A SZÖVETI REGENERÁCIÓ EXPERIMENTÁLIS VIZSGÁLATA

A SZÁJNYÁLKAHÁRTYA,- ÉS CSONTSZÖVET-REGENERÁCIÓ VIZSGÁLATA ÁLLAT MODELL RENDSZEREKBEN

DOKTORI TÉZISEK

Blazsek József dr.

SEMMELWEIS EGYETEM DOKTORI ISKOLA

KLINIKAI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
FOGORVOSTUDOMÁNYI KUTATÁSOK

ORÁLBIOLÓGIAI TANSZÉK

Témavezető
Dr. Varga Gábor
egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság
Elnök: Dr. Barabás József egyetemi tanár
Tagok: Dr. Orosz Mihály egyetemi tanár
Dr. Nagy Gábor egyetemi tanár
Dr. Kelentey Barna egyetemi adjunktus

A házi védés bírálói
Dr. Simon György ny.egyetemi tanár
Dr. Dobó Nagy Csaba egyetemi docens

Az értekezés bírálói
Dr. Nemeskéry Ágnes egyetemi docens
Dr. Tímár József egyetemi tanár

Budapest - 2008

BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉSEK

Az élet egyik princípiuma a szervezetek védelmi képessége. A testfelszín védelmi rendszerének kiemelt tényezője a nyálkahártya kompakt záró rétege. Az orális funkciók során, ezen a záró rétegen, akár százas nagyságrendben is keletkeznek mikrosérülések és gyakoriak a kiterjedt patológiás nyálkahártya-eróziók is. A szervezet felé irányuló káros (mikrobiális, antigenikus, toxikus, stb.) inváziós támadások kivédésének esélyét a seb-kapu mielőbbi záródása alapvetően meghatározza. Az epithel sejtréteg gyors záródása olyan mikrosérülések esetén, ahol nincs vérzés, kiemelt életfontosságú, mert nem számíthatunk a vér sejtes elemeinek, záró barrierjére. Ebben a rendszerben alapvető, nyál komponens, az Epidermális Növekedési Faktor (EGF), mely az epitheliális sejtek proliferációját, differentációját, vagyis a gyors regenerációját potencírozza.

Az EGF termelés experimentális modellkísérleteit és a humán nyál EGF tartalmának vizsgálatait laboratóriumunkban a 90-es években indítottuk. Az EGF szájüregi jelenlétének jellemzésével részleges és teljes nagynyálmirigy eltávolítást (ablációt) követően két közleményünkben számoltunk be. Ezen korai adatainkat azóta sem cáfolta irodalmi adat, megerősítése mellett pedig szól, hogy humán patológiás kisnyálmirigyekben kimutatták az EGF és receptorának termelődését.

A nyálmirigyek EGF szekréciója a lumen felé irányul, amint azt mutatják azok a vizsgálatok, melyek szerint adrenerg agonisták a nyál EGF koncentrációját néhány százszorosára növelik, miközben a plazma EGF szintje nem változik. A gasztrointesztinális traktusban elváltozást kiváltó patológiás eseteknél (alkohol, dohányzás), károsodás függő EGF termelődésről számoltak be, mely utalhat bizonyos szöveti faktorok szerepére az EGF termelés szabályozási rendszerében

Ha patkányban eltávolítjuk a submandibuláris nyálmirigyet – mely rágcsálókban az EGF termelési és tárolási helye – a gl. Parotisban funkcionális hipertrófiás-hiperpláziás kompenzáció jön létre, megemelkedik a H^+-ion reflux az intestinális nyálkahártyán, és nő a fekélyképződés. A gl. submandibuláris irtott (ablatio) egereknél ivóvízben adagolt EGF (1 μg/ml) helyreállítja a sebgyógyulás normális ütemét. Intraperitoneális EGF kezelés (10 μg/kg i.p. napi 2x - 3 napig) növeli a nyál amylase aktivitását, miközben paralel csökken az amylase tartalom gl. parotisban. RNA reverz transzkriptáz PCR-el elemezve a mirigyszövetet cDNS 576bp amylase-derivátum produktummal, az EGF kezelt állatokban 18-szorosra fokozódott az amylase mRNS szint a kontrollhoz képest. Ez az EGF termelődés szöveti kompartmentjein túli hatásmechanizmusokat is feltételez.

Nincsenek pontos adataink, mely sejttípusok termelik a nyál EGF-et. Eddig patkány gl. submandibulárisban a granuláris convolúciós tubulusok sejtjeiben (GCT cells) mutattak ki EGF termelés, ahol nagyon gazdag az adrenerg beidegzés. Egérben és patkányban noradrenalin adással emelni lehet mind a nyál, mind a plazma EGF koncentrációját mely hatás alfa-adrenerg receptoron mediálódik. Korábbi vizsgálataink és az irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a paralel nyálmirigypárok eltávolítása (sialoadenectomia, abláció) után a megmaradt mirigyek funkcionális aktivitásfokozódással (hypertrófia és hyperplázia), bizonyos kompenzálásra képesek a mirigyfunkció, vagyis a nyálelválsztás terén. Nem ismert, hogy ez a mirigykompenzáció létre jön-e az EGF produkció terén is, de lehetőségét nem zárhatjuk ki az epithel

sejtekre kifejtett hatás alapján. Ennek humán viszonylatban is számos esetben lehet jelentősége. A különböző okból (tumor, baleset, fertőzés) kieső nyálmirigytermelés esetén van-e esély az EGF kompenzációra, mely a napi több száz szájnyálkahártya mikrosérülés regenerációját - fertőzési kapuként tekintve - életfontosságú lehet.
Kísérleteink első részében (A1) erre a kérdésre kerestünk választ, az állatok gl. submandibuláris-sublingualis eltávolítása (részleges abláció) után kialakuló gl. Parotis kompenzációs megnagyobbodása vonatkoztatható-e az EGF termelés és szekréció kompenzációjára is.

Míg a szinte folyamatos rágást produkáló rágcsálókban az EGF termelésének döntő forrása a submandibularis nyálmirigy, addig emberben főleg rágáskor, a mikrosérülések keletkezése idején, a parotis nyál szekrétumában mutatható ki nagy mennyiségü EGF. Ez a praktikus eltérés számos kérdést vet fel: a) vajon a fő termelési helyek mennyire plasztikusak, van-e nagynyálmirigyen kívül EGF termelés, b) lesz-e nyálban EGF ha a fő képzőhelyéül szolgáló nyálmirigyet(eket) elveszítjük, c) lehet-e a nagy nyálmirigyek nélkül EGF-re számítani a szájnyálkahártya regenerációban?

Dolgozatom következő részében (A2) olyan vizsgálatokat, és egy új sajátfejlesztésű kísérleti módszert - teljes nagynyálmirigy abláció, „experimentális kisnyálmirigy vizsgálat" - mutatok be, mely az előbbi kérdésekre keres választ és ad vizsgálati lehetőséget.

Az egyre általánosabbá váló civilizációs kedvezőtlen hatások, terhelő tényezők a szájüreg területén. Népbetegség szintre fokozzák a kemény- és lágyszöveti destrukciókat. A prevenciós küzdelem ellenére, illetve, hogy a szuvas léziókat a kariológia egyre jobb eredménnyel restaurálja, a folyamat megállíthatatlan: a végén ott áll a fog elvesztése. Más irányból is ide jutunk: a szájnyálkahártya gyulladások, az enyhétől a súlyos - fogágy-betegségekig, nagymértékű csontszövet veszteséget idéznek elő az élet előrehaladtával, és előbb-utóbb, a tartószövet nélküli fogakat szintén elveszítjük. A normális funkcionális állapot rehabilitációjához a klasszikus protetikai megoldásokat bizonyos esetekben nem alkalmazhatjuk. A pillérfogak hiánya, kényszerítőleg, gyors fejlődésnek indította mind a dentális implantációs technikákat mind a destruált csontos fogágy restaurációt.

Az implantátumok eredményességének alapja - a kellő statikai és csontbiológiai-biomechanikai helyzet - az implantátum osseointegrációja (oi). Ez a folyamat normális esetben is lassú (6-10 hónap) a betegek számára kedvezőtlen. A legjobb eredményeket mutató kétfázisú implantációs technika esetén a csökkentett terhelés miatt erre az időszakra a fogazati státusz gyakran táplálkozási nehézségeket okoz, melynek gyakran a szervezet egészére is negatív hatása van. A rágás és az anyagcsere megbomlása (öntisztulás, keringés stimuláció gyengülése, illetve eszenciális aminosavak, vitaminok, ásványi anyagok, nyomelemek hiánya) révén egyrészt a csontképzés folyamatára is visszahat, másrészt védekezési, regenerációs, immunológiai-problémákat is kiválthat.

Az utóbbi évtizedekben nagy fejlődésnek indultak az irányított csont rekonstrukciós eljárások. Mind az implantátumok osseointegrációjánál mind a fogágy restauráció irányított csontújraképzésénél központi kérdés: a csontregeneráció és annak szabályozása. A képződő csont minősége (szerkezete, mineralizáltsága, terhelhetősége) és az új-csont kialakulásához szükséges idő, számos tényező, mint például az egyes növekedési faktorok, citokinek, csontképzési proteinek, ionok lokális – esetenként szisztémás - aktivitásától vagy gátlásától is függ.

