulmányozták odontogén cisztákban. Takeichi és mtsai. radikuláris cisztákban - a vártnak megfelelően - iNOS expressziót detektáltak [59]. Még nem teljesen tisztázott, hogy a NO milyen szerepet játszik a csont destrukciójában ilyen

körülmények között. Jelenleg kutatások folynak annak kimutatására, hogy a NO milyen szerepet játszik az odontogén keratociszták patogenezisében [60].

A periapikális infekciók következményeként szintén fokozódik az iNOS aktivitása, ezáltal a NO termelése, így tehát a NO-nak a gyökércsúcsi infekciók kórfolyamatában is szerepet tulajdonítanak [61].

- A szájnyálkahártya gyulladással megbetegedései:

Csak kevés olyan tanulmány van, melyben a NO szerepét vizsgálták a szájnyálkahártya különböző betegségeiben. Bár a lichen planus krónikus gyulladással betegség, a vizsgálata során csak alacsony, vagy semmilyen iNOS aktivitást nem sikerült kimutatni még annak ellenére sem, hogy a betegségben bőven detektálhatók voltak CD68 pozitív makrofágok [62]. Feltételezések szerint ennek oka, hogy az elváltozás következtében nagy mennyiségben termelődő citokinek gátolják az iNOS expresszióját.

Habár a nyálban lévő NO hatása az egészséges orális mukózásra még nem teljesen ismert, az eredmények azt támasztják alá, hogy a nyál magas NO tartalmának szerepe van a szájnyálkahártya-betegségek patogenezisében [63].

- Orális karcinóma és diszplázia:

Számos cikkben beszámoltak már a szájüregi rákok és az iNOS kapcsolatáról. Rosbe és mtsai. elsőként vizsgálták a fej-nyak régióban előforduló elszarusodó laphámrák kapcsán az iNOS expresszióját [64], 10 eset eredményét publikálták, azt azonban nem részletezték, hogy a tumor pontosan hol helyezkedett el. Az iNOS-t elsődlegesen a daganatsejtek expresszálták. Gallo és mtsai. is az iNOS aktivitását tanulmányozták 27 betegnél, akiknél fej-nyak régióban kialakult laphámrák szerepelt a diagnózisban. Az iNOS expressziójának fő forrásai ismét a daganatsejtek voltak [65].

A szájüreg diszplázias állapotában immunhisztokémiai módszerekkel, valamint RT-PCR-rel tanulmányozták az iNOS expresszióját [66]. Egészséges orális mucosában nem tapasztalható iNOS expresszió [67], azonban diszplázias állapotokban az iNOS aktivitása korrelál az elváltozás súlyosságával [68]. Brennan és mtsai. orális diszplázias állapotokat vizsgálva pozitív összefüggést találtak az iNOS és a VEGF expressziója között [67].

Az iNOS szerepe a szájüregi rosszindulatú daganatok, valamint diszpláziás állapotok patogenezisében még további kutatások tárgyát képezi. Az iNOS szelektív antagonisták alkalmazása megfelelő terápiának tűnik az orális karcinómák kezelésében. Specifikusan kapcsolódnak az iNOS-hoz, és állatokon végzett vizsgálatoknál nagy százalékban csökkentették a daganatok invazivitását és a metasztázis képződést [69].

2.7.6. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

A VEGF egy 40 kDa súlyú homodimer glikoprotein, mely kulcsszerepet játszik a mikroerek permeabilitásában és az angiogenezisben [70]. Több mint huszonöt éve ismert. Első leírói Senger és munkatársai voltak 1983-ban, akik a VEGF-et mint a tengerimalac hepatocelluláris karcinóma sejtjeiben termelődő proteint írták le [70]. Ezt a proteint vaszkuláris permeabilitási faktornak (VPF) nevezték. Arra a következtetésre jutottak, hogy ez a faktor specifikus regulátora a tumorban lévő vérerek permeabilitásának. 1989-ben Ferrara és Henzel [71] valamint Plouët és mtsai. [72] egymástól függetlenül kimutattak egy endotélsejt-specifikus fehérjét, amelyet vaszkuláris endoteliális növekedési faktornak (VEGF) neveztek el. További vizsgálatok során kiderült, hogy a VPF és a VEGF ugyanaz a molekula [73, 74].

A humán VEGF génje 8 exont tartalmaz, a hatos kromoszóma rövid karján (6p21.3) helyezkedik el [75]. A gén átíródásának eredményeként öt különböző izoforma jön létre. Ezek az aminosav számban különböznek egymástól (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) [76].

Emlősöknél eddig a VEGF család 5 tagját ismerjük. Ezek a VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD és a placenta növekedési faktor (PLGF). Emlősökön kívül VEGF-hez hasonló szerkezetű protein található a parapox vírusban (VEGFE), valamint a kígyóméregben (VEGFF) is [77].

Mára már számos sejtből sikerült izolálni. A simaizomsejtek, az endotélsejtek, a trombociták, a leukociták és a makrofágok szintetizálják és szabadítják fel a megfelelő ingerek hatására [78]. A felszabadulását különböző citokinek, a NO, valamint az oxigénnyomás is befolyásolja [79, 80]. Az EGF, a TGF- β vagy a keratinocita

növekedési faktor jellegzetes induktorai a VEGF mRNS expresszióinak [81]. Az II₆ szignifikáns VEGF expressziót okoz a különféle sejtvonalakban [82]. Az IGF 1-et is kimutatták kolorektális karcinóma sejtekben, mint a VEGF mRNS-ét indukáló faktort [83]. A TSH is képes indukálni a VEGF expresszióját a különböző tiroid karcinóma sejtvonalaknál [84].

Három olyan tirozin-kináz receptort ismerünk, melyhez a VEGF kötödni képes. Az 1-es típusú receptor a monocita-makrofág rendszer kemotaxisát szabályozza. A 2-es típusú receptor felelős a VEGF sejtosztódást, érújdonképződést, permeabilitást és érátmérőt szabályozó hatásáért, mely utóbbi az általunk elvégzett tanulmányunk a fő témája [77, 85]. A 3-as típusú receptor a nyirokrendszer endotelsejtjeinek fejlődését és működését szabályozza [77, 85]. A receptorokhoz történő kötés után fejti ki a VEGF számos hatását, melyek közül párat az alábbiakban megemlítek. Az egyes területeken betöltött szabályozó szerepét részletesen a következő fejezetben tárgyalom.

A VEGF fokozza az endotelsejtek osztódását, elősegíti az érújdonképződést, részben az NO hatásán keresztül kitágítja az ereket és kb. 50000-szer hatásosabban növeli az erek permeabilitását, mint a hisztamin [85-97].

A VEGF fokozza a NO és a prosztaciklin (PGI₂) [98] szintézist, valamint gátolja a trombusképződést [99] és a simaizomsejtek proliferációját [100]. Felszabadulása fokozódik sebgyógyulás, tumor növekedés, hipoxia és endotoxinok okozta heveny gyulladás esetén [78, 85, 101, 102]. A VEGF szérumszintje szignifikánsan megnő különböző daganatok kezelése esetén és lezajlott infarktus után is, mivel a VEGF és a 2-es típusú receptora mind a daganatok növekedéséhez elengedhetetlen, mind pedig az ischémia hatására kialakuló érújdonképződésben fontos szerepet játszik [102-106]. Azok az ágensek, melyek blokkolják a VEGF jelátviteli folyamatokat, mint például a ZM323881, ami a 2-es típusú VEGF receptor szelektív inhibitora, a különböző onkológiai vizsgálatoknál ígéretesnek bizonyultak a daganatterápiában [85, 107-111]. Ugyanakkor más betegségekben, ahol az érellátási, illetve a keringési zavar dominál (pl.: ischémias szívbetegség), maga a VEGF jöhet szóba, mint terápiás eszköz [112].

Érújdonképződés egészséges fogínyben is történik, de fogínygyulladás fennállásakor jóval fokozottabban zajlik [113, 114]. A VEGF nem csak a gingivitisz létrejöttében, de a krónikus parodontitisszé való progressziójában is fontos szerepet játszhat az érhalózat

expanzióján keresztül [93, 95, 115, 116]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a VEGF-nek kulcsfontosságú szerepe van a parodontális mikrocirkuláció szabályozásában mind egészséges, mind kóros körülmények között. Emiatt azok a kísérleti kutatások, amelyek a 2-es típusú VEGF receptor lokalizációjával, funkcióival és más molekulákkal (pl.: NO) végbemenő interakcióival foglalkoznak, új terápiás utakat nyithatnak mind a szöveti atrófia, mind a parodontitisz elleni harcban.

2.7.6.1. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor izoformái

Mint az az előző fejezetben már tárgyalásra került, emlősökben eddig a VEGF 5 családját izolálták, melyeknek az aminosav szám függvényében számos izoformája ismert [77].

A VEGF-et termelő sejtek eltérő mértékben expresszálják a különböző izoformákat. A VEGF 121-es izoformája a lépben, a vesében és a tüdőben, a 145-ös izoformája a méhlepényben, a 165-ös az agyban és a vesében, a 189-es a szívben és a tüdőben, míg a 206-os izoforma, amely a legritkább, elsősorban a méhlepényben fordul elő [117-119].

A natív VEGF bázikus karakterű, ECM-hoz kötött molekula [71]. A VEGF 121-es izoformája enyhén savas karakterű, gyengén kapcsolódik az ECM-hoz, ezért a sejtekből szabadon szecernálódik [75]. A VEGF 145-ös izoformája a 6-os exon által kódolt, enyhén bázikus karakterű protein. A VEGF 165-ös izoforma a 145-ösnél bázikusabb karakterű, a 7-es exon által kódolt fehérje. Szekrécióját követően 30-40%-ban sejt, illetve ECM-hoz kötött formában marad, amiért a heparin-szulfát proteoglikánokkal való interakciója tehető felelőssé [120]. A VEGF 189-es, illetve a 206-os izoformái mind a 6-os mind a 7-es exon által kódolt formák, ezek a legbázikusabb karakterűek. Nagy affinitással kötődnek az ECM fehérjéihez, ezért szinte teljes mértékben ECM-hoz asszociáltan fordulnak elő [75]. Az ECM-hoz kötött VEGF izoformák raktárt képeznek, melyből heparin, heparán-szulfát, heparináz, plazmin vagy plazminogén aktivátor hatására felszabadulhatnak [75].

A különböző VEGF izoformák diszulfidhidakkal stabilizált homodimerek formájában aktívak. A VEGF heterodimerek biológiailag inaktívak [121].

2.7.6.2. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor biológiai hatásai

- A VEGF hatása a vaszkulogenezisre:
Egerekben végzett knockout vizsgálatok igazolták a VEGF és a VEGFR-ok jelenlétének fontosságát az embrionális vaszkulogenezisben [122, 123]. A VEGF gén inaktiválása, már heterozigóta formában (VEGF +/-) is az állatok korai, a 11-12. embrionális napon bekövetkező elhullásához vezet [124]. A VEGF heterozigóta knock-out embriók fejlődése visszamaradott, számos fejlődési rendellenesség figyelhető meg rajtuk. A kardiovaszkuláris rendszer fejletlensége mellett szembetűnő az egerek idegrendszeri alulfejlettsége is [122].
Homozigóta VEGFR1 knockout egerek már az embrionális fejlődés 8-9. napján elpusztulnak. Ezekben az állatokban az endotélsejtek kialakulása ugyan zavartalan, de a sejtek nem formálnak ereket, és bizonyos esetekben a hemopoetikus őssejtek fejlődése is károsodott [122]. Érdekes módon a PLGF gén inaktiválása nem vezet embrionális pusztuláshoz, még homozigóta állapotban sem. A homozigóta PLGF -/- egerek életképesek és termékenyek, habár némi sebgyógyulási zavar megfigyelhető náluk [125]. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a különböző VEGF családoknak nincs egyformán fontos szerepe az érfejlődésben és a túlélésben.
- A VEGF hatása az angiogenezisre egészséges és tumoros szövetekben:
Az angiogenezis egy többlépcsős folyamat, amelynek az eredményeként új véredények keletkeznek a már meglévő erekből. Angiogenezis során különböző stimulusok (hipoxia, citokinek, mechanikai stressz, stb.) hatására az endotélsejtek olyan enzimeket (mátrix-metallo-proteázok) termelnek, amelyek elbontják a bazális membránt, ezáltal a sejtek folyamatos proliferációval és migrációval új ereket formálnak [126]. Ebben a folyamatban számos egyéb növekedési faktor is szerepet játszik, de a legfontosabb proangiogén tényező a VEGF. Ez a mechanizmus játszódik le az egészséges szervezetekben is az átépülési folyamatok kapcsán (pl.: menstruációs ciklus, sebgyógyulás), ugyanakkor daganatos megbetegedésekben is elengedhetetlen a tumorok egy minimális méreten túli növekedéséhez [126].

Már régóta ismert, hogy a tumorok méretének növekedésével párhuzamosan nő a tumorok érzéketlensége is. Algire és mtsai. 1945-ben megfigyelték egereknél, hogy a tumorok növekedését mindig megelőzi azok érellátásának a növekedése. Ebből arra következtettek, hogy a gyors daganat-növekedés a gazdag vaszkuláris hálózat kifejlődésétől függ [127]. 1971-ben Folkman úgy gondolta, hogy az angiogenezis gátlása megfelelő stratégia lehet a szolid tumorok gyógykezelésében [128].

Az angiogenezis gátlásán alapuló tumorkezelés csak két évtizeddel a kezdeti tanulmányokat követően, a 90-es évek végén került be az orvosi köztudatba [129, 130]. Számptalan potenciális angiogenezist gátló célpont ismeretes, mégis a VEGF ellen irányuló kezelés jelentette az első gyógyszeres lehetőséget, ugyanis ez a faktor mutatja a legszorosabb összefüggést a tumorprogresszióval [129, 130]. Kutatási eredmények azt mutatják, hogy a daganatok a fejlődésük korai szakaszában szorosabb összefüggésben állnak a VEGF-vel, mint a későbbi progressziójuk során, ezért a VEGF-ellenes kezelés hatékonyságának növelése érdekében fontos a daganatok minél korábbi felismerése [129, 130]. A VEGF-ellenes kezelés több úton is megvalósulhat. Irányulhat maga a VEGF molekula ellen, illetve a VEGFR-ok ellen is.

Jelenleg a világon a legelterjedtebb angiogenezist gátló szer a humanizált, rekombináns technológiával előállított monoklonális ellenanyag (bevacizumab /Avastin®/) [129, 130]. Ez a terápiás szer az érújdonképződés legfontosabb molekuláris elemét, a VEGF-A-t gátolja azáltal, hogy specifikusan kötődik hozzá, és így megakadályozza a VEGFR-hoz való kötődését [129, 130]. Klinikai vizsgálatok tanúsítják, hogy a konzervatív antitumor terápiát VEGF-ellenes terápiával kiegészítve mind a nem kissejtes tüdődaganatos [131], mind pedig a kolorektális daganatos betegek túlélése javul [132].

- A VEGF hatása az erek permeabilitására:

A VEGF-et eredetileg, mint az erek permeabilitását hatékonyan és gyorsan fokozó faktort írták le, és vaszkuláris permeabilitási faktornak nevezték [133]. A fokozott érpermeabilitás közvetítésében jelentős a VEGFR2 szerepe. Stacker és mtsai. kimutatták, hogy mutáns VEGF hatására nem fokozódik az erek permeabilitása, mert a kóros molekula nem képes kötődni a VEGFR2-hoz [134]. Számos in vivo kísérlet igazolja, hogy a NO, illetve a PGI₂ részt vesz a VEGF érpermeabilitást fokozó

hatásának közvetítésében. Az eNOS-t gátló L-NAME, illetve a COX-gátló indometacin, jelentősen csökkenti a VEGF indukálta érpermeabilitást [98].

A VEGF fokozza a veziko-vakuoláris sejtorganellumok (VVO) jelenlétét is. A VVO egy olyan sejtorganellum, amely kapcsolatot létesít az endotélsejtek érlumen felőli és az azzal ellentétes, abluminális oldala között, biztosítva ezáltal a plazmafehérjék transzportját [135].

- A VEGF sejtproliferációs hatásai:

A knockout egereken végzett, korábban ismertetett kutatások kimutatták a különféle VEGF családok, valamint a VEGFR-ok fontosságát a kardiovaszkuláris, hemopoetikus és a limfatikus rendszer fejlődésében [122, 123]. A VEGF sejtproliferációs hatását számos szignáltranszdukciós út biztosítja. A VEGF hatására aktiválódó mitogénaktivált protein kinázok (MAPK1 és MAPK2) fokozzák az endotélsejtek osztódását. A VEGF hatást a MAPK inhibitor, a PD98059 teljesen felfüggeszti [136].

- A VEGF hatása a sejt migrációra:

Az endotélsejtek migrációjának, ezáltal az angiogenezisnek fontos előfeltétele a bazálmembrán degradációja [137]. A VEGF hatása az endotélsejtek migrációjára több úton érvényesül. Az endotélsejtek különböző aktiváló faktorok, többek között a VEGF hatására az angiogenezis kezdeti fázisában MMP-okat valamint zselatináz A-t termelnek, melyek a kötőszöveti elemek lebontásáért felelősek, ezáltal szabaddá téve az utat az endotélsejtek migrációjának [138].

A VEGF fokozza a FAK foszforilációját, aminek következtében az enzim aktiválódik [139]. Az aktív FAK központi szerepet játszik a sejtek adhéziójában, az aktin filamentumok szerveződésében, ezen keresztül pedig a sejt migráció folyamatában [140]. Egyre több az adat, melyek szerint a VEGF a NO-on keresztül fejti ki migrációs hatását, ugyanis a NO elősegíti a FAK foszforilációját [141, 142].

- A VEGF antiapoptotikus hatása:

Az apoptózis a sejtek program szerinti pusztulása, mely nagyon fontos része a szöveti homeosztázis fenntartásának. Az emlős sejtekben az apoptózisnak két fő jelátviteli útja van, a mitokondriális és a halálreceptor út. A VEGF az apoptózis mechanizmusát azáltal

gátolja, hogy felfüggeszti az apoptózis effektor molekuláinak, egyes kaszpázoknak a működését. A kaszpázok igen specifikus proteázok, melyek a sejtek legkülönbözőbb alkotóit képesek hasítani. A VEGFR2-ának aktiválódása stimulálja a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) működését, mely aktiválja az antiapoptotikus kinázt (Akt). Az Akt a kaszpáz-9 gátlásán keresztül fejt ki az antiapoptotikus hatását [143]. Emellett a VEGFR aktiválódása következtében megemelkedik a FAK szintje is, amely még erősebben fokozza a sejtek túlélését. A VEGF-nek a sejtek túlélését elősegítő hatását elsőként a retina endotélsejtjein igazolták [144], majd humán vénás köldökzsinór endotélsejteken [145], valamint a vesetubulusok epitél sejtjein [146] is megfigyelték.

A VEGF hosszú távú antiapoptotikus hatását a Bcl- 2, illetve a Bcl-2 kapcsolt fehérje, az A1 szintézisének fokozásán keresztül is kifejti [144].

- A VEGF hatása a NO és a prosztaciklin szintézisre:

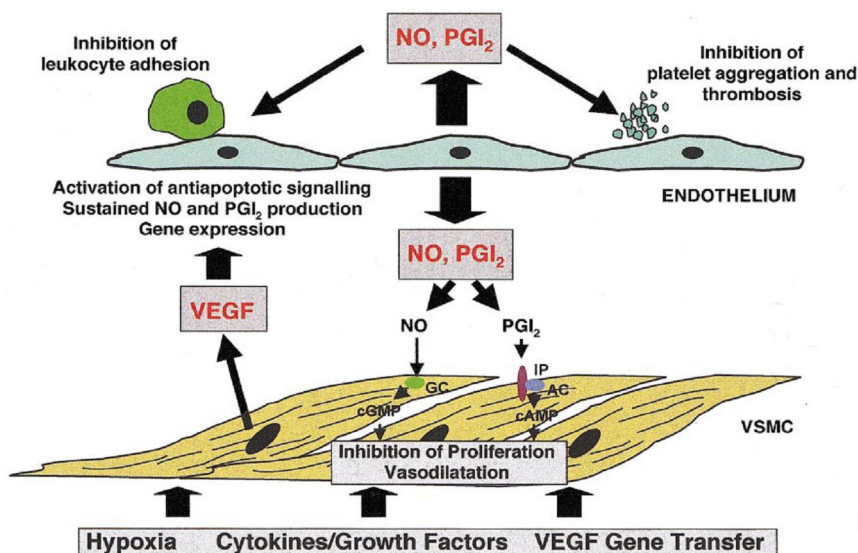
A VEGF fokozza a NO és a PGI₂ szintézisét, valamint azok sejtekből való felszabadulását [98]. Egyúttal a NO és a PGI₂ a VEGF számos biológiai hatását is közvetíti. Jól ismert a NO és a PGI₂ a vazodilatációt fokozó hatása, ám emellett mindkét molekula számos vazoprotektív hatással is rendelkezik (7. ábra). Gátolják a VSM sejtek proliferációját, a trombociták aggregációját, valamint a NO akadályozza a leukociták interakcióját az endotéliummal. Mindemellett szerepük lehet a VEGF angiogenezist és vazopermeabilitást fokozó hatásának a közvetítésében is.

A VEGF számos mechanizmuson keresztül befolyásolja a NO, illetve a PGI₂ szintézisét, valamint azok endotélsejtekből való felszabadulását. A VEGF bekötődésével aktiválódik a G-protein kapcsolt receptor. A jeltovábbítás eredményeként keletkező IP₃ fokozza a Ca²⁺ kiáramlását a szarkoplazmatikus retikulumból, ezáltal növelve a plazma Ca²⁺ koncentrációját. A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció aktiválja az eNOS működését, a NO termelését. A VEGF ezen az útvonalon a NO szintjének gyors és rövid ideig tartó növekedését okozza.

A VEGF egy másik szignáltranszdukciós útvonalon, az Akt aktiválásán keresztül foszforilálja az eNOS-t, és ezáltal egy hosszan tartó, Ca²⁺ független NO felszabadulás történik.

A VEGF-nek a DAG – PKC – ERK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozó szerepe van a citoplazmatikus foszfolipáz A₂-ből történő PGI₂ szintézisben. A VEGF hatására

megnövekedett citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció nemcsak az eNOS működését aktiválja, hanem egyúttal fokozza a PGI_2 endothélséjtekből való felszabadulását is [97].



7. ábra

A VEGF vazoprotektív hatásának mechanizmusa [97]

A VSM sejtek VEGF termelését számos tényező szabályozza. Ilyenek a különböző citokinek, növekedési faktorok, vagy pl. a hipoxia. A stimuláló tényezők hatására termelődő VEGF a receptorához kapcsolódva fokozza az endothélsétek NO és PGI_2 termelését. A VSM sejtekben a NO hatására nő a cGMP, a PGI_2 hatására pedig a cAMP szintje. Ezek a másodlagos messenger molekulák felelősek a vazodilatációért, valamint az antiproliferatív hatásért. A NO és PGI_2 a VSM sejtekre kifejtett hatásukon kívül gátolják a trombociták aggregációját, ezáltal a trombusképződést, valamint a NO megakadályozza a leukociták endothélhez való adhézióját. Ezek a folyamatok együttesen protektív hatást fejtenek ki az erekre [97].

