

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

Doktori tézisek

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, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Hermann Péter egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Márton Ildikó egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Molnár Miklós egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2012

1. BEVEZETÉS

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktorról (VEGF) köztudott, hogy endotéliumhoz köthető hatásait (pl.: erek permeabilitásának növelése, endotél sejtek osztódásának szabályozása, érújdonképződés, stb.) 2-es típusú receptorán (VEGFR2) keresztül fejti ki. Mindazonáltal korlátozott mennyiségű információnk van a fogíny mikrokeringésben betöltött szabályozó szerepéről, kiváltképpen a fogíny venulákkal összefüggésben. Számos tanulmányban beszámoltak már a VEGF vazodilatátor hatásáról is, ám ezt rendszerint az artériákon vizsgálták, holott közismert a vénás rendszer élettanának fontossága. Az általunk is vizsgált, posztkapilláris venulák jelentőségét mutatja, hogy a fehérvérsejtek adhéziója, rollingja, vándorlása és exudációja itt zajlik csakúgy, mint a mikrocirkuláció ellenállásának szabályozása. Továbbá a posztkapilláris venulák kulcs szerepet játszanak a születés utáni angiogenezisben, együttműködve az itt található pericitákkal. Azok a kísérleti kutatások, amelyek a 2-es típusú VEGF receptor lokalizációjával, funkcióival és más molekulákkal (pl.: nitrogén-monoxid (NO)) végbemenő interakcióival foglalkoznak, új terápiás utakat nyithatnak mind a szöveti atrófia, mind a parodontitisz elleni harcban. Munkacsoportunk az eredetileg alkalmazott intravitálmikroszkópos protokollal azonban a mélyebben fekvő képleteket a gingiva hámjának és kötőszövetének optikai tulajdonságai miatt nem tudta megfigyelni. Gondot okozott továbbá, hogy az érátmérő változások mérésénél a dimenzióvesztés miatt csak egy síkban tudtuk elvégezni a kiértékelést a

vizsgálat közben készített felvételeken. Szükségessé vált ezért egy új vizsgálati eljárás kidolgozása is. Ennek első lépését képezte egy olyan anyag kifejlesztése, mely 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 három dimenziós (3D) kiértékelést tenne lehetővé.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Általános célkitűzésünk az volt, hogy a VEGF és VEGFR-2 gingivális venulák érátmérő 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 N^G-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.

3. MÓDSZEREK

3.1. 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 oldatot (ZM323881, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyész-mérnöki és Biomérnöki Karán szintetizálták) cseppentettünk (20 μ g/ml, n=7).

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 (N_G -nitro-L-arginine-metil-észter [L-NAME] CAS #51298-62-5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.; 1 mg/ml az ivóvízben, *ad libitum*) előkezeltük. 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. Az állatok felénél (n=7) ebben a csoportban is előkezelést végeztünk, méghozzá 6 héttel vizsgálataink előtt iv. streptozotocinnal (85882 Fluka $\geq 98.0\%$ (HPLC) N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diabétesz mellituszt indukáltunk. A csoport másik fele (n=7) nem kapott előkészítést és kontrollként szolgált. A vizsgálat elvégzésekor mindkét csoportban az állatok ínyére ZM323881-et cseppentettünk (20 µg/ml).

8. Az ebben a csoportban szereplő vizsgálati állatokat (n=16) az általunk fejlesztett fiziológizált trietanolamin (TEA), dietanolamin (DEA) és monoetanolamin (MEA) alapú átderítő oldatokkal kezeltük és teszteltük ez utóbbiak hatását *in vitro* az eltávolított szöveteken (harántcsíktolt izom, állkapocs alatti mirigy, vékonybél), valamint *in vivo* a valós 3D vitálmikroszkópos rendszerünkkel.

3.2. 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 vezettünk 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 rectalis 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 vizsgálati területet 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, mely egyben a terület fényvédelmét is biztosította, 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 mind a vizsgálati, mind a hozzá tartozó kontroll csoport esetén. 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 μ m-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 μ m-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 (SureFil, Dentsply, York, PA, USA) helyeztünk a plakkretenció fokozása érdekében. Egy hét elteltével a ligatúras állatok (n=7) ínyére ZM323881-et cseppentettünk a fent ismertetett módszer szerint. A kísérletes diabéteszes állatoknál (7. csoport, n=7) 6 héttel az 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.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az 1., 6. és 7. csoportnál négy-négy vizsgálati állatból eltávolítottuk a papilla incisívát, és a kivett szövetdarabot 4 %-os paraformaldehid oldatba helyeztük, majd az ilyen módon fixált mintával immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. Az így nyert szövetdarabokat paraffinba ágyaztuk, majd ebből 12 μ m 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 foszfát-pufferolt sóoldat [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).

3.4. Western blot vizsgálat

A Western Blot analízis során a patkányoknál (1. (kontroll), 6. (kísérletes gingivitisz), 7. (kísérletes diabétesz) csoport), 3-3 vizsgálati állatából 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-inhibítor koktéllal (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). A minták fehérje koncentrációját BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, USA). A szövetlízátumokat 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).

