

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Anthocyaninok szerepe a szájüregi egészség
fenntartásában**

Dr. Skopkó Boglárka Emese

Témavezetők: Dr. Remenyik Judit és Dr. Bágyi Kinga Ágnes



DEBRECENI EGYETEM
Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Anthocyaninok szerepe a szájiüregi egészség fenntartásában

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

Írta: Dr. Skopkó Boglárka Emese okleveles fogorvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája
keretében

Témavezetők: Dr. Remenyik Judit, PhD és Dr. Bágyi Kinga Ágnes, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Turzó Kinga Mónika, PhD
Dr. Leiter Éva Julianna, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, az MTA doktora
tagok: Dr. Turzó Kinga Mónika, PhD
Dr. Leiter Éva Julianna, PhD
Prof. Dr. Kovács Árpád, PhD
Dr. Stájer Anette, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászat Intézet tanterme, 2025. február 20. 12:00

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	4
CÉLKITŰZÉSEK.....	6
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	7
EREDMÉNYEK.....	9
<i>Proinflammatorikus citokinek, mucinok, melatonin szintje nyugalmi- és ingernyálban.....</i>	<i>9</i>
Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása	9
<i>A fogkefecsere hatásának vizsgálata.....</i>	<i>10</i>
Nyugalmi nyál	10
Ingernyál	10
<i>Mikrobiom vizsgálata nyugalmi- és ingernyálban.....</i>	<i>10</i>
Alfa diverzitás.....	10
Béta diverzitás	11
A DMF-T korrelációja a leggyakoribb genusokkal nyugalmi nyálban	12
Kiemelt family-k és genusok nyugalmi nyálban	12
Potenciális biofilmképzők aránya nyugalmi nyálban	12
Speciesek relatív gyakorisága nyugalmi nyálban.....	13
Mikrobiális hálózatok felépítése a fogkefecsere alapján.....	13
Ingernyál core mikrobiom	13
A mucinok, melatonin és a citokinek korrelációja az ingernyál mikrobiótával.....	14
MEGBESZÉLÉS.....	15
Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata nyugalmi nyálban	15
Nyugalmi nyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációnkban	16
Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata ingernyálban	16
Ingernyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációnkban	17
Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása.....	17
ÖSSZEFOGLALÁS.....	18
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	19
<i>A jelöltnek az értekezés témájában született publikációinak a Kenézy Könyvtár által hitelesített listája</i>	<i>21</i>
<i>Publikációk, konferenciák jegyzéke:.....</i>	<i>23</i>
<i>Köszönetnyilvánítás.....</i>	<i>24</i>

BEVEZETÉS

A szájüregi mikrobiom modulálásának számos kémiai és mechanikai módszere lehet. Fontos a betegek által otthonukban is könnyen kivitelezhető, szájüregi mikrobiomot előnyösen befolyásoló módszerek megtalálása és a szájüregi egészség fenntartásában szerepet játszó, nyálban található védő faktorok, a szájüregi egészség követésére alkalmas biomarkerek vizsgálata.

A proinflammatorikus citokinek termelése a fogak felületén autokrin és parakrin módon indul el a mikroorganizmusokra (pl. LPS) adott válaszreakció eredményeként. A citokinek és mucinok közötti komplex interakciók hatásmechanizmusának ismeretében a természetes hatóanyagok alkalmazásának eredményessége a nyálból történő egyszerű mintavétel segítségével monitorozható.

A tobozmirigyben termelődő melatonin, amelynek szintje a szervezet cirkadián ritmusának megfelelően változik, a nyálban is kimutatható. Nagyon erős antioxidáns hatással rendelkezik, amely a fogszuvasodás elleni védelemben is megmutatkozik.

A nyálban megtalálható számos faktor a kommenzális mikrobiom fenntartásában és a patogén mikrobák felszaporodásának gátlásában, ezáltal a fogak védelmében játszik szerepet. Ebben a folyamatban védő szerepet töltenek be a mucinok, amelyek az egyensúlyi állapot felbomlásának előjelezői, a védelmi folyamatok elindítói pedig a nyálban megtalálható gyulladáscsökkentő citokinek. A mucinok számos funkcióval rendelkeznek, talán a legfontosabb, hogy a szájüregi biofilmben és az emésztőtraktusban megtalálható baktériumokkal interakcióban, azok növekedését, letapadását, védelmét biztosítják vagy nyállal való kiürülésük által fenntartják a szájüregi mikro-ökoszisztéma egyensúlyát. A nyálban 'polimikrobiális aggregátumok' formájában elhelyezkedő mikroorganizmusokból indul el a plakk akkumulációja. A mikroorganizmusok a nyál makromolekuláihoz (pl. mucinok) is kötődhetnek, amely a nyeléssel elősegíti a szájból való kiürülésüket. A mucinok a kommenzális baktériumokra is pozitív hatással vannak, ugyanis prebiotikus tulajdonságaiknak köszönhetően, azok szaporodását elősegítik.

