

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Skopkó Boglárka Emese

**Anthocyaninok szerepe a szájüregi egészség
fenntartásában**

DEBRECENI ÉGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. BEVEZETÉS.....	8
2. AZ IRODALMI HÁTTÉR ÁTTEKINTÉSE	10
2.1. A meggy és hatóanyagai (anthocyaninok).....	10
2.2. Az anthocyaninok általános egészségre kifejtett hatásai	11
2.2.1. <i>Oxidatív stressz csökkentő hatás</i>	11
2.2.2. <i>Antioxidáns hatás</i>	11
2.2.3. <i>Gyulladáscsökkentő hatás</i>	11
2.2.4. <i>Cukorbetegségre kifejtett hatása</i>	12
2.2.5. <i>Fogszuvasodással szemben kifejtett hatása</i>	13
2.2.6. <i>Biofilmre kifejtett hatása</i>	13
2.3. A 'nyál-mikrobiális-dentális' komplex jelentősége	14
2.4 A nyál mint funkcionális folyadék.....	15
2.5 Az orális biofilm	17
2.5.1 <i>Általános jellemzés</i>	17
2.5.2 <i>Bakteriális biofilm</i>	17
2.5.3 <i>Mikrobiális kölcsönhatások</i>	19
2.5.4 <i>A szervezetre kifejtett hatása</i>	20
2.6 A fogszuvasodás napjainkban elfogadott elméletei.....	21
2.6.1 <i>A kiterjesztett ökológiai plakk hipotézis</i>	21
2.6.2 <i>A fogszuvasodás és fogágybetegségek közös eredetét meghatározó integrált hipotézis</i>	21
2.7 Reziliencia és szerepe a szájüregi egészség fenntartásában.....	23
2.8 Nyál biomarkerek	26
2.8.1 <i>Mucinok</i>	27
2.8.1.1 <i>MUC5B jellemzése</i>	30
2.8.1.2 <i>MUC7 jellemzése</i>	37
2.8.2 <i>Interleukin (IL)-1β</i>	38
2.8.3 <i>Interleukin (IL)-2</i>	39
2.8.4 <i>Interleukin (IL)-6</i>	39
2.8.5 <i>Tumor nekrozis faktor alfa (TNFα)</i>	40
2.8.6 <i>Melatonin</i>	41
2.9 A fogszuvasodásban szerepet játszó biomarkerek hálózata a carieses fogak felszínén.	42
2.10 A nyálmintavétel előnyei	44
2.11 A caries prevenció lehetőségei napjainkban	45

3.	CÉLKITŰZÉSEK.....	47
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	48
4.1	Résztevők beválogatása, anamnéziszfelvétel	48
4.2	Klinikai vizsgálatok	49
4.3	Mintavételezési protokoll	50
4.4	A résztvevők csoportosítása	51
4.5	Kevert és stimulált nyál gyűjtése	51
4.6	Rágógumi összetétele, előállítása	51
4.7	ELISA (Enzimhez kötött Immunosorbens Assay).....	52
4.7.1	<i>Az ELISA legfőbb alkotóelemei</i>	52
4.7.2	<i>Az ELISA vizsgálatok típusai</i>	53
4.7.2.1	<i>Kompetitív ELISA</i>	53
4.7.2.2	<i>Sandwich ELISA</i>	53
4.7.3	A vizsgálataink során alkalmazott ELISA módszerek leírása	53
4.7.3.1	<i>A Mucin 5B (MUC5B) koncentrációjának meghatározása</i>	53
4.7.3.2	<i>A Mucin 7 (MUC7) koncentrációjának meghatározása</i>	54
4.7.3.3	<i>A Tumor Necrosis Factor α (TNFα) koncentrációjának meghatározása</i>	54
4.7.3.4	<i>Az Interleukin 1β (IL-1β) koncentrációjának meghatározása</i>	54
4.7.3.5	<i>Az Interleukin 2 (IL-2) koncentrációjának meghatározása</i>	54
4.7.3.6	<i>Az Interleukin 6 (IL-6) koncentrációjának meghatározása</i>	55
4.7.3.7	<i>A Melatonin koncentrációjának meghatározása</i>	55
4.8	PCR (Polimeráz Láncreakció) technológia alkalmazása.....	55
4.8.1	<i>RNS-izolálás MagMax Viral RNA Isolation Kit-el</i>	55
4.8.1.1	<i>RNS-transzkripció</i>	57
4.8.1.2	<i>Statisztikai elemzés</i>	58
4.9	A Ca ²⁺ koncentrációk meghatározása	58
4.10	A klinikai, PCR-el és ELISA-val nyert adatok, Ca ²⁺ koncentrációk statisztikai elemzése 59	
4.11	A 16S riboszomális RNS (rRNS) kimutatásán alapuló mikrobiom vizsgálatok.....	59
4.11.1	<i>Nyálminták izolálása</i>	60
4.11.2	<i>Könyvtárkészítés</i>	62
4.11.3	<i>PCR</i>	63
4.11.4	<i>Bioinformatikai módszerek</i>	64
5.	EREDMÉNYEK	66
5.1	Fogazati státuszok csoportok szerint.....	66
5.2	Proinflammatorikus citokinek, mucinok, melatonin szintje nyugalmi- és ingernyálban ...	68

5.2.1 Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása	68
5.2.2 A fogkefecsere hatásának vizsgálata	71
5.2.2.1 Nyugalmi nyál	71
5.2.2.2 Ingernyál.....	73
5.3 Alfa diverzitás	75
5.3.1 Nyugalmi nyál	75
5.3.2 Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása.....	76
5.3.3 Ingernyál alfa diverzitás a fogkefecsere alapján képzett csoportokban	76
5.4 Béta diverzitás	77
5.4.1 Béta diverzitás nyugalmi nyálban	77
5.4.2 Béta diverzitás nyugalmi- és ingernyálban	78
5.4.3 Béta diverzitás ingernyálban.....	79
5.5 A DMF-T korrelációja a leggyakoribb genusokkal nyugalmi nyálban.....	80
5.6 Kiemelt genusok és family-k log ₂ medián aránya a nyál mikrobiótával	81
5.7 Potenciális biofilmképzők aránya nyugalmi nyálban	82
5.8 Speciesek relatív gyakorisága nyugalmi nyálban	83
5.9 Mikrobiális hálózatok felépítése a fogkefecsere alapján.....	85
5.10 Ingernyál core microbiom	86
5.11 A mucinok, melatonin és a citokinek korrelációja az ingernyál mikrobiótával	87
6 MEGBESZÉLÉS	89
6.1 Fogazati státuszok vizsgálata	89
6.2 Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata nyugalmi nyálban.....	89
6.3 Nyugalmi nyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban.....	90
6.4 Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata ingernyálban.....	91
6.5 Ingernyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban	91
6.6 Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása	92
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	94
8. TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSAIM.....	96
9. IRODALOMJEGYZÉK	98
Hivatkozott közlemények jegyzéke:	98
10. TÁRGYSZAVAK	108
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109
12. MELLÉKLETEK.....	111
1.sz. melléklet: fogászati adatlap	111

Rövidítések jegyzéke

AC: anthocyanin

AG I/ AG II: I. korcsoport/II. korcsoport

ANOVA: Variancia Analízis

ATF/CREB: Aktiváló transzkripciós faktorok/cAMP válaszelem-kötő fehérje (Activating Transcription Factors/ cAMP response element binding protein)

BPE: Alap Parodontális Vizsgálat (Basic Periodontal Examination)

BR/ NBR: fogkefecszerelő/ nem fogkefecszerelő

BSM: szarvasmarha submaxilláris nyálmirigy

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

CAPSO: 3-(cikloxeil-amino)-2-propanhidroxi-amino -szulfonsav

CCL11: eozinofil kemotaktikus fehérje

CD54: A differenciálódás klasztere 54

CI: konfidencia intervallum

CMF PBS: Kalcium és magnézium mentes Foszfáttal pufferolt sóoldat

CO₂: szén-dioxid

DAG: diacil glicerol

DAMP: molekuláris mintázattal összefüggő károsodásfelismerő (Damage Associated Molecular Patterns)

DMF-T: szuvas (Dt), hiányzó (Mt), tömött (Ft) fogak számát jelölő index

EGF: epidermális növekedési faktor

eHOMD: kiterjesztett Humán Orális Mikrobiom Adatbázis (expanded Human Oral Microbiome Database)

EKR: EGFR kináz reporter

ELISA: enzimhez kötött immunoszorbens assay

EPS: extracelluláris polimer mátrix

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

ETT TUKEB: Egészségügyi és Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága

F1/ F2: utánkövetés 1/ utánkövetés 2

GIT: gyomor-bél rendszer (gastrointestinal tract)

HLA-DR: Humán Leukocita Antigén DR izoforma

HSG: humán nyálmirigy

Hsp: hősokk fehérje

HUVEC: Humán köldökzsinór véna endothel sejtek (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

IL-1R: Interleukin-1 receptor

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-2: interleukin-2

IL-6: interleukin-6

JAK/STAT: Janus Arcú Kináz/Szignál Transzducer és Aktivátora a Transzkripció Proteineknek

JNK: Janus arcú kináz

KIR: központi idegrendszer

KRÉMK: Komplex Rendszerek és Mikrobiom Innovációk Központ

LPS: lipopoliszacharid

MAPK: Mitogén Aktivált Protein-kináz

MCP-1: makrofág kemoattraktáns fehérje 1

MMS-68: makrofág eredetű fehérje 68

MUC5B (MG1): Mucin 5B

MUC7 (MG2): Mucin 7

NF- κ B: NF-kappa B

NIC: negatív izolációs kontroll

NO/ NOS: nitrogen monoxid/ Nitrogén monoxid szintáz

non-MS/MS: non-Mutans Streptococcusok/ Mutans Streptococcusok

OHI-S: Egyszerűsített szájhigiéniai index

OTU: operatív taxonómiai egység (Operational Taxonomic Unit)

PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázatok

PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz

PKC: protein kináz C

PMA: phorbol 12-mirisztát 13-acetát

pp90: 90 kDa foszfoprotein

PRP: prolindús fehérjék

PRR: mintázatfelismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor)

qPCR/ sqPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció / szemikvantitatív PCR

RANTES: Szabályozott és normál T-sejt expresszálódik és szekretálódik

RF: véletlenszerűen képzett modell

ROS: Reaktív oxigényökök

sIgA: szekretoros IgA

SO₃-3Galβ1-3G1C-NAc: sulfo-Lewis hiszto vércsoport struktúra

Sp1: transzkripció faktor

Src: nem-receptor tirozin kináz

SS: Sjögren szindróma

TEER: transzepitheliális elektromos ellenállás (Trans-Epithelial Electrical Resistance)

TGF: transzformáló növekedési faktor

TIR: Toll/IL-1 receptor

TLR: Toll-szerű Receptor (Toll-like Receptor)

TNFα: tumor nekrozis faktor α

1. BEVEZETÉS

A velünk élő baktériumok meghatározó szerepet töltenek be egészségi állapotunkban, de a betegségek kialakulásához is nagyban hozzájárulhatnak. A szájüregben a fogszuvasodásban betöltött szerepük évtizedek óta a fogorvostudomány érdeklődésének középpontjában áll. Napjainkban a fogszuvasodás integrált hipotézise a jelenleg elfogadott caries elmélet, amely a fogszuvasodás megelőzésében a szájüregi mikrobiális ökoszisztéma egyensúlyának biztosítását és fenntartását hangsúlyozza, amely a 'nyál-mikrobiális dentális komplex' egységén alapszik.

A szájüregben található szervezetünk második legnagyobb mikrobiális ökoszisztémája, mely a különböző felszíneken való elhelyezkedése alapján változó összetételű lehet, de akár 7 évig is állandónak mondható. Az elmúlt tíz év kutatásai egyértelművé tették, hogy a szájüregi mikrobióta földrajzi jellemzőkkel rendelkezik, amelyeket különböző belső és külső tényezők (genetikai, környezeti, táplálkozási tényezők, stressz, vagy a csapvíz összetétele) is befolyásolhatnak, de akár cirkadián oszcillációt is mutathat, a helyileg termelődő faktorokkal együtt pedig jelentős befolyással bírnak a teljes tápcsatorna mikrobiomjára.

A nyálból a fogak felszínét borító, védelmet biztosító pellicula képződésének kezdeti fázisaiban a mucinoké a legfontosabb szerep, a későbbi fázisokban a szájüregi baktériumok által termelt savak közömbösítése során pedig az amilázé. A nyálban megtalálható fehérjemolekulák és a pellicula a kalcium (Ca^{2+}) ionok megkötése által a remineralizációt segítik, így a Ca^{2+} ionok szintje a remineralizációs kapacitást tükrözi. A stimulált nyál több Ca^{2+} iont tartalmaz, amely hydroxilapatittal túltelített és magasabb remineralizációs kapacitást mutat.

A nyálban megtalálható számos faktor, melyek a kommenzális mikrobiom fenntartásában és a patogén mikrobák felszaporodásának gátlásában, ezáltal a fogak védelmében játszanak szerepet.

Ilyen a tobozmirigyben termelődő melatonin, amelynek szintje a szervezet cirkadián ritmusának megfelelően változik, nagyon erős antioxidáns hatással rendelkezik, amely a fogszuvasodás elleni védelemben is megmutatkozik.

A mucinok is számos funkcióval rendelkeznek, talán a legfontosabb, hogy a szájüregi biofilmben és az emésztőtraktusban megtalálható baktériumokkal interakcióban, azok növekedését, letapadását, védelmét biztosítják, vagy a nyállal való kiürülésük által fenntartják a szájüregi mikro-ökoszisztéma egyensúlyát. Pozitív hatással vannak a kommenzális

baktériumokra is, ugyanis prebiotikus tulajdonságaiknak köszönhetően, azok szaporodását is elősegítik.

A védelmi folyamatok elindításáért a nyálban megtalálható gyulladáscsökkentő citokinek a felelősek, melyek termelése a fogak felületén autokrin és parakrin módon indul el a mikroorganizmusokra adott válaszreakció eredményeként.

A citokinek és mucinok közötti komplex interakciók hatásmechanizmusának ismeretében a természetes hatóanyagok alkalmazásának eredményessége a nyálból történő egyszerű mintavétel segítségével monitorozható. Ilyen természetes hatóanyagok a meggy színanyagai, az anthocyaninok (AC), melyeket számos betegség kezelésében alkalmazva pozitív eredményeket észleltek az antioxidáns tulajdonságaiból adódó egészségre kifejtett előnyös hatásai miatt. Ismert a meggy Gram-negatív anaerob orális baktériumok (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum*) és *Candida albicans* elleni hatása. Anthocyaninos rágógumizást követően a fogszuvasodásban jelentős szerepet játszó *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) telepszámának csökkenését és a nyál amiláz aktivitását gátló hatások figyelhetők meg nyálban.

A további kutatások tervezésénél mindenképpen előremutató lehetőségeket biztosít ez a közeg, hisz a nyál biofilm egy viszonylag egyszerű mintavételi forrás, a szájüregi mikrobiom modulálására pedig számos kémiai és mechanikai módszer létezik. A biomarkerek és a mikrobiom további vizsgálataival így segíteni tudjuk a megelőzést és a korai stádiumban történő gyógyítás lehetőségét, az egészséges szájüregi mikrobióta összetételének monitorozásával vagy akár - a betegek által otthonukban is könnyen kivitelezhető módszerekkel történő - befolyásolásával, ami mindenképpen hozzájárulhat a szájüregi betegségek (fogszuvasodás, fogágybetegség) diszbiotikus jellegének jobb megértéséhez, ezáltal a szájüregi egészség minél hosszabb idejű fenntartásához.

2. AZ IRODALMI HÁTTÉR ÁTTEKINTÉSE

2.1. A meggy és hatóanyagai (anthocyaninok)

A meggynek két fő típusa van, az édes meggy (*Prunus avium L.*) és a savanyú meggy (*Prunus cerasus L.*) (1) A savanyú meggy a *Rosaceae* (rózsfélék) család, *Prunoideae* alcsalád, *Prunus* nemzetség *Cerasus* alnemzetségébe tartozik. Egy hibrid, amelyet az édes cseresznye és az európai törpecseresznye (*Prunus fruticosa*) keresztezésével nyertek. (2)

Az anthocyanin (antocián) szó görög eredetű szóösszetétel, a természetben színük a pirostól a kékig változik, mely a pH-val hozható összefüggésbe. Megtalálhatók különböző baktériumokban és növényekben is, ez utóbbi leveleiben, a gyökérzetben, virágzatban és a termésekben, pl.: meggy, bodza, szőlő és feketeribizli. (3)

A meggy számos tápanyagot és bioaktív anyagot is tartalmaz, mint a rostok, polyphenolok, karoténoidok, C-vitamin és a kálium. Ezen kívül gazdag a triptofán, melatonin és szerotonin tartalma is, valamint hidroxicinnamátokat és flavan-3-olokat is magas arányban tartalmaz. A magyarországi meggyfajták extrém magas anthocyanin tartalommal rendelkeznek. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján ez az érték: 295 ± 53 mg/100 mg a friss, míg 1528 ± 135 mg/100 mg a liofilizált gyümölcsben, legmagasabb arányban pedig cianidin-3 rutinozid-ot, cianidin-3-O-glükozidot és más kisebb alkotórészeket - delphinidin, malvidin, peonidin és petunidin – tartalmaznak. (4)

A vizsgálatainkban használt meggykivonat fő összetevői: cianidin-3-O-rutinozid, cianidin-3-O-glükozid, cianidin-3-O-glükozil-rutinozid/malvidin-3,5-diglükozid. (4, 5)

2.2. Az anthocyaninok általános egészségre kifejtett hatásai

A meggy anthocyaninok nagyon hamar felszívódnak és minimum 12,3%-os a biohasznosulásuk a szervezetben, a maximális plazma koncentrációt pedig akár 2 órán belül elérik. (1)

Az egészségi állapottal összefüggő hatásait és a kimutatott eltéréseket az irodalom alapján a következőkben részletezem.

2.2.1. Oxidatív stressz csökkentő hatás

Az oxidatív stressz csökkentésére kifejtett hatások az édes és a savanyú meggyénél is érvényesültek *in vitro* vizsgálatokban, HUVEC (Humán köldökzsinór véna endothel sejtek, angolul: Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sejteken a magas vércukorszint által előidézett diabetest indukáló állapotban. A proinflammatorikus citokinek – az IL-6, IL-8 és interleukin-1 α – génexpressziójának anthocyanin hatására való csökkenését idézték elő 1 és 50 ng ml⁻¹ (nanogram/milliliter)-es anthocyanin koncentrációkban alkalmazva hiperglikémiát indukáló modellben. (6)

2.2.2. Antioxidáns hatás

Magas vércukorszint hatására bekövetkező ROS (Reaktív oxigéngyökök) csökkenést, az NOS (Nitrogén monoxid szintáz) expressziójának fokozódását, valamint az Endothelin-1 és az Endothelin Konvertáló Enzim-1 koncentrációjának szignifikáns csökkenését figyelték meg 50 ng ml⁻¹-es koncentráció mellett, ami igazolja az antioxidáns hatását. A TNF α szintjének emelkedését a flavonoidok magas koncentrációkban kifejtett deszenzitizáló hatásának tudták be. (6) *In vitro* sejtkultúrákon végzett és állatkísérletes vizsgálatok során a májban az enzimek antioxidáns aktivitását fokozták és csökkentették a vas és ón indukálta lipid peroxidációt (1).

2.2.3. Gyulladáscsökkentő hatás

Gyulladáscsökkentő hatásai során a C reaktív protein, TNF α , interleukin IL-8, RANTES (Szabályozott és normál T-sejt expresszálódik és szekretálódik), NO (nitrogén monoxid) és makrofág kemoattraktáns fehérje 1-re kifejtett hatásai a legismertebbek. (1) HUVEC sejtek vizsgálata során Bíró és munkatársai (7) vizsgálataiban az LPS (lipopoliszacharid) által indukált

gyulladásos válaszban részt vevő IL-6, TNF α , RANTES, granulocita-monocita kolónia stimuláló factor, proinflammatorikus citokinek és kemokinek szintje 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú anthocyanin kivonat hatására szignifikánsan csökkent. Egy másik vizsgálatban az IL-1 β , IL-8 és TNF α , emelkedett szintje volt kimutatható, amely korrelált a melatonin metabolitjának szintjével. (8)

Remenyik és munkatársai (9) Caco-2 és HUVEC sejtvonalak vizsgálata során Caco-2 sejteken Occludin esetében cipzárszerű mintázat csökkenést találtak az AC kezelés hatására, míg HUVEC sejteken a TNF α hatására az Occludin expressziójának csökkenését tapasztalták a sejtkultúrákon, amely az AC kezelés hatására csökkent. Ezen eredmények alapján megismerhettük az anthocyaninok tight junction-ökhöz kapcsolódóan észlelt hatásai által az anthocyanin kezelés hatásmechanizmusának háttérében álló biokémiai és jelátviteli folyamatokat. Le Phoung és munkatársai (10) Caco-2 sejtvonalakon az anthocyanin kezelés után, a TEER-t (transzepitheliális elektromos ellenállás, angolul: Trans-Epithelial Electrical Resistance) mérve TNF α stimuláció hatására a barrier funkció megbomlását figyelték meg. Aktiválódott a gyulladásos reakciók kulcs elemeként ismert IL-1 β és TNF α hatására az NF- κ B (NF-kappa B) útvonal, ami a proinflammatorikus mediátorok felszabadulását váltotta ki, továbbá a cianidin-3-O-glikozid hatására az IL-8 és a TNF α átírása csökkent. (10)

2.2.4. Cukorbetegségre kifejtett hatása

A cukorbetegségre kifejtett hatásait Nemes és munkatársai (11) vizsgálták, patkányokon végzett *in vivo* túlsúlyt és cukorbetegséget indukáló modellben. A 6 héten keresztül 60 mg/kg (milligramm/kilogramm) napi dózisban adott anthocyanin csökkentette a ROS képződését és az elhízás háttérében álló leptin, IL-6 és rezisztin szintjét. A rezisztin - expresszióját a TNF α és IL-6 proinflammatorikus citokinek emelkedett szintje váltja ki - a humán monocita sejtekben a TNF α és IL-6 expresszióját fokozza és gátolja az adiponectin gyulladásellenes hatásait. Így összességében az anthocyaninok hatására az IL-6 és a TNF α expressziója is csökkenhet (11).

2.2.5. Fogszuvasodással szemben kifejtett hatása

Homoki és munkatársai (5) az anthocyanin tartalmú rágógumik alkalmazását követően (placebo-kontrollcsoporttal összehasonlítva) végzett 0, 5, 10, 20, 30 perces mintavételek és nyugalmi nyálmintákon végzett vizsgálatok eredményeit kérdőíves felmérés adataival vetették össze és az alábbi szignifikáns eltéréseket találták:

- (a) az anthocyanin tartalmú cukormentes meggyes rágógumi alkalmazása a rágást követően 30 perccel csökkentette a *S. mutans* telepszámot és a nyál amiláz aktivitását, amelynek hatása a rágás mechanikai és a nyál mosóhatása révén fokozódhatott;
- (b) a xylitol és meggy anthocyaninok csökkentették a nyálban lévő *S. mutans* mennyiségét és a nyál amiláz aktivitását;
- (c) a xylitol/erythritol visszaszorította a *S. mutansokat*.

2.2.6. Biofilmre kifejtett hatása

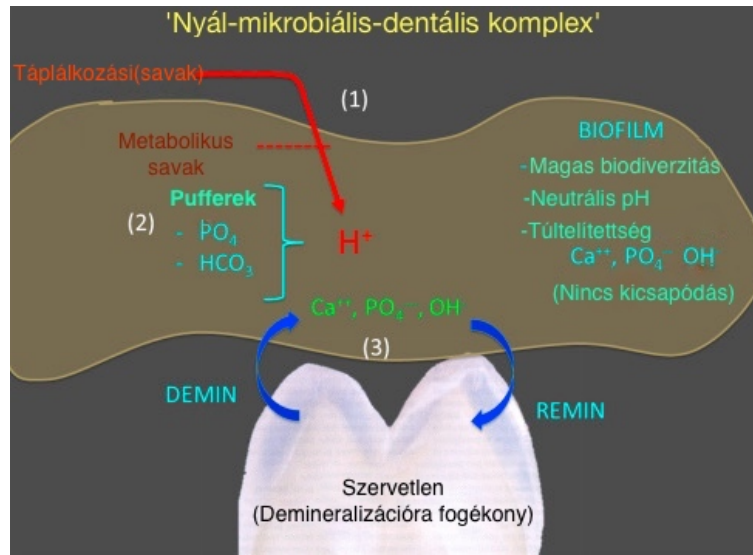
Ben Lagha és munkatársai (12) megállapították, hogy a meggy a *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) biofilmképző képességét csökkentette.

A meggy anthocyaninok mikrobiomra kifejtett hatásainak hatámechanizmusai a következők lehetnek (12):

- a) a mikrobiális sejt hidrofobicitásának befolyásolása;
- b) adhezinek génexpressziójának gátlása;
- c) a quorum sensinggel (küszöbdenzitás-érzékelés) történő interferálás;
- d) a *S. mutans* zománchoz való letapadás gátlása a PKC (protein kináz C) aktiváció gátlásán keresztül. (12)

2.3. A 'nyál-mikrobiális-dentális' komplex jelentősége

A 'nyál-mikrobiális-dentális' komplex meghatározás a szájüreg egyensúlyi állapotára utal a nyál, a mikrobiom és a fogak kölcsönhatásai szempontjából (1. ábra).



1. ábra: A 'nyál-mikrobiális-dentális' komplex (13)

A 'nyál-mikrobiális-dentális' komplexre egészséges körülmények között jellemző, hogy a puffer rendszerek (2) által gátolt az étkezési eredetű cukrok metabolizmusa eredményeként létrejövő savak (1) zománc demineralizációt kiváltó hatása és a Ca^{2+} , HPO_4^{2-} és OH^- ionok között (3) a demineralizációs és remineralizációs folyamatok egyensúlya figyelhető meg.

A nyál biofilmben ilyenkor magas a biodiverzitás, semleges a pH és a Ca^{2+} , PO_4^{3-} (foszfát) és OH^- (hydroxil) ionok szuperszaturációja (de nem kicsapódása) figyelhető meg, ezáltal a hydroxilapatit remineralizációja biztosított. Ezen ionok képesek a nyálfehérjékhez (pl. a PRP-k (prolindús fehérjék), statherinek) kötődni és ezáltal reakcióba lépésüket, továbbá a nyálkövek kialakulását megakadályozni. A fogak demineralizációja a savak nem teljes puffereelésének következtében létrejövő telítetlen állapot miatt alakul ki a fog és a biofilm határán. Ha nem túl gyakori és nagymértékű a savasodás, akkor tud bekövetkezni a remineralizáció, amelynek során pedig a zománcból kioldódott Ca^{2+} , PO_4^{3-} és OH^- ionok a biofilm és a fogak határán felhalmozódnak és a pH növekedésével a túltelített állapot visszaáll. Ezáltal pH csökkenéskor a nyálfehérjékben megkötött ionokkal együtt képesek a zománc remineralizációjára. A folyamatban fontos szerepet játszik még a bikarbonát puffer-rendszer is. (13, 14).

Az orális biofilmek további jellemzői, hogy a bakteriális közösségek alkalmazkodnak a magas sejtsűrűséghez, amely pedig a pH, redox rendszerek által az oxigén szintek és a tápanyagok hasznosulásához kedvező mikrokörnyezetet hoz létre. (15)

A vadászó-gyűjtögető (vagy paleolitikus) táplálkozás idejében az egészséges orális biofilm biodiverzitása nagyon magas, a biofilm pH-ja pedig neutrális volt. (13, 16).

Különbség figyelhető meg a húst is fogyasztó (pH~7,2) és a csak növényi étrenden élők (pH~6,8) nyugalmi biofilm pH-ja között is. A biofilm baktériumok többsége ugyanis a pH-t az urea metabolizmus és arginin aminosav metabolizmusa révén tartja fenn, amelynek során ammóniát és CO₂-t (szén-dioxid) termelnek. Ezáltal egyensúlyi körülmények között a jelenlévő acidogén és acidurikus baktériumok (pl.: *S. mutans*, amely a biofilm kb. 2%-át alkotja) nem képesek demineralizációt és fogszuvasodást okozni. (13)

2.4 A nyál mint funkcionális folyadék

A nyál, mint az egyéb testfolyadékok (pl.: vér, sulcusfolyadék) funkcionális folyadéknak tekinthető, amely hordozza a veleszületett és a szerzett immunitás mediátorait is. (17) A 3 pár nagy nyálmirigy és a szájüregben elszórtan elhelyezkedő kis nyálmirigyek szekrétuma. (18)

A *nyugalmi, kevert nyál* egyénenként változó, körülbelül 0,3 ml/perc szekréciós rátával termelődik. Elválasztása külső ingerek nélkül a KIR (központi idegrendszer) nucleus salivatoriusai által folyamatosan zajlik a szervezetben, amelyet befolyásolhat a hidratáltság, testhelyzet, cirkadián- és egyéb biológiai ritmusok, de pszichogén ingerek is. A cirkadián ritmus szerepe kiemelendő, klinikai vizsgálatok tervezésekor is jelentős szereppel bír, ajánlott mindig ugyanazon napszakban a mintavételeket végezni. (17)

Az *inger- vagy stimulált nyál* termelését vizuális, szaglász, íz- vagy mechanikai ingerek váltják ki, paraszimpatikus és szimpatikus vegetatív rostokon keresztül vezérlődik a nyálmirigyekben. Átlagosan 0,7 ml/perc a szekréciós rátája, amely széles határok között mozoghat, termelését befolyásoló tényezők a mirigyméret, kor, dohányzás, étel fogyasztása. (17)

A nyál 99%-ban vízből és 1%-ban a **1. táblázat**ban felsorolt egyéb összetevőkből áll.

