

Semmelweis Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Klinika, Budapest*
 Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Budapest**
 Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Egészségügyi Informatikai Fejlesztési
 és Továbbképző Intézet, Budapest***
 Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kórélettani Intézet, Magyar Tudományos Akadémia
 és Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport, Budapest****

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) venulákra kifejtett hatásának vizsgálata patkány fogínyben

DR. GYURKOVICS MILÁN*, DR. LOHINAI ZSOLT*, DR. GYÓRFI ADRIENNE*, DR. SZÉKELY D. ANDREA**,
 DR. DINYA ELEK***, DR. FAZEKAS ÁRPÁD*, DR. ROSIVALL LÁSZLÓ****

Tanulmányukban a szerzők a VEGF akut keringésszabályozó hatásait akarták megismerni patkány fogínyben. Hím Wistar patkányok alsó metszőfogai közti fogíny területére vizsgálati anyagokat cseppentettek. Az itt futó venula érátmérő változását vitálmikroszkópiával obszerválták. Fényképeket készítettek az erről az adott anyag cseppentése előtt, majd a cseppentést követő 1., 5., 15., 30., 60. percben.

A VEGF dóziszfüggő vazodilatációt okozott a venulákon. A 2-es típusú VEGF receptor (VEGFR2) antagonistá ZM323881 önmagában nem okozott szignifikáns érátmérő változást. A ZM323881, illetve a nitrogén-monoxid (NO) szintáz blokkoló L-NAME előkezelés viszont csökkentette a VEGF vazodilatációs hatását. Mérsékelt VEGFR2 specifikus immunjelölést találtak a venulák és az arteriolák falában.

Eredményeik alapján elmondható, hogy bár normál körülmények között nincs jelentős endogén VEGF termelés a patkány fogínyében, de az exogén VEGF-nek szerepe lehet a gingivális vérkeringés fokozásában a 2-es típusú VEGF receptorokon keresztül. Ez a vazodilatációs hatás részben NO felszabaduláson keresztül történik.

Kulcsszavak: VEGF; VEGFR; vazodilatáció; NO

Bevezetés

A VEGF egy 40 kDa súlyú homodimer glikoprotein, mely kulcsszerepet játszik a mikroerek permeabilitásában és az angiogenezisben [1]. Több mint harminc éve ismert. Első leírói *Senger és munkatársai* voltak 1983-ban, akik a VEGF-t mint a tengerimalac hepatocelluláris karcinóma sejtjeiben termelődő proteint írták le [1, 2]. Ezt a proteint vaszkuláris permeabilitási faktornak (VPF) nevezték. Arra a következtetésre jutottak, hogy ez a faktor specifikus regulátora a tumorban lévő véregek permeabilitásának. 1989-ben *Ferrara és Henzel* [3] valamint *Plouet és mtsai.* [4] egymástól függetlenül kimutattak egy endotélsejt-specifikus fehérjét, amelyet VEGF-nek neveztek el. További vizsgálatok során kiderült, hogy a VPF és a VEGF ugyanaz a molekula [4–6].

A VEGF-t a simaizomsejtek, hámsejtek, vérlemezkék, fehérvérsejtek és makrofágok is termelik [7]. A VEGF fokozza az endotélsejtek osztódását, elősegíti az érújdonképződést, részben NO hatásán keresztül kitágítja az ereket és kb. 50000-szer hatásosabban növeli az erek permeabilitását mint a hisztamin [8–20]. Három olyan tirozin-kináz receptort ismerünk, melyhez

a VEGF kötődni képes. Az 1-es típusú receptor a monocita-makrofág rendszer kemotaxisát szabályozza. A 2-es típusú receptor felelős a VEGF sejtosztódást, érújdonképződést, permeabilitást és érátmérőt szabályozó hatásáért, mely utóbbi a mostani vizsgálatnak a fő témája [15, 21]. A 3-as típusú receptor pedig a nyirokrendszer endotélsejtjeinek fejlődését és működését szabályozza [15, 21].

A VEGF expresszió többek között citokinek és a NO hatása alatt áll. Felszabadulása fokozódik sebgyógyulás, tumor növekedés, hipoxia és endotoxinok okozta heveny gyulladás esetén [7, 15, 22, 23]. A VEGF szérumszintje szignifikánsan megnő a különböző daganatok növekedésénél és lezajlott infarktusz után is, mivel a VEGF és a 2-es típusú receptora mind a daganatok expanziójához szükséges, mind az ischémia hatására kialakuló érújdonképződésben lényeges szerepet játszik [23–27]. Azok az ágensek, melyek blokkolják a VEGF jelátviteli folyamatokat, mint például a ZM323881, ami szelektív inhibitora a 2-es típusú VEGF receptornak, a különböző onkológiai vizsgálatoknál ígéretesnek bizonyultak a daganatterápiában [15, 28–33].

