

УНИВЕРЗИТЕТ “СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ”- СКОПЈЕ

Стоматолошки факултет - Скопје

Катедра за болести на усната и пародонцијата



д-р Кристина Митиќ

ПРОЛИФЕРАТИВНИ И АПОПТОТИЧНИ ПРОМЕНИ

КАЈ ГИНГИВАЛНИТЕ РАЗРАСНУВАЊА

СТИМУЛИРАНИ ОД ЦИКЛОСПОРИН

докторска дисертација

Ментор: Проф. Др. Мирјана Поповска

Скопје, 2011 година

Членови на комисија за одбрана на докторската
дисертација

1. Проф. д-р, Марија Накова,
2. Проф. д-р, Киро Ивановски,
3. Проф. д-р, Златанка Белазелковска,
4. Проф. д-р, Миљана Толовска,
5. Проф. д-р, Мирјана Поповска.

Благодарноси изразувам до...

- ... Проф. д-р Мирјана Појовска, мојот ментор, кој висштински ме водеше во изработката на трудот, и со особена посветеност учествуваше во несебично пренесување на своите знаења,
 - ... Проф. д-р Марија Накова, човек со исклучителна добрина и ангажираност во работата која секогаш беше пример за нас помладите,
 - ... Проф. д-р Миљана Толовска и нејзиниот соработник асс. д-р Рубенс Јовановиќ, за помошта во изведувањето на испитувањата, корисните консултации и разбирањето,
 - ... Проф. д-р Нинослав Ивановски, за помошта и поддршката во реализација на поставените цели,
 - ... Проф. д-р Розалинда Исјановска, за помошта во статистичката обработка на податоците,
 - ... колежите од Клиниката за Болести на усната и пародонтолог за помошта при собирањето на материјалот,
 - ... м-р Тајјана Зорчец, за помошта при финалната компјутерска обработка,
 - ... моите најблиски, за бескрајната љубов, пријателство и поддршка.
-

СОДРЖИНА

Вовед	1
Литературен преглед	16
Цели на трудот	34
Материјал и методи на работа	36
Резултати	47
Дискусија	86
Заклучоци	124
Референци	128

PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC CHANGES IN CYCLOSPORIN STIMULATED GINGIVAL OVERGROWTH

Abstract

From a clinical point of view, cyclosporin A-induced gingival overgrowth is a current problem of tissue-specific mechanism which is still not completely explained. Apoptosis has been of a particular interest within the recent years, being grounds through which a potentially new concept can be traced in the etiology of this very common clinical change. As a matter of fact, the final objective of the research performed is to ensure new therapeutic possibilities in prevention and treatment of the cyclosporin-overgrown gingival tissues.

Based on the abundant, yet ununified literature, we established the goal of this thesis: to define the pathogenetic processes in overgrowth gingival tissue, to detect the role of local immunity, the level of expression of bcl-2, p53, Ki-67 depending on the dosage of the medicament, as well as the duration of the treatment of medicamentously induced gingival overgrowth.

To realise the set goal, a research group of 64 kidney-transplant patients was formed, divided into four subgroups depending on the daily dosage of therapeutically applied cyclosporin (100mg, 125mg, 150mg and 175mg). The group, subject to the research, was made of 21 patients clinically diagnosed with periodontal disease, who were not subjected to any medicamentous treatment causing gingival overgrowth (primarily cyclosporine A). To this end, we carried out clinical and paraclinical research.

The clinical research was carried out by applying the following indexes: index of dental plaque (IDP), index of gingival inflammation (IGI) according to Loe-Silnes, index of gingival overgrowth (IGZ) according to McGaw et al. and index of attachment loss (level of apical migration of the epithel).

The set up paraclinical research was realised through determination of cyclosporin in blood (C2) by applying a fluorescence polarised immunoassay (FPIA).

A sample of the tissue was taken from all the patients who were part of the research. Following the standard pathohistological processing, coloured with hemalaun eosine to determine the collagen, reticulin, apoptotic cells, morphometrical thickness of the gingival epithelium. The group of patients were subjected to semiquantitative analysis to determine the intensity of the inflamed infiltrate. Furthermore, the tissue samples were immunohistochemically coloured to determine the expression of the following protein: bcl-2, p53 and Ki-67.

The results from the research showed that the overgrown gingival tissue is due to the overgrowth of the stroma (because of the deposited collagen), rather than the thickened epithelium. Unlike the greater doses which are critical for the high values of this index, the 150 mg dosage do not affect the great gingival inflammation.

The Spearman's correlation coefficient shows a positive correlation between IGZ with the medicament concentration, and the IDP, IGA and IGI for $r < 0.05$. Immunosuppression leads to inhibited resistance of the paradontal tissue complex towards activity of the plaque products which has an impact on the paradontal status.

The concentration of the cyclosporin in serum does not correlate with the apoptotic processes and the collagen proliferation, most probably because of the much lesser effect of the cyclosporine, in comparison to the chronic inflammation.

The statistical data processing showed existence of a significantly positive correlation between the IGZ and the expression of bcl-2, and Ki-67 for $r < 0.05$.

Inflammation plays the most important factor for the expression of apoptosis and proliferation in gingival tissues but it has a greater effect on the proliferative processes, rather than the apoptotic processes.

The removal of the local irritating factors and the reduction of gingival inflammation results in reduction of apoptosis in etiopathogenesis of periodontal destruction and gingival overgrowth.

Key words: cyclosporin, gingival overgrowth, apoptosis, bcl-2, p53, Ki-67.

ПРОЛИФЕРАТИВНИ И АПОПТОТИЧНИ ПРОМЕНИ КАЈ ГИНГИВАЛНИТЕ РАЗРАСНУВАЊА СТИМУЛИРАНИ ОД ЦИКЛОСПОРИН

Абстракт

Циклоспорин А-индуцираното гингивално зголемување од клинички аспект претставува актуелен проблем на ткивно-специфичен механизам кој сеуште не е во потполност разјаснет. Последниве години, особено внимание привлекува апоптозата, преку која се трасира потенцијално нов концепт во етиологијата на оваа многу честа клиничка промена. Всушност крајна цел на спроведената претрага е овозможување на нови терапевтски можности во превенција и третман на циклоспорин-зголемените гингивални ткива.

Базирајќи се на богатата, но неунифицирана литература ја поставивме и целта на овој труд: да ги дефинираме патогенетските процеси во хиперплазираното гингивално ткиво, да ја откриеме улогата на локалниот имунитет, степенот на експресија на bcl-2, p53, Ki-67 во зависност од дозата на медикаментот како и времетраењето на терапијата кај медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување.

За реализација на поставената цел, формирана е испитувана група од 84 бубрежно-трансплантирани пациенти поделена во четири подгрупи спрема дневната доза на циклоспоринот применет во терапевтски цели (100мг, 125мг, 150мг и 175мг). Контролната група ја сочинуваа 21 пациент со клинички дијагностицирана пародонтопатија, кои не беа подложени на било каква медикаментозна терапија која предизвикува гингивално зголемување (пред се циклоспорин А). За таа цел спроведовме клинички и параклинички претраги.

Клиничките испитувања беа остварени преку примена на следните индекси: индекс на дентален плак (ИДП), индекс на гингивална инфламација (ИГИ) по Loe-Silnes, индекс на гингивално зголемување (ИГЗ) според McGaw и сор. и индекс на губиток на атечмент (ниво на апикална миграција на припојниот епител).

Поставените параклинички испитувања се реализирани преку одредување на концентрација на циклоспоринот во крв (C2) со користење на флуоресцентно поларизациона имуно метода (FPIA).

Од сите пациенти вклучени во истражувањето, земен е ткивен исечок, и по извршената стандардна патохистолошка обработка, боен со хемалаун еозин за одредување на колаген, ретикулин, апоптотични клетки, морфометриски дебелината на гингивалниот епител. Кај групата испитаници беше спроведена семиквантитативна анализа каде е одредуван интензитетот на воспалителниот инфилтрат. Понатаму, ткивните пресеци се имунохистохемиски боени за одредување на експресијата на следниве протеини: bcl-2, p53 и Ki-67.

Добиените резултати се статистички обработени со методите на дескриптивна и аналитичка статистика, како и користен е Срегман-овиот коефициент на корелација.

Добиените наоди од спроведеното истражување укажуваат на фактот дека зголеменото гингивално ткиво, многу повеќе се должи на зголемување на стромата (заради депониран колаген), отколку на задебелениот епител. Дозите на медикаментот до 150мг, не влијаат врз силно изразена гингивална инфламација за разлика од дозите над 150мг кои се критични за високите вредности на овој индекс.

Spearman-овиот коефициент на корелација покажа позитивна корелација помеѓу ИГЗ со концентрацијата на медикаментот, со ИДП, ИГА и ИГИ за $p < 0,05$. Имуносупресијата доведува до инхибирана резистентност на пародонтално-ткивниот комплекс кон активноста на плак-либерираните продукти што се реперкуира врз пародонталниот статус. Концентрацијата на циклоспоринот во серум не корелира со апоптотичните процеси и пролиферацијата на колагенот, веројатно поради многу послабот ефект на циклоспоринот, во однос на хроничната инфламација.

Статистичката обработка на податоци укажаа на постоење сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГЗ и експресијата на bcl-2, p53 и Ki-67 за $p < 0,05$.

Инфламацијата е најзначаен фактор во експресијата на апоптозата и пролиферацијата во гингивалните ткива, но таа има посилен ефект врз пролиферативните процеси, отколку врз апоптотичните процеси.

Отстранувањето на локалните иритирачки фактори и намалувањето на гингивалната инфламација води кон намалување на апоптозата во етиопатогенезата на пародонталната деструкција и гингивалното разраснување.

Клучни зборови: циклоспорин, гингивално зголемување, айдиопатоза, bcl-2, p53, Ki-67

Вовед

Медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување претставува несакан ефект кој може да биде предизвикан од повеќе медикаменти од кои најчести се: имуносупресиви, антиепилептици, калциум (Ca^{+2}) блокатори и други. Тргувајќи од првите сознанија кои известуваат за циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување, во текот на патогенетските истражувања следат повеќе клинички и лабораториски проследувања чија крајна цел е разјаснување на патогенезата на ова заболување.

Иако дел од студиите укажуваат на повеќе фактори кои партиципираат во патогените случувања на гингивалното зголемување, вреди да се апострофираат следните: дозата, серумската и саливарната концентрација на медикаментот, времетраење на терпијата, оралната хигиена, како и возраста на секој поединец. Сепак одредени разлики во генетскиот капацитет на домаќинот, чувствителност на гингивалните ткива, примарната гингивална состојба, вклучувајќи ја и инфламацијата, можат да варираат и дополнително да го отежнат расветлувањето на оваа многу честа патологија.

Еден од најчестите причинители на гингивалните хипертрофични и хиперпластични случувања е терапијата со циклоспорин А. Овој медикамент вообичаено се применува при бубрежните трансплантации, па согласно со тоа, кај овој профил на пациенти гингивалното зголемување е многу чест локален клинички наод. Имено, циклоспоринот е имуносупресив кој е откриен од страна на Bogel (14). Медикаментот е метаболит на габи и се добива со ферментација на специесите: *Trichoderma polysporum* и *Cilindocarpon lucidum*.

Експерименталните студии покажуваат дека циклоспоринот го супримира клеточниот-имун одговор, но нема ефект на хуморалниот одговор. Понатаму, Т-помошните клетки се повеќе афектирани, отколку супресорните клетки кое резултира во нарушен баланс на Т-супресор клетките и е причинител на имуносупресијата. Неафектираните Б-клеточни линии овозможуваат интактен хуморален имун одговор кон бактериските патогени. Циклоспоринот ја инхибира пролиферацијата на Т-лимфоцитите стимулирана со одредени антигени или митогени (26).

Познато е дека фармакокинетиката на циклоспоринот и нифеდიпинот се должи на регулација на калциум, како и синтеза и ослободување на колагеназата. Останатите металлопротеинази се ослободуваат од фибробластите, процес кој е зависен од нивото на калциум (30).

Иако патогенезата е недоволно разјаснета, во студиите кои ги консултираме се претпоставува дека фибробластичниот гингивален супстрат е последица на нарушена хомеостаза на колагената синтеза и деградација, особено на колаген тип I, резултирајќи во зголемена акумулација на колагени фибри, екстрацелуларен матрикс и неколку инфламаторни клетки во гингивалното сврзно ткиво. Овие претпоставки се потврдени со имунохистохемиски анализи на експериментални модели на стаорци третирани со циклоспорин А (85).

Во суштина метаболизмот на колагенот прецизно е балансиран преку колагената синтеза и деградација во одржување на ткивниот волумен. Schincaglia и сор. (85) во своите истражувања се согласни за постоење на стимулаторен ефект на циклоспоринот на хуманите гингивални фибробласти, за разлика од James и сор. (47) кои посочуваат за неафектирана или инхибирана колагена синтеза после спроведен циклоспорински третман.

Колагената деградација може да има двојно потекло. Од една страна екстрацелуларна преку инволвирана секреција на колагеназата, а од друга страна интрацелуларна со фагоцитоза на фибробластите.

Намалената ткивна ресорпција, како механизам кој води кон медикаментозно- зголемена гингива привлекува посебно внимание во последните години. Сврзно-ткивниот „turnover“ во гингивалните ткива е особено висок и деструкцијата на екстрацелуларниот матрикс се случува како резултат на дејството на екстрацелуларните протеинази, намалена MMP активност, и преку фагоцитоза и интрацелуларна деструкција на екстрацелуларните матрикс компоненти со лизозомални ензими (100).

In vitro студиите покажаа дека циклоспоринот ја инхибира продукцијата на лизозомалната протеиназа катепсин L, но не и катепсин B, во хуманите гингивални фибробласти (10). Исто така во досегашните

студии докажано дека циклоспоринот може да ја инхибира фагоцитозата на тип 1 колагенот во *in vitro* и *in vivo* услови (54).

Главна карактеристика на сите медикаментозно-индуцирани гингивални разраснувања е зголемување на сврзно-ткивниот матрикс, кој се должи на промени во сврзно-ткивната хомеостаза. Колагената продукција која е последица на активноста на гингивалните фибробласти е контролирана од страна на координативни колагени регулаторни механизми, вклучувајќи и интрацелуларна деградација. Во понатамошниот процес контролата се остварува со синтеза и ослободување на металопротеинази и ткивни инхибитори на металопротеинази (TIMPs) (5).

Секоја промена во синтезата и ослободувањето на колагената од фибробластите може да води кон деструкција на колагенот. Нарушената рамнотежа помеѓу овие два процеси, во интерес на зголемена продукција на колаген е глобално кажано причина за гингивалното зголемување.

Циклоспоринот влијае на растот и функцијата на фибробластите и епителните клетки директно и индиректно. Регулацијата на овие процеси во најголема мера се зависни од повеќе цитокини и хемокини кои се ослободуваат од инфламаторните клетки, макрофаги и лимфоцити, а донескаде и од фибробласти. Пролиферацијата и диференцијацијата на сврзно-ткивните клетки и продукцијата на екстрацелуларниот матрикс се контролирани од страна на цитокини кои иницираат сигнални каскади со помош на специфични рецептори.

Иако одредени студии покажуваат зголемско ниво на специфични цитокини и фактори на раст кај медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување како IL-6, IL-1 β , PDGF- β , FGF-2, TGF- β , CTGF- β , сепак не е постигнат консензус околу функционалната врска меѓу имуномодулаторниот ефект на медикаментот, дистрибуцијата на специфичните имуни клетки и алтерираниот цитокин баланс. Редукција во бројот на Лангерхансовите клетки кај циклоспорин третирани ткива, укажува на модифицирана инфламаторна реакција која влијае на нивото на помошните Т-клетки и цитокиниот профил (46, 55, 63).

Инфламаторната клеточна популација која е алтерирана како резултат на примената медикаментозна терапија, се смета дека е

одговорна за модифицираниот ткивен одговор. Циклоспорин-А го стимулира нивото на циркулирачкиот TGF- β *in vivo* (32), и ја зголемува продукцијата на TGF- β во реналните клетки и лимфоцитите. Ова резултира во зголемена синтеза на колаген екстрацелуларен матрикс и негов депозит во бубрежните гломерули. Овие факти се потврдени со примена на анти-TGF- β антитела кои конечно ја блокираат бубрежната фиброза и дисфункција (Wondimu). Тргувајќи од овие претпоставки се очекува висока експресија на TGF- β и неговиот долно регулиран CTGF кај високо инфламираните циклоспорински ткива. Но, спротивно од овие очекувања, циклоспоринските ткива се високо инфламрани (95), и не покажуваат висока експресија на TGF- β или CTGF, воедно немаат висок степен на фиброза. Овие резултати се изненадувачки, но индицираат интеракција меѓу оралните бактерии и гингивалните клетки и ткива кои реагираат на единствен начин претставен со релативно висок интензитет на инфламација и целуларитет компариран со останатите форми на гингивално зголемување. Тоа значи дека нарушениот баланс на цитокините сам по себе не го објаснува процесот на гингивалното зголемување.

Во тој процес се претпоставува дека гингивалниот епител игра важна протективна улога кон бактериските инфекции и механичката траума. Кератиноцитите претставуваат доминантни клетки во епидермисот, конституирајќи 90% од гингивалната клеточна популација. Самообновувачкиот капацитет на гингивалниот епител води кон гингивална одбрана, која следи по континуираната десквамација на суперфицијалните епителни клетки која превенира бактериска колонизација. Затоа секоја промена во нивото на клеточниот *turn over* на гингивалниот епител може да ја афектира прогресијата на пародонталните заболувања.

Cetinkaya. и сор. (24) велат дека, медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување е асоцирано со хиперпластични промени на гингивалниот епител, но и фибробластични активности во *lamina propria*. Се уште не е сосема јасно дали пролиферативниот ефект се одигрува во мукозниот епител или во субепителното сврзно ткиво. Волуминозната

густина на оралниот епител е сигнификантно повисока кај циклоспорин А-индуцирано гингивално зголемување компарирано со не-третирани пациенти.

Wondimu и сор. (98) сметаат дека зголемениот гингивален епител кај пациенти третирани со нифедипин и циклоспорин-А се должи на зголемување во спинозниот слој. Odile и сор. (72) известуваат за постоење различен степен на пролиферација кај кератиноцити изолирани од здрави и инфламирани хумани гингивални ткива. Nurmenniemi и сор. (69) забележале задебелен епител кој кај циклоспорин-индуцираните гингивални зголемување се асоцирани со зголемена митотска активност, особено во оралниот епител.

Развојот на гингивалното зголемување е асоцирано со гингивална инфламација, каде е документирана зголемена инфилтрација на мононуклеарни клетки во сврзното ткиво, за кои се верува дека директно или индиректно учествуваат во патогенезата на медикаментозното алтерирање на сврзното ткиво (70). Активираниите макрофаги/моноцити учествуваат во продукција на $\text{TNF-}\alpha$, кој покажува зголемени вредности кај инфламирана гингива, а воедно ја стимулира колагеназната активност во гингивалните фибробласти како и биосинтезата на простагландин E_2 (PGE_2). Инфламаторните клетки кои се алтерирани како резултат на медикаментозната терапија, можат да го модифицираат гингивалниот ткивен одговор.

Испитувањата насочени кон откривањето на механизмот на гингивалното зголемување, укажуваат на јака инхибиција на циклоспорин А во продукција на PGI_2 во *in vitro* и *in vivo* студиите. PGI_2 го продуцира гингивалното ткиво и има антипролиферативен ефект. Ниската вредност на PGI_2 резултира во намалено ниво на cAMP и последователно зголемена митотска активност и клеточна пролиферација (67).

Инхибираната продукција на интерлеукините и последователното делување се потентни стимулатори во колагеназната продукција на фибробластите (74).

Хипертрофираното и хиперплазирано гингивално ткиво од клинички аспект е причина најнапред за создавање лажни пародонтални

цепови, а подоцна и до миграција на прикрупениот епител кон апикално и создавање на длабоки пародонтални цепови. Во првиот, но и во вториот случај во пародонталните цепови се акумулира голема количина на дентален плак, кој тешко се елиминира, а од свој аспект, ја продлабочува веќе настанатата пародонтална лезија.

Тргувајќи од овие сознанија површинските пародонтални ткива се постојано изложени на комбинирана анаеробна Gram⁻ флора која може да индуцира инфламаторни одговори, кои пак водат кон деструкција на забно-потпорниот апарат односно, предизвикуваат пародонтална афекција. Во суштина одржување на пародонталното здравје зависи од одржување на соодветен еквilibrium на бактерии (38). Постоенето на високо ниво на епителниот клеточен turnover и високо регулираниот локален имун одговор може да се каже дека се одговорни за спречување пенетрација на патогените микроорганизми во гингивалните ткива Page (75).

Истражувањата потврдуваат дека акумулацијата на инфламаторните клетки од бактериите е зависна од селективна активација во субепителната капиларна мрежа кон експресија на специфични леукоцитни адхезивни молекули Mucosal (64). Понатаму со помош на дијапедеза, полиморфонуклеарните леукоцити мигрираат кон припојниот епител на гингивата водени спрема градиентот од хемотактични и хаптотактични молекули и подготвени да одговорат на бактерискиот предизвик. Поголем дел од мононуклеарните клетки, пенетрираат во периваскуларното сврзно ткиво и формираат инфламаторен инфилтрат кој главно е составен од специфични субсепови на Т клетки, Б клетки, и макрофаги. Наспроти хроничната природа на бактериските стимули, кај здрави индивидуи степенот на инфламаторниот инфилтрат останува прилично константен преку целиот живот. Заради тоа неопходно е постоење на специфични механизми кои се одговорни за негово одржување и покрај постојаниот инфлукс на леукоцити. Се претпоставува дека еден од овие механизми би можел да биде и програмираната клеточна смрт на ткивото така наречена апоптоза.

Апоптозата е програмирана клеточна смрт која резултира во елиминација на специфични клетки без да предизвика нарушување на ткивната структура или функција. Апоптозата е имплицитирана во широк дијапазон на билошки феномени, вклучувајќи ги и инфламаторните одговори. Овие процеси се во постојана динамика, која е зависна од различни влијанија како присуство на фактори на раст, цитокини, бактериски и вирусни инфекции, како и промени во имуниот одговор на домаќинот (7).

Продукти на два гени, кои ги енкодираат протеините p53 и bcl-2, имаат фундаментална улога во овие процеси. Протеинот bcl-2 има улога да ја превенира или значајно да ја редуцира смртта на соодветната клетка индуцирана од различни стимули. Во физиолошки услови, експресијата на bcl-2 е асоцирана со помалку диференцирани клетки како и со клетки кои се во фаза на терминална диференцијација. Кај овие клетки bcl-2, ја превенира апоптотичната клеточна смрт и со тоа придонесува во ткивниот развој, клеточната матурација, и терминалната диференцијација.

Спротивно од bcl-2, тумор супресивниот ген p53, чија експресија може да индуцира апоптоза во клетките, е поврзан со сите форми на инхибиција на клеточната репликација. Неговата експресија е есенцијална за апоптотичните одговори при случаи на акумулација на ДНК оштетувања. Експресијата на p53 е исто така поврзана и со регулација на ткивната динамика преку индукција на апоптозата во терминалната фаза на диференцирање на клетките вклучувајќи ги и инфламаторните клетки (78).

Всушност апоптозата претставува физиолошки начин на смрт на нуклеотидните клетки. Таа е високо регулирана форма на програмирана клеточна смрт, дефинирана преку одредени морфолошки и биохемиски карактеристики кои водат кон одржување на ткивната хомеостаза. Изолирани се бројни апоптотични регулаторни гени кои се прв доказ за тоа дека клеточната смрт е активен процес кој е под генетска контрола (2).

Денес е јасно дека многу заболувања се карактеризираат со дисрегулација на апоптотични програми. Многу од нив инволвираат

фамилија од рецептори и лиганди. Дисрегулацијата на апоптозата се јавува како нов концепт во толкувањето на важните карактеристики во развојот на повеќе заболувања со воглавно непозната етиологија. Нерегулираната апоптоза може да биде причина за повеќе дегенеративни и автоимуни заболувања (AIDS, Алцхајмерова болест, пародонтопатија) кој се карактеризираат со губење на нормалните или протективните клетки. На пр. милиони автореактивни Т и В клетки се продуцираат од имуниот систем и секојдневно на ваков начин се елиминираат (3).

Животот на една клетка постојано е зависен од сигналите што при тоа ги добива: стимулаторни или смртоносни. При настапување на смрт на една клетка, се случува диференцијација и оформување на други клетки и ткива (ембриогенеза), кои понатаму подлежат на функционално организирање и одржување на ткивата во живот. Доколку од одредени причини настане супресија на смртните сигнали, доаѓа до енормен раст на ткивата како кај карциномите, неуродегенеративните, автоимуните заболувања и останати состојби. Клеточната делба и клеточната смрт го одржуваат балансот меѓу клеточната популација во организмот.

Процесот на апоптоза може да биде модулиран преку различни стимули, вклучувајќи хормони, цитокини, фактори на раст, бактериски, вирусни инфекции, и имуни одговори. Неодамнешните студии демонстрираат дека апоптозата е зависна од фамилија на цистеин протеинази, наречени каспази, кој се познати како иницијаторни или ефекторни каспази (7).

Интрацелуларната регулација на апоптозата и каспаза 3 играат главна улога во ослободување на активирачки сигнал. Всушност, присуство на клетки позитивни за активна каспаза-3, се индикатори за активирана апоптоза. Akt/P13 киназа ја регулира генската експресија преку контрола на Forkhead (FOXO) транскриптивни фактори. Со активација на овие фактори преку дефосфорилација, доаѓа до стопирање на клеточниот циклус и до алтерации во енергетскиот метаболизам, со што FOXO факторите играат значајна улога во регулација на пролиферацијата и оксидативниот стрес. Активацијата на FOXO протеините резултира во индукција на апотозата, додека нивна

инактивација предизвикува пореметен баланс меѓу клеточната пролиферација и клеточната смрт, и понатаму води кон туморогенеза преку промовирање на клеточниот раст и клеточното преживување (3).

Иако присуството на бактериски патогени се смета за важен фактор во процесот на иницијација на гингивалните промени, комплекс од инфламаторни и имуни одговори имаат критична улога во прогресија на гингивалното зголемување. При тоа апоптозата учествува во регулација на инфламаторните и ткивните имуни одговори. Во текот на овој процес, серија координативни морфолошки и биохемиски процеси се одигруваат во афектираните клетки, резултирајќи во нејзина смрт и последователно отстранување со фагоцитоза.

Регулацијата на апоптозата може да биде од ендогени или егзогени регулациски фактори. Експериментите како *in vivo* така и *in vitro* на администрација на цитокини, покажаа дека PDGF и IGF се важни преживувачки фактори кај одредени клеточни популации (46). И лимфоцитите во одсуство на IL-2 претрпуваат апоптотични промени. Покрај цитокините во литературата се опишуваат и други фактори кои ја регулираат апоптозата, како промени во концентрацијата на калциум, магнезиум, бактериски липолисахариди, имунолошки процеси, простагландини, слободни радикали, TNF и останати фактори.