A meggy (*Prunus cerasus* L.) színanyagai az anthocyaninok (AC), amelyek antioxidáns tulajdonságaiból adódó egészségre kifejtett előnyös hatásai miatt számos betegség kezelésénél, a cukorbetegség, szív- és érrendszeri betegségek; fogszuvasodás esetében is pozitív eredményeket észleltek. In vitro vizsgálatok eredményei alapján a meggy Gram-negatív anaerob orális baktériumok (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum*) és *Candida albicans* ellen is hatékony. Humán nyálmintákból anthocyaninos

rágógumizást követően a fogszuvasodásban jelentős szerepet játszó *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) telepszámának és a nyál amiláz aktivitásának csökkentését sikerült igazolni.

CÉLKITŰZÉSEK

-Kontrollidőszakot követő 2 hetes (napi háromszori) anthocyaninos rágógumi használat és a fogkefecsere ezen faktorok szintjére való hatásainak vizsgálata fiatal felnőtt (18-30) és felnőtt (31-45), egészséges száj státuszú populációban nyugalmi- és hatóanyag nélküli rágózást követő ingernyál mintavételekkel. A nyálban található proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α), mucinok (MUC5B, MUC7), melatonin és ionok összetételének általános laboratóriumi elemzése.

-A kontrollidőszakot követő depurálás után a vizsgált populációban a fogkefecsere és depurálás hatásainak vizsgálata ezen biomarkerekre és ionokra, a nyugalmi- és ingernyál 16S rRNS szekvenálás eredményeinek elemzése.

-A vizsgálat során ezen biomarkerek és a mikrobióta közötti összefüggések vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatokat a Nemzeti Népegészségügyi Központ és az ETT TUKEB által kiadott, IV/1120-1/2020/EKU ügyiratszámú engedély (protokoll azonosítója: 6709-8/2020 EÜIG) alapján végeztük, amely a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsághoz bizottsághoz való kérelem beadását (protokoll azonosítója: 5379-2019) követően, a nyál mikrobiom vizsgálatok miatt került további felterjesztésre és elfogadásra. A kutatási terv felállítása a Helsink Deklarációnak megfelelően történt. A 2022-IV/1120-1/2020 számon a <https://clinicaltrials.gov/> oldalon is regisztráltuk a tanulmányt.

A kísérlet egy önkontrollos, multicentrikus vizsgálat volt a Debreceni Egyetem Komplex Rendszerek és Mikrobiom-innovációk Központ (KRéMK), a Fogorvostudományi Kar és a Gyógyszerésztudományi Kar között.

A résztvevők jó szájhigiéniével rendelkező, jó általános állapotú 18 és 45 év közötti személyek voltak, akiket két korcsoportba osztottunk be: az I. korcsoport tagjai 18-30 év közöttiek, a II. korcsoport tagjai 30-45 év közöttiek voltak. A mintavételekkel kapcsolatos szóbeli tájékoztatást követően a Betegtájékoztató és a Beleegyező nyilatkozatok kiadása történt, amelyek elolvasása után a résztvevők írásos beleegyezésével kezdtem el a mintavételeket. A kizárási kritériumok között szerepelt a 2 hónapon belüli antibiotikum-kezelés, így a vizsgálat közben beindított antibiotikum-kezelés, továbbá az egészségi állapotában bekövetkező, a vizsgálatot befolyásoló változás is a vizsgálat befejezését tette volna indokolttá az adott személy számára, amelyre egyik résztvevőnél sem került sor. A résztvevők beválogatása során a páciensek fogászati státuszának felvétele egy előre elkészített státuszlapon történt.

Önkontrollos vizsgálatokat végeztünk, amelyek során a páciensek 3 héten keresztül, megadott napokon (0. nap: a legelső mintavételi időpont, 4. nap: a második mintavételi időpont és a 7. nap: az adott hét utolsó mintavételi időpontja, amely mindig megegyezett a következő hét 0. napi mintavételi időpontjával) jelentek meg 11:00 és 14:00 közötti időszakban, a cirkadián ritmus figyelembevételével meghatározott időpontban. A vizsgálat első hete volt a kontroll periódus (B), amely során anthocyaninos rágózás nem történt, csak az ingernyál minták vételét megelőzően történt hatóanyag nélküli rágó elrágása. A 2. hét (F1 periódus) 0. napján a mintavételt követően depurálás történt, ezután hetente adtuk ki az anthocyanin-tartalmú meggyes rágógumit a résztvevőknek. A rágógumit a főétkezéseket követő fogmosás után kértük kb. 1-5 perces időintervallumig elrágni, a mintavételezés a megadott napokon történt folyamatosan további 2 héten keresztül (2. hét: F1 periódus, 3. hét: F2 periódus), hogy az

anthocyanin-tartalmú meggyes rágógumi folyamatos hatásait vizsgálni tudjuk. A 2 hetes rágózási intervallum alatt a megadott napokon történt a mintavételezés. Az ingernyál minták levétele külön vizsgálatban történt, a résztvevőknek a helyszínen adott hatóanyag nélküli rágógumi kiadásával, a nyugalmmal megegyező kontroll és 2 hetes anthocyaninos rágózás periódusaiban.