Érújdonképződés egészséges fogínyben is történik, de fogínygyulladás fennállásakor jóval fokozottabban zajlik [34, 35]. A VEGF nem csak a gingivitis létrejöttében, de a krónikus parodontitisszé való progressiójában is fontos szerepet játszhat az érhalózat expanzióján keresztül [16, 18, 36, 37]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a VEGF-nak kulcsfontosságú szerepe van a parodontális mikrocirkuláció szabályozásában mind egészséges, mind kóros körülmények között. Emiatt azok a kísérleti kutatások, amelyek a 2-es típusú VEGF receptor lokalizációjával, funkcióival és más molekulákkal (pl.: NO) végbemenő interakcióival foglalkoznak, új terápiás utakat nyithatnak meg mind a szöveti atrófia, mind a parodontitis elleni harcban.

A fogíny venuláiról alig van adat az irodalomban, pedig ennek a vérkeringési szakasznak komoly biológiai jelentősége van. A fehérvérsejtek érfalon való megtapadása, „rolling”-ja, migrációja a posztkapilláris venulák területén zajlik. Ugyanitt történik az érellenállás, az exudáció és a mikrocirkulációs rendszer keringésszabályozása is [38, 39]. Elmondható továbbá az is, hogy a posztkapilláris venulák nagy valószínűséggel fontos szerepet játszanak a folyamatos érújdonképződésben a mikrovaszkuláris pericitákkal együttesen [40].

Jelen tanulmányunk célja az volt, hogy felmérjük a VEGF akut szerepét az érátmérváltozás szabályozásában gyulladásmentes gingiva posztkapilláris venuláin patkányban.

Vizsgálati anyag és módszer

Állat modell a fogíny venuláinak intravitálmikroszkópos vizsgálatához

Az állatokon folytatott vizsgálatunk protokollját a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyta (48/1999). 63 db hím Wistar patkányt (300 ± 37 g) véletlenszerűen öt csoportra osztottunk az alkalmazott vizsgálati anyagoknak megfelelően. Minden esetben 10 µl-t cseppentettünk ezek oldatából az alsó metszők közötti foghús centrális papillájára. Az öt csoport az alábbi kezelésben részesült: 1) kontroll csoport (fiziológiás sóoldat, n=7); 2) VEGF (Recombinant Rat VEGF164, catalog #564-RV/CF, R&D Systems, Minneapolis, MN.) 0,1 (n=7); 1 (n=7); 10 (n=7) és 50 (n=7) µg/ml, ez a csoport szolgált a dózishatásgörbe felállításához is; 3) 2-es típusú VEGF receptor antagonistá ZM323881 (5-((7-benziloxiquinazolin-4-yl)amino)-4-fluoro-2-metilfenolhidrochlorid; a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán szintetizálták; 20 µg/ml) cseppentése és hatásának vizsgálata önmagában (n=7) [33]; illetve 4) ZM323881 cseppentése, majd 15 perccel később VEGF (50 µg/ml, n=7) applikálása; és 5) 1 hétig NO-szintáz gátló (N_G-nitro-L-arginine-metil-észter [L-NAME]; L-NAME, CAS #51298-62-5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.; 1 mg/ml az ivóvízben, ad libitum) itatása, majd VEGF (10 µg/ml, n=7) vagy fiziológiás sóoldat (n=7) cseppentése [41].

A vizsgálati állatot ip. Na-pentobarbital segítségével elaltattuk (Nembutal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.; 0,5 ml/tskg; 6 m/m%), majd patkánypadon rögzítettük a fejét és a végtagjait. Tracheostomia után tubust vezetünk be a szabad légutak fenntartása érdekében. Az alsó ajkat kifordítottuk és a kétoldali nyaki területhez varratokkal rögzítettük, hogy közvetlen rálátást nyerjünk a mandibula frontális területére. A bal oldali arteria femoralisba kanült helyeztünk a szisztémás vérnyomás méréséhez (Haemosys, Experimetria, Budapest). A rectalis hőmérsékletet digitális hőmérő segítségével mértük és egy visszacsatolással működő, az állat alá helyezett elektromos fűtőpárna segítségével tartottuk konstansan. Transzmissziós fénymikroszkópot (Nikon SMZ-1B, Nikon, Tokyo, Japán, 72x-es nagyítás) használtunk az alsó metszők melletti labialis gingiva megfigyeléséhez. A jobb láthatóság érdekében a területet hidegfénnyel világítottuk meg (Intralux 5000, Volpi, Schlieren, Switzerland). Meghatároztuk a véráramlás irányát, ami ha az erek egyesülése és a nagyobb átmérők felé mutat, akkor a vénás rendszerre utal. Ennek alapján kiválasztottuk a mérésekhez felhasználandó posztkapilláris venulát (átmérő: 25–60 µm). Minden esetben megpróbáltuk ugyanazt a karakteres eret vizsgálni, mely ezen a területen fordul a mélybe. Ezt a venulát a papilla incisiva csúcsa és az áthajlás között félúton lehet megtalálni. A vizsgálati anyagokat mikrofecskendő segítségével jutattuk az ér fölé (Hamilton syringe, Hamilton, Reno, NV.), mely lehetővé tette rendkívül pontos kis adagok (10 µl) felszívását és kicseppentését. Annak érdekében, hogy a vizsgált területet a nyáltól izoláljuk, továbbá a cseppentett anyag felhígulását elkerüljük, a megfigyelt területet mindig úgy állítottuk be, hogy a szájüregben belül ez legyen a legmagasabb pont. A kiválasztott venulát a mikroszkóphoz csatlakoztatott digitális fényképezőgépen (Nikon Coolpix 950, Nikon, Tokyo, Japán; 3x-os optikai nagyítás) keresztül figyeltük meg. Felvételeket készítettünk a vizsgálati anyag cseppentése előtt, majd a cseppentés utáni 1., 5., 15., 30. és 60. percben. Az egyes felvételek között a megfigyelt területet alufóliával letakartuk, valamint minden egyes felvétel elkészítése előtt 1 perccel (kivéve 0. és 1. perc) testhőmérsékletű fiziológiás sóoldatot cseppentettünk a kiszáradás elkerülése érdekében mind a vizsgálati, mind a kontroll csoportoknál. Az erek külső átmérőjét számítógépes szoftver segítségével határoztuk meg (UTHSCSA ImageTool for Windows v3.00, The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX). Egy hitelesített 100 µm-es beosztású mércét használtunk a pixel értékek mikrométerre történő átszámításához. A kiértékelést végző személy (Gy. M.) előtt nem volt ismert, hogy melyik csoportba tartozó képeket analizálja. A mérési hibák mennyiségének csökkentése érdekében a kiértékelést végző személy először a 100 µm-es beosztású mércén gyakorolt ugyanazzal a nagyítással, mint amit a vizsgálat során is használtunk. Az átlag és a SEM értékeket a mérce két beosztása között végzett 10 db, egy-