A csont kutatás korszerű alapjait, a száz évvel ezelőtt tevékenykedő. W.B. Coley megfigyeléseitől számíthatjuk. A csontképzés szabályozás a keményszövet formálás több fázisból álló folyamata szerint, különböző időbeni és térbeni orientációjú sokkomponensű folyamat. Ebben döntő szerepet játszanak, a csontformáló fehérjék (Bone Morphogenetic Proteins =BMPs) melyek a differenciálódási növekedési faktor család tagjai (Transforming Growth Factors pl.: TGF-α, TGF-β). Az utóbbi évtizedekben hatványozottan felgyorsult a csontképzésre vonatkozó kutatások száma. A csontfelépülés sejtműködési rendszerében fontos reguláló faktorokról kapott információink döntően *in vitro* tenyészetek eredményei, a humán klinikumra is adaptálható *in vivo* experimentális kísérleti adatok és értékelések hiányosak.

A szervezet keményszöveteinek sérülés ill. destrukció következtében kialakuló hiányait, immuntoleráns idegen anyagok felhasználásával már egy évszázada pótolják. A sikeres funkcionális rehabilitáció legfontosabb tényezői a kilökődési immuntolerancia és a biológiai használati érték. Ezen utóbbi faktor alapja a csontregeneráció, mely kedvező esetben az idegen anyag és csont közötti szoros kapcsolatot, „szervülést" létrehozva biztosítja a megfelelő rögzülést. Az „osseointegráció" mint kifejezés, ezt a biológiai regenerációs folyamatot jelenti. A regenerációs faktorok és a szisztémás szervezeti regulációk kutatási eredményei új dimenziót nyújthatnak a hosszadalmas biológiai folyamat befolyásolására.
A dentális implantátumok - a szájüregi speciális helyzetben működnek, a belvilágunk és a külvilág közötti kapcsoló elemként. Az anyagcsere, fajfenntartás, kommunikáció során gyorsan változó mikroflóra veszélyes inváziós hátteret jelent az orális régióban. A szervezet talán legnehezebb védekezési szituációja az egységében rugalmas lágyszöveti védő rétegeken a csontból a felszíni külvilág felé áttörő fogak körüli rés lezárása. A periodontális ligamentum és a gingiva marginális tapadása a fogak felszínéhez igen erős. Ha sérül e barrier, a fedő epithel sejtréteg növekedési faktorának (EGF) stimulációja hatására gyors burjánzással zárja a keletkezett rést. Ez legtöbb esetben azonban a zárási vonal apikális irányú eltolódásával, „tasakképződéssel" jár. Ez a mechanizmus - a felszíni sérülések „gyors-zárás" védekezési szisztémája – a dentális implantátum osseointegrációját hiúsíthatja meg, a csontra felkúszó azt az implantátum felszíni kapcsolódási pontjaitól elválasztó epithelsejtréteg kialakításával. A klinikumban ezért többféle módszert is alkalmaznak ennek az epithel, destabilizáló réteg kialakulásának megakadályozására. Valamennyi eljárásban egységes, hogy az implantátum körüli csontosodási regenerációnak nagyobb esélyt kell adni, mint a mélybe burjánzó epithelsejt-regenerációnak, vagyis a csontképzést gyorsítani kell.

Alapszintű kutatások emberen nem folytathatók így nemzetközi tendenciákat is figyelve egyre inkább kialakult az igény, egy olcsó, könnyen kivitelezhető experimentális csontregeneráció-vizsgáló módszer kifejlesztésére. Alapvetően a módszernek kritériuma, hogy egységes rendszerben lehessen vizsgálni magát a csontképződést, a csontképződésre in szitu és/vagy szisztémásan ható faktorok, gyógyszerek hatásait valamint implantátum anyagösszetétel, felszíni struktúra variánsait.
Világszerte így laboratóriumunkban is rutin kísérleti állat a fehérpatkány. A patkányok anatómiai sajátosságai, a kis méretek miatt orális régió tekintetében azonban nem adnak jó lehetőségeket a csontosodási folyamatok nagyszámú, rutin ellenőrzésére. A fajon belüli módszertani lehetőségek keresése közben jutottunk el számos csontkompartment elemzésével a patkány farok-csigolya illetve a fogágyat alkotó csont morfológiai

szerkezet hasonlóságához. Vizsgálati eredményeink alapján a farokcsigolya csont felhasználása mellett döntöttünk a dentális implantáció, a csontregeneráció illetve az osseointegráció új rendszerének kidolgozására.
Dolgozatom második részében (B) mutatom be azt az új saját, patkány-farokcsigolyára kifejlesztett „Csontszöveti-regenerációs/osseointegrációs vizsgálati modell"-t, mely széles körű elemzési lehetőségeket biztosít az experimentális tiszta csontszövet fejlődéstani, őssejt és regenerációs, implantátum osseointegrációs kutatásoknak. A mérési eredmények alapján kiválasztható a leginkább optimális csontszerkezet, implantátum-felület, biológia faktor illetve ion miliő, amely az osseointegrációt szabályozó alaptényezőket kedvező irányba módosítja.
Az utóbbi évek során számos közlemény számolt be súlyos szájüregi csontproblémákról, mely hátterében biszfoszfonát terápia mellékhatását tételezik fel. [132, 172]. Csontbetegségekben – főképp a lebontással, csontmetasztázisokkal összefüggő kórképeknél - a klinikum Világ szerte nagyszámban alkalmaz biszfoszfonát készítményeket, a csontszöveti stady state rendszerben, az osteoclastok működésének csökkentésére. Miután a csontregeneráció és osseointegráció csontszöveti remodellingen keresztül történik, adódik a kérdés: a csontbetegségek széles skáláján alkalmazott biszfoszfonát kezelés hogy befolyásolja az erre a területre kidolgozott kísérleti modellünkben az osseointegrációt. Őszintén megvallva, a számos aggasztó mellékhatás esetet bemutató tanulmány alapján azt vártuk, hogy jelentősen romlik az implantátum rögzülés, kvázi ki fognak potyogni a stiftek, miközben lebomlik, szétesik a farokcsigolya…..

MÓDSZEREK

Az alkalmazott módszerek széles skálája e helyen csak felsorolás szintű bemutatásra adhat lehetőséget**.**

1) Általános módszertani protokollok nyálmirigy vizsgálatoknál

1. Kísérleti állatok: (nőstény-Wistar Crl.(Wi)Br patkányok, fekete C57BL/6 egerek), Etikai engedélyi szám N^{O}:1799/003/2004.

2. Nyálmirigy szöveti minta: A szöveteket a műtét alatt hűtve pooloztuk, majd 0 C°-on 20 mM pH 7,4 foszfát pufferben homogenizáltuk

3. Nyálgyűjtés:

a. Részleges ablációban, kontrollban (a szájüregbe illetve a gl. parotis kivezetőcsőre helyezett műanyag kanüllel eppendorf centrifugacsőbe vezettük a kevert- illetve a parotisnyálat, 15'-es frakciókban, pilocarpin-HCl ip. stimulációt alkalmazva.

b. Teljes ablációban, kontroll állatokban. ***új nyálgyűjtési módszerünk***: „a frakcionált szájüreg öblögetéses kimosás". A szekréciós vizsgálatoknál 5-perces intervallumokkal frakcionált kimosási gyűjtést alkalmaztunk a 150 perces vizsgálatban 30 frakciót gyűjtünk.

4. Biokémiai vizsgálatok:

a. *fehérje tartalom meghatározás:* Bradford-féle módszerrel savas közegben Coomassie Brillant-Blue G-250 festékkel colorimetriás leolvasással Bio-Rad Protein Micro Assay- kitt felhasználásával (2-20µg értékhatáron

b. *amylase enzimaktivitás mérés:*Az amiláz aktivitást keményítő bontása alapján végeztük [52]. Phadebas (Pharmacia, Sweden) tabletta teszt alkalmazásával, fotométeres módszerrel.

c. *EGF tartalom mérése:*Radio-Receptor Assay (RRA) módszerrel, human placentális syncicіotrofoblaszt-membrán preparátumot (Huplastb-mp) alkalmazva (Booth AG, 1980) mértük az EGF-koncentrációt A metodikában alkalmazott membrán EGF-receptora species-független EGF-kötő kapacitású.

5. Fotométeres mérések*:* az extinkciókat Bio-Rad micro-plate reader (Model: 3550) fotométer automatán mértük és a hozzá kapcsolt PC-szoftverrel kvantáltuk.

6. Satisztikai számítási módszerek:

A vizsgálati csoportok adatatanak átlagát számítottuk, megadva az átlagtól való standard ± eltérést (SD, SEM). Dunnet-test, vagy Stunent t-próba alkalmazásával készítettük el a variancia-analízist az értékek normál gaus eloszlása alapján. Az adatokat Microsoft Excel 5.0 illetve, ANOVA statisztikai protokolok felhasználásával. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ –nél határoztuk meg.