A résztvevőket több szempont alapján is csoportosíthattuk: életkor, nem és az általunk kialakított egyik szempont az volt, hogy az 1 hetes kontrollperiódus végén, az anthocyaninos rágógumi kiadásakor amellet, hogy a résztvevők a szájhygiénés szokásaikat megtartották, 10 fő a depurálást követően kérésünkre lecserélte a fogkefjét, míg a másik 10 fő nem cserélt fogkefét.

Az anthocyanin-tartalmú rágógumi kifejlesztése és előállítása a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Karának Gyógyszertechnológia Tanszékén Dr. Váradi Judit és munkatársai által történt. Homoki és munkatársai korábbi kísérleteiben alkalmazott formulációnak megfelelően történt a rágógumik előállítása. A „Csengődi csokros” fajtaba tartozó ”VN1” meggyfajtából készült a vizsgálatban alkalmazott rágógumi.

A laboratóriumi vizsgálatok során a nyugalmi- és ingernyál mintákból ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), PCR (Polymerase Chain Reaction) és 16 S rRNS (Svedbers riboszomális ribonukleinsav) vizsgálatokat végeztünk.

ELISA vizsgálatok során sandwich immunoassay-val határoztuk meg a Mucin 5B (MUC5B), Mucin7 (MUC7), Interleukin 1 β (IL-1 β) és az Interleukin 6 (IL-6) koncentrációját. Ezen kívül Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukin 2 (IL-2) és Interleukin 6 (IL-6) meghatározása történt. A melatonin szinteket pedig kompetitív ELISA-val határoztuk meg.

qPCR-el mértük az Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6) és Tumor Necrosis Factor α (TNF α) mRNS (messenger ribonukleinsav) expresszióját.

A 16 S rRNS mikrobiom szekvenálás az Illumina MiSeq Systemben történt, a bioinformatikai elemzéseket pedig QIIME 2 (verzió: 2021.8) pipeline-ban (<https://qiime2.org/>) a Human Oral Microbiome Database (HOMD, <http://hcmd.org/>, ver.: 15.23, letöltve: 2023.08.01.) alkalmazásával végeztük el.

A nyugalmi- és ingernyál minták α és β diverzitás elemzését, utóbbi ábrázolását Metacoderrel heat tree formátumban végeztük el. A core micrombiome meghatározására a magmikrobiomokat az összes nyálminta 100%-ában képviselt OTU-k segítségével vettük figyelembe. Klaszteranalízist végeztünk a baktérium nemzetségek vonatkozásában a mucinok, citokinek és melatonin relatív génexpressziójával és fehérjekoncentrációjával Pearson-korreláció segítségével.

EREDMÉNYEK

A korcsoportok alapján az I. korcsoport átlagéletkora 26.8 ± 2.04 , DMF-T értéke 4.9 ± 4.38 , míg a II. korcsoport átlagéletkora $36,3 \pm 3.83$, DMF-T értéke pedig 8.9 ± 4.91 volt. Pearson korrelációval szignifikáns, negatív korreláció (-0,48) mutatkozott a résztvevők DMF-T ($6,9 \pm 4,97$) és BPE ($0,43 \pm 0,34$) indexe között.

Proinflammatorikus citokinek, mucinok, melatonin szintje nyugalmi- és ingernyálban

Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása

A Ca^{2+} koncentrációk ingernyálban az időfüggés tekintetében is szignifikáns növekedést mutattak az ingernyál fogkőeltávolítást megelőző mintavételekor, a kontroll és a 11. nap ($p=0.0002$) és a 21. nap ($p<0.00001$) között. A MUC5B, IL-1 β mRNS, TNF α , TNF α mRNS, melatonin, MUC7 és Ca^{2+} esetében általánosságban az ingernyál értékek, míg az IL-1 β (nem szignifikáns), IL-2 és IL-6 esetében a nyugalmi nyál értékek voltak szignifikánsan magasabbak.

A fogkefecsere hatásának vizsgálata

Nyugalmi nyál

Nyugalmi nyálban szignifikáns eltéréseket találtunk a csoportok között a TNF α és a MUC7 értékeinél a fogkő-eltávolítás napján vett mintái esetében.

Az IL-1 β mRNS expresszió szignifikáns eltéréseket mutatott a két csoport, valamint a fogkefecszerélők kontroll és 10. napi értékei között, azonban a kezelés végére szintje mindkét csoportban lecsökkent.

A Pearson-korreláció eredményei alapján szignifikáns pozitív korreláció mutatkozott a nem fogkefecszerélők esetében az IL-2 és a melatonin között (0.96). Az IL-2 és MUC7 között viszont szignifikáns, negatív korreláció (-0.95) volt megfigyelhető a nem fogkefecszerélők esetében.