mást követő mérés után számoltuk ki. A mérési technikát akkor tartottuk megfelelőnek, ha a SEM érték kisebb volt, mint 0,5.

Immunhisztokémiai vizsgálat

A vítmikroszkópos megfigyelések után az első csoport állatainak alsó metszők közötti fogínyszövetét immunhisztokémiai vizsgálat céljából kimetsztük. Az így nyert szövetdarabokat paraffinba ágyasztuk, majd ebből 12 µm vastagságú szeleteket készítettünk és ezeket tárgylemezre helyeztük. A metszeteket rehidráltuk és egy éjszakára szobahőmérsékleten nyúl eredetű VEGFR2 elleni antitesttel reagáltattuk (VEGF Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb, Cell Signaling, Danvers, MA., hígítás: 1:20 0,01 M foszfát pufferolt fizioológias sóoldat [PBS] segítségével). PBS-tal történő rövid öblítés után a metszeteket másodlagos, nyúl ellenes antiszérummal kezeltük (1:50, Immpress, Vector, Burlingame, CA.). Az immunreakciót a diaminobenzidine barna színű kicsapódása tette láthatóvá (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Kontrollnak a primer antitest vagy a szekunder antiszérum önmagában alkalmazva szolgált. Ezután a metszeteket hematoxylinnal megfestettük és fixáltuk (DePeX, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA.), majd lefényképeztük a fénymikroszkóphoz csatlakoztatott fényképezőgép segítségével (Olympus Vanox, Olympus, Tokyo, Japán).

Statisztikai analízis

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

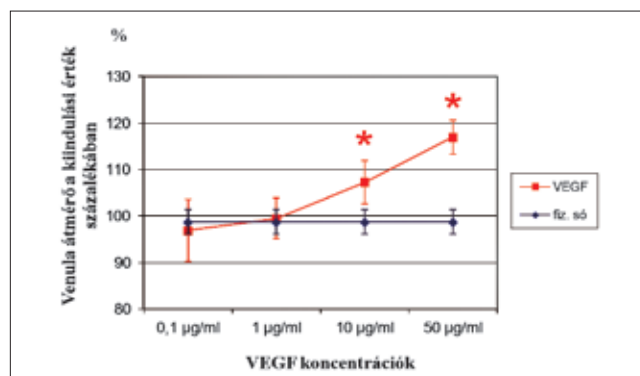
Eredmények

Egyik VEGF, illetve ZM323881 oldat sem változtatta meg szignifikánsan a szisztémás vérnyomást (kiindulás: $125/85 \pm 8$ mmHg). Dózishatásgörbénk (1. ábra) felállítása során megállapítottuk, hogy a kontrollként használt fizioológias sóoldat és a 0,1, valamint 1 µg/ml-es VEGF oldatok nem okoztak szignifikáns érátmérő változást a vizsgálat ideje alatt. A 10 és 50 µg/ml-es VEGF oldat viszont szignifikánsan dilatálta a gingivalis venulákat az alkalmazás utáni 5. és 15. percben (1. és 2. csoport). (2. ábra)

ZM323881 önmagában történő alkalmazása sem okozott semmilyen szignifikáns érátmérő változást (3. csoport) a kontrollként használt fizioológias sóoldathoz viszonyítva (1. csoport). (3. ábra)

Másrésről viszont ZM323881-vel történő előkeze-

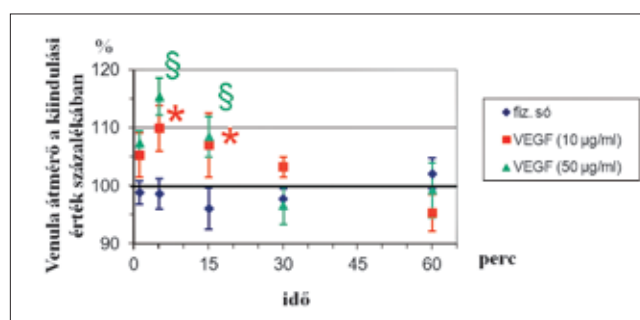
lés kivédte a VEGF vazodilatációs hatását (4. csoport). (3. ábra)



1. ábra. Fogíny-venula átmérőjének változása a különböző VEGF koncentrációk függvényében (dózishatásgörbe).