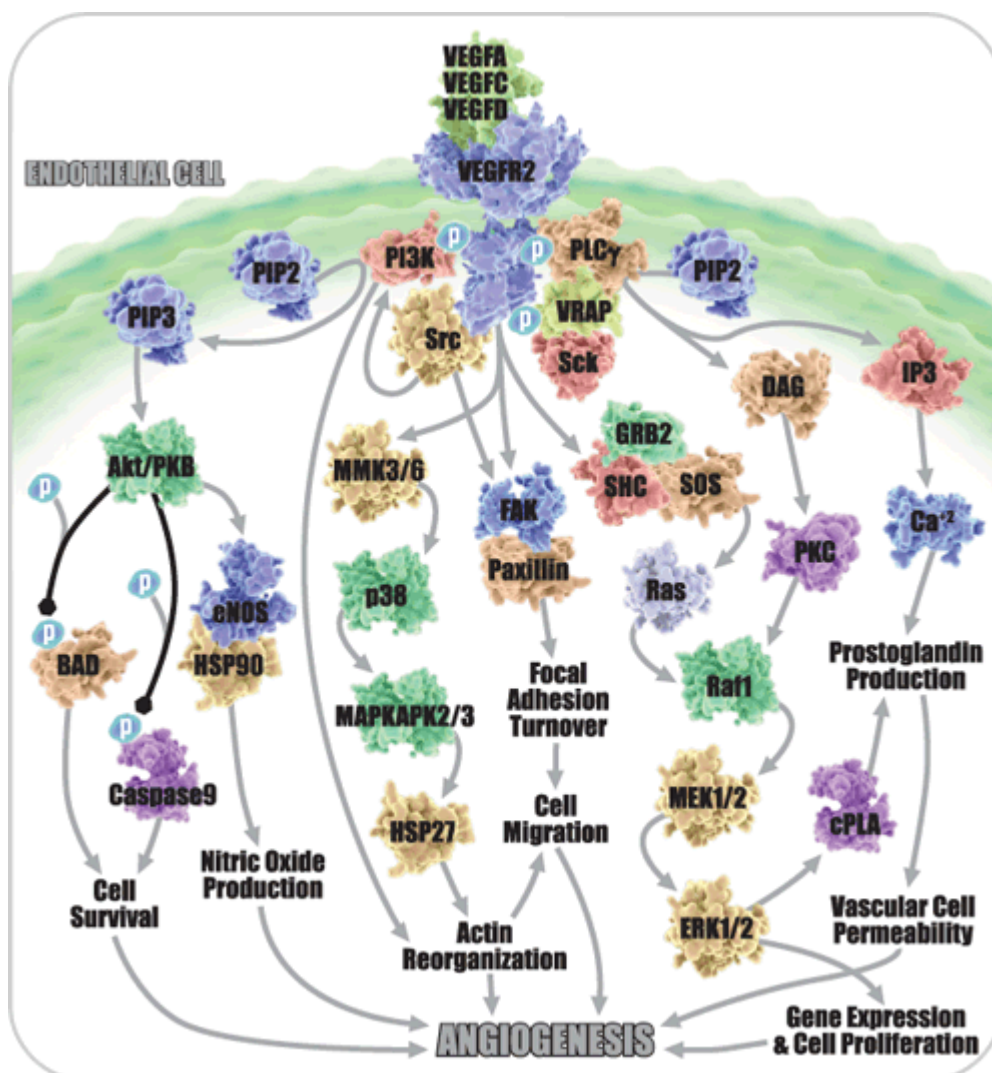
2.7.6.3 A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptorai

Jakeman és mtsai. autoradiográfiás vizsgálatokkal nagy affinitású VEGF kötőhelyeket találtak magzati és felnőtt patkányok szöveteiben a nagy és kis erek endothéliumán egyaránt. A VEGF kötődés nem csak az osztódó, hanem a nyugalomban lévő sejteken is észlelhető volt [147, 148].

Emlősöknél eddig 5 VEGF családot írtak le, melyek tirozin-kináz enzimaktivitású plazmamembrán receptorhoz kapcsolódnak. Ezek a VEGFR1, VEGFR2 és VEGFR3 [77, 85]. A receptorok közös jellemzője, hogy a nagyméretű extra- (N-terminális) és intracelluláris (C-terminális) régiót egyetlen transzmembrán hélix köti össze.

A receptoraktivitás első lépése a dimerizáció-oligomerizáció, amelyet jellemzően az agonista ligand kötődése indukál. A növekedési faktor receptoroknál a tirozin-kináz már az aktiváció előtt is a molekula integráns része [77, 85].

A növekedési faktorok jellemző jel továbbitási útja a Ras/Raf/MAP kináz útvonal. A jel továbbitási út első lépéseként a dimerizációt követően az integráns tirozin-kináz autofoszforylálja az intracelluláris lánc tirozinjait, amelyek kötőhelyet alakítanak ki az egyik SH₂-domén protein, a Grb₂ számára. Az SH₂-domén proteinek közös jellemzője, hogy komplementer kötőzsebeket tartalmaznak a receptoron kialakított foszfortirozin formációk felismerésére. A kötött Grb₂-t a saját receptor tirozin-kináza szintén foszforylálja, és a ledisszociált Grb₂-foszfát aktiválja a Ras egységet GDP/GTP cserével. Az aktivált Ras aktiválja a Raf egységet. A Raf egység egy szerin/treonin kináz lánc első tagja, amelyek mindegyike foszforylációval aktiválja a következő jel továbbitó elemet. A lánc utolsó tagja a MAP-kináz, amely foszforylációval egy vagy több transzkripciós faktort aktivál. Ez utóbbiak a génexpresszió kezdeményezésével számos sejtválaszt indukálhatnak (pl.: sejtosztódás) (8. ábra) [77, 85].



8. ábra

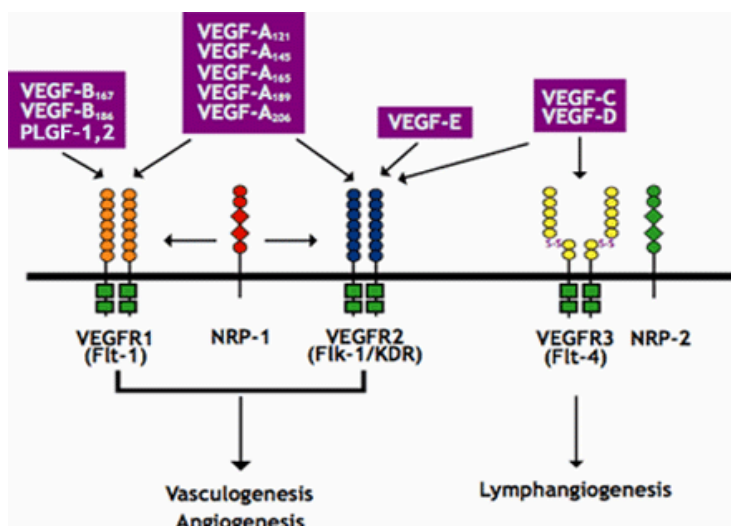
A VEGFR jelátviteli útja [149]

A VEGF a VEGFR-hoz kötődve elindítja az intracelluláris jelátviteli folyamatot, melynek eredményeként olyan változatos hatások jönnek létre mint az aktin újrendeződése, erek permeabilitásának fokozása, gén expresszió, sejtosztódás és végül angiogenesis [149].

A VEGFR1-hoz a VEGFA, B és a PLGF, a VEGFR2-hoz a VEGFA és E, míg a VEGFR3-hoz a VEGFC és D kötődik. A humán VEGFC és D proteolitikus emésztést követően képes a VEGFR2-hoz kapcsolódni, habár ezek a faktorok kisebb affinitással kötődnek a VEGFR2-hoz, mint a VEGFR3-hoz. A VEGFF a VEGFR1 és a 2 típusú receptorral is interakcióba lép (9. ábra) [150].

A VEGFR1-nak a VEGF iránti affinitása jóval nagyobb, mint a VEGFR2-é, ugyanakkor a tirozinkináz aktivitása csak a tizede a VEGFR2 aktivitásának [151].

A VEGF receptorait a különböző VEGF izoformákon kívül más növekedési faktorok is képesek aktiválni, ugyanakkor a VEGF is képes más RTK-hoz kapcsolódni (mint pl. PDGFR, EGFR) [152].



9. ábra

A VEGF és receptorainak interakciója [153]

A VEGF egyes izoformái eltérő affinitással kötődnek a különböző receptorokhoz és elindítják a jelátviteli folyamatokat [153].

A VEGFR1 a monocita/makrofág migráció pozitív szabályozója, illetve a VEGFR2 szignalizációjának pozitív és negatív regulátoraként is leírták már. A negatív szabályozás általa jön létre, hogy a VEGF a VEGFR1 variáns egyik alternatív szolubilis kötőhelyéhez kapcsolódik, ezáltal megakadályozva a VEGFR2-hoz való kötődését [85]. A VEGFR2-on keresztül jön létre a VEGF érendotélre kifejtett számos biológiai hatása úgy az egészséges, mint a patológiás szövetekben. Ilyen hatás például a korábban már említett ér permeabilitás fokozás, vagy az angiogenesis. A VEGFR3-on keresztül a VEGF részt vesz a nyirokerek fejlődésében és szabályozza a limfatikus endotélsejtek funkcióit [85].

Az utóbbi időben a különféle tumorok kezelésében előtérbe kerültek a neutralizáló hatású VEGF ellenes antitestek, valamint a kis-molekulasúlyú tirozin-kináz-gátlók, melyek a VEGFR-on hatnak. A tumorterápia új stratégiájában tehát fontos szerepet tölt be a VEGF szignáltranszdukciós útvonalának gátlása [129, 130].

3. Célkitűzések

Általános célkitűzésünk az volt, hogy a VEGF és VEGFR-2 gingivális venulák átmérő változásában szerepet játszó hatását vizsgáljuk ép és kóros körülmények között.

Tételeken:

1. A kontroll oldat (fiziológiás sóoldat) cseppentésének van-e hatása a fogíny venulák átmérőjére.
2. Különböző koncentrációjú VEGF hatásának vizsgálata a fogíny venulák átmérőjére egészséges ínyszövetben.
3. A VEGFR2 szelektív blokkoló (5-((7-benziloxiquinazolin-4-yl)amino)-4-fluoro-2-metil-fenol-hidrochlorid, ZM323881) hatásának vizsgálata önmagában a fogíny venulák átmérőjére és a VEGFR2 pontos lokalizációjának meghatározása a fogínyszövetben.
4. VEGFR2 szelektív blokkolása után adott VEGF hatásának vizsgálata.
5. A NO-szintáz gátló NG-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) előkezelés, és az előkezelés VEGF hatását befolyásoló vizsgálata a venula átmérő szabályozásában.
6. A VEGFR2 fogíny venula átmérőjének szabályozásában betöltött szerepének, mennyiségének és lokalizációjának vizsgálata kísérletes gingivitiszben.
7. Megvizsgálni a VEGFR2 szerepét a fogíny venula átmérőjének szabályozásában kísérletes diabétesz esetén, valamint mennyiségének és lokalizációjának pontos meghatározása ebben a kórképben.
8. A szöveti transzparencia növelése az erre a célra általunk fejlesztett, fiziológizált oldataink segítségével, valamint egy új, valós 3D vitálmikroszkópos eljárás kidolgozása.

4. Módszerek

4.1. Kísérleti állatok

Az állatokon folytatott vizsgálatunk protokollját a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta (22.1/4268/003/2009). A kísérleteink során 107 db hím Wistar patkányt (300 ± 37 g) használtunk. Az állatok besorolása a vizsgálati csoportokba véletlenszerűen történt. Az állatok ínyére, az alsó metszőfogak melletti papilla incisívára 10 μ l-t cseppentettünk az adott vizsgálati csoportnak megfelelő testhőmérsékletre melegített oldatból.

A vizsgálati csoportok a következők voltak:

1. Kontroll csoport (n=7) – fiziológiás sóoldatot cseppentettünk az ínyre.
2. Különböző koncentrációjú VEGF oldatot (Recombinant Rat VEGF164, catalog #564-RV/CF, R&D Systems, Minneapolis, MN. 0,1; 1; 10; 50 μ g/ml; n=7 mindegyik koncentrációnál) cseppentettünk az ínyre a dózis-hatás görbéhez.
3. Ebben a csoportban a VEGFR2-t szelektíven blokkoló ZM323881-et (a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán szintetizálták) cseppentettünk (20 μ g/ml, n=7) [154, 155].
4. Ezeknél az állatoknál az ínyre először ZM323881-et (20 μ g/ml), majd 15 perc elteltével VEGF-et (50 μ g/ml) cseppentettünk (n=7).
5. Ebben a csoportban a vizsgálati állatokat (n=14) egy hétig folyamatosan NOS blokkolóval (L-NAME, CAS #51298-62-5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.; 1 mg/ml az ivóvízben, ad libitum) előkezeltük [156]. Az állatok egyik felénél (n=7) a fogínyére VEGF-et (10 μ g/ml), a másik felénél (n=7) pedig fiziológiás sóoldatot cseppentettünk.

6. Ebben a csoportban a vizsgálati állatok felénél (n=7) ligatúrával és kompozit blokkal 1 hét alatt experimentális gingivitiszt hoztunk létre. A csoport másik fele (n=7) nem kapott előkészítést és kontrollként szolgált. A vizsgálat elvégzésekor mindkét csoportban az állatok ínyére a VEGFR2-t szelektíven blokkoló ZM323881-et cseppentettünk (20 µg/ml).

7. A vizsgálati állatok felénél (n=7) ebben a csoportban is előkezelést végeztünk, 6 héttel vizsgálatunk előtt iv. streptozotocinnal (85882 Fluka ≥98.0% (HPLC) N-(Methylnitrosocarbamoyl)-α-D-glucosamine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diabétesz mellitust indukáltunk. A csoport másik fele (n=7) nem kapott előkészítést és kontrollként szolgált. A vizsgálat elvégzésekor az állatok ínyére ZM323881-et cseppentettünk (20 µg/ml).

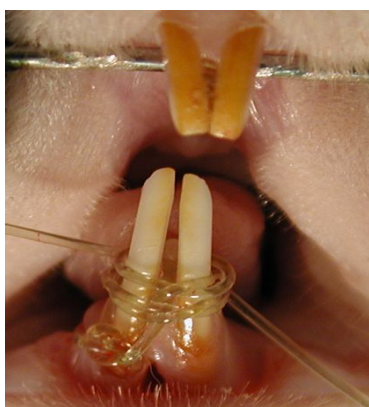
8. Az ebben a csoportban szereplő vizsgálati állatokat (n=16) az általunk fejlesztett és a 4.6 fejezetben ismertetett átderítő oldatokkal kezeltük és teszteltük ez utóbbiak hatását *in vitro* az eltávolított szöveteken (harántcsíktolt izom, állkapocs alatti mirigy, vékonybél), valamint *in vivo* a valós három dimenziós (3D) vitálmikroszkópos rendszerünkkel.

4.2. Műtéti előkészítés, a vizsgálat menete

A vizsgálati állatokat ip. Na-pentobarbital segítségével elaltattuk (Nembutal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 0,5 ml/tskg; 6 m/m%). Tracheostomia után tubust vezetünk be a szabad légutak fenntartása érdekében. Az alsó ajkat kifordítottuk és a kétoldali nyaki területhez varratokkal rögzítettük, hogy közvetlen rálátást nyerjünk a mandibula frontális területére. A bal oldali arteria femoralisba kanült helyeztünk a szisztémás vérnyomás méréséhez (Haemosys, Experimetria, Budapest). A rektális hőmérsékletet digitális hőmérő segítségével rögzítettük és a készülékhez csatlakoztatott elektromos hőpárnával, szervo-kontrollos visszacsatolással tartottuk konstansan. Transzmissziós fénymikroszkópot (Nikon SMZ-1B, Nikon, Tokyo, Japán, 72x-es nagyítás) használtunk az alsó metszők melletti labialis gingiva megfigyeléséhez. A jobb láthatóság érdekében a területet hidegfénnyel világítottuk meg (Intralux 5000, Volpi, Schlieren, Switzerland). Meghatároztuk a véráramlás irányát és ennek alapján kiválasztottuk a mérésekhez felhasználandó posztkapilláris venulát (átmérő: 25-60 μm). Minden esetben megpróbáltuk ugyanazt a karakteres eret vizsgálni, mely ezen a területen fordul a mélybe. Ezt a venulát a papilla incisiva csúcsa és az áthajlási redő között félúton lehet megtalálni. A vizsgálati anyagokat egy mikrofecskendő segítségével jutattuk az ér fölé (Hamilton syringe, Hamilton, Reno, NV), mely lehetővé tette rendkívül pontos adagok (10 μl) felszívását és kicseppentését. Annak érdekében, hogy a vizsgált területet a nyáltól izoláljuk, továbbá a vizsgálati anyag felhígulását elkerüljük, a szóban forgó részt mindig úgy állítottuk be, hogy a szájüregben belül ez legyen a legmagasabb pont. A kiválasztott venulát a mikroszkóphoz csatlakoztatott digitális fényképezőgépen (Nikon Coolpix 950, Nikon, Tokyo, Japan; 3x-os optikai nagyítás) keresztül figyeltük meg. Felvételeket készítettünk a vizsgálati anyag cseppentése előtt, majd a cseppentés utáni 1., 5., 15., 30. és 60. percben. A vizsgálati terület kiszáradását úgy előztük meg, hogy egyrészt a mérési időpontok között letakartuk ezt a régiót alufóliával, másrészt pedig az adott felvétel elkészítése előtt 1 perccel (kivétel az 1. perc, ami előtt ti. a vizsgálati anyag cseppentése történt a 0. percben) testhőmérsékletű fiziológiás sóoldatot cseppentettünk az érintett területre. Az erek külső átmérőjét számítógépes szoftver segítségével határoztuk meg (UTHSCSA ImageTool for Windows v3.00, The

University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX). Egy hitelesített 100 μm -es beosztású mércét használtunk a pixel értékek mikrométerre történő átszámításához. A kiértékelést végző személy (Gy. M.) előtt ismeretlen volt, hogy melyik csoportba tartozó képeket analizálja. A mérési hibák mennyiségének csökkentése érdekében a kiértékelést végző személy először a 100 μm -es beosztású mércén gyakorolt ugyanazzal a nagyítással, mint amit a vizsgálat során is használtunk. Az átlag és a SEM értékeket a mérce két beosztása között végzett 10 db, egymást követő mérés után számoltuk ki. A mérési technikát akkor tartottuk megfelelőnek, ha a SEM érték kisebb volt, mint 0,5.

A kísérletes gingivitiszes állatok (6. csoport, $n=7$) előkészítése annyiban tért el a fentebb vázoltaktól, hogy altatás után az alsó metszőfogak köré és közé a szájfenék átöltésével ligatúrát helyeztünk fel, melyet a vesztibulum felől hurkoltunk meg. Az így felhelyezett ligatúrára kompozit blokkot helyeztünk a plakkretenció fokozása érdekében (10. ábra). Egy hét elteltével a ligatúras állatok ($n=7$) ínyére ZM323881-et (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar) cseppentettünk a fent ismertetett módszer szerint. A diabéteszes állatoknál (7. csoport, $n=7$) 6 hetes iv. streptozotocin előkezelést követően vércukorszint meghatározást végeztünk. A továbbiakban a 20 mmol/l feletti vércukorszinttel rendelkező állatokat ($n=7$) vizsgáltuk, a többit kizártuk a vizsgálatból. Az állatok ínyére ZM323881-et cseppentettünk az ismertetett módszer szerint.



10. ábra

A gingivitisz experimentális előidézése ligatúrával és ligatúrára helyezett kompozit blokkal

4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az 1., 6. és 7. csoportnál négy-négy vizsgálati állatból eltávolítottuk a papilla incisívát és a kivett szövetdarabot 4 %-os paraformaldehidban fixáltuk. Az így nyert szövetdarabokat paraffinba ágyasztuk, majd ebből 12 µm vastagságú szeleteket készítettünk és ezeket tárgylemezre helyeztük. A metszeteket rehidráltuk és egy éjszakára szobahőmérsékleten nyúl eredetű VEGFR2 antitesttel reagáltattuk (VEGF Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, MA, hígítás: 1:20 0,01 M PBS segítségével). PBS-vel történő rövid öblítés után a metszeteket egy másodlagos antiszérummal kezeltük (1:50, Impress, Vector, Burlingame, CA.). Az immunreakciót a diaminobenzidin barna színű kicsapódása tette láthatóvá (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Kontrollnak a primer antitest vagy a szekunder antiszérum önmagában alkalmazva szolgált. Ezután a metszeteket hematoxilinnal megfestettük és fixáltuk (DePeX, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Fényképfelvételeket készítettünk a fénymikroszkóphoz csatlakoztatott fényképezőgép segítségével (Olympus Vanox, Olympus, Tokyo, Japán).

4.4. Western blot vizsgálat

A western blot analízis során a patkányoknál (1. (kontroll), 6. (kísérletes gingivitisz), 7. (kísérletes diabétesz) csoport) 3-3 vizsgálati állatból kimetszett gingivális szövetdarabot azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük. A lefagyasztott szövetmintát jégben hűtött lízis pufferben üveg homogenizálóval homogenizáltuk. A lízis puffer összetétele: 25 mM Trisz (pH 7,4), 1% NP-40, 100 mM NaCl, 4 mM EDTA, 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF, 1 mM DTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) kiegészítve 50xPIC proteáz-inhibitor koktéllal (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). A minták fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, USA). A szövetlizátumokat 1:1 arányban 2x Laemmli pufferrel kevertük, majd ezt a

keveréket 95°C-on 5 percig főztük. A mintákból azonos mennyiségű összfehérjét vittünk fel 8%-os poliakrilamid géltre (Biorad, a Hercules, CA, USA). A fehérjék elválasztására SDS-PAGE-t használtunk, majd a gél tartalmát nitrocellulóz membránra transzformáltuk (Biorad, Hercules, CA, USA). A transzformálást követően blokkoltuk a membránt, hogy megakadályozzuk a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat a membrán és az antitest fehérjék között. A blokkolásra 5%-os sovány tejpor oldatot használtunk. A blokkolást követően a membránt először a VEGFR-2 receptorra specifikus nyúlban termelt antitesttel inkubáltuk (VEGF Receptor 2 Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), amelyet faj specifikus HRP-vel kapcsolt másodlagos antitest (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) követett. A kialakult specifikus sávokat Amersham ECL rendszer segítségével tettük láthatóvá (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a GeneGnome detekciós rendszer felhasználásával (GeneGnome Chemiluminescent detection system, Syngene, Frederik, MD, USA).

4.5. Statisztikai analízis

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk W teszttel ellenőriztük, a kiértékelésnél átlag \pm SEM szerint számoltunk. További statisztikai vizsgálatot végeztünk kétutas (felhasznált vizsgálati anyag és a mérés időpontja), repeated measures analysis of variance (ANOVA) segítségével, majd az egyes csoportoknak megfelelően Fisher féle least significant difference (Fisher LSD), Tukey's HSD, illetve Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -re állítottuk. A vizsgálatot statisztikai programcsomag segítségével végeztük (SAS/STAT, software release 9.1.3., SAS Institute, Cary, NC).