2) A részleges nyálmirigyabláció kísérleti modell

1. Műtéti technika: Nőstény Wistar patkányoknál enyhe Nembutal (30 mg/kg ip.) narkózisban, nyaki medián saggitális metszésből, tompa szövetszétválasztással feltártuk régiót. Kifejtettük mindkétoldali gl submandibularis és szorosan hozzáfekvő gl. sublingualis nyálmirigyeket, az egy-kötegben futó kivezető csövet és ereket ligatúrával lekötöttük, majd levágva eltávolítottuk (részleges ablació) a mirigyeket. A sebet 2-3 varattal zártuk..

2. Kezelési protokoll: a) Álműtött csapvizzel itatott csoport (K), b) Álműtött 0,5%-os citromsavas vizzel itatott csoport (Cit), c) Részleges ablációs csapvizzel itatott csoport (AB), d) Részleges ablációs 0,5%-os citromsavas vizzel itatott csoport (AB+Cit). Egy hét kezelési periódus, ad libitum standard patkánytápon (LATI Kft.)

3. Vizsgálati protokol: pilocarpin 2,5 mg/kg ip. stimulálással 15-perces nyálminta. Narkózis alatti elvéreztetés után valamennyi állatból kipreparáltuk a nyálmirigyeket, súlyukat lemértük.. A mirigysúlyok lemérése után a szöveteket 0 C°-on 20 mM foszfát pufferben (pH 7,4) blendorral homogenizáltuk, 10e rpm x 10 perc centrifugálás után felülószót analizáltuk.

3) A teljes nyálmirigyabláció:

„Kisnyálmirigy experimentális" vizsgálati modell

1. Műtéti technika: Median saggitalis nyaki feltárásból a nagynyálmirigyeket óvatos, tompa szövetszétválasztás mellett kipreparáltuk, a mirigy hílusoknál a kivezetőcső-ér komplexuokat lekötöttük, majd a mirigyeket levágtuk, a sebet varrattal zártuk.

2. Kezelési protokoll: **a.** *A kisnyálmirigy szekréció stimulálása és gátlása.* A szájüregi szekrétum kimosását 250-250 µl-es naturálvízes kimért frakciókba, pipettával történt öblögetéssel végeztük. A reziduális nyálfilmet az első 10 frakcióval távolítottuk el (50. perc), majd ez után alkalmaztuk szisztémásan intraperitoneális stimulációt (1 mg/kg Pilocarpine-HCl, Serva). A receptorgátlás hatásvizsgálatnál, az antagonistát (2 mg/kg propranolol, Inderal inj.ZENECA UK) előzetesen az 5. frakció idején (25. perc) adtuk be szintén ip. injekcióban

b. *Akut vizsgálat.* Akut kísérleteinknél a nyálmirigyek eltávolítása után - gégekanült helyeztünk be és testhőmérsékleti kontroll mellett, 45 perc posztoperációs stabilizálódási szünet után indítottuk el a szájüregi mintavételezést.

c *Krónikus vizsgálat (7, 14, 21 és 90 nap)*. Az állatokat ad libitum táp és folyadékfelvételen tartottuk.

4) Csontszövet kvantitatív és kvalitatív vizsgálata

1. Zsír és megakaryocyta kimutatás: Az egereket avertine hipnózis alatt perfundáltuk Ca, Mg-mentes foszfát pufferrel (PBS). A perfuziót 1%-os alginate-blue poliszacharid komplexszel folytattuk (Sigma, Low density alginate és Berlin kék komplex) amely élénken színezi az egész érrendszert. A szöveteket kipreparáltuk és 4%-os paraformaldehydben fixáltuk 24 órán keresztül, majd mostuk Ca-tartalmú PBS-ben. A csontokat, kipreparáltuk, sztereomikroszkóp alatt hosszanti irányban felnyitottuk. Az eljárást a zsírsejtek és acelluláris zsírcseppek festésével folytattuk Oil-red oldatban. Ez az új módszerünk láthatóvá teszi három dimenzióban a véredény rendszert, a zsírsejteket. A megakaryocyták kimutatására a micro-angiográfia után közvetlenül, - paraformaldehyd fixálás nélkül - a felnyitott hosszú csontokat óvatosan a specifikus acethtyl-cholinészteráz szubsztrát olatba vittük. A sötétbarna reakciótermék kb. 20 perc után értékelhető, és a megakaryocytákat mutatja.Majd itt is elvégeztük a zsírsejtek Oil-red-es festését, mely után fotografáltunk.

2. Csont és porc szimultán festése, vitrifikálás*:* A megtisztított csontvázat fixáltuk (6% formaldehid), és dehiráltuk 50, 70 és 100%-os ethanolban (5-5 óra), majd acetonban (3x1óra). Alizarin vörös/Alcian kék festést alkalmaztunk stanard festék-oldat alkalmazásával egy éjjelen 37°C-on. A csont fedőszínének (background) eltávolítására többszöri cserével 1% KOH és 20% glycerin vizes vitrifikálást végeztünk. A preparátumok fotodokumentálását sötét-hátteres megvilágítással, Zeiss STEMI SV8 sztereomikroszkóp-CCD kamera (Sony) egységgel végeztük.

3. Hisztológiai vizsgálatok: A femurt és a csigolyákat kipreparáltuk, lágyrészeket eltávolítottuk majd egy éjjelen át fixáltuk, szobahőn, acetic acid-zinc formalin (AZF) fixálóban. Ezt követően mostuk - 3x30 perc desztillált vízben (dv.) - majd a mintákat dekalcináltuk (Gooding és Stewar módszer). Mosás (dv 3x30 perc) majd sucrose-gelatin impregnálás és fagyasztás (isopentan -80°C) után metszeteket készítettünk. Az 5-10 µm-es metszeteket poly-lysin-el bevont tárgylemezre vittük és különféle képpen festettük: *rutin vizsgálatokra vagy háttérfestésként* May-Grünwald Giemsa, vagy hematoxilin-eosinnal festettük. Az oszteoblaszt kimutatásra alkalikusfoszfatáz jelzést (kékszínű,Vector Lab.Ltd lúgos foszfatáz kitt), az oszteoklaszt kimutatásra tartarát rezisztens savifoszfatáz jelzést használtunk (TRAP –kitt, Sigma, USA). A *Ca kimutatásához von Kossa szerint* jártunk el. A fixált metszeteket vagy sejt-tenyészeteket 1%-os ezüst-nitrátban inkubáltuk UV-besugárzás alatt 45 percig, mostuk, majd a fölösleges reagenst 3%-os Na-thioszulfáttal kötöttük le és a preparátumokat desztilláltvízben öblítettük. A sötétbarna-feketés reakciótermék a Ca helyére precipitált ezüst.

4. Sejt-tenyészetek: Hematopoietikus őssejtek (HSC) és progenitor sejtek kvantitatív meghatározása. A HSC populáciot in vitro rendszerben mértük a vég-kihigítási-analizis ("limiting dilution analysis, LDA)") elvén. Az MS-5 sejtekből trypszines passzálást követően konfluens tenyészeteket készitettünk 96-üregű „Takácsi", lapos aljú tenyész-edényben (Falcon, microplate) majd a sejteket 2000 rad-al besugároztuk. A vizsgált szövet sejtszuszpenzióból sorozat-higitást készitettünk, 270-90-30 és $10x10^3$ sejt/ml koncentrációban. Minden higításból 100 µl aliquotot pipettáztunk a már előre készített „feeder-layer" MS-5 sejtekre, 24 parallel mikroplate-helyre. A kultúrákat hetente analizáltuk fázis-kontraszt mikroszkóp alatt és értékeltük a "cobblestone area forming cell (CAFC)" –nek nevezett sejt klónokat mindegyik mikro-plate edényben. Irodalmi adatok szerint a tenyészetek 14-ik napján nyert érték a myeloid "Colony Forming Unit"-nak felel meg (GM-CFU, M-CFU, G-CFU és High

Proliferative Capacity (HPP)-CFU), míg a tenyészetek 35-ik napján nyert érték a hematopoietikus őssejteknek számára utal

5. Hematopoietikus őssejtek analizise és izolálása "Fluorescent Activating Cell Sorter"-el(FACS): A szivacsos csontban (farokcsigolya, állcsont és femurban) lévő csontvelő szövetet három frakcióban nyertük ki micro-disszekció során. A szabadon szuszpendálható sejteket („buffy coat"), a noduláris „hematon" [Blazsek I. 2000] frakciót és az „endoszteumhoz kötött" sejteket külön preparáltuk az analízishez. A szöveteket enzimatikusan (0.1% Collagenase-I, II, III és 0.1 U hyaluronidase, 37°C, 60 perc) emésztve, egysejtü szuszpenzióvá disszociáltuk. Az enzimeket mosással (2xPBS, 4°C) eltávolitottuk, Bürker kamrában meghatároztuk a kinyert sejtszámot. A sejtfrakciókat 10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk Ca, Mg-mentes PBS/2%FCS-ban. A szuszpenziókhoz Hoechst-33342 fluorokrómot adtunk 5µg/ml koncentrációban és 90 percig 37°C-on incubáltuk. A szuszpenziókat 4°C-ra hűtöttük, centrifugáltuk, a sejteket 800 µl térfogatban szuszpendáltuk és 200-200 µl-es aliquotra osztottuk. A 200µl-es szuszpenziókhoz hozzáadtuk a fluorokrómmal jelzett ellenanyagokat 1:50-es higításban (FITC anti c-kit, PE ant-Sca-1; Becton-Dickinson) - egyedül, vagy együttesen.- 30 percig inkubáltuk, majd a szuszpenziókat mostuk 4°C-on, és azonnal analizáltuk FACS-on (FacsStar Vantage Option Digital, Becton Dickinson).