Az ábrán szemléltetésképpen a kísérleteinkben legszignifikánsabbnak bizonyult 5. perc értékeit ábrázoltuk a különböző koncentrációknak megfelelően. Referenciaként minden érték mellé felvettük az 5. perchez tartozó fizioológias só értéket is (ezért ez egy konstans érték).

A 10 és 50 µg/ml koncentrációk szignifikáns vazodilatációt okoztak a kontrollhoz képest (* $p < 0,05$; átlag ± SEM, $n=7$ mindegyik koncentrációnál).



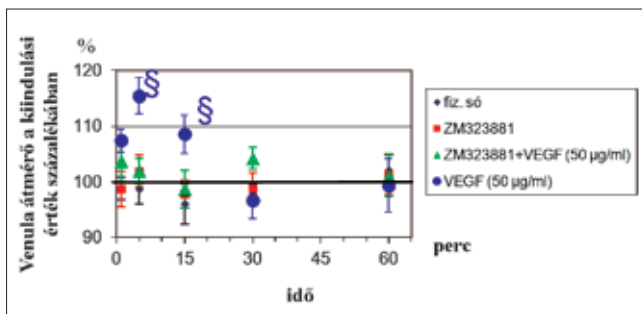
2. ábra. Venula érátmérőjének változása VEGF kezelés hatására a kiindulási érték százalékában, az idő függvényében.

A VEGF oldatot az alsó metszőfogak közötti fogínyre csepegtettük. Mindkét koncentrációval szignifikáns vazodilatációt tapasztaltunk az applikálást követő 5. és 15. percben a kontroll fizioológias sóoldathoz képest (*, § $p < 0,05$, a kontrollhoz képest; Fisher LSD; átlag ± SEM, $n=7$ mindegyik koncentrációnál).

L-NAME-rel történő előkezelés szignifikánsan megnövelte a szisztémás vérnyomást ($155/120 \pm 12$ mmHg), és csökkentette a venulák bazális átmérőjét a kontroll csoporthoz viszonyítva (L-NAME előkezelés: 35 ± 2 mm, kontroll csoport: 44 ± 2 mm). Az L-NAME előkezelés után használt vizsgálati anyagok nem változtatták meg a szisztémás vérnyomást. Az L-NAME előkezelés nemcsak kivédte a 10 µg/ml VEGF vazodilatációs hatását, de még vazokonstriktiót is okozott a kontrollhoz képest (5. csoport). (4. ábra)

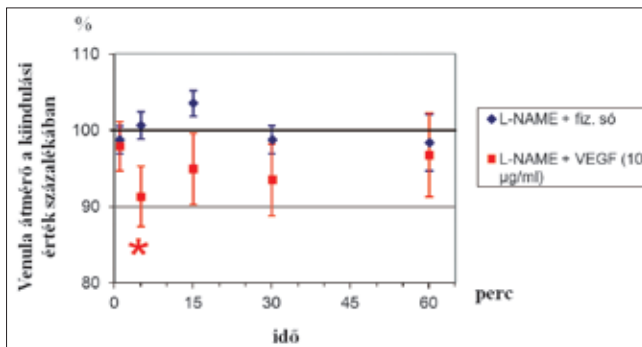
A gingivális arteriolák és venulák fala mérsékelt VEGFR2 specifikus immunpozitivitást mutatott. Immunreaktív kicsapódást figyeltünk meg az endotélium területén, az érfal legbelső rétegében (5. ábra), ahol a sejtmagok általában az ér hossz tengelyével páru-

zamosan helyezkednek el. Ehhez hasonló, ám gyengébb, pontszerű immunpozitivitást figyeltünk meg a következő rétegben, melyet simaizomsejtek képeztek az



3. ábra. Fogíny venula átmérőjének változása VEGFR2 blokkolása után az idő függvényében.