4.6. Transzparens valós 3D intravitálmikroszkópia

4.6.1. Rövid áttekintés

Munkacsoportunk az eredetileg alkalmazott protokollal a mélyebben fekvő képleteket a gingiva hámjának és kötőszövetének optikai tulajdonságai miatt nem tudta megfigyelni. Szükségessé vált ezért egy új vizsgálati eljárás kidolgozása. Ennek első lépését képezte egy olyan anyag kifejlesztése, mely vitálmikroszkópiánál a vizsgált szövetbe diffundálva a képleteket átderíti anélkül, hogy megváltoztatná a biológiai folyamatokat és segítségével a mélyebb rétegekbe is betekintést nyerhetünk, továbbá egy olyan feljavított vitálmikroszkópos vizsgálati rendszer összeállítása is, mely valós 3D kiértékelést tenne lehetővé. Az érátmérő változások mérésénél, de akár a mindennapos fogászati képalkotó eljárásoknál is (fogászati kiströntgen) tudni illik gondot okoz, hogy a dimenzióvesztés miatt csak egy síkban tudjuk elvégezni a kiértékelést a vizsgálat közben készített felvételeken. Ennek gyakorlati jelentősége a kérdéses anatómiai viszonyok pontos feltérképezésében lenne (klinikai gyakorlatban pl.: gyökerek egymásra vetülése estén vagy gyökércsúcs és sinus kapcsolatának megállapítására, bölcsességfogak és az állkapcsi ideg viszonyának meghatározására). Kutatócsoportunkkal együttműködő, eredetileg fogorvos végzettségű kollégánk, dr. Stuber István (Semmelweis Egyetem, Sporttudományi Kar, 3D Morfológiai és Mozgáselemzési Labor) kidolgozott egy optikai rendszert, mely alkalmassá tesz gyakorlatilag bármilyen képalkotó eljárást (pl.: a vitálmikroszkópiánál használt sztereomikroszkópot, vagy a fogászati kiströntgent) arra, hogy 2 szögből sztereo képet, vagy videót rögzítsünk, majd ezeket a szinkron képeket, illetve videókat egy polarizált üveglapra vetítve 3D szemüveg segítségével az eddig két dimenzióban megfigyelt folyamatokat egyedülálló módon valós 3D-ben is rekonstruálni, majd kiértékelni tudjuk. A jelenleg elterjedt 3D-nek mondott rendszerek csak 2,5D-nek felelnek meg, mert csak

a térhatást keltő ábrázolásmóddal (pl.: árnyékolás) mutatják a teret, valamint a mérések 2D-ben történnek, ezért megkülönböztetésképpen hívjuk a saját rendszerünket valós 3D-nek. Egy további segédeszköz (sztereokonverter) használatával a nagyítást 5x-ösére tudjuk fokozni úgy, hogy a mélységélesség a megszokottól eltérő módon nem csökken. Az optikai nagyítás digitálisan még tovább fokozható a mikroszkópra szerelt, 2db nagyfelbontású Canon 500D fényképezőgéppel. A rendszerhez kifejlesztett szoftver segítségével a 3D képeken/videókon távolságméréseket is lehet végezni, a képletekre burkoló görbét lehet szerkeszteni. A kifejlesztett módszerhez immáron 2 szabadalmi bejegyzés is tartozik [156-158].

4.6.2. A szöveten belüli fényszórás geometriai alapjai

A szövetek transzparenciájának megnövelése szempontjából fontos probléma a sejtalkotók által okozott fényszórás minimalizálása a sejtalkotók térfogatának változtatása nélkül.

Problémát jelenthet a sejtalkotók nagy száma, jó példa erre a sejten belüli zsírraktározás. A lipideknek nagy a fénytörése a sejt plazmához képest, így szórják a fényt. Kérdés, hogy egy nagy sejten belüli zsírcsepp, vagy sok apró, de ugyanakkora mennyiségű zsírcsepp növeli-e meg jobban a fényszórást?

Ha az alábbi levezetésnél feltételezzük, hogy egyszerű fényszórásról van szó és a sejtalkotók között elég hely van, hogy ne alakuljon ki interferencia a különböző partikulumból érkező szórt fénynyalábok között, akkor választ kaphatunk a kérdésünkre. Vegyünk egy állandó térfogatot „V” és osszuk fel „N” számú „r” sugarú partikulumra. A teljes szórási keresztmetszet ebben az esetben:

$$C_{\text{total}} = N C_{\text{sca}} = N \pi r^2 Q_{\text{sca}}(r n_m / \lambda_{\text{vac}}, m).$$

Mivel,

$$V = 4N\pi r^3 / 3$$

$$N = 3V / (4\pi r^3),$$

Akkor ezt a képletet felírhatjuk így is,

$$C_{\text{total}} = 3V / (4 \pi r^3) \pi r^2 Q_{\text{sca}}(r_{\text{m}} / \lambda_{\text{vac}}, m)$$

$$= K_v Q_{\text{sca}}(r_{\text{m}} / \lambda_{\text{vac}}, m) / r$$

Ahol $K_v = 3V/4$, konstans.

A második probléma a sejt felszín fényszórásának a csökkentése. A sejt felszíne érintett a membrántranszportban, gáz és folyadékcsereben. Vegyünk egy állandó felületet („S”), és osszuk fel „N” számú egyenlő részre, amiknek a sugara „r”. Így a teljes szórási keresztmetszet:

$$C_{\text{total}} = N C_{\text{sca}} = N \pi r^2 Q_{\text{sca}}(r_{\text{m}} / \lambda_{\text{vac}}, m).$$

Mivel,

$$S = 4N\pi r^2,$$

$$N = S / (4 \pi r^2),$$

ebből következik, hogy a teljes szórási keresztmetszetet a sejt felszínére vonatkoztatva felírhatjuk az alábbi módon:

$$C_{\text{total}} = S / (4 \pi r^2) \pi r^2 Q_{\text{sca}}(r_{\text{m}} / \lambda_{\text{vac}}, m)$$

$$= K_s Q_{\text{sca}}(r_{\text{m}} / \lambda_{\text{vac}}, m),$$

ahol $K_s = S/4$, konstans.

Ez azt mutatja nekünk, hogy minél kisebb a fényszóró részecskék száma, annál kisebb a szórási keresztmetszete a szövetünknek és így a transzparenciát növelni tudjuk a szóró részecskék számának minimalizálásával [159, 160].

4.6.3. A transzparencia növelése

A szövetek transzparenciája vagy átlátszósága függ a szövet fényszórásától, jelen esetben Mie szórásról beszélhetünk, mivel a sejten belüli partikulumok, amelyek elsődlegesen felelősek ezért az effektusért, nagyobbak a látható fény hullámhosszánál illetve megközelítik azt [159, 161, 162]. A szövetek transzparenciájának megnövelése szempontjából fontos a sejtalkotók által okozott fényszórás minimalizálása a sejtalkotók térfogatának változtatása nélkül. A szöveten belüli Mie szórás fontos összetevője illetve okozója a sejtalkotók eltérő törésmutatója. Ha a sejtek homogén törésmutatóval rendelkeznek, csökken a fényszórás [159, 161, 162].

Ha csökkenteni tudnánk a sejtalkotók között fellépő törésmutató eltéréseket, azzal a Mie szórást is csökkenthetnénk, és így megnövelhetnénk a vizsgált szövetminta transzparenciáját.

Több anyagot is alkalmasnak találtunk a szövetalkotók törésmutatójának homogenizálására. Ilyen anyagok például a trietanolamin (TEA) vagy a dietanolamin (DEA).

Az alábbi táblázatban (1. táblázat) a különböző sejt- és szövetalkotók eltérő törésmutatóit soroltam fel. Láthatjuk, hogy 1,355 és 1,54 között változó értékekről van szó, és ekkora különbség már jelentősen növeli a fényszórást.

1. táblázat

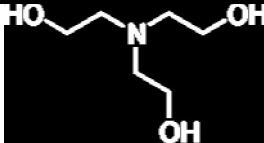
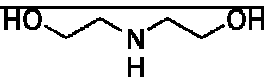

Sejt- és szövetalkotók törésmutatói

Sejtalkotó/szövetalkotó	törésmutató
Citoplazma	1,367
Sejtmembrán	1,46-1,54
Mitokondrium	1,40
intersticiális folyadék	1,355
kötőszöveti rostok	1,47

A trietanolamin, a dietanolamin, valamint a monoetanolamin (MEA) törésmutatója (2. táblázat) közel áll ezekhez az értékekhez, feltételezésünk szerint ezek az anyagok képesek bediffundálni a sejtbé annak minimális károsításával, az alacsony törésmutatóval rendelkező szövet és sejtalkotók törésmutatóit emelik, míg a magas törésmutatóval rendelkezőket csökkentik, így egymáshoz közelítve az értékeket, csökken a törésmutatókban fellépő különbség és ezzel csökken a fényszórás. Végül ez ahhoz vezet, hogy nő a kezelt szövetrészt transzparenciája.

2. táblázat

A trietanolamin (TEA), dietanolamin (DEA) és monoetanolamin (MEA) törésmutatója és kémiai szerkezete.

vegyület	törésmutató	szerkezet
trietanolamin (TEA)	N=1,484	
dietanolamin (DEA)	N=1,478	
monoetanolamin (MEA)	N=1,454	

Mind a TEA mind a DEA széles körben felhasznált vegyület. A TEA emulgeáló szer és felületaktív anyag a kozmetikai iparban, komplexképző vegyület a fotó laborokban. A DEA-t szintén alkalmazzák a kozmetikai iparban állagjavítónak és habzás szabályzóként. Ezen kívül felhasználgják az olajfinomításban a kénhidrogén eltávolítására.

Mivel ezeket az oldatokat *in vivo* szeretnénk alkalmazni, megpróbáltuk őket úgy megváltoztatni, hogy megfeleljenek az extracelluláris körülményeknek.

A kémhatásukat 7,4-re állítottuk be tejsavval és HEPES-el. Azért erre a két anyagra esett a választásunk, mert úgy találtuk, hogy a tejsav, ami biológiai szer segíti a transzparencia létrejöttét, a HEPES pedig jól pufferolja az oldatunkat.

Sókkal beállítottuk az ionkoncentrációkat (NaCl 135 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 1,5 mM; Glükóz 5 mM; MgSO₄ mM). Vas-kloriddal (20 mM) próbáltuk kiküszöbölni a komplex képző hatást, ami megzavarhatná a sejtjeink működését.

A fiziológizált oldataink törésmutatóit megmértük Abbe-féle refraktométerrel és megfelelőnek találtuk (3. táblázat).

3. táblázat

Felhasznált oldataink törésmutatója a fiziológizálás után.

Vegyület	törésmutató
fiziológizált TEA	n= 1,449
fiziológizált DEA	n=1,455
fiziológizált TEA-DEA keverék	n=1,461
fiziológizált MEA	n=1,441

Az oldatokkal patkányokból nyert harántcsíkt izom, állcsont alatti nyálmirigy és vékonybél szövetmintákat kezeltünk.

Szubjektív megfigyeléssel megállapítottuk az oldatok hatására bekövetkező transzparencia növekedést, de ennek számszerűsítésére a következő vizsgálati protokollt dolgoztuk ki.

Egyenlő vastagságú szövetminták nyeréséhez, saját módszert kellett kitalálnunk. A mintákat 1 ml-es fecskendőbe töltöttük majd lefagyasztottuk és úgy metszettünk belőlük 1 mm-es szeleteket. Ezeket a szeleteket elrendeztük a microplate-ben majd a vizsgált oldatokból 100-100 mikrolitert pipettáztunk rájuk és úgy mértük abszorbanciájukat az előzőleg meghatározott ideális hullámhosszon.

Az ideális hullámhosszt egy BMG FLUOstar Omega microplate reader-rel vizsgáltuk. Az optimalizált TEA oldattal kezelt microplate-be töltött minták abszorbanciáit 220-850 nm-es tartományban meghatároztuk 60 percen keresztül. A továbbiakban BIO-RAD 3550-UV microplate reader-rel 2 órás méréseket végeztünk a kiválasztott hullámhosszon (450 nm).

4.6.4. A valós 3D mikroszkópia

Az oldatok transzparenciájának növelésével lehetővé vált az erek lefutásának térbeli vizsgálata. Erre egy, a kutató csoportunk által épített sztereo mikroszkóp rendszer segítségével van lehetőség. A sztereo mikroszkópunk okulárjaira (Nikon SMZ-1B CMO sztereo mikroszkóp Tokyo, Japan) 15 megapixel felbontású digitális tükörreflexes fényképezőgépeket (Canon 500D) rögzítettünk, melyek videó felvételére is képesek. Mivel a sztereo mikroszkóp okulárjaiban a mikroszkóp lencse- és prizmarendszere segítségével sztereo-pár képződik, azt a fényképezőgépekkel rögzíteni tudjuk. A fényképezőgépekkel rögzített sztereo-párokat (függetlenül attól, hogy álló- vagy mozgóképek) egy-egy LCD monitorhoz (LG 22") továbbítjuk HDMI-kábelekkel. A monitorok egymással 90 fokos szöget zárnak be, és köztük egy félig áteresztő üveglap van, mind a két képernyőre 45 fokban. Polarizált 3D szemüveggel nézve az egyik képernyőt a féligáteresztő üvegen keresztül (melyen tükröződik a másik monitor képe) sztereoszkópikus képet látunk vagy más néven, valós 3D-ben látjuk és tudjuk rögzíteni a tárgyról készült nagyított képet. A rendszer által rögzített 3D képek méretbeli adatokat is tartalmaznak, melyből az x és y koordináták nagyságát a nagyítás és a pixelek száma alapján tudjuk kiszámolni. Az újonnan rögzítésre került harmadik dimenziót, a „z” koordinátát, a sztereo-pár egymáshoz viszonyított szögeltéréséből a fotogrammetria elvei alapján a rendszerhez tartozó, munkacsoportunk által (ld. 4.6.6. A mérőrendszer) fejlesztés alatt álló 3D kép kiértékelő program képes kiszámolni, voxelek alapján. A rendszer ezáltal alkalmas arra, hogy bármilyen valós 3D képet térben mérjünk. A jó minőségű képek készítéséhez megfelelő megvilágításra van szükség. Ezt ún. hideg fényvel oldottuk meg, hogy a vizsgált szövet hőmérsékletét ne befolyásoljuk. A berendezés két optikai szállal világítja meg két irányból a vizsgálandó felületet (Intralux 5000, VOLPI AG, CH-8952 Schlieren, Schweiz). A két okulár és a fényképezőgép közé beiktattunk egy sztereokonvertert is (11. ábra).



11. ábra

3D vitálmikroszkópos rendszer

A kép megtekintéséhez kérem használjanak piros-kék szemüveget (piros: bal szem, kék: jobb szem)!

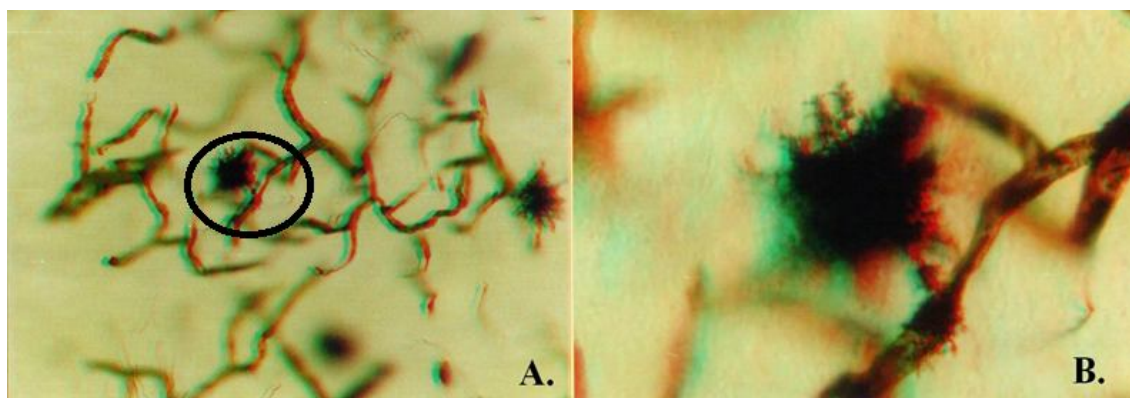
A rendszer részei: 2 db egymásra merőlegesen állított LCD monitor, közöttük velük 45°-os szöget bezáró speciális félig áteresztő üveglap, a sztereomikroszkóp okulárjaira adaptált 2 db nagyfelbontású fényképezőgép, a nagyítást 5x-ére növelő sztereokonverter, polarizált 3D szemüveg a kép térbeli megfigyeléséhez és egy 3D képkéértékelő program.

4.6.5. A sztereokonverter

A sztereokonverter dr. Stuber István által 20 éve feltalált optikai eszköz, mely képes a fénymikroszkópok nagyítását úgy az ötszörösére növelni, hogy közben a mélységélesség nem változik. Ismert probléma, hogy a fénymikroszkópok nagyításának növelésével a mintának az a tartománya, amit egyformán élesen láthatunk (mélységélesség) az okulárokon keresztül drasztikusan lecsökken. Ez egy példával szemléltetve azt okozza, hogy míg egy 10X nagyítású objektív mélységélesség tartománya 26 mikron, addig egy 50X objektívé csupán 1 mikron. A sztereokonverter segítségével a 10X nagyítású objektív nagyítása az ötszörösére növekszik, míg a mélységélesség tartománya 26 mikron marad.

A mélységélesség ilyen mértékű növelésére azért van szüksége az általunk fejlesztett rendszernek, mert a transzparencia növelésével, a mélyebb rétegekben is láthatóvá vált képletek lefutását így könnyebb nyomon követni és azokról valós 3 dimenziós képet készíteni.

Az alábbi felvétel jól demonstrálja a sztereokonverter segítségével történő képkészítés előnyeit (12. ábra).



12. ábra

A sztereokonverter hatékonysága

A kép megtekintéséhez kérem használjanak piros-kék szemüveget (piros: bal szem, kék: jobb szem)!

Az „A” és „B” képek Golgi impregnációval készült macska agy preparátum egyik Glia sejtjét ábrázolják. A felvételek ugyanazzal a sztereomikroszkóppal, 20x-os objektívvel készültek. A „B” képen a sztereokonverter bekapcsolt állapotban van, melynek hatására az „A” kép bekeretezett része további 5x-ös nagyítást kapott a mélységélesség változatlansága mellett.

A jobb és a bal szembe érkező képek külön kerültek rögzítésre, majd egy anaglif, piros-kék színkódolású sztereo kép készült belőlük. Az „A” képen a sztereokonverter használata nélkül kapott képet láthatjuk, a mélységélesség tartománya 8 mikron. A „B” képen a sztereokonverter csatlakoztatása után láthatjuk az „A” képen bekarikázott struktúrát. A nagyítás 100X-nak felel meg, a mélységélesség tartománya megmaradt 8 mikron [163].

4.6.6. A mérőrendszer

A háromdimenziós mérésekre egy, dr. Stuber István és dr. Korom Csaba (3D Morfológiai és Mozgáselemző Labor, Testnevelési és Sporttudományi Kar) által fejlesztett mérőrendszer segítségével kerülhet sor. A mérő-szoftver még fejlesztés alatt áll, de már ígéretes eredményeket értek el vele. Többek között a kriminalisztikai és régészeti felhasználását is kutatják.

A háromdimenziós mérőrendszer esetében a geodézia egyik ágazatának, a sztereofotogrammetriának (eddig szinte kizárólag térképészeti célra, a tereptől készült légi felvételek kiértékelésére használt) módszereit adaptálták mikroszkópos és makroszkópos tárgyakról készült sztereo-felvételek mérésére. A munkacsoport által kifejlesztett háromdimenziós számítógépes munkaállomás és a hozzá tartozó szoftver csomag alapján véve a geodéziában használatos optikai és finommechanikai kiértékelő berendezések működését szimulálja.

A rendszert alkotó műszaki berendezésekkel kapcsolatban a szerzők szabadalmi bejelentést tettek [164].

A tárgyról két nézőpontból készült sztereo képpárokat sztereoszkóppal (pl. anaglif szemüveg, polarizációs vetítőrendszer, geodéziai tükrös sztereoszkóp, stb.), valódi 3D látvány formájában jelenítik meg. A mérés során, a háromdimenziós látványon belül a kurzorok térben lebegő mérőjelként jelennek meg, melyek a program segítségével a virtuális térben szabadon vándoroltathatók, és a háromdimenziós struktúrák bármely pontjára ráültethetők. E művelet segítségével a sztereo-fotogrammetria elveit követve a

pont mélységi („z”) koordinátája kiszámítható.

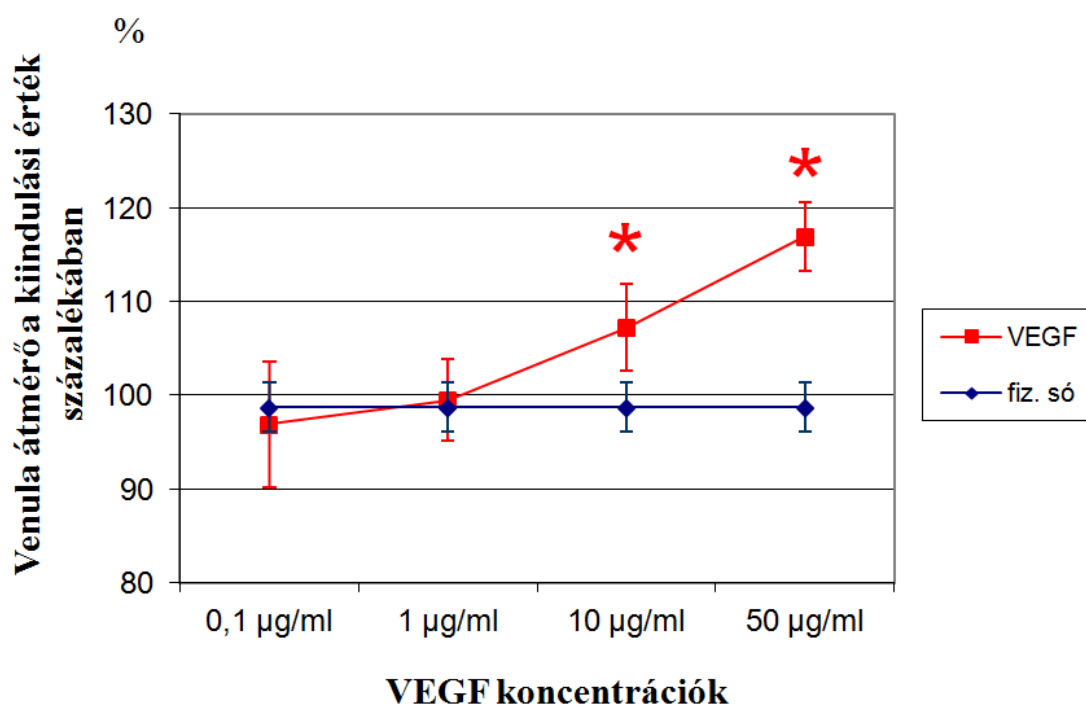
A mérések során nyert 3D ponthalmazokon matematikai elemzések és modellezések végezhetők, ill. azokat a számítógépes programok matematikai borítófelülettel vonhatják be, és háromdimenziós, árnyékolt "virtuális tárgyak" formájában jeleníthetik meg; ezeket az objektumokat forgathatják, mozgathatják, deformálhatják, azokból térbeli animációkat készíthetnek.

E programok egyik alapvető jellegzetessége, hogy szemléletmódjuk (mind a térbeli mérés, mind a háromdimenziós animáció esetében) alapvetően különbözik a ma már széles körben alkalmazott 3D grafikai szoftverekétől. A jelenleg elterjedt programok a térbeli felületeket túlnyomórészt síkban, a teret a perspektíva, az árnyékolás, a mozgatás ill. a műszaki életben elterjedt három képsíkos megjelenítés segítségével feltüntetve ábrázolják, s a felületeken végzett beavatkozásokat három képsíkban végzett műveletekkel hajtják végre.

A rendszer központi jellemzője, hogy a térbeli felületeket a számítógép képernyőjén az emberi térlátás elvét követve, két szög alatt, sztereo-párok formájában jeleníti meg, és a képeket különböző rendszerű sztereoszkópos berendezések segítségével valódi háromdimenziós (valós 3D) látvány formájában tünteti fel. A valódi, életszerű térbeli látvány nemcsak az előbbi módszerekkel megjelenített képekétől radikálisan eltérő pszichológiai hatást fejt ki, de jelentős plusz információt is hordoz, s emellett alapvetően eltérő lehetőségeket kínál a felületek kezelésének, manipulálásának terén is [164].