5) Csontregeneráció és implantátum-beépülés modellezése szivacsos csontszövetben „Új vizsgálati modell" kidolgozása farokcsigolyában

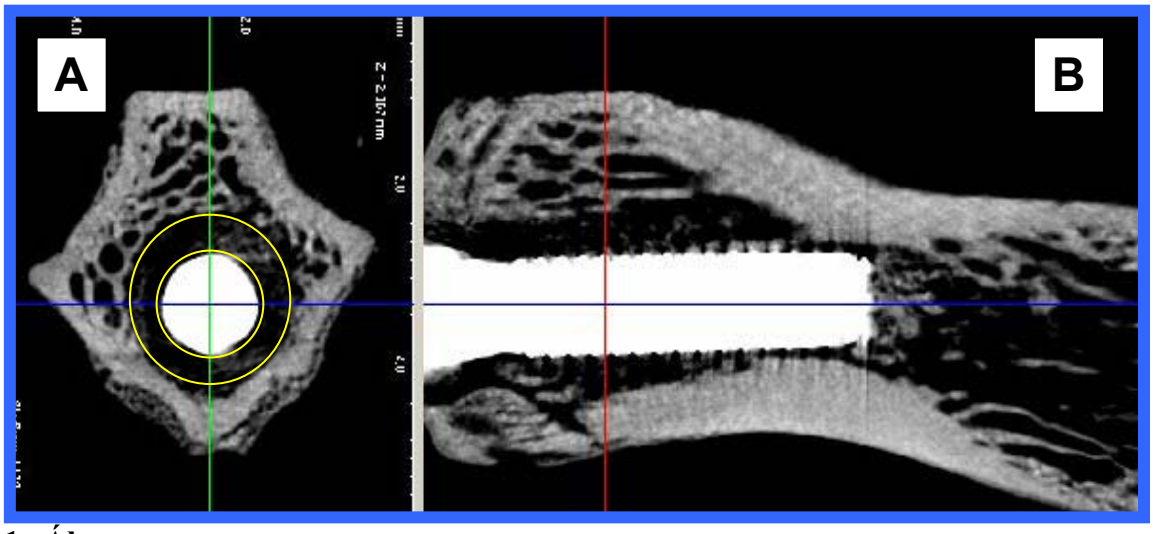
– szabadalmi szám: P0800345 -

1. Kisérleti állatok : Charles River 250-370 g Crl(Wi)Br Wistar nöstény patkányok, ad libitum folyadék és tápfelvételen (LATI standard patkánytáp). Anaestéziát sodium pentobarbitállal (Nembutal 40 mg/tskg) végeztük. Etikai engedély szám: N^O 46/1999.

2. Titán implantátum – adaptált mini dentál-implantátum:
Az osseointegráció fizikális mérésére szolgáló speciális mini-implantátumot a Full-tech Kft. Állítja elő - mely 1,0 Ømm mag átmérőjű csavarmenetes homokfúvással kezeltfelületű Titán-stift, lapított fejének átmérője 2,5 mm, centrális 1,0 Ømm lukkal

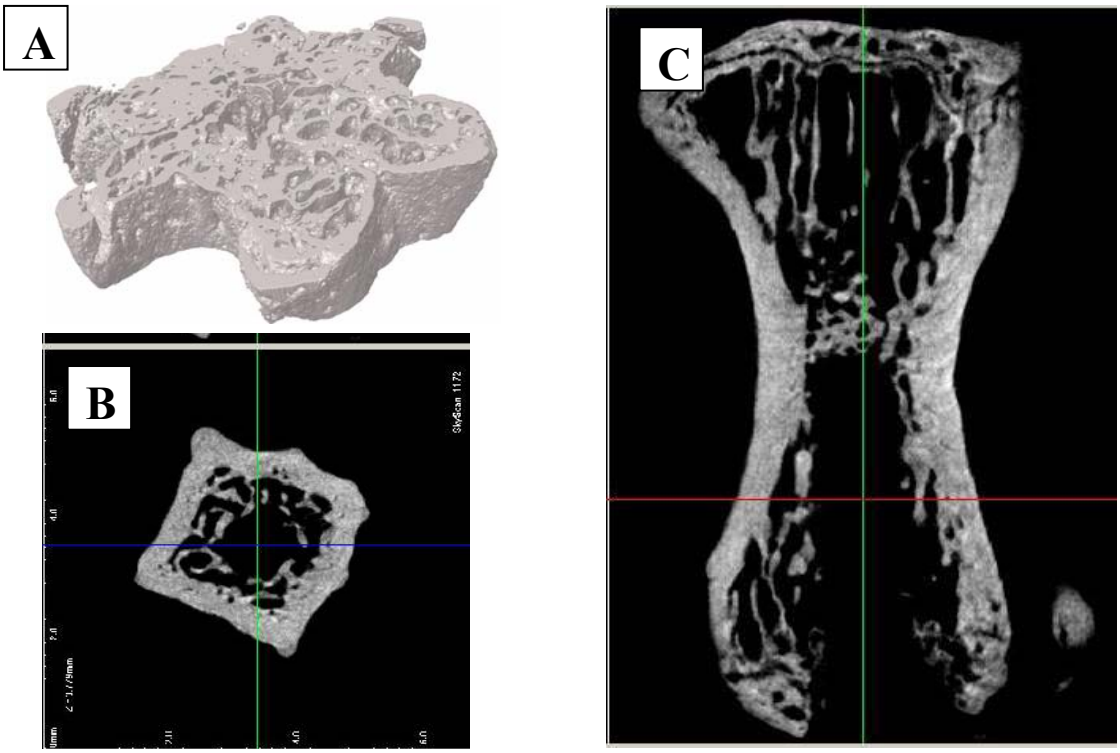
3. Műtéti technika (***„Új"***): A patkányfarok bőrét felületi vizes lemosással és sebészi bőrdezinficiáló oldatos áztatással fertőtlenítettük (30 perc). Ligatúrával felfüggesztettük a keringést. Steril műtéti környezetben, steril eszközökkel a 4/5 farki csigolya ízesülésétől disztálisan 5-6 mm-re körbemetszettük a bőrt, majd az ízületnél diszekáltuk a csigolyákat. A szabaddá váló csigolya disztális, porcszövettel borított ízfelszínét centrálisan tengelyirányban egy 1,0 mm átmérőjű fúróval 8mm mélységig előfúrtuk. Ezt a lukat második fázisban 2,0 mm átmérőjű fúróval 5 mm mélységig tágítottuk, kialakítva egy 2mm átmérőjű, 5mm mély „művi csontosodási kazettát". Ez az üreg a csontosodási folyamat (regeneráció) nyomon követésére ad lehetőséget, helyet biztosítva az újonnan képződő csontszövet számára. Ezen kívül in situ behelyezhető az üregbe, a csontosodási folyamat 1)–biomechanikai ellenőrzésére implantátum, 2)–a csontosodási folyamat regulálására különböző modifikáló kémiai anyag (egyedül vagy kombinációkban), vagy 3)-biológiai aktív minta pl.: szövetpreparátum, tumorsejt, őssejt. Az implantátum és/vagy vizsgálati preparátumok behelyezése után a farok bőrének atraumatikus szutúrájával zárjuk a sebet. A varrat elkészítése után a bőrfelületet bőrfertőtlenítővel kezeljük, és egy plasztik bevonva izoláljuk (Plastubol). A kísérleti periódus első két hetét az állatok egyedi ketrecekben töltik, fokozott higiénia biztosításával. A farok sebgyógyulása után a szocializációs igények helyreállítására visszahelyezzük állatainkat közös csoportjukba.

4. Mikro komputer tomográfia (microCT): **a.** *Rtg analízis, minták szkennelése.* A módszer lehetőséget ad, hogy Implantátum-stiftek beültetését követő különböző időpontokban a csontállományban kialakított csontkazetta csontosodási stádiumát, a regenerálódás mineralizálódási folyamatát mikroCT-vel in situ nyomon követhessük. Jelenleg rendelkezésünkre álló berendezés kis preparátumok vizsgálatára alkalmas („Skyscan 1172", X-RAY Microtomograph, Belgium). A készülékben 8 µm pontméreten mikrofúkuszálható röntgen sugárforrás van melynek 17,7 µm felbontása van. A kép rekonstrukció con-beam algoritmus szerint végezhetők. Az rtg sugár homogenitásának javítására és „lágyítására" 0,5 mm vastagságú alumínium szűrőt alkalmaztunk. A fém implantátumokat tartalmazó patkányfarok szekcionált mintákat teljes fordulattal 360°-on, míg a stiftek extrakciója után a fémmentes csontszövetet 180°-on szkenneltük, 0,7 fokonkénti lépés-intervallumokkal. A fémfelszín/csont határán generálódott zajt fizikai és szoftveres módszerrel eliminátuk.
b. *Rekonstruált képek előállítása.* A rétegek digitális adataiból rekonstruált szeletekből 2D és 3D szövetszerkezeti képet állíthatunk elő, mérésekhez és vizuális bemutatáshoz (1-3. ábra).