Апоптозата претставува еден сосема динамичен процес, чиј краен ефект е интеракција од бројни целуларни регулатори и различни модулатори. Степенот на апоптозата и нејзините крајни ефекти се под влијание на фамилија од 16 протеини од кои најзначајни се: bcl-2, p53 и каспазите (17).

bcl-2 е протоонкоген кој претставува рецептор на мембраните на митохондриите, ендоплазматскиот ретикулум и нуклеусот, и на таков начин ја детерминира активноста на овие органели. При апоптоза доаѓа до промени во електрохемиските процеси на овие органели, кои водат кон промени во волуменот на клетката, пореметен сооднос на калциум, како и пореметен проток на митохондрочни ензими во цитоплазмата на клетката (19).

Според Bulut (19) поголемо присуство на bcl-2 позитивни епителни клетки постои кај биопсии од пациенти кои биле третирани со медикамент, за разлика од останатите биопсии кои не биле третирани со медикамент, индицирајќи дека постои можност за учество на bcl-2 во развојот на гингивалната хиперплазија.

bcl-2 се смета дека е инхибитор на активацијата на каспаза-9, а со тоа и инхибитор на клеточната смрт. При состојби на зголемена експресија доаѓа до клеточно преживување, а со тоа и до туморогенезни состојби. Иако се смета дека циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување не е поврзано со туморогенезата, неодамнешните случаи покажуваат дека сквамозниот клеточен карцином може да произлезе од гингивалната хиперплазија индуцирана од циклоспорин и фенитоин. Можните импликации меѓу патогенезата на ова заболување и туморогенезата, сеуште не е јасна (8).

Експресијата на p53 протеин кај гингивалната хиперплазија сугерира дека во патогенезата на ова заболување е инволвирано оштетување на ДНК, додека спречениот раст кој се забележува кај хиперпластичниот епител со експресија на Ki-67 антиген, може да ја превенира инвазивната експанзија на епителните клетки во гингивалните ткива и последователно да ја супримира туморогената прогресија (8).

p53 е протеин кој е трансактиватор на многу гени, и при оштетувања на ДНК на клетката доаѓа до негова активација, а со тоа и до отпочнување на апоптотичниот процес. Овој протеин го контролира степенот на оштетување на една клетка, и со тоа одредува дали ќе започне смртниот процес или не (20).

Во процесот на заздравување на рана, транзиторната форма на гранулационо ткиво во ремоделирачко ткиво се одвива со апоптозата на фибробластите. Рани кај кои не постои соодветна апоптоза, може да резултираат во формирање на фиброзно ткиво. Тргувајќи од овој факт, сосема е возможно процесот на модулирана апоптоза да претставува етиолошки фактор кај зголемените гингивални ткива.

Балансот меѓу клеточната пролиферација и апоптоза може да претставуваат карактеристики на различни форми на гингивално

зголемување, и варијации на овој баланс можат да дадат нови насоки кај различни етиологии на гингивално зголемување. На пр. кај фенитоин-индуцираното гингивално зголемување и наследната гингивална фиброматоза, се сретнува многу поголема фиброза отколку кај останатите форми на гингивално зголемување (84).

Про-и анти-апоптотичните фактори ја детерминираат осетливоста или резистентноста од апоптозата и последователно играат улога во еволуција, пропагација и хроничитет на дегенеративните, канцерогените и автоимуните заболувања. На таков начин се овозможува прецизна идентификација на евентуални грешки во комплексната машинерија на апоптозата, која дава разјаснувања околу етиопатогенезата на повеќе заболувања, а со тоа и овозможување на нивен специфичен и ефикасен третман. Денес најголема надеж, секако дека претставува интерферирањето во апоптозната регулација, а со тоа и развивање на нови терапевтски можности.

Специфични цитокини, фактори на раст, како и соодветни метаболити на циклоспоринот, можат директно да ја иницираат апоптозата во клетките на домаќинот. Од друга страна пак, повеќе пародонтални патогени како *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, и *Eikenella Corrodens* присутни во денталниот плак можат да индуцираат цитотоксични реакции на повеќе клеточни компоненти во пародонтот. Имајќи го предвид цитотоксичниот ефект на бактериите на клеточните култури, се верува дека апоптозата има улога во патогенезата на пародонталните заболувања (73).

Липополисахаридите како заедничка компонента на клеточниот ѕид на грам- бактерии, стимулира синтеза на бутрична киселина која ја започнува апоптозата во периферните моноклеарни клетки, и ослободува токсин кој индуцира апоптоза на Б лимфоцитите присутни во гингивалните ткива. Индукцијата на апоптозата во клетките на домаќинот е провоцирана од одредени патогени, или нивни продукти, феномен кој е инволвиран во патогенезата на пародонталните заболувања. Фагоцитозата на бактериите или експозицијата кон бактериските компоненти како на пример липополисахаридите, можат да ја одложат програмираната

клеточна смрт на терминално диференцираните полиморфонуклеарни леукоцити (7).

Berker (11) демонстрира дека апоптозата на неутрофилите ослободува сигнал кон моноцитите, менувајќи го фенотипот на моноцитите резултирајќи во продукција на антиинфламаторни цитокини и супресија на проинфламаторните цитокини како одговор на бактериските липополисахариди.

Имуниот систем има есенцијална улога во патогенезата на пародонталните заболувања, па затоа интересот на пародонтолозите за медикаментите кои го алтерираат (супримираат) имуниот систем е сосема рабирлив. Инфламаторните пародонтални заболувања се карактеризираат како локални и периферни инфекции инволвирајќи мултипли специеси од Gram⁻ организми.

Локалниот имун одговор вклучува реакција на неутрофилите, соодветно ослободување на инфламаторни медијатори и цитокини, кои имаат важна улога во патогенезата на пародонталното заболување. Механизмот кој е одговорен за гингивалното оштетување сеуште е нејасен во потполност, иако се познати имуно-посредуваните реакции и директниот цитотоксичен ефект на бактериите кои се инволвирани во процесот на гингивалните лезии.

Saymour и сор. (88) испитувајќи го ефектот на циклоспоринот и пародонталниот комплекс, смета дека гингивалните промени настануваат како резултат на интеракција меѓу денталниот плак, неговите продукти и медикаментот и претставуваат резултанта од инфламаторните и имунолошките промени во пародонталните ткива. При тоа циклоспоринот се јавува во улога на модулатор на квалитетот на инфламаторниот одговор, афектирајќи ја природата на целуларниот инфилтрат или либерацијата на различни цитокини, простагландини и фактори на раст.

ЦСА влијае на растот и функцијата на гингивалните фибробласти и епителните клетки директно и индиректно. Овие процеси се регулирани преку цитокини и фактори на раст, а експресијата на овие медијатори и нивните кореспондирачки рецептори се смета дека се од фундаментално значење во патофизиологијата на ГЗ.

Неодамнешните испитувања даваат податоци за ЦсА-модулираната апоптоза која може да партиципира во патогенезата на ГЗ. Апоптозата претставува процес на физиолошки начин на смртта на сите нуклеотидни клетки, но во исто време таа уште се нарскува и програмирана клеточна смрт.

Последните децении, таа е особено атрактивна за научниците, која нуди разјаснуања околу етиопатогенетските збиднувања на повеќе заболувања, а со тоа можност за развој на специфичен и ефикасен третман во нивното лекување. Варијации во балансот меѓу клеточната пролиферација и апоптозата, претставува еден сосема веројатен модел во однос на етиологијата на ГЗ.

Бројни идиопатски, патолошки, и фармаколошки реакции може да резултираат во разраснување на гингивата.

McGaw и сор. (60) денталниот плак го сметаат за локално депо на циклоспорин, кој води кон супресија на имуниот одговор во гингивалниот епител. Епителните клетки посебно кератиноцитите и Лангерхансовите клетки (антиген - презентирачки клетки) стапуваат во директен контакт со денталниот плак, кој како "локален извор" за циклоспорин врши интраепителен депозит на медикаментот и супресија на имуниот одговор во гингивалниот епител.

Намалениот број на Лангерхансовите клетки кај циклоспорин-зголемената гингива, сугерира за модифицирана инфламаторна реакција која влијае на нивото на Т-помошните лимфоцити и цитокиниот профил во гингивалните ткива (90). Лангерхансовите клетки играат улога во иницијација и развој на гингивалната инфламација при што нивниот број и дистрибуција следен преку CD1 или HLA-DR е зголемен соодветно према степенот на хиперплазија (91, 45).

Спротивно на нив група автори (45) известуваат за намален број на CD1 со сигнификантно намалување на АТР-азната активност на Лангерхансовите клетки која се одигрува кај пародонталните заболувања за разлика од здрав гингивален епител. Тие сугерираат дека со прогресија на пародонталното заболување (одреден према губењето на колагенот) бројот на Лангерхансовите клетки се намалува поради нивната миграција

кон сврзното ткиво и овој редуциран број истовремено ја превенира имуната хиперстимулација.

Ефектот на ЦсА на смртта и пролиферацијата на гингивалните фибробласти беше испитувана и во *in vitro* студиите на Fujimori et al. (35) со цел појаснување на механизмот на ГЗ кое е асоцирано со хроничната употреба на имуносупресивната терапија. Тие утврдуваат дека клеточната смрт била инхибирана и истата се одвивала зависно од медикаментозната концентрација.

Buduneli et al. (15) тргнувајќи од фактот дека медијаторите на апоптозата учествуваат во патогенезата на ГЗ, го испитувале нивото на p53, bcl-2, и IL-15 во гингивалниот флуид кај ЦсА третирани пациенти. Вредностите на p53 и bcl-2 во гингивалниот флуид биле минимални и практично недектибилни, додека вредностите на IL-15 биле сигнификантно повисоки кај ЦсА пациенти со и без ГЗ како и кај групата со гингивит, за разлика од здравите пациенти. Додека вредноста на IL-15 кај ЦсА е пониска во однос на групата со гингивит без медикаментозна апликација, но без постоење на статистички значајна разлика. IL-15 има улога во патогенезата на ГЗ кај пациентите со циклоспорин кое се должи на неговата интеракција со медикаментот и неговата улога во апоптозата и инфламацијата (16).

Литературен преглед

Инспирирани од бројните, но прилично различни откритија во овој домен, за многу истражувачи и научни соработници, посебен предизвик биле гингивалните ткивни зголемувања. На тој план, посебен осврт е даден на хиперплазираната и хипертрофирана гингива која според нив најверојатно е последица на интеракцијата на медикаментот и домаќинот, но и неговата улога во апоптозата и инфламацијата. Информациите кои потекнуваат од литературата се бројни, но нивната заедничка одлика е хетерогеност.

Во стручната литература се објавени повеќе стручни и научни публикации кои ја потврдуваат асоцијацијата помеѓу гингивалното зголемување и примањето на циклоспорин. Исто така, на дофат ни се податоци кои ја промовираат врската помеѓу инхибирана апоптоза и хиперпластичи и хипертрофични промени на гингивата. Во врска со ова следи богат литературен преглед кој фрла светло кон разјаснување на патогенетските механизми на ткивните гингивални разраснувања.

Гингивалните ткива генерално се наоѓаат во состојба на алтерација и репарација која инволвира репетитивни циклуси од продукција на хемотактични фактори, инфламаторни клетки, ткивна ресорпција и ремоделација. Колагениот turnover е необично висок во пародонталните ткива и тој е контролиран од хемокините и цитокините кои се ослободени од инфламаторните клетки како макрофагите, лимфоцитите и во помал степен од фибробластите (51).

Сеуште во потполност не е сигурно дали зголемената реактивност кон циклоспоринот *in vitro* е последица на генетски пренесена осетливост кон медикаментот или е секундарен ефект од долготрајното *in vivo* изложување со циклоспоринот.

Детерминирање на вистинската инциденца е многу сложена поради бројни конфузни варијабли меѓу испитуваните субјекти, влучувајќи разлики во дозата на медикаментот, неговата концентрација во плазмата, времетраењето на терапијата, методот на нотирање на гингивалното зголемување, пародонталниот статус (особено инфламаторната компонента), возраста на пациентите, здравствениот статус, како и употребата на останати медикаменти.

Ramon et al. (80) во своите истражувања, забележале зголемени слоеви на оралниот епител за 5 до 10 пати кај нифедипин - третирани пациенти во однос на контролните здрави пациенти. Волуменската густина на оралниот епител е сигнификантно повисока кај ЦсА-третирани пациенти во споредба со пациенти кои не се третирани со медикамент. Nurmenniemi et al. сметаат дека зголемените слоеви на епителот се асоцирани со митотската активност во оралниот епител. Други студии известуваат дека, нивото на кератиноцитниот фактор на раст беше зголемено кај ЦсА ГЗ, и авторите сметаат дека кератиноцитниот фактор на раст може да има важна улога во зголемената епителна пролиферација асоцирана со ГЗ Nurmenniemi (69).

Гингивалните ткива се изложени на многу повисока концентрација на медикаментот во споредба со останатите ткива преку богатата васкуларизација и епителот во оралната празнина. ЦсА влијае на растот и функцијата на гингивалните фибробласти и епителните клетки директно и индиректно. Овие процеси се регулирани преку цитокини и фактори на раст, а експресијата на овие медијатори и нивните кореспондирачки рецептори се смета дека се од фундаментално значење во патофизиологијата на ГЗ (6, 79).

Приближно 30% од пациентите кои примаат циклоспорин А (CsA) и 6-20% од пациентите кои примаат нифедипин, покажуваат клинички манифестно гингивално зголемување со различни варијации. Фреквенцијата на пациентите со ЦсА во одредени случаи се движи и до 85% зависно од дијагностичките критериуми. Според студијата на Varga и Mariani (96, 59) инциденцата се движи и до 82,2%. Заедничката употреба на ЦсА и нифедипин ја зголемува можноста за развој на гингивално зголемување Nurmenniemi (71). Клиничките студии сугерираат дека детската популација и адолесцентите се особено чувствителни, во споредба со возрасните пациенти. Тој смета дека гингивалното зголемување почесто се јавува кај деца отколку кај возрасни, и притоа тој ја поставува хипотезата за можна корелација меѓу циклоспоринот, половите хормони и гингивалните фибробласти.

Евидентно е дека овој несакан ефект не се јавува кај сите пациенти подложни на оваа терапија. Ваквите интер - индивидуални разлики во гингивалните

промени веројатно се должат на генетската предиспозиција. Seymour, Hitzig (88, 45) го имплицираат протективниот ефект на HLA-DR1 спроти ЦсА-индуцираното гингивално зголемување, додека HLA-DR2 претставуваат ризик фактори за развој на гингивалното зголемување.

Постоењето на две различни клеточни популации на фибробласти е докажано и со користење на флуоресцентна форма на циклоспорин, при што 35% од клеточната популација на фибробластите не покажала поврзување со флуоресцентниот циклоспорин, додека 41% се поврзале и покажале одговор манифестиран како зголемена синтеза и пролиферација (4). Овие ефекти биле модифицирани со додавање на супернатанти од лимфоцитните култури, иницирајќи ја можната интеракција меѓу лимфоцитните продукти и гингивалните фибробласти.

Повеќе истражувања даваат податоци за хетерогени одговори на гингивалните фибробласти кон ЦсА или калциум блокатори. Степенот на клеточната пролиферација беше зголемен, намален или непроменет кај различни клеточни видови и различни медикаментозни концентрации.

Сеуште постојат контроверзи околу асоцијацијата на гингивалното зголемување и медикаментозните варијабли. Некои автори иницираат постоење на корелација меѓу степенот на гингивалната хиперплазија и дозата на циклоспоринот (26) додека други автори известуваат за спротивни наоди (60). Paik и сор. се согласуваат дека е потребна одредена иницијална концентрација на медикаментот во серум, за да се постигне ефектот на зголемена гингива, при што сугерираат поголема серумска концентрација, побрз одговор на гингивата (76).

Тргнувајќи од фактот дека циклоспоринот се секретира преку плунка, повеќе студии го испитувале ефектот на саливарната концентрација на циклоспоринот и развојот на гингивалното зголемување. Но, исто како и со серумската концентрација на циклоспоринот, останува неизвесно дали локалната концентрација на медикаментот игра значајна улога во гингивалното зголемување. Директна релација меѓу степенот на гингивалното зголемување и циклоспоринската концентрација во стимулирана плунка била демонстрирана во

испитувањата на Hassell (44), а спротивно од нив, за слаба корелација меѓу нестимулирана саливарна циклоспоринска концентрација и гингивално зголемување известуваат King и sor. (57).

Овие конфликтни резултати ги објаснуваат преку способноста денталниот плак да учествува како локален резервоар на циклоспорин, кој се ослободува со дејството на стимулираната плунка.

Зголемената секреција на глюкозаминогlukanите индуцира зголемена густина на негативен електрицитет кој ги привлекува осмотски активните катјони како натриум, кој води кон привлекување на големо количество врзувачка вода, и последователно висок волумен и зголемен осмотски притисок во екстрацелуларниот матрикс (93).

Во студијата на Varga (96), кај сите пациенти кои имале силно развиена форма на гингивално зголемување, истото постоело и пред трансплантацијата каде што отсутствувала циклоспоринската терапија. Авторите сметаат дека особено ризичен фактор претставува постоечката гингивална инфламација и хиперплазија.

Овие испитувања се во согласност и со Echelard и sor. (31), кои испитувајќи го степенот на инфламација на здрава и циклоспорин-индуцирана гингива користеле инфламаторни маркери познати како протеин S-100A8 и S-100A9 и утврдиле сигнификантна инфламација во сврзното ткиво кај третираната гингива споредено со здрава гингива. Оралните бактерии и гингивалните клетки и ткива, кај пациентите кои примаат циклоспоринска терапија реагираат на специфичен начин кој се манифестира со релативно високо ниво на инфламација и целуларитет, спореден со другите форми на гингивално разраснување.

Тргнувајќи од податокот за постоење на позитивен тераписки ефект на азитромицинон применет кај ГЗ, Harald et al. (42), ја поставуваат тезата дека во етиопатогенетските збиднувања на ГЗ се вклучени микроорганизмите. Во своето истражување, тие ја потврдуваат инфекцијата со *Chlamydia pneumoniae* како високо превалентна во зголемените гингивални делови. Инфекцијата може да перзистира долг период во резидуалните гингивални лезии, дури и по завршување на

терапијата со азитромцин. Со тоа авторите потврдуваат дека имunosупресивната терапија со циклоспорин ја зголемува можноста за инфекција со *Chlamydia pneumoniae* и надвор од кардиоваскуларните ткива.

Romito et al. (83) покажуваат дека колонизацијата на *Micromonas* micго во гингивалните партии може да учествува во процесот на гингивално зголемување, преку постоење на статистички позитивна корелација.

Група автори Trackman (94), по пат на имунохистохемиски анализи на цитоскелетонот кај нормални и хипертрофирани гингивални фибробласти третирани со циклоспорин и TGF β ₁ и контролни здрави фибробласти, не покажаа некакви морфолошки разлики меѓу третираните и контролните клетки, без присуство на неопластични клеточни линии. Биохемиските промени во екстрацелуларниот матрикс, авторите сметаат дека повеќе се предизвикани од цитокините (TGF β ₁), отколку од циклоспоринот. Циклоспоринот не индуцира морфолошки промени во фибробластните култури добиени од хипертрофирана и нормална гингива.

Хистолошки, медикаментозно-индуцираното ГЗ е асоцирано со задебелен епител, издолжени траки и присуство на фиброза во ламина проприа со зголемен број на фибробласти. Фиброматозата се развива како резултат на зголемено ниво на пролиферација и екстремна продукција на екстрацелуларни матрикс компоненти како колагенот од страна на фибробластите. Во одредени органи таа може да претставува сериозна компликација која може да има смртни последици. Фибробластите најчесто се претставени како физиолошки инертни клетки кои се поврзани со стромалната функција, овозможуваат механичка подпора, ги исполнуваат раните и останатите ткивни дефекти.

Новите студии од бројни лаборатории, говорат нешто сосема поинаку. Имено, тие сметаат дека ова сваќање за фибробластите како физиолошка подпора е доста наивно. Во нормални физиолошки услови, фибробластите стапуваат во интеракција со екстрацелуларниот матрикс и се субјект на системските фактори, поврзани или не со инфламацијата. Тие ја афектираат пролиферацијата, продукцијата на колаген и матрикс металопротеиназите, експресија на различни

рецептори, и секреција на паракрини и автокрини цитокини од фибробластите, вклучувајќи ги и тие кои директно се вклучени во регулација на фиброзата. Фибробластите исто така во услови на инфламација стапуваат во реакција со повеќе клетки, како неутрофили, макрофаги, Т клетки, еозинофили и маст клетки кои понатаму влијаат на фибробластната регулација. Фибробластите се особено чувствителни на цитокините, кои можат и самите да ги лачат. Цитокината мрежа е доста комплицирана и можеби до некаде непотребна за разгледување. Главното фокусирање на новите сознанија околу фибробластната регулација би требало да ни овозможат подобро сваќање на абнормалната фибробластна активност која води кон ткивна фиброматоза (5).

Нарушување на цитокиниот баланс може да биде одговорен и да допринесе во настанувањето на ГЗ. Во последните години направени се повеќе функционални студии анализирајќи ги биолошките механизми, кои можеби се одигруваат на единствен начин кај хуманите гингивални ткива. Нивото на цитокините и факторите на раст се во пораст кај медикаментозно - зголемената гингива, вклучувајќи ги интерлеукин-6 (IL-6), IL-1 β , тромбоцитен фактор на раст (PDGF-B), фибробластен фактор на раст (FGF-2), трансформирачки фактор на раст (TGF- β) и сврзно-ткивен фактор на раст (CTGF) (42). Испитувањата индуцираат нагорна регулација на CTGF од TGF- β и негово стимулирање на колагена акумулација во хумани гингивални фибробластни култури.

Пролиферацијата и диференцијацијата на сврзно-ткивните клетки и продукцијата на екстрацелуларен матрикс се контролирани од цитокини кои иницираат сигнални каскади зависни од специфични рецептори. Неодамнешните клеточни и молекуларни биолошки техники демонстрираат абнормално високо ниво на специфични цитокини и фактори на раст (IL-6, IL-1 β , PDGF-B, FGF-2, TGF- β и CTGF) во гингивално зголемените ткива. Овие истражувања се од голем интерес, и сугерираат дека супстанциите кои предизвикуваат гингивално зголемување го алтерираат нормалниот баланс на цитокините во гингивалните ткива (94).

Циклоспоринот ја регулира цитокината експресија во гингивалните ткива. Преку селективна имуносупресија, тој има способност за инхибиција на интерлеукините (IL-6, IL-1 β), кои се потентни стимулатори на колагеназата, и на таков начин има важна улога во патогенезата на гингивалното зголемување. Myrillas и сор. известуваат за цитокината инхибиција која се одвива на дозно - зависен начин (65).

Циклоспорин-индуцираното зголемување на гингивата претставува интересен пример на ткивно-специфичен механизам, при кој циклоспоринот го стимулира нивото на TGF- β *in vivo* и ја зголемува неговата продукција во реналните клетки и лимфоцитите и доведува до ренална фиброза и нефропатија. Тргнувајќи од овој податок, се чини разумно да се очекува дека ќе постои висока експресија на TGF- β и CTGF кај циклоспоринското зголемување на гингивата, но спротивно на овие очекувања, Echelard (31) известува за постоење на висока инфламација на ткивата и за непостоење на зголемено ниво на TGF β и CTGF. Забележаната зголемена инфламација, секако е резултат на интеракцијата меѓу оралните микроорганизми, гингивалните клетки и циклоспоринската амбиентарност кои ја разликуваат оваа состојба од останатите гингивални зголемувања. Авторите посочуваат дека овие ткива имаат помал степен на фиброза за разлика од гингивалните ткива кои се третирани со нифедицин и фенитоин.

Спротивно од резултатите на Trackman, (55) евидентирал зголемено ниво на цитокините и факторите на раст (IL-6, IL-1 β , PDGF- β , FGF-2, TGF- β , CTGF) присутни во биопсии од медикаментозно - индуцирано ГЗ. Познато е дека сврзно-ткивниот фактор на раст CTGF води кон фиброза на многу различни ткива. Иако се тргнува од хипотезата дека овој фактор би можел да биде одговорен за настанувањето на ГЗ, сепак пореметеното ниво на цитокините само по себе не ја докажува функционалната поврзаност со ГЗ. Биолошкото потекло на ГЗ сепак претставува многу сложен и комплексен процес.

Агоа (4) со примена на колагениот модел и колагената фагоцитоза го определува ефектот на ЦсА во инхибирање на интернализацијата преку блокирање на ефлукс од Ca²⁺ од ендоплазматскиот ретикулум и митохондриите, и доаѓа до

заклучок дека ЦсА предизвикува дозно - зависна инхибиција на фагоцитозата на колагените партикули. ЦсА значајно ја инхибира колагената деградација која се одигрува преку интрацелуларниот начин на фагоцитоза во фибробластите. Кај ЦсА-третирани гингивални фибробласти, оваа инхибиција води кон намалена колагена фагоцитоза, која пак резултира во зголемена матрикс продукција и гингивално зголемување. Иако точната улога на митохондријалните калциумови резерви не е позната од истражувањата на Arora, сепак улогата на сигналната регулација на калциумовите резерви е значајна и евидентна.

Промени во фагоцитозата на колагенот е индиректно подржана и од студиите на Paik (76). Машки стаорци се употребени со цел испитување на ефектот на циклоспорин А и азитромицин на колагениот метаболизам во гингивата. Гингивалните фибробласти беа изолирани и беше одредена вкупната количина на колаген. Тип I колаген и колагеназа mRNA, беа одредени преку реакцијата на реверзна транскриптивна полимераза. Истражувачите сметаат дека ЦсА индуцира гингивално зголемување кај стаорци, додека азитромицинот ја редуцира истата.

Хистолошките резултати кај циклоспоринската група покажуваат впечатливо зголемување на ткивниот волумен компариран со останатите групи. Постои висок степен на колаген, а фагоцитозните испитувања покажаа дека ЦсА ја намалува фагоцитозната активност на гингивалните фибробласти, додека азитромицинот ја зголемува нивната активност. Авторите сугерираат дека индукцијата и редукцијата на ЦсА-индуцираното ГЗ биле асоцирани со фагоцитната активност, и дека ЦсА ја намалува колагената деградација преку намалување на фагоцитната активност на гингивалните фибробласти кај испитуваните стаорци.

Од друга страна Kantarci et al. (51), го застапуваат ставот дека директната регулација на матрикс метаболизмот или пролиферацијата на гингивалните фибробласти третирани со ЦсА и нифедипин, веројатно не е примарниот механизам одговорен за ГЗ.