5. Eredmények

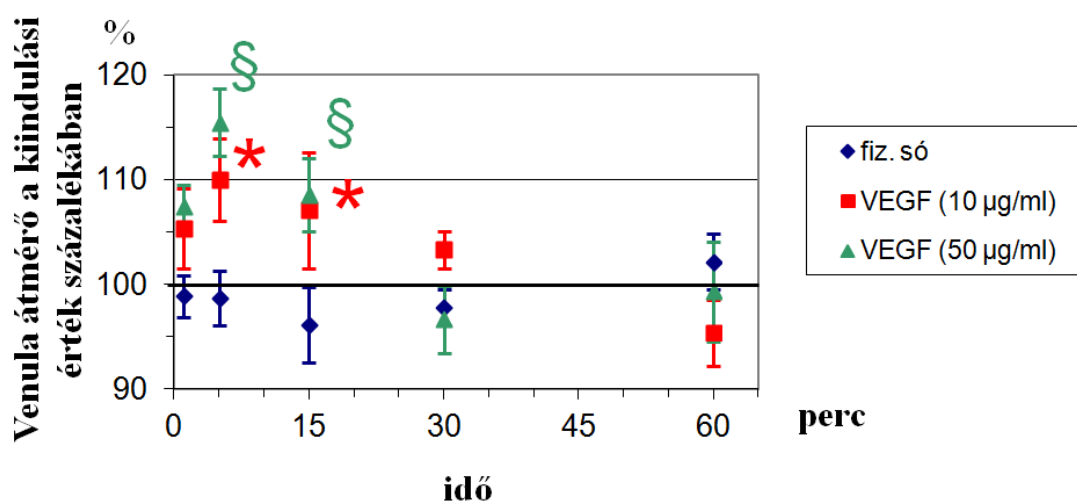
Egyik VEGF koncentráció sem, illetve ZM323881 oldat sem változtatta meg szignifikánsan a szisztémás vérnyomást (kiindulás: $125/85 \pm 8$ Hgmm). A vizsgálati protokollunkban meghatározott időszak alatt sem a fizioiógias-sóoldat, azaz a cseppentés önmagában (1. csoport), sem a VEGF 0,1 $\mu\text{g/ml}$ és 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldata (2. csoport) nem okozott szignifikáns érátmérő-változást. A 10 $\mu\text{g/ml}$ és 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú VEGF oldat viszont már szignifikáns venodilatációt hozott létre a cseppentést követő 5. és a 15. percben (2. vizsgálati csoport 13., 14. ábra).



13. ábra

A venulák érátmérő-változása a különböző VEGF koncentrációk függvényében (dózis-hatás görbe) a gingivában

Minden koncentráció esetén a legnagyobb változást mutató 5. perc adatait ábrázoltuk. Az anyag cseppentését követő 5. percben a 10 $\mu\text{g/ml}$ és 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú VEGF oldat szignifikáns venodilatációt hozott létre a kontrollhoz viszonyítva (* $p < 0,05$; Fisher LSD; átlag \pm SEM).

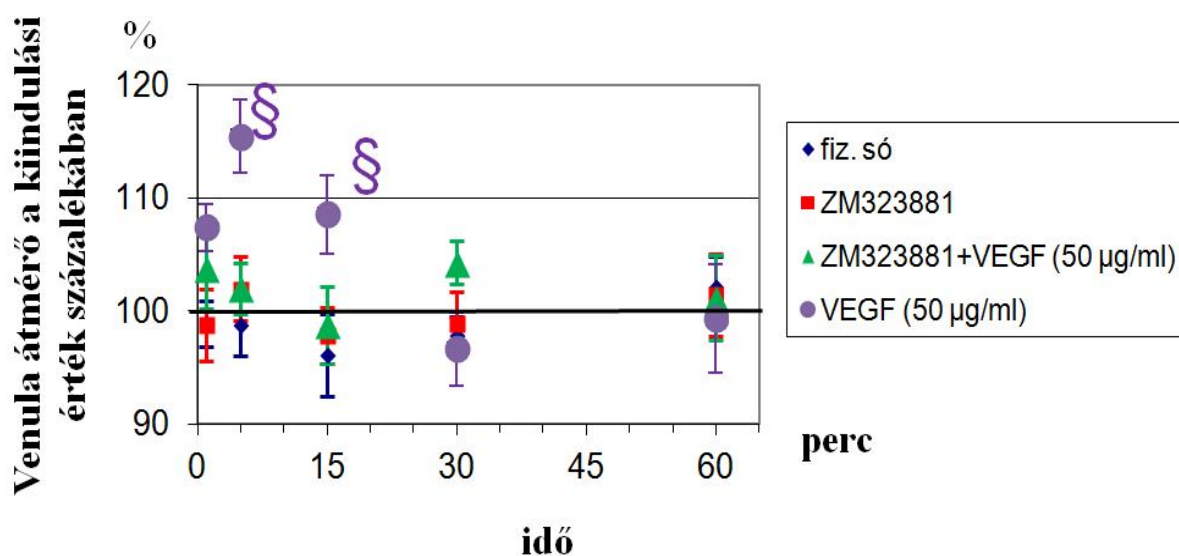


14. ábra

A VEGF alkalmazását követő venulaátmérő változás az idő függvényében a gingivában (n=7 a különböző koncentrációkban)

A VEGF oldatot az előzőleg kiválasztott venula megfelelő szakasza fölé cseppentettük. Mindkét koncentrációval szignifikáns vazodilatációt tapasztaltunk az applikálást követő 5. és 15. percben a kontrollhoz képest (*, § $p < 0,05$, a kontrollhoz képest; Fisher LSD; átlag \pm SEM).

A ZM323881 önmagában való alkalmazása (3. csoport) nem hozott létre szignifikáns változást a venulák átmérőjében (15. ábra). Ha a ZM323881-el történő előkezelést követően VEGF-et is cseppentettünk, szintén nem láttunk szignifikáns érátmérő-változást a VEGF hatására (4. csoport, 15. ábra).

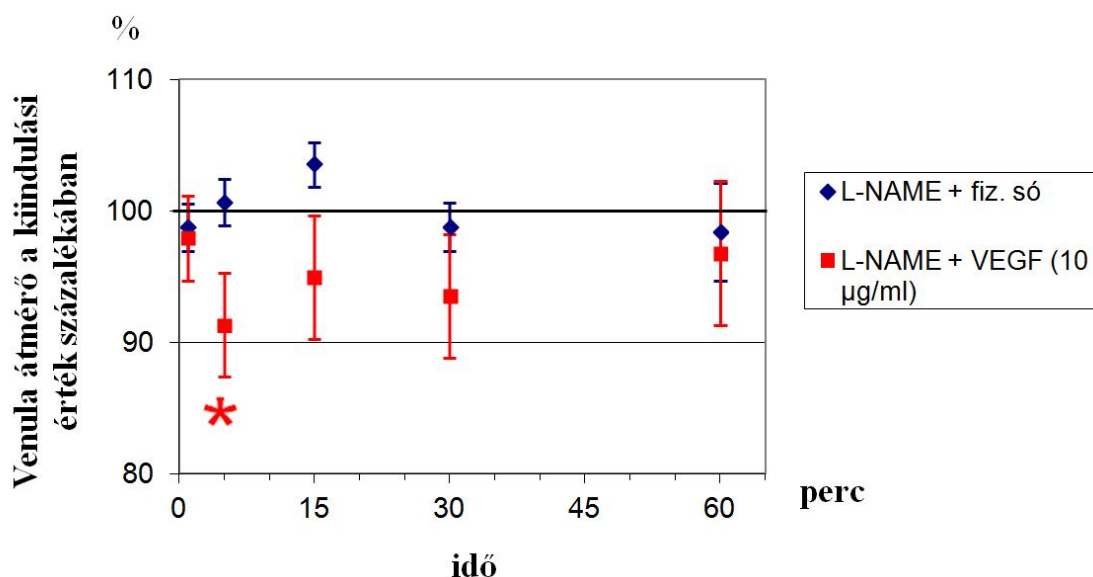


15. ábra

A VEGF blokkoló ZM323881 alkalmazását követő venulaátmérő-változás az idő függvényében a gingivában

Sem az önmagában alkalmazott VEGFR2 blokkoló ZM323881 (20 µg/ml), sem a ZM323881 alkalmazását követő VEGF (50 µg/ml) applikálás nem hozott létre szignifikáns érátmérő változást. Jól látszik a különbség a blokkolás nélküli VEGF cseppentéséhez képest, mellyel -a 14. ábrán szintén látható módon- az applikálást követő 5. és 15. percben szignifikáns vazodilatációt tapasztaltunk ($^{\S}p < 0,05$; Fisher LSD; átlag \pm SEM).

Az L-NAME-rel történő előkezelés (5. csoport) szignifikánsan megnövelte a szisztémás vérnyomás alapértékét ($155/120 \pm 12$ Hgmm), és csökkentette a venulák alapátmérőjét a kontrollhoz viszonyítva (35 ± 2 µm vs. 44 ± 2 µm). Az L-NAME előkezelést követően alkalmazott VEGF nem módosította a szisztémás vérnyomást. Az L-NAME előkezelés megakadályozta a 10 µg/ml koncentrációjú VEGF venodilatációs hatását (5. csoport, 16. ábra).

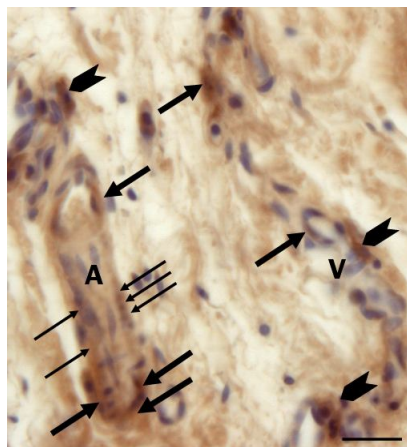


16. ábra

L-NAME-rel történő előkezelést követően a VEGF által kiváltott gingivális venulaátmérő-változás

Az állatokat ivóvizükben feloldott 1 mg/ml koncentrációjú NOS gátlóval (L-NAME) 1 héten keresztül előkezeltük, majd a fogínyre fiziológiás sóoldatot vagy 10 µg/ml koncentrációjú VEGF oldatot cseppentettünk. Szignifikáns vazokonstriktiót mértünk a VEGF applikálását követő 5. percben a kontrollhoz viszonyítva (* $p < 0.05$; Fisher LSD; átlag \pm SEM). Bár a 15. percben is vazokonstriktiót tapasztaltunk, statisztikailag azonban ez nem volt szignifikáns (t15: $p=0.0568$).

A gingivális arteriolák és venulák falában a VEGFR2 elleni antitest hatására gyenge immunpozitivitást tapasztaltunk. Immunreakció látható az erek endotéliumában, az érfal legbelső rétegében (17. ábra), ahol a sejtmagok párhuzamosan helyezkednek el az erek hossz tengelyével, ugyanakkor pontszerű immunjelölés látható az erek következő, muskuláris rétegében is.



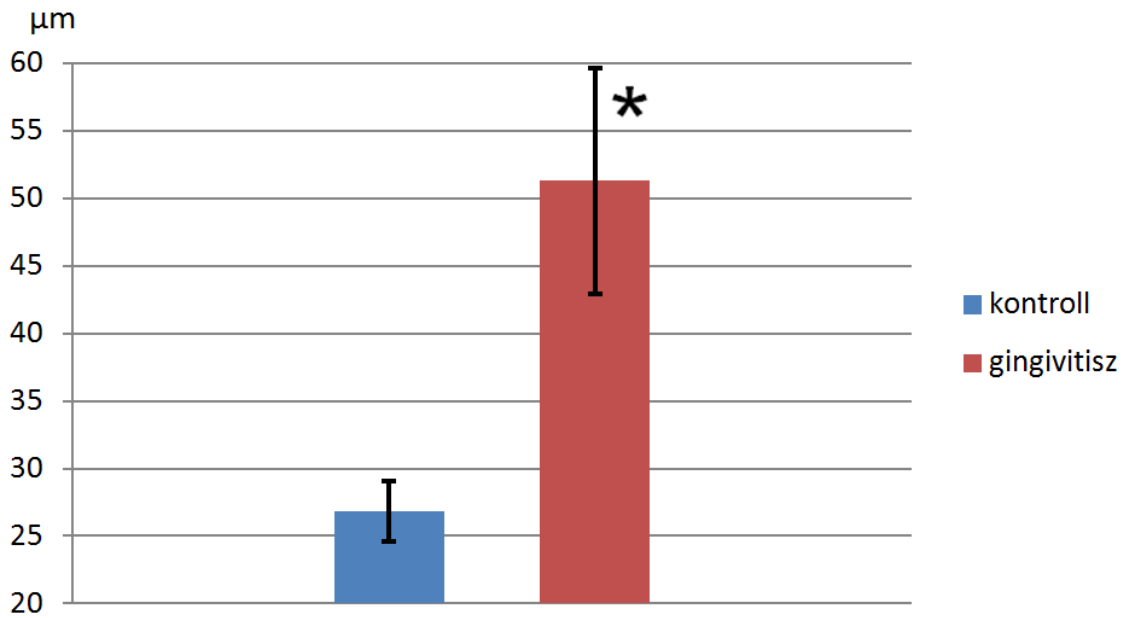
17. ábra

VEGFR2-nak lokalizációja patkány papilla incisívában

Immunhisztokémiai vizsgálattal kimutathatók a gingivális kiserek falában lévő VEGFR2-ok. A speciális festéssel jelölt endotélsejtek (hosszú, vastag nyilak) képzik az érfal legbelső rétegét, sejtmagjuk az ér hossz tengelyével párhuzamos rendeződést mutat. A középső rétegben a simaizomsejtek az immunfestés hatására pontszerűen ábrázolódnak (vékony nyilak), mivel a körkörös lefutásuk miatt a keresztmetszetük látszik. Néhány jelölt pericita is megfigyelhető az izomrétegen kívül (rövid, vastag nyílhegyek) A – kis artéria/arteriola, V – kis véna/venula, Mércse: 50 μ m

A kísérletes gingivitiszes (6. csoport) és diabéteszes (7. csoport) vizsgálataink során sem az alapbetegség, sem a lokálisan alkalmazott ZM323881 nem változtatta meg a szisztémás vérnyomást (alapérték: 125/85 \pm 8 Hgmm), viszont mindkét csoportban megnőtt a venulák kiindulási érátmérője a kontrollhoz viszonyítva (gingivitisz: 51 \pm 8 μ m vs. 27 \pm 2 μ m; diabétesz: 47 \pm 1 μ m vs. 28 \pm 2 μ m; 18., 19. ábra).

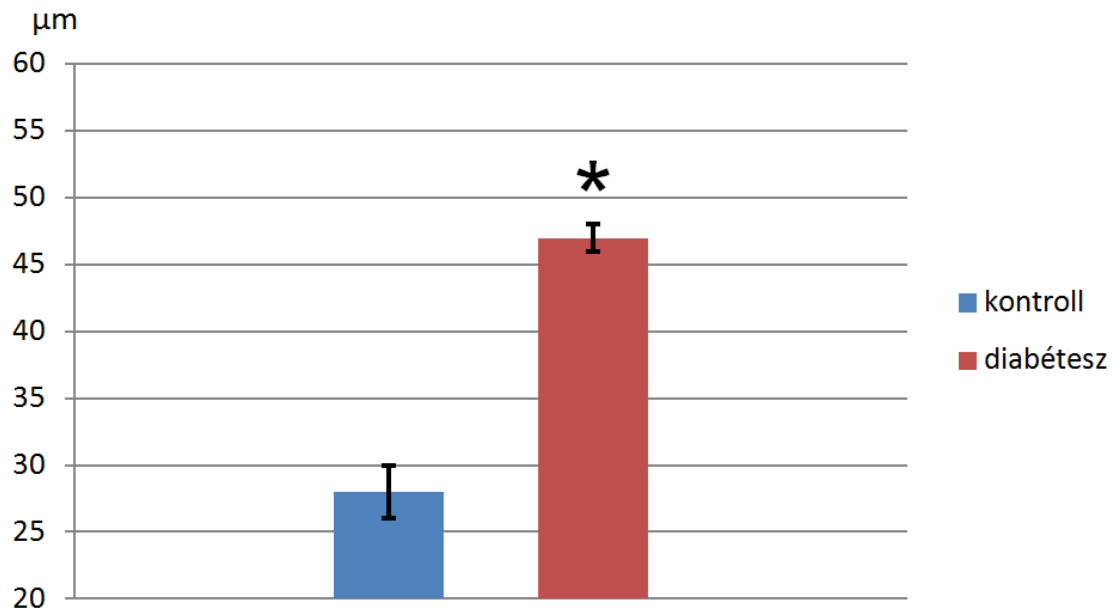
A gingivitiszes patkányok ínyére (6. csoport) lokálisan applikált VEGF blokkoló ZM323881 szignifikáns vazokonstriktiót hozott létre az 5., 15., 30., és a 60. percben, az egészséges fogínyú állatoknál mért adatokhoz képest (20. ábra).



18. ábra

A kiindulási érátmérő a kontroll és a gingivitiszes csoportban

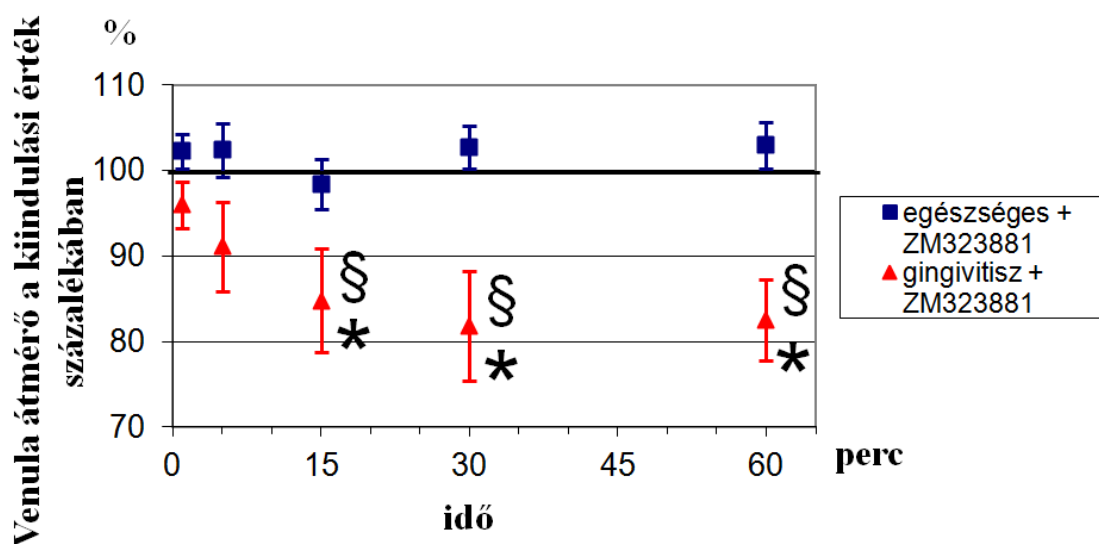
A gingivitiszes vizsgálatunk során a kiindulási érátmérő a kontroll csoportban $26 \pm 2 \mu\text{m}$, a gingivitiszes csoportban $51 \pm 8 \mu\text{m}$ volt. Ez alapján megállapítható tehát, hogy már a kiindulási érátmérő is szignifikánsan nagyobb volt fogínygyulladás esetén (* $p < 0.05$; Fisher LSD; átlag \pm SEM).



19. ábra

A kiindulási érátmérő a kontroll és a diabéteszes csoportban

A diabéteszes vizsgálatunk során a kiindulási érátmérő a kontroll csoportban $28 \pm 2 \mu\text{m}$, a cukorbeteg csoportban $47 \pm 1 \mu\text{m}$ volt (* $p < 0.05$; Tukey's HSD; átlag \pm SEM).

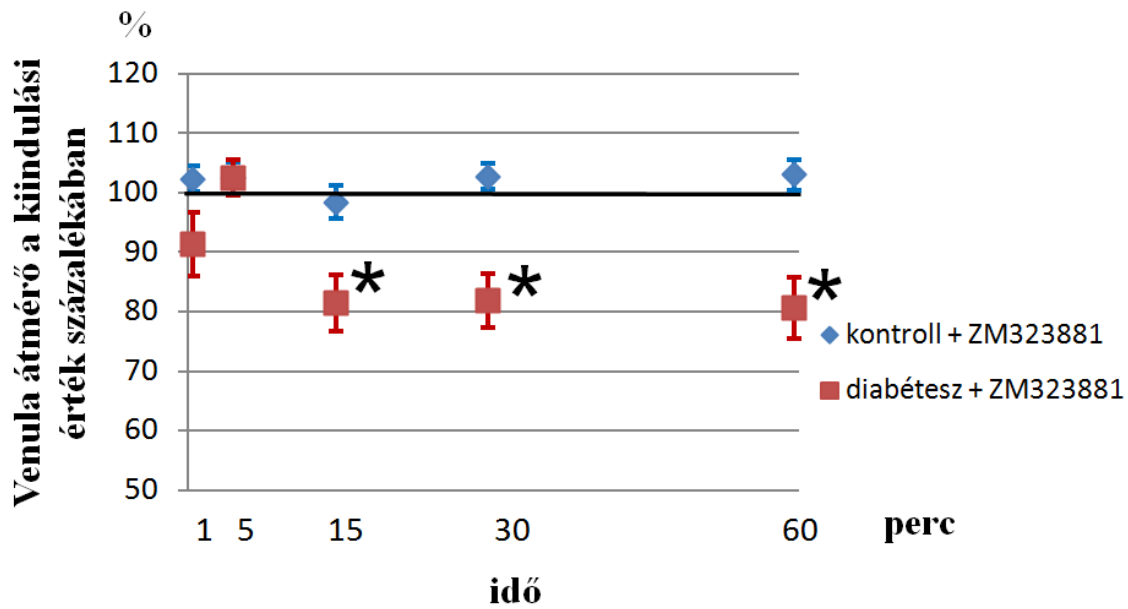


20. ábra

A VEGF blokkoló ZM323881 alkalmazását követő venulaátmérő-változás az idő függvényében gingivitiszes ínyben

A ZM323881 lokális alkalmazását követően a gyulladt íny venuláiban szignifikáns vazokonstriktiót figyeltünk meg az 5., 15., 30., és a 60. percben az egészséges fogínyű állatoknál mért adatokhoz képest (§ $p < 0,05$ a kiinduláshoz, * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; Fisher LSD; átlag \pm SEM).

A diabéteszes patkányok csoportjában (7. csoport) alkalmazott ZM323881 lokális hatására az ínyben szignifikáns vazokonstriktió jött létre a 15., 30., és a 60. percben a kiindulási értékhez viszonyítva (21. ábra).