1. Szerves összetevők (fehérjék, enzimek)	<p>A) Emésztőenzimek: amiláz, lipáz;</p> <p>B) Direkt antimikrobiális hatással bíró fehérjék: laktoferrin, lizozim, immunglobulinok: IgA IgG, IgM, sIgA (szekretoros IgA)), hisztatinok;</p> <p>C) Lubrikációban részt vevő fehérjék: mucinok (fő mucinok az MG1 (MUC5B) és MG2 (MUC7)), PRP (prolindús fehérje);</p> <p>D) Növekedési faktorok: EGF (epidermális növekedési faktor), neurális növekedési faktor;</p> <p>E) Kalciumkötő fehérjék: statherinek, PRP-k, hisztatinok, cisztatinok.</p> <p>Egyéb összetevők: albumin, β-glükuronidáz, észterázok, fibronectin, foszfátázok, gusztin, kallikrein, karbohidrázok, laktát-dehidrogenáz, parotidális aggreginek, peptidázok, peroxidázok, ribonukleázok, nyomokban szérumfehérjék, tirozindús fehérjék, vitaminkötő fehérjék</p>
2. Kisméretű szerves molekulák	glükóz, kreatinin, lipidek, szíalsav, urea
3. Elektrolitok	bikarbonát, fluorid, foszfát, hidrogén-karbonát, jodid, kalcium ion, klorid ion, magnézium, nátrium ion, nem specifikus pufferek, szulfátok, tiocianát

1.táblázat: A nyálmirigyek szekréciójának fő összetevői (18-20)

Fő funkciói:

1. A mikroorganizmusok kezdeti adhéziójára és kolonizációjára, így a kommenzális mikrobiom összetételére jelentős hatással van.
2. A mikrobiomra kifejtett másik hatása, hogy a mikroorganizmusok elleni védelem során azok kiürülését segíti a mucinok általi összecsapódásuk, valamint a direkt antimikrobiális hatást kifejtő nyálfehérjék által.
3. Mindezen túl tápanyagot is szolgáltat a mikroorganizmusok számára az étkezési eredetű keményítő (amiláz), lipidek vagy fehérjék lebontása által vagy a bakteriális metabolizmus végtermékeiből (pl.: glikoproteinek lebontása eredményeként).
4. A rágás, nyelés és beszéd folyamataiban is szerepet játszik. (19)

2.5 Az orális biofilm

Costerton 1978-ban határozta meg először a biofilm fogalmát: csoportosult bakteriális sejtek szervezett közössége, melyben előfordulnak azonos és különböző speciestek is. A maguk által képzett extracelluláris polimer mátrixba (EPS) zárva és beágyazva, élő (nyál, sulcusfolyadék) vagy élettelen (fog, protézis vagy implantátum) felülethez kötődnek vagy azok határfelületén alakulnak ki és interaktív közösségekként funkcionálnak. (15, 21, 22)

2.5.1 Általános jellemzés

A szájüregben, 5 fő felületen található biofilm: 1.) nyelv; 2.) buccalis nyálkahártya; 3.) supra- és 4.) subgingivális plakk; 5.) nyál. (22)

A három legjellemzőbb társulás közül a *supragingivális biofilmek* "kukoricacső" szerkezetét az utóbbi években "hedgehog" szerkezetként definiálták. Felépítésére jellemző, hogy a filamentosus baktériumok kisugároznak a fogfelszín felől és különböző rétegekben aerob (*Streptococcus*, *Porphyromonas* és *Haemophilus*), mélyebben pedig mikroaerofil (*Fusobacterium* és *Leptotrichia*) fajok helyezkednek el benne. (23) A *subgingivális biofilmekre* is meghatározott felépítés jellemző. A *nyelvhátra* pedig az előző kettőhöz hasonló, de attól mégis eltérő szerkezet jellemző. Egy központi mag köré csoportosulva, külső és belső rétegekben, *Actinomyces* és *Streptococcus* speciestek, míg a belső rétegben, *Neisseria* és *Veillonella* törzsek vannak jelen. A *keratinizált ínre* jellemző biofilm leírásával kapcsolatban nem áll rendelkezésre irodalom. (15)

A biofilm kutatások által napjainkban már a nyál-biofilm és a fogak közötti komplex kölcsönhatások ismertek. Az orális biofilmek részét képezi az **orális bakteriális biofilm (bakteriom)**, de beletartozik az orális virális biom (virobiom/virom), a fungális microbiom (a mycobiom), továbbá az orális protozoa biom (protozooom) és az archae biom (archaeom) is. (17)

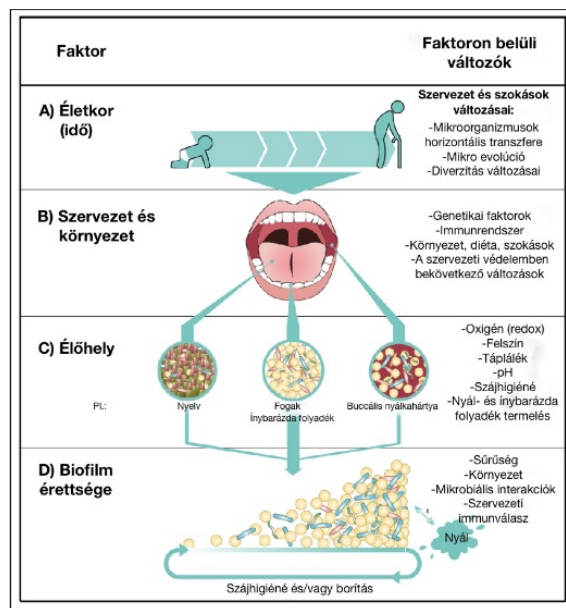
2.5.2 Bakteriális biofilm

Az orális microbiom kifejezés alatt leggyakrabban az orális bakteriomot értik, ami az egyik legstabilabb mikrobiális társulás a szervezetben. Egészséges egyénekben akár 7 éven keresztül is fennmaradhat és nagyon fontos szerepet játszik a szájüregi egészség fenntartásában. (14, 24)

A szájüreg különböző területeinek megfelelően különböző bakteriális biofilm társulások jellemzőek pl. a plakkra, a nyelvhátra és a keratinizált ínyre, így sok baktérium specifikusan kapcsolódhat egy adott területhez, pl.: a *Veillonella atypica* a nyelvháton, a *Veillonella parvula/dispar* a plakokban és a *Veillonella rogosae* a keratinizált ínyen figyelhető meg. (15)

A biofilmben jelenlévő mikroorganizmusok közötti legfontosabb kölcsönhatások a *horizontális géntranszfer* és a *quorum sensing* (küszöbdenzitás-érzékelés). (15)

Felépítését számos szervezeti faktor befolyásolja. (2. ábra)



2. ábra: Az orális bakteriális biofilm felépítését befolyásoló legfontosabb tényezők. (24)

A szájüregben belül a **biofilm érettségi foka** is különböző, az érett biofilmek mélyebb rétegei területén csökkent az oxigénellátás, ami az anaerob speciestek megtelepedésének kedvez, míg a felületesebb rétegekben aerob körülmények uralkodnak. (2. ábra)

A fogfelszíneket borító biofilm képződése során a különböző szájüregi szerves, szervetlen alkotórészek folyamatos felépülése során a mucinoknak a kezdeti fázisban van jelentős szerepe, amikor még aerob körülmények uralkodnak, később az amilázok szerepe kerül előtérbe. A kezdeti fázisban ezen fehérjék a biofilm hatásait fokozzák. A zománc hidroxilapatitjának felszínén lévő Ca^{2+} ionok pozitív töltéseikhez könnyen hozzákapcsolódnak a negatívan töltött molekulák, mint a MUC5B szialinsav oldalláncai. A hisztatinok, statherinek és PRP-k kíséretében ezek az legelső alkotórészei a pelliculának. Az akvirált pellicula elnevezésében az akvirált (=szerzett) szó arra utal, hogy ez a réteg már a fogáttörést követően létrejön. Amikor a pellicula eléri az 1 μm -es vastagságot a nyálfehérjék felületi elnyelődése és a planktonikus, nyálban

oldott formába való kibocsátása között egyensúlyi állapot jön létre. Ilyenkor a regionálisan változó összetételű és sebességű nyálfilmnek megfelelően a pelliculában felületspecifikus a különböző fehérjék elhelyezkedése. Fontos szerepet tölt be a baktériumok következményes megkötése vagy taszítása, továbbá a táplálkozási eredetű szénhidrátok elleni védelem és remineralizáció szempontjából azáltal, hogy a Ca^{2+} és HPO_4^{2-} ionokat a fogfelszínhez közel tartva megvédi azt a savaktól. (25)

2.5.3 *Mikrobiális kölcsönhatások*

A szájüregi biofilm társulásokon belül elhelyezkedő baktériumok között különféle kölcsönhatások jöhetnek létre, amelyek lehetnek szinergisztikusak vagy antagonisztikusak. A nyál és a szájüregi felszín között pedig folyamatos át- és visszaépülési folyamatok zajlanak. (14, 24)

A *szimbiózis* egy kölcsönösen előnyös kölcsönhatás, amely létrejöhét a mikrobiális közösségeken belül, azok között vagy a szervezettel való kölcsönhatás eredményeként. (14, 17)

A *diszbiózis* a mikrobiális közösségek olyan egészséggel összefüggő változásának következtében alakul ki, amelynek eredményeként a szervezettel való előnyös kölcsönhatás felbomlása következtében annak hosszú távon való fennállása esetén egészségkárosító hatás jön létre. (17)

Kiegyensúlyozatlan mikrobiom kifejezéssel is illetik, melynek 3 fő ismertetőjele van:

1. *A mikrobiális diverzitás teljes elvesztése:*

A fogszuvasodással kapcsolatban egyértelműen arról számolnak be az irodalmi adatok, hogy a destrukció előrehaladtával egyre inkább a diverzitás elvesztése jellemző a kórfolyamatra, viszont a parodontális kórképekkel kapcsolatban ezzel ellentmondásosak az adatok: a diverzitás csökkenését, de emelkedését is leírták már. (15)

2. *Az előnyös mikrobák elvesztése:*

A kommenzális orális mikroorganizmusok jelenléte szükséges a megfelelő immunválaszok kialakításához a szájüregben, megvédve azt a patogén mikroorganizmusoktól és azok káros metabolitjaitól. (15)

3. *A pathogén mikroorganizmusok felszaporodása:*

Egyensúlyi körülmények között a kommenzális flóra a pathogén mikroorganizmusok számát alacsonyan tartja, míg diszbiotikus körülmények között ezek felszaporodhatnak és a szájüregben fogszuvasodás és fogágybetegség, valamint a szervezetben általános kórképek (cukorbetegség, érlemeszesedés, autoimmun betegségek, daganatos és egyéb megbetegedések) kialakulásához vagy súlyosbodásához járulhatnak hozzá. (15)

Ezen körülmények kialakulásában az ételek tartósítására kifejlesztett fermentációs technikák és a finomított szénhidrátok nagy mennyiségű fogyasztása az ipari forradalom óta befolyással bír a biofilmek szerkezetére (16), így a fogszuvasodás és fogágybetegségek, valamint az általános kórképek kialakulására. (15)

A komplex szénhidrátok fogyasztásának gyakorisága és az egyszerű cukrok fogyasztása a bakteriális biofilmek megváltozását eredményezi. A *non-MS*-ek (*non-Mutans Streptococcusok*) és az *Actinomycesek* kifejlesztették a saját metabolikus útvonalait, hogy a metabolikus savak előállítását fokozzák, így könnyebben elszaporodnak és a biofilm nyugalmi pH-jának savasodását eredményezik (26), amely az alkalikus kémhatást fenntartó kommenzális baktériumok számának, és a diverzitás csökkenését váltja ki. A modern társadalmakra jellemző, (szén)savas italok nagy mennyiségű fogyasztása tovább súlyosbítja a biofilm elsavasodását, így növelve a fogszuvasodás kialakulásának kockázatát. (15)

A szájüregi baktériumok közötti kölcsönhatásban az *amphibiosis* két különböző organizmus együttélésekor a változó környezeti körülményekre adott dinamikus adaptációs folyamat. (27)

2.5.4 *A szervezetre kifejtett hatása*

Az oralom kifejezést az orális (bakteriális) mikrobiom és a szervezet közötti kölcsönhatások leírására használják. A szervezet a pathogén mikrobákra adott reakciójaként védelmet nyújt, azonban harmonizálja és védi is a kommenzális mikroorganizmusokat. A szervezet védelmi reakciója során a szövetek és kommenzális mikroorganizmusok sérülése nélkül próbálja a pathogén mikrobákat elpusztítani, amely által megakadályozza a pathogén mikroorganizmusok megtelepedését. (15)

2.6 A fogszuvasodás napjainkban elfogadott elméletei

Napjaink leginkább elfogadott caries elmélete a kiterjesztett ökológiai plakk hipotézis, ahol az ökológiai plakk hipotézist egészítik ki azzal a gondolattal, hogy inkább az orális mikrobiom metabolikus aktivitása, mint az összetétele váltja ki a legnagyobb változást az ökológiai környezetben, esetünkben a szájüregben. (26, 28)

2.6.1 A kiterjesztett ökológiai plakk hipotézis

A kiterjesztett ökológiai plakk hipotézis alapján a fogszuvasodás az alábbi 3. ábrán látható stádiumokban zajlik. Rendszerváltásként ('regime shift') írja le a mikrobiális változások és következményes pathogén, környezeti módosulások folyamatát, amely a helyi, táplálkozási és immunológiai változások következményeként jön létre. (14, 26)



3. ábra: A caries képződésének stádiumai a kiterjesztett plakk hipotézis alapján:

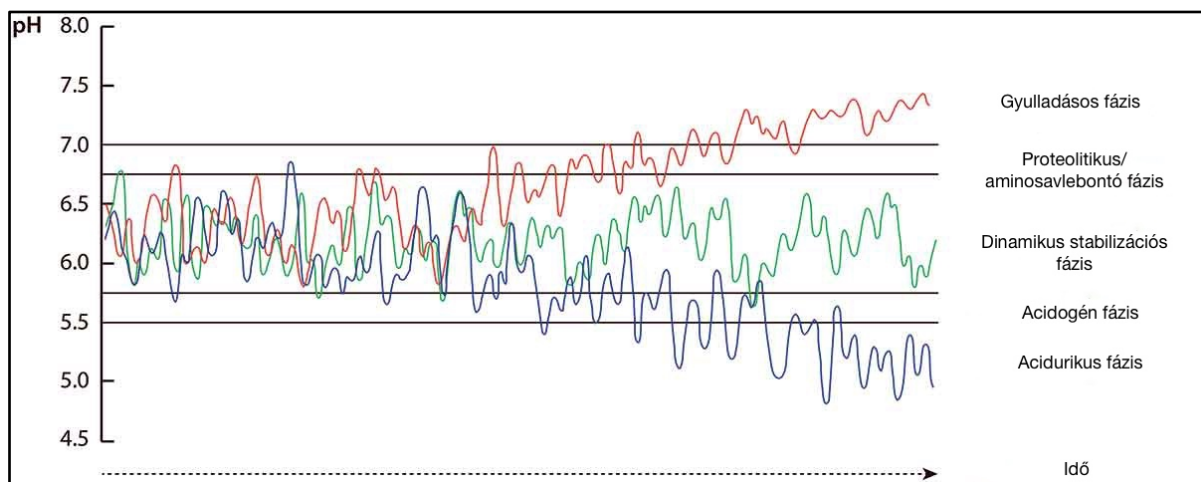
Dinamikus stabilizációs fázis; Acidogén fázis, Acidurikus fázis. (28)

Napjainkban már ezt az elméletet is továbbfejlesztették a fogszuvasodás és fogágybetegségek közös kialakulási mechanizmusával. (14, 29, 30).

2.6.2 A fogszuvasodás és fogágybetegségek közös eredetét meghatározó integrált hipotézis

A kiterjesztett ökológiai plakk hipotézisen túl, a fogszuvasodás és fogágybetegség közös mechanizmusának alapjait Mira és munkatársai (31), továbbá Manji és munkatársai (32) fogalmazták meg, majd a fogszuvasodás és fogágybetegségek integrált hipotéziseként Nyvad és Takahashi (14) foglalták össze. Megfogalmazásuk szerint meghatározandó és megmagyarázandó azon funkciók köre, amelyek stabilizálják, szétválasztják és visszaállítják a

szájüregi mikrobiális ökoszisztéma egyensúlyát. Tehát a fő cél olyan folyamatok meghatározása és felépítése, amelyek kontrollálják vagy modulálják a betegségek kialakulását. Ugyanazon lépések (dinamikus stabilizációs, acidurikus és acidogén) jellemzőek a fogszuvasodás folyamatára, azonban kiegészítették további, inkább a fogágybetegségre jellemző, gyulladós és aminosav lebontó fázisokkal is (**4. ábra**). (14)



4. ábra: A fogszuvasodás és fogágybetegségek közös elméletének stádiumai; zöld színnel a 'dinamikus stabilizációs fázisban' pH 5,5-7 között a mikroflóra egyensúlyi állapotban van. A pH 5,5-6 irányában való eltolódáskor az 'acidogén fázisba' lép, míg pH 4,4-5,5 között már az 'acidurikus fázisba' kerül.

Ezen teória alapján a dinamikus stabilizációs fázis mikrobiális összetétele diverz, *non-MS* és *Actinomycesek* dominálják, nyugalmi pH-ja pedig 5,5 és 7 (átlagosan 6,25) között ingadozik egészséges egyénekben. Ennek során a táplálkozás következtében a szerkezeti mikroorganizmusok folyamatosan metabolizálják a nyálból és a sulcusfolyadékából a táplálékot. Egészséges mikrobiom összetétel mellett ezen metabolikus végtermékek semlegesítése megtörténik, ez a klinikailag egészséges, eredeti ('pristine') állapot, amelyre a dinamikus stabilizációs fázis folyamatos jelenléte jellemző.

A szájüregben belül elhelyezkedő különböző területeknek megfelelően a biofilmek összetétele eltérő lehet, így bizonyos területeken még az egészséges személyeknél is kialakulhatnak a betegség szubklinikai tünetei, amelynek klinikai manifesztációi a szerkezeti reziliencia mechanizmusainak megfelelően kontrollálhatóak. (28)

2.7 Reziliencia és szerepe a szájüregi egészség fenntartásában

A reziliencia egy ökoszisztéma képessége arra, hogy 'megállítsa a zavarokat és egy olyan változáson keresztül szervezze újra a működését, amely képes a változás előtti funkciót, szerkezetet, azonosságot és visszacsatolásokat fenntartani'. (14)

Amennyiben ez az ökoszisztéma nem képes a környezeti változásokkal megküzdeni, a korábban stabil közösségek destabilizálódhatnak és az átrendeződés következtében létrejövő újak stabilizálódhatnak, azaz megváltozik az uralkodó fajösszetétel, eltolódva a patogén flóra irányába. A reziliencia-mechanizmusok küszöbét meghaladó nagy mennyiségű és gyakoriságú szénhidrátfogyasztás vagy a nyáltermelés csökkenése eredményeként először az 'acidogén' (pH 5,5-7), majd az 'acidurikus' (pH 4,5-5,5) fázisba kerül a szájüregi környezet, ahol a folyamatosan csökkenő pH eredményeként a flórában az acidurikus törzsek (*MS (Mutans Streptococcusok)* és *non-MS, Actinomyces* és *Bifidobacteria*) kerülnek túlsúlyba. Amennyiben a sulcusfolyadék mennyisége emelkedik, a flórára a proteolitikus és aminosavbontó baktériumok (mint a *Fusobacterium* és a *Prevotella*) túlsúlya lesz jellemző, amelyet 'proteolitikus/ aminosavbontó fázisnak' neveznek. Ezen folyamat hosszú fennállása esetén pedig az anaerob fajok, mint a *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) vagy *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) szaporodnak el, amelyek a cukrokban gazdag, supragingivális és a fehérjékben gazdag subgingivális környezetben is túlélnek, így jelentős mértékben megváltoztatva a flóra összetételét. A hosszabb ideig fennálló körülmények kedveznek elszaporodásuknak, elősegítve a gingivitis, majd a parodontitis kialakulását. Azonban a *Streptococcusok* és *Actinomycesek* is részei lehetnek a parodontitis flórájának, *Fusobacteriumokkal* és *Prevotellákkal* való együttes jelenlétük pedig a *P. gingivalis* elszaporodásának kedvez. Ezen folyamatok kialakulásában döntő szerepe van a táplálkozásnak és az általános szervezeti állapotnak. Amennyiben több, hasonló (pl. szacharolitikus és proteolitikus) funkciójú mikroba található a szájüregben, további hasonló mikrobák (pl. probiotikus baktériumtörzsek hozzáadása) vagy tápanyagok (pl. arginin) hozzáadása mai tudásunk szerint nem változtatja meg jelentős mértékben a működéseket. Az ilyen célzatú terápiák hatékonysága még kutatások tárgyát képezik. (14)

A szájüreg egészséges állapotának fenntartása így a reziliencia, azaz a dinamikus stabilizációs fázisban való egyensúlyi állapot fenntartásával vagy az abból való kibillenés esetén annak visszaállításával lehetséges, amiben jelentős szerepet játszanak a nyál, a sulcusfolyadék és a levált epithel sejtek, mint intrinsic rezilienciafaktorok. (25)

A *nyál* az egyik legfontosabb intrinszc rezilienciafaktor, amely egyrészt a patogén mikroorganizmusok ellen véd (2. *táblázat*), másrészt a kommenzáris mikroflóra túlélését is támogatja azáltal, hogy a benne megtalálható glikoproteinek, fehérjék, urea és ásványi anyagok által elősegíti azok növekedését. (25)

A sulcusfolyadék az íny alatt elhelyezkedő területek védelme során szintén fehérjéket, aminosavakat és tápanyagokat (pl. urea) szolgáltat, így egy stabil környezetet hoz létre a baktériumok számára, mivel kis mennyiségű kiáramlása részlegesen meg tudja akadályozni a nyál, az ételek és italok beáramlását. (14)

A nyálban megoszló baktériumok összessége tükrözheti a betegség aktuális állapotát, tehát a szájüregi közösségek rezilienciájának helyreállításához a mikrobiom funkcionális egyensúlyának helyreállítása fontos a szájüregben, amely a szájüregi pH egyensúlyának fenntartásával lehetséges.

Az egyensúly fenntartásához holisztikus szemlélet szükséges, így nemcsak a szájhigiénés tevékenységek, hanem egészségtelen életmód esetén a táplálkozással összefüggő szokásokon történő változtatás is szükséges hozzá. (33)

ÖSSZETEVŐ	FUNKCIÓ	HATÁS
Víz	Tisztítás	Mikroorganizmusok, cukrok és savak
NaHCO ₃ , HPO ₄ ²⁻ , fehérjék	Pufferelés	Neutrális pH fenntartása
Nyálfehérjék	Pelliculaképzés	Kommenzális baktériumok letapadása, patogén mikrobák eltávolítása
Glikoproteinek, lipidek	Tápanyagforrás	A szájüregi egyensúly fenntartásában fontos mikroorganizmusok táplálása
Mucinok	Baktérium-, gomba- és vírusellenes, tápanyagforrás	Lubrikáció, Agglutináció/aggregáció elősegítése, Nyálfehérjék közötti kölcsönhatások
Amiláz	Baktériumellenes, keményítőbontás	Bizonyos Streptococcusok megkötése, számos baktériumnak tápanyagforrás
Lakto- és mieloperoxidáz	Gomba- és baktériumellenes	H ₂ O ₂ segítségével a tiocianát, hipotiocyanáttá alakítása, Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium-, Candida-ellenes
Lizozim	Baktérium-, gomba- és vírusellenes	A Gram-pozitív bakteriális sejtfal poliszacharid hidrolízise, vírus- és Candidaellenes
Laktoferrin	Baktérium-, gomba- és vírusellenes	Vas szekvesztráció és megkötés, Gram-pozitív és negatív baktérium-, vírusellenes
PRP-k	Baktérium- és vírusellenes	Gram-negatív baktérium-, vírusellenes
Statherinek	Gomba- és baktériumellenes	Mikroorganizmusok aggregációjának elősegítése, Gram-negatív baktérium-, Candidaellenes
Cisztatinok	Baktérium-, gomba- és vírusellenes	Gram-pozitív és negatív baktérium-, Candida-, vírusellenes
Hisztatinok	Baktérium-, gomba- és vírusellenes	Gram-pozitív és negatív baktérium-, Candida-, vírusellenes
Immunglobulinok (sIgA)	Mikroballenes	Adhézió gátlása, fagocitózis fokozása, Más nyálfehérjékkel együtt a mikroorganizmusok aggregációja

2.táblázat: A nyál összetevők indirekt- és direkt antimikrobiális hatásai (19)

2.8 Nyál biomarkerek

A biomarker egy mérhető és meghatározható szintű biológiai paraméter, amely az egészséggel és fiziológiával kapcsolatos mérések mutatója, mint a patológiás folyamatok, környezeti ártalmak, betegségek diagnózisa és prognózisa vagy terápiás beavatkozásokra adott farmakológiai válaszok. (39)

A biomarkerek szintje jelezheti a fehérje-expresszió változásokat, amelyek korrelálnak a rizikóval vagy a betegség progressziójával vagy egy adott kezelés állapotváltozást kiváltó hatásával. (34)

A nyálból transzkriptomikai biomarkerek is meghatározhatóak, mint az *exozómák* vagy a *nyál micro-RNS (miRNS)*, melyek gének által kódoltak és nem íródnak át fehérjékké. A *miRNS*-ek génjeinek százait fedezték fel különböző szervezetekben, amelyek a sejtnövekedés, differenciáció, apoptózis, stressz- és immunválaszok, valamint a cukorszekréció szempontjából fontosak.

A *citokinek*hez tartoznak az interferonok, tumor nekrozis faktor és az interleukinok, amelyek a peptid sejtreguláció szerteágazó családját képezik. (35) A *citokinek* az immunválasz számos aspektusát, a leukocyták toborzása során az adhézións molekulák szintézisét, kemokinek szintjét szabályozzák. A veleszületett immunitásban betöltött szerepük, hogy a mikrobiális PAMP (pathogén asszociált molekuláris mintázatok), mintázatfelismerő receptorai kötődnek a szervezet sejtjein (beleértve a dendritikus sejteket is), amelyek ezt követően elindítják a gyulladási választ, mint az IL-1 β , IL-6, IL-8 vagy a TNF α szintézisét. Kezdetben csak gingivitis alakul ki, majd ha a folyamat hosszú ideig fennál, cariesbe/parodontitisbe progrediálhat. (36)

A nyáldiagnosztika egy dinamikus és fejlődő terület, amely nanotechnológiát és molekuláris diagnosztikát alkalmaz a szájüregi és szisztémás betegségek diagnózisára és a betegségek felismerésére. (37)

2.8.1 Mucinok

A nyálban található mucinok fő funkciói:

- Lubrikációban betöltött szerepük során a GIT-ban (gyomor-bél rendszer, angolul: gastrointestinal tract) segítik a táplálék továbbítását és megelőzik a szájüreg kiszáradását vízmegtartó képességük által. (25, 38)
- Szelektív barrier funkciójuk által elősegítik a kis molekulásúlyú alkotórészek szállítását, a tápanyagok epithelsejtekhez való eljuttatását.
- Védő funkcióik által pedig az alattuk fekvő epithelsejtek - mechanikai vagy kémiai traumáktól való - védelmét biztosítják.
- Szubsztrátként szolgálhatnak a GIT-ban élő baktériumsejteknek növekedése, adhéziója, védelme és clearance-e során (**3. táblázat**). (38, 39)

A BIOFILM KÉPZŐDÉSE		A NYÁL FUNKCIÓJA A BIOFILM KÉPZŐDÉSE ALATT		
Biofilm kora	Biofilm	Szerves összetevők	Szervetlen összetevők	Fizikai tömeg
Percek	Aerob körülmények	<u>PRP-k, statherinek, hisztatinok, mucinok, cisztatinok</u> A pellikulaképző proteinek kontrollálják a bakteriális kolonizációt.	Kevés funkció ebben a stádiumban.	Baktériumok clearance-e (mucinok).
Órák	Aerob körülmények	<u>slgA, lizozim, laktoferrin, peroxidázok, cisztatinok, mucinok, hisztatinok</u> Az antimikrobiális fehérjék gátolják a bakteriális növekedést és metabolizmust.	Kevés funkció ebben a stádiumban.	Baktériumok clearance-e (mucinok).
Napok	Anaerob körülmények	<u>Nyálfehérjék és urea</u> A bakteriális savak kismértékű pufferelése.	<u>Bikarbonát, foszfát</u> A bakteriális savak pufferelése. A demineralizáció csökkentése.	A cukrok és bakteriális savak clearance-e (amiláz).
Hetek	Anaerob körülmények	<u>Kalcium-kötő fehérjék</u> Demineralizáció csökkentése. Remineralizáció fokozása.	<u>Kalcium-kötő fehérjék</u> <u>Fluorid</u> Demineralizáció csökkentése és remineralizáció fokozás.	A cukrok és bakteriális savak clearance-e (amiláz).

3. táblázat: A biofilm funkciói annak kora, vastagsága és savképző kapacitása alapján. (25)

- A mucinok továbbá biológiailag aktív molekulákat köthetnek meg (mint a trefoil faktor), amely az epithelsejtek védelmét jelenti és elősegíti a sebgyógyulást. (40)

A mucinok a pathogénekkal összefüggő molekuláris mintázatok (PAMP, pathogén asszociált molekuláris mintázatok) felismerőjeként (40), azaz molekuláris mintázattal összefüggő károsodásfelismerőként (DAMP, damage associated molecular patterns) hathatnak (38). A Toll-szerű receptorok (TLR, Toll-like Receptor) a *Drosophila* Toll proteinhez (innen is ered a 'Toll-szerű receptor' elnevezés) és az emberi interleukin-1 receptor (IL-1R) családdhoz hasonló felépítésűek. A TLR-ok a mikroorganizmusok elleni védelemben játszanak szerepet és a PAMP-ok - amelyek a mikroorganizmusok túlélésében játszanak szerepet – felismerésére fejlődtek ki, képesek a mikrobák egyedi mintázatait felismerni, másik elnevezésük a mintázatfelismerő receptorok (PRR, angolul: Pattern Recognition Receptor). (40) Extracelluláris citoplazmatikus doménekből állnak és a citoplazmatikus doménjük az IL-1 receptor doménhez hasonló szerkezetű és Toll/IL-1 receptor (TIR) doménként is ismert. A bőr és a nyálkahártyák mikroorganizmusoknak kitett felszínein helyezkednek el. A TLR2-t bakteriális sejtfal komponensek (lipoproteinek, lipoteikolsav és fungális zymosan), a TLR3-at kettősszálú RNS, a TLR4-et a baktériumok sejtfalának lipopoliszacharidja aktiválja. (40) Vizsgálatok során Sjögren-szindrómások (SS) kisnyálmirigy biopsziáiban a TLR2, TLR3 és TLR4 erősebb expresszióját mutatták ki az acinusok és a ductális epithelsejtek esetében, mint egészséges kontrolloknál. (41) A proinflammatorikus citokinek (TNF α és IFN-gamma) fokozott expressziója tovább fokozta a TLR-ek expresszióját, valamint a HSG (humán nyálmirigy) sejtek stimulációja TLR ligandokkal fokozta az IL-6 produkcióját és a CD54 (A differenciálódás klasztere 54) expresszióját, ahol az in vitro nyálmirigy sejtek képviselték a nyálmirigy sejtek in vivo funkcióját. A jelátviteli folyamatok során a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonalon az ERK (extracelluláris szignál-regulált kináz), Janus-arcú kináz (JNK) és p38 indukcióját eredményezte, viszont az NF- κ B aktivációja nem volt megfigyelhető a TLR által. (41)

A mucinokat több szempont alapján csoportosíthatjuk:

A nyálkahártyát borító filmréteghez való viszonyuk alapján lehetnek szekretoros vagy membránhoz kötött mucinok. A membránhoz kötött mucinokat (Pl. Mucin 1 és Mucin 3) az epithelsejtek szintetizálják és azok plazmamembránjának apikális részéhez kötődnek. A membránhoz kötött mucinok szerkezetére a C-terminális transzmembrán horgony jellemző, amely biztosítja a rögzülésüket. A szekretált mucinok a goblet sejtek apikális részében

szintetizálódnak és nagy molekulásúlyuknak köszönhetően viszkózus gél fázist képeznek. Szerkezetükre az N- és C-terminális régióban elhelyezkedő ciszteinben gazdag szekvenciák jellemzőek. (39)

A mucinok a **cukor összetételük alapján** pedig *neutrális* és *savas mucinokra* oszthatók fel. A *savas mucinok* jelentős mennyiségű szíálsavat ('*szialomucinok*') és/vagy szulfát reziduumokat ('*szulfomucinok*') tartalmazhatnak. Sok mucin viszont hordozza mind a szulfát- mind a szíálsav reziduumokat is. A szulfomucin a legtöbb baktérium mucinbontó enzimének ellenáll. A glikoziláció révén kötődhetnek immunsejtekhez, patogén és kommenzális mikroorganizmusokhoz is. (39)

A mucinokat a **szekréció helye alapján** is csoportosíthatjuk, ugyanis a submandibuláris nyálmirigy (MG1-et szintetizáló) mucosus és (MG2-t szintetizáló) serosus sejteket tartalmaz, amely a nyálban található mucinok 30%-át szekretálja. A sublinguális, labiális és palatinális nyálmirigyek (amelyek jelentős részben mucosus sejteket tartalmaznak) pedig a mucinok 70%-át állítják elő a szájüregben. A sublinguális nyálmirigyek által szekretált mucin koncentrációja magasabb, mint a submandibuláris nyálmirigyé, a parotisé pedig elhanyagolható. (42)

A nyálban található mucinok általában antibakteriális nyálfehérjék transzportereként működhetnek, fokozzák azok pelliculához való kapcsolódását, valamint megvédhetik azokat a proteolitikus degradációtól. A baktériumok a mucinokon megtalálható specifikus oldalláncok, mint a szíálsav vagy vércsoport antigének közvetítésével kapcsolódhatnak. (43)

A szájüreg védelmében kétféle módon hatnak a mucinok: a) a baktériumok aggregációja által, amely fokozza azok nyállal való lenyelését; b) a glikán-specifikus kötődésen keresztül, amely a baktériumok szétoszlásával, azok szelektív eltávolítását eredményezi.

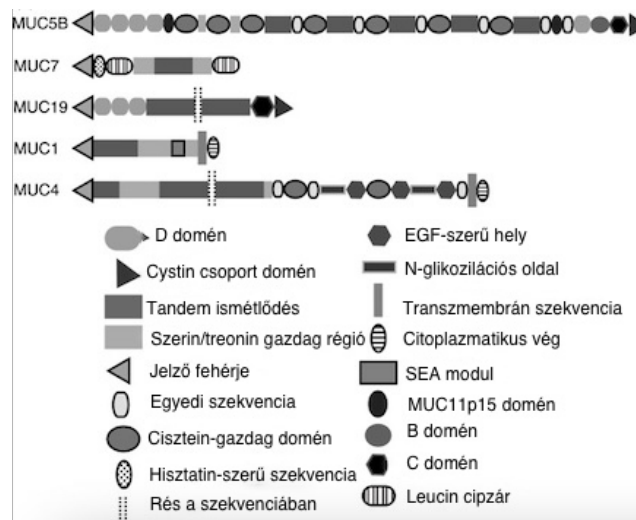
A két legfontosabb *szekretált* szájüregi mucin, a MUC5B és a MUC7 különböző antibakteriális hatásmechanizmussal rendelkeznek. (43)

A mucinokat részben '*prebiotikus*' anyagoknak tartják (39). A *prebiotikum* egy nem emészthető táplálék-összetevő, amely a baktériumok szelektív növekedése révén előnyösen befolyásolja a szervezet egészségét. (44, 45)

A szájüregben megtalálható főbb mucinok a MUC5B, MUC7, Mucin 19, Mucin 1 és a Mucin 4 egyedi domén struktúrából állnak, amely befolyásolja a mucinok fizikai struktúráját és elhelyezkedését a szájüregben. A MUC5B és a MUC7 *szekretált mucinok* részletes ismertetése

a további fejezetekben történik. A Mucin 1 és a Mucin 4 *membránhoz asszociált mucinok*, amelyek a parotis, submandibuláris és a kis nyálmirigyek ductusait bélelik. A jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet, valamint a szekretált mucinok számára képeznek vázat (43).