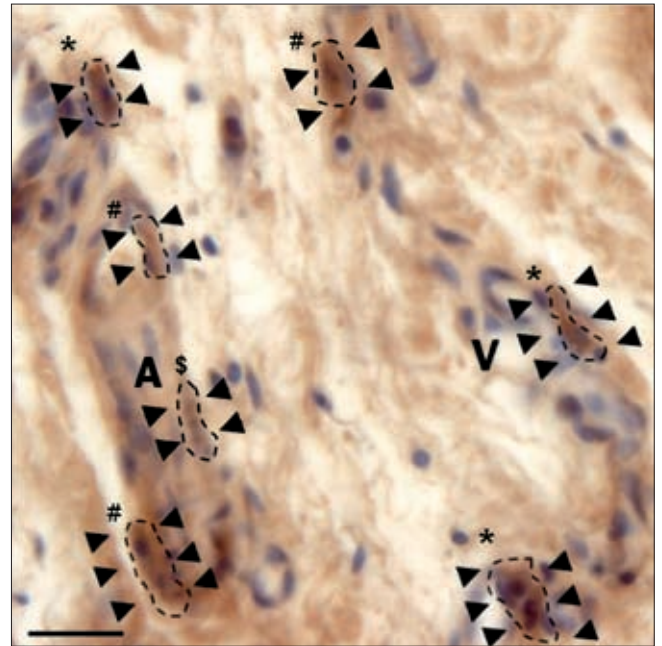
Sem az önmagában alkalmazott VEGFR2 blokkoló ZM323881 (20 µg/ml, n=7), sem a ZM323881 alkalmazását követő VEGF (50 µg/ml, n=7) applikálás nem hozott létre szignifikáns érátmérő változást. Jól látszik a különbség a blokkolás nélküli VEGF cseppentéséhez képest, mellyel – a 2. ábrán már bemutatott módon – az applikálást követő 5. és 15. percben szignifikáns vazodilatációt tapasztaltunk. Szemléltetés végett a fiziológiás sóoldathoz és az 50 µg/ml-es VEGF cseppentéshez tartozó értékeket is ábrázoltuk a grafikonon (§ p<0,05; Fisher LSD; átlag±SEM).



4. ábra. Fogíny venula átmérőjének változása lokálisan alkalmazott VEGF, illetve fiziológiás sóoldat hatására az idő függvényében 1 mg/ml nitrogén-monoxid szintáz blokkolóval (L-NAME) történő 1 hetes előkezelés után.

Az L-NAME-t a vizsgálati állatok ivóvizében oldottuk fel, melyből *ad libitum* fogyasztottak a vizsgálat előtt 1 hétig. A lokálisan cseppentett anyagok: fiziológiás sóoldat (n=7) vagy 10 µg/ml VEGF (n=7). Szignifikáns vazokonstriktiót mértünk a VEGF applikálását követő 5. percen a kontrollhoz viszonyítva (* p < 0,05; Fisher LSD; átlag ± SEM). Bár a 15. percen is vazokonstriktiót tapasztaltunk, statisztikailag azonban ez nem volt szignifikáns (t15: p=0,0568).

endotélsejtek körül. Jól megfigyelhető ebben a rétegben a simaizomsejtek keresztmetszete. (5. ábra) Az izomréteg mellett található periciták némelyike szintén VEGFR2 immunreaktivitást mutatott. (5. ábra) A kontroll metszeteknél, ahol vagy a primer vagy szekunder antiszérumot alkalmaztuk, nem volt specifikus immunreakció az arterioláknál és a venuláknál sem (nem mutatjuk).



5. ábra. VEGFR2 receptorok lokalizációja az alsó metszőfogak közötti patkány foghúsban.

Figyeljük meg a barna színű immunhisztokémiai festődést az érfa- (A) és simaizomsejtek (S) körül! A VEGFR2 immunjelöléssel specifikusan festődött endotél- (#) és simaizom sejteteket (\$) is felfedezhetünk a fogíny kisereinek falában. Néhány pericita (*) szintén immunreaktivitást mutatott. A – kis artéria/arteriola, V – kis véna/venula, mércé: 50 µm.

Megbeszélés

Tanulmányunkban a VEGF egészséges fogínyszövetre kifejtett akut venoregulációs hatását vizsgáltuk. Ennek során a gingivális venulák érátmérő változását mértük különböző, lokálisan cseppentett vazoaktív oldatok hatására. Az oldatainkat közvetlenül a fogínyre cseppentettük, hogy elkerüljük a szisztémás adagolással járó mellékhatásokat, melyek akarunk ellenére befolyásolhatták volna eredményeinket. Vizsgálati eljárásunk azt az élet-, illetve kórtani mechanizmust modellezte, amikor *in vivo* megnő a lokális VEGF koncentráció. Ez létrejöhet többek között rosszindulatú daganatok, sebgyógyulás és gyulladás esetén is [21, 42–44]. A VEGF szabályozó szerepe a parodontális szövetekben még nem tisztázott, a jelenlegi irodalmi adatok nagy része inkább csak a különböző patológiás körülmények esetén fellépő expresszió növekedését írja le [11, 16, 18, 35, 37]. A fogínyben mért VEGF szint a 2-es típusú diabéteszsel rendelkező pácienseknél szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest [18]. Továbbá szignifikánsan magasabb VEGF koncentrációt mértek gyulladt parodontális szövetekben és a krónikus parodontitis gyógyulásakor is [11, 16]. A mi munkacsoportunk is vizsgálta a VEGF és 2-es típusú receptorának szerepét különböző patológiás állapotokban. Megállapítottuk, hogy mind fogínygyulladás, mind pedig diabétesz esetén jelentős a helyi VEGF termelés a fogínyben, továbbá míg előbbi esetben az érfa összes sejtje szignifi-