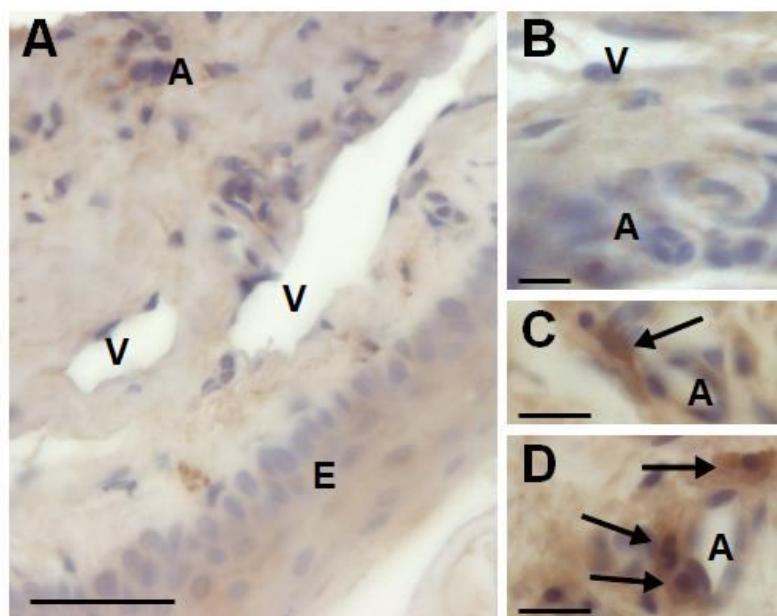


21. ábra

A VEGF blokkoló ZM323881 alkalmazását követő venulaátmérő-változás az idő függvényében diabétesz mellitusban szenvedő patkányok gingivájában

A ZM323881 lokális alkalmazását követően a diabétesz állatok inyében szignifikáns vazokonstriktiót figyeltünk meg a 15., 30., és a 60. percben, míg az egészséges állatok fogínyében nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni (* $p < 0.05$; Tukey's HSD; átlag \pm SEM).

A szemikvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink alapján gingivitiszben a VEGFR2 expresszió szignifikánsan megnőtt az erek falában, míg a kontroll csoport esetén nem (22. ábra A, B /személtető jellegű ábra a vizsgált területről/) vagy csak gyenge immunpozitivitást detektáltunk (22. ábra C, D /személtető jellegű ábra a vizsgált területről/).



22. ábra

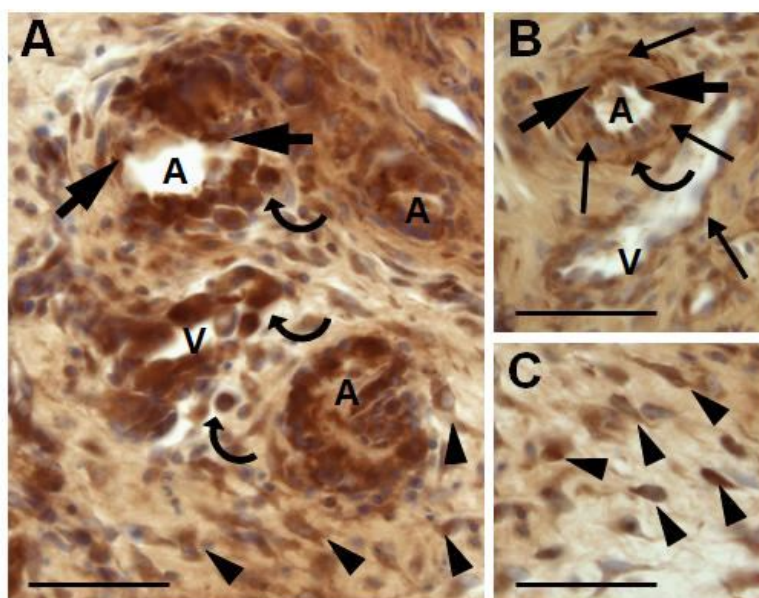
VEGFR2 immunhisztokémiai vizsgálata egészséges állatok ínyében

A kis vérerekben nem (a, b), vagy csak gyenge immunpozitivitást detektáltunk (c, d) Azonban egy-egy helyen halványan megjelölődött az endotélium, és néhány pericita is immunpozitivitást mutatott (nyilak). A szemikvantitatív analízist az összes minta alapján végeztük. Jelen ábra szemléltetőként szolgál.

A – kis artéria/arteriola, V – kis véna/venula, E – endotélium,

Mérce: 50 μ m az a és 10 μ m a b, c, d ábrán

Mindazonáltal egy-egy helyen ezeknél a kontroll metszeteknél is megjelölődött halványan az endotélium és néhány pericita is immunpozitivitást mutatott (22. ábra C, D). A ligatúrás állatokból kimetszett mintákban a szemikvantitatív vizsgálat alapján magas fokú immunreaktivitás mutatkozott mind az érfalban, mind az erek körüli területen. Az arteriolák és venulák mindegyik intramurális komponense VEGFR2 immunpozitivitást mutatott, beleértve a legbelső, endotélium réteget is (23. ábra A, B /szemléltető jellegű ábra a vizsgált területről/).



23. ábra

VEGFR2 immunhisztokémiai vizsgálata gingivitisben szenvedő állatok ínyében

A gingivitiszes állatok ínyéből kimetszett szövet nagyfokú immunpozitivitást mutat mind az érfalban, mind az erek körüli területen. Az arteriolák és venulák intramurális komponensei VEGFR2 immunpozitivitást mutatnak, beleértve a legbelső, endotélium réteget is (vastag nyilak; A, B), ahol a sejtmagok általában az ér tengelyével párhuzamosan helyezkednek el. Ehhez hasonlóan nagyfokú immunreaktivitást, helyenként pontszerű lerakódásokat tapasztaltunk az endotélium körüli simaizom rétegben (vékony nyilak; B).

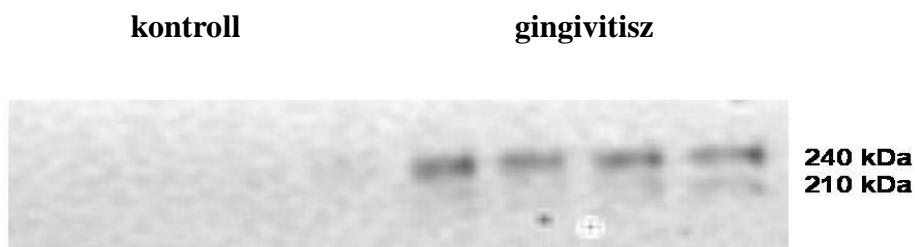
A simaizomsejtek keresztmetszetben láthatók (A, B). Az érfal mellett a pericitákon (görbe nyilak) kívül számos VEGFR2-re immunpozitív fibroblasztot is találtunk (nyílhegyek; A, C). A szemikvantitatív analízist az összes minta alapján végeztük. Jelen ábra szemléltetőként szolgál.

Mérce: 50 μ m

Ehhez hasonlóan nagyfokú immunreaktivitást, helyenként pontszerű lerakódásokat tapasztaltunk az endotélium körüli simaizom rétegben. A képen a simaizomsejtek keresztmetszetben láthatók (23. ábra A, B). A felvételen érdemes megfigyelni, hogy az érfal mellett a pericitákon kívül számos VEGFR2-re immunpozitív fibroblasztot is találtunk (23. ábra C).

A többi kontroll metszetben, melyeknél az elsődleges vagy a másodlagos antiszérumot használtuk nem tapasztaltunk immunjelölődést sem az arteriolákon, sem a venulákon. A western blot vizsgálat megerősítette ezeket az eredményeket, mivel a VEGFR2-re

jellemző 240 és 210 kDa-os sávoknál erős reakciót mértünk a kontrollhoz képest (24. ábra).

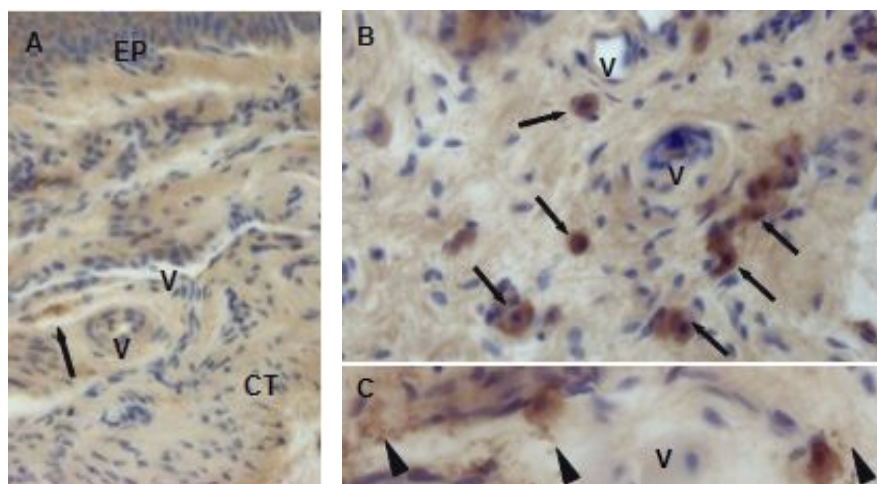


24. ábra

VEGFR2 western blot vizsgálat gingivitiszes fogínyénél

A sávokat Amersham ECL rendszer segítségével tettük láthatóvá a GeneGnome detekciós rendszer felhasználásával. A VEGFR2 specifikus 210 (szemiglikolizált, éretlen forma) és 240 kDa-os (teljesen glikolizált, aktív forma) sávjai markánsan megjelentek a kontrollhoz viszonyítva. A homogenizátumok fehérje koncentrációját az SDS-PAGE előtt megmértük és minden mintából azonos mennyiségű összfehérjét vittünk fel a különböző zsebekbe. A gél Comassie blue festésével ellenőriztük a transzfer sikerességét.

A diabéteszes állatokból nyert szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata alapján azt tapasztaltuk, hogy a VEGFR2 expresszió szignifikánsan megnőtt a venulák melletti hízósejtekben (25. ábra B, C) a kontroll csoporthoz képest, ahol nemhogy immunpozitivitást, de hízósejteket is alig találtunk (25. ábra A).



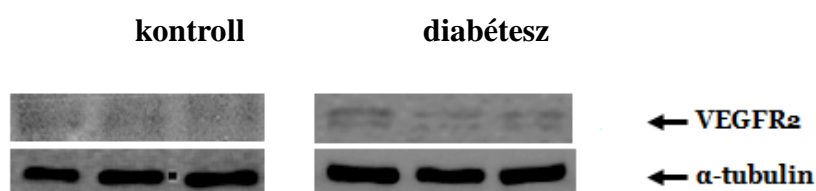
25. ábra

VEGFR2 immunhisztokémiai vizsgálata egészséges (A) és diabéteszes (B, C) állatok ínyében

A diabéteszes állatok ínyéből kimetszett szövet magas fokú immunpozitivitást mutatott, az erek mellett számos immunjelölt hízósejt látható (vékony nyilak; B, C). Egyes hízósejtek részben degranulálódtak, üresebbek (nyílhegyek; C). A kontroll csoportban lévő állatok gingiváján az érfalakban viszont csak egy-két immunpozitív sejt látható, az erek mentén pedig elvéve találhatunk egy-egy hízósejtet (vékony nyíl; A). Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye szerint a cukorbeteg csoportban szignifikáns VEGFR2 expresszió növekedés volt tapasztalható a venulák melletti hízósejteken.

V-ér, EP-endotél, CT-kötőszövet

Western blot analízisünk megerősítette ezt az eredményt, mivel a vizsgálat során a diabéteszes állatoknál kimutatható volt a VEGFR2-re jellemző sávozottság (26. ábra).

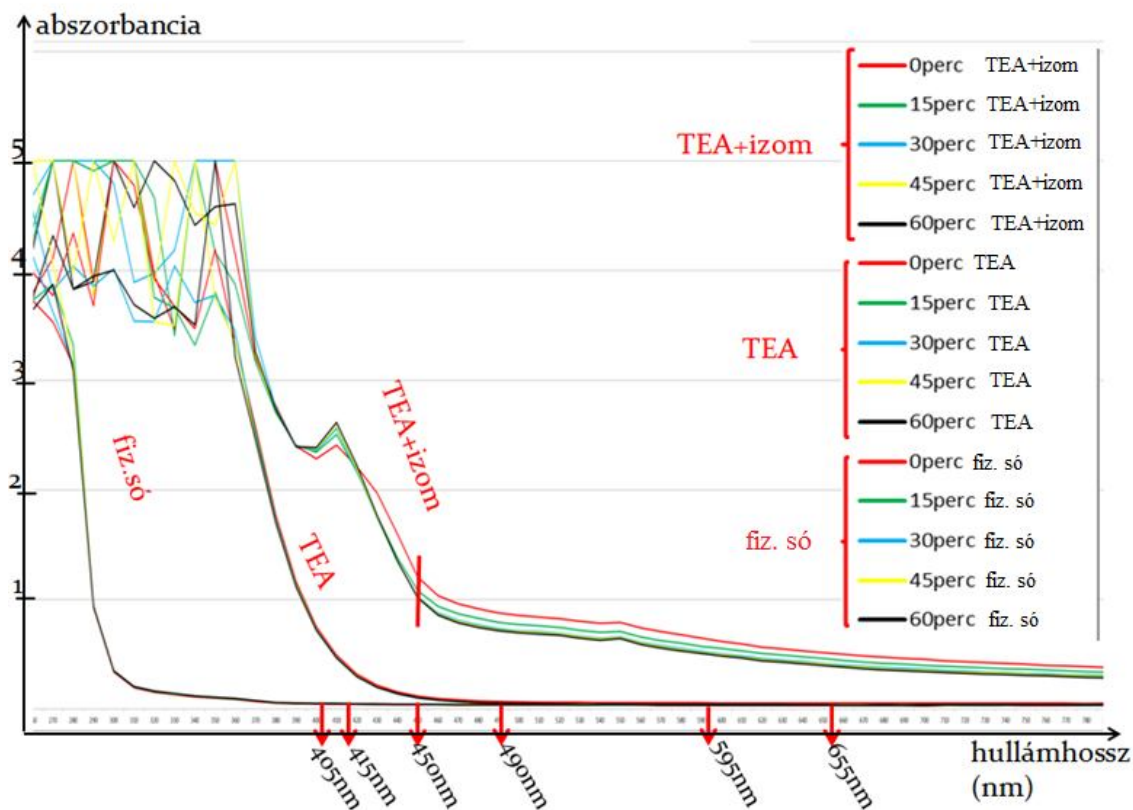


26. ábra

VEGFR2 western blot vizsgálat a diabéteszes patkány gingivájában

Diabéteszes állatokban magasabb VEGFR2 szintet mértünk a kontrollhoz képest. A minták fehérje telítettségének kontrollálására α -tubulint használtunk. Ugyanazon a gélen futattuk a kontroll és gingivitiszes mintákat is, a marker és molekulaméret alapján ugyanabban a pozícióban, de mivel más csoportok is futottak a gélen, ezért ezeket a könnyebb érthetőség kedvéért kivágtuk.

A szövetek átderítésére végzett vizsgálatunk során microplate reader készülék segítségével megállapítottuk, hogy 450 nm környékén van az a hullámhossz, melynek használatával már jól elkülönülnek egymástól az egyes időpontokhoz tartozó abszorpciós értékek (27. ábra).



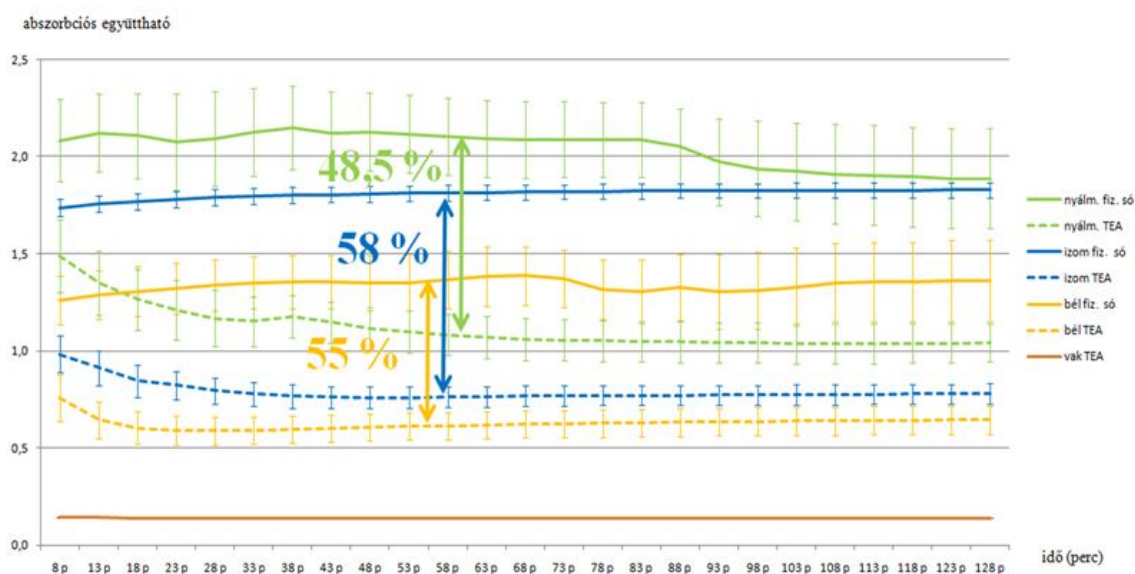
27. ábra

Abszorpciós spektrum

A hullámhossz függvényében láthatjuk az ábrán az abszorpció változását a különböző csoportoknál (TEA+izom, TEA, fiz. só), a mérési időpontoknak megfelelően (0, 15, 30, 45, 60 perc). Kb. 450 nm-nél szétválnak az egyes mérési időpontokhoz tartozó görbék.

A vizsgált szövetek (Wistar hím patkányokból kivett harántcsíkolt izom, állkapocs alatti mirigy, vékonybél) abszorpciójának változását a különböző oldatok hatására (TEA, TEA-DEA, MEA) 460 nm-re állított microplate readerrel mérve az alábbi eredményeket kaptuk. TEA esetén szignifikáns abszorpció csökkenést állapítottunk meg az izomszövetnél a kontrollhoz (fiziológias sóoldat) képest minden egyes mérési

időpontban. A bélnél a vizsgálat kezdetétől számított 13. és 88. perc között, majd a 103. és 123. perc között mértünk szignifikáns abszorpció csökkenést. A nyálmirigynél a 38. és 93. perc között lehetett ugyancsak szignifikáns abszorpció csökkenést detektálni (28. ábra).

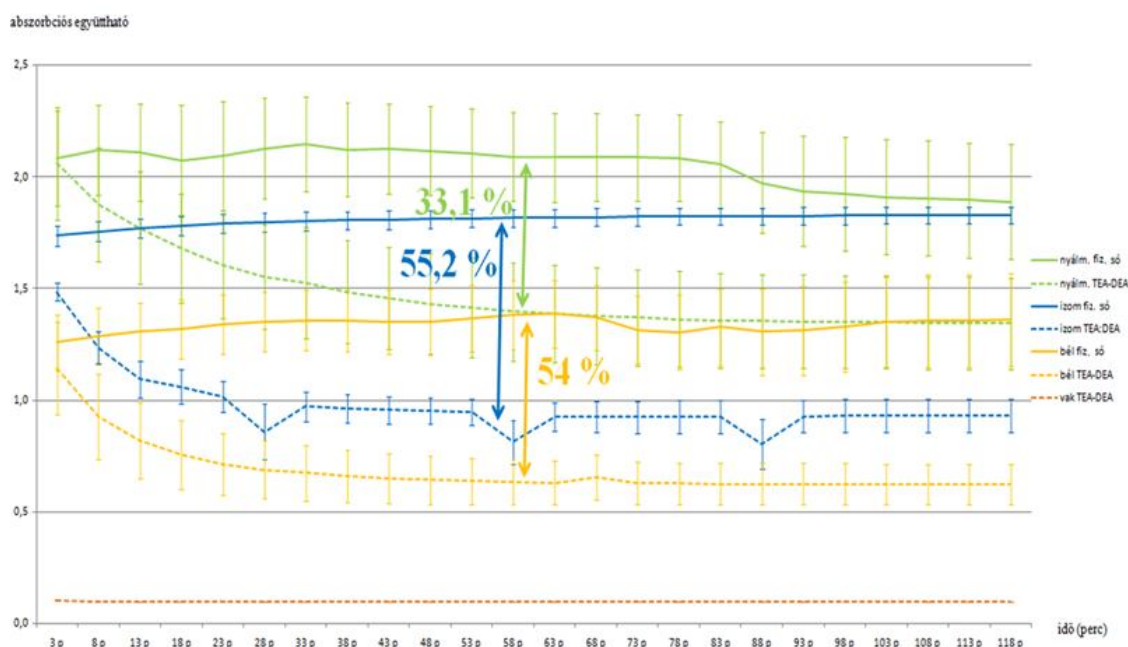


28. ábra

Szöveti abszorbanca változása TEA hatására

Az ábráról leolvashatjuk a kezelés adott időpontjához tartozó abszorpciós értékeket mind a vizsgálati, mind kontroll csoport esetében. Szignifikancia az izomnál: minden időpontban, a bélnél: 13.-88., majd 103.-123. percben; a nyálmirigynél: 38.-93. percben ($p < 0,05$; Bonferroni; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$)

TEA-DEA oldat esetén szignifikáns abszorpció csökkenést kaptunk az izomnál a 8. perctől kezdve végig. A nyálmirigynél és a bélnél statisztikailag nem mértünk ugyan szignifikáns abszorpció csökkenést, de a csökkenő trend megállapítható volt (29. ábra).

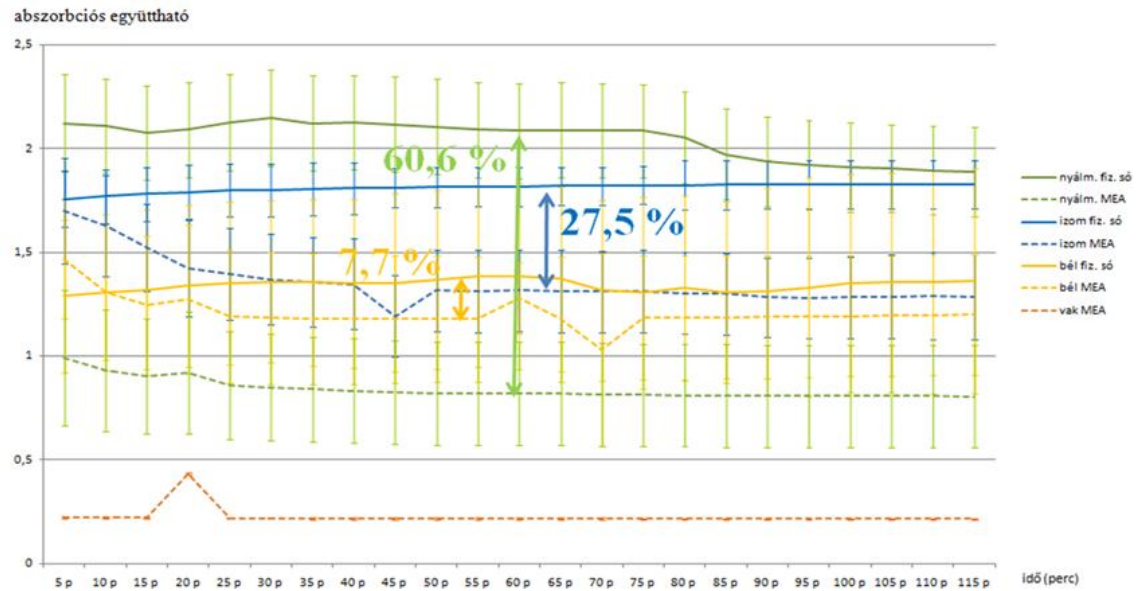


29. ábra

Szöveti abszorbancia változása TEA-DEA hatására

Az ábráról leolvashatjuk a kezelés adott időpontjához tartozó abszorpciós értékeket mind a vizsgálati, mind kontroll csoport esetében. Szignifikancia az izomnál: 8. perctől kezdve végig, a nyálmirigynél: n.s., a bélnél: n.s. ($p < 0,05$; Bonferroni; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$)

MEA alkalmazásánál a nyálmirigynél minden egyes mérési időpontban szignifikáns abszorpció csökkenést tudtunk megállapítani. Izom esetén a 40. perctől kezdve végig szignifikáns abszorpció csökkenést mértünk. Bélnél nem kaptunk statisztikailag szignifikáns csökkenést az abszorpcióban (30. ábra).