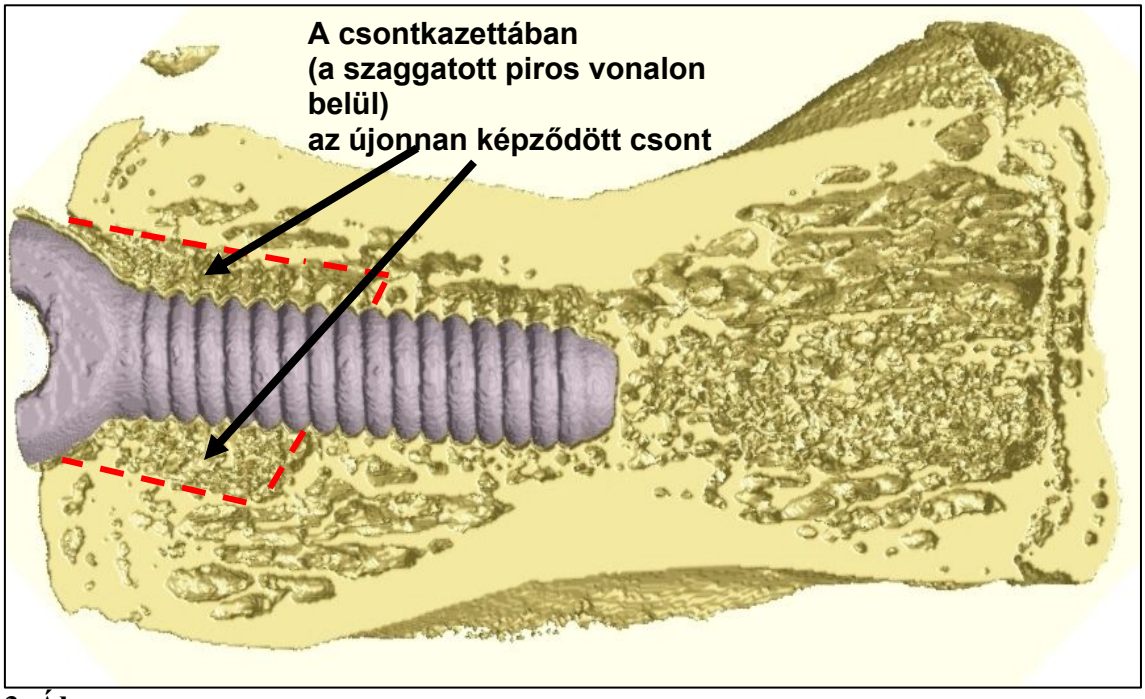


1. Ábra: Az implantátum behelyezés után 3 héttel már helyenként látható az újonnan képződő csont-lamella rendszer, de még jól kivehető a csontosodási kazetta határa, és igen intenzíven látható a körülötte lévő eredeti trabekuláris állomány, illetve a centrálisan elhelyezkedő implantátum A) horizontális metszet, B) medián saggitális metszet. A sárga körök reprezentálják a kazetta határait jelentő ROI-t (Region Of Interest)

A morfometriai elemzéshez C4-es csigolya minták rekonstruált szeletein kijelöltük a csontkazetta és az implantátum közötti – csontosodási üregnek megfelelő – csonthengert, a csontkazettának megfelelő külső és belső (az implantátum helyének széle) körvonalát (1. ábra), ez egy gyűrű alap, majd megadtuk ezen alaphoz tartozó vizsgálandó henger magasság értékét (ROIx1,5mm). Az így behatárolt egységes térfogatnak (TV: 2,694 mm^3) megfelelő szövetet elemeztük a morfometriai szoftverrel. Az elemzéseket valamennyi minta esetén két külön csigolya azonos területén végeztük. Az alsó preparált csigolya (C4) elemzésével információt kapunk az újonnan regenerálódó csontszövet paramétereiről ezeket „Új csont" adatok néven kezeljük (New Bone). Az alsó preparált csigolya feletti csigolyán (C4) az alsóval megegyezően kijelölt (ROIx1,5mm) térfogatnak csontszövet morfometriai értékeit, mint belső-referencia kontrol (Reference Bone) adatokat kezeltük

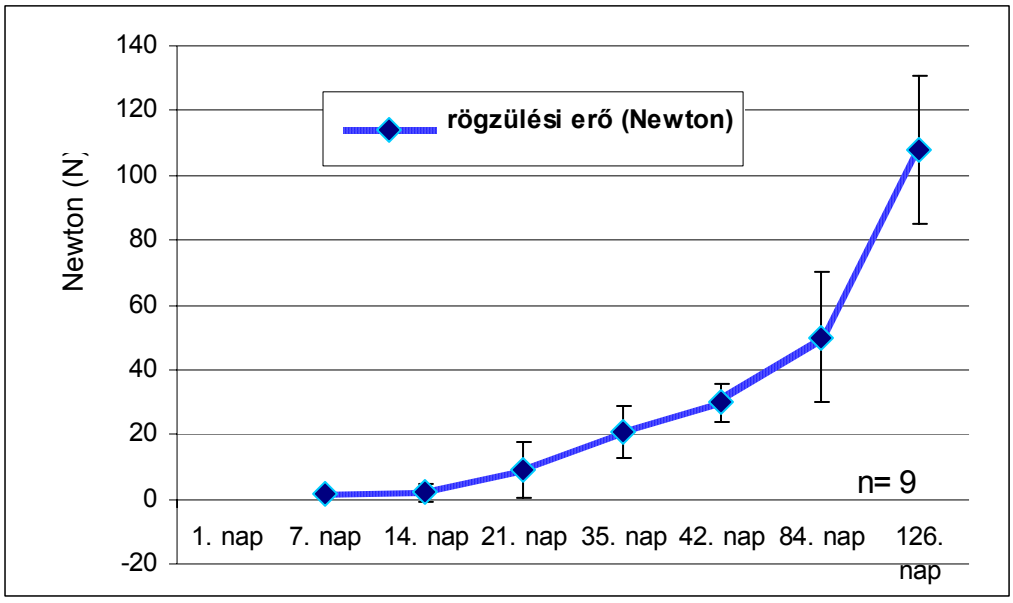


2. Ábra: Patkányfarok vertebra 3D-s rekonstruált képe, egy – tetszőlegesen – adott síkban történt metszéssel (A). Titán implantátum stift kihúzása után keresztmetszeten (B), illetve hosszmetszeten (C) láthatjuk a csigolya finomszerkezetét. Jól látható a csigolya kompakt csontállománya és a centrális stift helye közötti trabekuláris állomány a 10. hetes regenerációban.



3. Ábra: Osszeointegrált csigolyatest, az implantátum kimozdítása előtt, egy medián saggitális művi metszési síkban. Jól látható a csontosodási kazettában kialakult új szivacsos csont – szaggatott vonal jelzi a határát. Az megállapítható, hogy ebben az esetben az új csont szerkezete finomabb mikrostruktúrájú, mint a körülötte lévő, de nagymértékben egyező a csigolyatest proximális végén lévő csontstruktúrával

5. Biomechanikai vizsgálat – implantátum kimozdulási maximum erő mérése: A csontosodási folyamat során rögzülő implantátumok terhelhetősége fordított irányban megegyezik a kimozdítási maximális erővel. A csontosodási regenerációs folyamat különböző stádiumaiban altatott állatokon a bőr feltárása után Ti-implantátumok kiszakítási maximum erejének (Newton) mérését végeztük, a speciálisan erre a célra kifejlesztett Tenzi TE 18.1 típusú digitális maximum-erőmérő készülékkel.
A mérés menete: 1) sebészileg feltárjuk az implantátumot tartalmazó csigolya véget. A csavar disztális végén lévő lukon átfűzött acél szállal csatlakozunk egy külön erre a célra kifejlesztett digitális végpont-erőmérő műszerre. 2) A csigolya test és az extrakciós acélhuzal rögzítése és a műszert 0 –értékre állítjuk. Ez után csavarmenet előtolással, egyenletes húzóerő fokozással az implantátumot kimozdítjuk.
A műszeren kijelzett maximum érték a rögzülési erővel azonos Newton (N) értéket adja. (4. ábra)



4. Ábra: Osszeointegráció mértéke Titánimplantátum rögzülési erő mérés alapján patkány farokcsigolyában, a mérési pontokban ± SD jelöléssel.