A MUC5B és MUC7 felépítésére is jellemző, hogy egy fehérjeláncból állnak, amelyek glikán oldalláncai kifelé ágaznak, hasonlóan mint egy ‘üvegmosókefe’ (5. ábra). (43)



5. ábra: A szájüregi mucinok szerkezeti felépítése (43)

2.8.1.1 MUC5B jellemzése

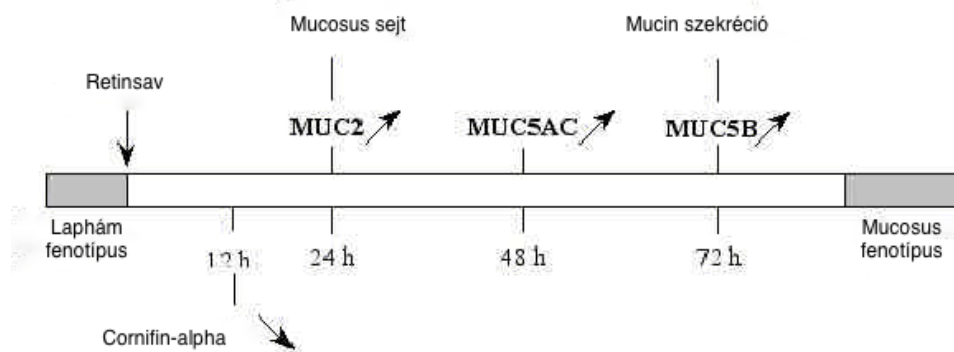
A submandibularis, sublingualis, az ajak és a szájpad kis nyálmirigyei termelik. (39, 43) Az elsődleges gélképző, szekretált mucin a szájüregben (39, 43). A MUC5B magas molekulású mucin (MG1>1 MDa), barrier feladatokat lát el a GIT-ban, továbbá a lubrikációért felelős és a fogfelszínnek védelmében van szerepe (46), de a mikroorganizmusok táplálékaul is szolgálhat. (38, 39) A MUC5B szekretált mucin, mikroorganizmusokkal szembeni védelemben betöltött fő funkciói: a) A biofilmből segíti a baktériumsejtek planktonikus formába való átlépését, így a baktériumok (pl.: *S. sanguinis* és *S. mutans*) együttes jelenlétét fokozza - bár csak limitált mennyiségű baktériumhoz kapcsolódik és a baktériumok aggregációjára, megkötésére nem hat (43). b) Ezáltal a köztük lévő kompetíciót csökkenti. (47)

A mucinok génjei közül a Mucin 2, MUC5AC és a MUC5B génje a 11p15.5 kromoszómán helyezkednek el egy multigén család részeként, amely a *szekretált mucinokat* kódolja. A MUC5AC és a MUC5B génjei nagyon közel helyezkednek el egymáshoz - egy csoportot alkotnak a Mucin 2-vel és Mucin 6-tal. Szerkezetileg viszont a ciszteinben gazdag régiókban

különböznek (48). Feltételezhetően a 11p15.5 kromoszómán található MUC5AC és a MUC5B egy génből erednek. A MUC5AC elsősorban a légutakban kifejeződő mucin gén, ahol egy további gén, a hCLCA1 is a mucinok szekréciójáért felelős. (49) A MUC5B a légutak, sublingualis és submandibularis nyálmirigyek, epehólyag és endocervix nyálkahártyájában fejeződik ki.

Feladata nagyon specializált és a 11p15 kromoszómán található gének - közöttük a MUC5B - expressziós mintázata különböző. (48)

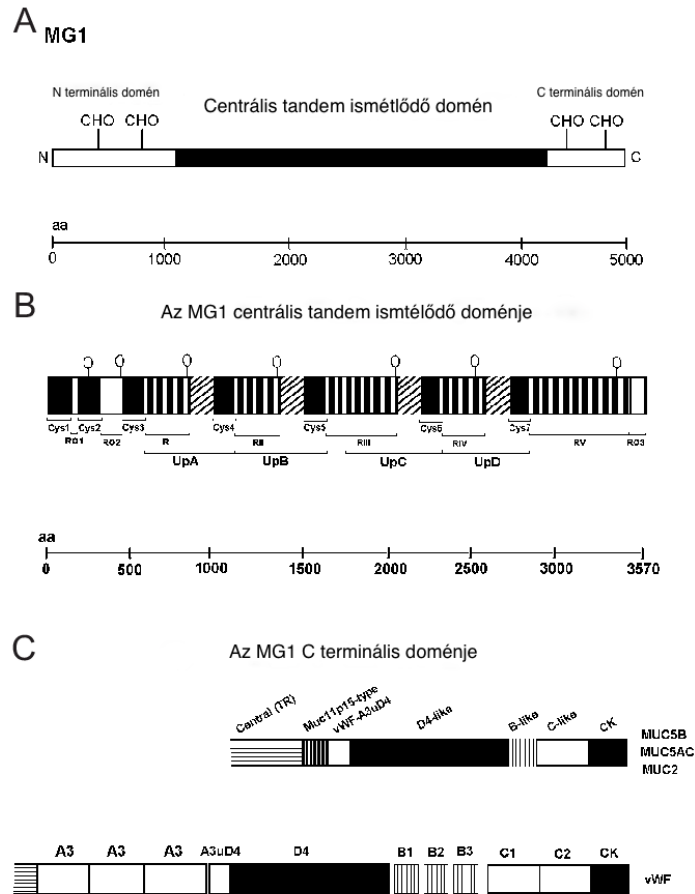
Korábbi vizsgálatok eredményei szerint retinsav hatására a 11p15 kromoszómán elhelyezkedő mucin gének szekvenciálisan aktiválódnak (6. ábra): először a Mucin 2, majd a MUC5AC végül pedig a MUC5B (50).



6. ábra: A mucin gének szekvenciális aktivációja: Koo és munkatársai (50) határozták meg a mucin génjeinek szekvenciális aktivációját a retinsav hatására (51).

További vizsgálatok eredményeiből arra következtettek, hogy ezen gének elhelyezkedése és aktivációs sorrendje az embrionális fejlődés transzkripcionális regulációjára vezethető vissza (52).

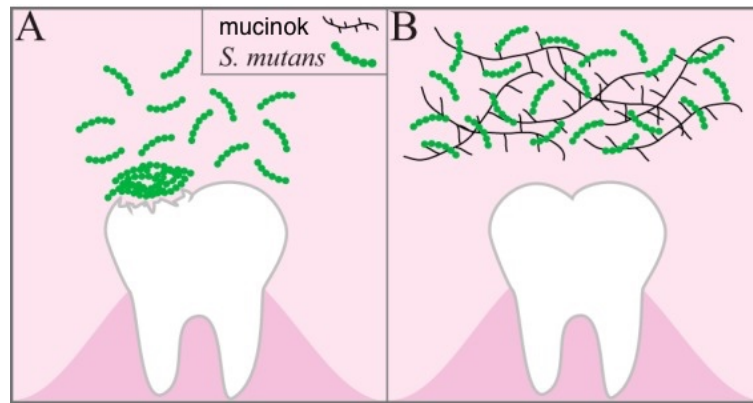
A MUC5B fehérjelánc kb. 5700 aminosavból felépülő C-terminális, centrális és N-terminális részekből áll (7. ábra). Az MG1 ciszteinben gazdag aldomének és egyéb mucinok (emberi MUC5AC, Mucin 2, egér MUC5AC, patkány Mucin 2) között szerkezetbeli hasonlóságok is mutatkoznak.



7. ábra: A humán MUC5B gén produktumának oligomer szerkezete: A) A teljes MUC5B szerkezete, B) Az MG1 centrális tandem ismétlődő doménje c) Az MG1 C terminális doménje (42)

A mucinok terminális csoportjai tartalmazzák pl. a sulfo-Lewis hiszto-vércsoport struktúrákat ($\text{SO}_3\text{-3Gal}\beta\text{1-3GIC-NAc}$) -vagy más, ritka vércsoport struktúrákat is - így a MUC5B glikozilációja az egyén ABH és Lewis hiszto-vércsoport antigén státuszát tükrözi, amely azonban az azonos vércsoportú egyéneknél is eltérő szerkezetet mutathat. Ez a szerkezet a szájüreg különböző helyeire jellemző, az adott helyre specifikus szájüregi baktériumok kötődését teszi lehetővé. (39)

A MUC5B vizsgálatai során továbbá kimutatták, hogy azonos nyálmirigyen belül is, az F2 epitópnak megfelelően különbözően glikozilált MUC5B (vagy MUC5AC) termelődik. (53) A nagy nyálmirigyekben a mucosus acináris és ductus sejtek mutatnak MUC5B reaktivitást. (54) A MUC5B működésének pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen ismert, viszont a **8. ábrán** látható módon a *S. mutans* és egyéb, *non-MS* elleni védelemben betöltött funkciója, hogy képes azokat planktonikus formában tartani, amelyek így nem tudnak a fogfelszínhez tapadni.

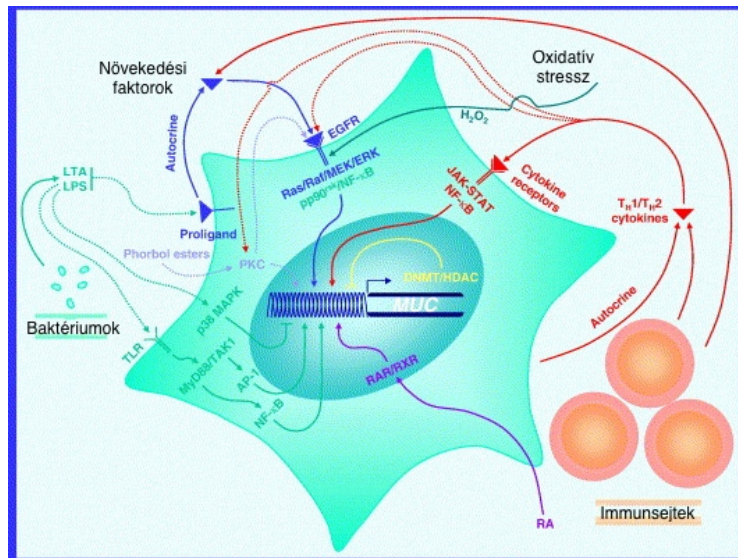


8. ábra: A MUC5B lehetséges működési hatásmechanizmusa. A) A *S. mutans* letapadása, majd biofilm képzése során cukrot használ a ragadós extracelluláris poliszacharidok képzéséhez. B) A mucinok által a *S. mutans* planktonikus formába kerül. (43)

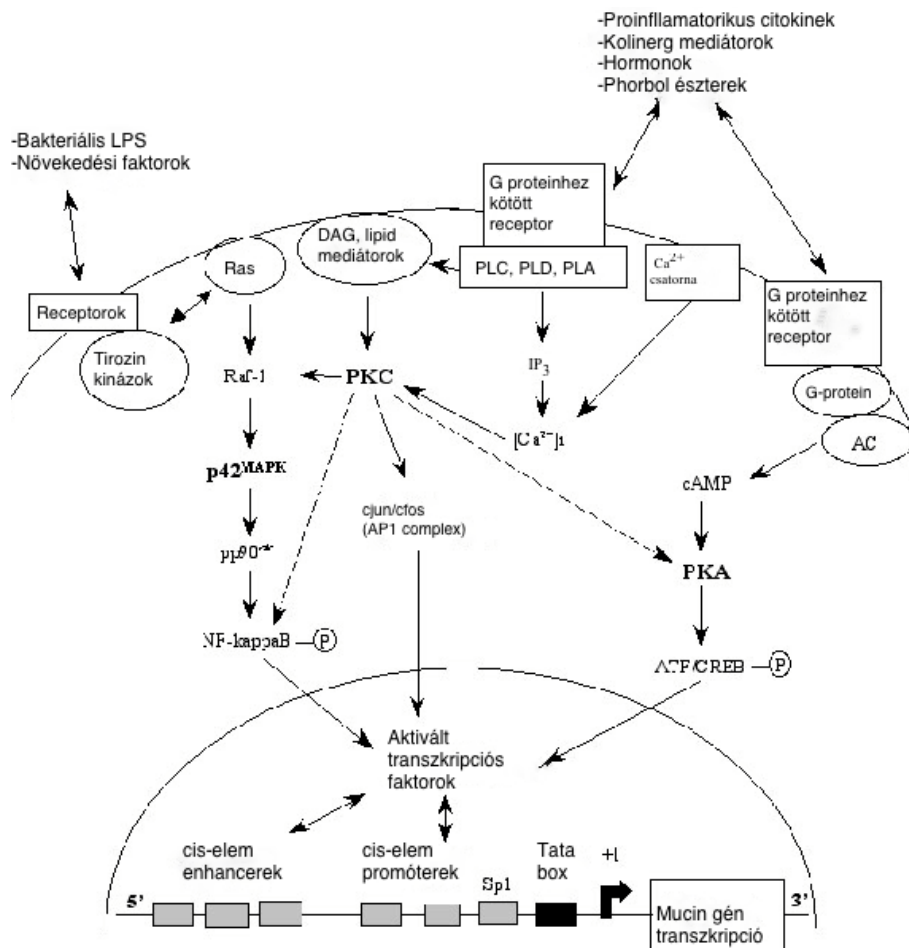
Heterogén glikán láncai miatt csak néhány szájüregi baktériumot képes megkötni (pl. *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans*). Hatásmechanizmusa alapján a baktériumokat taszítja a fogfelszínekről, azokat viszont nem pusztítja el, így a baktériumok nem virulens formában lehetnek jelen a szájüregben vagy továbbbódnak a tápcsatorna további szakaszaira. (43) A MUC1, membránhoz kötött mucin szolgál vázként a MUC5B számára. (55) Továbbá a MUC5B heterotopikus komplexeket képezhet más mucinokkal (pl. MUC7-el), amelyben a ciszteinben gazdag doméneknek lehet szerepe. Ezekhez a doménekhez bizonyos esetekben hisztatin, statherin és ciszteinben prolin-gazdag fehérjék kötődhetnek. (43) A mucinok ciszteinben gazdag szubdoménjei különböznek az emberi pro-von Willebrand faktor D doménjétől, amely jelentősen különbözik a MUC2 és MUC5B esetében. (48)

A caries képződés hátterében a mucinok produkciója, a proinflammatorikus citokinek termelődése, valamint a mikroorganizmusok jelenléte közötti kapcsolatról számos irodalmi adat áll rendelkezésre. Korábbi vizsgálatok során kimutatták, hogy az IL-1 β és TNF α által a Mucin 2 és MUC5AC génjei upregulálódhatnak (56).

A 11p15.5 kromoszómán elhelyezkedő mucin gének szabályozásában a proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6 és TNF α), a baktériumok LPS-e, növekedési faktorok (EGF, TGF- α), lipid mediátorok, retinoidok és hormonok is részt vesznek (9-10. ábra) (51).



9. ábra: A MUC5B génjének transzkripcióját kiváltó exogén ágensek (57)



10. ábra: A 11p15.5 kromozómán elhelyezkedő mucin gén (MUC5B) transzkripciójához vezető proinflammatorikus citokinek és növekedési faktorok által aktivált jelátviteli útvonalak lehetséges mechanizmusa (51)

A MUC5B transzkripciót az Src/RAS/MAPK/pp90 jelátviteli útvonal szabályozza (**10. ábra**), amely az NF- κ B aktivációját eredményezi (51). A MUC5B promóter régiója Caco-2 enterocytákban inaktív. A proximális promóter az Sp1 és metiláció befolyása alatt áll, míg a disztális promóter az Sp1 és ATF/CREB (Aktiváló transzkripciós faktorok/cAMP válaszelemkötő fehérje, angolul: Activating Transcription Factors/ cAMP response element binding protein) faktorokat köti meg és transzaktiválódik a CREB által, amelyek a cAMP (ciklikus adozin monofoszfát) jelátviteli útvonalon aktiválódnak, csakúgy mint a p38^{MAPK}. Az AP-1 komplex – Jun homodimerekből és Jun/Fos heterodimerekből áll – szintén heterodimereket képezhet az ATF/CREB-vel, ahogy a PMA (phorbol 12-mirisztát 13-acetát), mint a PKC potens aktivátora szignifikánsan indukálhatja a MUC5B aktivitást (51).

A MUC5AC számos, a **4. táblázatban** részletezett gyulladásos és egyéb mediátor által upregulálódhat.

Gyulladásos mediátorok:

- IL-1 α és β
- Th2 citokinek: IL-4, IL-6, IL-9, IL-13
- Th1-Th2 citokinek: TNF α
- Th1 citokin: IFN-gamma
- MMS-68 (makrofág eredetű fehérje-68)
- C3a
- Hisztamin
- Elastáz, katepszin G, chymáz
- Szabad gyökök, ROS

Egyéb mediátorok:

- Bakteriális produktumok: *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Entamoeba histolytica*, *Bordetella pertussis*, LPS
- Dohány termékek: acrolein (aldehid)
- Mustár olaj
- A vitamin és retinoidok
- Hormonok: ösztrogén, T₃
- Glükokortikoidok: dexamethasone, bradikinin
- Szennyező anyagok: pl.: maradék olajszenyeződés

4. táblázat: A mucin (MUC5AC) expressziót/szekréciót fokozó mediátorok (51)

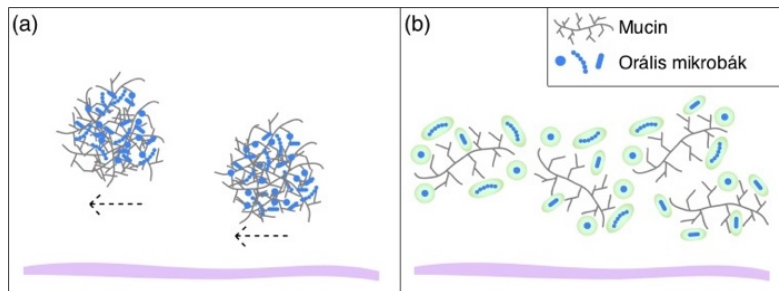
Humán submandibularis nyálmirigy (HSG) sejteket kezeltek szarvasmarha submaxilláris nyálmirigy (BSM) mucinnal, amelynek során sqPCR-el (szemikvantitatív polimeráz láncreakció) kimutatták, hogy a 0,2-0,4 μM -os koncentrációkban történő kezelést követően a sejtek szignifikánsan magasabb mértékben expresszálták az IL-8-at, TNF α -t, IL-6-ot (IL-6 esetében a protein szintet is mérték, ami szintén szignifikáns emelkedést mutatott a kezelés hatására) és az IL-1 β -t. Ugyanilyen sejteket tisztított humán MUC5B-vel vagy sulfo-Lewis reziduumokkal kezelve is a TNF α és IL-6 mRNS szintek emelkedése volt megfigyelhető. A HSG sejteken kimutatható a TLR4 receptor és DAMP-ként funkcionál. 0-0,2 μM -os LPS-el történő stimulációt követően az IL-6 és TNF α szignifikánsan emelkedett szintje volt megfigyelhető. Egy IL-6 expressziót blokkoló anyag jelenlétében sem a BSM sem az LPS nem volt képest az IL-6 mRNS-expresszió indukciójára. (38)

A vizsgálat eredményeit összefoglalva a HSG sejtek 0,4 μM BSM-el történő 0, 2, 8 és 24 óráig tartó stimulációja eredményeként a MUC5B 2-24 óráig emelkedett, míg a MUC7 expresszió csökkent. A TLR4- és az NF- κB p65 alegységek expressziója nem történt meg, 10 ng ml⁻¹ TNF α váltotta ki a nukleáris transzlokációt. Ezen eredmények alátámasztják Kawamaki és munkatársai (41) eredményeit, akik humán submandibuláris sejtek vizsgálata során azt találták, hogy a TLR receptorok nem aktiválják az NF- κB útvonalat, viszont a CD54 expresszióját és az IL-6 produkcióját fokozzák, valamint az EKR, JNK és p38 foszforilációját váltják ki ezen sejtekben. (38)

Barrera és munkatársai (38) vizsgálataiban megállapította, hogy a MUC5B indukciója a HSG sejteken a MAPK útvonalon történik és az IL-6 által indukált autokrin-parakrin útvonalon az ERK 1/2 aktivációjával tovább fokozza a MUC5B expresszióját. Ezen kívül azt találták, hogy a MUC5B LPS-indukált módon TLR4 mediált útvonalon az IL-6 aktivációját eredményezheti Sjögren-szindrómában. (38, 51)

A MUC7-en észlelt ellentétes hatások pedig a két mucin (MUC5B és MUC7) eltérő reguláló mechanizmusára utalnak. (38)

A MUC7 hatásmechanizmusa a szerkezetéből adódóan eltér a MUC5B-től ugyanis sziálsav oldalláncain keresztül képes megkötni a baktériumokat (pl. *S. sanguinis*, *S. sobrinus* vagy *S. oralis*-t a konzervált szerkezetű sziálsavat felismerő receptorokon keresztül (**12. ábra**), de a *S. gordonii* már nem ezeken keresztül kapcsolódik hozzá). A *S. mutans*-t a baktérium alfa-enoláz proteinjén keresztül köti meg. (43) Más baktériumok (pl.: *E. coli* és *S. aureus* ellen, de vírusok pl. HIV és gombák (*Candida*)) ellen is véd.



12. ábra: A MUC7 hatásmechanizmusa: a) Mikrobák agglutinációja; b) Sziálsav oldalláncain keresztül köti meg a mikrobákat. (43)

A MUC7 gén proximális promotor régiója az AP-1 számára kettő, az NF- κ B számára pedig egy kötőhelyet tartalmaz. Az AP-1 lényeges a MUC7 expresszió szabályozásában, míg az NF- κ B pedig a MUC7 TNF α által indukált transzkripciójában szerepel (38). A korábbiakban leírt, a mucin génátírásra jellemző, eltérő jelátvitelt vizsgálták A549 sejtvonalon, amely TLR4 receptort nem tartalmaz, így LPS-en keresztül nem aktiválható. A vizsgálat során egyértelműen bizonyították, hogy a MUC7 TNF α által indukált transzkripciója az NF- κ B útvonalon keresztül történik. Lehetségesek egyéb útvonalak is (pl. EGF), amelyek további vizsgálatok tárgyát képezik. (58)

2.8.2 Interleukin (IL)-1 β

A Th2 sejtek termelik (59). Lymphociták és macrophagok hiányában nem termelődik. Lokalizációja főleg a ductális epithelium körül volt kimutatható Sjögren-szindrómás páciensek kismirigyjeiben. (60) Rágcsálók nyálmirigyén végzett vizsgálatok eredményeként a TNF α és az IL-1 β helyi produkciója is fokozza az IL-6 produkcióját, mert az IL-6 gén expresszióját megelőzően jelen van ez a két citokin. (60) Vizsgálatok eredményei alapján cariesben betöltött szerepe, hogy a *S. mutans* számmal pozitívan korrelál az IL-1 β koncentrációja. (61) A vizsgálatok eredményei alapján az anthocyaninok képesek a proinflammatorikus citokinek, így az IL-1 β gátlására (62).

2.8.3 Interleukin (IL)-2

Az IL-2-t, amely a késői típusú hiperszenzitivitási reakciókban szerepel, a Th1 sejtek termelik. Sjögren-szindrómás páciensek kis nyálmirigyeit vizsgálva könnyebben detektálták az IL-2-t ezen betegeknél, mint az egészségesekben. Az IL-2 nagy mennyiségű termelésére képesek a memóriasejtek. Antigen vagy mitogén stimuláció hatására a T sejtekben a protein kináz C aktiválódik (PKC), amely az IL-2 és IL-4 expressziójához vezető biokémiai stimulusok egyik kezdő lépése. (60)

2.8.4 Interleukin (IL)-6

Az IL-6-ot Th2 sejtek termelik, ezáltal a humorális immunválaszokat fokozzák. A nyálmirigyekben pedig főleg az epithelsejtek, macrophagok, fibroblastok, endothelsejtek és B sejtek termelik (36, 59). Az IL-1 β és TNF α indukálja az IL-6 termelődését. A helyileg képződő IL-6 pedig a B sejtek végleges érési folyamatában fontos (60).

Az IL-6-nak számos biológiai hatása van és a szervezeti válaszok szignifikáns mediátoraként hat a szövetkárosodás, fertőzések és gyulladások során. A pulpális gyulladásokat és ödémaképződést az érpermeabilitás fokozásán keresztül gyorsítja fel. A veleszületett immunitásból a szerzett immunreakciók irányába való váltást a leukocyták toborzásán, aktivációján és apoptózisán keresztül eredményezi. Szerepet játszik az immunoszenzitisben és a fogszuvasodásban is. Viszonylag kevés tanulmány vizsgálta az IL-6 fogszuvasodásban betöltött szerepét. (34). Kurtis és munkatársai (63) vizsgálataiban bizonyították, hogy emelkedett IL-6 és TNF α a páciensek nyálában az osteoblastok és fibroblastok számának csökkenését és gingivitist vált ki. Az IL-6 megnövekedett produkciója a TNF α termelődés gátlását eredményezheti, tehát a két citokin ellentétes hatással bír egymással szemben (36).

A gyulladásos markerek szintje korrelálhat a bakteriális infekció progressziójával. Az IL-6 erősen korrelál a fogbélgyulladással és a fogszuvasodással összefüggő immunoszenzissel. Az IL-6 szerepel továbbá a gyulladásos stimulusra való nyirokcsomókon keresztüli lymphocytá toborzásban is (34).

Carieses egyéneknél szignifikánsan magasabb IL-6 szintet találtak, mint egészségesekben. A caries kezelés hatására pedig az IL-6 szignifikáns redukcióját tapasztalták. (34)

In vitro (7) és patkányokon végzett in vivo vizsgálatok (11) eredményei alapján az anthocyaninok képesek az IL-6 gátlására.

2.8.5 Tumor nekrosis faktor alfa (TNF α)

Sjögren-szindrómás páciensek vizsgálata alapján a TNF α -t a Th1 sejtek termelik. Lymphocyták és macrophagok hiányában nem termelődik. (A környezeti körülmények hatására a különböző T sejt típusok egyikből a másikba át tudnak alakulni.) (60, 64) Egészséges egyénekben a nyálmirigyek epithel sejtjei (pl. keratinocyták), makrofágok, CD4+ T sejtek, endothelsejtek is termelik. (36)

A Sjögren-szindrómás betegek nyálmirigy-biopsziáiból a control plasmid RNS és szöveti cDNS alapján az eredeti szövetmintában megtalálható mRNS mennyiségét következtetve azt találták, hogy a Sjögren-szindrómásoknál található - IL-2 és IL-6 - cDNS mennyisége szignifikánsan magasabb volt, mint az egészségeseké. Nyálban statisztikailag alacsonyabb koncentrációban volt detektálható a kontroll nyálban, mint a Sjögren szindrómában. (59)

Más tanulmányok vizsgálatai eredményeként viszont egészséges nyálmirigy-biopsziákban nagy gyakorisággal fordul elő (65). A szervezeti védekező reakciókban (fertőzés és gyulladás) játszik szerepet. A p75-ös receptor (a másik receptora a p55) általi válaszok sokkal kifejezettebbek: a T-sejtek proliferációját az IL-1, IL-2 és IL-6-al párhuzamosan stimulálja, IL-2-vel a B-sejtek aktivációját váltja ki. Ebben a tanulmányban az egészséges nyálmirigyekben nem találtak mononukleáris sejt infiltrátumokat. Az egészséges minták fele nem mutatott TNF α immunreakciót (habár pozitívak voltak), de a TNF α festés, ahol volt, közepes vagy erőteljes volt az SS (Sjögren-szindrómás) mintákban. Az SS mintákban az arteriolák endothelsejtjei, kapillárisok és posztkapilláris venulák is megfestődtek TNF-el, továbbá ahol az egészségesben festődött ott erős reakciót mutatott. Az acinussejtek sehol sem festődtek meg TNF-el. A TNF α - bár kisebb mennyiségben - kimutatható volt az egészséges nyálmirigyek endothelsejtjeiben is. Feltételezhetően az endothelsejtek adhezív funkcióinak szabályozása az IFN-n keresztül zajlik, de a TNF α megváltoztatja. Az endothelsejtekben a TNF α helyileg termelődik, amely átváltoztatja az endothel funkcióját egy koagulációt megelőző állapotba, amely megzavarja az endothel normál funkcióját, továbbá befolyásolja a folyadékok nyálba való szállítását - amely SS-ben sérült (oka a csökkent nyáltermelés) - továbbá a fibroblastokból történő kollagenáz előállítását (p55 receptor gyakori az SS mintákban). (64)

További vizsgálatok során kimutatták, hogy a TNF α és IL-6 szignifikánsan emelkedett szintje volt megfigyelhető carieses egyéneknél. Parodontitises személyek vizsgálatakor pedig a parodontálisan egészséges kontroll csoportban szignifikánsan magasabb TNF α és IL-6 szint volt megfigyelhető, mint a parodontálisan érintettek nyálában (36), amelynek alapján parodontálisan egészséges személyeknél emelkedett szintje cariesre vagy az iránti fogékonyságra utalhat. A transzkripciós factor NF- κ B nem gátolt a κ B által TNF α jelenlétében, az emberi ductális nyálmirigy sejtvonalban (64).

Az anthocyaninok hatására a TNF α termelődése csökkenhet (7).