káns VEGFR2 expressziót mutatott, addig diabétesz esetén leginkább az erek melletti hízósejtek mutattak szeropozitivitást [45, 46]. Jelen vizsgálatunkban normál állapotú fogínyben tanulmányoztuk a felületesen futó venulák lokálisan alkalmazott VEGF oldat hatására létrejövő vazodilatációját patkányban, az idő és a dózis függvényében. Kimutattuk, hogy a lokálisan alkalmazott VEGF szignifikánsan megnövelte a gingivális venulák átmérőjét mind a kiindulási állapothoz, mind a kontrollhoz viszonyítva. Más tanulmányok [9, 47] is beszámoltak a VEGF szájüregi vazodilatációs hatásáról. A VEGF által kifejtett vazodilatációs hatást hörcsögök pofazacs-kójának nyálkahártyáján vizsgálták, a venulákon kifejtett hatást azonban nem vették figyelembe. Ebben a kutatásban már igen alacsony koncentrációjú VEGF (10^{-9} M) adásával is szignifikáns vazodilatációt mutattak ki az arteriolákon [9]. Ezzel szemben kísérleteinkben a patkány fogíny venulákon csak a $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációnál nagyobb koncentrációjú anyag lokális cseppentése esetén mértünk szignifikáns vazodilatációt. Az eltérés oka az alkalmazott protokollok közötti különbség lehet, mivel a lokális adagolásunknak diffúziós és metabolikus korlátai is vannak más beadási módokhoz képest. További ok lehet még a VEGF receptorok számának különbsége is az arteriolák és venulák között, illetve a fajok között.

További kísérleteinkben a VEGFR2 szelektív antagonistája, a ZM323881 bár önmagában nem okozott venula átmérő változást, de ugyanakkor a külsőleg adagolt VEGF vazodilatációs hatását sikeresen kivédte. Ezek az adatok azt sugallják, hogy normál körülmények között nincs jelentős endogén VEGF felszabadulás a patkány fogínyben, mindazonáltal a külsőleg adott VEGF képes venodilatációt okozni a funkcionálisan aktív VEGFR2 receptorokon keresztül. Immunhisztokémiai megfigyelésünk azt mutatja, hogy az endotéliumon a simaziomsejeken és a pericitákon megtalálhatóak ezek a 2-es típusú VEGF receptorok, melyek mérsékelt mennyiségük ellenére jelentős hatásúaknak tűnnek. Ezt támasztja alá, hogy a VEGFR2 receptorok szelektív inhibitorral történő blokkolása által teljesen kivédett VEGF vazodilatációs hatás a mi vizsgálati körülményeink között csak a 2-es típusú VEGF receptorokon keresztül mehetett végbe. Az akut mikrocirkulációs hatásain kívül a venulák falában található VEGFR2 és a periciták, illetve simaziomsejtek által termelt VEGF az érújdonképződésben és az erek stabilizálásában is szerepet játszhat [48-50].

A NO-szintáz blokkoló L-NAME előkezeléssel az volt a célunk, hogy tisztázzuk a NO-nak mint mediátornak az esetleges szerepét a VEGF okozta venodilatációban. Az előkezeléssel nem szerettünk volna további akut kompenzációs mechanizmusokat aktiválni az ínyben, ezért választottuk a NO-szintáz antagonistá 1 hetes ivóvízzel történő előzetes adagolását. Az L-NAME előkezelés szignifikánsan megnövelte az artériás középnyomást és lecsökkentette a venulák átmérőjét a kontroll csoporthoz képest. Ezek az eredmények

alátámasztották korábbi megfigyeléseinket, miszerint a gingivális erekben folyamatos NO felszabadulás zajlik nyugalmi körülmények között, mely részt vesz a bazális cirkuláció fenntartásában [51]. Jelen tanulmányunkban az L-NAME előkezelés nem csak kivédte a venodilatációs hatását a VEGF-nek, hanem meglepő módon a csökkent vazodilatáció helyett vazokonstriktió lépett fel VEGF adása után. Ez azt sugallja, hogy a VEGF okozta venodilatációs hatást is legalább részben az endotélium eredetű NO-produkció közvetíti. Továbbá igen valószínű, hogy az L-NAME előkezelés hatására felbomlik a VEGF következtében kialakuló vazodilatációs (NO) és vazokonstriktió (pl.: szuperoxid) mechanizmusok közötti egyensúly és ezáltal jön létre a venokonstriktió túlsúly [47].

Következtetések

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy funkcionálisan aktív VEGFR2 receptorok találhatóak a patkány fogíny venuláiban. Bár normál körülmények között nincs jelentős endogén VEGF termelés a fogínyben, a kívülről bejuttatott VEGF a 2-es típusú receptorokon keresztül képes dilatációt okozni a venulákon, ezáltal csökkentve a gingivális vaszkuláris rezisztenciát. Továbbá az endotélium eredetű NO valószínűleg részt vesz a VEGF okozta vazodilatációs mechanizmusban.