Во обид да се дефинираат етиопатогенетските фактори на ГЗ и точните механизми во процесот на хиперпластичната фиброматозна реакција се сретнуваме со неколку потешкотии. Прво постојат бројни цитокини кои ја регулираат

фиброматозната реакција, но целиот механизам е прилично комплексен. Отсуството на само еден цитокин или негов рецептор во испитувањата спроведени на животински модели, може да доведе до комплетно елиминирање на фиброматозата. Овие податоци индицираат дека и покрај комплексните регулаторни механизми, развивањето на фиброматозата претставува високо интегриран процес. Таргетирајќи соодветен член на профибротичните регулатори, би можело да се насочи кон изнаоѓање на нови терапевтски можности. Второ, ефектот на многу важни профибротични цитокини може да биде под влијание на други автокрини фактори. Трето, одредени цитокини ја афектираат само колагената продукција, а други само пролиферацијата. Четврто, иако е потврдено дека повеќе цитокини реагираат со фибробластите и учествуваат во развој на фиброза, сепак тешко е да се тврди дека секоја клетка која е инволвирана во хроничната инфламација и доаѓа во контакт со фибробластот е потенцијален учесник во развојот на фиброзата (5).

Сакајќи да се дефинира ставот околу тоа дали гингивалната хиперплазија се должи на промени во гингивалниот епител, субмукозното сврзно ткиво или е заедничка, Esposito et al. (33) истовремено ги испитувале и останатите фактори како пол, возраст, различна медикаментозна концентрација на циклоспоринот, времетраење на терапија како партиципации во процесот на ГЗ. Тие го испитувале влијанието на различни концентрации на циклоспорин ($10(-6)$ g/ml; $5 \times 10(-7)$ g/ml; $10(-9)$ g/ml), во однос на растот и пролиферацијата на културелни хумани гингивални кератиноцити во период од 3, 6 и 9 дена. При тоа не се евидентирани сигнификантни корелации меѓу степенот на клеточната пролиферација и степенот на клеточен раст, во однос на полот ($p > 0,568$) и времетраењето на медикаментозната терапија ($p > 0,876$), додека концентрацијата на циклоспоринот покажа високо сигнификантно влијание на клеточниот раст ($p = 0,0001$). Инхибицијата на клеточниот раст била зависна од дозата на циклоспоринот, но ниска концентрација од $10(-9)$ g/ml дури и го стимулирала клеточниот раст. Евидентно е дека ЦсА употребен во ниски концентрации во подолг временски период го стимулира растот на гингивалните кератиноцити и со тоа се потврдува неговата асоцираност со ГЗ, додека високи концентрации на ЦсА можат да го инхибираат клеточниот раст.

Понатаму, авторите (10) известуваат за инхибиторниот ефект на циклоспоринот кон кератиноцитниот раст директно или индиректно, а *in vitro* студиите го покажуваат анти-пролиферативниот ефект на циклоспоринот на кератиноцитите сметајќи дека, пролиферацијата можеби се одвивала на непроменет начин кај циклоспоринските ткива. Со оваа теза согласни се и Niimi и сор. (68) кои поради зголемениот број на ДНК полимераза алфа (+) во базалните кератиноцити, сметаат дека феноменот на гингивална хиперплазија не се должи на зголеменото ниво на кератиноцитната пролиферација, туку на зголемениот животен век на кератиноцитите.

Според Casasco и сор. (23), присуството на зголемена пролиферативна активност во оралниот епител е забележана во услови на присутна инфламација. Тие го испитувале влијанието на инфламацијата на имунохистохемиската експресија на пролиферативниот клеточен нуклеарен антиген (PCNA) во епителните линии на одонтогените кератиноцити. PCNA се смета дека претставува солиден индикатор за анализа на клеточната пролиферација. Нивните резултати индицираат поголема пролиферативна активност во епителните клетки на инфламираните одонтогени кератиноцити споредени со неинфламираните лезии. Зголемената пролиферативна активност на епителот е всушност одговор на инфламацијата. Гингивалните епителни слоеви кај ЦсА се асоцирани со зголемената пролиферативна активност, и позитивниот ефект на инфламацијата на епителната клеточна пролиферација.

Авторите истражувајќи ја можната патогенеза во процесот на ГЗ, ја застапуваат хипотезата која се базира на инхибирана апоптоза и намалена колагеназна активност модулирана со цитоплазматски калциум (16). Од добиените резултати, тие сметаат дека ЦсА-индуцираното ГЗ не е предизвикано од зголемувањето на кератиноцитната пролиферација, туку со пролонгирање на клеточниот живот преку редукција на апоптозата уште пред да биде детектирана епителната хиперплазија.

Интрацелуларните начини на регулирање на апоптозата и каспаза 3 играат важна улога во иницирање на активирачки сигнал Bantel 2005. Akt/P13 kinaza може да ја регулира генската експресија преку контрола на Forkhead (FOXO) фактори на

транскрипција. Активацијата на FOXO факторите преку дефосфорилација води кон клеточено стопирање и алтерација на енергетскиот метаболизам, а со тоа овие фактори имаат критична улога и во регулација на пролиферацијата и оксидативниот стрес Birkenkamp and Coffey (3). FOXO активацијата може да резултира во индукција на апоптозата, додека соодветна инактивација на FOXO протеините може да изврши пореметување на критичкиот баланс меѓу клеточната пролиферација и клеточната смрт, водејќи кон создавање на туморогенезни состојби.

Инфламаторните состојби секако дека ја зголемуваат експресијата на FOXO факторите, демонстрирано преку тумор некрозис фактор алфа (TNF- α) во *in vitro* и *in vivo* студиите, додека при намалена експресија на FOXO факторите, TNF- α стимулираната фибробластна апоптоза беше намалена дури и до 76%. Понатаму FOXO е секако асоциран и со каспаза-посредуваната апоптоза, кое што е евидентно и при инхибиција на FOXO, кој доведува до намалена активација на каспаза-3, -8, и -9 како одговор на TNF- α , индицирајќи дека FOXO регулираните гени имаат важна улога во иницирање на сигналите кои водат кон стимулирање на апоптоза кај фибробластите.

Kantarci et al. (51) со цел да ја испитаат хипотезата дека кај фиброматозни гингивални лезии, фибробластната пролиферација е стимулирана, а апоптозата е намалена ги испитуваат апоптотичниот индекс, експресијата на FOXO и каспаза 3, пролиферативниот индекс и хистолошки присутната инфламација. Од нивните резултати се забележува дека апоптозата била сигнификантно намалена кај фенитоин-индуцираното ГЗ и кај не-медикаментозното ГЗ, компарирано со контролни и циклоспорински третирани ткива. Циклоспоринските ткива како и ткивата третирани со нифедипин подеднакво покажуваат сигнификантно намалена апоптоза компарирана со контролните примероци. Инфламацијата води кон зголемена апоптоза кај не-фиброзните контролни примероци, циклоспоринските, и нифедипинските. Кај фенитоинските и гингивалните фиброматозни ткива, инфламираните регии исто така покажуваат сигнификантно зголемување на апоптозата компарирано со не-инфламираните регии, но ефектот на инфламацијата

сметат дека е помал кај контролните, циклоспоринските и нифедининските примероци (22).

Во однос на клеточната пролиферација, кај примероците третирани со фенитоин, циклоспорин, нифединин и кај гингивалната фиброматоза, овој индекс е значително висока клеточна пролиферација за разлика од контролните примероци. При тоа истражувачите, сметаат дека инфламацијата воопшто не влијае на пролиферативниот индекс, сугерирајќи дека сите типови на ГЗ водат до поголема фибробластна пролиферација (12).

Експресијата на каспаза 3 како најважен ензим при апоптозата, Berker (11) го истражуваат во инфламирани и неинфламирани регии од ткивата. При тоа тие, регистрираат намалена експресија кај фенитоин и гингивалната фиброматоза, иако нејќи значајна разлика во споредба со контролните и циклоспоринските примероци. Исто така и кај нифедининските ткива е регистрирана значајно намалена експресија на каспаза 3 во однос на контролните примероци. При компарирање на инфламираните и неинфламираните регии се забележува значителна експресија на каспаза 3 кај инфламираните регии, иако разликите меѓу инфламираните и неинфламираните регии на каспаза 3 како функција на инфламацијата не се статистички значајни. Исто така се забележуваат слични насоки на апототичниот индекс и процентот на каспаза 3, кај истите можат да постојат и соодветни разлики зависно од стадиумот на апоптозата.

Апоптозата игра клучна улога во регулација на инфламацијата и имуните одговори. Авторите (2) со користење на електронски микроскоп ја испитуваат апоптозата присутна кај ЦсА гингивални кератиноцити и здрави кератиноцити со присутен гингивит. Резултатите од истражувањето индицираат дека степенот на апоптозата кај циклоспоринската група е многу слична со степенот на апоптозата кај здрави индивидуи (41).

Други автори (18) го застапуваат ставот дека ЦсА ја инхибира делбата на епителните клетки, но овој ефект не се должи на промени во апоптозата. Дејството на ЦсА на оралните епителни клетки можеби е асоцирана со долготраен стрес фактор, кој веројатно е дел од патолошките ефекти на овој медикамент.

Секако дека постоењето на вакви конфликтни резултати само ја наметнуваат потребата од идни студии кои ќе ја испитуваат и понатаму апоптозата кај различни типови на клетки во присуство на циклоспорин, кои ќе ја појаснат неговата улога во патогенезата на медикаментозно - индуцираното ГЗ.

Со имунохистохемиски методи утврдено е негативното влијание на циклоспорин А на антиген презентирачката улога на Лангерхансовите клетки поради ниската фреквенција на интеракција со Т-клетките. Тоа е последица од нивниот намален број во епителот, супресија на нивната презентирачка функција и блокирање на HLA-DR на Т-клетките (45). Супресијата на функционалниот капацитет на Лангерхансовите клетки е дозно зависна и употребата на концентрации поголеми од 100 ng/ml циклоспорин доведува до инхибиција на нивната функција до 50 % (28), додека (34) се согласува за концентрација поголема и до 10 пати за постигнување на ефективна инхибиција. Granelli и Piperno (40) демонстрираат дека функцијата на помошничките Т-клетки од хуманата периферна циркулација не е намалена ни при користење на високи концентрации на медикаментот од 1000 ng/ml. Овие дискрепации во различни студии можат да се објаснат со различните методи на мерење, разликите во дозата на медикаментот и фреквенцијата на неговата администрација.

За разлика од цитотокичните медикаменти кои не поседуваат специфичност и афектираат поголем дел од имуниот систем, дејството на циклоспоринот е лимитирано воглавно на Т-лимфоцитната функција, која резултира со реакција на гингивалните ткива кон плак-асоцираните пританси (56).

Yamasaki и сор. (101) во своите студии ги документираат ултраструктурните карактеристики на фибробластите изолирани од циклоспорин-зголемена гингива, тргнувајќи од фактот дека фибробластите претставуваат есенцијална компонента за сврзно-ткивното зголемување и "host-defense" механизмите. Највпечатлив дел претставува регистрирање на модифицирани фибробласти (миофибробласти), кои можат да се сретнат и кај различни други патолошки состојби кои се карактеризираат со активна фиброплазија, како и кај туморовидните пролиферативни состојби. Воедно тие известуваат за намалена фибробластна

цитотоксичност, во однос на истата добисна од гингивално зголемување кое не е резултат на циклоспоринското дејство, и сметаат дека таа се должи на инхибицијата на Т-лимфоцитната функција. Ултраструктурните и имунохистохемиските истражувања документираат активна протеинска синтеза и секреција со намалени цитотоксични или дегенеративни промени.

Многочислените обично се асоцирани со доцните фази на ткивниот "turnover", и нивното присуство во сврзните и гингивалните ткива, Boltchi и сор. (14) претпоставуваат дека се должи на медикаментозно условеното егзацербирање на нормалниот ткивен "turnover".

Во обид да се прецизира, дали овие несакани ефекти се должат на директното дејство на циклоспоринот на хуманите фибробласти или се тие под индиректно влијание на фактори ослободени од лимфоцитите, Willers и сор. (97) во *in vitro* услови во инкубирани култури на хумани фибробласти во период од 72 часа известуваат за дозно-зависна стимулација на DNK синтеза, додека синтезата на глюкозаминоглюканите бележи слаба супресија. Долготрајната инкубација (6 недели) со 1 g/ml циклоспорин, резултира во повторна стимулација на растечките параметри иако матрикс синтезата била послаба во однос на краткотрајната инкубација. Споредено со нетретираниите фибробласти, клеточниот број е зголемен за 168%, протеините за 159%, колагенот и глюкозамините биле зголемени за 120%.

Сите типови на ткивно зголемување бележат поврзаност меѓу клеточниот број, нивото на клеточната пролиферација и продукцијата на екстрацелуларниот матрикс.

Во случајот со циклоспоринското зголемување на гингивата, зголемениот број на фибробластите, авторите сметаат дека е придружен и со пропорционално зголемување на ткивниот матрикс (48). Добените резултати *in vitro*, само делумно ги потврдуваат, *in vivo* обсервациите, бидејќи матрикс синтезата не е пропорционално следена и со клеточна маса.

Хистометриските анализи на циклоспорин А-индуцираното гингивално зголемување, покажуваат дека основна карактеристика на лезијата е зголемување

на "нормалниот раст" (односот меѓу клетка и матрикс е непроменет) за разлика од клеточната хипертофија или хиперплазија. Ова подоцна беше потврдено со пенатамошни студии кои известуваат за зголемено ниво на колагена mRNA, без промени на колагената деградација (23).

Ki-67 (пролиферативен маркер) е нуклеарен протеин важен во функцијата на DNA синтезата. Неговата клеточна концентрација е во директна корелација со пролиферативното ниво на клетката, кој се манифестира во текот на сите активни фази на клеточниот циклус (G1, S, G2 и M). Експресијата на Ki-67 претставува солиден индикатор на клеточната пролиферација, а соодветните антитела можат да бидат искористени за одредување на динамиката на клетките во хуманите орални ткива при нормални и при патолошки состојби (5, 6).

Bulut et al. (20) со имунохистохемиските анализи утврдува слично ниво на експресијата на Ki-67 во гингивалниот епител кај ЦсА третирани пациенти во однос на здрави, контролни пациенти, индицирајќи дека постои слична пролиферативна активност во базалните епителни клетки кај двете групи.

Овие резултати се во конфликт во споредба со претходните хистопатолошки студии кои информираат за зголемени епителни слоеви кај нифедицин група и ЦсА група како и зголемена митотска активност Nymmenien (70). Испитувањата покажуваат дека ЦсА може да го инхибира кератиноцитниот раст директно или индиректно и *in vitro* студиите го демонстрираат анти-пролиферативниот ефект на ЦсА на кератиноцитите Kataoka (54). Според Bulut (21), степенот на епителната пролиферација може да биде сосема непроменет кај бубрежно трансплантираните пациенти со ГЗ.

Спротивно на овие испитувања, Buduneli (15) со имунохистохемиски анализи испитувајќи ја клеточната делба и апоптозата кај ЦсА -индуцирано ГЗ, утврдува сигнификантно зголемување на бројот на Ki-67 кај циклоспоринските ткива во однос на контролната група од здрави пациенти, додека бројот на апоптотичните клетки беше сигнификантно намален кај циклоспоринската група. Авторите утврдуваат и статистички сигнификантна позитивна корелација меѓу бројот на Ki-67 клетките и ИДП (индекс на дентален плак), ИПД (индекс на длабочина на

пародонтални цепови), ИГК (индекс на гингивално крварење), ИГЗ (индекс на гингивално зголемување) ($p < 0,01$). Фенитоин и нифедипин примероците покажуваат повисока експресија на Ki-67 позитивни клетки во споредба со циклоспоринската група, групата со гингивит и здравите пациенти.

Резултатот од клеточните култури и имунохистохемиските студии, сугерираат дека плак-индуцираните инфламаторни промени се сигнификантни во патогенезата на оваа состојба. Одредени автори (20), кои компарираат циклоспорин третирани пациенти со здрави субјекти, документираат зголемен број на CD68 (+) мононуклеарни клетки, плазма клетки, CD3 (+) Т лимфоцити, и повисок однос на CD4/CD8 кај циклоспорин групата.

Сите овие и многу други податоци, сугерираат дека самостојно, ни еден целуларен или молекуларен фактор не може да биде фундаментален во развојот на гингивалното зголемување. Иако е познат фактот дека плакот индуцира повеќе инфламаторни промени во гингивалните ткива, авторите сметаат дека повеќе клетки кои ја условуваат плак продукцијата, можат да ја модулираат интеракцијата фибробласт-медикамент во гингивата. Bulut и сор. (21) во своите истражувања ја компарираат пролиферативната активност на кератиноцитите кај плак-индуциран гингивит и ЦсА-индуцираното ГЗ.

Bulut и сор. (17, 20) во своите имунохистохемиски испитувања кај циклоспорин- зголемена гингива и системски здрави контролни субјекти со гингивит, ги испитувале степенот на инфламаторните промени и експресијата на одредени клеточни антигени (Ki-67, CD71, CD98, CD45, CD50, CD11a, CD162, CD227, CD231). Резултатите покажале слично ниво на експресија за Ki-67 во гингивалниот епител кај циклоспорин- третирани ренални реципиенти и здрава контролна група, покажувајќи слична пролиферативна активност во базалните епителни клетки кај двете групи. Овие резултати се во спротивност со претходните хистопатолошки студии кои известуваат за асоцијација меѓу зголемените епителни слоеви кај нифедипин и циклоспорин - индуцираното гингивално зголемување и зголемената митотска активност (22).

Плак-индуцираната гингивална инфламација претставува важен фактор во развојот и експресијата на гингивалните промени. Тргнувајќи од добиените резултати за зголемениот мононуклеарен клеточен инфилтрат кај ткива кои биле третирани со циклоспорин во однос на не третирани ткива (контролна група), Bulut и сор. (21) го подржуваат размислувањето за учеството на инфламацијата и локалните инфламаторни стимули во развојот на гингивалното зголемување, кој сепак останува дека е мултифакториелен процес. Клеточната композиција и присуството на инфламаторни клетки ја рефлектира неговата хронична природа, која може да резултира во долготраен локален стимулаторен процес кој води кон гингивално зголемување.

Цели на трудот

Врз база на консултираната литература како и тргнувајќи од фактот дека кај хиперцелуларните и фиброматозните лезии, фибробластната пролиферација може да биде стимулирана, додека кај лезии кои содржат високо ниво на екстрацелуларен матрикс и мал број на клетки, фибробластната апоптоза исто така може да биде стимулирана, ги поставивме следниве цели на истражувањето:

- да ја детерминираме улогата на имуниот систем во прогресија на гингивалното зголемување;
- да го одредиме степенот на експресија на bcl-2, p53 и Ki-67 во корелација со дозата и времетраењето на циклоспоринската терапија;
- преку семиквантитативна анализа да ја евидентираме апоптозата и пролиферацијата кај гингивалните ткива третирани со различни дози на имуносупресор;
- да го регистрираме интензитетот на инфламаторните промени кај циклоспорински третирани ткива;
- да утврдиме дали зголемените гингивални делови се должат на промени во епителот или во сврзното ткиво и
- дефинитивно да дадеме одговор дали постои корелација помеѓу клиничкиот наод со патохистолошките и морфометриските наоди кај сите испитувани групи;

Материјал и
методи на работа

За реализација на претходно поставените цели, беа извршени следните клинички и параклинички испитувања.

МАТЕРИЈАЛ

На Клиниката за болести на устата и пародонтот, при Универзитетскиот Стоматолошки Клинички Центар „Св. Пантелејмон“ во Скопје и Клиниката за нефрологија-Клинички Центар, Скопје, се проследени 20 пациенти без бубрежни заболувања и примање циклоспоринска терапија и 84 бубрежно-трансплантирани пациенти со дијагностицирано гингивално зголемување. Првата група пациенти ја оформи контролната група, а оние пациенти кои беа бубрежно трансплантирани и беа под циклоспоринска терапија ја оформија испитуваната група.

1. 0. Испитувана група

Групата испитаници според примената дневна доза на циклоспорин, се распределени во 4 групи:

- **Прва група** од 21 пациент, каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесува 100mg;
- **Втора група** од 21 пациент каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесува 125mg;
- **Трета група** од 21 пациент каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесува 150mg;
- **Четврта група** од 21 пациент каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин ќе изнесува 175mg.

Пост-трансплантациската имуносупресивна терапија кај сите испитаници се бостоеше од циклоспорин (Neoral; 6-8mg/kg/ден) за постигнување на C2 ниво (концентрација во серум 2 часа по администрација на медикаментот), преднизолон (1mg/kg/ден), mycophenolate mofetil (Cellcept 1,5-2g/ден) и Diltiazem (2x90mg), кој ја подобрува ресорпцијата на циклоспоринот.

Кај испитуваната група, при прегледот исклучени се следните состојби:

- заболувања на меките и тврдите ткива во оралната празнина со исклучок на кариес и пародонтопатија;

- присуство на протетски реконструкции во усната празнина;
- присуство на ортодонтски апарати во усната празнина;
- примена на антиконвулзиви (особено фенитоин) асоцирани со јатрогеното зголемување на гингивата.

Кај сите пациенти од испитуваната група спроведени се клинички и лабораториски испитувања.

Клинички испитувања

Клиничките испитувања се остварени преку спроведен пародонтолошки испит кој е реализиран преку примена на следните индексни вредности:

- индекс на дентален плак (ИДП) по Silness-Loe, според кој присуството и количината на дентален плак е вреднувано од 0-3

0 - нема дентален плак во гингивалната третина на забната коронка;

1 - плакот е дистрибуиран покрај маргиналната гингива, при што може да се детектира со сонда или пак по пат на боење, но не и со голо око;

2 - присуство на умерена количина на плак која зафаќа повеќе од една третина од забната коронка, но е присутен и во гингивалниот сулкус или во пародонталниот џеп;

3 - големо количество на дентален плак по целата забна површина, како и во гингивалниот сулкус, пародонталниот џеп, и во интерденталниот септум.

- индекс на гингивална инфламација (ИГИ) по Loe-Silnes, според кој интензитетот на гингивалната инфламација е вреднуван од 0-3

0 - не постои воспаление на гингивата, таа е со бледо розева боја, цврста конзистенција и со ситнозрнеста структура;

1 - блага до умерена инфламација која не ја зафаќа гингивата во целост, таа е со црвена боја, посилено изразен едем и присутно крварење при благо сондирање;

2 - умерена инфламација која ја зафаќа гингивата во целост, таа е со црвена боја, посилено изразен едем и присутно крварење при благо сондирање;

3 - јака инфламација на гингивата во целост, таа е со изразено црвена боја, многу зголемена со тенденција кон спонтани крварења.

• индекс на гингивално зголемување (ИГЗ) според McGaw и сор. исто така одредуван од 0-3

- 0 - не постои зголемување, сосема безначајно нагласена маргинална гингива;
- 1 - затапена маргинална гингива; инволвирана е само интерденталната папила;
- 2 - умерено зголемување на гингивата ($< 1/3$ од коронарната должина);
- 3 - значајно зголемување на гингивата ($> 1/3$ од коронарната должина);

• индекс на губиток на атечмент (ниво на апикална миграција на припојниот епител), предложена од American Academy of Periodontology (1999) врз основа на која е одреден и клиничкиот стадиум на заболувањето:

- прв клинички стадиум • слабо изразен губиток на атачмент до 2 мм;
- втор клинички стадиум • умерено изразен губиток на атачмент од 2-5 мм;
- трет клинички стадиум • силно изразен губиток на атачмент со над 5 мм апикална миграција на припојниот епител.

Параклинички испитувања

Кај сите испитаници според оформените групи одредувано е нивото на циклоспорин во крвта на Институтот за фармакологија при Медицинскиот факултет во Скопје, како дел од периодичните медикаментозни испитувања на ренално-трансплантираните пациенти.

Исто така кај сите испитувани пациенти организирани во систематизирани групи е земен ткивен исечок на кој на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје се спроведени следните претраги:

- одредување на дебелината на гингивалниот епител;
- одредување на воспалителниот инфилтрат во стромата;
- одредувани се апоптотичните клетки, bcl2, p53, и и Ki-67;
- одредувана е густината на ретикулинските и колагените влакна;

2. Контролна група

Контролната група ја формира 20 пациенти со присутна пародонтопатија, кои не примаат циклоспоринска терапија, ниту било каков медикамент кој

предизвикува гингивално зголемување. Кај сите нив спроведени се истите клинички и параклинички испитувања како и кај контролната група.

Клинички испитувања

- индекс на дентален плак (ИДП) по Silness-Loe;
- индекс на гингивална инфламација (ИГИ) по Loe-Silnes;
- индекс на гингивално зголемување (ИГЗ) според McGaw и сор.;
- индекс на губиток на атечмент;

Параклинички испитувања

Кај испитаниците од контролната група земен е ткивен исечок од гингивата на кој е спроведена стандардна патохистолошка анализа на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Во ткивните исечоци одредувана се: дебелината на гингивалниот епител, инфламаторниот инфилтрат во стромата, густината на колагените влакна, ретикулин како и апоптотичните клетки, bcl2, p53, и Ki-67.

МЕТОД НА РАБОТА

Кај сите испитаници од контролната и испитуваната група е спроведено хистохемиско и имунохистохемиско бојење.

Од сите испитувани пациенти земен е биоптичен материјал од зголемената интердентална папила под инфилтратациона анестезија и фиксиран во 10% неутрален формалин, по што се изврши стандардна патохистолошка обработка на Институтот за патолошка анатомија при Медицинскиот факултет во Скопје. Понатаму ткивните примероци се вкалапени во парафински блокчиња од кои се изработени ткивни пресеци со дебелина од 4-6 μ m. Така подготвените ткивни пресеци стандардно се монтирани на предметни стакла и обоени со хемалаун еозин (HE) и хистохемиски со Ван Гизон (Van Gieson) за детекција на колаген и Гомориева метода за детекција на ретикулин, додека пресеците за имунохистохемиското бојење се монтирани на виџански предметни стакла и боени со Авидин-Биотинска техника (ABC-Avidin Biotin Complex), LSAB + варијанта.

По парафинското калапење и боење со хемалаун еозин (HE), ткивните пресеци се проследени под светлосен микроскоп со цел пребројување на аптогични клетки. Нивниот број е изразен како просечен број на клетки на десет видни полиња.

По хистохемиското боење, следена е евалуација на присуство на хиперплазија на епителот и присуство на инфламаторни клетки во стромата на испитуваните препарати.

Морфометриско мерење

По стандардната микроскопска патохистолошка анализа и семиквантитативна проценка на степенот на фиброза на гингивалната строма, е направена и морфометриска анализа на ткивните пресеци со помош на специфичен софтвер „IMAGE ANALIZING SYSTEM-LUCIA M“. Морфометриската анализа опфати мерење на дебелината на гингивалниот епител на сите пресеци, со одредување на средна вредност за секој од испитуваните субјекти. Податоците се фотодокументирани.

Детекција на воспалителен инфилтрат

Интензитетот на воспалителниот инфилтрат во гингивалната строма е одреден семиквантитативно и степенуван на следниов начин:

- 1-инфламаторните клетки сочинуваат 20% од стромата;
- 2-инфламаторните клетки сочинуваат 21% -50% од стромата;
- 3-инфламаторните клетки сочинуваат повеќе од 51% од стромата.