2.8.6 Melatonin

A melatonin (N-acetil-5-metoxi triptamin) amfoter szerkezetű, a szervezet cirkadián ritmusát szabályozó fontos hormon, amely szervezetünkben a tobozmirigyben termelődik és a fény a legfőbb befolyásolója. A melatonin szabadgyökfogó hatásait elsősorban a belőle képződő N-acetil-5-metoxi kinuramin által fejt ki. Nemcsak az emberekben, hanem növények levelében, magjában és gombákban is termelődik. A növények például a magas UV sugárzás ellen melatonin termeléssel védekeznek. Az emberi szervezetre előnyös antioxidáns, daganatellenes hatásai is vannak és az immunrendszer működésében is szerepet játszik. A vizsgálatainkban használt meggy, a VN1 $1,186 \pm 0,090 \mu\text{g/g}$ ($255,09 \text{ ng/g}$) száraz tömegre vonatkoztatott melatonint tartalmaz. (66)

A melatonin fogszuvasodásban betöltött szerepének vizsgálatáról eddig összesen 2 tanulmányban írtak. Az egyikben patkányoknak adagolt 2,1 g-os melatonin tartalmú diéta hatására a fogszuvasodás szignifikáns csökkenését figyelték meg. (67) Egy másik, humán tanulmányban pedig carieses és caries mentes egyéneket vizsgálva ez utóbbiaknál szignifikánsan magasabb volt a melatonin nyálban mérhető koncentrációja, mint a másik csoportban és a malondyaldehid koncentráció szignifikánsan magasabb volt a caries-aktívaknál. (68)

A vizsgálatok háttérében carieses egyéneknél az antioxidások hiánya és szabadgyökök magas koncentrációja az NF- κ B upregulációját eredményezi, amely következményesen bekapcsolja az IL-1 β és TNF α termelését, valamint a mátrix-metalloproteinázok általi kollagéndestrukción. A folyamatban a melatonin antioxidáns és immunmoduláló hatásokkal bír, továbbá a matrix-

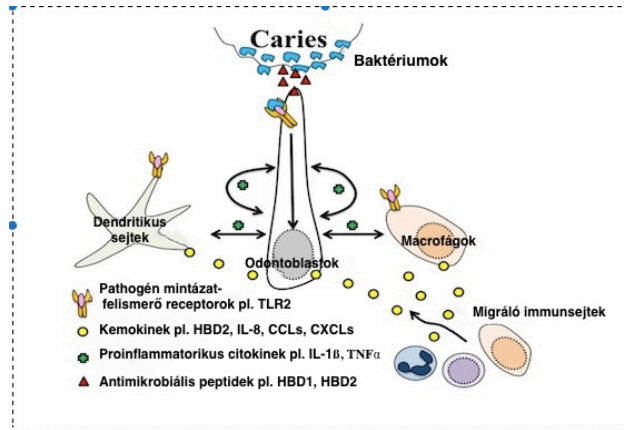
metalloproteinázok gátlójaként képes a fogszuvasodás progressziójának és a dentin mátrix bontásának gátlására. (68) A szájüregben a nyálmirigyekben és a gingivában is kimutatható volt a receptora (69). A melatonin koncentrációja fordított korrelációban áll a malondyaldehid-szinttel. (68) A melatonin a TNF α gátlója. (70)

2.9 A fogszuvasodásban szerepet játszó biomarkerek hálózata a carieses fogak felszínén

A cariesre vonatkozó, véletlenszerűen képzett modell (RF) általi számítások előrejelzései az orvosi vizsgálatoknál sokkal érzékenyebb előrejelzést jelentenek. Kutatások adatai alapján az IL-4, interleukin (IL)-13, IL-2-RA (interleukin-2 receptor alpha alegység) és eotaxin/CCL11 (eozinofil kemotaktikus fehérje) biomarkerek és a JAK/STAT (Janus Arcú Kináz/Szignál Transzducer és Aktivátora a Transzkripció Proteineknek) jelátviteli útvonal szerepe a fogszuvasodásban feltételezett, azonban további vizsgálatok szükségesek még a folyamat részleteinek pontos tisztázásához. (35, 71)

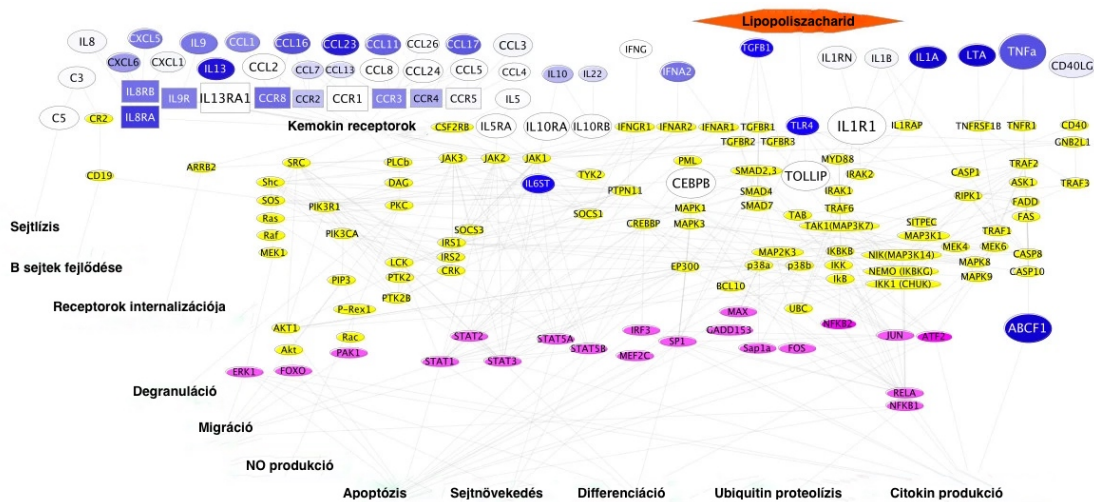
A fogszuvasodásban szerepet játszó sejtek feltérképezése során fogszabályozás miatt eltávolított szuvas fogakat vizsgálva immunfluoreszcens és immunoperoxidáz vizsgálatokkal sikerült egyértelműen kimutatni, hogy kezdetben a szuvas lézió közelében PGP 9.5 immunfluoreszcens idegsejtek és HLA-DR (Humán Leukocita Antigén DR izoforma) pozitív dendritikus sejtek voltak kimutathatóak az odontoblast réteg és a PGP 9.5 pozitivitást mutató immunoreaktív sejtek között. A PGP 9.5 a fogakban megtalálható idegsejtek azonosítását teszi lehetővé. A vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a Schwann-sejtek antigén-prezentáló sejtekként szerepelnek a fogszuvasodásban, mivel a HLA-DR pozitív sejtek a fogszuvasodás területére lokalizálódtak, és immunreaktivitásuk korrelált a fogszuvasodás mértékével, továbbá ezen sejtek a dendritikus sejtek mellett antigén-prezentáló sejtekként működnek. (72)

A fogszuvasodás során a baktériumok komponensei kemokin és citokin felszabadulást váltanak ki az odontoblastokból, dendritikus sejtekből és a makrofágokból a TLR-en keresztül. Az ezen sejtekből felszabaduló *proinflammatorikus citokinek* autokrin vagy parakrin módon hatva fokozzák az antimikrobiális hatásokat, mint az antimikrobiális peptidek, citokinek és kemokinek termelését. Az immunsejtek felől az odontoblastokig migrációs grádiens alakul ki, mialatt az antimikrobiális peptidek csökkentik a baktériumtömeget (**13. ábra**). (73)



13. ábra: A fogszuvasodásban szerepet játszó immunsejtek, kemokinek, proinflammatorikus mediátorok és antimikrobiális peptidek (73)

Egészséges és carieses fogakban is az odontoblast rétegben a fogszuvasodásra adott válaszreakció eredményeként antimikrobiális peptidek szintézise indul el a dentin védelme céljából. A kemotaktikus citokinek mRNS expressziójának fokozódása figyelhető meg (14. ábra).



14. ábra: A bakteriális lipopoliszacharid által kiváltott citokinek expressziós változásainak modellje a humán fogak odontoblast rétegében (magenta színnel: a transzkripciós faktorok, sárgával: a sejt belüli jelátvivő molekulák és zölddel: a sejtválaszok láthatóak) (73)

Az odontoblast rétegben a citokinek up-regulációja egyrészt leukocita migrációt, másrészt a dendritikus sejtek vándorlását indítja el. Az odontoblastok kemotaktikus citokinek szekretálnak, hogy odavonzzák a dendritikus sejteket, makrofágokat, limfocitákat és neutrofileket a fogszuvasodás területére. A migráló immunsejtek pedig IL-1 β -t, TNF α -t, IL-6-ot és IL-12-t szekretálnak, amelyek a szöveti válaszreakciókat befolyásolják és szintjük az

odontoblastokban is megemelkedik. Az IL-1 β a veleszületett immunválaszok fontos aktiváló faktora. Az IL-1R1 (interleukin-1 receptor1) a fogakat és azokat körülvevő csontszöveteket védi több mikroorganizmus ellen is (pl. *Streptococcusok*, *Porphyromonas*, *Prevotella* és *Fusobacteriumok*), ugyanis az IL-1R1 null egerekben sokkal súlyosabb az ilyen fertőzések, tályogok és csontdestrukció lefolyása.

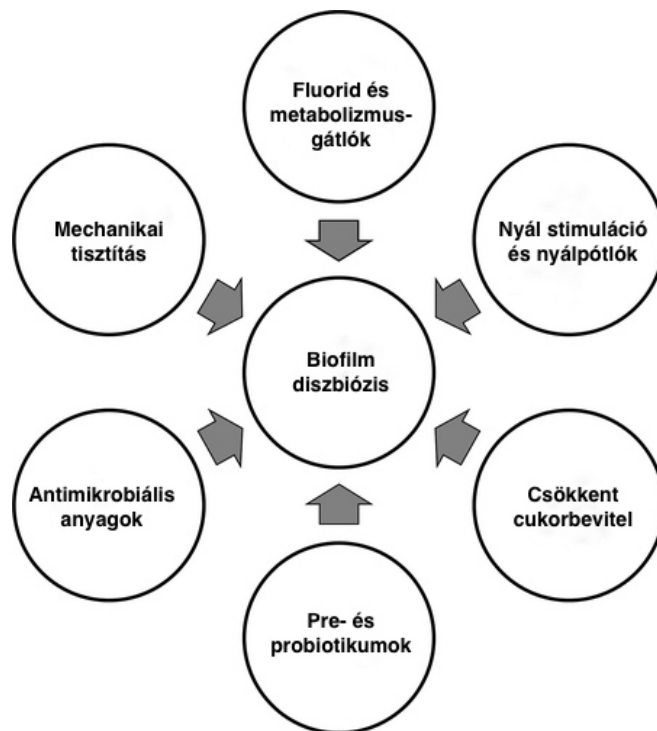
A TLR4 aktivációja az NF- κ B útvonalon keresztül indítja el a gyulladásos kaszkádot, az ATF3 (Aktiváló transzkripciós faktor 3) elkerülésével és a C/EBP δ ciklikus aktivációjával. A TLR4 receptor áramlása a C/EBP δ -t megzavarja, mintha folyamatos aktiváció történe és az IL-1R1 is a TLR4-hez hasonló hatást vált ki. A vizsgálatok alapján a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) – a TLR4, TGF β (transzformáló növekedési faktor β), kemokin, interleukin és TNF receptorokon elindult jelátvitel eredményeként - gátlódik, az odontoblastokban pedig szignifikánsan csökken az IL-6 és IL-12 transzkripciója. (73)

2.10 A nyálmintavétel előnyei

A nyálmintavétel előnyei: fájdalomtalan, kevesebb diszkomforttal jár és sokkal egyszerűbb az eszközigénye, a tárolása és szállítása nem igényel külön médiumot, mint ami a vérvételek esetében szükséges lehet. (34) Továbbá nem igényel különösebb képzettséget, ezáltal, ha szükséges a beteg otthonában, maga is elvégezheti. A kontamináció veszélye is sokkal kisebb. (37). A nyugalmi nyál gyakrabban korrelál a szisztémás klinikai állapotokkal, mint a stimulált nyál, mivel a nyálelválasztás stimulálására használt anyagok megváltoztathatják a nyál összetételét. (74) A nyálban kiválasztódnak továbbá a hormonok, gyógyszerek és antitestek is, amelyek követései és diagnosztikája nyálgyűjtéssel non-invazív módon elvégezhető. (35)

2.11 A caries prevenció lehetőségei napjainkban

A caries prevenció szempontjából legfontosabb lehetőségeket a **15. ábra** mutatja be:



15. ábra: A caries prevenció lehetőségeinek összefoglalása (75)

1. Csökkentett cukorbevitel: A WHO (Egészségügyi Világszervezet) ajánlása alapján <50g/nap az ajánlott napi szabad cukorbevitel. Szabad cukrok alatt a gyártók, szakácsok vagy fogyasztók által az ételekhez hozzáadott mono- vagy diszacharidokat értik (pl.: méz). Ez nemcsak a fogszuvasodás, hanem a cukorbetegség és elhízás, továbbá a fogágybetegség, napjaink népbetegségei elleni prevencióban is fontos.
2. Megfelelő szájhigiéné: hatékony és rendszeres, napi legalább kétszeri fogmosás a patogén biofilmek eltávolítása szempontjából fontos.
3. Fluorid és metabolizmusgátlók: A fluoridok a baktériumok enoláz gátlásán keresztül fejtik ki fő hatásukat, továbbá a cukrok transzportját is gátolják. A xylitol a korábbiakban tárgyalt hatásmechanizmus alapján hat elsősorban a *S. mutans*-ra.
4. A rágógumi rágása, valamint az egyéb nyáltermelést fokozó készítmények fontos szerepet játszanak a fogszuvasodás elleni védelemben:
 - A szájszárazság csökkentése.
 - Az ételmaradéktól való megtisztítás.

- A fogkőképződés, külső fogelszíneződések gátlása.
 - A biofilm pH semlegesítése.
 - Zománc remineralizáció.
 - A planktonikus baktériumok számának, adhéziójának csökkentése, egy kevésbé átjárható biofilm növekedését vagy egy más összetételű biofilm képződését eredményezve.
 - A biofilm újránövekedését és érését gátolja az occlusális felszíneken. (76-78)
5. Antimikrobiális szerek (pl.: klórhexidin) alkalmazása szintén előnyös lehet, azonban számolni kell ezek nem kívánatos mellékhatásaival, mivel hosszú távú használat során a fogak elszínezése vagy az ezen készítmények vivőanyagai - pl. alkohol – által a szájnyálkahártyára kifejtett potenciális hatások, tehát a száj kemény- és lágszöveteire is hátrányosan hathatnak hosszú távon.
6. Pre- és probiotikumok alkalmazása: A prebiotikumok 'táplálkozási eredetű rostok és oligoszacharidok, amelyek elősegítik az egészségre előnyös baktériumok szaporodását'. A probiotikumok pedig 'élő mikroorganizmusok, amelyek megfelelő aránya biztosítja az egészséges mikrobiom fenntartását'. Prebiotikus hatású anyagok közül az argininről vannak ismereteink, az arginolytikus, előnyös baktériumok elszaporodását segítik. A probiotikumok közé tartozik nagyon sok táplálék-összetevő (pl. tejtermékek, fermentált zöldségek vagy a kovászos kenyér is), amelyekben természetes módon jelen vannak a szájüreg vagy egyéb szervek egészséges mikrobiomjának fenntartásához vagy újraépítéséhez szükséges baktériumok. (75)

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori értekezésemben a kutatási vizsgálataim és eredményeim bemutatása előtt céлом volt áttekinteni az - elsősorban a meggyben található - anthocyaninok általános és szájüregi egészségre kifejtett hatásait, kitérve a nyál, a biofilm és a fogszuvasodás jelentőségére, valamint a bennük előforduló biomarkerekre és proinflammatorikus mediátorokra.

A későbbiekben célul tűztem ki, hogy bemutassam az értekezés alapjául szolgáló két közleményem kutatási anyagát. Kitérek a résztvevők beválogatására, a mintavételi protokollokra, a vizsgálathoz szükséges rágógumi összetételére és előállításának lehetőségeire, a különböző vizsgálómódszerekre, majd részletesen beszámolok a kapott eredményeimről és azokat összevetem az irodalomban fellelhető adatokkal.

Kutatásaim során a következő célokat fogalmaztam meg:

1. Első vizsgálataim során a betegek által otthonukban is könnyen kivitelezhető, szájüregi mikrobiomot előnyösen befolyásoló módszerek megtalálása és a mikrobiom összetételének a vizsgálata volt a céloom:
 - a) A meggy anthocyanin tartalmú rágógumi rágás és a fogkefeváltás hatásait kívántam vizsgálni északkelet-magyarországi fiatal, felnőtt populációban.
 - b) Kíváncsi voltam, hogy milyen hatással van a fogkefe cseréje a szájüreg mikrobióta összetételére.
2. Az első kutatási anyagom eredményeit figyelembe véve, a továbbiakban a szájüregi jóllét fenntartásában szerepet játszó, az orális egészség követésére alkalmas biomarkerek (proinflammatorikus citokinek: Interleukin (IL)-1 β , Interleukin (IL)-2, Interleukin (IL)-6, Tumor nekrosis faktor alfa (TNF) α ; mucinok: Mucin 5B (MUC5B), Mucin 7 (MUC7) és a Ca²⁺ ion) szerepét kívántam vizsgálni, beleértve a mikrobióta változását is, az AC tartalmú rágógumik hatása révén.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatokat a Nemzeti Népegészségügyi Központ és az ETT TUKEB (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága) 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 Helsinki 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.

4.1 Résztevők beválogatása, anamnéziszfelvétel

A résztvevők a **5. táblázatban** részletezett beválogatási és kizárási kritériumoknak megfelelően kerültek kiválasztásra az anamnesztikus adataik alapján.

Beválogatási kritériumok	Kizárási kritériumok
<ul style="list-style-type: none">• 18 éves kor betöltése	<ul style="list-style-type: none">• Dohányzás
<ul style="list-style-type: none">• Írásos beleegyezés	<ul style="list-style-type: none">• Antibiotikum szedése az elmúlt 2 hónapban
<ul style="list-style-type: none">• Egészséges fogazat	<ul style="list-style-type: none">• Diagnosztizált nyálmirigy alulműködés
	<ul style="list-style-type: none">• Szájüregi infekció látható tünetekkel
	<ul style="list-style-type: none">• Fogágybetegség
	<ul style="list-style-type: none">• Laktózérzékenység
	<ul style="list-style-type: none">• Súlyos szisztémás betegség
	<ul style="list-style-type: none">• Mentális betegség
	<ul style="list-style-type: none">• Várandósság
	<ul style="list-style-type: none">• Fogamzásgátló szedése

5. táblázat: A vizsgálat beválogatási és kizárási kritériumai.

A résztvevők jó szájhigiéniével rendelkező, jó általános állapotú, 18 és 45 év közötti személyek voltak, akiket két korcsoportba osztottunk: 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 beindikált 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.

4.2 Klinikai vizsgálatok

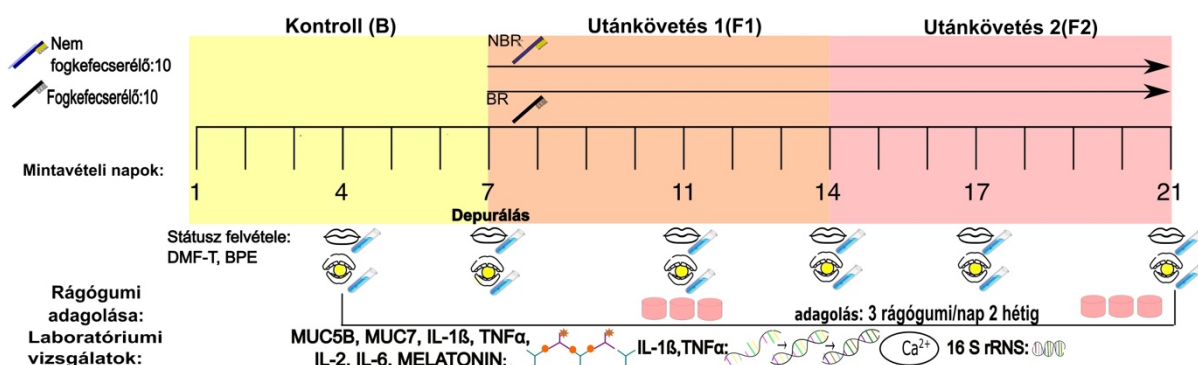
A résztvevők beválogatása során a páciensek fogászati státuszának felvétele egy előre elkészített státuszlapon történt. (1.sz. melléklet_fogászati státusz adatlap)

A fogágybetegség kizárására a BPE (Alap Parodontális Vizsgálat, angolul: Basic Periodontal Examination) index, a plakk- és fogkő mennyiségének leírására az OHI-S (Egyszerűsített szájhigiéniai index) szolgált. (85)

A BPE értékelése során WHO szondával, szextánsonként történt a parodontális szondázás, amelynek során 0,1 és 2 érték esetében nem szondázható 3,5 mm-nél mélyebb tasak; 0-s érték esetén nincs szondázásra vérzés és plakkretenciós tényező (túlérő tömésszél vagy fogkő), de 1-es érték esetében szondázásra vérzés tapasztalható, míg 2-es értéknél már supra-/subgingivális fogkő vagy túlérő tömésszél van. 3-as érték esetében a szondázási mélység 3,5 és 5,5 mm közötti érték, 4-es érték esetében pedig 5,5 mm-nél nagyobb a legmélyebb tasak az adott szextánsban. A státusz felvétele szextánsonként történik és mindig a legmélyebb értéket rögzítjük, továbbá csillaggal jelöljük a furkáció-érintettséget. 0, 1-es és 2-es kód esetében a továbbiakban szűrővizsgálatok keretében elegendő a BPE státusz követése, 3-as kód esetében az adott szextánsban, míg 4-es kódnál a teljes fogazaton javasolt a teljes parodontális státusz felvétele. Az eredményektől függően 1-es és 2-es kód esetében szájhigiénés instruálás, 2-es kód esetén a plakkretenciós faktorok eliminálása, fogkő-eltávolítás; 3-as kód esetében ezeken túl gyökérsimítás, míg 4-es kódnál a teljes parodontális státusz alapján javasolt további parodontális kezelés beindikálása. (79)

4.3 Mintavételezési protokoll

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 nyugalmival megegyező kontroll és 2 hetes anthocyaninos rágózási periódusaiban. (80) (16. ábra)



16. ábra: A 3 hetes vizsgálat mintavételi protokollja: Kontroll (B), rágózás 1. hete (F1: utánkövetés 1), rágózás 2. hete (F2: utánkövetés 2). Nem fogkefecsérelő csoport, akik a fogköleszedést követően nem cserélték le a fogkefésüket, Fogkefecsérelő csoport, akik lecserélték a fogkefésüket. Az 1. héten történő kezdeti vizsgálatok (DMF-T (szuvas, hiányzó és tömött fogak számát jelölő index), BPE) után minden vizsgálati hét 1. 4. és 7. napján történtek mintavételek. Zárt száj melletti cső a nyugalmi-, a szájból lévő rágó melletti cső az ingernyál mintákat jelzi. Laboratóriumi vizsgálatok (ábrán alul): ELISA (enzimhez kötött immunoszorbens assay), PCR (píleráz láncreakció), Ca^{2+} ion meghatározás és 16 S rRNS (16 Svedberg riboszómális RNS) szekvenálás történtek. (86)

4.4 A résztvevők csoportosítása

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 fogkefét, míg a másik 10 fő nem cserélt fogkefét. Továbbá az 1. hét végén fogkő-eltávolítást végeztünk, hogy teljesen plakk- és fogkőmentes felszínekkkel kezdjék a résztvevők az anthocyanin-tartalmú rágógumi rágását, így összehasonlíthattuk, hogy ezen kívül a fogkefecserének van-e relevanciája a fogkőleszedést követően a szájflóra visszaépülésére az anthocyanin hatása mellett. (80)

Az életkor alapján 10 fő 18-30 év közötti fiatal felnőtt volt, míg 10 fő 30-45 év közötti felnőtt személy, akik a Debreceni Egyetem dolgozói közül kerültek kiválogatásra. (80)

4.5 Kevert és stimulált nyál gyűjtése

A mintavételezés során fontos volt, hogy a résztvevők a mintavételek napján a reggelizést követően fogat mossanak, majd a fix időpontban történő mintavételezések biztosítása mellett, a mintavétel előtt 1 órával már nem ehettek, nem ihattak és nem rágózhattak (81, 82).

Minden alkalommal 1-1 ml nyugalmi-, az ingernyálás vizsgálatban pedig a 3 hetes vizsgálat teljes időtartama alatt a korábbiakban részletezett mintavételi napokon hatóanyag-nélküli rágózást követően 1-1 ml ingernyálát gyűjtöttünk Dnáz mentes, eldobható csövekbe. A Krém Központba küldött mintákat a nyugalmi- és ingernyálban mérhető biomarkerek változásainak későbbi mérése céljából -80°C -ra fagyasztottuk. (80)

4.6 Rágógumi összetétele, előállítása

Az anthocyanin-tartalmú rágógumi kifejlesztése és előállítása a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Karának Gyógyszertechnológia Tanszékén Dr. Várad Judit és munkatársai által történt. Homoki és munkatársai (5) korábbi kísérleteiben alkalmazott formulációnak megfelelően történt a rágógumik előállítása. A „Csengődi csokros” fajtaba tartozó „VN1” meggyfajtából készült a vizsgálatban alkalmazott rágógumi (5).

A „VN1” meggyfajta anthocyanin tartalmának Homoki és munkatársai (4) által történő meghatározása alapján a pH differenciációs módszerrel meghatározott hatóanyag mennyisége

295 ± 53 mg/100 g a friss gyümölcs és 528 ± 135 mg/100 g a fagyasztva szárított gyümölcs esetében. A teljes, izolált anthocyanin-tartalom 261 ± 11 mg/100 g friss gyümölcsben (4). A gyümölcs tartalmaz továbbá 0,15 mg melatonin/100 g friss gyümölcsben (2). A rágógumi anthocyanin tartalma: 296,75 mg/2,5 g-os szem.

A rágógumi előállítása során az érett gyümölcsök leszedését követően a laboratóriumba szállították, majd mosták, kimagozták és homogenizálták Braun Multiquick keverővel. A következő lépésben dupla mennyiségű savanyított ethanollal (0,1% HCl) kivonták és 1 órán keresztül keverték mágneses keverővel (Heidolph, Germany), majd a mintákat leszűrték és az oldószert vákuum alatt egy forgó evaporátorral sűrítették 40 °C-on. A meggykivonat fő összetevői: cianidin-3-O-rutinozid, cianidin-3-O-glükozid, cianidin-3-O-glükozil-rutinozid/malvidin-3,5-diglükozid (4, 5).

4.7 ELISA (Enzimhez kötött Immunosorbens Assay)

Az ELISA vizsgálatokat specifikus proteinek komplex váladékokban/folyadékokban való kimutatására és mennyiségének meghatározására fejlesztették ki. Eredetileg Eva Engvall és Peter Perlmann 1971-ben 'microplate well'-ekbe helyezett minták, specifikus antitestekkel való elemzése céljából írta le a vizsgálatot. Immunológiai és orvosi kutatólaborokban, főleg betegségekre specifikus antitestek és (pl. étkezési eredetű) allergének kimutatására szolgál.

4.7.1 Az ELISA legfőbb alkotóelemei

- 1) **Coating/Capture:** Antigének direkt vagy indirekt, polisztiirén 'microplate well'-ekre való felhelyezése.
- 2) **Plate blocking:** irreleváns fehérjék vagy más molekulák hozzáadása, hogy minden telítetlen felszíni kötőhelyet lefedjünk a 'microplate well'-ekben.
- 3) **Probing/detection:** antigén-specifikus antitestekkel történő inkubáció, amely affinitás kötéssel kapcsolódik az antigénhez.
- 4) **Signal Measurement:** a specifikus antitestben lévő direkt/szekunder jelzés által generált jel kimutatása.

4.7.2 Az ELISA vizsgálatok típusai

4.7.2.1 Kompetitív ELISA

Leginkább kis méretű antigének, egy epitóppal vagy antigénkötőhellyel rendelkező antigének esetében használatos. Ennek a módszernek az egyik változata tisztított antigént alkalmaz az antitest helyett. A tisztított antigén jelének csökkenése jelzi az antigén jelenlétét a mintában, amikor csak a jelölt antigént tartalmazó 'assay well'-ekhez hasonlítjuk.

A kompetitív/inhibíciós ELISA vizsgálatokban a cél antigén koncentrációjának meghatározása a jelinterferencia alapján kerül meghatározásra. A mintákban lévő cél antigén a jelölt referenciával vagy standard-el verseng a plate-n elhelyezkedő, limitált mennyiségű immobilizált antigénnel. (83)

4.7.2.2 Sandwich ELISA

A cél antigénre nagy szenzitivitású és specificitású módszer, mivel két antitestet használ a megkötésre és detektálásra/kimutatásra. Különböző detektálási/kimutatási módszerek léteznek ugyanazon kötő antitesthez.

Hátránya, hogy több optimalizációt igényel az antitest párok azonosítására és hogy minimális legyen a kötő és a detektáló antitestek közötti keresztreakció. (83)

4.7.3 A vizsgálataink során alkalmazott ELISA módszerek leírása

4.7.3.1 A Mucin 5B (MUC5B) koncentrációjának meghatározása

A MUC5B meghatározása a sandwich immunoassay, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit-el történt (MyBioSource, Inc., San Diego, CA 92195-3308, USA) a gyártó leírásának megfelelően (Catalog Number: MBS2024599 96) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). A MUC5B szintjének meghatározása ng ml⁻¹-ben történt. A MUC5B meghatározási tartománya 0.312-20 ng ml⁻¹ között volt. (80)

4.7.3.2 A Mucin 7 (MUC7) koncentrációjának meghatározása

A MUC7 meghatározása a sandwich immunoassay, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit-el (MyBioSource, Inc., San Diego, CA 92195-3308, USA) történt a gyártói leírás alapján (Catalog Number: MBS762777) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). A MUC7 meghatározási tartománya 0.313-20 ng ml⁻¹ között volt. A MUC7 esetében a hígítási faktor 250x-es volt, így kapott eredményeinket 250-el osztottuk. (80)

4.7.3.3 A Tumor Necrosis Factor α (TNF α) koncentrációjának meghatározása

A TNF α meghatározása a TNF α ELISA Kit-el (BioVendor, Laboratorní medicína a.s., Czech Republic) történt a gyártó leírása alapján (Catalog Number: RAF128R) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). A TNF α szintjének meghatározása pg ml⁻¹ értékekben történt. A kimutatási tartomány 7.8-500 pg ml⁻¹ között volt. Az OD (optikai denzitás) meghatározása 450 nm-es hullámhosszon történt. (80)

4.7.3.4 Az Interleukin 1 β (IL-1 β) koncentrációjának meghatározása

Az IL-1 β koncentrációját a Salivary IL-1 β sandwich immunoassay kit-el (Salimetrics, State College, PA 16803, USA) határoztuk meg a gyártó leírása alapján (Item Number: 1-3902-5) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). Az IL-1 β koncentrációjának a kimutatási tartománya 3.13-200 pg ml⁻¹ között volt. Az OD (optikai denzitás) meghatározása 450 nm-es hullámhosszon történt. (80)

4.7.3.5 Az Interleukin 2 (IL-2) koncentrációjának meghatározása

Az IL-2-t LEGEND MAX™ Human IL-2 ELISA Kittel (BioLegend, 8899 BioLegend Way, San Diego, CA 92121m USA) mértük a gyártó leírása szerint (termékkat. szám: 431807) a SPECTROstar Nano (BMG Labtech GmbH) segítségével. 77799 Osterberg, Németország). Az IL-2 kimutatási tartománya 15,6-1000 pg ml⁻¹ volt. Az optikai sűrűséget (OD) 450 nm hullámhosszon olvastuk le. (80)

4.7.3.6 Az Interleukin 6 (IL-6) koncentrációjának meghatározása

Az IL-6 koncentrációját a Salivary IL-6 sandwich immunoassay kit-el (Salimetrics, State College, PA 16803, USA) határoztuk meg a gyártó leírása alapján (Item Number: 1-3602-5) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). Az IL-6 koncentrációjának a kimutatási tartománya 1.56-100 pg ml⁻¹ között volt. Az OD (optikai denzitás) meghatározása 450 nm-es hullámhosszon történt. (80)

4.7.3.7 A melatonin koncentrációjának meghatározása

A melatonin koncentrációjának meghatározása kompetitív immunoassay, Melatonin Enzyme Immunoassay Kit-el (Salimetrics, State College, PA 16803, USA) történt a gyártó leírása alapján (Item Number: 1-3402-5) SPECTROstar Nano-val (BMG Labtech GmbH, 77799 Osterberg, Germany). A melatonin kimutatási tartománya: 0.78-50 pg ml⁻¹. (80)

4.8 PCR (Polimeráz Láncreakció) technológia alkalmazása

A PCR technológia lényege, hogy előzetesen megvásárolt primerek alapján az általunk kimutatandó nukleinsavszakasznak megfelelő primerek segítségével 3 fő lépésben (92-94 °C-on denaturáció, 50-70 °C-on primerek kapcsolódása, 72 °C: DNS szintetizálás) zajló duplikációs ciklus és annak ismétlései segítségével az adott RNS szakaszt felsokszorozzuk. (84).

4.8.1 RNS-izolálás MagMax Viral RNA Isolation Kit-el

Vizsgálatainkat a MagMax Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, 1939M Rev.E) segítségével végeztük, melynek során az általunk kimutatni kívánt RNS izolálását végeztük el (85). A kit mágnesyöngyöket tartalmaz, amelyek megkötik a nukleotidokat (RNS), mialatt kimossák a fehérjéket és más szennyeződések.

A visszanyert hordozó RNS mennyiségi meghatározása: A hordozó RNS mennyiségét 260 nm-en UV-sugárzással határozzuk meg. Ha NanoDrop 2000 spektrofotométert használ, 1,5 µl nukleinsavoldat mérhető hígítás nélkül.

Első lépésben a sejtek Petri-csészében történő tenyésztése után 3x CMF-PBS-sel történő mosás, majd 1000 µl-es Trizollal történő pipettázást követően a Petri csészéről eltávolított

sejttenyészetet Eppendorf-csövekbe helyeztük és -70 °C-on tároltuk. A mintákat a fagyasztást követően kiolvastva dolgoztuk fel.

Izolálás folyamata: 400 µl nyálmintát és 802 µl Lizáló/Kötőfolyadékot keverünk össze, majd röviden (30 mp) vortexeljük. Ezt követően 2 mp-ig centrifugáljuk. 20 µl Mágnesgyöngy-keveréket adunk minden mintához, majd 4 percig vortexeljük, ezt követően 2 mp-ig centrifugáljuk. 3 percig mágneses állványra rakjuk a csöveket a mágnesgyöngyök elkülönítése céljából. A felülúszót a mágnesgyöngyök megzavarása nélkül eltávolítjuk és a csöveket levesszük az állványról. A Mosófolyadék 1 segítségével átmoszuk a mintákat, majd 3-5 percig újra a mágneses állványon tartjuk, a végén a felülúszót pipettával eltávolítjuk. Ez a mosási lépés kétszer ismételendő. A Mosófolyadék 2 segítségével ismét átmoszuk a mintákat és 3-5 percig a mágneses állványra rakjuk, majd a felülúszót lepipettázzuk és kétszer ismételjük. A minták a nyitott csövekben 1,5 órán keresztül száradnak. Végül 50µl Elúciós Pufferbe helyezzük a mintákat és a mágneses állványon tartjuk. Ennek a lépésnek a végén a tisztított RNS lesz a felülúszó. A felülúszót nukleáz-mentes csöbe helyezzük és a DNS-be történő transzkripciót megelőzően -20 °C-on néhány napig tároljuk. (80)

4.8.1.1 RNS-transzkripció

Az 50 ng RNS tartalmú mintákat a Microsoft Excel programban adott formula szerint számított térfogatúra (16 µl) higítjuk fel desztillált vízzel. Az RNS-t és a desztillált vizet 96 lyukú plate-be pipetázzuk, amelyhez minden well-be 4 µl sötétkék LunaScript RT Super Mix-et adunk. A plate-t egy konvencionális PCR-be helyeztük (Applied Biosystems, Thermal Cycler 2720), ahol a hőprofil előre beállított. Az RNS-transzkripció hőprofilja: 25 °C, 2 perc; 55 °C, 10 perc; 95 °C, 1 perc.