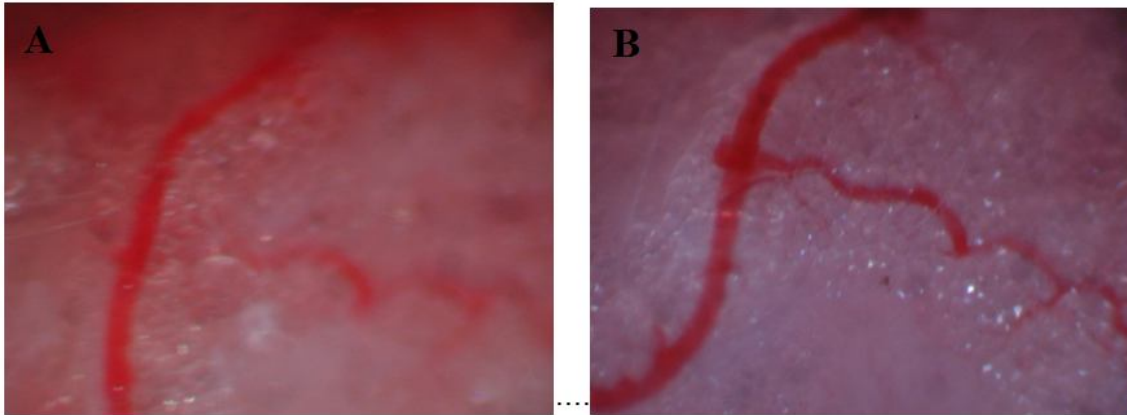


30. ábra

Szöveti abszorbania változása MEA hatására

Az ábráról leolvashatjuk a kezelés adott időpontjához tartozó abszorpciós értékeket mind a vizsgálati, mind kontroll csoport esetében. Szignifikancia a nyálmirigynél: minden időpontban, az izomnál: 40. perctől kezdve végig, a bélnél: n.s. ($p < 0,05$; Bonferroni; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$)

A fiziológizált TEA oldatunkkal végzett előkísérlet során látványos transzparencia növekedést kaptunk a vizsgált fogínyszövetben (30. ábra).

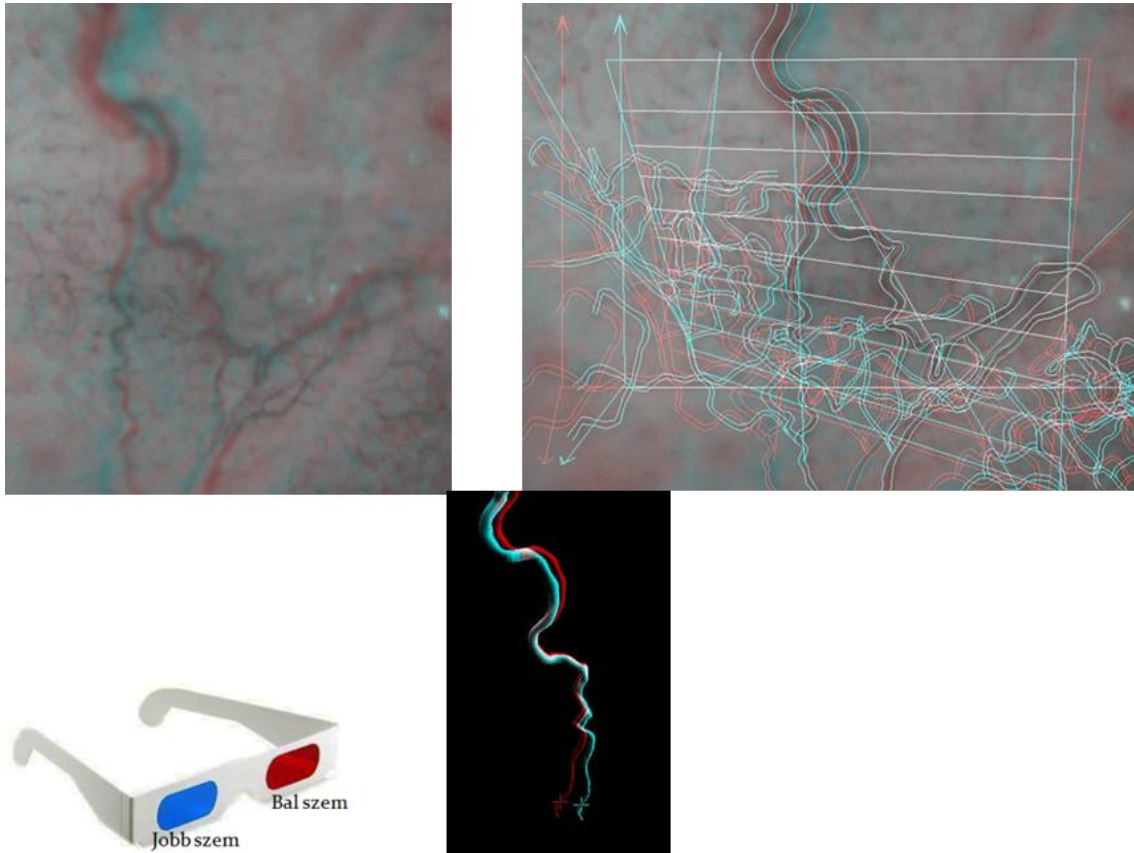


31. ábra

TEA átderítő hatása

A két képen ugyanaz a patkány gingiva részlet látható optimalizált TEA kezelés előtt (A), illetve az oldattal való kezelés után 1 órával (B). A transzparencia növekedése szembevetendő.

Az új, valós 3D vitálmikroszkópos rendszerünk segítségével térbeli rajzolást végeztünk a korábban csak 2D-ben megfigyelt venulákról. A rendszerünkhöz fejlesztett számítógépes program lehetővé tette, hogy koordináta-rendszert vegyünk fel a térben és berajzoljuk az erek burkológörbéit. Ez utóbbiakat a program segítségével kiemelhetjük, animálhattuk (32. ábra).



32. ábra

Anaglif felvételek a vizsgált érszakasról

A képek megtekintéséhez kérem használjanak piros-kék szemüveget (piros: bal szem, kék: jobb szem)! Az általunk kifejlesztett valós 3D vitálmikroszkópos rendszerrel rögzítettük a felvételeket a vizsgált venuláról. A bal felső képen a natív 3D érfelvételt látjuk. A jobb felsőn a rendszerünkhöz fejlesztett, számítógépes program segítségével berajzolt koordináta-rendszert és az erek burkológörbéit láthatjuk. Az alsó képen a számítógép által kiemelt, burkológörbével animált érszakasz látható.

6. Megbeszélés

A fogínyszövetek gyakran sérülnek, ami miatt ismétlődően kemotaktikus és gyulladásos reakciók alakulnak ki bennük [165]. Irodalmi adatok megerősítik, hogy a VEGF az egyik központi vezérlő eleme az angiogenezisnek és fontos szerepet játszik a vaszkuláris permeabilitás szabályozásában fogínygyulladás esetén is [78, 94, 96, 166, 167]. Bár a szulkuszfolyadékban található VEGF koncentrációját részletesen tanulmányozták a parodontitisz különböző stádiumaiban [116], a parodontális szövetekben a VEGF által közvetített komplex szabályozó folyamatok pontos menetét és résztvevőit alig vizsgálták eddig. Eddigi ismereteink többsége csak arra irányul, hogy a VEGF szintje megemelkedik a különböző patológiás állapotokban, mint például gingivitiszben, parodontitiszben, illetve egyéb gyulladásos folyamatoknál, valamint diabéteszben, rosszindulatú daganatoknál és például a sebgyógyulásnál [77, 89, 93, 95, 114, 116, 168-170].

Jelen tanulmányunkban a VEGF akut vazoregulációs hatását tanulmányoztuk egészséges és kóros körülmények között. A kísérleteink során a VEGF és a VEGFR2 blokkoló ZM323881 lokális alkalmazását követően mértük a gingivális venulák érátmérő változását. ZM323881-ből azt a legnagyobb koncentrációt használtuk, ami csak a VEGFR2-ra hat, és még nem ad keresztreakciót a receptorcsalád egyéb receptoraival (VEGFR1, PDGFR β , FGFR1, EGFR és erbB2; IC₅₀>50 μ M szövetkultúrában) [154]. A kísérleti oldatokat lokálisan csepegtettük közvetlenül a gingiva meghatározott szakasza fölé annak érdekében, hogy elkerüljünk bármilyen szisztémás mellékhatást.

A kísérleti protokollunk azt az állapotot is szándékozott szimulálni, amikor az élő szervezetben, a fent ismertetett állapotokban megnövekszik a lokális VEGF termelés. Számos tanulmányban beszámoltak már a VEGF vazodilatátor hatásáról, ám a VEGF hatását rendszerint az artériákon vizsgálták, holott közismert a vénás rendszer élettanának fontossága [171]. Érdekes kérdés, hogy vajon a különböző vazodilatátor/vazokonstriktor szabályozó mechanizmusok összefüggenek-e egymással az arteriolák, illetve a venulák esetében. Szájképleteknél nem készült még tanulmány erről, de például patkány mezentériumon végeztek már ezzel kapcsolatos

vitálmikroszkópos vizsgálatot és megállapításra került, hogy pl. a venula függő arteriola dilatáció részben NO által mediált [172]. Aramato és mtsai. a VEGF szerepét hörcsögök bukkális arterioláin vizsgálták, de a venulákra gyakorolt hatásokat sajnos már nem írták le [87, 173]. Kísérletük során azt tapasztalták, hogy már 10^{-9} M koncentrációjú (kb. 0,05 $\mu\text{g/ml}$), lokálisan adagolt VEGF is képes volt szignifikáns vazodilatációt létrehozni arteriolában. Ezzel szemben mi csak 10 $\mu\text{g/ml}$ vagy ennél magasabb koncentrációjú VEGF oldat lokális alkalmazását követően észleltünk szignifikáns venodilatációt. Ennek oka valószínűleg az eltérő faji, szöveti háttér, az eltérő VEGF beadási mód, továbbá feltételezhető, hogy az arteriolákban és a venulákban más a VEGF receptorok koncentrációja is. A sejtmembránon keresztüli átjutása a VEGF molekulának szabad diffúzió útján történhet, illetve HSPG-hez kötötten akár szekvesztrálódhat is [174]. Tanulmányunkban a legnagyobb venodilatációt az 50 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációjú VEGF cseppentésével értük el, ennél nagyobb töménységű anyagot azonban sajnos nem is állt módunkban kipróbálni a vizsgálat során. De nem is volt célunk VEGF komplex hatásmechanizmusának a teljes farmakológiai karakterizálása, inkább csak a fogíny keringés vénás oldalára gyakorolt hatásának felfedezésére és leírására fókuszáltunk. A VEGFR2 immunhisztokémiailag is kimutatható volt vizsgálatainkban az endotélsejteken, a VSM sejteken és a pericitákon. A VEGFR2 szelektív blokkolója, a ZM323881, önmagában nem tudott érátmérő-változásokat indukálni, ugyanakkor képes volt megszüntetni az exogén úton, lokálisan adott VEGF venodilatációs hatását. A vénák falában található VEGFR2, valamint - feltehetően a periciták és VSM sejtek által termelt VEGF parakrin módon hozzájárulhat az érújdonképződéshez, illetve az akut mikrocirkulációs hatásokhoz [175-177].

Az L-NAME-rel történő előkezeléssel azt a feltételezésünket igyekeztünk bizonyítani, hogy a VEGF vazodilatáló hatásában a NO szerepet játszik. A NOS antagonistá L-NAME-rel történő előkezelés szignifikánsan emelte a kiindulási artériás vérnyomásértéket, és csökkentette a venulák átmérőjét a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Ezek az eredmények megerősítik a korábbi megfigyeléseinket, miszerint fiziológias körülmények között az arteriolákban folyamatosan érvényesül egy tónusos NO felszabadulás, melynek szerepe van a nyugalmi véráramlás fenntartásában [178].

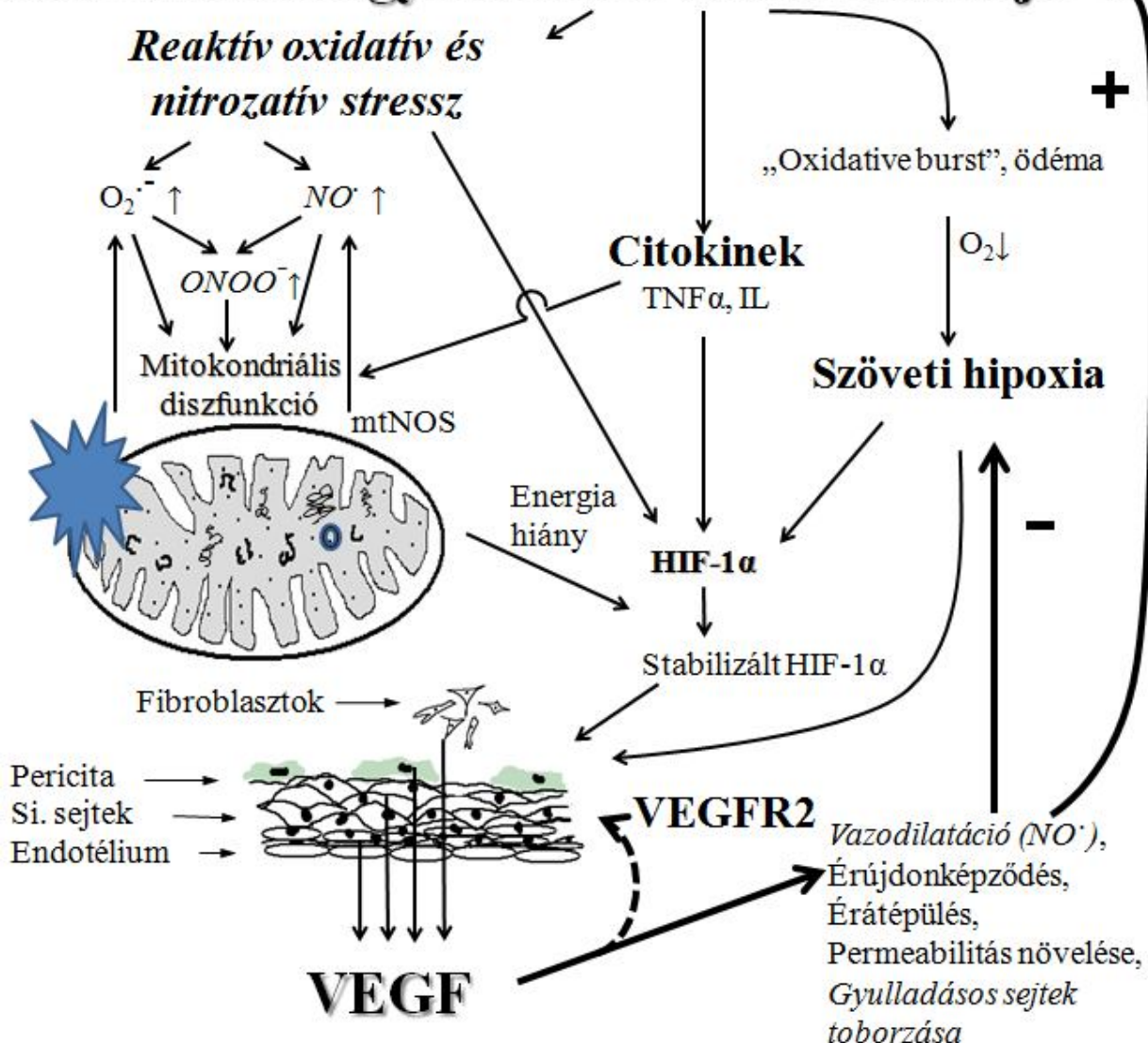
A vizsgálatunkban az L-NAME-rel történő előkezelés megszüntette a VEGF venodilatációs hatását, sőt szignifikáns venokonstriktiót hozott létre az 5. percben, ami

arra utal, hogy az ínyben a VEGF vazóaktív hatásának közvetítésében a NO-nak is szerepe van. Igen valószínű, hogy a VEGF vazodilatációs (NO szerepe) és vazokonstriktív (pl.: szuperoxid szerepe [173]) hatása közötti egyensúly L-NAME előkezelés miatti felbomlása magyarázza a megfigyelt venokonstriktívot. A venuláris vazodilatáció pontos mechanizmusának, a VEGF-NO útvonal szerepének a megismeréséhez még további vizsgálatok szükségesek, de ezt már más szöveteknél is megfigyelték [87].

Tanulmányuk alapján, a VEGFR2 immunreaktivitása szignifikánsan fokozódik minden egyes vaszkuláris komponensben gingivitisz esetén. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy egy szignifikáns, funkcionálisan aktív VEGF termelés van a fogínyszövetben, ami nem jellemző az egészséges ínyre és ennek szerepe lehet a gyulladt szövet mikrocirkulációjának szabályozásában. Korábbi tanulmányok kvantitatív és kvalitatív változásokról számoltak be a fogágy érhálózatában parodontitisz esetén [179, 180]. Chapple és mtsai. az angiogenezis zavarát írták le a parodontális tasakok epitéliuma mellett, mely a VEGF megváltozott expressziójával járt együtt [166]. Az angiogenezis sajátos hipoxiás szövetekben kezdődik, melyeknek új erekre van szükségük a megfelelő oxigenizáció fenntartása érdekében. Ha egy szövet hipoxiás, beindulnak a sejtszintű oxigénszint érzékelő mechanizmusok, indukálva a proangiogén fehérjék génexpresszióját. A korábbi és a jelenlegi munkahipotézisünk szerint (33. ábra), a baktériumok egy védekező jellegű immunválaszt idéznek elő a parodontiumban a VEGF közreműködésével, melynek három fő útvonala van. Először is a gyulladt területre vándorló fehérvérsejtekben és az eredetileg is itt lévő sejtekben oxidatív és nitrozatív szabadgyökök képződnek enzimatisz úton. Ezek között szerepel a szuperoxid, a NO és kettejük reakcióterméke, a peroxinitrit, melyek aztán elpusztítják a behatoló mikroorganizmusokat [56]. A szervezet számára jótékony hatásuk ellenére a túlermelődésük miatt károsodik a szövet (pl.: mitokondriális diszfunkció jön létre), melynek következtében további mitokondriális eredetű szabadgyök képzés történik és csökken a szövetek oxigén felvétele, mely folyamat önmagát még erősíti is [56, 181-183]. A végeredmény az lesz, hogy az oxigén fogyasztás és az oxidatív foszforiláció szétkapcsol. Továbbá a citokinek felszabadulása és a gyulladt szövetek hipoxiája a hipoxia indukálta faktor 1 alfa típusának (HIF-1 α) stabilizációjához, VEGF termeléshez és VEGFR2 expresszió növekedéséhez vezet [181, 184-186], mely összességében

akutan vazodilatációt és hosszabb távon pedig angiogenezist is eredményez a szöveti hipoxia kompenzálására. Másfelől a VEGF gyulladással sejt toborzó hatása stimulálja a hipoxiától független összetevőkön (mint például citokinek) keresztül a saját termelődését. Ezek eredményeként létrejövő VEGF túltermelődés hozzájárulhat a gyulladás progressziójához. Ezt a túltermelést meg lehet akadályozni a gyulladás okának megszüntetésével, azaz a baktériumok eltávolításával, vagy pedig a VEGF termelését szabályzó folyamatok gátlásával (pl.: rezveratrollal) (általunk feltételezett útvonal, 33. ábra) [93, 187, 188].

Parodoncium gyulladásos válaszreakciója



33. ábra

A parodoncium gyulladásos válaszreakciója (saját hipotetikus útvonal)

Három lehetséges útvonalat feltételezünk a fogínygyulladás, illetve parodontitisz esetén megfigyelhető VEGF termelés fokozódás és VEGFR2 expresszió növekedés mögött. Lényegében mindegyik útvonal a HIF-1 α stabilizálódásán keresztül vezet a VEGF eredetű hatásokhoz. További részleteket ld. a szövegben. A dőlt betűvel írt részek munkacsoportunk jelenlegi és korábbi munkásságára utalnak [56, 173, 189].

A VEGF expresszió, mint HIF függő tényező, a gyulladásos szövetek fibroblasztjaiban is megnő [185, 190]. Ezekkel a tanulmányokkal megegyezően mi is VEGFR2-re immunpozitivitást mutató fibroblasztokat találtunk az erek körül a gingivitiszes

csoportban, mely alátámasztja a fibroblasztok lehetséges szerepét a gyulladást kísérő vaszkuláris változásokban. A fibroblasztokban végbemenő változások és a HIF-1 stabilizálódása a VEGFR2 expresszió növekedésével elegendő lehet a gyulladással sejtek toborzásához és az angiogenezishez is [186, 190]. A mikrocirkulációban fellépő angiogenezis a sérülés utáni nyolcadik napon éri el a csúcspontját és a VEGF termelés fokozódásával jár [191]. Tanulmányunkban a metszőfogak körüli ligatúrát hét napig hagytuk fent, várhatóan az angiogenezis legaktívabb időszakáig. A ligatúrák modell az irodalomban általánosan elfogadott fogágygyulladás modell. A legkülönbözőbb emlősfajokon (rágcsálóktól kezdve a majmokig) manapság is rendszeresen alkalmazzák a parodontológiai kutatásokban. A ligatúra az embernél kialakuló fogkövet szimulálja. Nem csak a bakteriális biofilmnek biztosít retenciós felületet, hanem neurogén gyulladást is ki lehet vele váltani [192]. Munkacsoportunknak igen nagy tapasztalata van ezzel a modellel egérben és patkányban [56, 178, 192-195]. A kísérletes fogínygyulladás kiváltásához használt ligatúra felhelyezési módját esetünkben befolyásolta a folyamatosan növekvő metszőfog, ezért kellett a mandibula alatt is átötenünk a fonalat, hogy így a ligatúra megfelelő pozícióját fenntartsuk. A felhasznált ligatúrák modellünk krónikus szövődmények vizsgálatára is alkalmas lehet. Jelen vizsgálati protokollunk, ahol egy hétig hagytuk fent a ligatúrát, majd 1 órán keresztül vizsgáltuk az érátmérő változást, nem akutnak, hanem szubakutnak tekintendő az ínygyulladás szempontjából és ez a vizsgálati hossz általánosan elfogadott az irodalomban. Jogosan felmerül továbbá a kérdés mind a gingivitiszes, mind a diabéteszes vizsgálatunknál, hogy mennyi időt vesz igénybe a cseppentett blokkoló hatásának lecsengése. Akut vizsgálati protokollról lévén szó, jelen feltételek mellett erre vonatkozólag nincs adatunk, de egy későbbi tanulmány esetére érdekes célkitűzés lehet ennek meghatározása. Természetesen, mint minden állatmodellnél, ennél is csak kellő óvatossággal lehet adaptálni eredményeink humán vonatkozását.

Gyulladás esetén a VEGF-nek és a VEGFR2-nak a vazodilatációban betöltött szerepén kívül még egyéb fontos működését is felfedhetjük. Tudni illik a VEGF magas koncentrációja módosíthatja a mikrovaszkuláris periciták kontraktilis válaszát a VEGFR2-okon keresztül és hozzájárulhat a gyulladt területeken megfigyelhető permeabilitás fokozódáshoz [196]. Ezt a megfigyelést alátámasztja a mi eredményünk

is, mivel VEGFR2-re immunpozitív pericitákat azonosítottunk a gyulladt fogíny kiserei körül.