Хистохемиски методи

Методи за сврзно ткиво

Van Gieson

Ова боење е користено за прикажување на колагените влакна во парафинските пресеци.

Методот на боење поминува низ следните фази:

1. денарафинизација низ ксилол, апсолутен алкохол, 95% алкохол, дестилирана вода;
2. Weigertov хематоксилин 5-10 минути;

3. испирање со дестилирана вода;
4. боење со Van Gieson 1-3 минути;
5. 95% алкохол;
6. апсолутен алкохол;
7. ксилол;
8. закиселен ксилол;
9. балзам.

Резултат: Јадрата се плаво пребоени, колагените влакна црвено-пурпурни, а цитоплазмата, мускулните влакна и орожнетиот епител се пребоени жолто. Според степенот на присуството на колаген се користат следните степенувања: +, ++, +++. Категоризацијата 0, ќе биде искористена за валоризација на стадиумот на фиброза присуство на ретикулин, кај контролната група, која е помала во однос на категоризацијата 1 кај пациентите третирани со циклоспорин. Податоците се фотодокументирани.

Гомориева метода

Оваа хистохемиска метода е користена за прикажување на ретикулинските влакна во ткивните пресеци.

Методот на ова боење се изведува во следните фази:

1. депарафинизација, преку алкохол до вода;
2. оксидирање со калиум перманганат 1-2 минути;
3. испирање со тековна вода;
4. диференцирање во калиум метабисулфат;
5. испирање со вода;
6. сензибилизирање во р-ор на фери амониум сулфат;
7. испирање со вода;
8. испирање со дестилирана вода;
9. импрегнација со сребро 1 минута на собна температура;
10. испирање во дестилат;
11. редуцирање во 20% формалин 3 минути;
12. испирање со тековна вода 3 минути;
13. ставање во златен хлорид;

15. ставање во калиум метабисулфат 1 минута;
16. фиксирање во 2% натриум тиосулфат 1 минута;
17. испирање со вода 2 минути;
18. дехидрирање, ксилол и монтирање во балзам.

Резултат: Ретикуларните влакна се обоени црно, а основата ќе биде зелена. Нисуството на ретикулин е одреден кај сите препарати и е нотирано со +, ++, +++. Слатоците се фотодокументирани.

Имунохистохемиско бојење

Сите пресеци за имунохистохемиското бојење се монтирани на силански покривни стакла и обоени со Авидин-Биотинска техника (ABC-Avidin Biotin complex), LSAB+ варијанта. Со имунохистохемиската анализа ќе се одреди дистрибуцијата на следниве протеини: **bcl-2** (clone:124), **p53** (clone:DO-7) и **Ki-67** (clone MIB-1) од DAKO продукција.

p53 е тумор-супресор ген лоциран на хромозомот 17p13.1 кој се акумулира во клетките со оштетувања, и го прекинува клеточниот циклус (во G1 фаза) и со тоа на клетката и овозможува време потребно за репарација. Значи кога ДНК репаративните процеси отсуствуваат, p53 ја тригерира апоптозата. Во случаи кога p53 е мутиран или отсутен (кај канцерогени заболувања), тој е неспособен да индуцира апоптоза и настанува клеточното преживување. P53 се смета дека има клучкава улога на „живот или смрт“ во случај на генотоксичен стрес.

Во групата на протеини чија продукција е стимулирана од p53, спаѓаат и некои анти - апоптогични членови на bcl фамилијата во кој посебно место му припаѓа на **bcl-2**. Овие протеини се сместени во митохондријалните мембрани и цитоплазмата на клетката. Тие ја контролираат пропустливоста на митохондријалните мембрани и со тоа го регулираат активирањето на каспазната каскада.

Ki-67 е клеточен маркер кој служи за детерминирање на фракцијата на растачка на клеточната популација. За време на интерфазата, антигенот ексклузивно може да биде детектиран во нуклеусот, додека во митозата повеќето од протеините се локализираат на површината на хромозомите. Имунореактивноста се одредува со

на нуклеусот, а не со боене на цитоплазмата. Ki-67 протеинот е присутен во сите фази на клеточниот циклус (G1, S, G2, и митоза), но е отсутен во фаза на мирување (G0).

Авидин-Биотинска техника

Имунохистохемиската анализа служи за детекција на одредени антигени во ткивниот примерок со помош на соодветни антитела. Антителата се аплицираат на исечоците на ткивниот примерок и по нивното врзување се користи специфичен систем за детекција кој ќе овозможи визуелизација на маркираните молекули. На ткивниот примерок со одреден антигенска детерминанта се додава примарното антитело и се инкубира на температура (30 мин.). Потоа следи плакнење со фосфатен пуфер и боене на примероците во 10% нормален серум и повторно плакнење со фосфатен пуфер. Понатаму се додава на секундарното антитело кое е маркирано со биотин. Авидин-Биотин комплексот содржи ензим HRP (Horse Radish Peroxidase), кој се поврзува со биотинската молекула од секундарното антитело, а тоа се поврзува со детерминанти од примарното антитело. Примероците се инкубираат на собна температура во времетраење од 30 мин. и повторно се плакаат со фосфатен пуфер. Во наредниот чекор се додава ABC реагенс и повторно плакаат со фосфатен пуфер. Крајниот резултат како позитивна антиген-антитело реакција е проследена со формирање на кафеав преципитат од полимеризираниот ензим.

По имунохистохемиското боене со примена на светлосен микроскоп кај примероците пресеци се спроведува детекција и броење на апоптотичните клетки. bcl-2, Ki-67 изразено како просечен број на клетки на десет видни полиња (X 400). Степенот на експресија на p53, bcl-2, Ki-67, како и апоптотичните клетки на секој примерок беше градуирано на семиквантитативен начин употребувајќи скала од 0-3+ (0)= нема обоени клетки, (1+)=обоените клетки сочинуваат > од 10% од примарниот инфилтрат, (2+)=обоените клетки сочинуваат 30% од примарниот инфилтрат, (3+)=обоените клетки сочинуваат > 30% од примарниот инфилтрат. Добиените податоци се фотодокументирани.

Циклоспоринемија

Циклоспоринемијата е одредувана на Институтот за фармакологија при Медицинскиот факултет во Скопје, како дел од периодичните медикаментозни испитувања на ренално-трансплантираните пациенти. Крвните примероци се земен од v. cubitalis, 2 часа по примањето на утринската доза на циклоспоринот. Концентрацијата на циклоспоринот во крвта (C2) е одреден со користење на флуоресцентно поларизациона имуно метода (FPIA) на TDx анализатор од фирмата ABBOT со комерцијални сетови.

Секој примерок од крвта (2ml крв + 0, 2ml EDTA) претходно е подложен на претреттирање со цел минимизирање на интерференцијата на природната флуоресценција кај компонентите кои се врзани за протеините. Во претретманот, во крвниот примерок (150 l) се додава солубилизирачки реагенс (50 l) и преципитирачки реагенс (300 l) со цел растварање на клетките и преципитирање на протеините. По вортексирањето и центрифугирањето (9, 500 x 5min) се добива бистар супернатант кој се користи за мерење на нивото на моноклоналниот циклоспорин А во крвта.

Според оваа метода нормална терапевска концентрација на циклоспорин А во крвта се движи од 600-800ng/ml.

3. Статистичка обработка на добиените податоци

Сите добиени наоди од клиничките и параклиничките испитувања кај испитуваната група се споредувани со:

- контролната група и
- помеѓу себе кај четирите подгрупи на испитуваната група

Резултатите добиени од земените ткивни исечоци т. е. микроскопските испитувања се фотодокументирани.

Статистичката анализа е изработена во статистички програми: STATISTICA 7.1, SPSS 13.0; Собраните податоци се обработени со помош на следните статистички методи:

- Базите на податоците се формирани со примена на специфични компјутерски програми за таа намена. Нивната обработка е извршена со помош на стандардни дескриптивни и аналитички биваријатни и мултиваријатни методи.
- Атрибутивните статистички серии се анализирали со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со утврдување на статистичката значајност меѓу откриените разлики.
- Нумеричките серии се анализирали со мерки на централна тенденција и со мерки на дисперзија на податоците. Кај нумеричките серии кај кои не постои одстапување од нормалната дистрибуција, сигнификантноста на разликата се тестира со Student-ов t -тест (t);
- Односот меѓу две нумерички варијабли е испитуван со помош на Pearson-ов коефициент на корелација и тестот-Spearman Rank Correlations.
- Статистичката сигнификантност на разликите се анализирали со ANOVA тест, кој накнадно е тестиран и потврден со post hoc тест- Tukey honest significant difference (HSD) тест.
- За CI (confidence интервал $\pm$ 95% CI) е дефинирана статистичката значајност за ниво на грешка помало од 0,05 (p);
- Резултатите се претставени табеларно, графички и се фотодокументирани.

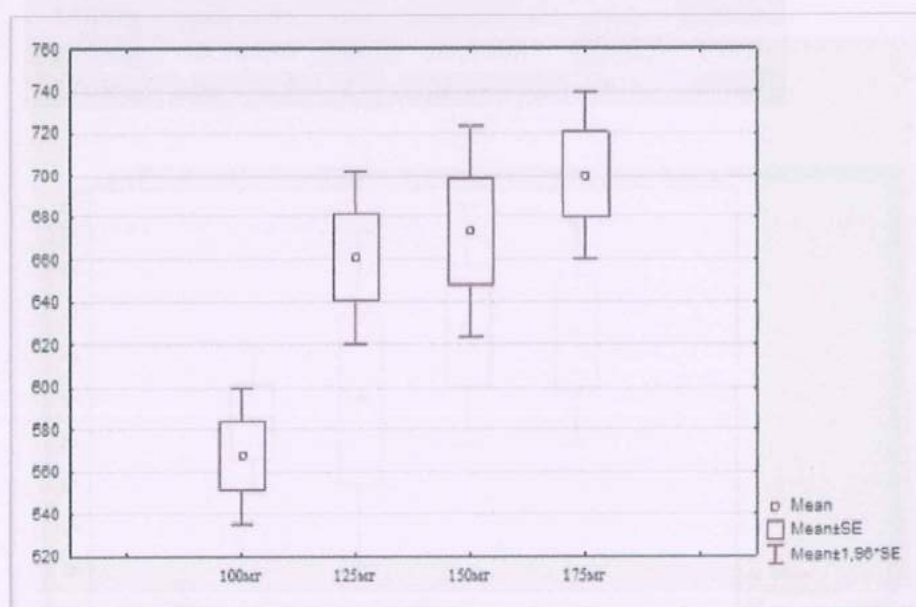
Результати

Табела бр. 1 Приказ на просечнаија возраси на пациентиите во испитуваија и контролнија групи

возраст	просек	број	$\pm$ Ст.дев.	мин.	мак.
100mg	31,14	21	10,01	18,0	49,0
125mg	37,76	21	9,36	16,0	51,0
150mg	36,71	21	7,84	22,0	53,0
175mg	35,14	21	8,13	21,0	51,0
контролна	41,19	21	11,9	23,0	62,0

Табела бр. 2 Анализа на варијанса-АНОВА тиесѝ

SS effect	Df effect	MS effect	SS error	Df error	MS error	F	P
1136,514	4	284,1286	9146,476	100	91,46476	3,106427	0,018680



Графикон бр. 1. Графички приказ на просечнаија возраси

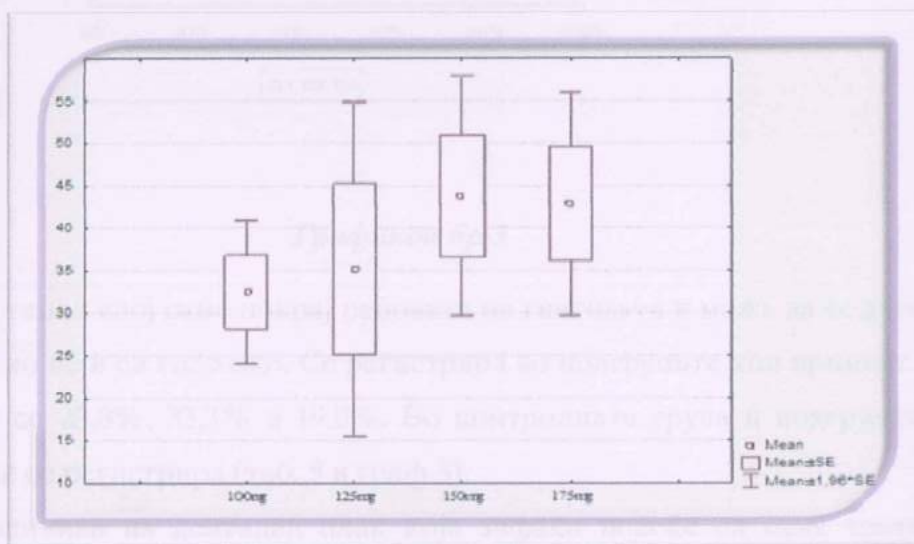
Табела бр. 3 Tukey HSD тест

група	100mg	125mg	150mg	175mg	kontrolna
100mg		0,172858	0,330756	0,657489	0,008403
125mg	0,172858		0,996617	0,901003	0,773060
150mg	0,330756	0,996617		0,983858	0,554290
175mg	0,657489	0,901003	0,983858		0,250763
kontrolna	0,008403	0,773060	0,554290	0,250763	

Просечната возраст на пациентите во групите изнесува помеѓу 31 и 41 година, со минимум 16 години и максимум 62 години (таб. и граф.1). Разликата која се регистрира помеѓу просечните возрасти во групите според АНОВА тестот е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб.5). Според Tukey honest significant difference (HSD) тест разликата е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу контролната група во однос на подгрупата која зема 100 мг (таб.3).

Табела бр. 4 Приказ на просечното време на терапија во месеци

месеци	просек	број	$\pm$ Ст. дев.	мин.	макс.
100mg	32,47619	21	19,81318	9,0	66,0
125mg	35,14286	21	46,13056	2,0	132,0
150mg	43,76190	21	33,12387	5,0	108,0
175mg	42,80952	21	30,84578	8,0	110,0

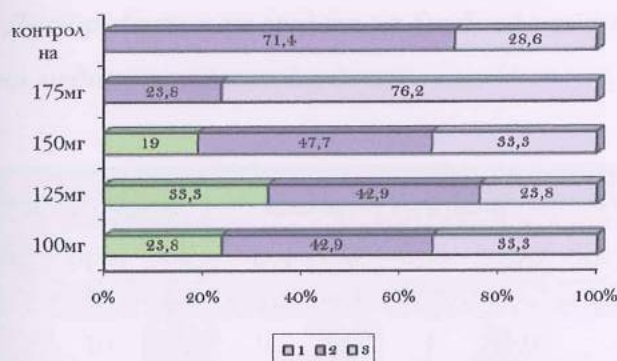


Графион бр. 2 Приказ на просечното време на терапија во месеци

Просечното време на земање на терапија кај пациентите во групите изнесува помеѓу 32,5 и 43,8 месеци, со минимум 2 месеци и максимум од 132 месеци (таб. 4 и граф 4).

Табела бр. 5 Дисциплинација на индекс на денитален плак (ИДП) по Silness-Loe според медикаментозната доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
ИДП	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
1	5	23,8	7	33,3	4	19,0				
2	9	42,9	9	42,9	10	47,7	5	23,8	15	71,4
3	7	33,3	5	23,8	7	33,3	16	76,2	6	28,6



Графикон бр.3

1- плак има во тенок слој само покрај рабовите на гингивата и може да се детектира само со сонда, но не и со голо око. Се регистрира во подгрупите кои примаат 100мг, 125мг и 150мг со 23,8%, 33,3% и 19,0%. Во контролната група и подгрупата која прима 175мг. не се регистрира (таб. 5 и граф 3);

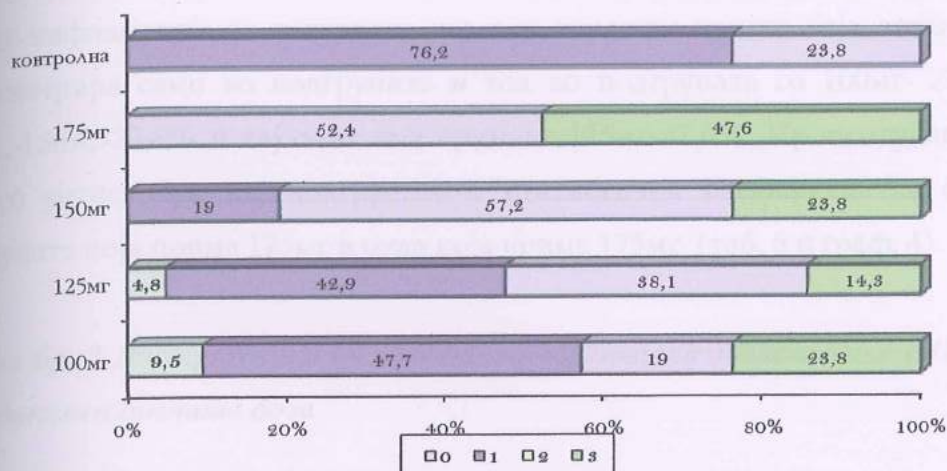
2- умерена количина на денитален плак која зафаќа повеќе од една третина од забната коронка, но е присутен во гингивалниот сулкус или пародонталниот џеп, се регистрира во сите испитувани групи. Над 43% се регистрира во групите кои

примаат 100мг, 125мг и 150мг (43% и 47,7%). Во групата која прима 175мг се регистрира со најмал процент од 23,8%. Во контролната група се регистрира со 71,4%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички несигнификантна за $p > 0,05$. Процентуалната разлика е статистички сигнификантна помеѓу контролната група и подгрупата која прима 175мг за $p = 0,0039$ (таб.5 и граф.3);

3- голема количина на дентален плак по целата забна површина како и во сулкусот, џепот и интерденталниот простор, се регистрира во сите испитувани групи. Во подгрупата која прима 100мг и 150мг со 33,3 %, а во групата која прима 125мг со 23,8 %, во контролната група со 28,6%. Во најголем процент од 76,2 % се регистрира во групата која прима 175мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу групата која прима 175мг. во однос на останатите подгрупи и контролната група е статистички сигнификантна за $p = 0,00$ (таб.5).

Табела бр. 6 Дисциплинација на индекс на гингивална инфламација (ИГИ) по Silness-Loe во однос на медикаментозната доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
ИГИ	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	2	9,5	1	4,8						
1	10	47,7	9	42,9	4	19,0			16	76,2
2	4	19,0	8	38,1	12	57,1	11	52,4	5	23,8
	5	23,8	3	14,3	5	23,8	10	47,7		



Графикон бр.4

0- не постои воспаление на гингивата, таа е со бледо розова боја, цврста конзистенција и со ситно зрнеста структура, се регистрира во подгрупите кои примаат 100мг и 125мг со процент под 10%. (таб. 6 и граф.4) ;

1-блага до умерена инфламација која не ја зафаќа гингивата во целост, се регистрира во подгрупите кои примаат 100мг, 125мг, и 150мг (19,0%, 42,9%, 47,7%) и контролната група (76,2%). Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите кои примаат 125мг и 150мг во однос на контролната група е статистички сигнификантна за $p < 0,03$ (таб. 6 и граф. 4);

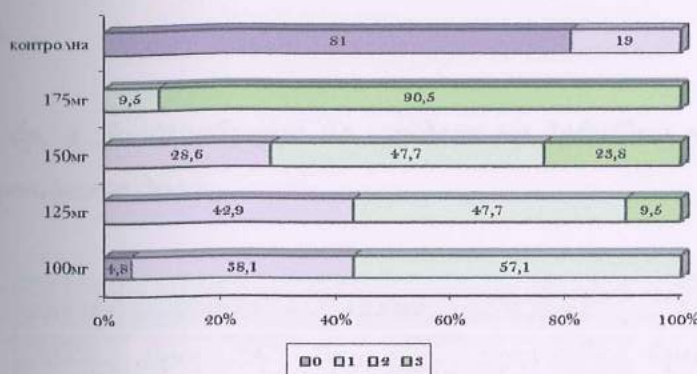
2- умерена инфламација која ја зафаќа гингивата во целост, таа е со црвена боја, и посилено изразен едем, се регистрира кај сите групи. Во подгрупата која прима 100мг се регистрира најмал процент односно 19,0% во групата која прима 125мг се регистрира 38,1%, во групата која прима 150мг- 57,2% и во групата која прима 175мг- 52,4%, со 23,8 % се регистрира кај контролната група. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички сигнификантна за $p < 0,05$, помеѓу подгрупата која прима 100мг во однос на подгрупите кои примаат 150мг и 175мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната

група во однос на подгрупата која прима 150мг е статистички сигнификантна за $p < 0,03$ (таб. 6 и граф. 4);

3- јака инфламација на гингивата, таа е со изразена црвена боја, многу зголемена, се регистрира само во подгрупите и тоа во подгрупата со 100мг- 23,8%, 125мг- 14,3%, 150мг-23,8% и кај оние кои примаат 175мг-47,6%. Процентуалната разлика која се регистрира кај подгрупите е статистички сигнификантна само помеѓу подгрупата која прима 125мг и онаа која прима 175мг. (таб. 6 и граф. 4).

Табела бр. 7 Дисциплинација на индекс на гингивална зголемување (ИГЗ) во однос на медикаментозната доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
ИГЗ	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	1	4,8							17	81,0
1	8	38,1	9	42,9	6	28,6			4	19,0
2	12	57,1	10	47,7	10	47,7	2	9,5		
3			2	9,5	5	23,8	19	90,5		



Графикон бр.5

0-не постои зголемување, сосема безначајна нагласена магринална гингива, во најголем процент се регистрира кај 81% од контролната група и само кај еден пациент кој прима 100мг терапија (таб. 7 и граф. 5);

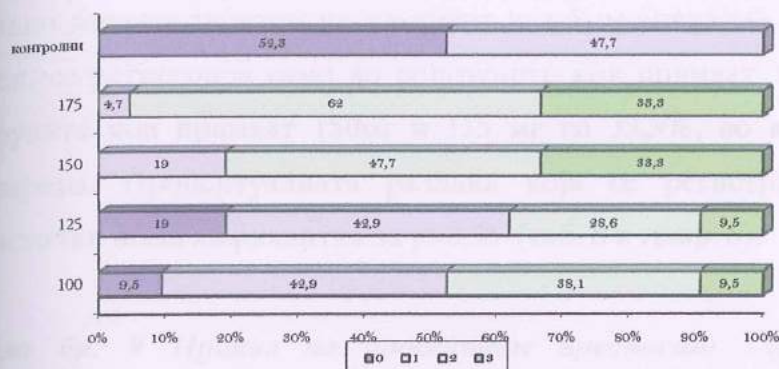
1-затапена маргинална гингива,инволвирана е само интерденталната папила, се регистрира кај 38,1% во подгрупата која прима 100мг, 42,9% во подгрупата која прима 125мг, 28,6 % во подгрупата која прима 150мг и 19,0% во контролната група. Во подгрупата која прима 175мг не се регистрира. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите и контролната група е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 7 и граф. 5);

2-умерено зголемување на гингивата ($< 1/3$ од коронарната должина) се регистрира кај 57,1% подгрупата која прима 100мг, 47,7% во подгрупата која прима 125 мг и 150мг, 9,5% во подгрупата која прима 175мг. Во контролната група не се регистрира. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите т. е. подгрупата која прима 100мг, 125мг, и 150мг во однос на подгрупата која прима 175мг е статистички сигнификантна за $p = 0,01$ (таб. 7 и граф. 5);

3- значајно зголемување на гингивата ($> 1/3$ од коронарната должина), не се регистрира во контролната група и подгрупата која прима 100мг. Најголем процент се регистрира во подгрупата која прима 175мг.-90,5%, потоа групата која прима 150мг.-23,8% и 9,5 % во подгрупата која прима 125мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите т.е. подгрупата која прима 125мг и 150мг во однос на подгрупата која прима 175мг е статистички сигнификантна за $p = 0,0001$ (таб. 7 и граф. 5).

Табела бр. 8 Дисџрибуција на индекс на губиџок на аџаачменџ (ИГА) сџоред медикаменџозна доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
ИГА	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	2	9,5	4	19,0					11	52,3
1	9	42,9	9	42,9	4	19,0	1	4,7	10	47,7
2	8	38,1	6	28,6	10	47,7	13	62,0		
3	2	9,5	2	9,5	7	33,3	7	33,3		



Графикон бр.6

0-нема губиток на атачмент, се регистрира во подгрупата која прима 100мг и 125мг (9,5% и 19%), и во контролната група со 52,3%. Процентуалната разлика помеѓу двете подгрупи се регистрира помеѓу двете подгрупи кои примаат 100мг и 125мг во однос на контролната група е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 8 и граф. 6);

1-слабо изразен губиток на атачмент до 2мм, се регистрира кај 42,9% во подгрупите кои примаат 100мг и 125мг, 19,0%, во подгрупата која прима 150мг и 4,7 % во подгрупата која прима 175мг. Во контролната група се регистрира со најголем процент од 47,7%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите кои примаат 100мг и 125мг во однос на групата која прима 175мг е статистички сигнификантна за $p = 0,00$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите кои примаат 150мг и 175мг е статистички сигнификантна за $p = 0,00$ (таб. 8 и граф. 6);

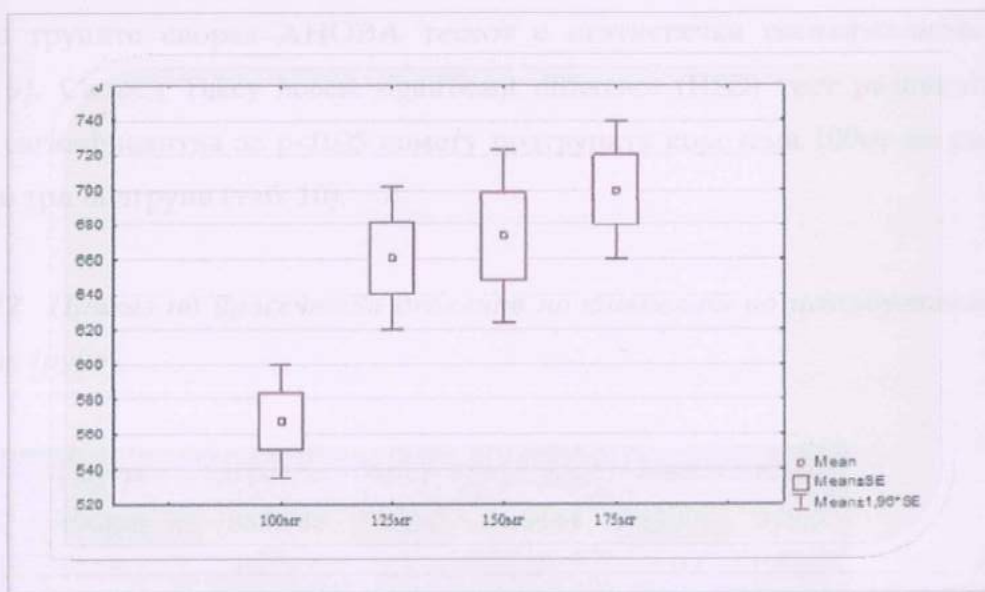
2-умерено изразен губиток на атачмент од 2 до 5мм не се регистрира во контролната група. Со најголем процент се регистрира во подгрупата која прима 175мг со 62,0%, во подгрупата 100мг-38,1%, 125мг-28,6%, и 150мг-47,7%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички

сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу подгрупата која прима 175мг во однос на онаа која прима 125мг (таб. 8 и граф. 6);

3- силно изразен губиток на атачмент над 5мм апикална миграција на припојниот епител, се регистрира само во подгрупите кои примаат 100мг и 125мг-9,5%, и во подгрупите кои примаат 150мг и 175 мг со 33,3%, во контролната група не се регистрира. Процентуалната разлика која се регистрира меѓу подгрупите е статистички несигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 8 и граф. 6).