A folyamat végén cDNS keletkezik, amelyet a felhasználásig -20 °C-on tárolunk.

A gyulladós faktorok koncentrációjának meghatározása qPCR módszerrel: A gyulladós faktorok primerjeit és próbáit a **6. táblázat** tartalmazza. (80)

Citokin	Próba (5'-3')	Elő primer (5'-3')	Fordított primer (5'-3')
TNF- α	CAATGGCGTGGAGCTGAGAG	AACCCCGAGTGACAAGC	TGGGAGTAGATGAGGTACAGG
IL-1 β	TGATGGCCCTAAACAGATGAAGTG	AATTCGGTACATCCTCGA	GATTTTCACCAGGCAAGTCTC
IL-2	TGTGAGCATCCTGGTGAGTTTGGG	AAAGAAAACACAGCTACAACCTGG	GAAGATGTTTCAGTTCTGTGGC
IL-6	TGTTACATGTCTCCTTTCTCAGGGC	AATTCGGTACATCCTCGACG	GATTTTCACCAGGCAAGTCTC
GAPDH	CATTGCCCTCAACGACCACTTT	CCTCCACCTTTGACGCTG	CTCTTCCTCTTGCTCTTGC

6. táblázat: A gyulladós markerek primerjei és próbái. (80)

qPCR (kvantitatív PCR) mérés folyamata: A reagensek összekeverését követően 18,5 µl keveréket és 1,5 µl DNS-t egy 96 lyukú plate well-jeibe pipetázzuk. Átlátszó fóliával lefedve Light Cycler 96 PCR (Roche)-be helyezük. Két párhuzamos mérést végzünk minden mintából és a belső kontrollból [GAPDH-ból(Glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz)], mert a mintánkban található gének nem stabilak. TaqMan próba segítségével tudunk egy stabil gént nyerni, amellyel a gyulladós citokinek messenger ribonukleinsav (mRNS)-szintjének valós szintjét tudjuk meghatározni. Hőprofil: 95 °C, 60 mp (1 ciklus), 95 °C, 15 mp (40-45 ciklus), 60 °C, 30 mp (40-45 ciklus). (80, 86)

4.8.1.2 Statisztikai elemzés

Livak módszer: A valós idejű PCR-t nyálmintákból származó cDNS felhasználásával végeztük. Az eredményeket C_T értékekben kaptuk meg, amelyet Livak módszerével értékeltünk.

A $2^{-\Delta\Delta C_T}$ módszer használható a génextpresszió változásainak valós idejű PCR-al történő értékelésére.

A C_T érték (határértékküszöb) a ciklusszám, amikor a fluoreszcens intenzitás értéke szignifikánsan meghaladja a határérték vonalát. A valós idejű C_T értéket könnyen bevihetjük például Microsoft Excel programba.

Az adatokat a következő formula segítségével elemeztük:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{GAPDH}})_{\text{Time x}} - (C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{GAPDH}})_{\text{Time 0}}$$

Time x a pontos idő, Time 0 a cél gén GAPDH-ra vonatkoztatott egyszeri expressziója.

Az átlagos C_T érték meg lett határozva a cél és a belső kontroll génre is a 0 időpontban, egyenértékben lettek alkalmazva. (80)

4.9 A Ca^{2+} koncentrációk meghatározása

A Ca^{2+} koncentrációkat Roche/Hitachi Cobas C® analizátorral határoztuk meg. A méréseket egytételes kazettákkal végeztük. PreciControl ClinChem Multi 1 tétel 05117003 (20x5 ml) PCC1 és PreciControl ClinChem Multi 2 tétel 05117216 (20x5 ml) (Roche, Mannheim, Németország) az R1 ((CAPSO(3-(cikloxeil-amino)-2-propanhidroxi-amino)-szulfonsav): 557 mmol/L, NM-BAPTA: 2 mmol/L, pH 10,0 nem reaktív felületaktív anyag, tartósítószer) és R2 reagenssokkal (EDTA (Étilén-diamin-tetraacetát) 7,5 mmol/L, pH: 7,3, nem reaktív felületaktív anyag, tartósítószer) használtuk a meghatározáshoz a koncentrációktól. Az első lépés egy előkészítés, egy mosási eljárás volt. A második lépésben a gyártó utasításai alapján a kereskedelmi kalibrátorokkal történt kalibrálás, majd az analizátor mérte a Ca^{2+} koncentrációkat. A számítások után megismételtük a mosási eljárást. (80)

4.10 A klinikai, PCR-el és ELISA-val nyert adatok, Ca²⁺ koncentrációk statisztikai elemzése

A klinikai adatok értékeléséhez ANOVA (Variancia Analízis) vizsgálatot végeztünk. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték <0.05 volt. A Pearson-féle korrelációs együtthatót GraphPad Prism (9.4.1-es verzió) segítségével végeztük. Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték <0.05 volt.

A gyulladáshoz kapcsolódó citokinek mRNS expresszióját és fehérjekoncentrációját mértük nyugalmi, kevert és stimulált nyálmintákban, amelynek értékeit a GraphPad Prism (9.0.1-es verzió) programba vittünk be további statisztikai elemzés céljából.

A mért nyers adatok értékeinek statisztikai elemzését végeztük el, átlagoltunk az egyes kezelési időpontoknak megfelelően és diagramokon ábrázoltuk a rágózás alapján (az adatokat p<0.05 esetén tekintettük szignifikánsnak 95%-os CI (konfidencia intervallum) mellett). Az adatok további elemzése, összehasonlítása céljából Pearson-féle korrelációt végeztünk a vizsgált paraméterek alapján.

4.11 A 16S riboszomális RNS (rRNS) kimutatásán alapuló mikrobiom vizsgálatok

A prokarióta 16S rRNS kb. 1500 bázispár hosszú, amelyre a konzervált és variábilis régiók váltakozása jellemző. A variábilis (az általunk használt rendszerben V3 és V4) régiók használatosak a nemzetségek vagy fajok elkülönítésekor és beazonosításakor a filogenetikai osztályozásokban. A technika első lépése a könyvtárkészítés, amelynek során a cél régiókat tartalmazó kiindulási metagenomiális DNS izolálását és feldarabolását követően a túlérő adapter szekvenciákat tartalmazó célszekvenciára specifikus primerek (5' végre P5 és 3' végre P7), majd a DNS mindkét végét jelölő bárkód (5' végre Index 2 és 3' végre Index 1) rögzítése limitált ciklusú PCR amplifikációs lépések során történik.

A következő lépésben a dsDNS kötőfestéket alkalmazó fluorimetriás módszerrel történik a könyvtár kvantifikációja, normalizációja és végül a 96 mintát tartalmazó tömény könyvtár egy csőbe történő összepoolozása (87).

A szekvenálás a MiSeq-platfommon történik, amelynek során 301 bázispárnyi páros olvasatokat végez és minden egyes olvasat vége túlér, hogy a V3 és V4 régiók magas minőségű, teljes hosszúságú olvasatát hozzák létre egy 65 órás folyamat során. A MiSeq futás teljesítménye 96

bárcódolt mintát feltételezve több, mint 20 millió olvasatot jelent és több, mint 100 millió olvasatot generál mintánként, amely a metagenomikai tanulmányokhoz elegendő (87).

Következő lépés a bioinformatikai analízis, amelynek során a mintánkban található taxonómiai adatokat nemzetség (genus) és faj (species) szintig ki tudja mutatni és a bioinformatikai szoftverek segítségével további adatokat nyerhetünk, statisztikai elemzést végezhetünk az adatokon. A továbbiakban a nyálmintákból történő szekvenálási és azt követő bioinformatikai módszerek részletes leírása következik.

4.11.1 Nyálminták izolálása

A nyálminták izolálása a QIAamp PowerFecal DNA Kittel (Quiagen Hilden, Germany), az Inhibitor Removal technológia alkalmazásával történt (QIAamp PowerFecal DNA Kit Handbook 08/2017) (88) megadott protokolloknak megfelelően.

A nyálminták izolálásának főbb lépései a következők:

1. Mechanikai lízis:

Nyugalmi nyálminták izolálásakor 250 µl nyálmintát és 750 µl PowerBead Solution-t keverünk össze, amelyhez további 60 µl C1 oldatot helyezünk Bead csövekre (Quiagen Hilden, Germany) és röviden vortexeljük. 65 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk, majd MagNa Lyser-ben (*Roche Applied Sciences; Penzberg, Germany*) 6000 g-n 90 másodpercig vortexeljük, amelyet követően 4 °C-on 2 percig inkubáljuk, majd a vortexelést és inkubálást ismételtelen elvégezzük. (89)

Ingernyál esetében pedig a lízis után a DNS-izolálást a kereskedelmi forgalomban lévő DNeasy® PowerSoil® Pro Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) hajtottuk végre a gyártó által az inhibitor eltávolítási lépésekből származó protokoll szerint. (80, 89)

2. Inhibitorok és fehérjék eltávolítása: 13000x g-n 1 percig történő centrifugálást követően a 400-500 µl felülúszót steril Eppendorf-csővekbe helyezünk. Ezt követően kémiai lízis történik, amelynek során 250 µl C2 oldatot hozzáadunk és 5 percen keresztül vortexeljük, majd 4 °C-on 5 percig inkubáljuk és ismét centrifugáljuk 13000x g-n 1 percig. 600 µl felülúszót egy 2 ml-es

steril Eppendorf-csőbe helyezünk. 200 µl C3 oldatot adunk hozzá és röviden vortexeljük, majd 4 °C-on 5 percig inkubáljuk és 13000x g-n 1 percig centrifugáljuk. (80, 89)

3. DNS membránhoz való kötése: 600 µl felülúszót egy steril Eppendorf csőbe helyezünk. 1200 µl C4 oldatot a felülúszóhoz adunk és 5 másodpercig vortexeljük. 650 µl felülúszót a membránt tartalmazó csőbe (MB Spin Column) adagolunk és 13000x g-n 1 percig centrifugáljuk. Ezt a lépést addig ismételjük, amíg az összes folyadékot fel nem használtuk. (80, 89)

4. Membrán mosása, szárítása: 500 µl (etanoltartalmú) C5 oldatot mérünk a membránra és 13000x g-n 1 percig centrifugáljuk, majd a membránt tartalmazó csőből a 'keresztülfolyó' folyadékot eltávolítjuk és 13000x g-n 1 percig centrifugáljuk. A membránt tartalmazó cső alá új gyűjtőcsövet rakunk. (80, 89)

5. Eluálás: 50 µl (RNáz-mentes) C6 oldatot a fehér membrán filter közepére helyezünk. A következő lépésben 2-3 percig inkubáljuk, majd 13000x g-n 1 percig centrifugáljuk. A legvégén a gyártó utasításainak megfelelően a MB Spin Column-t kidobjuk. (88) (QIAamp PowerFecal DNA Kit Handbook 08/2017) (80, 89)

6. DNS-minőség-ellenőrzés: A DNS-koncentrációkat a Qubit Fluorometric Quantitation dsDNS vizsgálati kittel (Thermo Fisher Scientific, MD, USA) határoztuk meg. Ezután az összes izolált nyálmintát 1 ng/µL-re hígítottuk PCR (polimeráz láncreakció) minőségű vízzel. A NanoDrop 2000 spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific, MD, USA) használtuk az abszorbancia tisztasági mérésére 260 és 280 nm hullámhosszon 1,7–2,0 (A260/A280) és 1,8–2,2 (A260/A230) optimális abszorbancia aránynál. A DNS-mintákat tisztítás után hűtőszekrénybe helyeztük -20 °C-ra. (80, 89)

7. Kontrollok:

Negatív és pozitív kontrollok. Minden DNS-kivonási lépést egy II. osztályú lamináris légáramú kabinban végeztünk, steril sebészeti kesztyű és arcmaszk használatával a laboratóriumi környezeti szennyeződések minimalizálása érdekében. A negatív izolációs kontrollok (NIC) a minták helyettesítésével készültek, PCR-minőségű víz felhasználásával. Az így eluált NIC mintákon V3–V4 régióspecifikus PCR-t végeztünk a kontamináció ellenőrzésére.

Az indexelési lépések során DNS-mentes, ultraibolya sterilizált AirClean PCR munkaállomást használtunk. A PCR termékek minőségellenőrzéséhez és tisztításához 4200 TapeStation rendszer (G2991AA; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) és Agilent D1000 ScreenTape (5067–5365) került alkalmazásra. A NIC amplikonokat szintén validáltuk a 4200 TapeStation rendszer segítségével. (80, 88, 89)

4.11.2 Könyvtárkészítés

A könyvtárakat Illumina MiSeq páros végű (PE, 2 × 301 nt) szekvenálási futtatások során szekvenáltuk, 5%-os PhiX spike-in alkalmazásával az általános szekvenálási minőség biztosítása érdekében (PhiX Control Kit v3-FC-110-3001; Illumina Inc., San Diego, CA, USA) a gyártó protokollja szerint (**17. ábra**, Part#15044223Rev.B). Ebben a rendszerben a hipervariábilis régiók a V3 és V4 régiók. Klindworth és munkatársai (2013), alapján a bakteriális 16S rRNS gént célozzák a felhasznált gén-szekvenciák. Az Illumina MiSeq szekvenáló átlagosan 460 bp amplikonokat generál az univerzális primerkészlettel: 341F-5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3' és 785R-5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3 (90). Ebben a lépésben a következő, túlerő adapter szekvenciákat tartalmazó célszekvenciára specifikus primerpár (*Sigma Aldrich, Missouri, US*) bekötése történik:

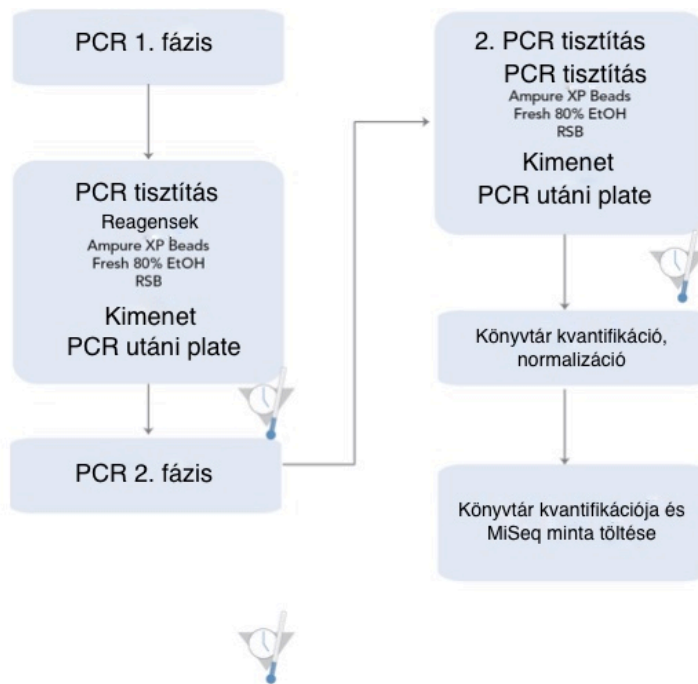
Forward overhang:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[célszekvencia specifikus primer]'

Reverse overhang:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[célszekvencia specifikus

primer]'. (*Sigma Aldrich, USA, Missouri*) (80, 89)



17. ábra: A könyvtárkészítés menete az Illumina MiSeq rendszerben. (87)

A lépés végén a DNS mennyisége és minősége NanoDrop 1000 spektrofotométer (*Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Germany*) segítségével kerül meghatározásra. (80, 89)

4.11.3 PCR

Az Amplicon PCR-t 2 x KAPA HiFi HotStart ReadyMix kit végeztük. A 96 minta kettős indexelése (i7-N7xx-12 tétel, i5-S5xx-8 tétel) az Illumina Nextera XT indexkészlettel (FC-131-1001/2) történt. MagSI Pure Beads (KAPA Biosystems, USA, Wilmington, Massachusetts) alkalmazásával a PCR tisztításhoz és az amplicon méretének kiválasztásához a gyártó utasításai szerint (KR1245—v3.16) történt. ~550–630 bp végső könyvtárat kaptunk. Az ellenőrzésekhez PCR Agilent D1000 Screen szalagokat (5067–5582) és D1000 reagenseket (5067–5583) használtunk. (80, 89)

Mindegyik 16S amplicon-könyvtárunkat qPCR-rel mértük, az ampliconok méretét tekintve normalizáltuk, végül ekvivalens moláris mennyiségben egy könyvtárba egyesítettük. 5 µl összevont 4 nM-os DNS-könyvtár-pool denaturálását 0,2 M NaOH-dal végeztük, majd ezt követően hígítottuk 8 pM végkoncentrációig. A MiSeq Reagent Kit v3–618 ciklust (MS-102–

3003) a gyártó protokolljain alapuló Illumina MiSeq platformon (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) használtuk a szekvenáláshoz. (80, 88, 89)

4.11.4 Bioinformatikai módszerek

Filogenetikai elemzés. A nyers FASTQ fájlokat a QIIME 2 (verzió: 2021.8) pipeline (<https://qiime2.org/>) segítségével töltöttük le és elemeztük. Kezdetben a FASTQ fájlokat QIIME2 formátumba importáltuk. A CTGTCTCTTATACACATCT ellenőrzése megtörtént a fennmaradó adapterszekvenciák eltávolításához. A Cutadapt szoftvert (a Qiime 2-ben) használtuk a leolvasás 3' végétől történő vágáshoz. Minőségi trimmelést végeztünk a DADA2 szoftverben a beállításokkal: az elejétől kezdve semmit sem távolítottunk el mind az előre, mind a hátrafelé olvasásnál. A hossza 300 bázis volt az előre, míg a hossza 256 bázis volt a hátsó leolvasásnál. (88, 89, 91)

Taxonómiai elemzés. Naive Bayes-féle gépi tanulás alapú osztályozót használtunk a kiterjesztett Humán Orális Mikrobiális Adatbázis (eHOMD, <http://homd.org/>, ver.: 15.23, letöltve: 2023.08.01.) taxonómiai összehangolására. A filogenetikai fák kiszámításához az align-to-tree-mafft-FastTree beépülő modult használtuk, amely a QIIME2 pipeline-be van integrálva. (80, 88, 89)

Statisztikai analízis. A béta diverzitás elemzéseket a QIIME 2 pipeline-ben számítottuk ki, 8264-es olvasási mélységre állítva a minták normalizálásához. A béta diverzitás elemzéséhez weighted UNIFRAC és unweighted UNIFRAC távolságokat számoltunk. Az Emperor plugint a Béta diverzitási mátrixok megjelenítésére használtuk. Az exploratív mikrobiom adatok értelmezése Uni-frac analízis segítségével történt. (92) Pairwise PERMANOVA tesztet végeztünk a béta diverzitás statisztikai elemzésére. Az alfa-diverzitás elemzéséhez a Chao1, Faith, Shannon és Simpson indexeket számítottuk ki a QIIME 2 folyamatban. A különbségek szignifikanciáját Kruskal-Wallis páros teszttel számoltuk. (80, 88, 89)

Ábrázolás. A heat-tree mátrix számítása és megjelenítése R nyelvű Metacoder csomaggal történt. A csoportok (BR, NBR, AG I, AG II) különbségeit heat-treeken a log₂ medián arány arányaival és az OTU (operatív taxonómiai egység, angolul: Operational Taxonomic Unit) számokkal mutattuk meg. A heat-treek statisztikai különbségeinek kiszámításához Wilcoxon rank-sum tesztet használtunk. Az ábrák felépítése 'ggplot2' R csomaggal készült. (80, 88, 89)

Core microbiom. Az AC rágózás hatásainak meghatározásához a magmikrobiomokat az összes nyálminta 100%-ában képviselt OTU-k segítségével vettük figyelembe. Összehasonlításokat végeztünk a mag-baktériumnemzetségek szóródási görbéjében azok relatív gyakorisági eloszlása alapján. (80)

A mikrobióta és a citokinek, mucinok és melatonin közötti korreláció elemzése. Klaszteranalízist végeztünk a baktérium nemzetségek vonatkozásában a mucinok, citokinek és melatonin relatív génexpressziójával és fehérjekoncentrációjával Pearson-féle korreláció segítségével. Az ábrázoláshoz a Seaborn Python csomagot használtuk. (80)

5. EREDMÉNYEK

5.1 Fogazati státuszok csoportok szerint

A 7. táblázat mutatja a korcsoportok alapján a résztvevők klinikai adatait a vizsgálat folyamán.

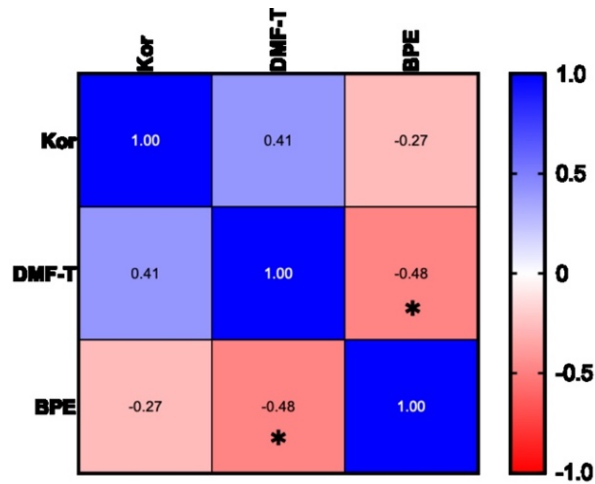
A korcsoportok alapján az I. korcsoport átlagéletkora $26,8 \pm 2,04$, DMF-T értéke $4,9 \pm 4,38$, míg a II. korcsoport átlagéletkora $36,3 \pm 3,83$, DMF-T értéke pedig $8,9 \pm 4,91$ volt.

A vizsgálatunk önkontrollos formában zajlott, ahol a résztvevőket nemcsak a korcsoportok alapján, hanem egy mechanikai behatás, a kontroll időszakot követő fogkö-eltávolítás utáni fogkefecsere vonatkozásában is vizsgáltuk, az AC tartalmú rágógumi rágása mellett.

Csoport	Létszám	Nem		Életkor (M±SD)	DMF-T (M±SD)	D (T) (M±SD)	M (T) (M±SD)	F (T) (M±SD)	BPE (M±SD)
		Nő	Férfi						
BR	10	5	5	$32 \pm 6,1$	$8,11 \pm 4,64$	$0,67 \pm 0,9$	$1,33 \pm 1,9$	$7,56 \pm 3,91$	$0,32 \pm 0,34$
NBR	10	7	3	$31,4 \pm 5,63$	$5,22 \pm 4,5$	$0,67 \pm 1,07$	$0,33 \pm 0,67$	$4,22 \pm 3,9$	$0,53 \pm 0,34$
ANOVA (p)					p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
AG I	10	7	3	$26,8 \pm 2,04$	$4,9 \pm 4,38$	$0,2 \pm 0,63$	$0,8 \pm 1,75$	$5 \pm 4,76$	$0,42 \pm 0,33$
AG II	10	5	5	$36,3 \pm 3,83$	$8,9 \pm 4,91$	$1,1 \pm 1,1$	$1,1 \pm 1,37$	$6,9 \pm 3,66$	$0,33 \pm 0,35$
ANOVA (p)				p=0.0003	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Össz.	20	12	8	$31,7 \pm 5,71$	$6,9 \pm 4,97$	$0,65 \pm 0,99$	$0,95 \pm 1,54$	$5,95 \pm 4,24$	$0,42 \pm 0,34$

7. táblázat: A vizsgálati csoportok (BR, NBR, AG I, AG II) alapján a résztvevők jellemzése: nem, életkor, DMF-T, Dt (carieses fogak száma), Mt (hiányzó fogak száma), Ft (tömött fogak száma). (80)

Pearson-korrelációval szignifikáns, negatív korreláció (-0,48) mutatkozott a résztvevők DMF-T ($6,9 \pm 4,97$) és BPE ($0,42 \pm 0,34$) indexe között. (18. ábra)

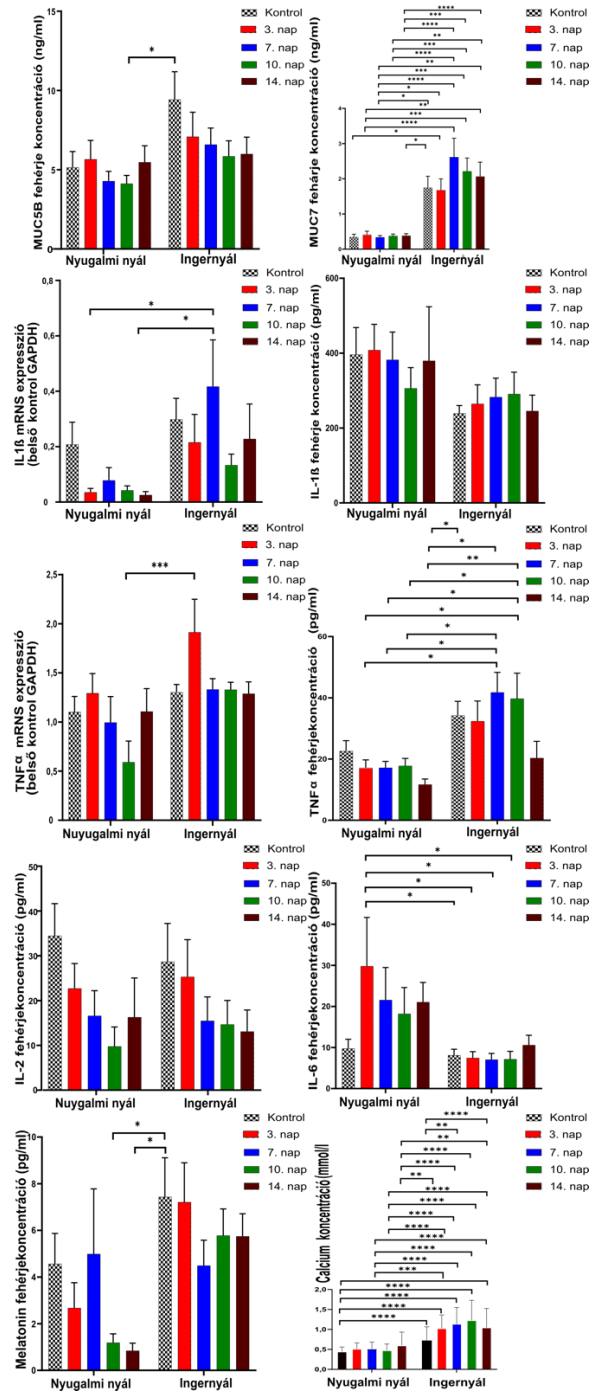


18. ábra: Pearson-korreláció a résztvevők kora, DMF-T (Decayed, missing, filled teeth) és BPE (basic periodontal examination) indexei között (* $p=0,0332$) (80)

A BPE és DMF-T indexek tekintetében homogén vizsgálati csoportunk volt, azonban az ínygyulladás a vizsgálat teljes ideje alatt nem volt kizárható (néhány személynél $1 > BPE > 0$), ezt több tényező (szájhygiénés és étkezési szokások) befolyásolta, viszont törekedtünk arra, hogy megegyezők legyenek a résztvevők földrajzi- és életkörülményei, amely által a változók hatásait minimalizálhattuk. (80)

5.2 Proinflammatorikus citokinek, mucinok, melatonin szintje nyugalmi- és ingernyálban

5.2.1 Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása



19. ábra: Mucinok (MUC5B, MUC7), gyulladásos markerek (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α) mRNS- és fehérjekoncentrációk és a melatonin mennyisége nyugalmi- és ingernyálban (* p=0,0332, ** p=0,0021, *** p=0,0002, **** p<0,0001). A kontroll időszak fekete-fehér négyzetráccsal, az AC kezelés időszaka színekkel jelölve: piros – 3. nap, kék – 7. nap, zöld – 10. nap, barna – 14. nap. (80)

Faktor Nyál típusa	MUC5B	MUC7	IL-1 β mRNS koncent- ráció	IL-1 β	TNF α	TNF α mRNS koncent- ráció	IL-2	IL-6	Melatonin	Ca ²⁺
Nyugalmi	5,192 \pm 4,33 ng ml ⁻¹	0,388 \pm 0,33 ng ml ⁻¹	0,208 \pm 0,35	396,604 \pm 320,219 pg ml ⁻¹	22,67 \pm 15,22 pg ml ⁻¹	1,101 \pm 0,71	35,025 \pm 32,42 pg ml ⁻¹	10,435 \pm 8,6 pg ml ⁻¹	3,76 \pm 4,76 pg ml ⁻¹	* 0,431 \pm 0,117 mmol/l
Inger	9,477 \pm 8,11 ng ml ⁻¹	1,89 \pm 1,35 ng ml ⁻¹	0,3 \pm 0,29	237,34 \pm 99,438 pg ml ⁻¹	34,74 \pm 20,84 pg ml ⁻¹	1,304 \pm 0,35	28,698 \pm 36,23 pg ml ⁻¹	8,36 \pm 6,73 pg ml ⁻¹	7,255 \pm 6,26 pg ml ⁻¹	* 1,26 \pm 1,02 mmol/l

8. táblázat: A nyugalmi- és ingernyálban mérhető koncentrációk kontroll értékeinek átlaga (* $p < 0.0001$). (80)

A nyugalmi- és az ingernyálban a vizsgált paraméterek mérési eredményei az mutatták, hogy a MUC5B szintje nem változik szignifikánsan az idő előrehaladtával nyugalmi- és ingernyálban sem, de szignifikáns különbség mutatkozott a nyugalmi- és ingernyál között. Ellenben a MUC7 szintje azonban minden időpontban megnőtt a stimulált nyálban a nyugalmi nyálban mért koncentrációkhoz képest.

Az IL-1 β fehérjekoncentrációja magasabb volt a nyugalmi nyálban, mint az ingernyálban. A TNF α a fehérje kifejeződése a stimulált nyálban a fogkö-eltávolítást követően 1 héttel levett mintában (14. nap: 41,78 \pm 29,11) láthatóan magasabb volt. Az IL-2 fehérjekoncentrációja a kontrollcsoporthoz képest csökkenő tendenciát mutatott, bár nem volt szignifikáns az eltérés, viszont az IL-6 mennyisége az ingernyálban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a nyugalmi nyál 10. napja. Az IL-1 β mRNS expresszió szintje a vizsgálat előrehaladtával nem mutatott szignifikáns különbséget, azonban az ingernyálban szignifikánsan magasabb volt, mint a nyugalmi nyálban. A TNF- α mRNS esetében a 3. napon (1,91 \pm 1,47) vett ingernyálmintában szignifikáns növekedést találtunk.

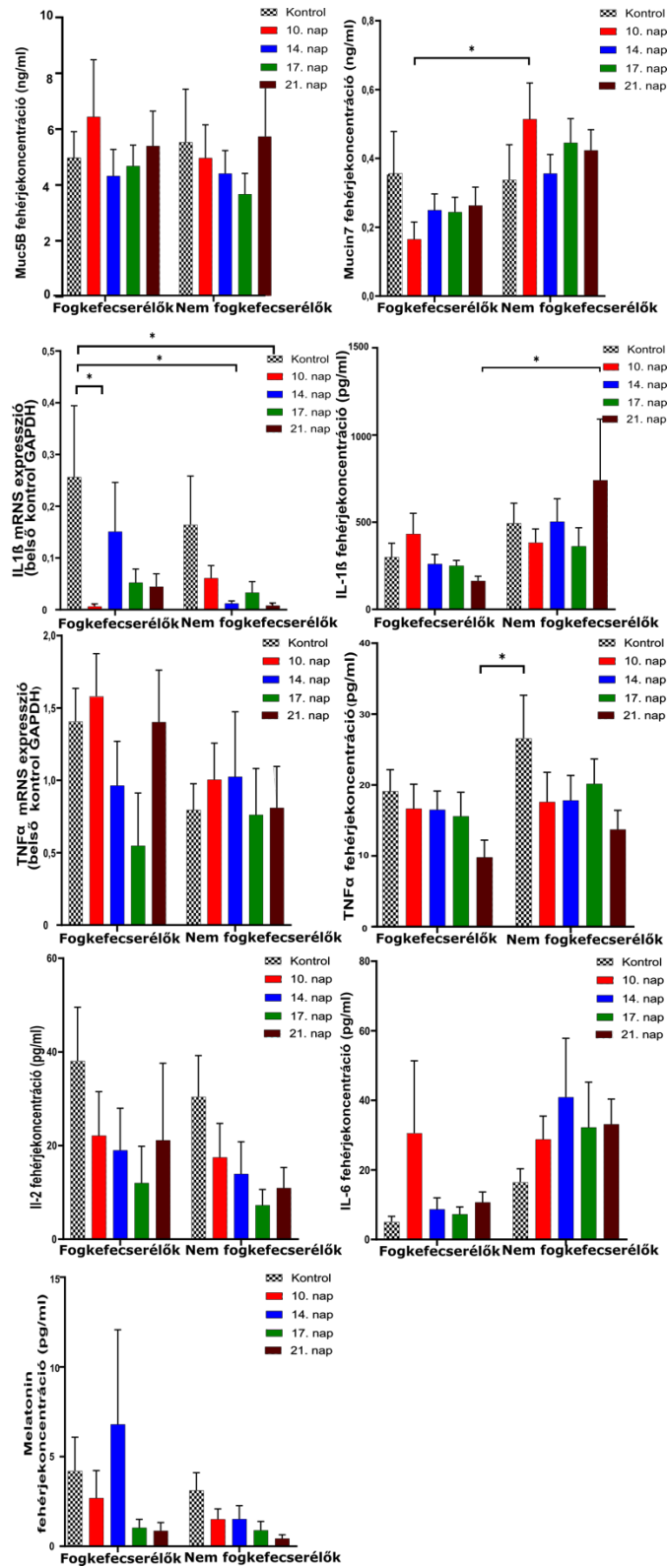
Érdekes, hogy az mRNS-t az IL-2 és az IL-6 esetén nyugalmi- és az ingernyálmintákban sem tudtunk kimutatni.