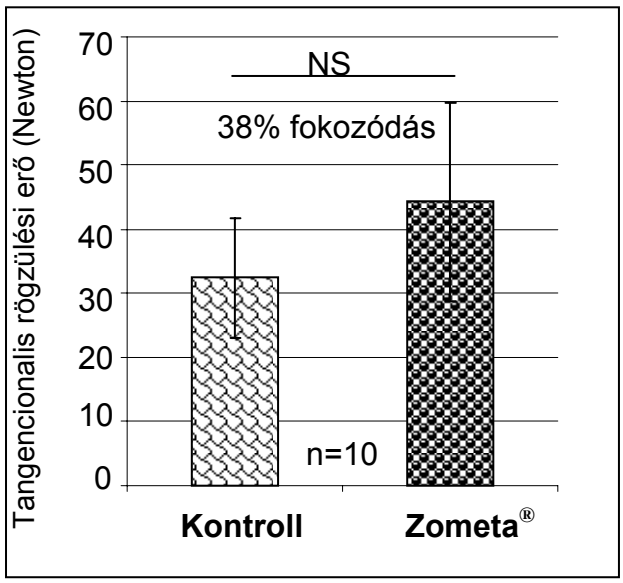
A mellékhatások súlyos következményei felvetik a kérdést, vajon a biszfoszfonátok milyen irányba befolyásolják a csontregeneráció folyamatát? Az implantátumok osseointegrációját gátolja, vagy elősegíti az osteoclastok gátlása? Megjelennek-e a mellékhatások, az egyéb terápiás kezelés nélkül is, az egészséges állatokon alkalmazott krónikus biszfoszfonát kezelés mellett?
E kérdések megválaszolására kísérleti körülmények között osseointegrációs modellünkön - a nagyhatékonyságú, de alkalmazásakor a klinikum felől különösen nagyszámú mellékhatás esetet közölt -nitrogéntartalmú biszfoszfonátot, a zolendronátot (Zometa® - Novartis) alkalmaztuk a kísérleti módszerekben leírt 6 hetes periódusban.

6) Biszfoszfonát experimentális alkalmazás:

1.Kísérleti állatok – Implantátum: A kísérletben a korábbiakban leírt Titán-stift implantátum behelyezéses „osseointegráció experimentális modell"-t alkalmaztuk 20 db 260-330 g testsúlyú Crl(Wi)Br Wistar nöstény patkányon. A beültetés után 10 állat 1ml fiziológiás sóoldatot (placebo kezelt kontroll) a másik 10 állat Zometa kezelést kapott, patkányra adaptált protokoll szerint. Az állatok ad libitum folyadék és tápfelvételen (LATI standard patkánytáp). A kísérleti anaestéziát intraperitoneális (ip.) injekcióban sodium pentobarbitallal (Nembutal 40 mg/tskg) végeztük.

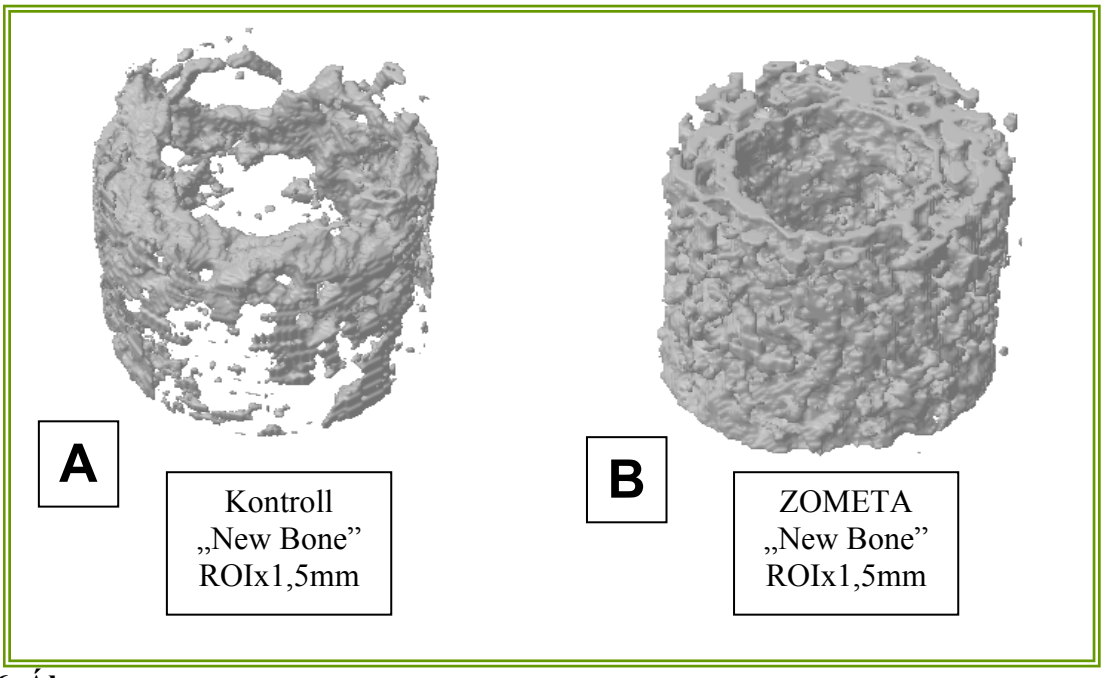
2. Amino-biszfoszfonát therápiás protokoll: Az alkalmazott biszfoszfonát, a nagy hatáserősségű zolendronic acid (zolendronate - Zometa®, Novartis, Basel, Switzerland). A Zometa® dózisát, a gyári ismertető alapján állítottuk be, valamint figyelembe vettük az ide vonatkozó humán klinikumi irányelveket. A patkányra megadott, nagyobb, mint 1 mg/kg letális single-dózis 60%-ában vagyis 0,6 mg/kg/alkalom dózisban alkalmaztuk a szert, és fiziológiás oldatban hígítva ip. adagoltuk, 3 alkalommal 2-hetes intervallummal. Az állatokat a kezelés és implantátum beültetés után a 6. héten dolgoztuk fel.

3. Vizsgálati protokollok: **a.** *Biomechanikai vizsgálat* – implantátum kimozdulási maximum erő mérése: A 6-hét csontosodási folyamat során a placebo kezelt kontroll és a Zometával kezelt csoportokban (5. szemléltető ábra)



5. Ábra: Zometa kezelés mellett a Titán implantátumok rögzülési értéke 38% -al haladta meg a kontroll adatokat, amely biomechanikailag jelentős, de statisztikailag a szignifikancia határ felett van. (Extrakciós erők: Kontroll:32.4 ±9.38 N; Zometa: 44.22 ±15.38 N; $p < 0.06$)

b. *Mikro komputer tomográfia (microCT):* A minták szkennelése az implantátumok extrakciója után történt. Miután így nem kell számolni az implantátum rtg-sugár szórási artefaktjával elegendő a 180°-os fordulat mintaállásait leképeznünk. Az adatok feldolgozása során kapott kvantitatív morfometriai értékek jelentős új-csont képződést mutatnak. Jól szemlélteti a megnövekedett újonnan képződött csontszövetet az 6. ábra.



6. Ábra: A patkány caudalis vertebrák csontosodási kazettájában létrejött új csont szövet microCT rekonstruált 3D-s kép. A) kontrol placebo kezelt és B) aminbiszfoszfonát (Zometa) kezelt állatok mintái. Megállapítható a lényegesen intenzívebb (3x-os) csontképződés a Zometa csoportban. A csonttérfogatban a Kontroll =0,58±0,26 mm^3 , a Zometa = 1,72 ± 0,35 mm^3 ; $p<0,00002$, de kétszeresre nő a trabekula-vastagság ($p<0,0002$), ezzel paralel csökken a trabekulák közötti tér mintegy harmadára. Összességében lényeges a denzitás különbség.

EREDMÉNYEK

A) Az Epidermális növekedési faktor (EGF) kompenzációjára vonatkozó vizsgálatok

1) Vizsgálataink megerősítik, hogy a nyálmirigyek széles variációban szekretálnak EGF-t. A nyálmirigyek részleges eltávolítása (sialoadenectomia, ablatio, abláció), vagy citromsavval történő krónikus gusztatórikus ingerlés egyaránt a nyálmirigyek hipertrófiáját indukálják. A nyálmirigy abláció, jelentős mirigytömeg fokozódást vált ki a Parotis mirigyben. Ugyanakkor, ablációt követően a fokozott gusztatórikus inger a parotis szöveti EGF-koncentrációját 90%-al csökkenti, mialatt a nyál EGF tartalma 20%-al emelkedik.

2) Alapvető felismerés, hogy a nagynyálmirigyek eltávolítása után, a kísérleti patkányok túlélési ideje meghaladja a 90 napot, tehát a nagynyálmirigyek nagy valószínűséggel nem életfontosságú szervek.

3) A kisnyálmirigyek patkányban, pilocarpin stimulált nyálelválasztásánál kísérleti körülményeink között az összes fehérje közel 15%-át, míg amiláz esetén az összes mennyiség 1-2%-át adják és vegetatív reguláció alatt állnak.

4) A nagynyálmirigyek eltávolítása után, a kisnyálmirigyek csekély mértékű, lassan kialakuló kompenzációra képesek, a fehérje, amiláz és EGF termelése szintjén. Az eredmények azt mutatják, hogy a nagynyálmirigyek eltávolítása után is van EGF a szájüregi szekrétumban, melynek legvalószínűbb forrása a kisnyálmirigyek szétszórt rendszere.