Табела бр. 9 Приказ на просечниите вредности на концентрацијата на циклосјорин во крв

Конц. серум	просек	број	$\pm$ Ст.дев.	мин.	мак.
100mg	567,3862	21	74,7936	452,58	742,0
125mg	661,0976	21	95,2048	385,52	855,0
150mg	673,4876	21	116,5856	358,0	968,54
175mg	700,1876	21	92,6894	487,9	968,54



Графикон бр. 7 Приказ на просечната вредност на концентрацијата на циклосјорин во крв

Табела бр. 10 Анализа на варијанса- АНОВА *тесит*

SS effect	Df effect	MS effect	SS error	Df error	MS error	F	p
210367,5	3	70122,49	736831,1	80	9210,389	7,613412	0,000153

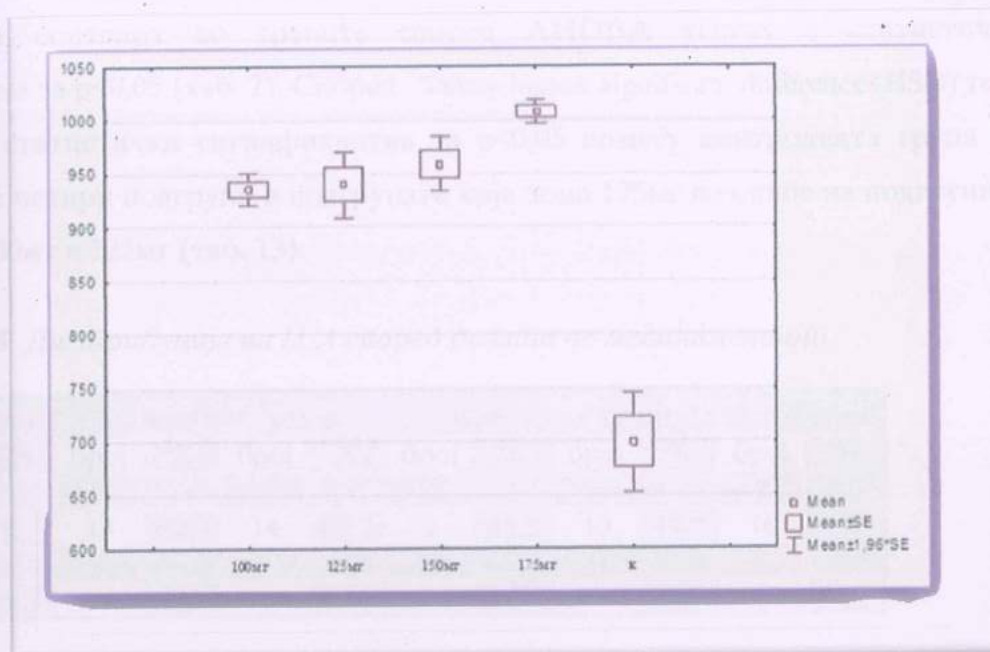
Табела бр. 11 Tukey HSD *тесит*

група	100mg	125mg	150mg	175mg
100mg		0,011668	0,003313	0,000273
125mg	0,011668		0,975243	0,553216
150mg	0,003313	0,975243		0,804106
175mg	0,000273	0,553216	0,804106	

Просечната концентрација на циклоспоринот кај пациентите е во границите на нормалната тераписка концентрација (600-800 ng/ml) во подгрупите кои примаат 125mg, 150mg, и 175mg (661,673,5 и 700,2 ng/ml) само во подгрупата која прима 100mg се регистрира концентрација пониска-567,4ng/ml.) од нормалната тераписка концентрација (таб. 9 и граф. 7). Разликата која се регистрира помеѓу просечните вредности во групите според АНОВА тестот е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 9). Според Tukey honest significant difference (HSD) тест разликата е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу подгрупата која зема 100mg во однос на останатите три подгрупи (таб. 10).

Табела бр. 12 Приказ на просечната дебелина на епителот во испитуваната и контролната група

Група	просек	број	$\pm$ Ст. дев.	мин.	мак.
100mg	935,738	21	34,3444	853,8	979,0
125mg	940,267	21	72,2697	769,8	1065,0
150mg	958,919	21	59,9582	799,0	1045,0
175mg	1007,667	21	25,3863	954,8	1067,2
контролна	698,967	21	107,8800	456,90	803,6



Графокон бр. 8 Графички приказ на просечниите вредности на дебелината на епителот

Табела бр.13 Анализа на варијанса-АНОВА шесѝ

SS effect	Df effect	MS effect	SS error	Df error	MS error	F	p
1218655	4	304663,7	445599,8	100	4455,998	68,37161	0,000000

Табела бр. 14 Tukey HSD test

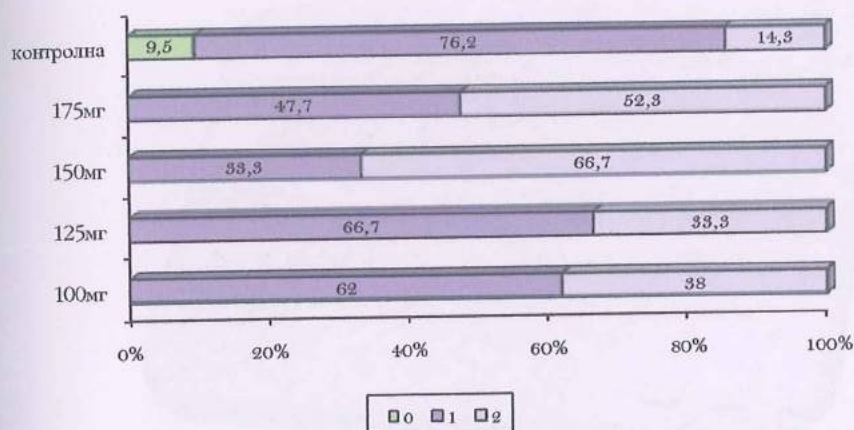
група	100mg	125mg	150mg	175mg	контролна
100mg		0,999536	0,792898	0,006407	0,000116
125mg	0,999536		0,894258	0,012586	0,000116
150mg	0,792898	0,894258		0,133343	0,000116
175mg	0,006407	0,012586	0,133343		0,000116
контролна	0,000116	0,000116	0,000116	0,000116	

Просечната дебелина на епителот во групите изнесува: најтенок епител се регистрира во контролната група од 699µm, потоа следи подгрупата која зема 100мг-935 µm, дебелината на епителот се зголемува да во групата со 125мг изнесува 940,3 µm, групата која зема 150мг-960µm и најдебел епител се регистрира во групата која зема 175мг (таб. 12 и граф. 8). Разликата која се регистрира на просечната

дебелина на епителот во групите според АНОВА тестот е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 2). Според Tukey honest significant difference (HSD) тест разликата е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу контролната група во однос на сите четири подгрупи и подгрупата која зема 175мг во однос на подгрупите кои земаат 100мг и 125мг (таб. 13).

Табела бр. 15 Дисџрибуција на LCA според дозата на медикаментот

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
LCA	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0									2	9,5
1	13	62,0	14	66,7	7	33,3	10	47,7	16	76,2
2	8	38,0	7	33,3	14	66,7	11	52,3	3	14,3
3										



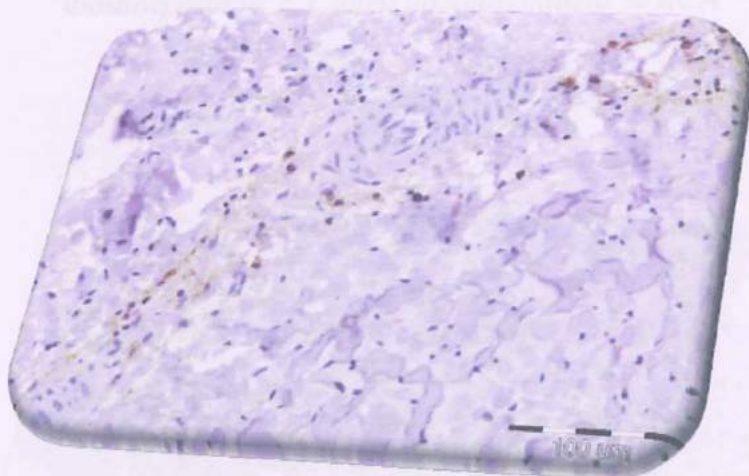
Графикон бр. 9

0- Се регистрира само во контролната група со 9,5% (таб. 15 и граф. 9);

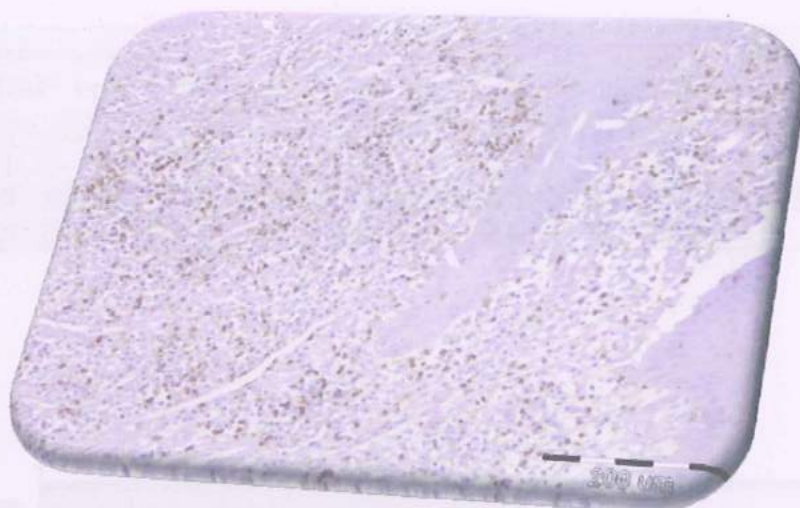
1- Лимфоцитниот инфилтрат сочинува 20% од стромата се регистрираат во сите подгрупи и контролната група со 62%, 66,7%, 33,3%, 47,7% и 76,2%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите, единствено процентуалната разлика помеѓу подгрупата која прима 125мг во однос на подгрупата која прима 150мг е статистички сигнификантна за $p = 0,03$. Процентуалната разлика е статистички сигнификантна единствено помеѓу контролната група во однос на подгрупата која прима 150мг за $p = 0,00$ (таб. 15 и граф. 9);

2-Лимфоцитниот инфилтрат сочинува од 21% до 50% од стромата се регистрира во сите подгрупи и контролната група. Во подгрупата која прима 100мг се регистрира со 38%, 125мг со 33,3% 150мг со 66,7% и 175мг со 52,3%. Во контролната група се регистрира со 14,3 %. Процентуалната разлика која се регистрира кај подгрупите е единствено статистички сигнификантна за $p=0,03$ помеѓу подгрупата која прима 150мг во однос на подгрупата која прима 125мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите кои примаат 150мг и 175мг е статистички сигнификантна за $p=0,01$ (таб. 15 и граф. 9);

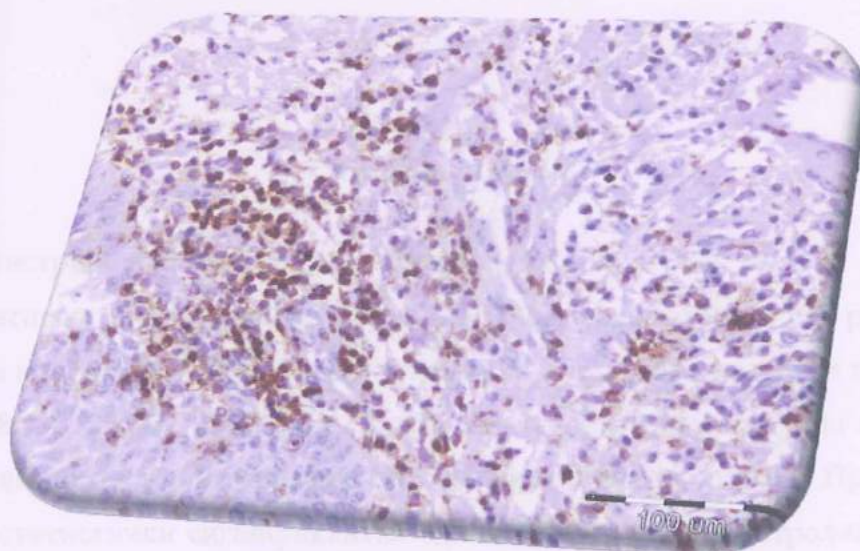
3- Лимфоцитите сочинуваат повеќе од 51% од стромата ; не се регистрира (таб. 15 и граф. 9).



Фотографија 1. Слаб позитивност за LCA



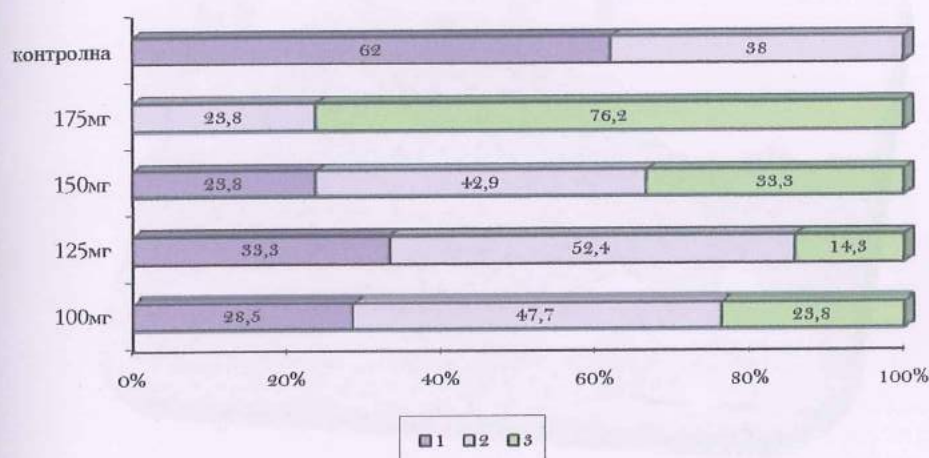
Фотографија 2. Силен позитивни резултат за LCA



Фотографија 3. Леукоцитна инфилтрација на стиромаи и назначена леукоцитна инфилтрација во дел од епителот

Табела бр. 16 Дисџрибуција на CD68 според медикаментозната доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
CD68	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0										
1	6	28,5	7	33,3	5	23,8			13	62,0
2	10	47,7	11	52,4	9	42,9	5	23,8	8	38,0
3	5	23,8	3	14,3	7	33,3	16	76,2		



Графикон бр.10

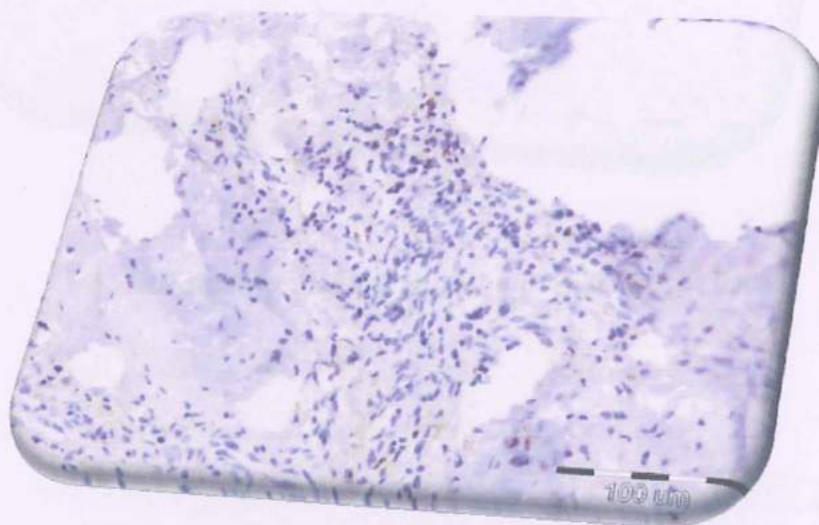
0- Не се регистрира инфилтрат од макрофаги (таб. 16 и граф. 10)

1- Макрофагниот инфилтрат сочинува 20% од стромата; не се регистрира во подгрупата која прима 175мг. Се регистрира во останатите подгрупи и контролната група со 28,5%, 33,3%, 23,8% и 62%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$. Процентуалната разлика е статистички сигнификантна единствено помеѓу контролната група во однос на подгрупата која прима 100мг и 150мг за $p < 0,05$ (таб. 16 и граф. 10)

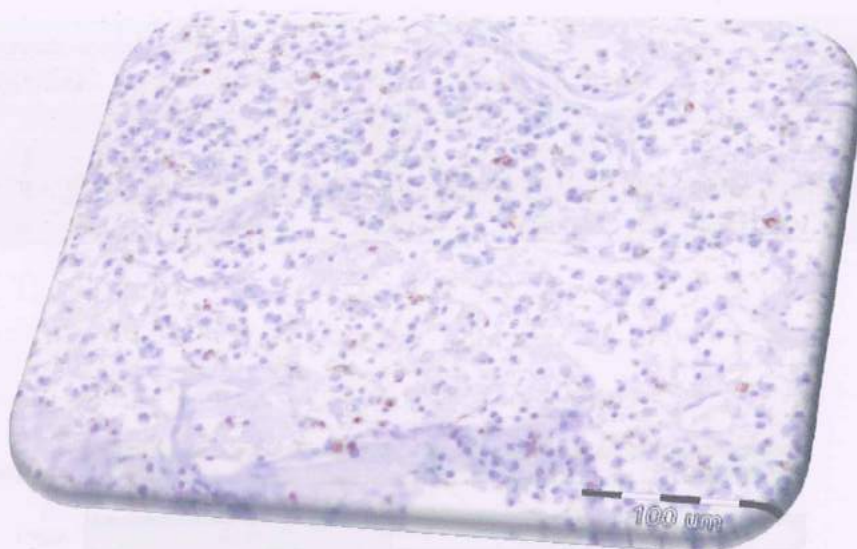
2- Макрофагниот инфилтрат сочинува 21% до 50% од стромата се регистрира во сите подгрупи и контролната група. Во подгрупата која прима 100мг се регистрира со 47,7%, 125мг со 52,4%, 150мг со 42,9% и 175мг со 23,8%. Во контролната група се

регистрира со 38%. Процентуалната разлика која се регистрира кај подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 16 и граф. 10)

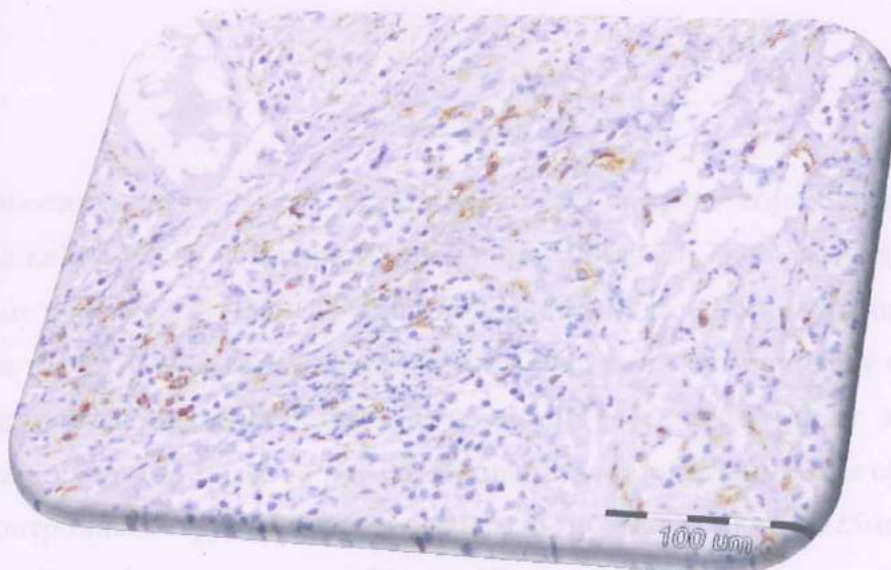
3-Макрофагниот инфилтрат сочинува повеќе од 51% од стромата; не се регистрира (таб. 16 и граф. 10).



Фотографија 4. Слаб позитивност за CD68



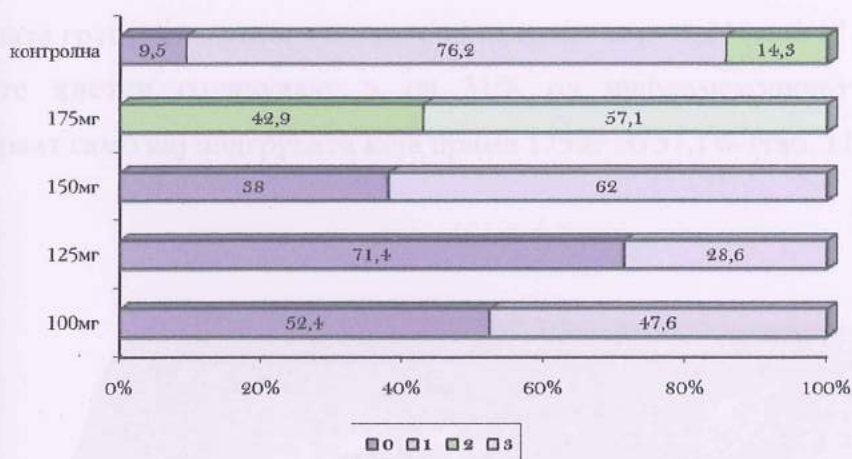
Фотографија 5. Умерен позитивност за CD68



Фотографија 6. Божити позитивност за CD68

Табела бр. 17 Дисџрибуција на апоптоза според медикаментозната доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
апоптоза	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	11	52,4	15	71,4	8	38,0			2	9,5
1	10	47,6	6	28,6	13	62,0			16	76,2
2							9	42,9	3	14,3
3							12	57,1		



Графикон бр. 11

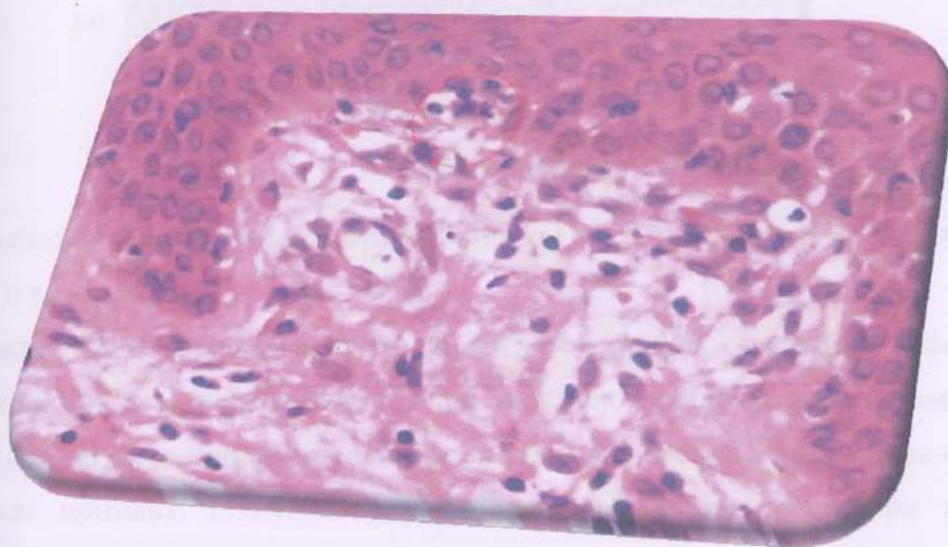
0- нема обоени клетки, не се регистрираат во групата која прима 175мг. Се регистрира кај 52,4% во подгрупата која прима 100мг, кај 71,4% во подгрупата која прима 125мг и кај 38,0 % во подгрупата која прима 150мг . Во контролната група се регистрира кај 9,5%. Процентуалната разлика која се регистрира меѓу подгрупите е статистички сигнификантна помеѓу подгрупата која прима 125мг во однос на подгрупата која прима 150мг за $p < 0,05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група и подгрупите кои примаат 100мг, 125мг и 150мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 17 и граф. 11).

1- обоените клетки сочинуваат > од 10% од инфламаторниот инфилтрат не се регистрираат во групата која прима 175мг. Се регистрира кај 47,6% во подгрупата која прима 100мг, кај 28,6 % во подгрупата која прима 125мг и кај 62,0% во

подгрупата која прима 150мг. Во контролната група се регистрира кај 76,0%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички сигнификантна помеѓу подгрупата која прима 150мг во однос на подгрупата која прима 125 мг за $p < 0,05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група и подгрупите кои примаат 100мг и 125мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 17 и граф. 11).

2- обоените клетки сочинуваат 30% од инфламаторниот инфилтрат, се регистрираат само во подгрупата која прима 175мг со 42,9% и во контролната група со 14,3%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупата која прима 175мг и контролната група е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 17 и граф. 11).

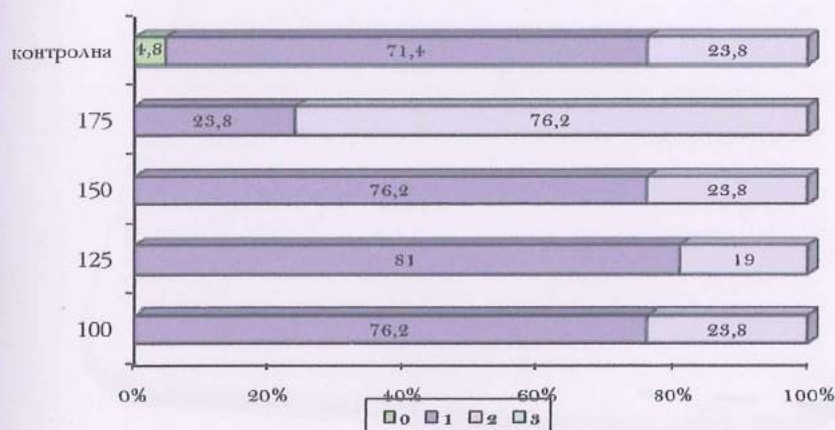
3-обоените клетки сочинуваат $>$ од 31% од инфламаторниот инфилтрат се регистрираат само кај подгрупата која прима 175мг со 57,1% (таб. 17 и граф. 11).