A Ca^{2+} koncentrációk ingernyálban az időfüggés tekintetében is szignifikáns növekedést mutattak az ingernyál fogkő-eltávolítást megelőző mintavételekor, a kontroll és a 11. nap ($p=0,0002$) és 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. (**19. ábra**) (80)

5.2.2 A fogkefecsere hatásának vizsgálata

5.2.2.1 Nyugalmi nyál

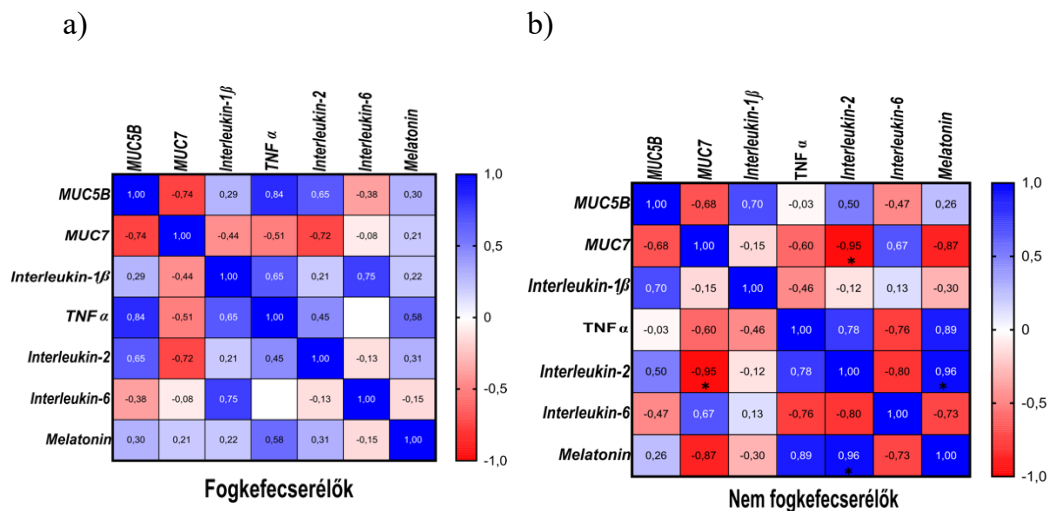


20. ábra: Mucinok (MUC5B, MUC7), gyulladásos markerek (IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-6) és melatonin mRNS- és fehérjekoncentrációk nyugalmi nyálban (* $p=0,0332$). (80)

Nyugalmi nyálban szignifikáns eltéréseket találtunk a csoportok között a $TNF\alpha$ és a MUC7 értékeinél a fogkö-eltávolítás napján vett mintái esetében. Az időfüggés tekintetében a MUC7 és az IL-1 β hasonló, de nem szignifikánsan eltérő tendenciát mutattak: a fogkefecszerélők esetében a kontroll értékhez képest csökkenő, míg a nem fogkefecszerelő csoportnál emelkedő tendenciát mutatott a vizsgálat végére. A MUC5B, IL-2 és melatonin fehérjekoncentrációk esetében a fogkefecsere alapján eltérés nem volt tapasztalható. Az időfüggés tekintetében azonban az IL-2 és a melatonin hasonló – nem szignifikáns - tendenciát mutattak: mindkét csoportban lecsökkent a koncentráció a vizsgálat végére a kiindulási értékhez képest, míg az IL-6 esetében ellentétes volt a tendencia, növekedett a vizsgálat végére a kiindulási értékhez képest.

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. Mivel szintje szignifikánsan lecsökkent a vizsgálat 10. napjára ($p=0,0332$) megállapíthatjuk, hogy az mRNS teljesen átíródott a fehérjeszintézishez.

A $TNF\alpha$ mRNS expresszió esetében sem volt eltérés a fogkefecsere alapján a csoportok között (20. ábra) (80).

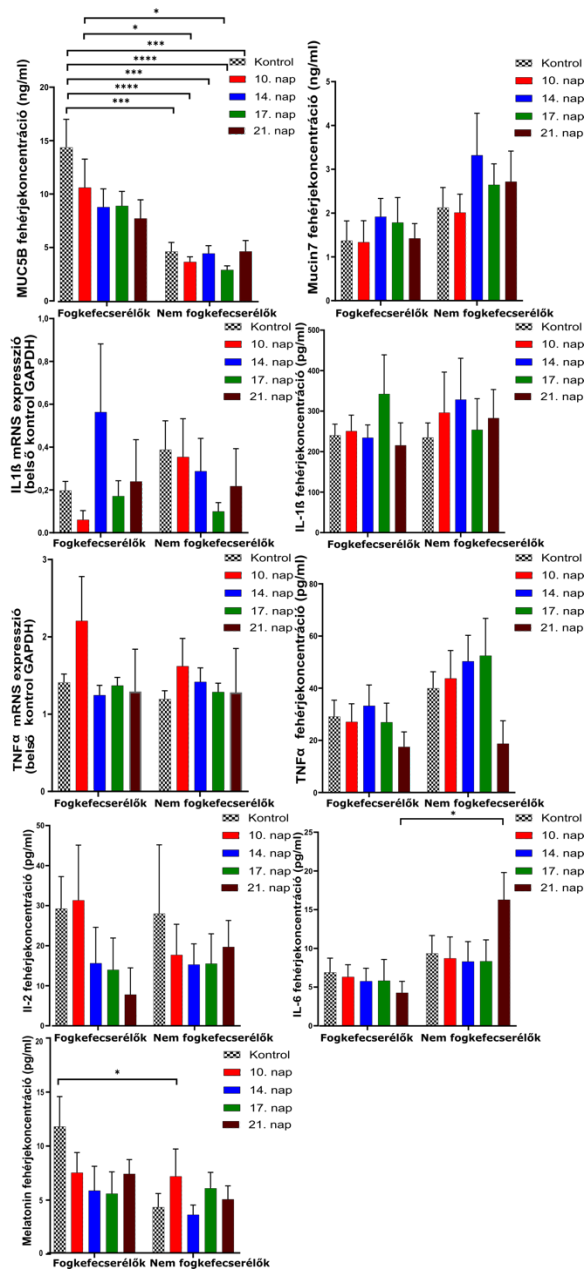


21. ábra: A citokinek (IL-1 β , IL-2, IL-6, $TNF\alpha$), mucinok (MUC5B, MUC7) és melatonin közötti Pearson-korreláció nyugalmi nyálban (* $p=0,0332$) a) Fogkefecszerélők, b) Nem fogkefecszerélők. (80)

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. (21. ábra) (80)

5.2.2.2 Ingernyál

Ingernyálban, a MUC5B esetében a fogkefecszerélők kontroll értékéhez képest a nem fogkefecszerélők minden értéke szignifikánsan alacsonyabb volt, további szignifikancia mutatkozott a fogkefecszerélők 10. napi ($10,6\pm 8,43$) és a nem fogkefecszerélők 10. ($3,65\pm 1,57$), valamint 17. napi ($2,9\pm 1,24$) értékei között. (80)

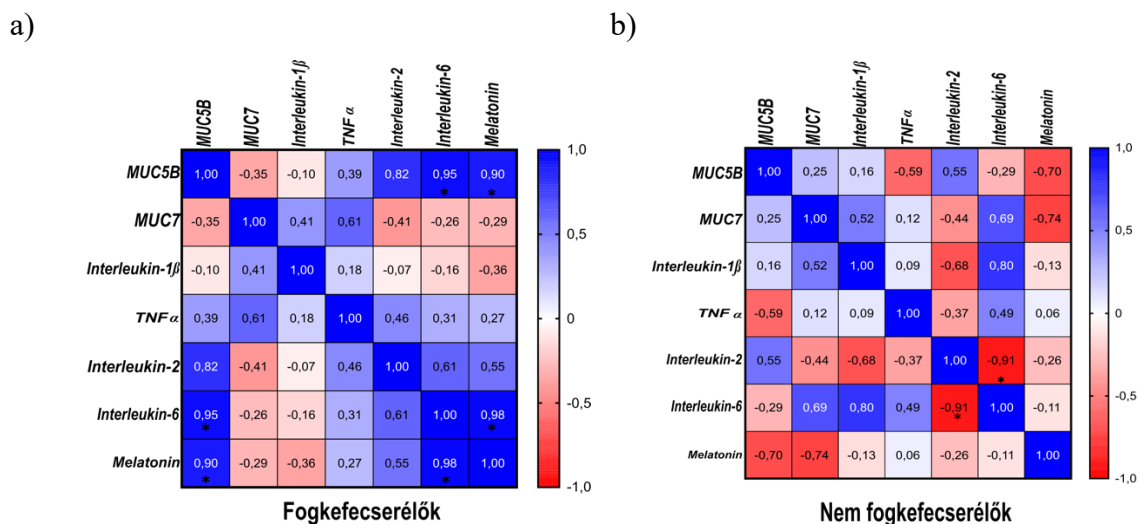


22. ábra: Mucinok (MUC5B, MUC7), gyulladáisos markerek (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α) és melatonin mRNA- és fehérjekoncentrációk ingernyálban (* $p=0,0332$, *** $p=0,0002$, **** $p<0,0001$). (80)

Hasonló eredmény volt látható a melatonin értékeiben, ahol a fogkefecserélő kontroll (11,7±6,8) a nem fogkefecserélő 10. kezelési napjához (7,1±6,71) képest volt szignifikánsan magasabb. A többi kezelési nap tekintetében is a MUC5B-hez hasonló tendencia volt látható a melatoninnál, viszont itt a nem fogkefecserélők értékei emelkedtek kissé a kontrollhoz képest (4,24±3,56) a vizsgálat végére (4,96±3,53). További szignifikáns eltérés mutatkozott az IL-6 esetében, ahol a vizsgálat végére viszont a fogkefecserélők értékei (4,27±4,41) voltak általában alacsonyabbak, mint a nem fogkefecserélőké (16,28±11,12). (22. ábra)

A MUC7, IL-1 β , TNF α mRNS és fehérjekoncentrációknál jelentős szignifikáns eltérés nem mutatkozott a csoportok között a fogkefecse alapján.

A Ca²⁺ szintekben a fogkefecse alapján való csoportokra lebontásnál nem mutatkozott szignifikancia sem a nyugalmi, sem az ingernyálban (nincs ábrázolva). (80)



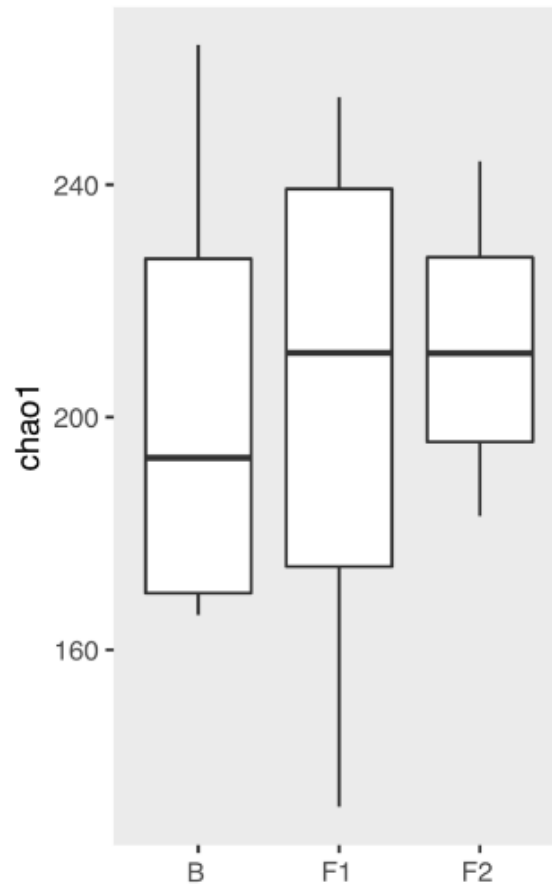
23. ábra: A citokinek (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α), mucinok (MUC5B, MUC7) és melatonin közötti Pearson-korreláció (* p=0,0332). a) *Pearson-korreláció a fogkefecserélőknél, b) Pearson-korreláció a nem fogkefecserélőknél.* (80)

A Pearson-korreláció eredményei szerint fogkefecserélőknél 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 fogkefecserélőknél az IL-6 és IL-2 szignifikánsan, de negatívan (-0,91) korreláltak egymással. (23. ábra) (80)

5.3 Alfa diverzitás

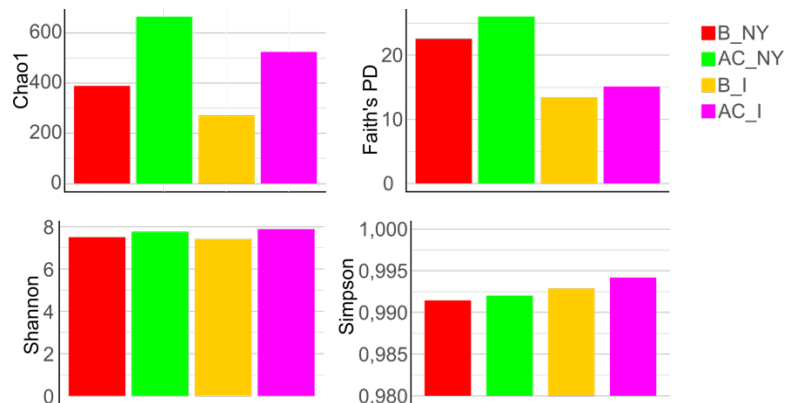
5.3.1 Nyugalmi nyál

Az alfa diverzitás tekintetében nyugalmi nyálban a kontroll és az F2 mintavételi időponthoz képest az F1 fázisban emelkedett érték volt látható, amely azonban nem mutatkozott szignifikánsnak. (24. ábra) (89)



24. ábra: Chao1 diverzitás a nyugalmi nyálmintákban. (89)

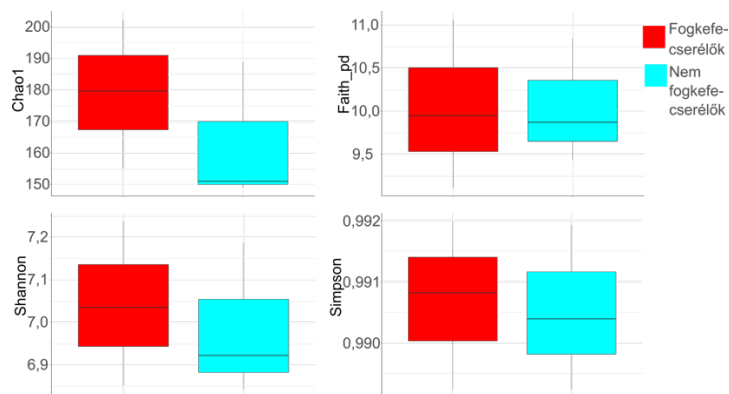
5.3.2 Nyugalmi- és ingernyál összehasonlítása



25. ábra: Alfa diverzitás értékek (*Chao1*, *Faith_pd*, *Shannon*, *Simpson*) nyugalmi- (piros - B_NY: kontroll nyugalmi, zöld - AC_NY: anthocyanin nyugalmi) és ingernyál (narancssárga - B_I: kontroll inger, pink - AC_I: anthocyanin inger). (80)

A nyugalmi- (B_NY, AC_NY) és ingernyál (B_I, AC_I) összehasonításakor mindegyik (*Chao1*, *Faith's PD*, *Shannon* és *Simpson*) diverzitás esetében magasabb értékeket találtunk nyugalmi nyálban (B_NY, AC_NY), mint ingernyálban (B_I, AC_I). Ehhez hasonlóan az AC kezelés időszakában (AC_NY, AC_I) magasabb volt a diverzitás, mint a kontroll időszakban (B_NY, B_I). (25. ábra) (80)

5.3.3 Ingernyál alfa diverzitás a fogkefecsere alapján képzett csoportokban



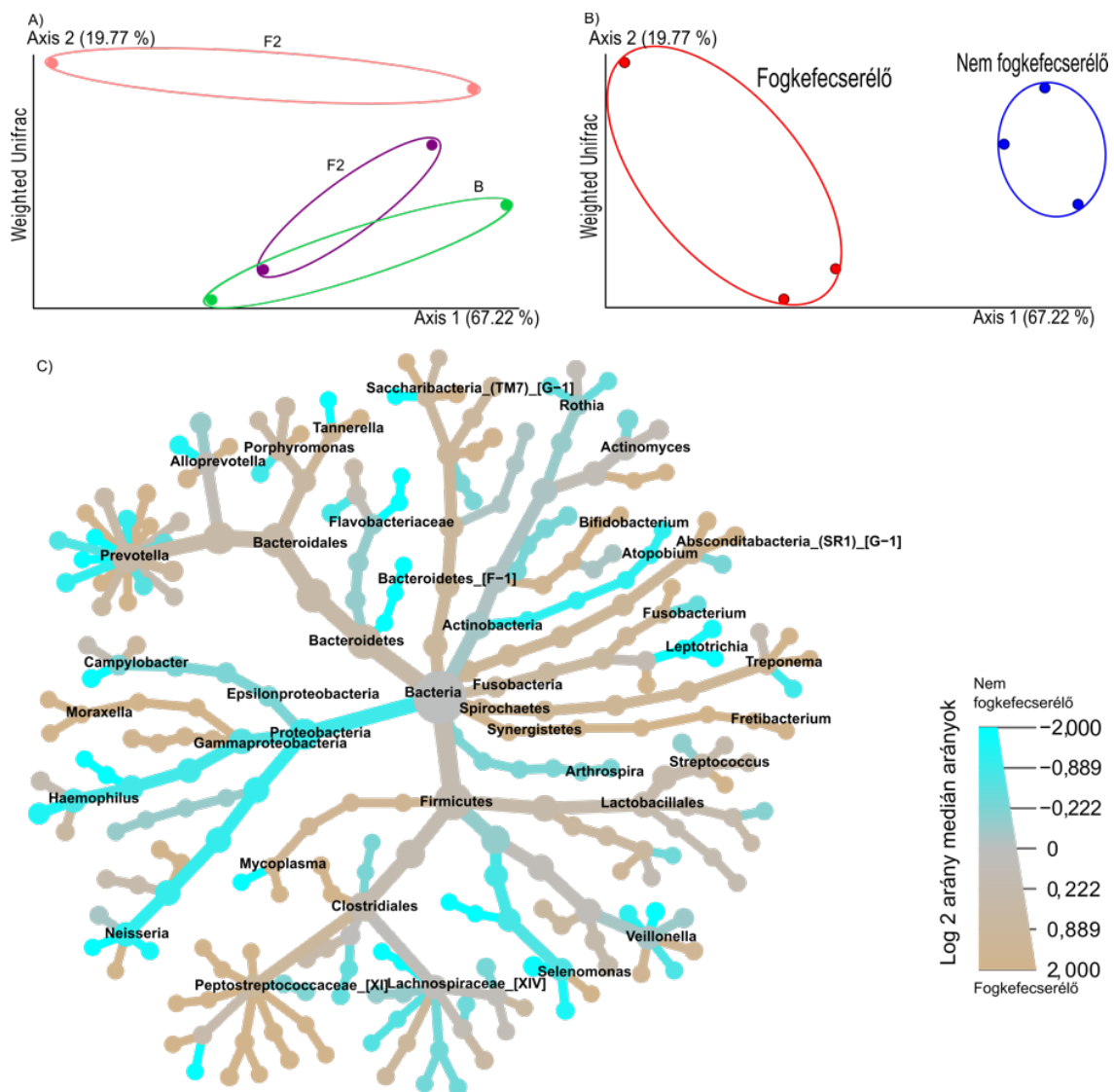
26. ábra: Alfa diverzitás értékek a fogkefecsere (fogkefecszerelők, nem fogkefecszerelők) alapján képzett csoportokban. (80)

A fogkefecsere alapján a *Chao1* és a *Shannon-diverzitás* egyértelműen a fogkefét nem cserélő csoportban mutatott alacsonyabb diverzitást, mint a fogkefecszerelőknél, azonban az eredmények nem voltak szignifikánsak. A *Faith* és *Simpson-diverzitás* tekintetében kisebb különbség mutatkozott a két csoport között a fogkefecsere vonatkozásában, de a tendencia itt is ugyanaz volt. (26. ábra) (80)

5.4 Béta diverzitás

5.4.1 Béta diverzitás nyugalmi nyálban

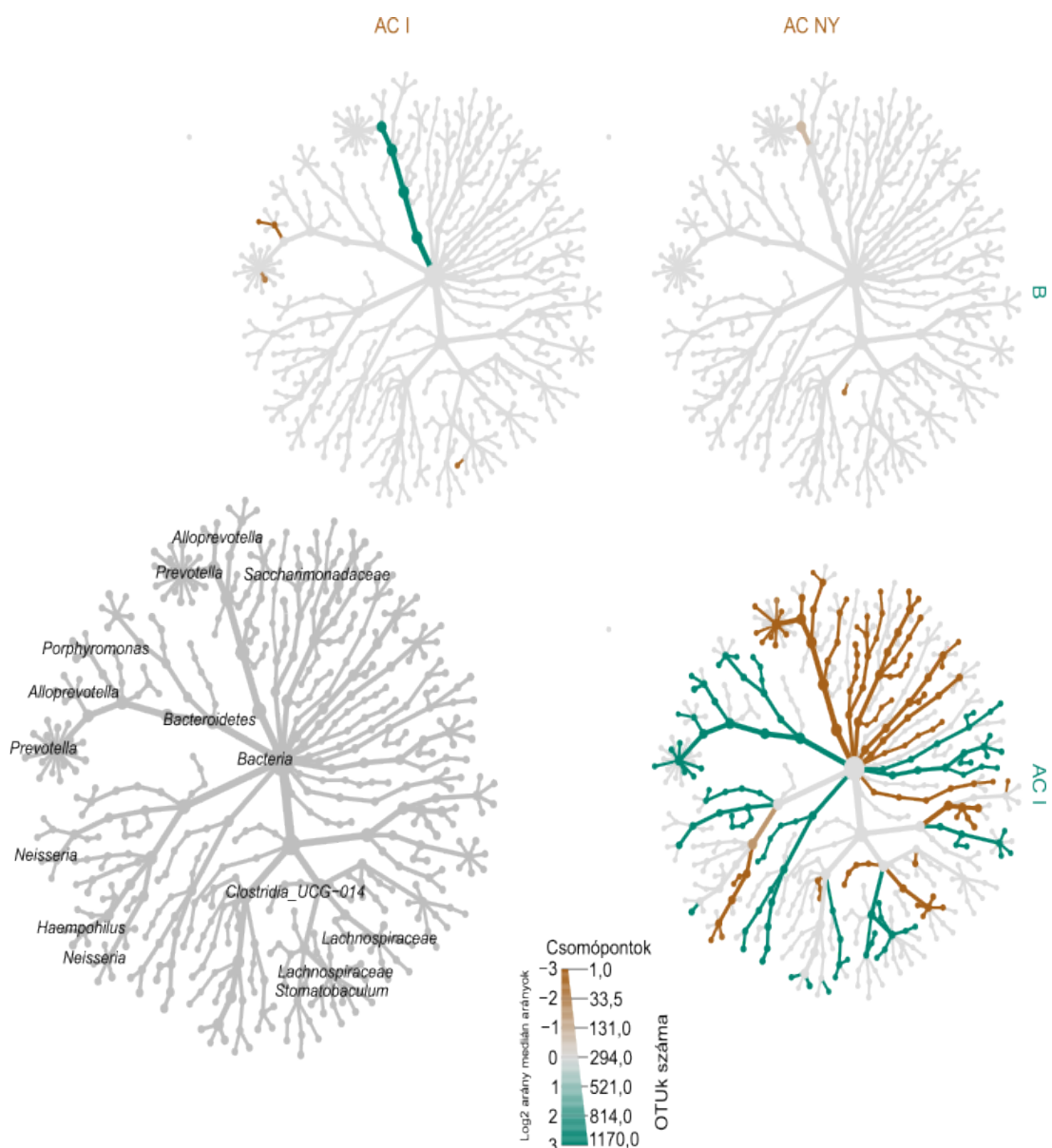
A Weighted Unifrac-elemzés során a fogkefecsere alapján két jól elkülönülő csoportot találtunk. Egy taxonómiai heat-tree ábrázolással különítettük el a fogkefecsere alapján képzett csoportokra jellemző baktérium összetételt, amely a Wilcoxon rank sum test alapján szignifikánsnak bizonyult, viszont a Weighted Unifrac elemzés eredményei nem voltak szignifikánsak. (27. ábra)



27. ábra: a) Nyugalmi nyál Weighted Unifrac: a) mintavételi időpontok (B, F1, F2); b) fogkefecsere alapján. c) Heat-tree ábrázolás a baktériumok előfordulásának log₂ medián arányairól a fogkefecsere alapján.

5.4.2 Béta diverzitás nyugalmi- és ingernyálban

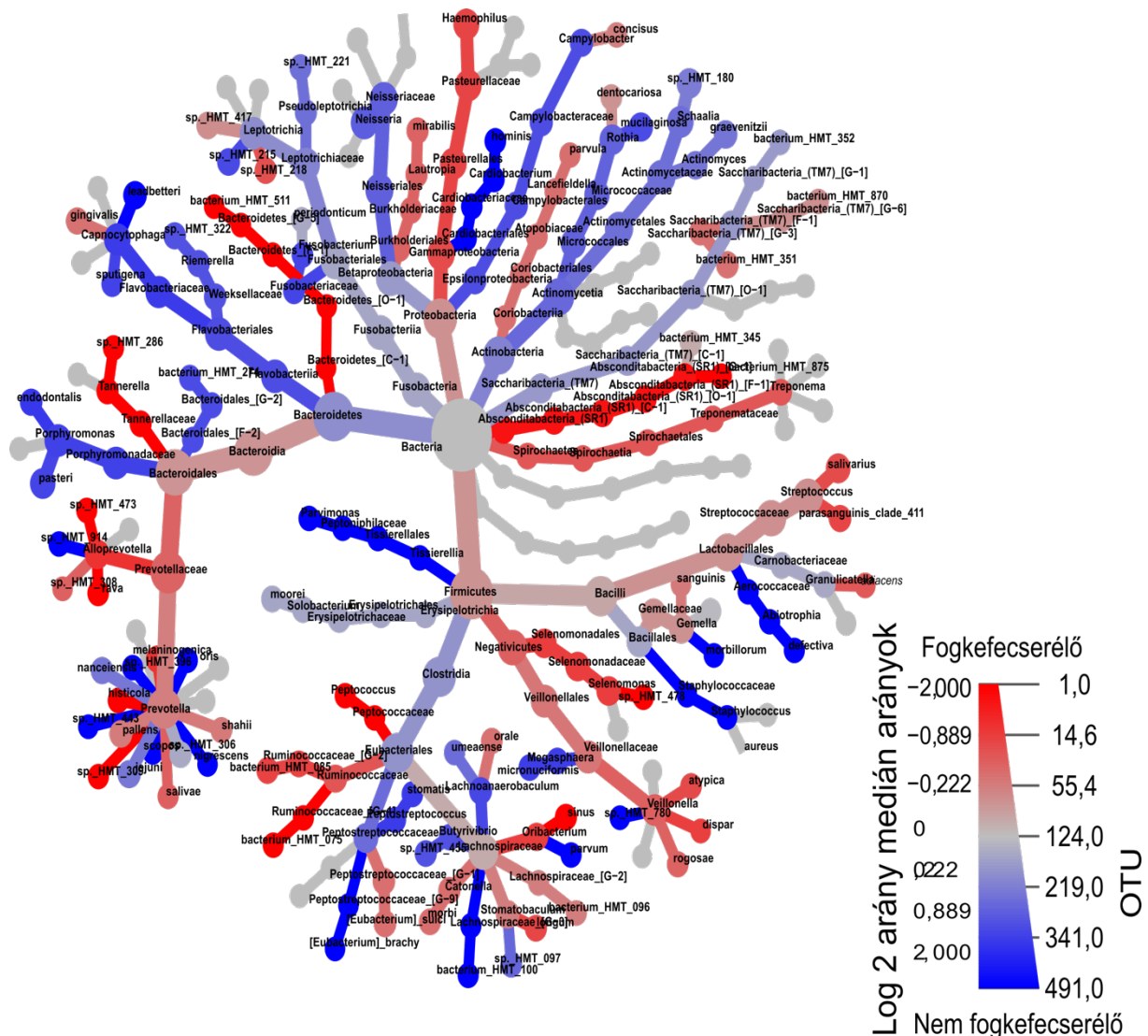
A Metacoder elemzés szignifikánsan magasabb \log_2 medián arányt mutatott az *s_Prevotella_melaninogenica* (-2,175) és *s_Neisseria_perflava* (-2,693) esetében az AC_NY-ban (nem stimulált), mint az AC_I-ben (stimulált). Magasabb volt az *f_Clostridia_UCG_014* (-3,309), *f_Lachnospiraceae* (-5,109), *f_Prevotellaceae* (-3,823), *f_Neisseriaceae* (-3,485) és *g_Prevotella* (-3,616) és *Neisseria* (-3,429) esetében. Stimulált nyál esetén csak a *Stomatobaculum sp_HMT_097* (-2,739) és a *genus Alloprevotella* (-4,223) volt kimutatható magasabb \log_2 medián arányban, mint a B (kontroll). (28. ábra) (80)



28. ábra: Béta diverzitás nyugalmi- és ingernyálban: B_NY (kontroll nyugalmi), B_I (kontroll inger), AC_NY (anthocyanin nyugalmi), AC_I (anthocyanin inger). (80)

5.4.3 Béta diverzitás ingernyálban

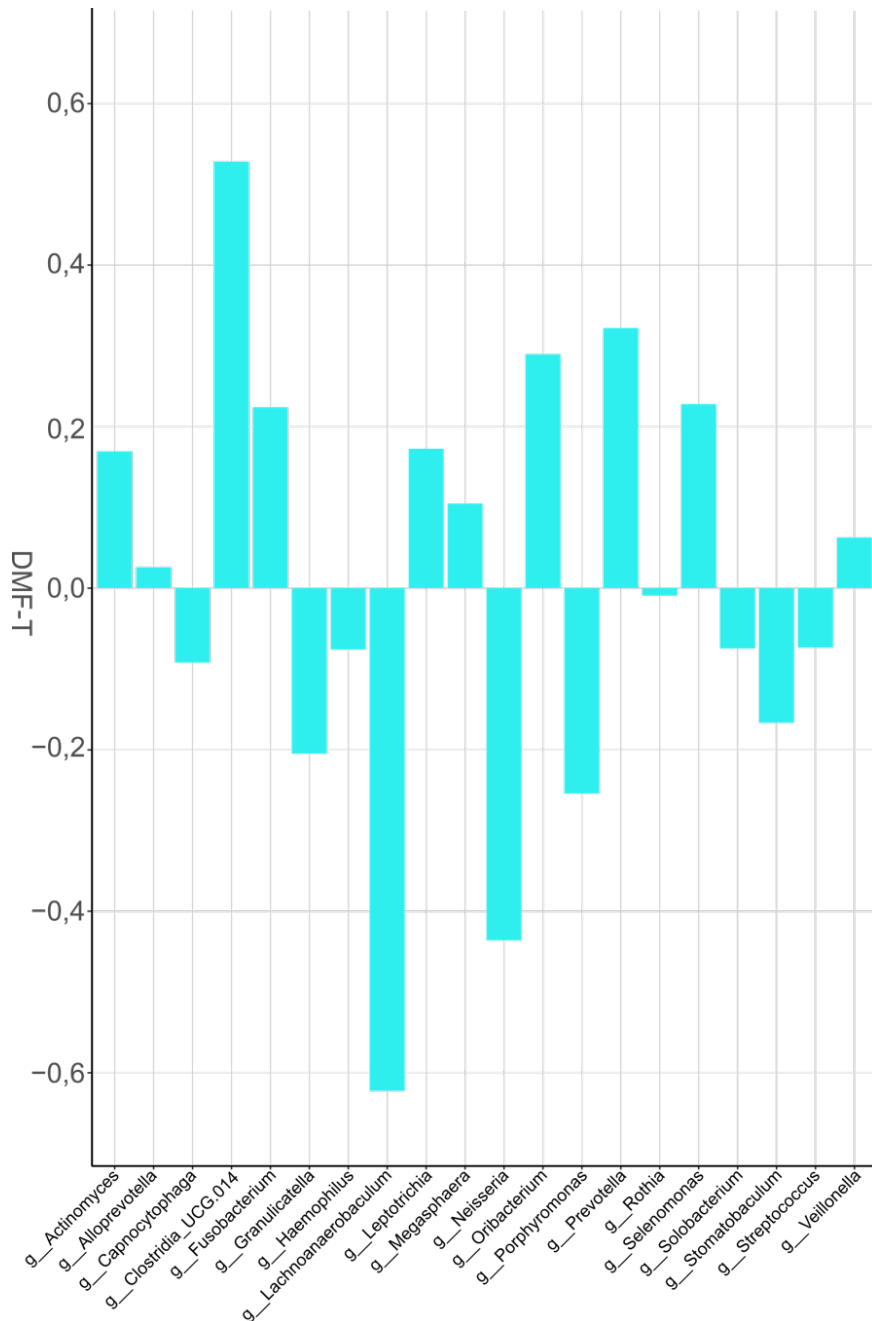
A béta diverzitás további, csoportokon belüli elemzéséhez Metacoder-rel heat-tree-eket készítettünk. (80) A BR csoportra jellemző volt a *Porphyromonas* [*Porphyromonas endodontalis* (1,004), *Porphyromonas pasteri* (0,821)], *Capnocytophaga leadbetteri* (1,94), valamint a family *Fusobacteriaceae* (0,799)] túlsúlya. Az NBR csoportra pedig a *Streptococcus* [*Streptococcus salivarius* (-0,707), *Streptococcus parasanguinis_clade_411* (-0,805)], *Haemophilus parainfluenzae* (-0,789) és *Granulicatella adiacens* (-0,567) voltak leginkább jellemzőek. (29. ábra) (80)