Habár kimutattuk, hogy az érfal minden egyes komponense (endotélsejt, simaizomsejt) és a környező sejtek is (pericita, fibroblaszt) VEGFR2-t tartalmaz, másfelől úgy tűnik, hogy mindezek a sejtek képesek VEGF-t előállítani is, az még nincs tisztázva, hogy milyen komplex parakrin, autokrin vagy endokrin szabályozás áll az érműködés, remodelling és stabilizálódás hátterében [175-177, 197]. Mindazonáltal a fali sejtek (periciták, vaszkuláris simaizomsejtek és perivaszkuláris fibroblasztok) által termelt VEGF, valamint az endotél eredetű VEGFR2 jelátvitel és az endotélium és fali sejtek közötti interakció fontosságát más tanulmányok is kihangsúlyozták [175, 197].

Mindezek a mechanizmusok pedig összefügghetnek a NO által mediált jelátviteli folyamatokkal is.

A vaszkuláris változásokon kívül, a leukociták kemotaxisának megváltozása tipikus jelenség gingivitiszben, illetve parodontitiszben [198]. A polimorfonukleáris leukociták és limfociták vándorlása feltehetően éppen a posztkapilláris venulák területén zajlik [199]. Részletes hisztokémiai, szerkezettani és bioszintetikus vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy ezen venulák endotélsejtjei sajátos módon olyan citokineket szintetizálnak, melyek közreműködnek a parodontitiszes szövetek immunválaszában [200, 201]. Igen valószínű, hogy a VEGF is ezek között a citokinek között szerepel.

A diabétesz mellitusz szerepét parodontitiszben és egyéb gyulladásos megbetegedésben már számos kísérlet igazolta. Ma már széleskörben ismert tény, hogy a cukorbetegség súlyosbítja a parodontitisz lefolyását [202, 203]. A diabétesz mellitusz következtében kialakuló súlyos parodontális elváltozásokban a VEGF-nek is jelentős szerepe van [95]. Cukorbeteg patkányok ínyére cseppentett VEGFR2 blokkoló vazokonstriktív választ váltott ki, ami alapján feltételezhető a VEGF vazoregulációs szerepe. Megnövekedett VEGFR2 és VEGF expressziót számos módszerrel, többek között immunhisztokémiai vizsgálatokkal is sikerült kimutatni és lokalizálni például a gingiva epitél és endotél sejtjeiben [204, 205].

Egyéb kutatások során megnövekedett hízósejtszámot találtak diabéteszes nefropátiában is. Ez a megnövekedett hízósejtszám feltehetően szerepet játszik a diabéteszben kialakuló megváltozott vesefunkcióban [206], valamint valószínűleg fontos tényező a diabéteszben jelentkező immunválasz-változásban is [207]. Számos további vizsgálat

megerősíteni látszik a megnövekedett VEGF expresszió alapvető szerepét a diabétesz eredetű érelváltozásokban [208-210]. Egyesek különbséget találtak az IDDM és a NIDDM között, miszerint IDDM esetén szignifikánsan nagyobb a VEGF expresszió a NIDDM-hoz képest, ami feltehetően az inzulin rezisztenciának és az endotél diszfunkciónak köszönhető [211]. Diabétesz esetén, a súlyos szövődmenyként retinában fellépő érújdonképződés kezelésében a sebészi eljárás mellett fontos szerepet kaphat a VEGF ellenes antitestek alkalmazása [212]. Az irodalomban talált adatok azonban időnként ellentmondásosak, hiszen egyesek nem találtak VEGF expresszió különbséget az egészséges és a diabéteszes csoportok között sem gingivitisz, sem parodontitisz esetén [213]. Minden esetre ez a tény is további vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé a témakörben.

Kísérletes diabéteszben kapott eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a cukorbetegség talaján szignifikánsan megnő a hízósejtek száma a gingivában, továbbá a hízósejteken lévő VEGFR2 expressziója is megemelkedik. Feltételezhető, hogy a hízósejtek a rajtuk lévő VEGFR2 aktiválódása után különböző vazodilatátor metabolitokat (pl.: hisztamin, prosztaglandinok) szabadítanak fel, melyek hozzájárulnak a lokális mikrocirkulációs paraméterek megváltozásához. Egy másik tanulmányban szintén kimutatták a VEGF expresszió növekedést diabétesz esetén a gingivában, bár itt főleg a monocitákban és makrofágokban találták ezt jelentősnek és nem a hízósejtekben [214]. Egyértelműnek tűnik azonban, hogy a kísérletes gingivitisz és diabétesz esetén munkacsoportunk által megfigyelt, a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb, kb. 150 %-os kiindulási érátmérő létrejöttében a fentiekén kívül még más mechanizmusok is szerepet játszanak, hiszen a VEGFR2 szelektív blokkolásával csak kb. 20 %-os venokonstriktió történt. Eredményeink klinikai relevanciájának megállapításához és ennek humán betegségekben való felhasználásához még további vizsgálatokra van szükség.

Az általunk kifejlesztett valós 3D transzlucens vitálmikroszkópia remélhetőleg egy új, igen ígéretes vizsgálati módszer lehet. Mivel vizsgálatunkat 2D-s rendszeren kezdtük, menet közben nem szerettünk volna módosítani a módszertanon. A valós 3D fejlesztéseinket a VEGF funkciós vizsgálatainkkal párhuzamosan végeztük. Bár még sok munka van hátra, az már most világosan látszik, hogy a különböző szövetekhez valószínűleg más-más összetételű oldat az optimális a transzparencia fokozásához. A különböző átderítő oldatok és a sztereomikroszkóp optikai fejlesztése és a digitális

képanalízis együtt egy olyan új megközelítési rendszert alkot, mely új területét nyithatja meg az orvosbiológiai kutatásnak.

7. Következtetések

Eredményeink azt mutatják, hogy

1. Az általunk használt módszer alkalmas a vizsgálat elvégzéséhez, mivel maga a cseppentés a kontroll, fiziológiás sóoldat felhasználásával nem okozott semmiféle érátmérő változást a fogíny venulákon.
2. Fiziológiás körülmények között nincs jelentős VEGF termelés és VEGFR2 expresszió a fogínyben.
3. Ugyanakkor az exogén úton, lokálisan adott VEGF képes vazodilatációt létrehozni a jelen lévő, funkcionálisan aktív VEGFR2-ok közvetítésével a gingiva venuláin, ezáltal csökkentve a vaszkuláris ellenállást. A kapott adatok alapján feltételezhető, hogy a VEGF venodilatátor hatásában az endotélsejtek által termelt NO-nak is szerepe lehet.
4. Kísérletes gingivitiszben, illetve diabétesz mellituszban patkányokon végzett kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy ezekben a patológias állapotokban a VEGF nagy mennyiségben termelődik.
5. Ilyenkor a VEGF az érfalban, illetve az érfal körüli sejtekben (endotélsejt, VSM, pericita és diabéteszben hízósejt) található VEGFR2-hoz kapcsolódva aktiválja e sejteket. A VEGF az így létrejövő mechanizmusok révén (gyulladásos és vazodilatátor mediátorok felszabadulása, permeabilitás növekedése, angiogenezis és remodeling a mikrocirkuláció területén) szerepet játszik a kialakuló érelváltozásokban.
6. A VEGFR2 gátlása új terápiás megközelítése lehet a fogágybetegségnek, különösképpen diabéteszes pácienseknél.
7. Az általunk kifejlesztett valós 3D transzlucens vitálmikroszkópia új, ígéretes területét nyithatja meg a kutatásnak.

8. Összefoglalás

Vizsgálatunk fő célja az volt, hogy tanulmányozzuk a VEGF lehetséges szabályozó szerepét patkányok fogíny venuláin fiziológiás (egészséges fogíny) és patológiás (fogínygyulladás, diabétesz) állapotokban. További célunk volt, hogy a mélyebben futó erek és a teljes mikrocirkulációs hálózat láthatóvá tételére kifejlesszünk egy speciális eljárást, melyet “transzlucens valós három dimenziós vitálmikroszkópiának” nevezünk el. Felnőtt hím Wistar patkányokból (n=107) 8 vizsgálati csoportot képeztünk. A vizsgálati anyagokat (VEGF, VEGFR2 antagonistá, fiziológiás sóoldat) az alsó metszők közötti fogínyre cseppentettük. Sztereomikroszkópra adaptált digitális fényképezőgép segítségével figyeltük meg az érátmérő változását az alsó metszők melletti fogínyben, a kiválasztott venulán. A venulák érátmérőjének változását a kiindulási értékhez, valamint az adott időponthoz tartozó kontroll értékhez is hasonlítottuk. Immunhisztokémiai és western blot vizsgálatot használtunk a 2-es típusú VEGF receptorok lokalizálására. Egészséges fogínyben a VEGF szignifikánsan és dózisfüggően megnövelte a venulák átmérőjét a fiziológiás sóoldathoz képest. A VEGFR2 antagonistá önmagában alkalmazva nem okozott semmilyen érátmérő változást. VEGFR2 antagonistával vagy nitrogén-monoxid (NO) szintáz blokkolóval történő előkezelés szignifikánsan csökkentette a VEGF vazodilatációs hatását. Fogínygyulladás és diabétesz esetén azonban szignifikáns vazokonstrikció lépett fel VEGFR2 antagonistá cseppentése után, valamint VEGFR2 expresszió fokozódást sikerült igazolnunk mind az immunhisztokémiai, mind a western blot vizsgálatok alapján. Eredményeink azt mutatják, hogy funkcionálisan aktív 2-es típusú VEGF receptorok találhatóak patkányok fogínyében. Noha egészséges íny szövet esetén nincs számottevő VEGF termelés, a kívülről bejuttatott VEGF a VEGFR2 aktiválása révén és az azt követő endotél eredetű NO felszabaduláson keresztül vazodilatációt okoz a venuláknál. Ezen kívül mind a VEGF termelés, mind pedig a VEGFR2 expresszió megnő fogínygyulladás esetén jellemzően az érfal minden rétegében, diabétesz esetén pedig karakteresen a nagy mennyiségű hízósejtben. A VEGFR2 gátlása új terápiás megközelítése lehet a fogágybetegségnek különösképpen diabéteszes pácienseknél. Az általunk kifejlesztett valós 3D transzlucens vitálmikroszkópia új, ígéretes területét nyithatja meg a kutatásnak.

9. Irodalomjegyzék

1. Gera I. Parodontológia. In, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005: 3-24.
2. Buhlin K., Mantyla P., Paju S., Peltola JS., Nieminen MS, Sinisalo J., Pussinen PJ. (2011) Periodontitis is associated with angiographically verified coronary artery disease. *J Clin Periodontol*, 38: 1007-1014.
3. Fehér E. Maxillofacialis anatómia. In, Medicina Kiadó, Budapest, 2001: 72-87.
4. Newman M. G. , Takei H. H., Klokkevold P. R. Clinical periodontology. In: Carranza F. A. (szerk.), Elsevier, St. Louis, 2006: 46-67.
5. Mian R., Marshall J. M. (1993) Effect of acute systemic hypoxia on vascular permeability and leucocyte adherence in the anaesthetised rat. *Cardiovasc Res*, 27: 1531-1537.
6. Venturi G. M., Tu L., Kadono T., Khan A. I., Fujimoto Y., Oshel P., Bock C. B., Miller A. S., Albrecht R. M., Kubes P., Steeber D. A., Tedder T. F. (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*, 19: 713-724.
7. Diaz-Flores L., Gutierrez R., Varela H. (1992) Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. *J Morphol*, 213: 33-45.
8. Csillik B., Kubik I., Tömböl T. Tájanatómia. In: Tömböl Teréz (szerk.), 2, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1991: 176.
9. Gera I. Parodontológia. In, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005: 71-94.
10. Newman M. G. , Takei H. H., Klokkevold P. R. Clinical periodontology. In: Carranza F. A. (szerk.), Elsevier, St. Louis, 2006: 355-361.
11. Kopper L., Schaff Zs. Patológia I. In, Medicina Kiadó, Budapest, 2006: 430-455.
12. Albrecht MG., Baranyi É., Békefi D., Brooser G., de Châtel R., Cseh K., Csermely P., Daróczy J., Egyed J. In: Halmos T., Jemendy Gy. (szerk.), Diabetes mellitus Elmélet és klinikum. vol. 3, Medicina, Budapest, 2002: 43-53.
13. Albrecht MG. In: Fog- és szájbetegségek diabetes mellitusban. vol., Medicina, Budapest, 2001: 18-71.
14. Heltianu C., Guja C., Manea S-A. Genetic Determinants of Microvascular Complications in Type 1 Diabetes, Type 1 Diabetes Complications. In: Wagner

- D. (szerk.). 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-complications/genetic-determinants-of-microvascular-complications-in-type-1-diabetes>.
15. Mikó S., Albrecht MG. Dental Conditions and Periodontal Disease in Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus, Type 1 Diabetes Complications. In: David Wagner (szerk.). 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-complications/dental-conditions-and-periodontal-disease-in-adolescents-with-type-1-diabetes-mellitus>.
 16. Albrecht MG., Baranyi É., Békefi D., Brooser G., de Châtel R., Cseh K., Csermely P., Daróczy J., Egyed J. In: Halmos T., Jemendy Gy. (szerk.), Diabetes mellitus Elmélet és klinikum. vol. 3, Medicina, Budapest, 2002: 562-569.
 17. Ganong W. F. In: Foltin J., Nogueira I., Ransom J., Sheinis L. A. (szerk.), Ganong's Review of Medical Physiology. vol. 20, Lange Medical Publications, New York, 2001: 574-587.
 18. Ganong W. F. In: Foltin J., Nogueira I., Ransom J. , Sheinis L. A. (szerk.), Ganong's Review of Medical Physiology. vol. 20, Lange Medical Publications, New York, 2001: 81-114.
 19. Fonyó A. Az orvosi élettan tankönyve. In, Medicina Kiadó, Budapest, 1997: 394-395.
 20. Gyorfı A., Fazekas A., Irmes F., Jakab G., Suto T., Rosivall L. (1993) Role of substance P (SP) in development of symptoms of neurogenic inflammation in the oral mucosa of the rat. J Periodontal Res, 28: 191-196.
 21. Fazekas A., Gyorfı A., Posch E., Jakab G., Bartfai Z., Rosivall L. (1991) Effect of denervation on the neurogenic inflammation of the rat mandibular mucosa. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 343: 393-398.
 22. Tobin G., Edwards A. V., Bloom S. R., Ekstrom J. (1997) Nitric oxide in the control of submandibular gland function in the anaesthetized ferret. Exp Physiol, 82: 825-836.
 23. Hickey K. A., Rubanyi G., Paul R. J., Highsmith R. F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am J Physiol, 248: C550-556.

24. Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332: 411-415.
25. Shepro D. (szerk.), *Microvascular Research*. vol. 1, Elsevier, Boston, 2006: 5-12.
26. Yanagisawa M., Masaki T. (1989) Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, 10: 374-378.
27. Inoue A., Yanagisawa M., Takawa Y., Mitsui Y., Kobayashi M., Masaki T. (1989) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*, 264: 14954-14959.
28. Pradeep A. R., Guruprasad C. N., Swati P., Shikha C. (2008) Crevicular fluid endothelin-1 levels in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*, 43: 275-278.
29. Ansai T., Yamamoto E., Awano S., Yu W., Turner A. J., Takehara T. (2002) Effects of periodontopathic bacteria on the expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells in adult periodontitis. *Clin Sci (Lond)*, 103 Suppl 48: 327S-331S.
30. Fujioka D., Nakamura S., Yoshino H., Shinohara H., Shiba H., Mizuno N., Hasegawa N., Shindoh N., Uchida Y., Ogawa T., Kawaguchi H., Kurihara H. (2003) Expression of endothelins and their receptors in cells from human periodontal tissues. *J Periodontal Res*, 38: 269-275.
31. Kedzierski R. M., Yanagisawa M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 851-876.
32. Hynynen M. M., Khalil R. A. (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 1: 95-108.
33. Barnes K., Turner A. J. (1997) The endothelin system and endothelin-converting enzyme in the brain: molecular and cellular studies. *Neurochem Res*, 22: 1033-1040.
34. Hawgood B. J. (1997) Mauricio Rocha e Silva MD: snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. *Toxicon*, 35: 1569-1580.
35. Wikipedia. Bradykinin structure. Available at: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Bradykinin_structure.svg&page=1. Accessed: 03.11., 2012.
36. Fürst Zs. (szerk.), *Gyógyszertan*. vol., Medicina, Budapest, 1999: 827-828.

37. Brunius G., Domeij H., Gustavsson A., Yucel-Lindberg T. (2005) Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Regul Pept*, 126: 183-188.
38. Fürst Zs. (szerk.), *Gyógyszertan. vol., Medicina, Budapest, 1999: 821-825.*
39. Alpagot T., Remien J., Bhattacharyya M., Konopka K., Lundergan W., Duzgunes N. (2007) Longitudinal evaluation of prostaglandin E2 (PGE2) and periodontal status in HIV+ patients. *Arch Oral Biol*, 52: 1102-1108.
40. Fürst Zs. (szerk.), *Gyógyszertan. vol., Medicina, Budapest, 1999: 812-814.*
41. Shepro D. (szerk.), *Microvascular Research. vol. 1, Elsevier, Boston, 2006: 229-232.*
42. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.
43. Ignarro L. J., Buga G. M., Byrns R. E., Wood K. S., Chaudhuri G. (1988) Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 218-226.
44. Ignarro L. J., Byrns R. E., Buga G. M., Wood K. S., Chaudhuri G. (1988) Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*, 244: 181-189.
45. Costa A., Trainer P., Besser M., Grossman A. (1993) Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. *Brain Res*, 605: 187-192.
46. Fürst Zs. (1999) A nitrogén-monoxid. *Természet Világa*, 130(4): 146-151.
47. Ignarro L. J., Buga G. M., Chaudhuri G. (1988) EDRF generation and release from perfused bovine pulmonary artery and vein. *Eur J Pharmacol*, 149: 79-88.
48. Murad F. (1988) Role of cyclic GMP in the mechanism of action of nitrovasodilators, endothelium-dependent agents and atrial natriuretic peptide. *Biochem Soc Trans*, 16: 490-492.
49. Daff S. (2004) An appraisal of multiple NADPH binding-site models proposed for cytochrome P450 reductase, NO synthase, and related diflavin reductase systems. *Biochemistry*, 43: 3929-3932.

50. Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142.
51. Alderton W. K., Cooper C. E., Knowles R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593-615.
52. Nathan C., Xie Q. W. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78: 915-918.
53. Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 217-230.
54. Lih K., Davis MJ., Chikian WH. (1992) Endothelial modulation of arteriolar tone. *NIPS*, 7: 5-9.
55. Shepro D. (szerk.), *Microvascular Research*. vol. 1, Elsevier, Boston, 2006: 405-410.
56. Lohinai Z., Benedek P., Feher E., Gyorfı A., Rosivall L., Fazekas A., Salzman A. L., Szabo C. (1998) Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol*, 123: 353-360.
57. Paquette D. W., Williams R. C. (2000) Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol* 2000, 24: 239-252.
58. Daghigh F., Borghaei R. C., Thornton R. D., Bee J. H. (2002) Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol*, 73: 392-400.
59. Takeichi O., Hayashi M., Tsurumachi T., Tomita T., Ogihara H., Ogiso B., Saito T. (1999) Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J*, 32: 124-130.
60. Brennan P. A., Thomas G. J., Langdon J. D. (2003) The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol*, 48: 93-100.
61. Shimauchi H., Takayama S., Narikawa-Kiji M., Shimabukuro Y., Okada H. (2001) Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod*, 27: 749-752.
62. Brennan P. A., Umar T., Palacios-Callender M., Spedding A. V., Mellor T. K., Buckley J., Langdon J. D. (2000) A study to assess inducible nitric oxide synthase expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*, 29: 249-254.
63. Ohashi M., Iwase M., Nagumo M. (1999) Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol Med*, 28: 355-359.

64. Rosbe K. W., Prazma J., Petrusz P., Mims W., Ball S. S., Weissler M. C. (1995) Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 113: 541-549.
65. Gallo O., Masini E., Morbidelli L., Franchi A., Fini-Storchi I., Vergari W. A., Ziche M. (1998) Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90: 587-596.
66. Chen Y. K., Hsue S. S., Lin L. M. (2002) The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal-pouch carcinomas using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Oral Pathol Med*, 31: 82-86.
67. Brennan P. A., Umar T., Wilson A. W., Mellor T. K. (2002) Expression of type 2 nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral dysplasia. *J Oral Maxillofac Surg*, 60: 1455-1460.
68. Brennan P. A., Palacios-Callender M., Zaki G. A., Spedding A. V., Langdon J. D. (2001) Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck*, 23: 217-222.
69. Thomsen L. L., Scott J. M., Topley P., Knowles R. G., Keerie A. J., Friend A. J. (1997) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor. *Cancer Res*, 57: 3300-3304.
70. Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219: 983-985.
71. Ferrara N., Henzel W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161: 851-858.
72. Plouet J., Schilling J., Gospodarowicz D. (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J*, 8: 3801-3806.
73. Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246: 1309-1312.
74. Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V., Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246: 1306-1309.

75. Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winer J., Ferrara N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 267: 26031-26037.
76. Houck K. A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D. W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5: 1806-1814.
77. Olsson A. K., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 359-371.
78. Pickkers P., Sprong T., Eijk L., Hoeven H., Smits P., Deuren M. (2005) Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock*, 24: 508-512.
79. Dulak J., Jozkowicz A., Dembinska-Kiec A., Guevara I., Zdzienicka A., Zmudzinska-Grochot D., Florek I., Wojtowicz A., Szuba A., Cooke J. P. (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 659-666.
80. Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J. (1994) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*, 71: 374-379.
81. Frank S., Hubner G., Breier G., Longaker M. T., Greenhalgh D. G., Werner S. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270: 12607-12613.
82. Cohen T., Nahari D., Cerem L. W., Neufeld G., Levi B. Z. (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271: 736-741.
83. Warren R. S., Yuan H., Matli M. R., Ferrara N., Donner D. B. (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 271: 29483-29488.
84. Soh E. Y., Sobhi S. A., Wong M. G., Meng Y. G., Siperstein A. E., Clark O. H., Duh Q. Y. (1996) Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*, 120: 944-947.
85. Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9: 669-676.

86. Abman S. H. (2007) Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology*, 91: 283-290.
87. Aramoto H., Breslin J. W., Pappas P. J., Hobson R. W., 2nd, Duran W. N. (2004) Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H1590-1598.
88. Cetinkaya B. O., Acikgoz G., Ayas B., Aliyev E., Sakallioglu E. E. (2006) Increased expression of vascular endothelial growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol*, 77: 54-60.
89. Cetinkaya B. O., Keles G. C., Ayas B., Sakallioglu E. E., Acikgoz G. (2007) The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol*, 78: 1129-1135.
90. Dvorak A. M., Feng D. (2001) The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem*, 49: 419-432.
91. Eriksson A., Cao R., Roy J., Tritsarlis K., Wahlestedt C., Dissing S., Thyberg J., Cao Y. (2003) Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation*, 107: 1532-1538.
92. Fernandez M., Mejias M., Angermayr B., Garcia-Pagan J. C., Rodes J., Bosch J. (2005) Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol*, 43: 98-103.
93. Johnson R. B., Serio F. G., Dai X. (1999) Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol*, 70: 848-852.
94. Roberts W. G., Palade G. E. (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, 108 (Pt 6): 2369-2379.
95. Sakallioglu E. E., Aliyev E., Lutfioglu M., Yavuz U., Acikgoz G. (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of gingiva and gingival crevicular fluid in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. *Clin Oral Investig*, 11: 115-120.
96. Weis S. M., Cheresch D. A. (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 437: 497-504.
97. Zachary I. (2001) Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1375-1386.