Фотографија 7. Атипично џелце. Кератиноцити (од базален слој) во атипиоза оокружен со неколку лимфоцити и околна ситиформна дегенерација на епителот.

Табела бр.18 Дисјерибуција на bcl-2 според медикаментозна доза

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
bcl-2	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0									1	4,8
1	16	76,2	17	81,0	16	76,2	5	23,8	15	71,4
2	5	23,8	4	19,0	5	23,8	16	76,2	5	23,8
3										



Графикон бр.12

0-нема обоени клетки се регистрира само кај еден пациент во контролната група (таб. 18 и граф. 12);

1-обоените клетки сочинуваат > од 10% од инфламаторниот инфилтрат, се регистрира кај сите подгрупи и тоа кај 76,2% во подгрупата која прима 100мг и 150мг, 81% кај оние кои примаат 125мг, и најмал процент се регистрира со 23,8% кај оние кои примаат 175мг. Во контролната група се регистрира кај 71,4%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите кои примаат 100мг, 125мг и 150мг во однос на подгрупата која прима 175мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$. (таб.18 и граф12);

2-обоените клетки сочинуваат 30 % од инфламаторниот инфилтрат се регистрираат со 23,8% во подгрупите кои примаат 100мг, и 150мг и во контролната група со 19% се регистрираат во подгрупата која прима 125мг. Најголем процент од 76,2% се

трира во групата која прима 175мг. Процентуалната разлика која се
трира помеѓу подгрупата која прима 175 мг во однос на останатите три
и контролната група е статистички сигнификантна за $p = 0,001$ (таб. 18 и
(12):

ените клетки сочинуваат > од 31% од инфламаторниот инфилтрат не се
трираат ниту во една група (таб. 18 и граф. 12).



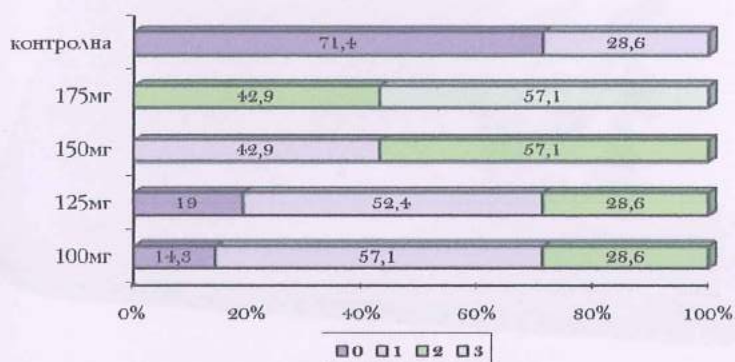
Фотографија 8. *Негативен наод за bcl-2*



Фотографија 9. *Умерен позитивитет за bcl-2*

Табела бр. 19 Дисџрибуција на Ki-67 според дозата на медикаментот

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
Ki-67	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	3	14,3	4	19,0					15	71,4
1	12	57,1	11	52,4	9	42,9			6	28,6
2	6	28,6	6	28,6	12	57,1	9	42,9		
3							12	57,1		



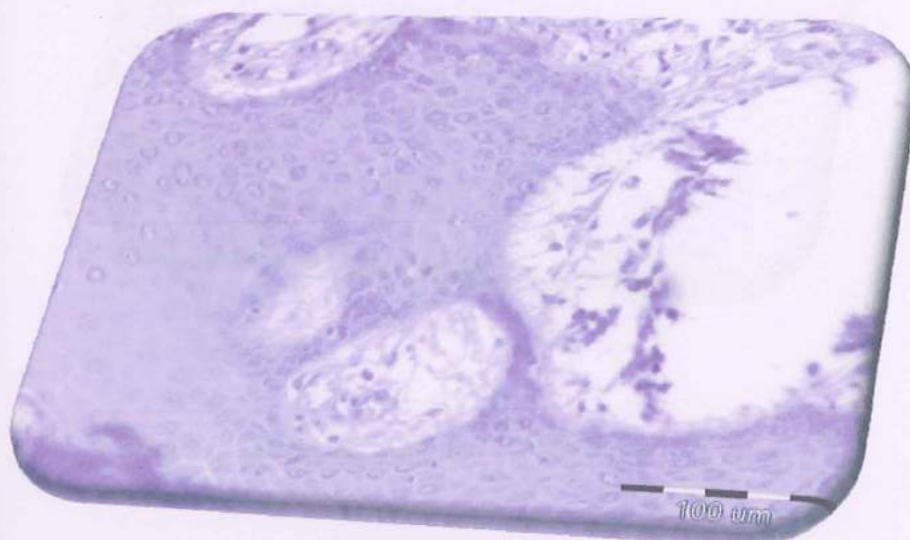
Графикон бр.13

0-нема обоени клетки се регистрираат во подгрупата која прима 100мг и 125мг со 14,3% и 19,0%. Во контролната група се регистрираат со 71,4%. Процентуалната разлика помеѓу контролната група и двете подгрупи кои примаат 100мг и 125мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ (таб. 17 и граф. 13);

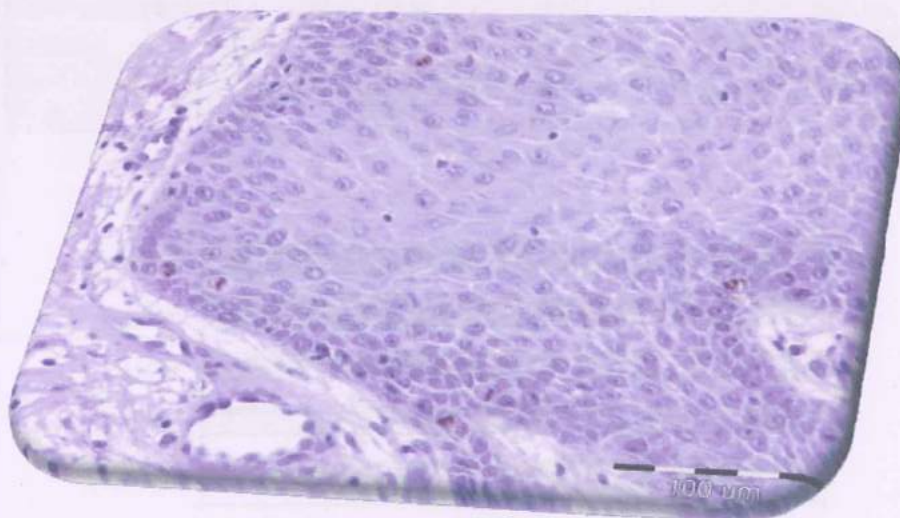
1-обоените клетки сочинуваат >од 10% од инфламаторниот инфилтрат не се регистрираат во подгрупата која прима 175мг. Се регистрира во подгрупата која прима 100мг со 57,1%, 125мг со 52,4%, 150мг со 42,9% и 28,6% во контролната група. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 19 и граф.13);

2- обоените клетки сочинуваат 30% од инфламаторниот инфилтрат се регистрираат кај подгрупата која прима 100мг и 125мг со 28,6%, 150мг со 57,1% и 175мг со 42,9%.

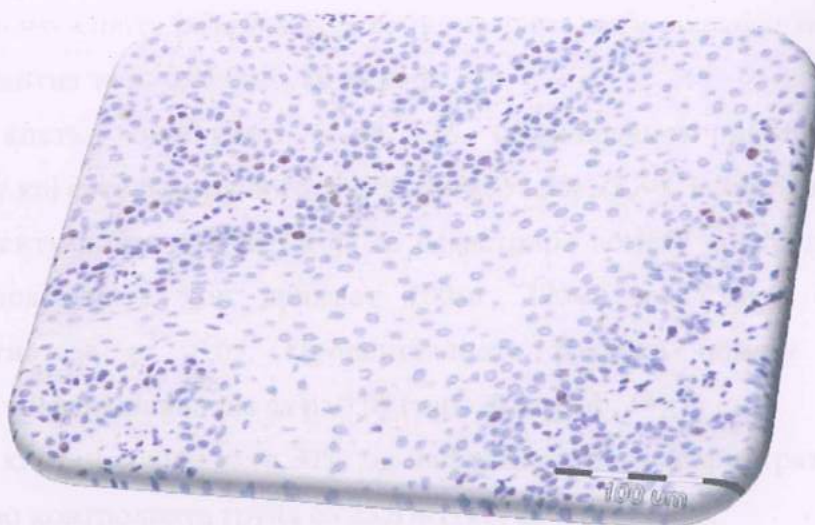
Во контролната група не се регистрира. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 19 и граф. 13); 3- обоените клетки сочинуваат $>$ од 31% од инфламаторниот инфилтрат, се регистрира само во подгрупата која прима 175мг со 57,1% (таб. 17 и граф. 13).



Фотографија 10. Негајивен наод за Ki-67



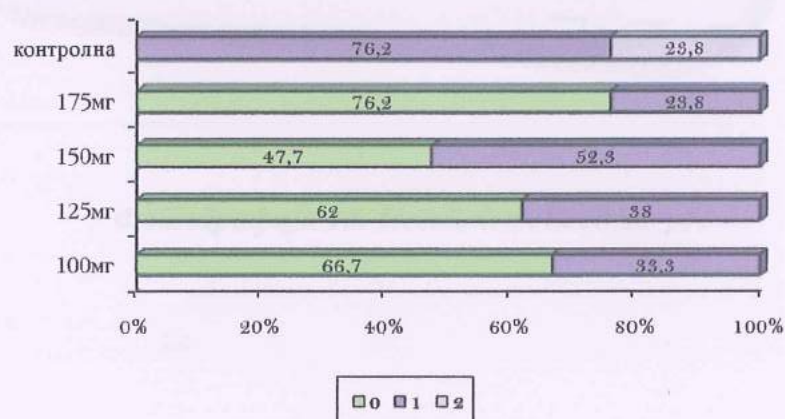
Фотографија 11. Слаб позитивитет за Ki-67



Фотографія 12. Умерен позитивний тест за Ki-67

Табела бр. 20 Дисірибуція на p53 според медикаментозної дози

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контрольна	
p53	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
0	14	66,7	13	62,0	10	47,7	16	76,2		
1	7	33,3	8	38,0	11	52,3	5	23,8	16	76,2
2									5	23,8
3										

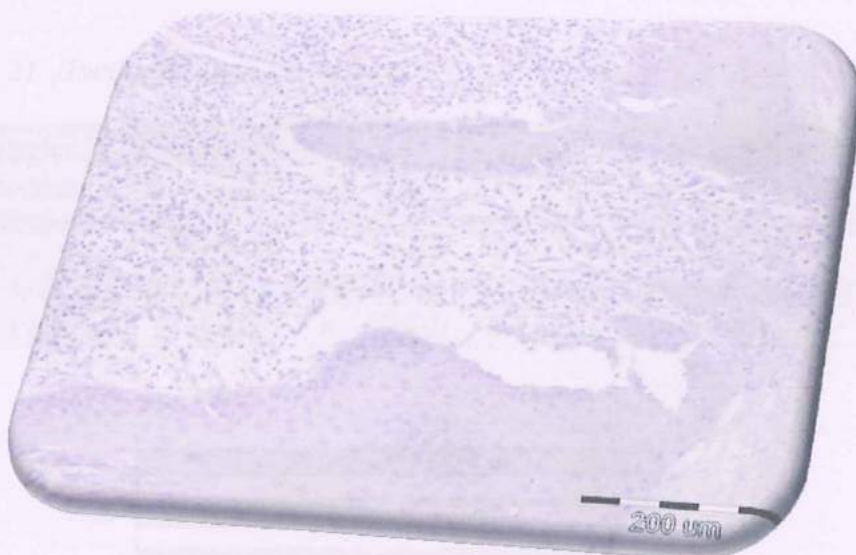


Графикон бр.14

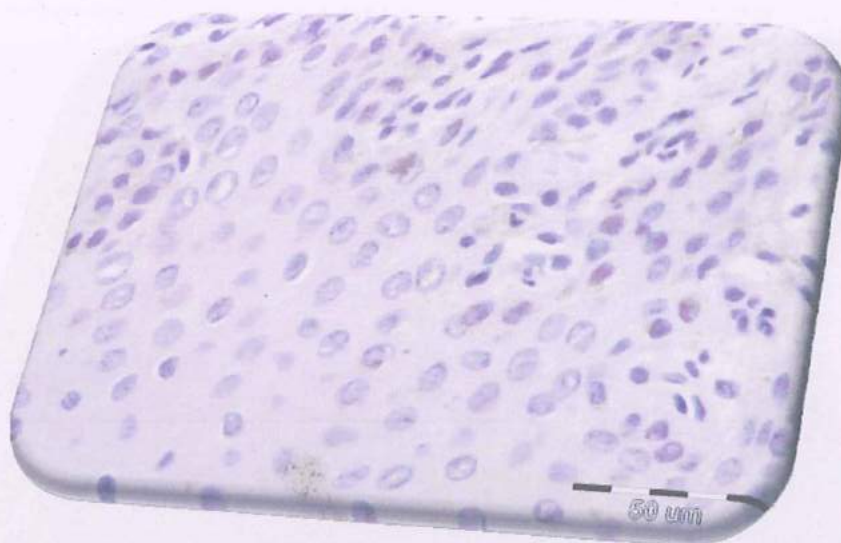
0-нема обоени клетки се регистрираат во сите подгрупи со 66,7%, 62%, 47,7% и 76,2%. Процентуалната разлика која се регистрира меѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 20 и граф. 14);

1-обоените клетки сочинуваат $> 10\%$ од инфламаторниот инфилтрат, се регистрираат кај сите подгрупи со 33,3%, 38%, 52,3%, 23,8% и 76,2% во контролната група. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите кои примаат 100мг, 125мг и 175мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$. Процентуалната разлика помеѓу подгрупите е статистички несигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 20 и граф. 14);

2- обоените клетки сочинуваат 30% од инфламаторниот инфилтрат единствено се регистрира во контролната група со 23,8% (таб. 20 и граф. 14).



Фотографија 13. Нејативен наод за p53



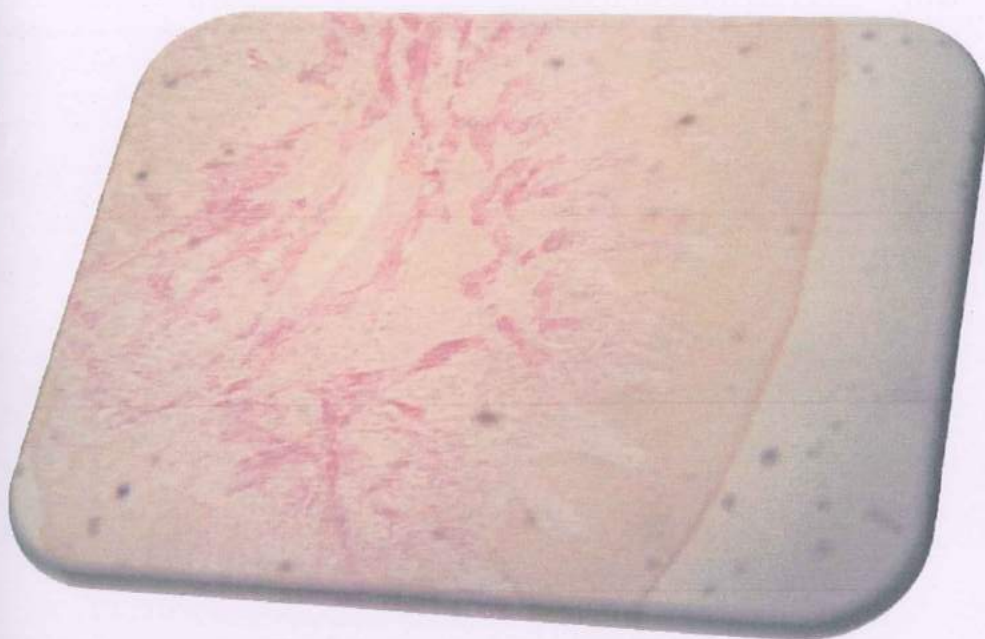
Фотографија 14. Слаб позиционираност за p53

Табела бр. 21 Дисциплинација на колаген

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
колаген	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
арбитража									16	76,2
+	10	47,5	4	19,0	2	9,5			5	23,8
++	9	42,9	11	52,4	11	52,4	7	33,3		
+++	2	9,5	6	28,6	8	38,1	14	66,7		



Графикон бр. 15



Фотографија 15. *Van Gieson x 40; Колаген (+)*



Фотографија 16. *Van Gieson x 40; Колаген (++)*



Фотографија 17. *Van Gieson x 40; Колаген (+++)*

За арбитража се регистрира само во контролната група со 76,2%, што е и за очекување (таб. 21 и граф. 15);

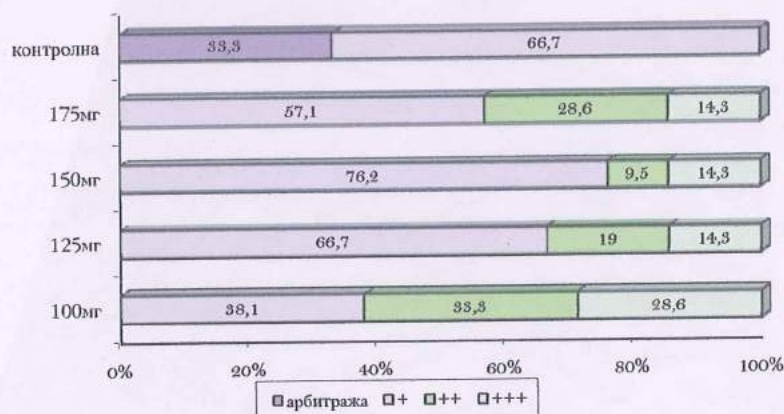
+ Не се регистрира кај подгрупата која прима 175мг. Се регистрира во подгрупите со постепен пад од групата која прима 100мг-47,5%, 125мг-19%, и 150мг со 9,5%. Во контролната група се регистрира со 23,8%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите т.е. подгрупата која прима 100мг во однос на останатите две кои примаат 125мг и 150мг е статистички сигнификантна за $p < 0,05$. Процентуалната разлика помешу контролната група и регистрираните подгрупи е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 21 и граф. 15);

++ Не се регистрира во контролната група. Се регистрира кај 42,9% кои примаат 100мг, 52,4%-125мг и 150мг, и 33,3% кај оние кои примаат 175мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички несигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 21 и граф. 15);

+++ Се регистрира во сите подгрупи со постепен пораст од подгрупата која прима 100мг-9,5%, 125мг-28,6%, 150мг-38,1% и подгрупата која прима 175мг со 66,7%. Процентуалната разлика која се регистрира е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу подгрупата која прима 175мг во однос на подгрупите кои примаат 100мг и 125мг (таб. 21 и граф. 15).

Табела бр. 22 Дисџрибуција на реџикулин

група	100мг		125мг		150мг		175мг		контролна	
ретикулин	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
за арбитража									7	33,3
+	8	38,1	14	66,7	16	76,2	12	57,1	14	66,7
++	7	33,3	4	19,0	2	9,5	6	28,6		
+++	6	28,6	3	14,3	3	14,3	3	14,3		



Графикон бр. 16

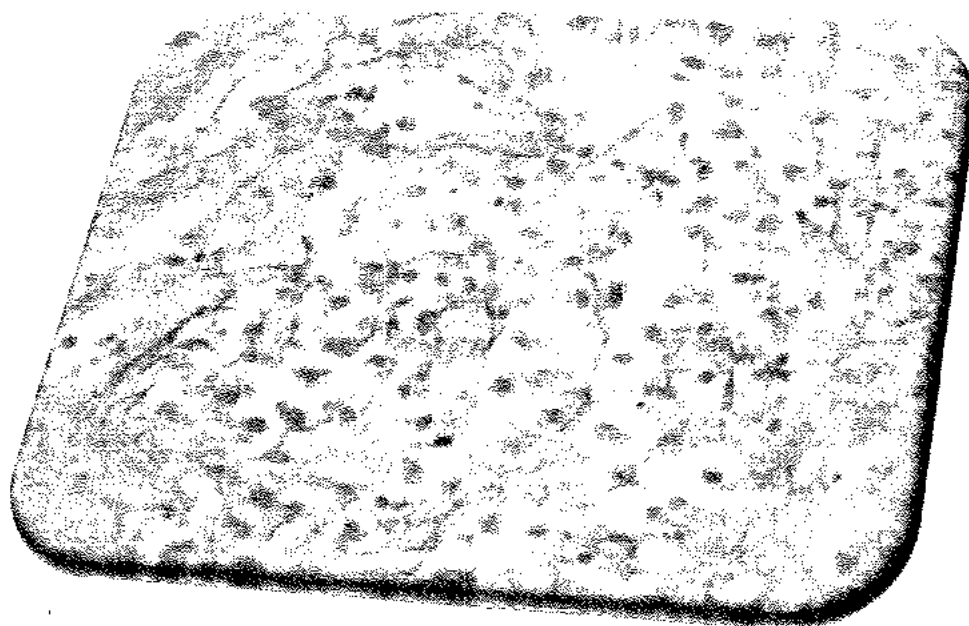
За арбитража се регистрира само во контролната група со 33,3% , што е и за очекување (таб. 22 и граф. 16);

+ Се регистрира во сите подгрупи, во подгрупата која прима 100мг-38,1% 125мг-66,7%, 150мг-76,2 и кај погрупата која прима 175мг со 57,1%. Во контролната група се регистрира со 66,7%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу

подгрупите и помеѓу контролната група е статистички несигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 22 и граф. 16);

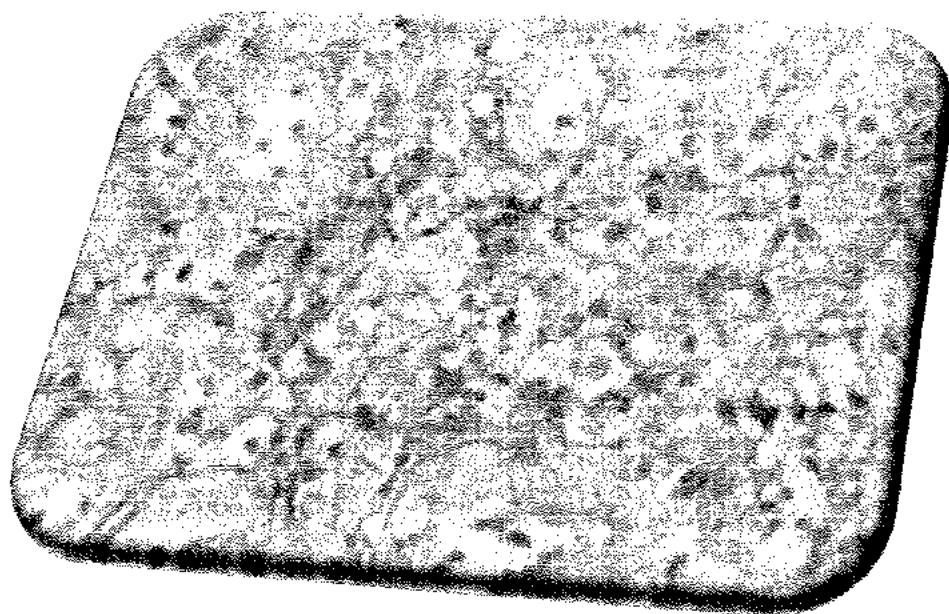
++ Не се регистрира во контролната група. Се регистрира кај 33,3% кои примаат 100мг, 19%-125мг, 9,5%-150мг, и 28,6% кај оние кои примаат 175мг. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички несигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 22 и граф. 16);

+++ Не се регистрира во контролната група. Се регистрира во сите подгрупи, во подгрупата која прима 100мг-28,6%, во подгрупите кои примаат 125мг, 150мг и 175мг со 14,3%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите е статистички не сигнификантна за $p > 0,05$ (таб. 22 и граф. 16).

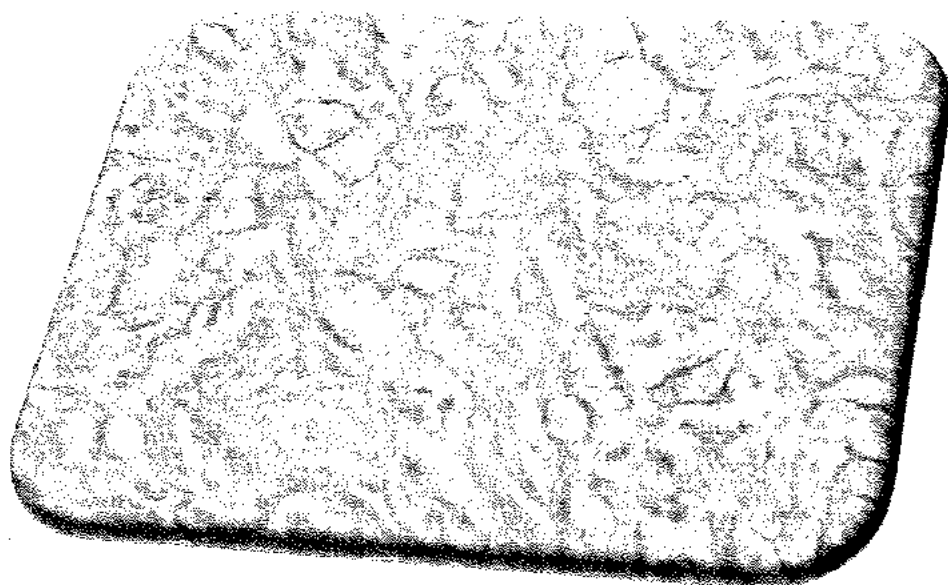


Фотографија 18. Ретикулин x 400-Се визуелизира богатта ретикуларна мрежа во субепителиниот слој, која е особено изразена кај случаи со интензивна фиброза.