3.5. Statisztikai analízis

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk W tesztel 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 félé 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. EREDMÉNYEK

Egyik VEGF, illetve ZM323881 oldat sem változtatta meg szignifikánsan a szisztémás vérnyomást (kiindulás: $125/85 \pm 8$ Hgmm). A vizsgálati protokollunkban meghatározott időszak alatt sem a fiziológiás-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 szignifikáns venodilatációt hozott létre a cseppentést követő 5. és a 15. percben (2. vizsgálati csoport). A ZM323881 önmagában való alkalmazása (3. csoport) nem hozott létre szignifikáns változást a venulák átmérőjében. Ha a ZM323881-el történő előkezelést követően VEGF-et is cseppentettünk, szintén nem láttunk szignifikáns érátmérő-változást (4. csoport). Az L-NAME-val történő előkezelés (5. csoport) szignifikánsan megnövelte a szisztémás vérnyomás alapértékét ($155/120 \pm 12$ Hgmm), és csökkentette a venulák alapátmérőjét a kontrollhoz viszonyítva ($35 \pm 2 \mu\text{m}$ vs. $44 \pm 2 \mu\text{m}$). Az L-NAME előkezelést követően alkalmazott VEGF nem módosította a szisztémás vérnyomást. Az L-NAME előkezelés megakadályozta a $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú VEGF venodilatációs hatását (5. csoport).

A gingivális arteriolák és venulák falában a VEGFR2 elleni antitest hatására gyenge immunpozitivitást tapasztaltunk. Immunreakció látható az erek endotéliumában, az érfal legbelső rétegében, ahol a sejtmagok párhuzamosan helyezkednek el az erek hossz tengelyével, ugyanakkor pontszerű immunjelölés látható az erek következő, muszkuláris rétegében is. Az erek körül megfigyelhető periciták is helyenként enyhe immunreakciót mutattak.

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 esetben megnőtt a venulák kiindulási érátmérője a kontrollhoz viszonyítva (gingivitisz: 51 ± 8 μm vs. 27 ± 2 μm ; diabétesz: 47 ± 1 μm vs. 28 ± 2 μm).

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 fogínyű állatoknál mért adatokhoz képest.

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

Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján gingivitiszben a VEGFR2 expresszió szignifikánsan megnőtt az erek falában, míg a kontroll csoport esetén nem vagy csak gyenge immunpozitivitást detektáltunk.

A ligatúrák állatokból kimetszett mintákban magas fokú immunreaktivitás mutatkozott mind az érfalban, mind az erek körüli területen. Az arteriolák és venulák mindegyik intramurális komponensénél VEGFR2 immunpozitivitást kaptunk, beleértve a legbelső, endotélium réteget is.

Ehhez hasonlóan nagyfokú immunreaktivitást, helyenként pontszerű lerakódásokat tapasztaltunk az endotélium körüli simaizom rétegben és immunpozitív fibroblasztot is találtunk.

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.

A diabéteszes állatokból nyert szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata alapján azt tapasztaltuk, hogy a VEGFR2 expresszió szignifikánsan megnőtt a venulák mellett nagy számban megjelenő hízósejtekben a kontroll csoporthoz képest, ahol rendkívül gyenge immunpozitivitást detektáltunk és hízósejteket is alig találtunk.

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

A vizsgált szövetek (Wistar hím patkányokból kivett harántcsíkt izom, állkapocs alatti mirigy, vékonybél) abszorpciójának változását a különböző oldatok hatására (TEA, TEA-DEA keverék, MEA) 460 nm-en microplate readerrel mérve az alábbi eredményeket kaptuk. TEA esetén szignifikáns abszorpció csökkenést állapítottunk meg az izomszövetnél a kontrollhoz (fiziológiás 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.

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.

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.

A fiziofiziológizált TEA oldatunkkal végzett *in vivo* előkísérleteink során látványos transzparencia növekedést kaptunk a vizsgált fogínyszövetben.

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

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink azt mutatják, hogy

1. Az általunk használt módszer alkalmas a vizsgálat elvégzéséhez, mivel maga a cseppentés a kontroll, fiziofiziológias sóoldat felhasználásával nem okozott semmiféle érátmérő változást a fogíny venulákon.

2. Fiziológias 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 transzluens vitálmikroszkópia új, ígéretes területét nyithatja meg a kutatásnak.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

6.1.1. Impakt faktoros cikkek

1. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi A, Iványi I, Süveges I, Kónya M, Bodor C, Székely AD, Dinya E, Fazekas A, Rosivall L. (2009) Venodilatory effect of vascular endothelial growth factor on rat gingiva. *J Periodontol*, 80(9): 1518-1523. IF=2.192 (2009)

2. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi 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)

6.1.2. Idézhető absztraktok

1. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi A, Bodor C, Fazekas A, Nyárasdy I, Rosivall L. (2008) The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental gingivitis. *J Vasc Res*, 45(2): 129.

2. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi A, Iványi I, Süveges I, Kónya M, Bodor C, Baintner K, Fazekas Á, Rosivall L. (2007) Examination of the venodilatory effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in rat gingiva. *Acta Phys Hung*, 94(4): 345.

3. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi A, Bodor C, Fazekas Á, Nyárasdy I, Rosivall L. (2009) The VEGF production rises in experimental gingivitis. *Acta Phys Hung*, 96(1): 78.

4. Gyurkovics M, Lohinai Z, Györfi A, Bodor C, Fazekas Á, Nyárasdy I, Rosivall L. (2010) Gingival venule diameter is regulated through the increased VEGF expression in experimental diabetes. *Acta Phys Hung*, 97(1): 104-105.

5. Gyurkovics M, Stuber I, Berkei G, Kis P, Rosivall L, Korom C, Lohinai Z. (2011) New approach in vital microscopy: Three-Dimensional Transparent Imaging. *Acta Phys*, 202(684): 25.

6. Gyurkovics M, Stuber I, Berkei G, Kis P, Korom C, Rosivall L, Lohinai Z. (2011) Development of Translucent Three-dimensional Vital Microscopy in Dental Research. *J Dent Res*, 90(S B): 269.

6.2 A disszertációtól független publikáció

1. Iványi I, Gyurkovics M, Várnagy E, Rosivall L, Fazekas A. (2008) Comparison of guttapercha points of different brands. *Fogorv Sz*, 101(2): 65-69.

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)