29. ábra: Béta diverzitás értékek Heat-tree mátrix színekódolása: Fogkefecszerélők - kék, Nem fogkefecszerélők – piros. (80)

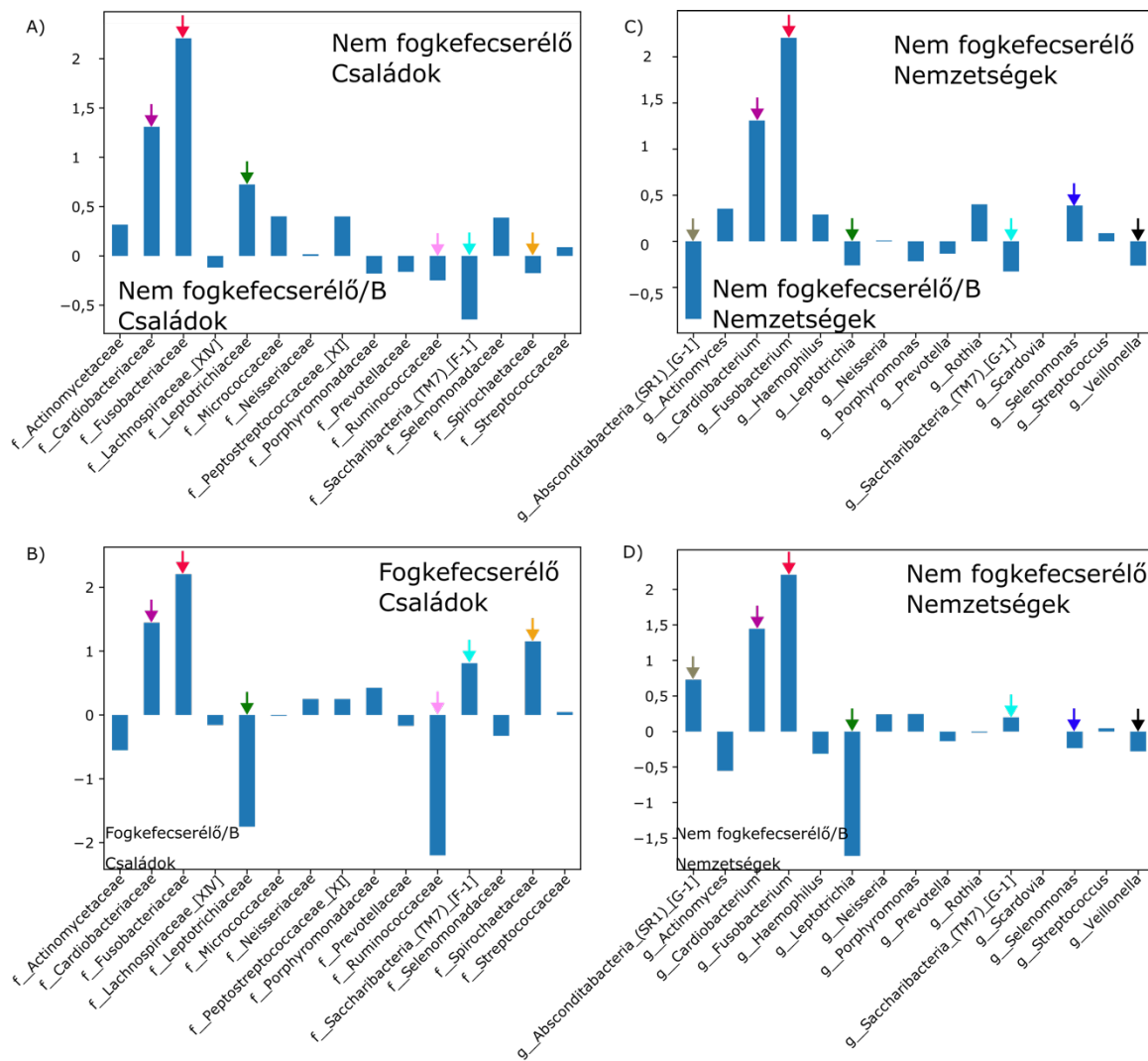
5.5 A DMF-T korrelációja a leggyakoribb genusokkal nyugalmi nyálban

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. (30. ábra) (89)



30.. ábra: A 20 leggyakoribb genera \log_2 medián arányát korreláltattuk a DMF-T-vel. (89)

5.6 Kiemelt genusok és family-k log₂ medián aránya a nyál mikrobiótával



31. ábra: Kiemelt genusok és family-k log₂ medián aránya az NBR (Nem fogkefecszerelő) és az NBR/B (Nem fogkefecszerelő/B) (felső ábrák), valamint a BR (Fogkefecszerelő) és a BR/B (Fogkefecszerelő/B) között (alsó ábrák) a fogkefecsere alapján nyugalmi nyálban. A különböző genusok és family-k színek kódjai: olíva: genus *Absconditabacteria*, lila: family *Cardiobacteriaceae*, genus *Cardiobacterium*, vörös: family *Fusobacteriaceae*, genus *Fusobacterium*, zöld: family *Leptotrichiaceae*, genus *Leptotrichia*, halványlila: family *Ruminococcaceae*, világoskék: family és genus *Saccharibacteria*, sárga: family *Spirochaetaceae*, indigókék: genus *Selenomonas*, fekete: genus *Veillonella*. (89)

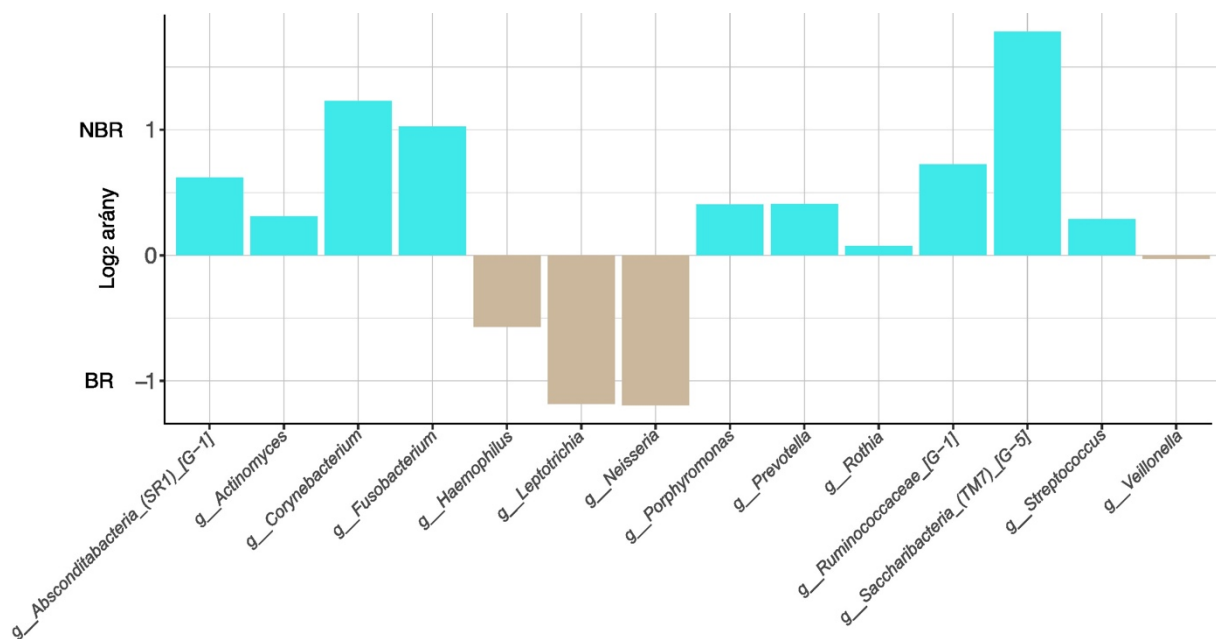
Mindkét csoportban a legnagyobb log₂ arány a family *Fusobacteriaceae* (NBR/B: 2,207, BR/B: 2,206), majd a *Cardiobacteriaceae* (NBR/B: 1,31, BR/B: 1,446) esetében volt észlelhető. Ugyanezek a tendenciák voltak láthatóak a genus *Fusobacterium* (NBR/B: 2,207, BR/B: 2,206)

és *Cardiobacterium* (NBR/B: 1,31, BR/B: 1,446) esetében a kontrollidőszakban, összehasonlítva a rágózás időszakával. (89)

A genus *Actinomyces* (NBR/B: 0,354, BR: -0,553) nagyobb arányban volt jelen az NBR/B esetében, mint a depurálás után az NBR-ben. A BR-ben ellentétes tendenciák voltak észlelhetők.

A *Leptotrichiaceae* log₂ aránya (NBR/B: 0,724, BR: -1,75) kevésbé volt magas az NBR kontroll periódusában és a genus *Leptotrichia* (NBR: -0,261, BR: -1,75) ugyanígy változott. Esetükben ellentétes tendencia voltak megfigyelhető a family szinten a BR-ben (-1,75) és az NBR/B (0,724)-ben is. (31. ábra) (89)

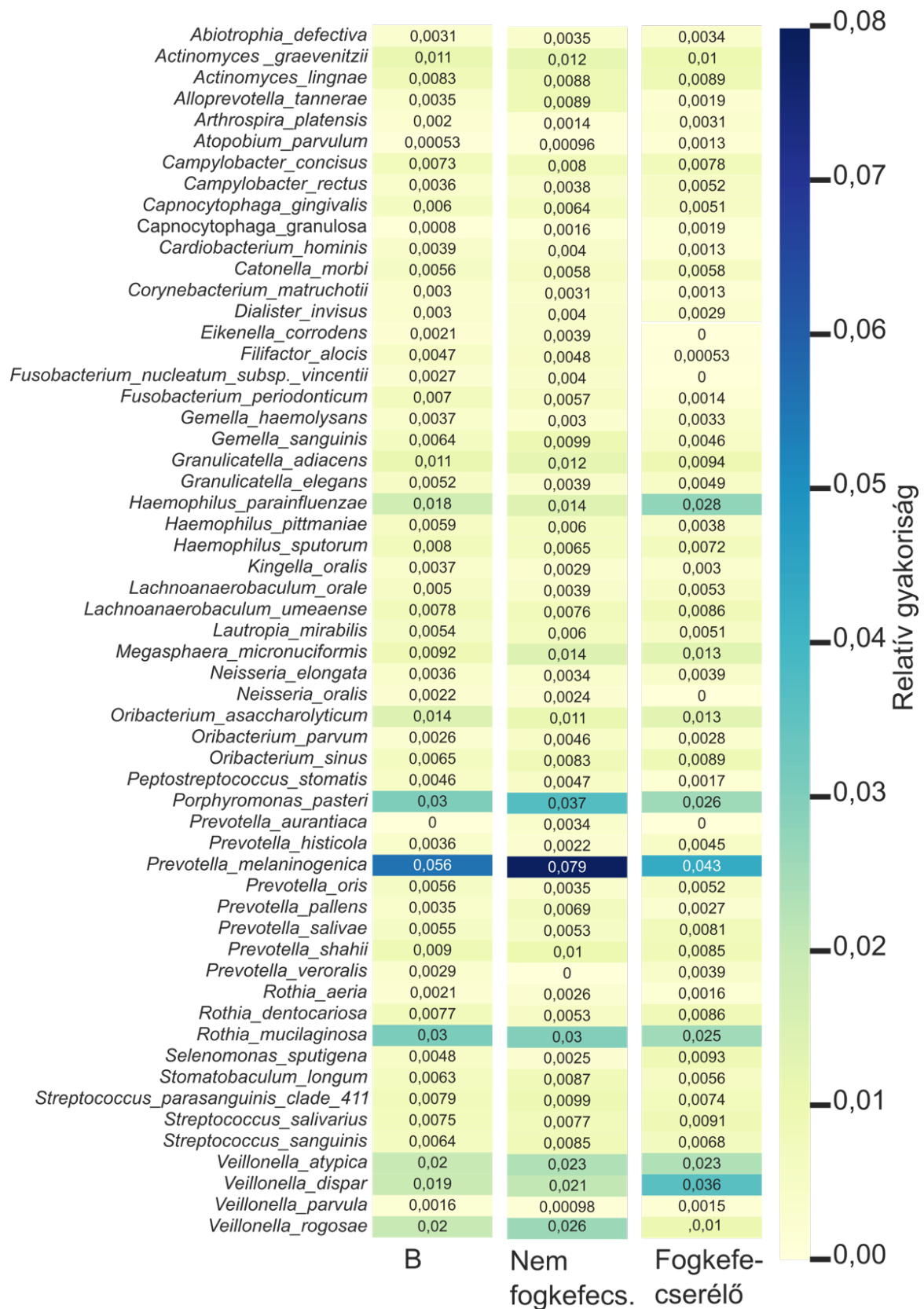
5.7 Potenciális biofilmképzők aránya nyugalmi nyálban



32. ábra: A leggyakoribb biofilmképző genusok aránya a fogkefecsere alapján nyugalmi nyálban (1-0: NBR, -1-0: BR). (89)

Az *Absconditabacteria_(SR1)_[G_1]*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* és *Saccharibacteria (TM7)_[G-5]* genusok mutatták a legnagyobb log₂ arányt az NBR-ben, míg a BR főleg *Leptotrichiából*, *Neisseriából* és *Haemophilusból* épült fel. (32. ábra) (89)

5.8 Speciesek relatív gyakorisága nyugalmi nyálban

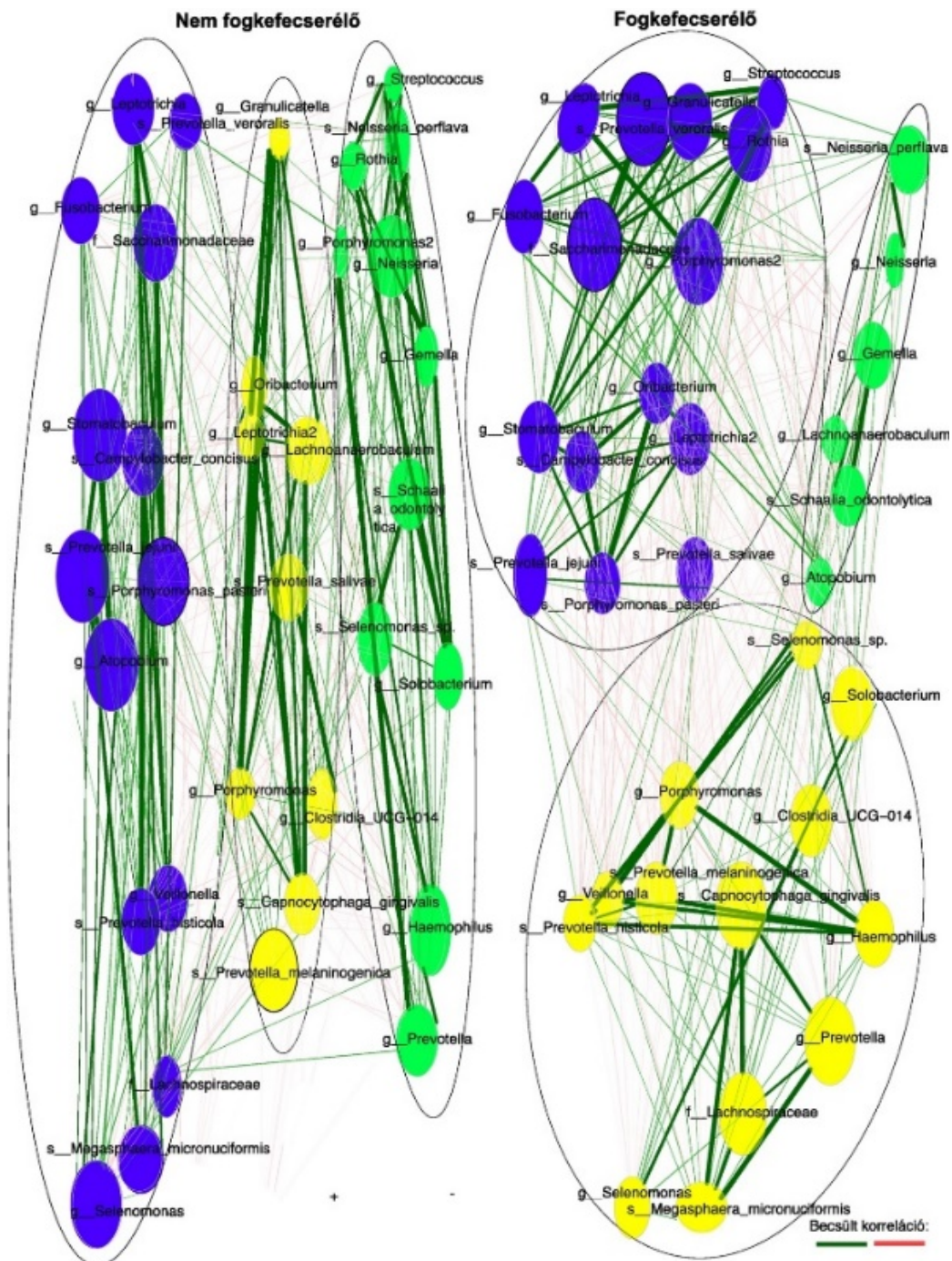


33. ábra: A nyugalmi nyálban észlelt specíesek relatív gyakorisága színekódok alapján. (89)

A leggyakrabban észlelt speciesek a *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas pasteri*, *Rothia mucilaginosa*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar* és *Veillonella rogosae*. (33. ábra)

A *Prevotella melaninogenicának* volt a legnagyobb relatív gyakorisága a nem fogkefecserélők esetében (NBR: 7,9%). A *Porphyromonas pasteri-nek* magasabb volt a relatív gyakorisága annál, akiknél nem történt fogkefecsere (NBR: 3,7%), mint a másik csoportban (BR: 2,6%). A *Haemophilus parainfluenzae-nak* volt a legmagasabb relatív frekvenciája a fogkefecserélőknél (BR: 2,8%), amely kevésbé volt kifejezett a másik csoportban (NBR: 1,4%). A *Veillonella atypica* (NBR; BR: 2,3%) és *dispar* (NBR: 2,1%; BR: 3,6%) elfordulása magas volt mindkét csoportban a fogköleszedést követően. A *Veillonella rogosae* gyakorisága magas volt a nem fogkefecserélőknél (NBR: 2,6%). (89)

5.9 Mikrobiális hálózatok felépítése a fogkefecsere alapján

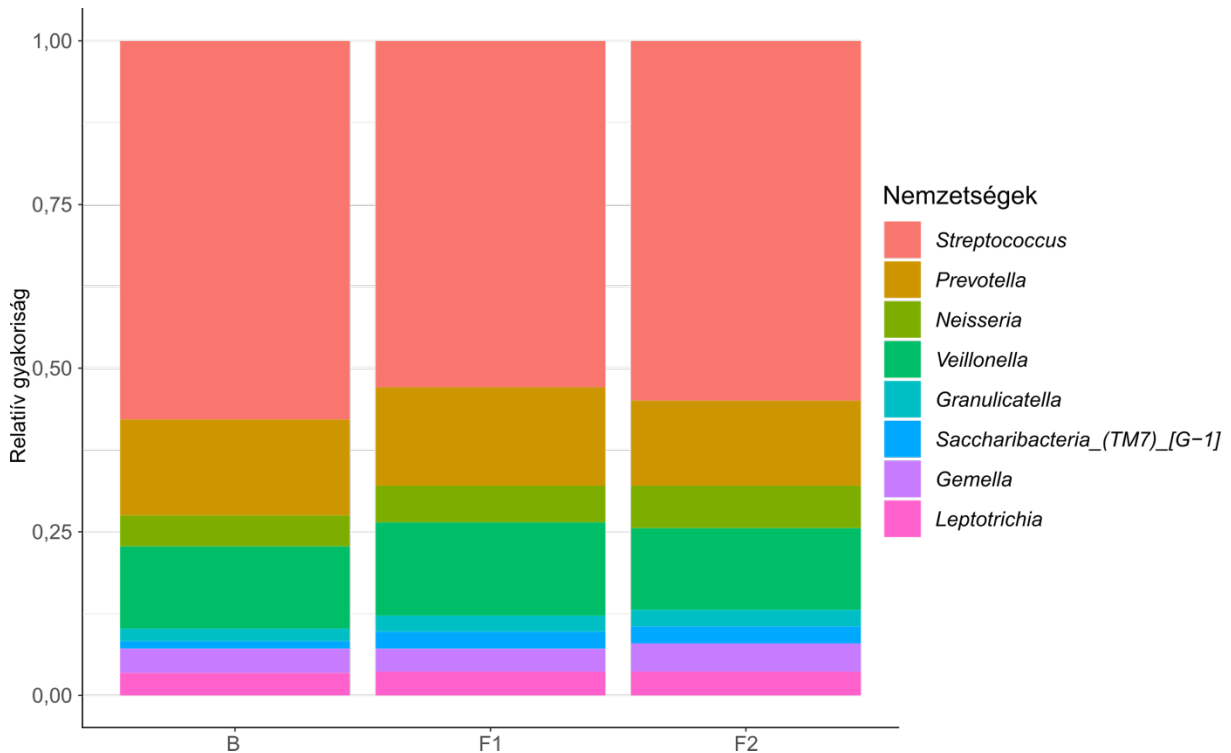


34. ábra: Mikrobiális hálózatok felépítése a nyugalmi nyálban. A zöld vonalak pozitív korrelációkat becsülnek, a piros vonalak pedig a negatív korrelációkat. A vonalak vastagsága a korreláció erősségét mutatja. A csomópontok színei különböző mikrobióta klasztereket képviselnek: lila – 1. cluster, sárga – 2. cluster és zöld – 3. cluster. (89)

A 70%-os core taxonok együttes előfordulása alapján Pearson-korrelációval történt hálózat elemzésük. A core mikrobiom OTU elemzése alapján 34 taxont azonosítottunk be. 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). (34. ábra) (89)

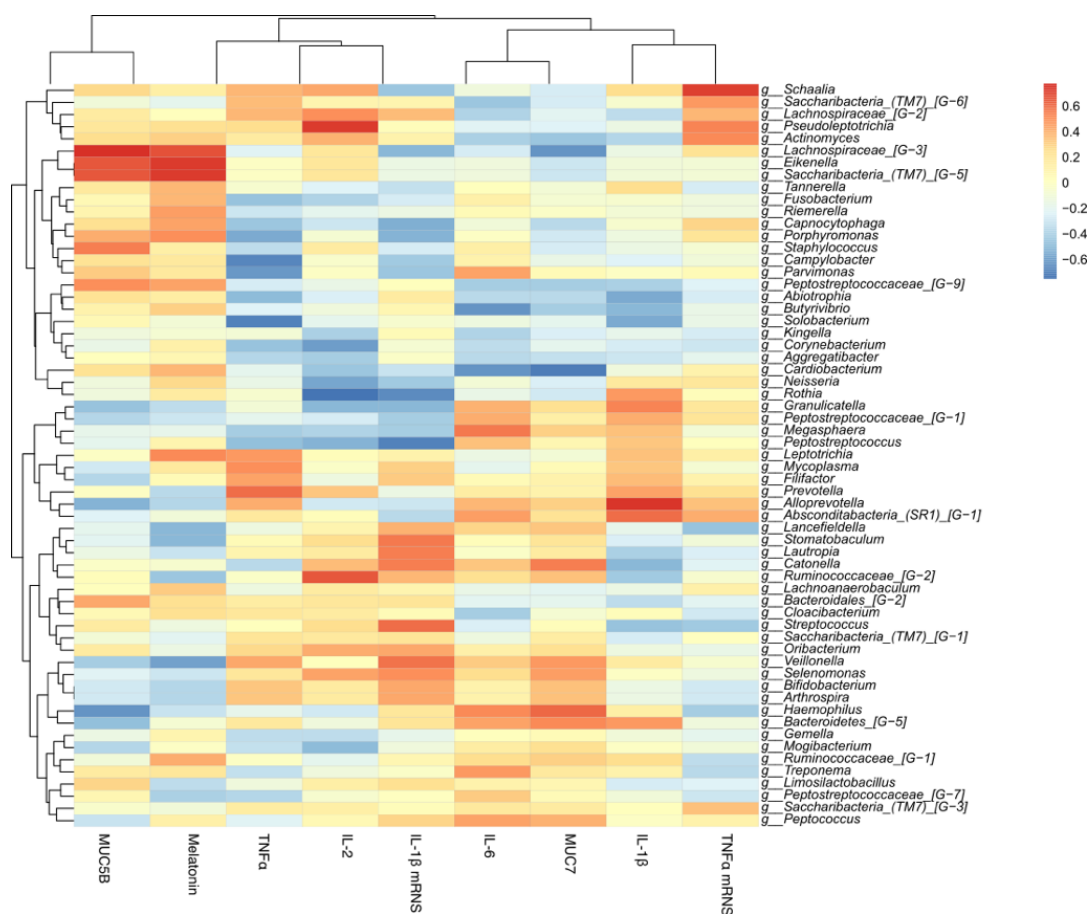
5.10 Ingernyál core microbiom



35. ábra: A mag (core) mikrobiomot alkotó taxonok (*Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Saccharibacteria_(TM7)_[G-1]*, *Gemella*, *Leptotrichia*) relatív frekvencia szerinti megoszlása ingernyálban a kezelési periódusok (B, F1, F2) alapján. (80)

Az összes résztvevő között az alábbi genusok oszlottak meg az ingernyálban relatív gyakoriságuk átlaga szerinti sorrendben: *Streptococcus* (0,55), *Prevotella* (0,14), *Neisseria* (0,056), *Veillonella* (0,13), *Granulicatella* (0,023), *Saccharibacteria_(TM7)_[G-1]* (0,021), *Gemella* (0,039) és *Leptotrichia* (0,036). (35. ábra) (80)

5.11 A mucinok, melatonin és a citokinek korrelációja az ingernyál mikrobiótával



36. ábra: A mucinok, melatonin és citokinek korrelációja az ingernyál mikrobiótával (80)

Genus/mucin	MUC5B	MUC7
<i>Actinomyces</i>	0,258	-0,462
<i>Lachnospiraceae [G-3]</i>	0,775	-0,644
<i>Eikenella</i>	0,658	-0,301
<i>Capnocytophaga</i>	0,250	-0,362
<i>Porphromonas</i>	0,415	-0,288
<i>Peptostreptococcaceae [G-9]</i>	0,507	-0,431
<i>Alloprevotella</i>	-0,537	0,308
<i>Bacteroidales [G-2]</i>	0,424	-0,19
<i>Veillonella</i>	-0,428	0,476
<i>Bifidobacterium</i>	-0,284	0,36
<i>Haemophilus</i>	-0,641	0,615
<i>Bacteroidetes [G-5]</i>	-0,481	0,517
<i>Mogibacterium</i>	-0,374	0,242
<i>Ruminococcaceae [G-1]</i>	-0,1	0,32
<i>Peptococcus</i>	-0,311	0,407

9.táblázat: A genusok MUC5B és MUC7 közötti legjelentősebb eltérései

A MUC5B és MUC7 vonatkozásában a korrelációanalízis során a *g_Actinomyces* (MUC5B: 0,258, MUC7: -0,462), *g_Lachnospiraceae [G-3]* (MUC5B: 0,775, MUC7: -0,644),

g_Eikenella (MUC5B: 0,658, MUC7: -0,301), *g_Capnocytophaga* (MUC5B: 0,250, MUC7: -0,362), *g_Porphyrmonas* (MUC5B: 0,415, MUC7: -0,288), *g_Peptrostreptococcaceae [G-9]* (MUC5B: 0,507, MUC7: -0,431), *g_Alloprevotella* (MUC5B: -0,537, MUC7: 0,308), *g_Bacteroidales [G-2]* (MUC5B: 0,424, MUC7: -0,19), *g_Veillonella* (MUC5B: -0,428; MUC7: 0,476), *g_Bifidobacterium* (MUC5B: -0,284, MUC7: 0,36), *g_Haemophilus* (MUC5B: -0,641, MUC7: 0,615), *g_Bacteroidetes [G-5]* (MUC5B: -0,481, MUC7: 0,517), *g_Mogibacterium* (MUC5B: -0,374, MUC7: 0,242), *g_Ruminococcaceae [G-1]-el* (MUC5B: -0,1; MUC7: 0,32) és a *g_Peptococcus* (MUC5B: -0,311, MUC7: 0,407) esetében a MUC5B-vel és MUC7-el korreláltatva ellentétes tendenciák voltak megfigyelhetőek (**9. táblázat**).

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).

A melatonin és a TNF α is pozitívan korreláltak a *g_Leptotrichiával* (melatonin: 0,520, TNF α : 0,479). A MUC5B negatívan (-0,476), az IL-1 β pedig pozitívan (0,535) korrelált a *Granulicatellával*.

A *g_Cardiobacterium* a MUC7-el (-0,718) és az IL-6-al (-0,63) is negatívan korrelált. A *g_Granulicatella-val* az IL-6 (0,396) és az IL-1 β (0,535) is pozitívan korreláltak. A TNF α negatívan korrelált a *g_Porphyrmonassal* (-0,569) és pozitívan a *g_Prevotellával* (0,607), ez utóbbival az IL-6 kevésbé, de pozitív korrelációt mutatott (0,162). Az IL-2 pozitívan korrelált a *g_Schaaliával* (0,432) és *Actinomycessel* (0,400), míg negatívan a *g_Neisseriával* (-0,579) és a *g_Rothiával* (-0,752), utóbbival viszont az IL-1 β pozitívan korrelált (0,475). Az IL-1 β a *g_Streptococussal* negatívan (-0,463), míg annak mRNS-ével pozitívan (0,603) korrelált. (**36. ábra, 9. táblázat**) (80)

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 Fogazati státuszok vizsgálata

Vizsgálatainkban a 18-30 éves, valamint a 30-45 éves korcsoportok és a kutatási protokoll szerint a depurálást követő fogkefecsere alapján történő újabb felosztás szerint elemeztük a résztvevők fogazati státuszát. A korcsoportok szerint az I. korcsoport DMF-T értéke $4,9 \pm 4,38$ volt, átlagéletkora pedig $26,8 \pm 2,04$ volt. A II. korcsoport DMF-T értéke $8,9 \pm 4,91$, 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 (szuvas fogak száma): $0,67 \pm 0,9$, Mt (hiányzó fogak száma): $1,33 \pm 1,9$, Ft (tömött fogak száma) $7,56 \pm 3,91$), a fogkefét nem cserélőknél pedig $5,22 \pm 4,5$ (Dt: $0,67 \pm 1,07$, Mt: $0,33 \pm 0,67$ Ft: $4,22 \pm 3,9$) volt. A két csoport DMF-T értékei között nem volt szignifikáns eltérés, amely vizsgálatunk célja volt. Hasonló földrajzi környezetben élő, hasonló szájhigiénés és étkezési szokásokkal rendelkező, egészséges, súlyos szisztémás betegséggel nem rendelkező személyeket vontunk be vizsgálatunkba. Ezáltal a viszonylag homogén összetételű csoportok elemzése során a mechanikai (fogkő-eltávolítás, fogkefecsere és hatóanyag-nélküli rágógumi rágása) és kémiai (meggy anthocyanin hatóanyag-tartalmú rágógumi) beavatkozásaink nyálban mérhető változásait egyszerűen tudtuk követni.

Pearson-korrelációval a résztvevők össz-átlag DMF-T ($6,9 \pm 4,97$) és BPE ($0,42 \pm 0,34$) értékei között szignifikáns, negatív korreláció ($\sim 0,48$) mutatkozott.