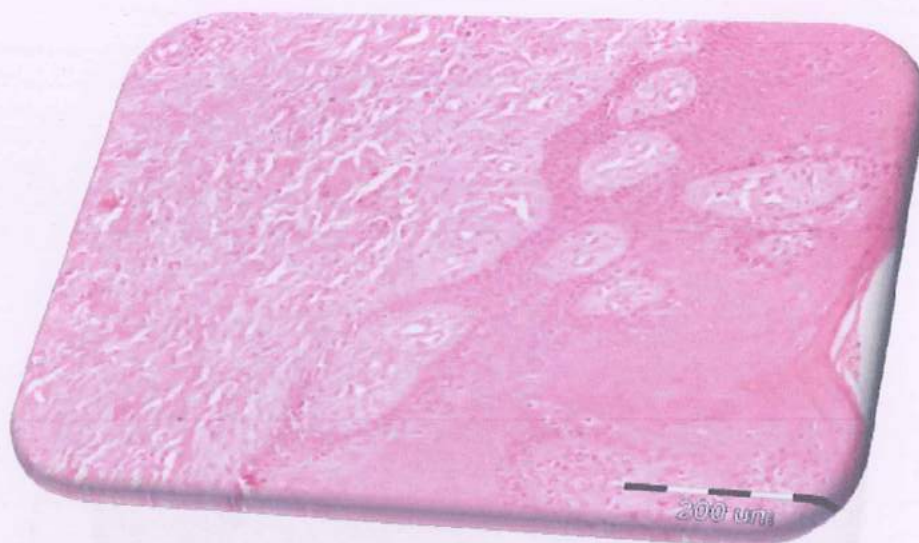
Ретикулин (+)



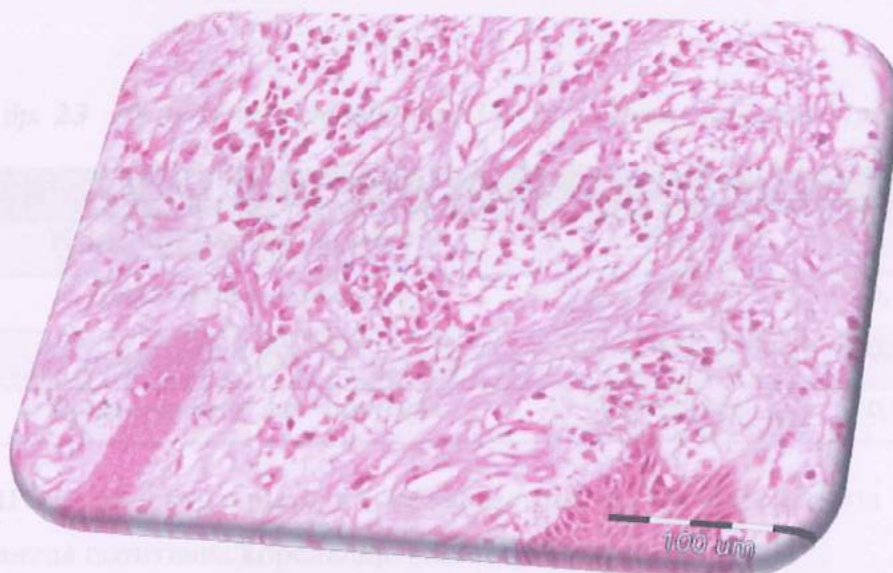
Фотографија 19. Рейикулин (++) x 400



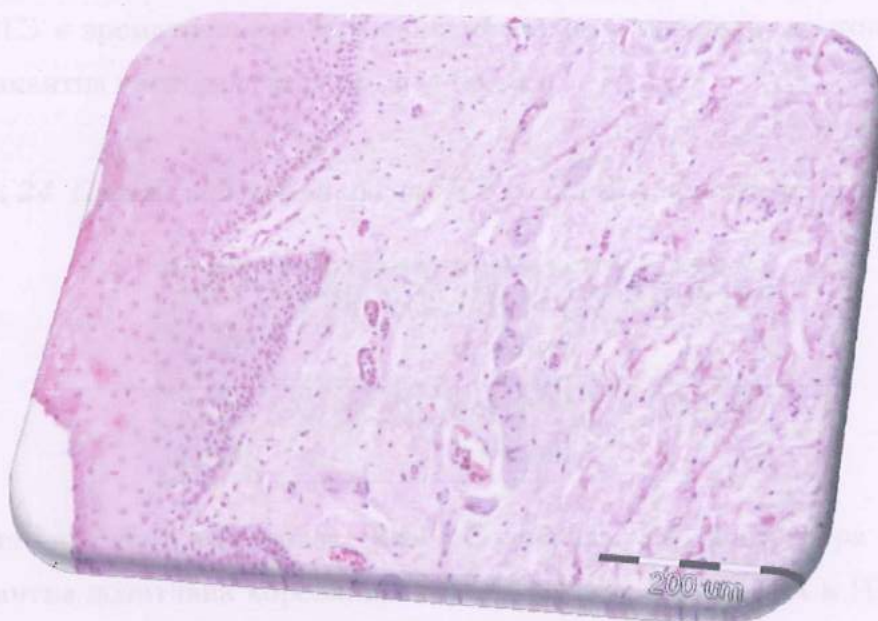
Фотографија 20. Рейикулин (+++) x 400



Фотографија 21. Оскуден инфламаторен инфилтраат во строма со назначена фиброза и умерена аканџоза со љациломаџоза на сквамозен еџиџел со фокусна кератџинизација



Фотографија 22. Умерено боџаџ инфилџраџ во стромаџа сочинеџ од макрофаџи, џолиморфонуклеари, и лимфоџиџи



Фотографија 23. Слаба фиброза на стромата со умерена аканџоза на сквамозниот епител

Табела бр. 23 Приказ на корелација на ИГЗ со одредени параметри

ИГЗ	r	p
Концентрација во серум	0,4019	0,000
Дебелина на епител	0,1854	0,421
Возраст	- 0,0236	0,832
Времетраење на терапија	- 0,0223	0,841

Помеѓу ИГЗ и концентрацијата на медикаментот во серумот постои статистички сигнификантна позитивна корелација (таб. 23).

Помеѓу ИГЗ и дебелината на епителот не постои статистички сигнификантна позитивна корелација (таб. 23).

Помеѓу ИГЗ и возраста регистрирана е не статистички сигнификантна негативна корелација (таб. 23).

Помеѓу ИГЗ и времетраењето на медикаментозната терапија постои статистички несигнификантна негативна корелација (таб. 23).

Табела бр. 24 Приказ на корелација на ИГЗ со одредени индекси

ИГЗ	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
ИДП	0,701425
ИГА	0,574166
ИГИ	0,621983

Со помош на тестот-Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГЗ со ИДП, ИГА и ИГИ за $p < 0,05$ (таб. 24).

Табела бр. 25 Приказ на корелација на ИГЗ со bcl-2, Ki-67 и p53

ИГЗ	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
bcl-2	0,389151
Ki-67	0,446840
p53	0,424015

Со помош на тестот Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГЗ со bcl-2, Ki-67 и p53 за $p < 0,05$ (таб. 25).

Табела бр. 26 Приказ на корелација на ИГЗ со колаген и ретикулин

ИГЗ	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
колаген	0,431789 $p < 0,05$
ретикулин	-0,126327 $p > 0,05$

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГЗ со колаген. Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички несигнификантна негативна корелација помеѓу ИГЗ со ретикулин за $p > 0,05$ (таб. 26).

Табела бр. 27 Приказ на корелација на ИГЗ со LCA и CD-68

ИГЗ	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
LCA	0,377191
CD-68	0,733203

Со помош на тестот Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГЗ со LCA и CD-68 за $p < 0,05$ (таб. 27).

Табела бр. 28 Приказ на корелација на ИГИ со апоптоза и Ki-67

ИГИ	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
апоптоза	0,308469
Ki-67	0,330238

Со помош на тестот-Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу ИГИ со апоптоза и Ki-67 за $p < 0,05$ (таб. 28).

Табела бр. 29 Приказ на корелација на Ki-67 со индекс на дебелина на епител

Ki-67	Spearman Rank Correlations $p > 0,05$
дебелина на епител	0,387994

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички несигнификантна позитивна корелација помеѓу Ki-67 со дебелина на епител за $p < 0,05$ (таб. 29).

Табела бр. 30 Приказ на корелација на концентрација во серум со апоптоза, колаген и ретикулин

концентрација во серум	Spearman Rank Correlations
апоптоза	0,187697 $p > 0,05$
колаген	0,206032 $p > 0,05$
ретикулин	-0,251819 $p < 0,05$

Со помош на тестот-Spearman Rank Correlations се регистрира статистички несигнификантна позитивна корелација помеѓу концентрација во серум со апоптоза и колаген за $p > 0,05$. Со помош на тестот-Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна негативна корелација помеѓу концентрација во серум со ретикулин за $p < 0,05$ (таб.30).

Табела бр. 31 Приказ на корелација на LCA со апоптоза, ИДП, ИГИ и ИГА

LCA	Spearman Rank Correlations
апоптоза	0,493643 $p < 0,05$
ИДП	0,297390 $p < 0,05$
ИГИ	0,343742 $p < 0,05$
ИГА	0,323103 $p < 0,05$

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу LCA со апоптоза, ИДП, ИГИ и ИГА за $p < 0,05$ (таб. 31).

Табела бр. 32 Приказ на корелација на CD68 со апоптоза, ИДП, ИГИ и ИГА

CD68	Spearman Rank Correlations
апоптоза	0,328093 $p < 0,05$
ИДП	0,824051 $p < 0,05$
ИГИ	0,728648 $p < 0,05$
ИГА	0,643597 $p < 0,05$

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу CD68 апоптоза, ИДП, ИГИ и ИГА за $p < 0,05$ (таб. 32).

Табела бр. 33 Приказ на корелација помеѓу времетраење на терапија со апоптоза, bcl2, Ki-67 и p53.

времтраење	Spearman Rank Correlations
апоптоза	0,124417 $p > 0,05$
bcl2	0,127123 $p > 0,05$
Ki-67	0,083888 $p > 0,05$
p53	0,224577 $p < 0,05$

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу времетраењето и p53 за $p < 0,05$. Со

помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички несигнификантна позитивна корелација помеѓу времетраењето и апоптозата, Ki-67 и bcl-2 за $p > 0,05$ (таб. 33).

Табела бр. 34 Приказ на корелација помеѓу дозата на циклосјориноид со апоптозата, bcl-2, Ki-67 и p53

доза	Spearman Rank Correlations $p < 0,05$
апоптоза	0,660386
bcl-2	0,377778
Ki-67	0,636633
p53	0,526378

Со помош на тестот- Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу дозата на медикаментот и p53, апоптоза, Ki-67 и bcl-2 за $p < 0,05$ (таб. 34).

Дискусија

Дискусија

Недоразјаснатите и комплексни механизми на гингивалната хиперплазија во денешни услови наметнуваат потреба на што посунтилни истражувачки постапки, кои на свој начин ќе ја сугерираат предоминантноста на одредени компоненти одговорни за овој многу чест и карактеристичен симптом кај пациенти кои се под циклоспоринска терапија.

Иако досегашните студии укажаа на сериозна партиципација на клеточната пролиферација, зголемената синтетска активност или намалена деградација, во циклоспорин - индуцираната хиперплазија, сепак ниеден од нив не обезбеди на дефинитивен и убедлив начин приоритетот во веќе апострофираната клиничка презентација.

Од друга страна пак студиите, за учество на целуларните и апоаптитични влијанија резултираа во неизедначеност и контрадикторност. Оттаму, оправдано е мислењето дека сепште не постојат јасни информации и сознанија за тоа дали гингивалното зголемување е последица на еден фактор или синхронизација и комбинација на повеќе причинители условени од дозата на циклоспоринската терапија.

Според литературата која ја консултиравме, циклоспорин-индуцираната гингивална хиперплазија претставува комбинација од повеќе целуларни влијанија. Генерално дефицитот на контролата за раст асоциран со фибробластната хиперплазија и акумулација на матрикс компоненти, резултира во хиперплазирано ткиво со релативно нормална архитектоника. Хиперплазијата на гингивата може да биде резултат на зголемена клеточна пролиферација, зголемена синтетска активност, намалена деградација или заедничка комбинација на овие фактори (6).

Тргувајќи од клиничкиот аспект на гингивалното зголемување, концепт кој најмногу преовладува во теориите за хиперплазија на гингивата е индивидуална преосетливост кон циклоспорините или кон неговите метаболити. Се претпоставува дека овие наоди се должат на разлики во субпопулациите на фибробластите или различна предиспозиција на гингивата кон инвазија на микроорганизмите од

денталниот плак, како резултат на интерференцијата на циклоспоринот со Т-клеточниот имунитет (5).

Од нашето истражување евидентиравме дека ИДП (индекс на дентален плак) со вредност 1 е застапен само во групите кои примаат 100мг, 125мг, и 150 мг, додека кај испитаниуците од контролната група и испитуваната групата која прима циклоспорин 175мг оваа индексна вредност не е регистрирана.

ИДП со вредност 2 се регистрира во сите испитувани групи и контролната група. Статистичката анализа помеѓу сите испитувани подгрупи претставена преку процентуалната разлика е статистички несигнификантна $p > 0,05$. Статистички сигнификантна процентуалната разлика е евидентна помеѓу контролната група и подгрупата која беше подложена на терапија со циклоспорин 175мг ($p = 0,0039$).

ИДП 3 е присутен во сите групи, но процентуално најмногу е застапен во групата која примаше циклоспорин 175мг. Добиената процентуална разлика помеѓу групата која прима 175мг во однос на останатите подгрупи и контролната група е статистички сигнификантна $p = 0,00$.

Тргувајќи од добиените резултати за постоење статистичка разлика во дистрибуција на фреквенција на плак индексот кај испитуваните подгрупи, евидентиравме постоење на високи плак вредности во групата која што беше подложена на терапија со највисока доза на циклоспорин од 175мг. Всушност добиениот клинички наод беше и очекуван. Имено, зголеменото гинивално ткиво кое од своја страна доведува до формирање на гингивални цепови т. е. лажни пародонтални цепови е директна причина за зголемена акумулација и задршка на дентален плак. Кај сите испитувани пациенти независно од аплицираната доза на циклоспорин (100, 125, 150 или 175mg) наидовме на низок степен на орална хигиена. Наспроти нив кај контролната група, плак акумулацијата беше евидентно намалена. Сметаме дека ваквите наоди на плак акумулацијата кои се однесуваат на контролната група се последица на подобри можности за одржување на орална хигиена кои се одразуваат на клиничкиот објективен наод.

Тргувајќи од фактот дека пациентите со бубрежна трансплантација имаат сериозно примарно заболување кое ги обврзува на континуирана циклоспоринска

терапия, императив за оваа категорија болни е максимална ангажираност за одржување добра орална хигиена. Спротивно од овој став, ние при спроведување на клиничкиот преглед кај испитаниците од испитуваната група забележавме немотивираност во одржувањето на оралната хигиена, и комплетна незаинтересираност за оралното здравје кое резултира во висок плак индекс кај истите, кој е предуслов за прилично напреднатиот пародонтошки стадиум.

Во тој контекст нашите резултати одат во прилог на позитивна корелација на клиничкиот губиток на атачмент со индексот на гингивална инфламација $p < 0,05$ и со степенот на гингивалното зголемување $p < 0,05$. Најверојатно длабоките пародонтални цепови каде хиперплазираната гингива е посебно впечатлива ја отежнува способноста за одржување на орална хигиена и секундарно доведува до нова плак акумулација која предизвикува повторно зголемување на гингивалниот обем. Сите овие збиднувања сериозно партиципираат во прогресивно губење на пародонталниот атачмент.

Нашите резултати се во согласност со истражувањата на Bartek (8), кој го демонстрира ефектот на циклоспоринската супресија врз бактериските липополисахариди од денталниот плак. Познато е дека липополисахаридите во нормални услови се цитотоксични за фибробластите, додека во присуство на циклоспорин, доаѓа до супресија на овој ефект, а со тоа и до нивна пролиферација.

Иако денталниот плак претставува предиспонирачки фактор за развој на гингивалното зголемување, MacGaw и сор. (60) сметаат дека не е непходен, бидејќи регистрирале високи индекси на дентален плак и гингивална инфламација и високи вредности на циклоспоринската концентрација во серум кај пациенти кај кои не биле евидентирани гингивални промени.

Semour и Smith (88) иако сметаат дека контролата на плакот не го превенира развојот на гингивалното зголемување кај чувствителни пациенти, сепак со елиминирање на инфламаторната компонента, доаѓа до редукција на гингивалното зголемување. Тие сметаат дека контролата на плакот и отстранувањето на плак ретенционите фактори го подобруваат гингивалното здравје кај пациентите со бубрежна-трансплантација, но овие мерки сами по себе не го спречиле развојот на

гингивалната хиперплазија или рекурентноста по извршената хируршката интервенција.

Како последица од присутниот дентален плак, ИГИ со степен 0, беше присутен само во подгрупите кои примаат 100мг и 125мг. Процентуалната разлика за ИГИ со степен 1, која е регистриран меѓу подгрупите кои примаат 125мг и 150мг, во однос на контролната група е статистички сигнификантна за $p < 0.03$. Што се однесува до степен 2 разликата е сигнификантна само меѓу подгрупата која прима 100 мг во однос на подгрупата кој прима 150мг за $p < 0.03$. За степен 3 во однос на ИГИ, процентуалната разлика е статистички сигнификантна меѓу подгрупата кој прима 125мг и онаа кој прима 175мг.

Од добиените резултати за фреквенциите на индексот на гингивалната инфламација (ИГИ) во однос на испитуваните групи добивме статистички високо значајна разлика на вредностите за гингивалната инфламација помеѓу испитуваните групи. Со меѓусебна споредба на групите, добивме високо статистички значајна разлика меѓу првата и четвртата група (100 и 175мг), меѓу втората и четвртата група (125 и 175мг) и меѓу контролната група и групата со доза од 125мг и 150мг. Меѓу останатите групи не постоеше статистички значајна разлика.

Сметаме дека вака добиените резултати најверојатно се должат на фактот што во првата и во втората група дозите на ординираниот медикамент се помали и на таков начин е предизвикана помала имуносупресија која условила антигените од бактерискиот плак да делуваат врз локалниот орален имунитет. Локалната орална имуна реакција индуцира одбрамбена реакција на гингивата која се манифестира со воспаление во кое хемодинамските промени (промени во пермеабилноста на крвните садови и формирање на леукоцитен инфилтрат) се примарни. За разлика од претходните две групи, кај четвртата група пациенти, кои примаа висока доза на циклоспорин (175мг), евидентиравме силно изразена гингивална инфламација која најверојатно е последица на супримираниот локален имун одговор. За дефинитивно разјаснување на овие патогенетски збиднувања, сметаме дека се неопходни дополнителни истражувања кои би дале попрецизни толкувања и одговори, на овие сèуште до крај неразјаснети прашања. Сепак, сметаме дека контролирањето на

гингивалната инфламација е од посебна важност за овие пациенти кои се под имуносупресивна терапија, бидејќи на таков начин се превенира рекурентноста на бактериските инфекции, посебно кај пациентите кои примаат високи дози на циклоспорин (над 175мг).

Buduneli и сор. (15) известуваат за асоцираност меѓу претходно присутниот плак и гингивална инфламација која корелира со циклоспоринското зголемување на гингивата. Инфламацијата води кон ткивно оштетување преку различни медијатори кои се ослободени од активираните инфламаторни клетки. Во инфламирано ткиво постои високо ниво на ремоделирање, ефектот на циклоспоринот притоа делува синергистички со ендогените сигнали, резултирајќи во зголемена репарација или разраснување. Инфламаторните медијатори притоа учествуваат како кофактори во индуцирање на гингивалното зголемување.

Статистички сигнификантната позитивна корелација помеѓу ИГЗ со ИДП, ИГИ и ИГА за $p < 0,05$ претставува еден логичен заклучок од претходно изнесените податоци. Во согласност сме со Seymour (88), Hassell (44), кои го подржуваат концептот за плак-индуцираното гингивално зголемување и сметаат дека денталниот плак и гингивалната инфламација претставуваат фундаментален концепт за ова зголемување. Romito и сор. (83) добиле резултати за сигнификантно намалување на гингивалното зголемување по иницијалниот дебридмент и сметаат дека контролата на плакот претставува еден од најважните фактори во превенирање на неговата рекурентност.

Но, постојат и студии кои известуваат за слаба корелација меѓу денталниот плак, гингивалната инфламација и степенот на гингивалното зголемување. Daley (27) демонстрира само слаба корелација, додека Scincaglia (85) смета дека присуството на денталниот плак и гингивалната инфламација не корелирале со инциденцата на гингивалното зголемување, испитувано кај 80 пациенти со бубрежна трансплантација.

И, покрај присутните разлики, а поткрепено и со резултатите кои ги добивме кај 30 испитаници со бубрежна трансплантација кои примаа циклоспоринска терапија, каде ги нотиравме пародонталните индекси пред и по терапија

(вклучуваше и инструкции за одржување на орална хигиена), забележавме сигнификантно намалување на ИДП, ИГИ и степенот на гингивално зголемување потврдувајќи дека минимизирање на овој несакан ефект може да се постигне со отстранување на локалните иританси и редукција на гингивалната инфламација (61).

Најверојатно присуството на лажни гингивални ценови ја афектираат способноста за одржување на орална хигиена и секундарно доведуваат до плак акумулација која предизвикува повторно зголемување на гингивалниот обем (заради присутната инфламација) и прогресивно настанува губење на пародонталниот атачмент. Нашите резултати се во согласност и со истражувањата на Bennet (10), кој во своите истражувања го демонстрира ефектот на циклоспоринска супресија на бактериските липополисахариди од денталниот плак. Познато е дека липополисахаридите во нормални услови се цитотоксични за фибробластите, додека во присуство на циклоспорин, доаѓа до супресија на овој ефект, а со тоа и до нивна пролиферација.

Овие наоди се во согласност и со Echelard и сор. (32), кои испитувајќи го степенот на инфламација на здрава и циклоспорин-индуцирана гингива користеле инфламаторни маркери познати како протеин S-100A8 и S-100A9, утврдиле сигнификантна инфламација во сврзното ткиво кај третираната гингива споредена со здрава гингива. Оралните бактерии и гингивалните клетки и ткива, кај пациентите кои примаат циклоспоринска терапија реагираат на специфичен начин кој се манифестира со релативно високо ниво на инфламација и целуларитет, спореден со другите форми на гингивално разраснување (33).

Циклоспоринот ја регулира цитокината експресија во гингивалните ткива. Преку селективна имуносупресија, тој има способност за инхибиција на интерлеукините ($IL-6$, $IL-1\beta$), кои се потентни стимулатори на колагеназата, и на таков начин има важна улога во патогенезата на гингивалното зголемување и формирање на пародонталниот џеп. Myrillas и сор. известуваат за цитокината инхибиција која се одвива на дозно-зависен начин (65).

ИГЗ (индекс на гингивално зголемување), во нашата студија покажа статистичка сигнификантност меѓу подгрупите од 100мг, 125мг, и 150мг во однос на подгрупата од 175мг. Во однос на групите, постои значителна сигнификантна разлика меѓу ИГЗ кај контролната група и пациентите третирани со медикамент.

Гингивата е особено чувствителна на притација и инфламација. Во текот на инфламаторниот процес, бројни гингивални влакна се оштетуваат, особено циркуларните. Како одговор на инфламацијата, се јавува фибробластна активност која се манифестира со секреција на колаген, ретикулин, интрцелуларна супстанција и нивна последователна организација во густ сврзно-ткивен комплекс кој има тенденција да го ограничи ширењето на лезијата. Оштетувањата започнуваат во регионите на помал отпор, т. е. сулкусниот епител. Ледираната зона овозможува слободна комуникација помеѓу крзното на гингивата и оралниот кавитет. На атакираната гингива присутен е богат инфламаторен инфилтрат со бактериите и нивните токсини. Епителот кој е во најнепосредна близина на дефектот, покажува зголемена митотска активност придружена со хиперплазија, резултирајќи во зголемена дебелина и траки од епител кој пенетрираат во сврзното ткиво. Во некои случаи, постои миграција на епителниот атечмент кон апикално. Ова продлабочување на пародонталниот џеп е последица од губење на гингивалниот фиброзен атечмент. Во некои случаи гингивалното зголемување индуцирано од едем и сврзно-ткивна хиперплазија ќе продуцира продлабочување на џепот иако епителниот атечмент кај мал број случаи се чини дека е сèште во најнепосредна близина на емајлово-цементното споиште. Инфламацијата индуцира епителна хиперплазија преку нутритивен дисбаланс на епителните слоеви во површинските клетки на сулкусот, поради што тие претрпуваат дегенеративни промени. Овие клетки понатаму се одвојуваат од површинскиот епител, и формираат пародонтален џеп. Овие епителни траки вршат механички притисок врз колагените елементи и ги уништуваат. Во овие регии на епителот се случува и колагенолиза по ензимски пат. Паралелно со инфламаторниот процес доаѓа до апикална прогресија на епителниот атечмент од емајлот кон цементот. Губење на интегритетот на влакната ја овозможува епителната прогресија кон апикално. Понатаму доаѓа до оштетување на колагените влакна и целуларните компоненти.

Кај долгоперзистирачка гингивална инфламација, репараторните процеси се одигруваат паралелно со деструктивната фаза на инфламацијата. Фиброзата во сврзното ткиво продуцира гингивално зголемување (73).

Ramon и сор. (82) демонстрираат дека задебелувањето на епителните слоеви кај нифедилин-индуцираното гингивално зголемување е поголемо околу 5-10 пати во однос на здрави контролни пациенти. Волуминозната густина на оралниот епител е сигнификантно зголемена кај циклоспорин-индуцираното зголемување во споредба со контролните не-медикаментозни контроли. Belazi и сор (9) покажуваат дека кај циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување, се сретнува повеќе слоен сквамозен епител кој е хиперпластичен со акантоза, и фокална спонгиоза со наизменични делови на паракератоза и длабока инвагинација на епителот во сврзното ткиво.

Дискутирајќи го односот фармакокинетички варијабил-степен на гингивално зголемување, секако дека треба да се земе во предвид и основниот пародонтален статус (особено инфламаторната компонента), медицинскиот статус како и генетската предиспозиција. Одредени нивоа на медикаментот можат да бидат рефлексја и на реналната функција која последователно влијае на фармакокинетиката на циклоспоринот. Овие фармакокинетски промени можат да влијаат на интеракцијата меѓу медикаментот и гингивалните фибробласти, на начин кој води кон гингивално зголемување (52).

Во однос на ИГА (индекс на губиток на атачмент), процентуалната разлика која се регистрира помеѓу подгрупите кои примаат 100мг и 125мг, во однос на групата која прима 175мг е статистички сигнификантна $p=0,00$. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу контролната група во однос на подгрупите кои примаат 150мг и 175мг е статистички сигнификантна за $p=0,00$.

Добиените резултати, сметаеме дека се должат на постоење високи вредности на дентален плак и негово пролонгирано делување кое се манифестира како хронична воспалителна реакција. Хроничната инфламација, предизвикана од дејството на микроорганизмите (токсини, ензими, алергија) како и од механички иритации (забен камен), во сврзното ткиво, непосредно до епителната инсерција

доведува до формирање на инфилтрат воглавно составен од плазма клетки и лимфоцити, како и промена во крвните садови. Поради тоа доаѓа до пропаѓање на колагените влакна во близина на припојниот епител и соседната слободна гингива, па епителот со тенденција да го пополни настанатиот дефект, пролиферира во апикален правец и се формира пародонтален џеп. При постоење на пародонтален џеп, епителот е прекинат и отворен кон сврзното ткиво, а преку него доаѓа до ширење на инфламацијата со бактериите и токсините. Епителот кој е во непосредна близина до дефектот, покажува зголемена митотска активност со придружна хиперплазија, резултирајќи во зголемена дебелина и траки од епител кој пенетрираат во сврзното ткиво. Оваа епителна пенетрација е овозможена од губењето на гингивалните влакна, всушност интактниот сврзен апарат не дозволува епителна миграција. Епителните слоеви ги лишуваат површинските клетки од сулкусот од исхрана, и со тоа тие трпат дегенеративни промени. Овие клетки понатаму калцифицираат. Кога овие калцификатни маси се одвојуваат од површинскиот епител, тие го формираат џепот. Епителните траки вршат механички притисок на колагените елементи, и ги уништуваат, но исто така се спомнува и епителот кој врши колагенолиза по ензимски пат. Паралелно со инфламаторниот процес, доаѓа до апикална прогресија на епителниот атачмент од емајлот кон цементната површина. Интактните гингивални влакна со инсерција во цементот го негираат овој феномен. Губење на интегритетот на влакната ја овозможува епителната прогресија кон апикално. Понатаму со пренесување на инфламаторниот процес во периодонталниот простор или во интерденталниот џептум, доаѓа до деструкција на овие ткива и до последователна остеопороза (Offenbacher S (74)).