Ingernyál

Ingernyálban, a MUC5B esetében a fogkefecszerélők kontroll értékéhez képest a nem fogkefecszerélők minden értéke szignifikánsan alacsonyabb volt. Hasonló eredmény volt látható a melatonin értékeiben, ahol a fogkefecszerélő kontroll (11.7) a nem fogkefecszerélő 10. kezelési napjához (7.1) képest volt szignifikánsan magasabb. További szignifikáns eltérés mutatkozott az IL-6 esetében.

Pearson-korreláció eredményei szerint fogkefecszerélőknél az IL-6 és MUC5B (0.95), az IL-6 és melatonin (0.98), a MUC5B és melatonin (0.9) szignifikánsan pozitívan korreláltak, míg nem fogkefecszerélőknél az IL-6 és IL-2 szignifikánsan, de negatívan (-0.91) korreláltak egymással.

Mikrobiom vizsgálata nyugalmi- és ingernyálban

Alfa diverzitás

Az alfa diverzitás tekintetében nyugalmi nyálban a kontroll és az F2 mintavételi időponthoz képest az F1 fázisban emelkedett érték volt látható.

A nyugalmi- és ingernyál összehasonításakor mindegyik diverzitás esetében magasabb értékeket találtunk nyugalmi nyálban, mint ingernyálban.

A fogkefecsere alapján a *Chao1* és a *Shannon-diverzitás* egyértelműen a fogkefét nem cserélő csoportban mutatott alacsonyabb diverzitást, mint a fogkefecserélőknél ingernyalban. A *Faith* és *Simpson-diverzitás* tekintetében a tendencia itt is ugyanaz volt.

Béta diverzitás

A Weighted Unifrac-elemzés során a fogkefecsere alapján két jól elkülönülő csoportot találtunk. Egy taxonómiai heat-tree ábrázolással különítettük el a fogkefecsere alapján képzett csoportokra jellemző baktérium összetételt, amely a Wilcoxon rank sum test alapján szignifikánsnak bizonyult.

A DMF-T korrelációja a leggyakoribb genusokkal nyugalmi nyálban

A 20 leggyakoribb genera DMF-T vel való korrelációja alapján a *Clostridia_UCG.014* (0.528), *Prevotella* (0.322), *Fusobacterium* (0.224), *Selenomonas* (0.228) és az *Oribacterium* (0.289) pozitív, míg a *Lachnoanaerobaculum* (-0.622), *Neisseria* (-0.436), *Porphyromonas* (-0.254) és *Granulicatella* (-0.205) negatív korrelációt mutattak a DMF-T-vel.

Kiemelt family-k és genusok nyugalmi nyálban

Mindkét csoportban a legnagyobb \log_2 arány a family *Fusobacteriaceae* (NBR/B: 2.207, BR/B: 2.206), majd a *Cardiobacteriaceae* (NBR/B: 1.31, BR/B: 1.446) esetében volt észlelhető. Ugyanezek a tendenciák voltak láthatóak a genus *Fusobacterium* (NBR/B: 2.207, BR/B: 2.206) és *Cardiobacterium* (NBR/B: 1.31, BR/B: 1.446) esetében a kontrollidőszakban, összehasonlítva a rágózás időszakával.

Potenciális biofilmképzők aránya nyugalmi nyálban

Az *Absconditabacteria_(SR1)_[G_1]*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* és *Saccharibacteria (TM7)_[G-5]* genusok mutatták a legnagyobb \log_2 arányt az NBR-ben, míg a BR főleg *Leptotrichiából*, *Neisseriából* és *Haemophilusból* épült fel.

Speciesek relatív gyakorisága nyugalmi nyálban

A leggyakrabban észlelt speciesek a *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas pasteri*, *Rothia mucilaginosa*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar* és *Veillonella rogosae*.

Mikrobiális hálózatok felépítése a fogkefecsere alapján

Az NBR-ben a *Streptococcus* genus erős pozitív asszociációt mutatott a *Gemellával* (0.99), *Neisseriával* (0.99), *s_Neisseria perflavával* (0.95) és *Haemophilussal* (0.79). A *Streptococcus* a BR-ben a lila csoport tagja volt, amely a legerősebb pozitív asszociációt mutatta a *Prevotella veroralissal* (0.95), *Granulicatellával* (0.94) és *Rothiával* (0.92).

Ingernyál core microbiom

Az összes résztvevő között az alábbi genusok oszlottak meg az ingernyálban relatív gyakoriságuk átlaga szerinti sorrendben: *Streptococcus* (0.55), *Prevotella* (0.14), *Veillonella* (0.13), *Neisseria* (0.056), *Granulicatella* (0.023), *Saccharibacteria_(TM7)_[G_1]* (0.021), *Gemella* (0.039) és *Leptotrichia* (0.036).