6.2 Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata nyugalmi nyálban

A proinflammatorikus citokinek szintjének három hetes, teljes vizsgálati periódus alatt való elemzése során a kontrollperiódus mintavételi eredményeinek átlagát és a kéthetes, anthocyaninos rágógumizás alatti nyugalmi- és ingernyál mintákból mért koncentrációk értékeit határoztuk meg.

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.

Pearson-korrelációval szignifikáns, pozitív korreláció mutatkozott a fogkefét nem cserélő csoportban az IL-2 és a melatonin között (0,98). Az IL-2 és a MUC7 között azonban szignifikáns, negatív korreláció (-0,95) mutatkozott ezen csoportban.

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 szájhigiénes tevékenységek során indulhat újra a plakk-képződés (93), 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, ugyanis a MUC7 képes direkt módon is megkötni azokat, hogy a nyállal ürüljenek, ezáltal fenntartva a kommenzális flóra egyensúlyát (43).

6.3 Nyugalmi nyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban

Az alfa diverzitás a mintán belüli összetétel változatosságának egyik mutatója (94). A nyugalmi nyál mikrobiom elemzésekor azt találtuk, hogy a fogkő-eltávolítást követően diverzebb lesz a mikrobiom összetétele (emelkedett alfa diverzitás) (15), amelyet az anthocyaninos rágógumizás fenntart. A béta diverzitás megmutatja az egyes minták közötti összetétel különbségeit (94) akár a taxonok szintjén is. A fogkefecserre 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 fogkefecserre alapján jól elkülönülő clustereket is találtunk. A kezelési idő tekintetében ez nem volt megfigyelhető, tehát a fogkefecserre 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 szájhigiéniájú egyénekre jellemző *Neisseria*, *Porphyromonas* és *Granulicatella* magasabb relatív frekvenciája volt megfigyelhető.

A fogkefecserre következtében létrejövő skálafüggetlen hálózatok elemzésekor pedig a *Streptococcusok* eltérő hálózati kapcsolódásait találtuk a fogkefecserre alapján. Ha nem történik fogkefecserre, akkor a cariesre jellemző *Gemella* és a *Streptococcusok* által termelt H₂O₂-t hasznosítani képes *Neisseria* és *Haemophilus* genusokkal való kapcsolódása jellemző.

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

6.4 Proinflammatorikus citokinek és mucinok szintjének összehasonlító vizsgálata ingernyálban

Ingernyálban a MUC5B, melatonin és IL-6 értékeiben találtunk szignifikanciát a fogkefecsere alapján képzett csoportok között, ahol MUC5B és melatonin esetében a fogkefecserélők, míg IL-6 esetében a nem fogkefecserélők értékei voltak szignifikánsan magasabb, bár értékük – nem szignifikánsan, de - lecsökkent a vizsgálati periódus végére. A Pearson-korreláció eredményeiben itt a fogkefecserélőknél az IL-6 és MUC5B (0,95), az IL-6 és melatonin (0,98), a MUC5B és melatonin (0,9) szignifikánsan pozitívan, míg a fogkefét nem cserélőknél az IL-6 és IL-2 szignifikánsan negatívan (-0,91) korreláltak egymással.

Azonban a fogkefecsere és a szisztémás hatásokkal nem bíró anthocyanin önmagában nem elegendő ezen hatások kiváltásához, ezért eredményeink további elemzését a mikrobiom szekvenálás eredményeivel összevetve kellett tovább vizsgálnunk.

Ezen eredmények háttérében a MUC5B és melatonin nem fogkefecserélőknél 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 (68). Ha nem történik fogkefecsere, akkor ingernyálban is megemelkedhet a gyulladásozó faktorok (pl. IL-6) szintje, amelynek szintje cariesmentes egyéneknél alacsonyabbnak bizonyult (34).

6.5 Ingernyál mikrobióta elemzése a vizsgálati populációkban

Az ingernyál mikrobiom elemzésekor a fogkefecsere alapján a fogkefecserélőknél találtunk magasabb alfa diverzitást. A béta diverzitás itt mindkét csoportban kimutatott késői kolonizáló *speciéseket* és a fogkefecserélőknél nem-mutans *Streptococcusokat*. Az ingernyál vizsgálatokor 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

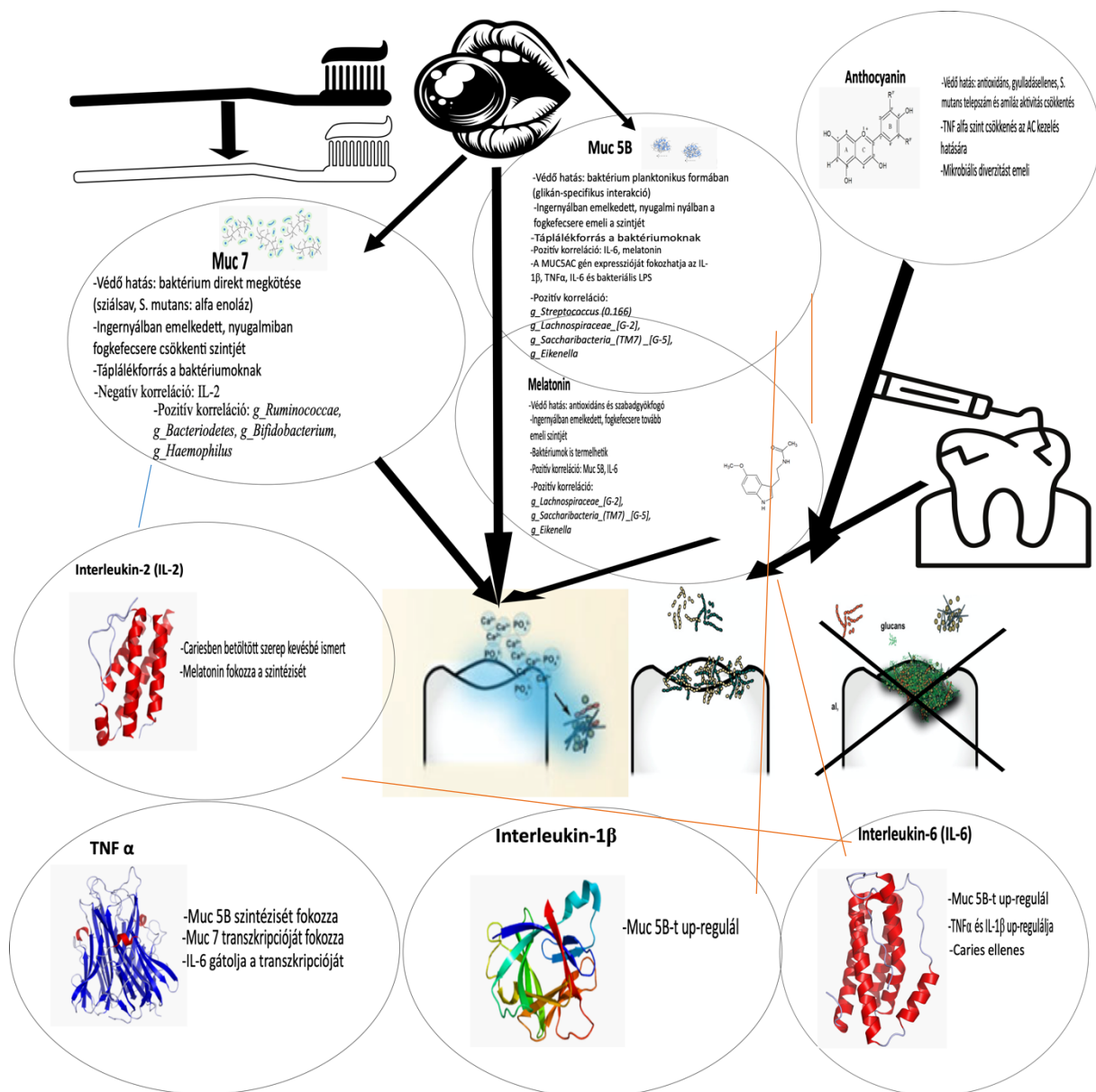
hasznosítani, valamint a *g_Bacteroidetes*-el és a *g_Bifidobacterium*-al, amelyek mucinbontó enzimekkel rendelkeznek, így ezen eredmények a MUC7-nek a szájüregi mikrobiom egyensúlyának fenntartásában betöltött szerepét támasztják alá. A *g_Haemophilus* MUC5B-vel negatívan és a MUC7-el pozitívan korrelált - a két mucin eltérő tulajdonságai -, továbbá IL-6-al való pozitív korrelációja is alátámasztja ezen genus cariesben betöltött ellentmondásos szerepét (95, 96). 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 (97), ugyanis vizsgálatainkat abban a napszakban végeztük, amikor a legalacsonyabb a nyál melatonin szintje és az anthocyaninos rágógumiból történő melatonin felszabadulása sem feltételezhető. Végül a *g_Prevotella* számos proinflammatorikus citokinnel való pozitív korrelációja, annak gyulladásban betöltött szerepét támasztja alá (98, 99). Az ingernyálban pedig a *g_Streptococcus* az irodalommal ellentétben az IL-1 β -val negatívan korrelált (61), amely résztvevőink jobb szájhigiéniájára és a non-mutans Streptococcusok túlsúlyára vezethető vissza.

6.6 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.

Ezen eredmények összefüggésben állnak Dawes és munkatársai (100) vizsgálataival, ahol cukormentes rágógumi rágását követően, nyugalmi- és ingernyálban mérték a Ca²⁺ koncentrációkat és megállapították, hogy az ingernyál Ca²⁺-ra túltelítetté válik, tehát magasabb lesz a koncentrációja. Az ingernyál, kísérleteinkkel összhangban jobban véd a fogszuvasodás ellen, amelyet az ingernyálban mért magasabb MUC5B, MUC7, TNF α és melatonin koncentrációk is alátámasztanak. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiból is kiderült, hogy a rágás hatására kezdetben megemelkedik a nyál *S. mutans* telepszáma (5), azaz a rágás hatására a fogakon lévő sessilis baktériumok planktonikus formába való átmenete fokozódik. Ezzel összhangban érthető, hogy a védő faktorok (MUC5B, MUC7 és melatonin) szintje is következményesen megemelkedik, továbbá Dawes és munkatársai (100) eredményeivel összhangban ingernyálban ezen faktorok koncentrációja is megemelkedik.

A vizsgálataink eredményeit a 37. ábrán foglaltam össze.



37. ábra: A vizsgálat eredményeinek összefoglalása (kék vonal: negatív korreláció, piros vonal: pozitív korreláció)

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A védő faktorok esetében azok expressziós szintű változásait figyelhettük meg, azonban ezen változások nyugalmi- és ingernyálban sem tudhatók be pusztán a szisztémás hatásokkal nem rendelkező koncentrációban alkalmazott anthocyaninos rágógumi vagy az elhasznált fogkefe cseréjének. Vizsgálatunkban a fogkő-eltávolítás megemelte a mikrobiális alfa diverzitást, amelyet az anthocyanin fenntartott nyugalmi nyálban. A $\text{TNF}\alpha$ szintjének csökkenése volt megfigyelhető a nyugalmi- és az ingernyál mintákban is, ez az anthocyanin hatásának tudható be. A két fő mucin esetében is megfigyeltük baktériumokkal való pozitív korrelációjukat, amely alátámasztja azoknak a patogén baktériumok elleni védő, ugyanakkor a kommenzális flóra egyensúlyát biztosító szerepét. A MUC5B-vel és a melatoninnal is pozitívan korreláló genusok esetében azok melatonin-termelő képessége szintén a szájüregi mikrobióta és védő faktorok közötti komplex interakciók szerepét bizonyítja. Vizsgálatunkban pozitív korrelációt találtunk irodalmi adatokkal összhangban a nyál MUC5B és IL-6, MUC5B és melatonin, melatonin és IL-6, IL-2 és IL-6 koncentrációja között. Magyar szerzők eredményeivel összhangban, kiemelendő a *g_Prevotella* és gyulladásszerű faktorok közötti pozitív korreláció ingernyálban a gyulladásban betöltött szerepét támasztja alá (98, 99). A fogszuvasodásban jelentős szerepet játszó *Streptococcusok* esetében, nyugalmi nyálban azok fogkefecse alapján hálózati kapcsolódásai kiemelendők abban a tekintetben, hogy fogkefecse nélkül más cariogén baktériumokkal (pl. *Gemella*) vagy az általuk termelt H_2O_2 -t hasznosítani képes baktériumokkal való kapcsolatuk által fennmaradásuk és egy potenciálisan cariogénebb mikrokörnyezet kialakulása feltételezhető. MUC7-el való pozitív korrelációjuk egyértelműen alátámasztani látszik, hogy a MUC7 védő szereppel bír ezen baktériális genus ellen.

Kiemelendő, hogy az ingernyálban a nyugalmihoz képest szignifikánsan magasabb Ca^{2+} , MUC5B, MUC7, $\text{TNF}\alpha$ és melatonin szintek azt bizonyítják, hogy a rágási stimulus hatására a baktériumok planktonikus formába való kerülését követi a védő faktorok szintjének emelkedése, fenntartva a flóra egyensúlyát. A mechanikai és a kémiai beavatkozásunk is elsődlegesen a mikrobiótán fejtette ki a hatását, amelynek következményes változásait láthattuk a biomarkerek szintjének változásaiban. Vizsgálatainkban, korábbi vizsgálatokkal összhangban (5, 12, 101) azt is bizonyítottuk, hogy a meggy anthocyaninok és a fogkő-eltávolítást követő fogkefecse a nyugalmi- és ingernyál mikrobiótára is előnyös hatással van. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált faktorok a szájüregi egészség követésére alkalmas biomarkerek.

SUMMARY

Changes in the expression level were observed in the case of the protective factors, however, these changes in unstimulated and stimulated saliva cannot be attributed solely to the anthocyanin chewing gum used at a concentration without systemic effects (296,75 mg/2,5 g tablet) or the replacement of the used toothbrush. In our study, scaling increased microbial alpha diversity maintained by anthocyanin in unstimulated saliva. A decrease in the level of TNF α was observed in both unstimulated and stimulated saliva samples, which can thus be attributed to the effect of anthocyanin. We also observed a positive correlation of the two major mucins with bacteria supporting their protective role against pathogenic bacteria while ensuring the balance of the commensal flora. In the case of genera positively correlated with MUC5B and melatonin, their melatonin-producing ability also proves the role of complex interactions between oral microbiota and protective factors. In our study, we found a positive correlation between salivary MUC5B and IL-6, MUC5B and melatonin, melatonin and IL-6, IL-2 and IL-6 concentrations in agreement with literature data. Consistent with the results of Hungarian authors, the positive correlation between g_Prevotella and inflammatory factors in stimulated saliva are highlighted supporting its role in inflammation (98, 99). In the case of Streptococcus, which plays a significant role in dental caries, their different network connections observed in unstimulated saliva should be highlighted in the sense that without toothbrushing, their survival and the formation of a potentially more cariogenic microenvironment can be assumed. Their positive correlation with MUC7 seems to clearly support that MUC7 has a protective role against this bacterial genus.

It should be noted that the levels of Ca²⁺, MUC5B, MUC7, TNF α and melatonin in the stimulated saliva are significantly higher than in the unstimulated saliva, proving that as a result of the masticatory stimulus, the bacteria become planktonic, an increase in the level of protective factors maintaining the balance of the flora. Both our mechanical and chemical intervention primarily had an effect on the microbiota, the consequent changes of which we could see by changes in the levels of biomarkers. In our studies, in accordance with previous studies (5, 12, 101) we also demonstrated that sour cherry anthocyanins and changing the toothbrush after scaling have a beneficial effect on the unstimulated and stimulated salivary microbiota. Based on these results, we can state that the factors we examined are biomarkers suitable for monitoring oral health.

8. TUDOMÁNYOS MEGÁLLAPÍTÁSAIM

- 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 melatonintermelő 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. Ingernyalban pedig a MUC5B és melatonin szintek fogkefecserélőknél észlelt szignifikánsan magasabb szintje a MUC5B eltérő antibakteriális és prebiotikus szerepével és a melatonin szintjének bakteriális tevékenység hatására létrejövő emelkedésével magyarázható.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Hivatkozott közlemények jegyzéke:

1. Kelley DS, Adkins Y, Laugero KD. A Review of the Health Benefits of Cherries. *Nutrients*. 2018;10(3).
2. Nemes A, Szöllősi E, Stündl L, Biró A, Homoki JR, Szarvas MM, et al. Determination of Flavonoid and Proanthocyanidin Profile of Hungarian Sour Cherry. *Molecules*. 2018;23(12).
3. Homoki J, Nemes A, Remenyik J. A meggy mint funkcionális élelmiszer. *Agrártudományi Közlemények*. 2014(55):41-7.
4. Homoki J, Nemes A, Fazekas E, Gyémánt G, Balogh P, Gál F, et al. Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and alpha-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties. *Food Chem*. 2016;194:222-9.
5. Homoki J, Gyémánt G, Balogh P, Stündl L, Bíró-Molnár P, Paholcsek M, et al. Sour Cherry Extract Inhibits Human Salivary α -amylase and Growth of *Streptococcus Mutans* (A Pilot Clinical Study). *Food Funct*. 2018;9(7):4008-16.
6. Markovics A, Biró A, Kun-Nemes A, Fazekas M, Rácz AA, Paholcsek M, et al. Effect of Anthocyanin-Rich Extract of Sour Cherry for Hyperglycemia-Induced Inflammatory Response and Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation. *Nutrients*. 2020;12(11).
7. Biró A, Markovics A, Homoki J, Szöllősi E, Hegedűs C, Tarapcsák S, Lukács J, Stündl L, Gálné Remenyik J. Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammatory Response. *Molecules*. 2019;24:3427-41.
8. Garrido M, González-Gómez D, Lozano M, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB. A Jerte valley cherry product provides beneficial effects on sleep quality. Influence on aging. *J Nutr Health Aging*. 2013;17(6):553-60.
9. Remenyik J, Biró A, Klusóczki Á, Juhász KZ, Szendi-Szatmári T, Kenesei Á, et al. Comparison of the Modulating Effect of Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract on Occludin and ZO-1 on Caco-2 and HUVEC Cultures. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
10. Le Phuong NT, Fenyvesi F, Remenyik J, Homoki JR, Gogolák P, Bácskay I, Fehér P, Ujhelyi Z, Vasvári G, Vecsernyés M, Váradi J. Protective Effect of Pure Sour Cherry Anthocyanin Extract on Cytokine-Induced Inflammatory Caco-2 Monolayers. *Nutrients*. 2018;10:861.

11. Nemes A, Homoki JR, Kiss R, Hegedűs C, Kovács D, Peitl B, et al. Effect of Anthocyanin-Rich Tart Cherry Extract on Inflammatory Mediators and Adipokines Involved in Type 2 Diabetes in a High Fat Diet Induced Obesity Mouse Model. *Nutrients*. 2019;11(9).
12. Ben Lagha A, LeBel G, Grenier D. Tart cherry (*Prunus cerasus* L.) fractions inhibit biofilm formation and adherence properties of oral pathogens and enhance oral epithelial barrier function. *Phytother Res*. 2020;34(4):886-95.
13. Kaidonis J, Townsend G. The 'sialo-microbial-dental complex' in oral health and disease. *Ann Anat*. 2016;203:85-9.
14. Nyvad B, Takahashi N. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. *Journal of Oral Microbiology*. 2020;12(1):1710953.
15. Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:1335-60.
16. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*. 2013;45(4):450-5.
17. Sanz M, Beighton D, Curtis M, Cury J, Dige I, Doomsch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. 2017;44:18:S5-S1.
18. Nagy G. 2.4 A nyál alkotói és szerepe. In: Erika B, editor. *Nyálmirigybetegségek*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2000. p. 25-6.
19. Lyng Pedersen AM, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *J Dent*. 2019;80 Suppl 1:S3-s12.
20. Ferguson DB. The salivary glands and their secretions. In: Parkinson M, editor. *Oral Bioscience*. London: Churchill Livingstone; 1999.
21. Buskermolen JK, Janus MM, Roffel S, Krom BP, Gibbs S. Saliva-Derived Commensal and Pathogenic Biofilms in a Human Gingiva Model. *J Dent Res*. 2018;97(2):201-8.
22. Gera I, I G. A fogágybetegség mikrobiológiája. *Parodontológia*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2009. p. 63-9.
23. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(6):E791-800.
24. Rosier TB, Marsch PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res*. 2018;97(4):371-80.

25. Bardow A VA. Saliva and caries development. In: Fejerskov O NB, Kidd E, editor. *Dental Caries The Disease and Its Clinical Management*. Oxford: Wiley Blackwell; 2015.
26. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303.
27. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):108-25.
28. Marsh PD TNaNB. Biofilms in caries development. In: Fejerskov O NB, Kidd E, editor. *Dental Caries The Disease and Its Clinical Management*. 3rd Edition ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015.
29. Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res*. 2016;50(4):422-31.
30. Folke C, Carpenter S, Walker B, Scheffer M, Elmqvist T, Gunderson L, et al. Regime Shifts, Resilience, and Biodiversity in Ecosystem Management. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2004;35(1):557-81.
31. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S23-s38.
32. Manji F, Dahlen G, Fejerskov O. Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on Their Aetiology. *Caries Res*. 2018;52(6):548-64.
33. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Scientific Reports*. 2016;6(1):22164.
34. Govula K AL, Swapna S, Kirubakaran R. Interleukin-6: A potential salivary biomarker for dental caries progression – A Cross-sectional study. *International Journal of Experimental Dental Science*.10:8-13.
35. Devaraj S. Salivary biomarkers - A review. *Pharm Sci & Res*. 2013;5(10):210-2.
36. Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, Grabowska SZ, Wójcicka A, Zalewska M, et al. Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2012;19(4):711-6.
37. Ilea A, Andrei V, Feurdean CN, Băbțan AM, Petrescu NB, Câmpian RS, et al. Saliva, a Magic Biofluid Available for Multilevel Assessment and a Mirror of General Health-A Systematic Review. *Biosensors (Basel)*. 2019;9(1).
38. Barrera MJ, Aguilera S, Veerman E, Quest AF, Díaz-Jiménez D, Urzúa U, et al. Salivary mucins induce a Toll-like receptor 4-mediated pro-inflammatory response in human

submandibular salivary cells: are mucins involved in Sjögren's syndrome? *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(8):1518-27.

39. Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010;1(4):254-68.

40. Tarang S, Kumar S, Batra SK. Mucins and toll-like receptors: kith and kin in infection and cancer. *Cancer Lett*. 2012;321(2):110-9.

41. Kawakami A, Nakashima K, Tamai M, Nakamura H, Iwanaga N, Fujikawa K, et al. Toll-like receptor in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome: functional analysis by human salivary gland cell line. *The Journal of Rheumatology*. 2007;34(5):1019-26.

42. Zalewska A, Zwierz K, Zólkowski K, Gindzieński A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):1067-79.

43. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol*. 2015;7:29759.

44. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401-12.

45. Bijle MN, Ekambaram M, Lo ECM, Yiu CKY. Synbiotics in caries prevention: A scoping review. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237547.

46. Angwaravong O, Pitiphat W, Bolscher JG, Chaiyarit P. Evaluation of salivary mucins in children with deciduous and mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clin Oral Investig*. 2015;19(8):1931-7.

47. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins promote the coexistence of competing oral bacterial species. *Isme j*. 2017;11(5):1286-90.

48. Desseyn JL, Guyonnet-Dupérat V, Porchet N, Aubert JP, Laine A. Human mucin gene MUC5B, the 10.7-kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. Structural evidence for a 11p15.5 gene family. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3168-78.

49. Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Lin BP, Schofield B, Sealfon SC, et al. Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1256-63.

50. Koo JS, Yoon JH, Gray T, Norford D, Jetten AM, Nettekheim P. Restoration of the mucous phenotype by retinoic acid in retinoid-deficient human bronchial cell cultures: changes in mucin gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(1):43-52.

51. Van Seuning I, Pigny P, Perrais M, Porchet N, Aubert JP. Transcriptional regulation of the 11p15 mucin genes. Towards new biological tools in human therapy, in inflammatory diseases and cancer? *Front Biosci.* 2001;6:D1216-34.
52. Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, et al. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics.* 1996;38(3):340-52.
53. Veerman EC, van den Keijbus PA, Nazmi K, Vos W, van der Wal JE, Bloemena E, et al. Distinct localization of MUC5B glycoforms in the human salivary glands. *Glycobiology.* 2003;13(5):363-6.
54. Piras M, Hand AR, Tore G, Ledda GP, Piludu M. Ultrastructural localization of salivary mucins MUC5B and MUC7 in human labial glands. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(1):14-8.
55. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(1):332-8.
56. Smirnova MG, Birchall JP, Pearson JP. TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model. *Cytokine.* 2000;12(11):1732-6.
57. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1765(2):189-222.
58. Li S, Bobek LA. Functional analysis of human MUC7 mucin gene 5'-flanking region in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(5):593-601.
59. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 1994;152(11):5532-9.
60. Boumba D, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. Cytokine mRNA expression in the labial salivary gland tissues from patients with primary Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol.* 1995;34(4):326-33.
61. Slotwinska SZ, M. Salivary interleukin-1 beta and *Streptococcus mutans* level in oral cavity. *Central European Journal of Immunology.* 2012;37:151-3.
62. Varoni EM, Lodi G, Sardella A, Carrassi A, Iriti M. Plant polyphenols and oral health: old phytochemicals for new fields. *Curr Med Chem.* 2012;19(11):1706-20.
63. Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2005;76(11):1849-55.

64. Koski H, Janin A, Humphreys-Beher MG, Solsa T, Malström M, Konttinen YT. Tumor necrosis factor-alpha and receptors for it in labial salivary glands in Sjögren's syndrome. *CLin Exp Rheumatol*. 2001;0131-7.
65. Brennan MT, Fox PC. Cytokine mRNA expression in the labial salivary glands of healthy volunteers. *Oral Dis*. 2000;6(4):222-6.
66. Homoki JR; Nemes A RJ. Régi hormon új csodája: magyarországi meggyfajták mint természetes melatonin források. *Agrártudományi Közlemények*. 2015(63):65-72.
67. Mechin JA, Toury C. Action of melatonin on caries development in rats. *J Dent Res*. 1976;55(3):555.
68. Saeralaathan S, Rajkumar A, Balaji TM, Raj AT, Ganesh A. Salivary melatonin is depleted in patients with dental caries due to the elevated oxidative stress. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2021;11(4):547-51.
69. Madapushi B SR. Preliminary Evaluation of Human Gingiva as an Extrapineal Site of Melatonin Biosynthesis in States of Periodontal Health and Disease. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*.12(1):ZF01-ZF7.
70. Di Stefano A, Paulesu L. Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J Pineal Res*. 1994;17(4):164-9.
71. Paqué PN H, C., Wiedemeier, DB. Mitsakakis, K. Attin, T., Bao, K. Belibasakis, GN. Hays, JP., Jenzer, JS. Kaman, WE. Karpíšek, M. Körner, P.; Peham, JR. Schmidlin, PR. Thurnheer, T. Wegehaupt, FJ. Bostanci, N. Salivary Biomarkers for Dental Caries Detection and Personalized Monitoring. *Pers Med*. 2021;11(3):235.
72. Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Ozawa H. Immunohistochemical Localizations of Class II Antigens and Nerve Fibers in Human Carious Teeth: HLA-DR Immunoreactivity in Schwann Cells. *Archives of Histology and Cytology*. 1998;61(4):343-52.
73. Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunology*. 2011;12(1):9.
74. Williamson S, Munro C, Pickler R, Grap MJ, Elswick RKJ. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nursing research and practice*. 2012;2012:246178.
75. Twetman S. Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *Eur J Oral Sci*. 2018;126 Suppl 1:19-25.
76. Ly KA, Milgrom P, Rothen M. The potential of dental-protective chewing gum in oral health interventions. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(5):553-63.

77. Wessel SW, van der Mei HC, Maitra A, Dodds MW, Busscher HJ. Potential benefits of chewing gum for the delivery of oral therapeutics and its possible role in oral healthcare. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(10):1421-31.
78. Hahnam A, Addy M. The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. *J Clin Periodontol.* 2001;28(3):255-7.
79. Skopkó B VI. Az íny- és fogágybetegségek epidemiológiája. In: V I, editor. *A fogágybetegség elméleti háttere*2021. p. 24-9.
80. Skopkó BE, Homoki JR, Fazekas MÉ, Paholcsek M, Fauszt P, Dávid P, et al. Changes in the Composition of Unstimulated and Stimulated Saliva Due to Chewing Sour Cherry Gum and a Toothbrush Change. *Cells.* 2024;13(3):251.
81. Söderling E, Hirvonen A, Karjalainen S, Fontana M, Catt D, Liisa S. The effect of Xylitol on the Composition of the Oral Flora: A Pilot Study. *Eur J Dent.* 2011;5(1):24-31.
82. Pizzo G, Licata ME, La Carar M, Pizzo I. The effects of sugar-free chewing gums on dental plaque regrowth: A comparative study. *J Clin Periodontol.* 2007;35(6):503-8.
83. Inc. TFS. ELISA technical guide and protocols. TECH TIP # 65. USA. 3747 N. Meridian Road Rockford, IL 61105 USA (815) 968-7316 fax.2010.
84. *A biotechnológia természettudományi alapjai 7. Polimeráz láncreakció (PCR)* [Available from: <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/BiotechManager/!2020/2%20Polimer%C3%A1z%20l%C3%A1ncreakci%C3%B3%20szoveges.pdf>.
85. Yu-Hsiang L, Hui Z, Jeann R, Xinmin Y, Lei Z, David C, et al. Direct Saliva Transcriptome Analysis. *Clin Chem.* 2011:1295-302.
86. Biolabs NE. Luna® Universal Probe qPCR Master Mix Protocol (M3004). M3003. Ipswich, MA, USA.
87. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System. 5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122 USA: Illumina, Inc.
88. Fidler G, Tolnai E, Stigel A, Remenyik J, Stundl L, Gal F, et al. Tendentious effects of automated and manual metagenomic DNA purification protocols on broiler gut microbiome taxonomic profiling. *Scientific Reports* 2020;10:3419.
89. Skopkó B, Paholcsek M, Szilágyi-Rác A, Fauszt P, Dávid P, Stündl L, et al. 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.* 2023;11(2):44.

90. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(1):e1.
91. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*. 2016;13(7):581-3.
92. Fukuyama J. Emphasis on the deep or shallow parts of the tree provides a new characterization of phylogenetic distances. *Genome Biol* 2019;20(1):131.
93. Simon-Soro A, Ren Z, Krom BP, Hoogenkamp MA, Cabello-Yeves PJ, Daniel SG, et al. Polymicrobial Aggregates in Human Saliva Build the Oral Biofilm. *mBio*. 2022;13(1):e0013122.
94. Hill. TC., Walsh KA, Harris. JA., BF. M. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;43:1-11.
95. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*. 2014;162(2 Pt A):22-38.
96. Johansson I, Witkowska E, B K, Holgerson P, Tanner A. The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *J Dent Res*. 2016;95(1):80-6.
97. Zhang Y, Lang R, Guo S, Luo X, Li H, Liu C, et al. Intestinal microbiota and melatonin in the treatment of secondary injury and complications after spinal cord injury. *Front Neurosci*. 2022;16:981772.
98. Wirth R MG, Vályi P, Komlósi L, Barta N, Strang O, Minárovits J, Kovács KK. Toward Personalized Oral Diagnosis: Distinct Microbiome Clusters in Periodontitis Biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;11:74814.
99. Wirth R, Maróti G, Lipták L, Mester MA, AA , Pap B, Madléna MM, J Kovács, KL. Microbiomes in supragingival biofilms and saliva of adolescents with gingivitis and gingival health. *Oral Dis*. 2021.
100. Dawes C, Dong C. The flow rate and electrolyte composition of whole saliva elicited by the use of sucrose-containing and sugar-free chewing-gums. *Arch Oral Biol*. 1995;40(8):699-705.
101. Hevesi M, Blázovics A, Kallay E, Végh A, Stéger-Máté M, Ficzek G, et al. Biological Activity of Sour Cherry Fruit on the Bacterial Flora of Human Saliva in vitro. *Food Technology and Biotechnology*. 2012;50(1):117-22.

A jelölt saját közleményeinek hitelesített jegyzéke:



**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., Bíróné 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





**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

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.



10. TÁRGYSZAVAK

anthocyanin; fogkefecsérélők; Interleukin-1 β ; Mucin5B; Mucin7; nyál; orális microbiom; orális mikrobióta; savanyú cseresznye; rágógumi; rekolonizáció; tumor nekrosis faktor α

11. 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 *Dr. Bágyi Kinga Ágnes* habilitált 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 felkészülés mellett a kutatásaimhoz a mintavételeket is elvégezhettem. Köszönöm Tanszékvezető Úr és a munkatársak szakmai támogatását.

Köszönöm Dr. Köröskényi Krisztina adjunktus (DE FOK Fogorvosi Biokémiai Tanszék), Oláh Zsuzsanna PhD előadó és Szabó Szabolcs segítségét.

Köszönet illeti a Debreceni Egyetem dolgozóit és volt dolgozóit, akik önkéntesen vállalták, hogy részt vesznek a kutatásban, biztosítva a szükséges mintákat.

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