5) Eredményeink azt sugallják, hogy új módszerünk a kisnyálmirigyek funkcionális experimentális kísérleteire alkalmazható, a nem nagynyálmirigy eredetű, szájüregbe szekretálódó folyadékfilm vizsgálatára. A részleges és a teljes nagynyálmirigy abláció eredményeinek együttes értelmezése a kisnyálmirigy-adaptáció sajátosan új oldalát tárja fel. Egyrészt a nyálkahártyát és fogakat bevonó biofilm peptid-fehérje komponensei között megtalálható az amiláz-enzim és az EGF. Másrészt hogy elválasztásukat, szekréciójukat pilocarpinnal stimulálni, illetve e stimulációt Propranololllal gátolni lehet. Nagyon valószínű tehát, humán viszonylatban is, hogy például baleset, tumor vagy más okozati tényező miatt, amikor a nagy-nyálmirigyek EGF termelése kiesik vagy csökken, a kismirigyek biztosítják, legalábbis részben, a nyálkahártya regenerációjához nélkülözhetetlen faktorokat.

B) Új implantációs modell kidolgozása patkányokban és a csontszövet-regeneráció experimentális analízise biszfoszfonát kezelés mellett

1) Az új, általunk kifejlesztett farokcsigolya modell alkalmazásával kvantitatív mérhető a csontregeneráció és az implantátum osseointegrációja. Módszerünk először teszi lehetővé az újonnan képződő csont morfometriai kvalitatív és biomechanikai kvantitatív változásainak együttes elemzését, szisztémás és/vagy lokális kezelésekre.

2) A módszer alkalmazásával először mértük egy amin-biszfoszfonát (Zometa®) kvantitatív és kvalitatív stimulációs hatását csont neogenezisben és implantátum osseointegrációjában. Az általunk kifejlesztett állatkísérleti modell új adatokkal gyarapította az amin-biszfoszfonát hatást a csonthiány regenerálódásban, egyben igazolta, hogy új lehetőséget jelent szisztémás és lokális kezelési eljárások csontregenerációra gyakorolt hatásvizsgálatára.

3) Kísérleti munkáinknak váratlan eredménye volt, hogy a csontvelő parenchyma az összes caudális vertebrában apláziás jellegű, annak ellenére, hogy gazdagok a csontépítő és lebontó sejtekben.

KÖVETKEZTETÉSEK

A) A szájnyálkahártya regenerációs faktorának experimentális vizsgálatok

Mérési eredményeink alapján kimondható, hogy az általunk kidolgozott új módszer a kisnyálmirigyek funkcionális experimentális kísérleteire alkalmas, a nem nagynyálmirigy eredetű, szájüregbe szekretálódó szájfolyadék vizsgálatára. A részleges és a teljes nagynyálmirigy abláció eredményeinek együttes értelmezése a kismyálmirigy-adaptáció sajátosan új oldalát tárja fel. Egyrészt a nyálkahártyát és fogakat bevonó biofilm peptid-fehérje komponensei között megtalálható az amiláz-enzim és az EGF. Másrészt hogy elválasztásukat, szekréciójukat a kevert hatásspektrumú pilocarpinnal stimulálni, illetve e stimulációt Propranololllal gátolni lehet. Ha a nyálkahártya egyik fő regenerációs tényezőjének, az EGF-nek rágcsálókban legintenzívebb termelési szövetét a gl. submandibulárist eltávolítjuk, akkor akutan drámai csökkenést láthatunk a nyál EGF tartalmában. A nyáltermelés adaptációs mechanizmusában a megmaradt gl. Parotis intenzív növekedéssel és nyáltermeléssel csökkenti a hyposalivációt. Ennek során jelentős mértékű acinussejt hipertrófia-hiperplázia látható. Kompenzációs funkció-fokozódás és megnagyobbodás jön létre a gl. parotisban, ha eltávolítják a submandibuláris-sublinguális mirigyeket, vagy az ellenoldali gl. parotist, viszont a kivezetőcső-rendszer volumene, illetve ennek

gyarapodása arányaiban elmarad ettől. Miután az EGF a kivezető-cső területén képződik az adaptációs mechanizmusban aránytalanul elmarad az EGF produkció. Más oldalról a gl. Parotis szöveti EGF tartalma, a gl. submandibulárisok excisiója után ezres nagyságrenddel lecsökken, ami részben utalhat arra, hogy e szöveti szinthez valamilyen mechanizmussal a gl. submandibulárisok is hozzájárulhattak. Másrészt az alacsony gl. Parotis szöveti tartalomhoz az extrém csúcsrajáratott szekréciós mechanizmus a kivezető csövek területe felől egy intenzív „kimosási effektus"-sal is járhat. A kisnyálmirigyekben, több kutatócsoport is (Brunner mirigyben) kimutatott EGF termelést. Újdonság, hogy a kisnyálmirigyek adaptálódása is megfigyelhető a teljes abláció során, mely a fehérje és amylase mellet EGF szekréciót is produkál. Erre utal, hogy az abláció után akutan végzett kísérletekben az állatok pilocarpin stimulációra adott 100 perces szummációs szintjét (2,233 ng), a 14 napos teljes ablációs hatás 18%-al (2,633 ng) „megnövelte", amely nem jelentős, de ez esetben alapvető bizonyíték arra, hogy nagynyálmirigyek nélkül is tartalmaz EGF-et, a szájüregi nyálkahártyát bevonó folyadékfilm. E megfigyelés alátámasztja azt a szervezetben általánosan meglévő „törekvést", hogy a biológiai mechanizmusok – főleg a védelmi struktúrák - többszörös „túl"-biztosítás alatt működnek. Tehát feltehetően lehet esélyünk humán viszonylatban is, ha baleset, tumor, stb. miatt megszűnik, vagy csökken a nagy nyálmirigyek EGF termelése, hogy a kismirigyek felől kerülhessen regenerációs faktor a szájnyálkahártyára.

B) Experimentális csontregeneráció/osseointegráció vizsgálatok

Vizsgálati eredményeink bizonyítják, hogy az újonnan kifejlesztett művi csontkazettás farokcsigolya modell alkalmazásával kvalitatív mérhető a csontregeneráció és az implantátum osseointegráció. Az általunk kifejlesztett és leírt kísérleti modell először teszi lehetővé az újonnan képződő csont kvalitatív és kvantitatív változásainak együttes elemzését, szisztémás és/vagy lokális kezelésekre. A módszer alkalmazásával először mértük meg egy amino-biszfoszfonát (Zometa®) kvantitatív és kvalitatív stimulációs hatását csont neogenezisben és implantátum osseointegrációjában.

A dentális implantátum osseointegrációjának kísérletes vizsgálatához megfelelő csont kompartment kiválasztás illetve az ehhez kapcsolódó elemzési munkának váratlan eredménye volt az a felismerés, hogy a szivacsos farok-csigolyák alig tartalmaznak csontvelő parenchymát, de igen sok bennük a csont remodelling elem, az építő osteoblast és a lebontó osteoclast sejt. Ez a felismerés fontos lehet számos alapvető kérdésben. Először is a farokcsigolya ideális mikrokörnyezet lehet a csont-modifikáló anyagok széles skálájának preklinikai vizsgálatánál, hiszen itt nem zavar a hematopoetikus rendszer. Igen kedvező lehet például a hasonló kompartment felépítésű állcsontok modellezésére, dentális implantátum osseointegrációjának vizsgálatára.

A gyér csontvelő (csv.) parenchyma a farokcsigolyákban egy olyan morfológiai helyzet, mely lehetőséget ad a jelenlévő osteoblast környezetbe („niche") beadva hematopoetikus illetve egyéb stem sejteket és vizsgálni reakcióikat az osteoblastokkal

Korábbi publikációk és saját, folyamatban lévő kísérleteink alapján nagy valószínűséggel e terület a pseudo-aplastikus helyzethez hasonló, így a farokcsigolyában vizsgálható a hematopoetikus csontvelői celluláris diszreguláció a myelodyspláziás és preleukémiás syndróma kialakulása és/vagy progressziója.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

In extenso közlemények folyóiratokban és proceedings kötetekben,
1972-2008 időszak publikációi: **kummulált IF: 10,756**

Saját Közlemények **kummulált IF: 2,281**

A disszertáció tárgykörében megjelent elsőszerzős dolgozatok

-Blazsek J., Offenmüller K., Burghardt B., Kisfalvi I., Birki K., Wenczl M., Varga G., Zelles T. Possible compensation in epidermal growth factor production by saliva in rat
Inflammopharmacology, 4:279-295, 1996. **IF: —**

-Blazsek J., Varga G.: Secretion from minor salivary glands following ablation of the major salivary glands in rats
Archives of Oral Biology 44:45-48, 1999. **IF: 1,04**

-Blazsek J, Dobó Nagy Cs, Blazsek I, Varga R, Vecsei B, Fejérdy P and Varga G.
Aminobisphosphonate stimulates bone regeneration and enforces consolidation of titanium implant into a new rat caudal vertebrae model.
Pathology and Oncology Research, 2008 (in press). **IF: 1,241**

Egyéb tárgykörben megjelent elsőszerzős dolgozatok

-Blazsek J., Zelles T., Boros I., Vaskó A., Tankovics G.: Density distribution of secretory granules in the rat parotid gland
Saliva and Salivation (Ed.T.Zelles), Pergamon Press-Akadémiai Kiadó,
Budapest, pp. 159-166. 1981. **IF: —**