A mucinok, melatonin és a citokinek korrelációja az ingernyál mikrobiótával

A MUC5B és melatonin vonatkozásában hasonló tendenciák mutatkoztak, ugyanis mindkettő pozitívan korrelált a *g__Lachnospiraceae_[G-2]-vel* (MUC5B: 0.168, melatonin: 0.021), *g__Eikenella-val* (MUC5B: 0.658, melatonin: 0.744) és a *g__Saccharibacteria_(TM7)_[G-5]-el* (MUC5B: 0.658, melatonin: 0.743).

Az IL-1 β a *g__Streptococussal* negatívan (-0.463), míg annak mRNS-ével pozitívan (0.603) korrelált.

MEGBESZÉLÉS

A korcsoportok szerint az I. korcsoport DMF-T értéke 4.9 ± 4.38 volt, átlagéletkora pedig 26.8 ± 2.04 volt. A II. korcsoport DMF-T értéke 8.9 ± 4.91 , míg az átlagéletkor $36,3 \pm 3.83$ volt ebben a korosztályban.

A fogkő-eltávolítást követő fogkefecsere alapján képzett csoportok kiindulási DMF-T státusza a fogkefecsereelőknél $8.11 \pm 4,64$ (Dt: 0.67 ± 0.9 , Mt: 1.33 ± 1.9 , Ft 7.56 ± 3.91), a fogkefét nem cserélőknél pedig 5.22 ± 4.5 (Dt: 0.67 ± 1.08 , Mt: 0.33 ± 0.67 Ft: 4.22 ± 3.9) volt. Pearson-korrelációval a résztvevők össz-átlag DMF-T (6.9 ± 4.97) és BPE (0.43 ± 0.34) értékei között szignifikáns, negatív korreláció (~ 0.48) mutatkozott.

Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata nyugalmi nyálban

Nyugalmi nyálban a fogkefecsere alapján szignifikánsan magasabb érték volt megfigyelhető a fogkefét nem cserélő csoportban a MUC7, IL-1 β és TNF α fehérje esetében. Az IL-1 β mRNS is szignifikánsan változott ezen csoportban, amely alátámasztotta itt is, hogy az IL-1 β mRNS teljesen felhasználódott a fehérjeszintézishez.

Ezen eredmények magyarázatául az szolgál, hogy a kontrollidőszakot követő fogkő-eltávolítás jelentősen lecsökkenti a mikroorganizmusok telepszámát a szájüregben, amelyet követően a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján a nyálból és a táplálkozás vagy szájhigiéniás tevékenységek során indulhat újra a plakk-képződés, így ha az elhasznált fogkefe cseréje nem történik meg, súlyosbító tényezőként szerepel. Ezzel összhangban az IL-1 β és TNF α fehérjekoncentrációk szignifikánsan magasabb értéke azt mutatja, hogy ha nem történik meg a fogkefe cseréje, az elhasznált fogkefe gyulladást tart fenn a szájüregben. A MUC7 emelkedett értéke ezen csoportban arra utalhat, hogy a mikroorganizmusok emelkedett számával, azok eltávolítása is elindul.

Nyugalmi nyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban

A nyugalmi nyál mikrobiom elemzésekor azt találtuk, hogy a fogkő-eltávolítást követően diverzebb lesz a mikrobiom összetétele (emelkedett alfa diverzitás), amelyet az anthocyaninos rágógumizás fenntart.

A fogkefecsere hatására nyugalmi nyálban az alacsony caries frekvenciára jellemző *Neisseria* és *Haemophilus* genusok magasabb relatív frekvenciáját mutattuk ki Metacoder elemzéssel készített heat-tree ábrázolással, továbbá a fogkefecsere alapján jól elkülönülő clustereket is találtunk. A kezelési idő tekintetében ez nem volt megfigyelhető, tehát a fogkefecsere jelentős hatással bír a mikrobiom összetételre.

Nyugalmi nyálban a DMF-T (szuvas, tömött és hiányzó fogak számát jelölő) indexet a mikrobiommal korreláltatva azt találtuk, hogy a magasabb DMF-T értékek esetén a svéd caries-aktív fiatalokra jellemző *Prevotella*, *Fusobacterium* és *Selenomonas* genusok emelkedett relatív frekvenciája, míg az alacsonyabb DMF-T értékekkel a jó szájhygiénájú egyénekre jellemző *Neisseria*, *Porphyromonas* és *Granulicatella* magasabb relatív frekvenciája volt megfigyelhető.

A fogkefecsere következtében létrejövő skálafüggetlen hálózatok elemzésekor pedig a *Streptococcusok* eltérő hálózati kapcsolódásait találtuk a fogkefecsere alapján.

A nyugalmi nyál vizsgálatokor pedig alacsonyabbnak találtuk a *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas pasteri*, *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii* és *Rothia mucilaginosa* speciesek szintjét azon személyekben, akik lecserélték a fogkefájüket a fogkő-eltávolítást követően.

Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata ingernyálban

Ezen eredmények háttérében a MUC5B és melatonin nem fogkefecsereelőknél észlelt szignifikánsan magasabb értékei azt mutatják, hogy a fogkefecsere hatására a mikrobiom összetétele olyan irányban változik, hogy a védő faktorok (MUC5B, melatonin) szintje lesz magasabb, amelyet melatonin esetében az alacsony caries frekvenciájú személyeknél mért magasabb koncentrációja is alátámaszt.

Ingernyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban

Az ingernyál mikrobiom elemzésekor a fogkefecsere alapján a fogkefecsérélőknél találtunk magasabb alfa diverzitást. A béta diverzitás itt mindkét csoportban kimutatott késői kolonizáló specioseket és a fogkefecsérélőknél nem-mutans *Streptococcusokat*. Az ingernyál vizsgálatok elvégeztük a mucinok, melatonin és citokinek korrelációját az ingernyál mikrobiótával. Kiemelendő, hogy a MUC7 pozitívan korrelált számos, a metabolizmusában részt vevő genussal, pl. a *g_Ruminococcaceae*-val, amely a mucinokat karbonforrásként képes hasznosítani, valamint a *g_Bacteroidetes*-el és a *g_Bifidobacterium*-al, amelyek mucinbontó enzimekkel rendelkeznek. A *g_Haemophilus* MUC5B-vel negatívan és a MUC7-el pozitívan korrelált - a két mucin eltérő tulajdonságai -, továbbá IL-6-al való pozitív korrelációja is alátámasztja ezen genus cariesben betöltött ellentmondásos szerepét [101,102]. A MUC5B-vel és melatoninnal is pozitívan korreláló *g_Lachnospiraceae* [G-2], *g_Eikenella* és *g_Saccharibacteria* (TM7) [G-5] pedig irodalmi adatokkal összhangban ezen baktériumok melatonin-termelő képességét támasztja alá. Végül a *g_Prevotella* számos proinflammatorikus citokinnel való pozitív korrelációja, annak gyulladásban betöltött szerepét támasztja alá. Az ingernyálban pedig a *g_Streptococcus* az irodalommal ellentétben az IL-1 β -val negatívan korrelált.

Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása

A nyugalmi- és ingernyál összehasonlításakor a MUC5B, MUC7, IL-1 β mRNS, TNF α mRNS, TNF α , melatonin és Ca²⁺ koncentrációk esetében szignifikánsan magasabb érték volt mérhető az ingernyálban, mint a nyugalmi nyálban, míg az IL-2 (nem szignifikánsan), IL-6 esetében szignifikánsan a nyugalmi nyálban volt magasabb az értéke. Az ingernyál, kísérleteinkkel összhangban jobban véd a fogszuvasodás ellen, amelyet az ingernyálban mért magasabb MUC5B, MUC7, TNF α és melatonin koncentrációk is alátámasztanak.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az általunk vizsgált nyálösszetevők, védő- és gyulladássos komponensek, valamint a mikrobióta változásait elemeztük. A védő faktorok esetében azok expressziós szintű változásait figyelhettük meg. A nyál, a fogak és a mikrobióta közötti összekötő közeg, biofilm, amely aggregált mikrobiális egységekkel rendelkezik és teljes supra- és subgingivális plakk- és fogkőmentesítést követően a nyálból indul el a fogakat borító akvirált pellicula képződése már a fogmosást követő 4 órán belül. A fogkő-eltávolítás továbbá mikrosebek képződésével jár, amelyre a szervezet gyulladássos faktorok termelésével válaszol. Vizsgálatunkban a mechanikai behatások közé sorolhatjuk a fogkő-eltávolítást, az elhasznált fogkefe cseréjét és a hatóanyag-nélküli rágógumi használatát is, amelyek hatása összeadódik és fontos kiemelni, hogy a mechanikai és a kémiai beavatkozásunk is elsődlegesen a mikrobiótán fejtette ki a hatását, amelynek következményes változásait láthattuk a védő faktorok és a proinflammatorikus citokinek szintjének változásaiban.