Köszönetnyilvánítás

Gyurkovics és Lohinai doktorok egyenlő mértékben járultak hozzá a publikáció elkészítéséhez, ezért mindketten első szerzőnek tekintendők. A szerzők köszönetüket fejezik ki a támogatóiknak: OTKA (T042584, T049708, és AT048767); ETT (104/2006); MinDent 1987 kft, Budapest, és Prof. Hubert N. Newmannak (Emeritus Professor, University College London; Emeritus Professor of Periodontology and Preventive Dentistry, University of London, London, United Kingdom) a szakértő konzultációjáért, valamint külön köszönik egykori tudományos diákköröseik: Nagy Izabella és Váry Melinda segítségét. Jelen cikk alapját a kutatócsoportunk által a *Journal of Periodontology*-ban 2009-ben publikált tanulmányunk szolgáltatta (Gyurkovics M, Lohinai Z, Gyorfi A, Iványi I, Süveges I, Kónya M, Bodor C, Székely AD, Dinya E, Fazekas A, Rosivall L. Venodilatory effect of vascular endothelial growth factor on rat gingiva. *J Periodontol.* 2009 Sep;80(9):1518-23).

Irodalom

1. SINGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.
2. FERRARA N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527-543.
3. FERRARA N, HENZEL WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858.

4. PLOUET J, SCHILLING J, GOSPODAROWICZ D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AIT-20 cells. *EMBO J* 1989; 8: 3801–3806.
5. KECK PJ, HAUSER SD, KRIVI G, SANZO K, WARREN T, FEDER J, ÉS MTSAI: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309–1312.
6. LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDEL DV, FERRARA N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306–1309.
7. PICKKERS P, SPRONG T, EIJK L, HOEVEN H, SMITS P, DEUREN M: Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock* 2005; 24: 508–512.
8. ABMAN SH.: Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology* 2007; 91: 283–290.
9. ARAMOTO H, BRESLIN JW, PAPPAS P J, HOBSON RW, 2ND, DURAN WN: Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1590–1598.
10. CETINKAYA BO, ACIKGOZ G, AYAS B, ALIYEV E, SAKALLIOGLU EE: Increased expression of vascular endothelial growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol* 2006; 77: 54–60.
11. CETINKAYA BO, KELES GC., AYAS B, SAKALLIOGLU EE, ACIKGOZ G: The expression of vascular endothelial growth factor in a rat model at destruction and healing stages of periodontal disease. *J Periodontol* 2007; 78: 1129–1135.
12. DVORAK AM., FENG D: The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 419–432.
13. ERIKSSON A, CAO R, ROY J, TRITSARIS K, WAHLESTEDT C, DISSING S, ÉS MTSAI: Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability. *Circulation* 2003; 107: 1532–1538.
14. FERNANDEZ M, MEJIAS M, ANGERMAYR B, GARCIA-PAGAN JC, RODES J, BOSCH J: Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005; 43: 98–103.
15. FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–676.
16. JOHNSON RB, SERIO FG, DAI X: Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 848–852.
17. ROBERTS WG, PALADE GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 6): 2369–2379.
18. SAKALLIOGLU EE, ALIYEV E, LUTFIOGLU M, YAVUZ U, ACIKGOZ G: Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of gingiva and gingival crevicular fluid in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. *Clin Oral Investig* 2007; 11: 115–120.
19. WEIS SM, CHERESH DA: Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437: 497–504.
20. ZACHARY I: Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1375–1386.
21. OLSSON AK, DIMBERG A, KREUGER J, CLAESSON-WELSH L: VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359–371.
22. BOUSSAT S, EDDAHBI S, COSTE A, FATACCIOLI V, GOUGE M, HOUSSET B, ÉS MTSAI: Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L371–378.
23. SLEVIN M, KRUPINSKI J, SLOWIK A, KUMAR P, SZCZUDLIK A, GAFFNEY J: Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1863–1870.
24. BEN ARUSH MW, BEN BARAK A, MAURICE S, LIVNE E: Serum VEGF as a significant marker of treatment response in hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2007; 24: 111–115.
25. SHANG ZJ, LI J. R, LI ZB: Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65: 17–21.
26. SLOMIANY MG, BLACK LA., KIBBEY MM, DAY TA, ROSENZWEIG SA.: IGF-1 induced vascular endothelial growth factor secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 851–858.
27. YEO KT, WANG HH, NAGY JA, SIOUSSAT TM, LEDBETTER SR, HOOGWERF AJ, ÉS MTSAI: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in guinea pig and human tumor and inflammatory effusions. *Cancer Res* 1993; 53: 2912–2918.
28. DREVS J, SIEGERT P, MEDINGER M, MROSS K, STRECKER R, ZIRRGIEBEL U, ÉS MTSAI: Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3045–3054.
29. HO QT, KUO CJ: Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1349–1357.
30. MANLEY PW, BOLD G, BRUGGEN J, FENDRICH G, FURET P, MESTAN J, ÉS MTSAI: Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697: 17–27.
31. MANNING EA, ULLMAN JG, LEATHERMAN JM, ASQUITH JM, HANSEN TR, ARMSTRONG TD. ÉS MTSAI: A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3951–3959.
32. ROBERTS N, KLOOS B, CASSELLA M, PODGRABINSKA S, PERSAUD K, WU Y. ÉS MTSAI: Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006; 66: 2650–2657.
33. ZM323881 material sheet. Available at: <http://www.tocris.com/disprod.php?ItemId=156230>. Accessed: 21.01., 2013.
34. BONAKDAR MP, BARBER PM, NEWMAN HN: The vasculature in chronic adult periodontitis: a qualitative and quantitative study. *J Periodontol* 1997; 68: 50–58.
35. DEGIDI M, ARTESE L, SCARANO A, PERROTTI V, GEHRKE P, PIATTELLI A: Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol* 2006; 77: 73–80.
36. ORSINI G, MURMURA G, ARTESE L, PIATTELLI A, PICCIRILLI M, CAPUTI S: Tissue healing under provisional restorations with ovate pontics: a pilot human histological study. *J Prosthet Dent* 2006; 96: 252–257.
37. PRAPULLA DV, SUJATHA PB., PRADEEP AR: Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007; 78: 1783–1787.
38. MIAN R, MARSHALL JM: Effect of acute systemic hypoxia on vascular permeability and leucocyte adherence in the anaesthetised rat. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1531–1537.
39. VENTURI GM., TU L, KADONO T, KHAN AI, FUJIMOTO Y, OSHEL P. ÉS MTSAI: Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 2003; 19: 713–724.
40. DIAZ-FLORES L, GUTIERREZ R. VARELA H: Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. *J Morphol* 1992; 213: 33–45.
41. HORTOBAGYI L, KIS B, HRABAK A, HORVATH B, HUSZTY G, SCHWEER H. ÉS MTSAI: Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent of vasodilator prostanoids. *Brain Res* 2007; 1131: 129–137.
42. ABLONCZY Z, CROSSON CE: VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res* 2007.
43. CHEN Z, MALHOTRA PS, THOMAS GR, ONDREY FG, DUFFEY DC, SMITH CW, ÉS MTSAI: Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1369–1379.
44. SVENSEN CH: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in plasma increases after hip surgery. *J Clin Anesth* 2004; 16: 435–439.