98. Murohara T., Horowitz J. R., Silver M., Tsurumi Y., Chen D., Sullivan A., Isner J. M. (1998) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*, 97: 99-107.
99. Waltham M., Burnand K. G., Collins M., McGuinness C. L., Singh I., Smith A. (2003) Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalisation and organisation. *Thromb Haemost*, 89: 169-176.
100. Laitinen M., Zachary I., Breier G., Pakkanen T., Hakkinen T., Luoma J., Abedi H., Risau W., Soma M., Laakso M., Martin J. F., Yla-Herttuala S. (1997) VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther*, 8: 1737-1744.
101. Boussat S., Eddahibi S., Coste A., Fataccioli V., Gouge M., Housset B., Adnot S., Maitre B. (2000) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L371-378.
102. Slevin M., Krupinski J., Slowik A., Kumar P., Szczudlik A., Gaffney J. (2000) Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 31: 1863-1870.
103. Ben Arush M. W., Ben Barak A., Maurice S., Livne E. (2007) Serum VEGF as a significant marker of treatment response in hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol*, 24: 111-115.
104. Shang Z. J., Li J. R., Li Z. B. (2007) Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*, 65: 17-21.
105. Slomiany M. G., Black L. A., Kibbey M. M., Day T. A., Rosenzweig S. A. (2006) IGF-1 induced vascular endothelial growth factor secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 851-858.
106. Yeo K. T., Wang H. H., Nagy J. A., Sioussat T. M., Ledbetter S. R., Hoogewerf A. J., Zhou Y., Masse E. M., Senger D. R., Dvorak H. F., et al. (1993) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res*, 53: 2912-2918.
107. Dreves J., Siegert P., Medinger M., Mross K., Strecker R., Zirrgiebel U., Harder J., Blum H., Robertson J., Jurgensmeier J. M., Puchalski T. A., Young H., Saunders O., Unger C. (2007) Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 25: 3045-3054.

108. Ho Q. T., Kuo C. J. (2007) Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 1349-1357.
109. Manley P. W., Bold G., Bruggen J., Fendrich G., Furet P., Mestan J., Schnell C., Stolz B., Meyer T., Meyhack B., Stark W., Strauss A., Wood J. (2004) Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1697: 17-27.
110. Manning E. A., Ullman J. G., Leatherman J. M., Asquith J. M., Hansen T. R., Armstrong T. D., Hicklin D. J., Jaffee E. M., Emens L. A. (2007) A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res*, 13: 3951-3959.
111. Roberts N., Kloos B., Cassella M., Podgrabinska S., Persaud K., Wu Y., Pytowski B., Skobe M. (2006) Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res*, 66: 2650-2657.
112. Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J. C., Abraham J. A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266: 11947-11954.
113. Bonakdar M. P., Barber P. M., Newman H. N. (1997) The vasculature in chronic adult periodontitis: a qualitative and quantitative study. *J Periodontol*, 68: 50-58.
114. Degidi M., Artese L., Scarano A., Perrotti V., Gehrke P., Piattelli A. (2006) Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol*, 77: 73-80.
115. Orsini G., Murmura G., Artese L., Piattelli A., Piccirilli M., Caputi S. (2006) Tissue healing under provisional restorations with ovate pontics: a pilot human histological study. *J Prosthet Dent*, 96: 252-257.
116. Prapulla D. V., Sujatha P. B., Pradeep A. R. (2007) Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*, 78: 1783-1787.
117. Anthony F. W., Wheeler T., Elcock C. L., Pickett M., Thomas E. J. (1994) Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts. *Placenta*, 15: 557-561.
118. Bacic M., Edwards N. A., Merrill M. J. (1995) Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues. *Growth Factors*, 12: 11-15.

119. Cheung C. Y., Singh M., Ebaugh M. J., Brace R. A. (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 173: 753-759.
120. Park J. E., Keller G. A., Ferrara N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4: 1317-1326.
121. Neufeld G., Cohen T., Gitay-Goren H., Poltorak Z., Tessler S., Sharon R., Gengrinovitch S., Levi B. Z. (1996) Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metastasis Rev*, 15: 153-158.
122. Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M. L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376: 66-70.
123. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L., Schuh A. C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376: 62-66.
124. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380: 435-439.
125. Carmeliet P., Collen D. (1998) Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int*, 53: 1519-1549.
126. Plate K. H., Breier G., Risau W. (1994) Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol*, 4: 207-218.
127. Algire GH., Chalkley HW. (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst*, 6: 73-85.
128. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186.
129. Bodoky G. (2007) Az angiogenesis gátlásának szerepe a vastagbél- és végbélrák kezelésében. *Magy Onkol*, 51: 139-144.
130. Ferrara N., Gerber H. P. (2001) The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*, 106: 148-156.

131. Shepherd F. A. (2001) Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, 34 Suppl 3: S81-89.
132. Berlin J. D. (2002) Targeting vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*, 16: 13-15.
133. Ferrara N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med*, 77: 527-543.
134. Stacker S. A., Vitali A., Caesar C., Domagala T., Groenen L. C., Nice E., Achen M. G., Wilks A. F. (1999) A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *J Biol Chem*, 274: 34884-34892.
135. Qu Hong, Nagy J. A., Senger D. R., Dvorak H. F., Dvorak A. M. (1995) Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J Histochem Cytochem*, 43: 381-389.
136. Pedram A., Razandi M., Levin E. R. (1998) Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 273: 26722-26728.
137. Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
138. Lamoreaux W. J., Fitzgerald M. E., Reiner A., Hasty K. A., Charles S. T. (1998) Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res*, 55: 29-42.
139. Matsumoto Y., Tanaka K., Hirata G., Hanada M., Matsuda S., Shuto T., Iwamoto Y. (2002) Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints. *J Immunol*, 168: 5824-5831.
140. Abedi H., Zachary I. (1995) Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*, 30: 544-556.
141. Goligorsky M. S., Abedi H., Noiri E., Takhtajan A., Lense S., Romanov V., Zachary I. (1999) Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol*, 276: C1271-1281.
142. Noiri E., Hu Y., Bahou W. F., Keese C. R., Giaever I., Goligorsky M. S. (1997) Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem*, 272: 1747-1752.

143. Thakker G. D., Hajjar D. P., Muller W. A., Rosengart T. K. (1999) The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*, 274: 10002-10007.
144. Alon T., Hemo I., Itin A., Pe'er J., Stone J., Keshet E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1: 1024-1028.
145. Tran J., Rak J., Sheehan C., Saibil S. D., LaCasse E., Korneluk R. G., Kerbel R. S. (1999) Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 264: 781-788.
146. Kanellis J., Fraser S., Katerelos M., Power D. A. (2000) Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 278: F905-915.
147. Jakeman L. B., Armanini M., Phillips H. S., Ferrara N. (1993) Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*, 133: 848-859.
148. Jakeman L. B., Winer J., Bennett G. L., Altar C. A., Ferrara N. (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*, 89: 244-253.
149. Chen A., Cuevas I., Kenny P. A., Miyake H., Mace K., Ghajar C., Boudreau A., Bissell M. J., Boudreau N. (2009) Endothelial cell migration and vascular endothelial growth factor expression are the result of loss of breast tissue polarity. *Cancer Res*, 69: 6721-6729.
150. Takahashi H., Shibuya M. (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 109: 227-241.
151. Waltenberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C. H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269: 26988-26995.
152. Zachary I., Glikli G. (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, 49: 568-581.
153. Hicklin D. J., Ellis L. M. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23: 1011-1027.

154. ZM323881 material sheet. Available at: <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=156230>. Accessed: 21.01., 2013.
155. Whittles C. E., Pocock T. M., Wedge S. R., Kendrew J., Hennequin L. F., Harper S. J., Bates D. O. (2002) ZM323881, a novel inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine kinase activity. *Microcirculation*, 9: 513-522.
156. Hortobagyi L., Kis B., Hrabak A., Horvath B., Huszty G., Schweer H., Benyo B., Sandor P., Busija D. W., Benyo Z. (2007) Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent of vasodilator prostanoids. *Brain Res*, 1131: 129-137.
157. Stuber I, Lohinai Z, Gyurkovics M, Korom C, Szabados L. Eljárás optikai vizsgálatok célját szolgáló, nagy vastagságú preparátumok előállítására; biológiai anyagok vastag rétegeinek élő állapotban, fiziológiás körülmények között történő vizsgálatára, továbbá preparátumok egyes struktúrái törésmutatójának szelektív meghatározására. Hivatal Magyar Szabadalmi, ed. vol. P1100081. Magyarország, 2011.
158. Stuber I, Lohinai Z, Koszorús C, Bozó C, Korom C, Gyurkovics M, Szabados L. Eljárás optikai vizsgálatok célját szolgáló, nagy vastagságú preparátumok létrehozására. Hivatal Magyar Szabadalmi, ed. vol. P1200098/3, 2012.
159. Johnsen S., Widder E. A. (1999) The physical basis of transparency in biological tissue: ultrastructure and the minimization of light scattering. *J Theor Biol*, 199: 181-198.
160. Vo-Dinh T. Biomedical photonics handbook. In, CRC Press, 2003.
161. Tuchin VV. Handbook of optical biomedical diagnostics. In, SPIE Press, 2002.
162. Tuchin VV. Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis. In, SPIE Press, 2007.
163. Stuber I. Sztereokonverter. Hivatal Magyar Szabadalmi, ed. vol. 5153/86, 1986.
164. Stuber I. Sztereomedical mérőrendszer. Hivatal Magyar Szabadalmi, ed. vol. P0800650.
165. Artese L., Piattelli A., de Gouveia Cardoso L. A., Ferrari D. S., Onuma T., Piccirilli M., Favari M., Perrotti V., Simion M., Shibli J. A. (2010) Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol*, 81: 718-726.
166. Chapple C. C., Kumar R. K., Hunter N. (2000) Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med*, 29: 500-506.

167. Lee K. Y., Lee K. S., Park S. J., Kim S. R., Min K. H., Choe Y. H., Lee Y. C. (2008) Clinical significance of plasma and serum vascular endothelial growth factor in asthma. *J Asthma*, 45: 735-739.
168. Ablonczy Z., Crosson C. E. (2007) VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res*.
169. Chen Z., Malhotra P. S., Thomas G. R., Ondrey F. G., Duffey D. C., Smith C. W., Enamorado I., Yeh N. T., Kroog G. S., Rudy S., McCullagh L., Mousa S., Quezado M., Herscher L. L., Van Waes C. (1999) Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 5: 1369-1379.
170. Svensen C. H. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in plasma increases after hip surgery. *J Clin Anesth*, 16: 435-439.
171. Monos E. A vénás rendszer élettana. SE háziyomda, Budapest, 1999.
172. Kim M. H., Harris N. R. (2006) Leukocyte adherence inhibits adenosine-dependent venular control of arteriolar diameter and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H724-731.
173. Suda O., Smith L. A., d'Uscio L. V., Peterson T. E., Katusic Z. S. (2005) In vivo expression of recombinant vascular endothelial growth factor in rabbit carotid artery increases production of superoxide anion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 506-511.
174. Stefanini M. O., Wu F. T., Mac Gabhann F., Popel A. S. (2008) A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biol*, 2: 77.
175. Bale T. L., Giordano F. J., Hickey R. P., Huang Y., Nath A. K., Peterson K. L., Vale W. W., Lee K. F. (2002) Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 7734-7739.
176. Darland D. C., Massingham L. J., Smith S. R., Piek E., Saint-Geniez M., D'Amore P. A. (2003) Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol*, 264: 275-288.
177. Yamagishi S., Yonekura H., Yamamoto Y., Fujimori H., Sakurai S., Tanaka N., Yamamoto H. (1999) Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest*, 79: 501-509.
178. Lohinai Z, Szabo C. (1998) Role of nitric oxide in physiology and pathophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit*, 4: 1089-1095.

179. Kubota T., Morozumi T., Shimizu K., Sugita N., Kobayashi T., Yoshie H. (2001) Differential gene expression in neutrophils from patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*, 36: 390-397.
180. Bullon P., Fioroni M., Goteri G., Rubini C., Battino M. (2004) Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantitis condition, and aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res*, 15: 553-559.
181. Garedew A., Moncada S. (2008) Mitochondrial dysfunction and HIF1alpha stabilization in inflammation. *J Cell Sci*, 121: 3468-3475.
182. Li J. M., Shah A. M. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287: R1014-1030.
183. Poyton R. O., Ball K. A., Castello P. R. (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 20: 332-340.
184. Chu S. C., Tsai C. H., Yang S. F., Huang F. M., Su Y. F., Hsieh Y. S., Chang Y. C. (2004) Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod*, 30: 704-707.
185. Ng K. T., Li J. P., Ng K. M., Tipoe G. L., Leung W. K., Fung M. L. (2011) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human periodontal tissue. *J Periodontol*, 82: 136-141.
186. Yamakawa M., Liu L. X., Date T., Belanger A. J., Vincent K. A., Akita G. Y., Kuriyama T., Cheng S. H., Gregory R. J., Jiang C. (2003) Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*, 93: 664-673.
187. Pradeep A. R., Prapulla D. V., Sharma A., Sujatha P. B. (2011) Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. *Cytokine*, 54: 200-204.
188. Nunez M. J., Novio S., Balboa J., Seoane J., Suarez J. A., Freire-Garabal M. (2010) Effects of resveratrol on expression of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts stimulated by periodontal pathogens. *Acta Odontol Scand*, 68: 239-247.
189. Gyurkovics M., Lohinai Z., Gyorfi A., Ivanyi I., Suveges I., Konya M., Bodor C., Szekely A. D., Dinya E., Fazekas A., Rosivall L. (2009) Venodilatory effect of vascular endothelial growth factor on rat gingiva. *J Periodontol*, 80: 1518-1523.

190. del Rey M. J., Izquierdo E., Caja S., Usategui A., Santiago B., Galindo M., Pablos J. L. (2009) Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. *Arthritis Rheum*, 60: 2926-2934.
191. Dratviman-Storobinsky O., Lubin B. C., Hasanreisoglu M., Goldenberg-Cohen N. (2009) Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. *Mol Vis*, 15: 2326-2338.
192. Gyorfı A., Fazekas A., Suba Z., Ender F., Rosivall L. (1994) Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol*, 21: 601-605.
193. Keremi B., Lohinai Z., Komora P., Duhaj S., Borsi K., Jobbagy-Ovari G., Kallo K., Szekely A. D., Fazekas A., Dobo-Nagy C., Sikiric P., Varga G. (2009) Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 7: 115-122.
194. Lohinai Z., Mabley J. G., Feher E., Marton A., Komjati K., Szabo C. (2003) Role of the activation of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase in the pathogenesis of periodontitis. *J Dent Res*, 82: 987-992.
195. Lohinai Z., Stachlewitz R., Virag L., Szekely A. D., Hasko G., Szabo C. (2001) Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res*, 80: 470-475.
196. Donoghue L., Tyburski J. G., Steffes C. P., Wilson R. F. (2006) Vascular endothelial growth factor modulates contractile response in microvascular lung pericytes. *Am J Surg*, 191: 349-352.
197. Zhang N., Fang Z., Contag P. R., Purchio A. F., West D. B. (2004) Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood*, 103: 617-626.
198. Zoellner H., Chapple C. C., Hunter N. (2002) Microvasculature in gingivitis and chronic periodontitis: disruption of vascular networks with protracted inflammation. *Microsc Res Tech*, 56: 15-31.
199. Wynne S. E., Walsh L. J., Seymour G. J. (1988) Specialized postcapillary venules in human gingival tissue. *J Periodontol*, 59: 328-331.
200. Zoellner H., Hunter N. (1994) The vascular response in chronic periodontitis. *Aust Dent J*, 39: 93-97.
201. Zoellner H. F., Hunter N. (1989) High endothelial-like venules in chronically inflamed periodontal tissues exchange polymorphs. *J Pathol*, 159: 301-310.

202. Duh E., Aiello L. P. (1999) Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes*, 48: 1899-1906.
203. Katz J. (2001) Elevated blood glucose levels in patients with severe periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 28: 710-712.
204. Merlak M., Kovacevic D., Balog T., Marotti T., Misljenovic T., Mikulicic M., Dekaris I. (2008) Expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Coll Antropol*, 32 Suppl 2: 39-43.
205. Lucarini G., Zizzi A., Aspriello S. D., Ferrante L., Tosco E., Lo Muzio L., Foglini P., Mattioli-Belmonte M., Di Primio R., Piemontese M. (2009) Involvement of vascular endothelial growth factor, CD44 and CD133 in periodontal disease and diabetes: an immunohistochemical study. *J Clin Periodontol*, 36: 3-10.
206. Okon K., Stachura J. (2007) Increased mast cell density in renal interstitium is correlated with relative interstitial volume, serum creatinine and urea especially in diabetic nephropathy but also in primary glomerulonephritis. *Pol J Pathol*, 58: 193-197.
207. Geoffrey R., Jia S., Kwitek A. E., Woodliff J., Ghosh S., Lernmark A., Wang X., Hessner M. J. (2006) Evidence of a functional role for mast cells in the development of type 1 diabetes mellitus in the BioBreeding rat. *J Immunol*, 177: 7275-7286.
208. Donaghue K. C., Chiarelli F., Trotta D., Allgrove J., Dahl-Jorgensen K. (2009) Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*, 10 Suppl 12: 195-203.
209. Aiello L. P., Wong J. S. (2000) Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl*, 77: S113-119.
210. Guneri P., Unlu F., Yesilbek B., Bayraktar F., Kokuludag A., Hekimgil M., Boyacioglu H. (2004) Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol*, 75: 91-97.
211. Aspriello S. D., Zizzi A., Lucarini G., Rubini C., Faloia E., Boscaro M., Tirabassi G., Piemontese M. (2009) Vascular endothelial growth factor and microvessel density in periodontitis patients with and without diabetes. *J Periodontol*, 80: 1783-1789.
212. Durham J. T., Herman I. M. (2011) Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*, 11: 253-264.

213. Keles G. C., Cetinkaya B. O., Eroglu C., Simsek S. B., Kahraman H. (2010) Vascular endothelial growth factor expression levels of gingiva in gingivitis and periodontitis patients with/without diabetes mellitus. *Inflamm Res*, 59: 543-549.
214. Unlu F., Guneri P. G., Hekingil M., Yesilbek B., Boyacioglu H. (2003) Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol*, 74: 181-187.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. Gyurkovics M, Lohinai Z, Gyórfi A, Iványi I, Süveges I, Kónya M, Bodor C, Székely A.D., Dinya E, Fazekas Á, Rosivall L. (2009) Venodilatory effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on rat gingiva. *J Periodontol*, 80: 1518-1523. IF=2.192 (2009)
2. Gyurkovics M, Lohinai Z, Gyórfi A, Bodor C, Székely AD, Dinya E, Rosivall L. (2012) Microvascular regulatory role and increased expression of vascular endothelial growth factor receptor type 2 in experimental gingivitis. *J Periodontal Res*, doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01520.x. [Epub ahead of print]. IF=1.686 (2011)

10.2 A disszertációtól független publikációk

1. Iványi I, Gyurkovics M, Várnagy E, Rosivall L, Fazekas A. (2008) Comparison of guttapercha points of different brands. *Fogorv Sz*, 101(2): 65-9.
2. Herczegh A, Ghidan A, Gyurkovics M, Bedő Z, Lohinai Z. (2013) Effectiveness of a high purity chlorine dioxide solution in intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm eliminating. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 60(1): 63-75. IF=0,787 (2011)

11. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönöm édesanyámnak, aki támogatta azon döntésemet, hogy elinduljak a fokozatszerzés rögzös útján és mindvégig pártomat fogta. Hálával tartozom továbbá édesapámnak, akitől örökölt kaptam a tudomány iránti elhivatottságot és bízok benne, hogy sikerem kárpótolja abban, hogy zseniális felfedezései egyelőre nem kerültek be a szakirodalomba. Köszönöm Domanyik Szilviának, aki egyként mellettem állt és támogatott a véghajrában, valamint dr. Zöldág Lászlónak, aki az elkészült anyag 5 példányos nyomtatását biztosította.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Lohinai Zsoltnak, aki mindig kész volt segíteni rajtam és az utolsó pillanatig tartotta bennem a lelket. Úgy érzem, hogy időnként ő több munkával járult hozzá a sikerhez, mint én. Örülök, hogy a kezdetektől fogva barátomnak mondhatom őt.

Köszönöm laborvezetőmnek, dr. Rosivall Lászlónak, aki egyfelől a helyszín biztosításával lehetővé tette, hogy vizsgálatsorozatunk létrejöjjön, másfelől az elkészült tudományos anyagok lektorálásával is óriási segítséget nyújtott. Szakmai és neveltetési célzatú „atyai” tanácsait mindig örömmel fogadtam. Köszönöm dr. Iványi Ivánnak, egy igaz barátnak, akitől rengeteget tanultam mind szakmailag, mind emberileg és hozzásegített ahhoz, hogy folytassam ott a munkát, ahol ő befejezte. Köszönöm dr. Fazekas Árpádnak, aki sokat segített tudományos pályám indulásakor és a későbbiekben is messzemenően támogatott. Köszönöm dr. Gyórfi Adriennek, aki a témám címét „megálmodta”, valamint mindig számíthattam megfontolt tanácsaira, javaslataira. Köszönöm dr. Stuber Istvánnak, akit korunk egyik zsenijének tartok a mikroszkópia és az optika területén és külön hálával tartozok neki azért, hogy részt vehetek abban a két szabadalomban, melyekben az ő ötleteit ötvöztük az általunk végzett vizsgálatokkal. Köszönöm a Ph.D. időszakom alatti intézetvezetőmnek, dr. Nyárasdy Idának és dr. Tóth Zsuzsannának, hogy támogattak törekvéseim elérésében és biztosították számomra, hogy mind a szükséges idő, mind pedig a szükséges eszközök rendelkezésemre álljanak munkám végzéséhez. Kiváltságosnak érezhettem magam, mivel megengedték, hogy a fókuszom a tudományra szegeződjön, sokszor a betegellátás

vagy éppen az oktatás háttérbe szorításával. Nagyon köszönöm egykori diákkörösömnek, immáron kolléganőmnek, dr. Nagy Izabellának, aki segített a gyakorlati munka oroszánrészének elvégzésében és hatalmas mértékben járult hozzá ahhoz, hogy átfogó tudományos anyagunk összeálljon. Ugyanitt szeretném megköszönni két további diákkörösömnek, akiket azóta szintén kollégaként üdvözölhetek, dr. Kis Patriknak és dr. Berkei Gábornak. Lelkesen és szorgalmasan járultak hozzá a közös sikerhez. Köszönöm a segítséget továbbá dr. Dinya Eleknek, aki nélkül elvesztünk volna a statisztika feneketlen tengerében, valamint mindazoknak akik a saját szakterületükkel és munkájukkal hozzájárultak eredményeinkhez: dr. Székely Andrea Dorottyának, dr. Zachar Gábornak és Bakó Máriának az immunhisztokémiai vizsgálatokért, dr. Bodor Csabának a western blot analízis elvégzéséért, dr. Molnár Miklósnak, Varga Júliának, dr. Kriston Tündének és dr. Mózes Miklósnak akikhez mindig fordulhattam segítségért, valamint dr. Süveges Ibolyának, dr. Kónya Máriának és dr. Komora Péternek, továbbá minden egykori diákkörösünknek, többek között dr. Váry Melindának, dr. Radó Stefániának és dr. Révész Bencének, és mindenkinek aki még rajtuk kívül hozzásegített a munka elkészültéhez.