Vizsgálatainkban, korábbi vizsgálatokkal összhangban azt is bizonyítottuk, hogy a meggy anthocyaninok az orális mikrobiótára előnyös hatásokkal bírnak. A nyugalmi- és ingernyál citokin profil, mucin és a Ca^{2+} szintek, továbbá a mikrobióta elemzése alapján kijelenthetjük, hogy a fogkő-eltávolítás és azt követő fogkefecsere a nyugalmi- és ingernyálra is előnyös hatással van.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált faktorok a szájüregi egészség követésére alkalmas biomarkerek.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) A fogkő-eltávolítás megemelte a mikrobiális alfa diverzitást, amelyet az anthocyanin fenntartott nyugalmi nyálban.
- 2) A TNF α szintjének csökkenése volt megfigyelhető a nyugalmi- és az ingernyál mintákban is, amely az anthocyanin hatásának tudható be.
- 3) Nyugalmi nyálmintákban alacsonyabb volt a *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas pasteri*, *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii* és *Rothia mucilaginosa* speciesek szintje azon személyekben, akik lecserélték a fogkefájukat a fogkő-eltávolítást követően.
- 4) Ingernyálban a MUC7 pozitív korrelációja volt megfigyelhető számos bakteriális genus, mint a - *g_Ruminococcaceae*, valamint a *g_Bacteroidetes* és a *g_Bifidobacterium* esetében.
- 5) A korrelációanalízis további eredményei közül kiemelendő, hogy a *g_Lachnospiraceae [G-2]*, *g_Eikenella* és *g_Saccharibacteria (TM7) [G-5]* a MUC5B-vel és melatoninnal is pozitíval korrellált, amely egyrészt a MUC5B kommenzális flóra egyensúlyában betöltött prebiotikus szerepét, másrészt ezen baktérium genusok melatoninintermelő képességét támasztja alá.
- 6) A *g_Prevotella* proinflammatorikus citokinekkal (IL-1 β , TNF α , IL-6) való pozitív korrelációja a gyulladásban betöltött szerepét támasztja alá.
- 7) A fogszuvasodásban fontos szerepet játszó *Streptococcusok* esetében, ha nem történik fogkefecsere, más cariogén baktériumokkal (pl. *Gemella*) vagy az általuk termelt H₂O₂-t hasznosítani képes baktériumokkal (*Neisseria*, *Haemophilus*) való hálózati kapcsolódása azt támasztja alá, hogy a fogkőeltávolítást követő fogkefecsere nélkül egy potenciálisan cariogénebb flóra marad fenn.
- 8) A *g_Streptococcus* MUC7-el való pozitív korrelációjából arra következtethetünk, hogy a MUC7 jelentős védő szereppel bír ezen genus ellen.
- 9) Ingernyálban a MUC5B, MUC7, IL-1 β mRNS, TNF α mRNS, TNF α , melatonin és Ca²⁺ koncentrációja megemelkedik, amely így ezen faktorok esetében az ingernyál képződésének rágási stimulus hatására való mechanikai szerepén túl a baktériumok elleni védő szerepét is alátámasztja.

- 10) A fogkefecsere alapján *nyugalmi nyálban* a MUC7, IL-1 β mRNS és fehérje, valamint TNF α fehérje szignifikáns emelkedése volt tapasztalható, ha nem történik fogkefecsere.
- 11) Ez alátámasztja, hogy a fogkefe által fenntartott cariogénebb környezet egészséges személyekben maga után vonja ezen proinflammatorikus citokinek és az antibakteriális hatású MUC7 szintjének növekedését. Ingernyálban pedig a MUC5B és melatonin szintek fogkefecsereelőknél észlelt szignifikánsan magasabb szintje a MUC5B eltérő antibakteriális és prebiotikus szerepével és a melatonin szintjének bakteriális tevékenység hatására létrejövő emelkedésével magyarázható.

A jelöltnek az értekezés témájában született publikációinak a Kenézy Könyvtár által hitelesített listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/501/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Skopkó Boglárka Emese
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Skopkó, B. E.**, Homoki, J., Fazekas, M., Paholcsek, M., Fauszt, P., Dávid, P., Stündl, L., Biróné Molnár, P., Forgács, I. N., Váradi, J., Bágyi, K., Gálné Remenyik, J.: Changes in the Composition of Unstimulated and Stimulated Saliva Due to Chewing Sour Cherry Gum and a Toothbrush Change.
Cells. 13 (3), 1-29, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells13030251>
IF: 5.1 (2023)
2. **Skopkó, B. E.**, Paholcsek, M., Szilágyi-Rácz, A. A., Fauszt, P., Dávid, P., Stündl, L., Váradi, J., Kovács, R. L., Bágyi, K., Gálné Remenyik, J.: High-Throughput Sequencing Analysis of the Changes in the Salivary Microbiota of Hungarian Young and Adult Subpopulation by an Anthocyanin Chewing Gum and Toothbrush Change.
Dentistry Journal. 11 (2), 1-16, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/dj11020044>
IF: 2.5





További közlemények

3. **Skopkó, B. E.**, Deák, Á., Matesz, K., Kelentey, B., Bácskai, T.: Pefloxacin induced changes in serotonergic innervation and mast cell number in rat salivary glands.

Drug Chem. Toxicol. 43 (5), 496-503, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01480545.2018.1508217>

IF: 3.356

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,956

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,6**

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

Debrecen, 2024.10.03.