45. GYURKOVICS M, LOHINAI Z, GYORFI A, BODOR C, FAZEKAS A, NYARASDY I, ÉS MTSAI: Gingival venule diameter is regulated through the increased VEGF expression in experimental diabetes. *Acta Physiologica Hungarica* 2010; 97: 104–105.
46. GYURKOVICS M, LOHINAI Z, GYORFI A, BODOR C, SZEKELY AD, DINYA E, ÉS MTSAI: Microvascular regulatory role and increased expression of vascular endothelial growth factor receptor type 2 in experimental gingivitis. *J Periodontal Res* 2013; 48: 194–202.
47. SUDA O, SMITH L. A, D'USCIO LV, PETERSON TE, KATUSIC Z S: In vivo expression of recombinant vascular endothelial growth factor in rabbit carotid artery increases production of superoxide anion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 506–511.
48. BALE TL, GIORDANO FJ, HICKEY RP, HUANG Y, NATH AK, PETERSON K L, ÉS MTSAI: Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7734–7739.
49. DARLAND DC, MASSINGHAM LJ, SMITH SR, PIEK E, SAINT-GENIEZ M, D'AMORE PA: Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol* 2003; 264: 275–288.
50. YAMAGISHI S, YONEKURA H, YAMAMOTO Y, FUJIMORI H, SAKURAI S, TANAKA N, ÉS MTSAI: Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* 1999; 79: 501–509.
51. LOHINAI Z, SZABO C: Role of nitric oxide in physiology and pathophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit* 1998; 4: 1089–1095.

GYURKOVICS M, LOHINAI Z, GYÖRFI A, SZÉKELY DA,
DINYA E, FAZEKAS Á, ROSIVALL L

Investigation of the venodilatory effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat gingiva

VEGF induces proliferation of endothelial cells, stimulates angiogenesis, and increases vascular permeability in many organs. Nevertheless, we have only limited information about its role on gingival hemodynamics, especially in venules. Therefore the aim of this study was to assess the acute circulatory effects of VEGF on rat gingival venules by means of the following protocol.

Wistar rats (n=63) were divided into five study groups after anesthesia; each animal received 10 µl of experimental solution dripped onto the lower interincisal gingiva. The groups included: 1) saline control (after the experiment, gingiva was excised for VEGF receptor 2 [VEGFR2] immunohistochemistry); 2) VEGF (0.1, 1, 10, or 50 µg/ml); 3) VEGF2 receptor antagonist 5-((7-benzyloxyquinazolin-4-yl)amino)-4-fluoro-2-methyl-phenol-hydrochloride (ZM323881; 20 µg/ml); 4) ZM323881 (20 µg/ml) followed by VEGF application (50 µg/ml after 15 minutes); and 5) VEGF (10 µg/ml), these rats were premedicated with nitric oxide (NO) synthase blocker (NG-nitro-L-arginine-methyl-ester [L-NAME]; 1 mg/ml in drinking water) for 1 week before the experiment. Changes in gingival superficial venule diameter were measured by vital microscopy prior to and 1, 5, 15, 30, and 60 minutes after the administration of the experimental solutions.

According to our findings, VEGF dose-dependently increased the venular diameter compared to saline. ZM323881 alone did not cause any alteration. Premedication with ZM323881 or L-NAME decreased the dilatory effects of VEGF. Occasionally moderate VEGFR2 immunohistochemical labeling was observed in the wall components of the venules. Concluding our results we can say, that there is no remarkable VEGF production under physiologic circumstances in rat gingiva, but VEGF is able to increase gingival blood flow through the activation of VEGF2 receptors and consequent NO release.

Key words: VEGF; VEGFR; vasodilation; NO