-Blazsek J., Offenmüller K., Zelles T., Humphreys-Beher M.: Galactosyltransferase immunológiai módszerekkel történő kimutatásához alkalmazható antitestek előállítása
Fogorv.Szle., 83:329-334, 1990. **IF: —**

Társ Közlemények **kummulált IF: 8,475**

A disszertáció tárgykörében megjelent társszerzős dolgozatok

-Zelles T., **Blazsek J.**, Kóbor A., Gelencsér F.: A glandula parotis gusztatórikus ingerrel létrehozott megnagyobbodása
Fogorvosi Szle., 77:315-318, 1984. **IF: —**

-Zelles T. **Blazsek J**., Kelemen É.:A pilocarpin hatékonyságának elemzése a xerostomia kezelésében
Fogorv.Szle., 83:319-331, 1990. **IF: —**

-Seok-Woo Lee, Purushotham K.R., Littlewood T., Evan G., Zelles T., **Blazsek J**., Yoichi Nakagawa and Humphreys-Beher M.G.: Down-regulation of cellular proto-oncogenes during inhibition of rat parotid acinar cell proliferation
Biochim. Biophys. Acta, 1135:115-122, 1992. **IF: 2,610**

-Purushotham K.R., Zelles T., **Blazsek J**., Pao-Li Wang, Paul G.A., Kerr M., Humphreys-Beher M.: Effect of EGF on rat parotid gland secretory function
Comp. Biochem. Physiol 110C:7-14, 1995. **IF: 0,865**

-Purushotham K.R., Offenmüller K., Bui A.T., Zelles T., **Blazsek J**. Schultz G.S., Humphreys-Beher M.G.: Absorption of epidermal growth factor occurs through the gastrointestinal tract and oral cavity in adult rats
Am.J.Physiol., 269:867-873, 1995. **IF: 3,244**

-Blazsek I, Clay D, **Blazsek J**, Pierre-Louis O, Leclerc P, Le Bousse-Kerdilès MC and Uzan G. Haematopoietic stem cell niches are complex, self-organizing, topological units providing autonomy and tissue robustness.
Letter to Nature/2008. (közlés alatt)

Egyéb tárgykörben megjelent társszerzős dolgozatok

-Boros I., Zelles T., Keszler P., Vaskó A., **Blazsek J.:** Osmotic pressure as a presumable factor influencing the zymogen granules in the parotid gland of rats
Saliva and Salivation (Ed.T.Zelles), Pergamon Press- Akadémiai Kiadó,
Budapest, pp.177-189, 1981. **IF: —**

-Keszler P., Boros I., Zelles T., **Blazsek J.**: Preparation of zymongen granules with gel filtration: Distribution of amylase and carbonic anhydrase activity following "linear-discrete" density gradient centrifugation
Saliva and Salivation (Ed.T.Zelles), Pergamon Press- Akadémiai Kiadó,
Budapest, pp. 167-176, 1981. **IF: —**

-Zelles T., Keszler P., Boros I., **Blazsek J.**: Amylase synthesis in the parotid gland of cortisone treated rats
Saliva and Salivation (Ed.T.Zelles), Pergamon Press- Akadémiai Kiadó,
Budapest, pp. 249-255, 1981. **IF: —**

-Zelles T., **Blazsek J**., Tófalvi Á., Végh A.: A ß-receptor blokkoló Visken hatása a gl. parotisának súlyára, valamint az elválasztott nyál mennyiségére és amiláz aktivátására
Fogorvosi Szle., 77:346-348, 1984. **IF: —**

-Zelles T., **Blazsek J**., Tófalvi Á., Póchs E.: The ultrastructure and secretory activity of rat parotid gland in experimental mucopolysaccharidosis
Berichte der Humboldt Universität, Berlin, 14:19-23, 1985. **IF: —**

-Zelles T., **Blazsek J**., Tófalvi Á.: Effects of suramin a trypanocidal drug on the rat parotid gland
Zahn-Mund-Kieferheilkd., 74:683-690, 1986. **IF: —**

-Purushotham K.R., Pao -Li Wang, Dolce C., Zelles T., **Blazsek J**., Humphreys-Beher M.G.: Effects of surgical ovariectomy on rat salivary gland function
Arch. Oral Biol., 38:779-784, 1993. **IF: 0.972**

-Purushotham K.R., **Blazsek J**., Humphreys-Beher M.G., Zelles T.: Cholecystokinin modulates isoproterenol induced changes in rat parotid gland
Comp. Biochem. Physiol.,C 106: 249-254, 1993. **IF: 0.784**

-Nagy G., **Blazsek J**., Bánóczy J. Sándor M. Fogorvostan-hallgatók és fogorvosok dohányzási szokásai Magyarországon
A Magyar Fogorvos különszáma: Szájüregi daganatok, 4:279-295, 2003. **IF: —**

Könyv - könyvfejezet, jegyzet, jegyzet-fejezet:

-Blazsek J.,: Rágás és nyelés
Orálbiológiai Jegyzet Fogorvostanhallgatók részére, Szerk: Zelles T., Budapest, SOTE, FOK. pp. 195-213, 1987. **IF: —**

-Blazsek J.,: Rágás és nyelés
Orálbiológia tankönyv, Szerk: Zelles T., Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 23. fejezet, 223-236, 2007. **IF: —**

Elöadás Abstractok

Abstract kummulált IF: 28,092

Előadások melyek absztraktjai folyóiratokban és proceedings kötetekben jelentek meg. Az impakt faktorok tájékoztató jelleggel kerültek feltüntetésre.

A disszertáció tárgykörében elhangzott előadások

Elsőszerzős előadások

-Blazsek J., Zelles T., Selmeci L., Tófalvy Á., Kulcsár Á.: Compensatory Hypertrophy of the Hyperfunctioning Rat Parotid Gland
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 63:304-305 (Abs.), 1984. IF: 0.354

-Blazsek J., Zelles T., Tófalvy Á., Simon Gy.: Compensatory Enlargement of the Rat Parotid Gland
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 66:314-315 (Abs.), 1985. IF: 0.359

Társszerzős előadások

-Zelles T., **Blazsek J**., Boros I., Keszler P., Kulcsár Á., Tófalvy Á.: Secretory Response of the Rat Parotid After Compensatory-Hyperfunctional Enlargement
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 63:395 (Abs.), 1984. IF: 0,354

-Purushotham K.R., Offenmüller K., Bui A.T., Zelles T., **Blazsek J**., Humphreys-Beher M.G.
Sublingual absorption of Epidermal Growth Factor (EGF) in the rat
J.Dent.Res., 74:568 (Abs.), 1995. IF: 3,810

-Offenmüller K., **Blazsek J**., Gyovai B., Szöllősi K., Zelles T.,
Examination of the epidermal growth factor level of saliva in healthy and dental implant provided patients
Advances in Dental Research vol.13:189, 1999. IF -

-Zelles T., Varga G., **Blazsek J**., Gresz V., Nagy Á., Humphreys-Beher M.: Chronic gustatory stimulation: a model for parotid hypertrophy in rats.
J. dent. Res., 80:618 (Abs.), 2001. IF: 3,350

Egyéb tárgykörben elhangzott előadások

Elsőszerzős előadások

-Blazsek J.: Mitochondrion-secretory granule complexes (MSGC) in parotid acinar cells in rats
J.Dent.Res.77:851 (Abs.), 1998. IF:4,060

Társszerzős előadások

-Boros I., Mózsik Gy, Keszler P., Zelles T., **Blazsek J**.: Amylase Activity and cAMP Level in the Parotid Gland of Rats Following F- Ingestion
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 63:308 (Abs.), 1984. IF: 0,354

-Bullis D., Zelles T., Keszler P., Boros I., **Blazsek J**. and Cutler L. S.: Effect of Chronic Cortisone Treatment on Secretion by Rat Salivary Glands

J. Dent. Res., 63:210 (Abs.), 1984. IF: 2,276

-Gintner Z., Zelles T., **Blazsek J**., Sülle T., Bródy A.: Animal Model for Producing Hepatogenic Sialosis in the Rat Parotid Gland by Carbon Tetrahydrochloride Treatment
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 63:329 (Abs.), 1984. IF: 0,354

-Zelles T., Fazekas Á., Posch E., Tófalvy Á. and **Blazsek J**.: Effect of Body Temperature on Blood Flow in the Salivary Glands
J. Dent. Res., 65:783 (Abs.), 1986. IF: 2,533

-Purushotham K., **Blazsek J**., Humphreys-Beher M. and Zelles T.: Cholecystokinin Effects on Amylase Secretion in Rat Parotid
J. Dent. Res., 72:648 (Abs.), 1992. IF: 3,019

-Zelles T., Varga G., **Blazsek J**.: Soya feedind induces parotid hypertrophy in rats
J.Dent.Res., 74:444 (Abs.), 1995. IF: 3,810

-Zelles T., Varga G., **Blazsek J**., Gresz V., Offenmüller K.: Does cholecystokinin have a direct trophic effect on the parotid gland?
J.Dent. Res., 76:344 (Abs), 1997 IF: 3,459