Publikációk, konferenciák jegyzéke:

Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia megjelenések:

Előadások:

1. XX. TISZÁNTÚLI AGRÁRTUDOMÁNYI NAPOK
MEGGY ANTHOCYANINOK SZÁJÜREGI EGÉSZSÉGRE KIFEJTETT HATÁSAI
Effect of sour cherry anthocyanins in oral health
Boglárka Emese Skopkó¹; Judit Rita Homoki²; Mónika Éva Fazekas²; Melinda Paholcsek²; Péter Fauszt²; Péter Dávid²; László Stündl²; Piroska Bíróné Molnár²; Ildikó Noémi Forgács²; Judit Váradi³; Kinga Ágnes Bágyi^{1†} és Judit Remenyik^{2,*†}
2. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, 2022.10.12.-14.
EFFECT OF SOUR CHERRY ANTHOCYANINS ON HEALTHY HUMAN ORAL MICROBIOME
Boglárka Emese Skopkó¹, Melinda Paholcsek², Anna Anita Szilágyi-Rácz², Péter Fauszt², Péter Dávid², Judit Rita Homoki², Mónika Éva Fazekas², Piroska Bíróné Molnár², László Stündl², Judit Váradi², Gábor Vasvári³, Renátó Kovács⁴, Kinga Ágnes Bágyi⁵, Judit Remenyik²

Poszterek:

1. World of Microbiome, Vienna, 2022.04.28-30.:
EFFECT OF SOUR CHERRY ANTHOCYANINS ON HEALTHY HUMAN ORAL MICROFLORA (A PILOT CLINICAL STUDY),
B.E. Skopko¹, M.E. Fazekas², J.R. Homoki², J. Remenyik², M. Paholcsek³, K.A. Bagyi⁴
2. Hungarian Molecular Life Sciences, 2023.
The interaction of anthocyanin containing chewing gum and toothbrush microbiota on the salivary microbiota of Hungarian young adults after scaling
Boglárka Emese Skopkó¹, Melinda Paholcsek², Anna-Anita Szyilágyi-Rácz², Péter Fauszt², Péter Dávid², Judit Rita Homoki², Mónika Éva Fazekas², Piroska Bíróné Molnár², László Stündl², Judit Váradi³, Gábor Vasvári³, Renátó Kovács⁴, Kinga Ágnes Bágyi⁵, Judit Remenyik²

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni témavezetőimnek, *Habil. Dr. Remenyik Judit* tudományos tanácsadónak, a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar (DE MÉK), Komplex Rendszerek és Mikrobiom-innovációk Központ (KRÉMK) vezetőjének, aki 2019-ben lehetőséget biztosított számomra az Élelmiszertechnológiai Intézetben folyó kutatómunkába történő bekapcsolódásra, szakmai iránymutatásaival, tanácsaival, támogatásával segítette kutatásomat, az eredmények publikálását és *Habil. Dr. Bágyi Kinga Ágnes* egyetemi docensnek, a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar (DE FOK) dékánjának, klinikaigazgatónak, aki támogatta, segítette kutatási tervünk két Intézet közötti együttműködés keretében történő megvalósulását.

Hálás vagyok, hogy 2019-ben csatlakozhattam a DE MÉK Élelmiszertechnológia Tanszék kutatócsoportjához és folytathattam a *Dr. Homoki Judit Rita* által elkezdett meggy anthocyaninok szájüregi hatásainak kutatásait, akinek köszönettel tartozom a kutatómunkám megvalósulásában nyújtott szakmai, gyakorlati támogatásért, az ELISA vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

A kutatásban nyújtott segítségéért szeretnék köszönetet mondani *Habil. Dr. Paholcsek Melindának*, *Dr. Fazekas Mónika Évának* és *Habil. Dr. Kovács Renátó Lászlónak*, akik a kezdetektől szakmai tudásukkal, tanácsaikkal jelentős mértékben hozzájárultak kutatómunkám elindulásához és megvalósulásához.

Köszönetemet fejezem ki *Prof. Dr. Stündl László* egyetemi tanárnak, a DE MÉK dékánjának, az Élelmiszertechnológia Intézet vezetőjének, aki lehetővé tette számomra, hogy a kutatásaimhoz kapcsolódó laborvizsgálatokat az Intézetben elvégezhettem.

Köszönettel tartozom *Habil. Dr. Váradi Juditnak* és *Dr. Vasvári Gábornak*, akik a DE GYTK Gyógyszertechnológiai Tanszékén rendelkezésünkre bocsátották a kutatásban használt rágógumit.

Külön köszönettel tartozom *Bíróné Molnár Piroskának*, aki lelkiismeretes munkájával segített az ELISA vizsgálatokban.

Szeretném megköszönni a KRÉMK munkatársainak, *Szilágyi-Rácz Anna Anitának*, *Dávid Péternek*, *Fauszt Péter Zsombornak* és *Dr. Szilágyi-Tolnai Emesének* a metagenom

szekvenálásban nyújtott szakmai segítségüket. Köszönettel tartozom *Kovács-Forgács Ildikó Noémi* és *Pesti-Asbóth Georgina* szakmai segítségéért is.

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. D. Tóth Etelkának*, a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar Dentoalveoláris Tanszék vezetőjének és *Dr. Varga Istvánnak*, a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Kar Parodontológiai Tanszék vezetőjének, akik lehetővé tették számomra, hogy a Parodontológia Tanszéken a szakvizsgára való felkészülést mellett a kutatásaimhoz a mintavételeket is elvégezhettem.

Hálás köszönettel tartozom családomnak segítségükért és támogatásukért, hogy biztos hátteret biztosítottak szakmai előmenetelemhez.