Теодосијевиќ (89) и Seymour (88) кај циклоспорински третирани пациенти по 3 и 6 месечен посттрансплантациски период забележале сигнификантно зголемување на гингивата со длабочина на пародонталните џепови $>3\text{mm}$.

Иако овие ткива покажуваат назначена инфламаторна компонента, пародонталната деструкција Seymour и сор. (87) сметаат дека не е вообичаена карактеристика на пролиферативната сосостојба. Нивните истражувања

потврдуваат дека ткивно-деструктивната компонента на инфламаторниот одговор е маскирана од ткивно-регенеративната компонента. Дали пародонталната деструкција примарно настанува заради ткивниот одговор како резултат на бактерискиот плак останува предмет за понатамошни истражувања.

Испитувањата насочени кон откривањето на механизмот на гингивалното зголемување, укажуваат на јака инхибиција на циклоспорин А во продукција на PGI_2 во *in vitro* и *in vivo* студиите. PGI_2 го продуцира гингивалното ткиво и има антипролиферативен ефект. Ниската вредност на PGI_2 резултира во намалено ниво на cAMP и последователно зголемена митотска активност и клеточна пролиферација (46, 67).

Zebrowski и сор. (102) сметаат дека зголемениот сврзно-ткивен матрикс кај пациентите кои биле третирани со циклоспорин се јавува поради зголеменото ниво на не-сулфатни глюкозаминоглюкани.

Пролиферативниот ефект на циклоспоринот на гингивалните кератиноцити, бил предложен и од Wondimu и сор. (99) кои забележале сигнификантно зголемување на волуменската густина на оралниот епител и површинската густина на епителните траки, компарирани со контролни примероци. Во студиите кои го подржуваат пролиферативниот ефект на циклоспоринот кон кератиноцитите присутни во медикаментозно-индуцирани епителни промени, спаѓаат и Cetinkaya (24) кои сугерираат дека пролиферативниот ефект на циклоспоринот на гингивалните епителни клетки е поголем во однос на денталниот плак и гингивалната инфламација. Секако дека тие не ја исклучуваат можноста и локалните фактори да учествуваат во пролиферативните активности на епителот, но само како дополнителни.

Das и сор. (29) сметаат дека епителните промени се резултат на инфламаторни процеси. Слично на нив, Fuiano и сор. (34) сметаат дека хиперпластичните алтерации на гингивата се должат на индуцираната инфламација, а многу помалку на циклоспоринот.

За разлика од нашите резултати, во литературата постојат и резултати кои го демонстрираат и антипролиферативниот ефект на циклоспоринот на

кератиноцитите испитувани во *in vitro* услови. Значењето на овие резултати не е сосема јасно, бидејќи интерпретацијата на *in vivo* условите е поинаква и секако не треба да се исклучи ефектот на инфламацијата.

Во литературата (2, 20, 48) наидуваме на истражувања кои известуваат за инхибиторниот ефект на циклоспоринот кон кератиноцитниот раст директно или индиректно. Во тој контекст *in vitro* студиите го покажуваат анти-пролиферативниот ефект на циклоспоринот на кератиноцитите сметајќи дека, пролиферацијата можеби се одвивала непроменето кон циклоспоринските ткива. Со оваа теза согласни се и Niimi и сор. (68) кои поради зголемениот број на ДНК полимераза алфа (+) во базалните кератиноцити, сметаат дека феноменот на гингивална хиперплазија не се должи на зголеменото ниво на кератиноцитната пролиферација, туку на зголемениот животен век на кератиноцитите.

Vignaux и останатите (13) го испитуваат ефектот на циклоспорин на епителните клетки и при тоа утврдуваат дека циклоспоринот ја инхибира делбата на епителните клетки, но овој ефект не се должи на промени во апоптозата. Дејството на циклоспоринот на оралните епителни клетки, авторите сметаат дека можеби е асоциран со долготраен стрес сигнал, како дел од патолошките ефекти на медикаментот.

Сакајќи да се дефинира ставот околу тоа дали гингивалната хиперплазија се должи на промени во гингивалниот епител, субмукозното сврзно ткиво или е заедничка, Lauer et al (58) истовремено ги испитувале и останатите фактори како пол, возраст, различна медикаментозна концентрација на циклоспоринот, времетраење на терапија како партиципации во процесот на ГЗ. Тие го испитувале влијанието на различни концентрации на циклоспорин (10^{-6} g/ml; 5×10^{-7} g/ml; 10^{-9} g/ml), во однос на растот и пролиферацијата на културелни хумани гингивални кератиноцити во период од 3, 6 и 9 дена. При тоа не се евидентирани сигнификантни корелации меѓу степенот на клеточната пролиферација и степенот на клеточен раст, во однос на полот ($p > 0.568$) и времетраењето на медикаментозната терапија ($p > 0.876$), додека концентрацијата на циклоспоринот покажала високо сигнификантно влијание на клеточниот раст ($p = 0.0001$). Инхибицијата на

клеточниот раст била зависна од дозата на циклоспоринот, но ниска концентрација од 10(-9) g/ml дури и го стимулирала клеточниот раст. Евидентно е дека ЦсА употребен во ниски концентрации во подолг временски период го стимулира растот на гингивалните кератиноцити и со тоа се потврдува неговата асоцираност со ГЗ, додека високи концентрации на ЦсА можат да го инхибираат клеточниот раст.

Сакајќи го испитае влијанието на циклоспоринските дози врз фибробластната активност во епителот како и синтезата на колагенот кај групата испитаници спроведовме мерење на дебелината на гингивалниот епител.

Кај групата испитаници, најтенок епител регистриравме кај контролната група, која изнесуваше 699 μ m, а најголема дебелина (1007,6 μ m) е регистрирана кај групата испитаници кои беа подложени на терапија со 175mg. Регистрираната разлика на просечната дебелина на епителот меѓу подгрупите третирани со медикамент е статистички сигнификантна за $p < 0,05$. Воедно беше регистрирана и статистички сигнификантна разлика за $p < 0,05$ помеѓу контролната група во однос на сите четири подгрупи, и подгрупата која прима терапевска доза од 175mg циклоспорин во однос на подгрупите кои земаат 100mg и 125mg.

Овие резултати сметаме дека се должат на стимулаторниот ефект на циклоспоринот на фибробластите во синтеза на колаген и останати матрикс компоненти. Добиените резултати одат во прилог на директното влијание на циклоспоринот на клеточната пролиферација.

Ефектот на циклоспоринот е насочен кон фибробластната активност: пролиферација на фибробластите и формирање на сврзно ткиво во гингивата и бубрезите.

Нашите добиени резултати одат во прилог на резултатите добиени од Willerhausen и сор. (97) кои го испитувале влијанието на циклоспоринот на култури од фибробласти во *in vitro* услови, при што добиени се резултати кои укажуваат на фактот дека при инкубација извршена за 72 часа, синтезата на ДНК е дозно-зависна, додека синтезата на глюкозаминоглюканите била слабо супримирана. Долготрајна стимулација (6 недели) со 1 g/ml циклоспорин резултира во стимулација на

параметрите на раст: компарирано со немедикаментозна група, клеточниот број се зголемил за 168%, инкорпорација на X-тимидин во ДНК за 143%, и содржината на протеини за 159%. Синтезата на колагенот и гликозаминогlukanите биле зголемени за 120%.

Овие резултати го покажуваат директниот ефект на циклоспоринот врз пролиферацијата на хуманите гингивални фибробласти, иако долго време се поставувало прашањето дали ефектот на пролиферација е директно или индиректно предизвикан преку фактори кои се ослободуваат од лимфоцитите.

In vitro студиите покажаа дека циклоспоринот предизвикува сигнификантен пораст на колагената синтеза во култури на гингивални фибробласти, но не влијае врз ДНК синтезата со специфично покачување на тип I проколаген (101). Zebrowski и сор. (102) сметаат дека зголемениот сврзно-ткивен матрикс кај пациентите кои биле третирани со циклоспорин се јавува поради зголеменото ниво на не-сулфатни глукосаминогlukanи. Продукцијата на колаген од страна на гингивалните фибробласти и нивната пролиферација може да се јави и како резултат на зголеменото ниво на тромбоцитниот фактор на раст (PDGF) кој е детектиран во гингива третирана со циклоспорин (33, 55).

Резултатите добиени од хистохемиското испитување, говорат за постоење на сигнификантна разлика во однос на степенот на депонирање на колаген во гингивалната строма помеѓу контролните примероци и ткивните исечоци од испитуваната група ($p < 0,01$). При дополнително тестирање се утврдува постоење на сигнификантна разлика меѓу групата со 100мг и 125мг во однос на подгрупата од 175мг, што укажува на дозно стимулирана синтеза на колаген од страна на фибробластите. Одредувајќи ја густината на ретикулинските и колагените влакна, т.е. во однос на ретикулинот, очекувано се регистрира сигнификантна разлика на намалување на ретикулинска мрежа во гингивалната строма помеѓу биоптичните примероци на контролната група и испитаниците од испитуваната група ($p < 0,01$). Наодите укажуваат на не постоење статистичка разлика на вредностите помеѓу контролната и испитуваната група. Оттука сметаме дека создавањето на ретикуларна мрежа не е дозно-зависна. Всушност на овој начин ја потврдуваме

позитивната корелација помеѓу индексот на гингивално зголемување (ИГЗ) и колагенот. Иницијално како резултат на хроничната инфламација доаѓа до депонирање на богат моноклеарен клеточен инфилтрат и ретикулин во гингивалната строма каде последователно по подолг временски период со развојот на инфламаторниот одговор, настанува замена на ретикулинот со колаген како неспецифичен механизам на организмот за одбрана (за справување со хронични инфекции). Заради фиброзата на ретикуларната мрежа, ИГЗ (индекс на гингивално зголемување) е во статистички несигнификантна негативна корелација со ретикулинот. Во патологијата е познато дека долготрајни хронични воспаленија предизвикуваат склерозациски стромални промени претставени со депонирање на колаген, а во многу напреднати случаи и со создавање на калцификати се со цел да се ограничи штетната нокса. Сето ова резултира во зголемување на волуменот на гингивата, која клинички се детектира како гингивално зголемување (100). Всушност, ова е нашето толкување за добиените резултати во однос на дистрибуцијата на ретикулинските и колагените влакна.

Во фармакодинамиката на циклоспоринот (цитостатик) се вели дека тој делува на клетки кои поседуваат високо ниво на "turn-over", а бидејќи имуните клетки поседуваат многу повисок "turn-over" од фибробластите, најверојатно, циклоспоринот делува многу повеќе на имуните клетки отколку на фибробластите и затоа тие се во дискрепанда со имунитетот. Ова е всушност и објаснувањето на дејството на денталниот плак врз гингивата. Впрочем инфламаторната компонента е таа која делува на фибробластите и влијае врз продукција на колаген чиј краен ефект е гингивалното зголемување.

Неодамна беше демонстрирано дека циклоспоринот не само што го блокира имуниот систем преку инхибиција на сигнали преку Т клеточниот рецептор (превенира продукција на цитокини кои нормално го стимулираат имуниот одговор), туку ја стимулира и продукцијата на TGF β 1 кој претставува најодговорен цитокин за продукцијата на екстрацелуларниот матрикс, колагените фибри, глукозаминоглукани и протеоглукани (55).

Постојат и спротивставени гледања за овој концепт, како што се резултатите на Boltchi и сор. (14) кои сметаат дека постои слаба поврзаност меѓу фибробластната активност и клиничките знаци на гингивалното разраснување, поништувајќи ја униформноста, а подржувајќи ја хипотезата за постоење на мултифакториелен концепт во патогенезата на ова заболување.

Bennet (10), демонстрира дека циклоспоринот е способен да индуцира *in vitro* пролиферација без драстично алтерирање на синтетската активност. *In vivo*, циклоспоринот е врзан со плазматските протеини, еритроцитите и липопротеините и како таков е присутен во високо васкуларизирани ткива (гингивата). Индуцираната пролиферација на фибробластите кое резултира во продукција на матрикс компоненти, само делумно го објаснуваат проблемот на зголемената ткивна маса и целуларитет.

Гингивалното зголемување се должи на задебелување на епителот и зголемување на стромата, но помеѓу ИГЗ и дебелината на епителот не евидентиравме сигнификантна позитивна корелација. Сметаме дека добиените резултати одат во прилог на фактот дека гингивалното зголемено ткиво многу повеќе се должи на зголемување на стромата (заради депониран колаген), отколку на задебелениот епител.

Со цел да ги одредиме ефектите на циклоспоринот и неговата серумска концентрација врз гингивата, го одредивме нивото на циклоспорин во крв.

Од добиените резултати, евидентиравме дека просечната концентрација на циклоспоринот кај пациентите е во границите на нормалната терапевска вредност (600-800 мг/мл), во подгрупите кои примаат 125мг, 150мг, и 175мг циклоспорин. Само во подгрупата која прима 100 мг, се регистрира пониска концентрација од нормалната терапевска концентрација. Разликата која се регистрира меѓу групите е статистички сигнификантна за $p < 0,05$ помеѓу погрупата која зема 100мг во однос на останатите три подгрупи.

Концентрацијата на медикаментот во крв е највисока во првите недели, а потоа постепено се намалува доближувајќи се до терапевтските дози на одржување.

Дозата на медикаментот сама по себе Seymour (88) смета дека е несигурен предвесник на серумската концентрација бидејќи таа е зависна и од тежината на пациентот, од различната апсорпција, алтерираниот метаболизам и екскрециониот период. Понатаму, авторите сметаат дека доколку вредноста на циклоспоринот во плазма е поголема од 400 ng/ml, веројатноста за развој на гингивално зголемување е многу поголема, иако постојат несогласувања во однос на овие параметри па постојат информации за критична вредност над 300 ng/ml (53), а според други автори за вредност над 500 ng/ml (28).

Од добиените наоди на спроведеното истражување евидентирана е позитивна статистички сигнификантна корелација помеѓу ИГЗ и медикаментозната концентрација.

Нашите резултати се во согласност со Thomas (91), Hassell (44), Wondimu (98), Torrezan (93). Тие укажуваат на позитивна корелација помеѓу степенот на гингивалното зголемување и дозата или концентрацијата во серум. Тие притоа истакнуваат дека последната регистрирана доза е најпрецизен предвесник за гингивалното зголемување. Paik (76) по спроведениот пародонтолошки третман, кај циклоспорински третирани пациенти, регистрирал тотална регресија на гингивалното зголемување во 50% од случаите, додека само во 36,4% парцијално намалување на гингивалното зголемување, кое се должело и на редукција во дневната доза на ординираниот циклоспорин.

Во прилог на нашите резултати се и испитувањата на Yamasaki и сор. (101) кои сметаат дека инхибицијата на Т-лимфоцитната функција резултира во намалена фибробластна цитотоксичност, а таа доведува до активна протсинска синтеза и пролиферација.

Спротивно на добиените резултати на оваа студија, истражувањата на Daley (27), Seymour (88), MacGaw (60), Wysocki (100) не ја потврдуваат тезата за постоење на позитивна корелација меѓу циклоспоринската доза и степенот на гингивалното зголемување.

Daley и сор. (27) не ја подржале теоријата дека е потребна минимум критична концентрација на циклоспоринот или некој негов метаболит во серум за да се предизвика гингивално зголемување и дека зголсмена концентрација на медикаментот над терапискиот лимит не доведува до зголемување на гингивалното ткиво.

Во своите клинички истражувања Seymour (88) известува дека гингивалното зголемување се јавува во првите 6 месеци од трансплантацијата, достигнувајќи највисок обем во 9 и 12 месец.

Thomason и сор. (91) сметаат дека степенот на гингивалното зголемување сигнификантно корелирало со дозата и серумската концентрација во испитувања проследени за 3, 6 и 12 месеци.

Во тој контекст бројни епидемиолошки и експериментални студии настојуваат да ја расветлат патогенезата на овој несакан ефект, но сепак не е јасно дали оваа компликација се манифестира кога вредноста на циклоспоринот во серум ќе достигне критично ниво или се јавува како дозно-зависна реакција (44).

Конфликтните резултати најверојатно се должат на постоење на различна индивидуална биоскористливост, степен на протеинско врзување, волумен на дистрибуција, како и различни методи на одредување на медикаментозната концентрација и нејзината релација со фактор време.

Во истражувањето спроведено во оваа студија сите пациенти примаа циклоспорин во капсуларна форма. Во литературата најдовме на медикаментозно третираните пациенти со циклоспорин, кои освен капсуларна форма, користеле и солуција. Тргувајќи од фактот дека кај различните форми на циклоспоринска терапија се постигнува различна искористливост и различно време на постигнување максимална концентрација во серум, разбирлив е различниот ефект на овие два циклоспорински препарати во гингивалниот одговор Thomason и сор. (91) Karpinia и сор. (52) спровеле истражување кај млади пациенти (средна возраст 12, 5 години) каде циклоспоринската доза/ден/kg телесна тежина не била сигнификантно различна меѓу поединци со гингивално зголемување и без промени на гингивата.

Концентрацијата на циклоспоринот во крвта била сигнификантно повисока кај индивидуите кои не покажале гингивално зголемување. Но, средното времетраење на циклоспоринската терапија кај пациентите без гингивално зголемување изнесувало 1,3 месеци, додека кај пациентите со гингивално зголемување 3,5 години. Нивните резултати покажале дека времетраењето на циклоспоринската терапија е најкритичен фактор поврзан со развојот на гингивалното зголемување. Овие сознанија се спротивни од добиените резултати кои не покажаа постоење корелација помеѓу степенот на гингивалната хиперплазија и долготрајноста на терапијата.

Резултатите од спроведената студија (статистички не сигнификантна негативна корелација), одат во прилог на тезата дека со зголемување на долготрајноста на терапијата, стимулаторниот ефект на циклоспоринот ослабува веројатно поради временски редуцирана сензибилност на фибробластите кон медикаментот.

Од епидемиолошки аспект клиничките студии на Chabria (26), укажуваат дека гингивалното зголемување почесто се јавува кај деца отколку кај возрасни, и со тоа тој ја поставува хипотезата за евентуална корелација меѓу циклоспоринот, времетраењето и гингивалните фибробласти.

Gagliano и сор. (37), ја испитувале врската помеѓу возраста на пациентите и гингивалната сврзно-ткивна хомеостаза. Резултатите покажале дека доколку кај постари лица (без некои посериозни заболувања), гингивалното сврзно-ткиво е карактеризирано со слична содржина на колаген и "turnover", сугерирајќи дека во контролата на колагениот "turnover" е вклучена комплексна машинерија, и овој процес се одвива на сличен начин како и кај млади пациенти. Особено интерстицијалниот колаген е главна компонента на гингивалното сврзно ткиво и неговиот турновер е таргет на циклоспоринот, кој води кон гингивално зголемување. Иако колагениот "turnover" е главна цел на циклоспоринот во гингивалните фибробласти, резултатите покажуваат дека дури и кај постари пациенти, циклоспоринот не предизвикал модификации на колагениот турновер.

Всушност, целуларната хомеостаза во ткивата претставува резултат на балансот меѓу интеракцијата на антагонистичките молекули, во кои цитокините и факторите на раст имаат значајна улога (39).

Зголеменото ниво на одредени фактори на раст и/или нивните рецептори се забележуваат во состојби каде постои зголемен ткивен волумен, како што претставува циклоспорин-индуцираната гингивална хиперплазија. Дури и здрава гингива се наоѓа во состојба на континуирана репарација поради константното влијание на микроорганизмите од денталниот плак. Boltchi и сор. (14) сметаат дека медикаментите кои како несакан ефект индуцираат гингивално зголемување, предизвикуваат егзацербација на нормалниот ткивен "turnover" и процесот на репарација на рана.

Цитокините се медијатори кои можат да ја модулираат инфламаторната остеолиза заедно со полипептидните хормони кои го регулираат однесувањето на клетките во инфламација. Протективните аспекти претставени од неутрофили, синтеза на антитела, ослободување на анти-инфламаторни цитокини (TGF- β) и интерлеукини (IL-4, IL-10, IL-12) водат кон нарушување на хомеостазата и вклучување на механизми кои резултираат во ослободување на медијатори како проинфламаторни цитокини (IL-1, IL-6, TNF- α , протеази, простагландини) кои промовираат деструкција на матриксот во гингивата и стимулираат коскена ресорпција.

Повеќето студии известуваат дека апоптозата учествува во контролата на гингивалното зголемување, вклучувајќи каскада од специфични биохемиски реакции, кои одат со зголемено ниво на интрацелуларниот Ca^{2+} . Заедничка карактеристика на фенитоин, нифедипин и ЦсА е дека се Ca^{2+} антагонисти. Блокада на еден или неколку фази во каскадните процеси со ЦсА, може да резултира со промени во апоптозата и намалена каспаза-3, доведувајќи до зголемување на степенот на раст на гингивалното ткиво.

Се верува дека апоптозата е инволвирана во контрола на клеточната судбина, претставувајќи главен механизам во прецизната регулација на ткивното

ремоделирање за време на развојот. Паралелно со овие механизми, апоптозата е инволвирана и при многу токсични реакции и повеќе заболувања.

Esposito и сор. (33) докажуваат дека ЦсА има антипролиферативен ефект на ендотелните и епителните клетки. ЦсА ја инхибира клеточната пролиферација на епителните клетки во тубулите по пат на апоптоза. Овој ефект е асоциран преку индукција на апоптоза, веројатно преку нитрик оксид регулацијата во епителните клетки. Овие резултати покажуваат дека ЦсА различно делува на клеточните типови и нарушената архитектоника на ткивата се должи на мултипли ефекти на клеточно ниво (49).

Студиите каде предмет на истражување е апоптозата потврдуваат дека таа има улога во интерстицијалната фиброза и губење на целуларитетот, кој е карактеристика на хронично индуцираната циклоспоринска нефропатија. Tonetti и сор. (92) за прв пат ја промовираат улогата на апоптотичниот процес во хроничното воспаление, поврзувајќи ја со бактериски индуцираната гингивална инфламација. Тргувајќи од фактот дека овој механизам партиципира во патогенезата на гингивалното зголемување, Budunelli и сор. (15) во своите испитувања сметаат дека бројот на делбените клетки и апоптотичните клетки не покажале значајна разлика меѓу испитаниците со гингивитис и испитаниците кои ја сочинуваа контролна група. Што се однесува до оние пациенти кои ја оформиле циклоспоринската група бил детектиран намален број на апоптотични клетки.

Во спроведеното истражување од оваа студија констатиравме сигнификантно зголемување на апоптотичните процеси во гингивалниот епител кај пациентите третирани со највисока доза на циклоспорин (175mg) во однос на останатите групи и контролната група ($p < 0,01$). Оваа апоптоза сметаме дека е повеќе последица на плакот, воспалението и парадонтопатијата, отколку што е причина за истата. Тоа ни го покажуваат анализата на корелации, каде што се забележува дека останатите фактори имаат поголема и посилен корелација отколку апоптозата во процесот на пародонталната деструкција.

Исто така евидентирана е сигнификантност и помеѓу контролната група и подгрупите од испитаниците кои беа подложени на циклоспоринска терапија од

125мг и 150мг. Но, при спроведената корелација помеѓу испитаниците од апострофираните погруппи подложени на различни дози циклоспорин не беше евидентирана статистичка значајност на разликите на вредностите.

Од добиените резултати можеме да заклучиме дека циклоспоринот кој предизвикува имуносупресија и несоодветен имунолошки одговор на стекнатиот (лимфоцитен) одговор, следи во пролонгирана и понеефикасна одбрана со помош на неспецифичниот вроден имунитет (макрофаги и неутрофили), кој понатаму од своја страна доведува до активација на фибробластите поради пролонгирано хронично воспаление и создавање на колаген (фиброза). Притоа доаѓа до оштетување на епителот.

Одредувајќи ја дистрибуцијата на каспаза-3 и апоптозата кај ЦсА третирани пациенти и контролни пациенти со гингивит, Bulut (17) утврдува постоење на сигнификантна разлика меѓу испитуваните групи. Кај ИДП, ИГИ, индексот на длабочина на пародонтални џекови забележани се сигнификантно пониски вредности кај контролната група во споредба со испитуваната група. Авторите сметаат дека добиените резултати се должат на нарушена морфологија на гингивалното ткиво кое дозволува поголема акумулација на дентален плак, негово отежнато отстранување, кое доведува до формирање лажни пародонтални џекови кои доведуваат последователно и до формирање на вистински пародонтални џекови. Овие резултати укажуваат на можната инволвираност на степенот на апоптозата и каспаза-3 во процесот на ЦсА-гингивално зголемување.

Динамиката на апоптозата делумно е диригирана од степенот на инфламацијата присутна во гингивалните ткива, кој ја зголемуваат клеточната смрт на клетките и учествуваат во клиничкиот губиток на атачменот. Но, паралелно со овие процеси, во гингивата наизменично се одвиваат и репараторни процеси откаде потекнува позитивната корелација меѓу ИГИ и пролиферативниот индекс Ki-67. Во инфламираното ткиво доаѓа до ослободување на различни цитокини и фактори на раст, кој пак од своја страна различно делуваат на апоптотичните процеси (16).

Ефектот на ЦсА на смртта и пролиферацијата на гингивалните фибробласти беше испитувана во *in vitro* студиите на Fujimori et al. (35), чија крајна

цел е појаснување на механизмот на гингивалното зголемување кое е асоцирано со хроничната примена на имуносупресивна терапија. Тие утврдуваат дека клеточната смрт била инхибирана и истата се одвивала зависно од медикаментозната концентрација.

Ова толкување го поткрепува и Buduneli et al. (15), кои тргнувајќи од фактот дека медијаторите на апоптозата учествуваат во патогенезата на гингивалното зголемување, го испитувале нивото на p53, bcl-2, и IL-15 во гингивалниот флуид кај ЦсА третирани пациенти. Вредностите на p53 и bcl-2 во гингивалниот флуид биле минимални и практично недектибилни, додека вредностите на IL-15 биле сигнификантно повисоки кај пациенти третирани со ЦсА со и без гингивално зголемување како и кај групата пациенти со гингивитис, за разлика од пациентите кај кои не се евидентирани никакви промени на гингивалното ткиво. Што се однесува до вредностите на IL-15 кај пациенти кои примале ЦсА, евидентирани се пониски вредности во однос на групата со гингивитис без медикаментозна апликација, но без постоење на статистички значајна разлика. IL-15 има улога во патогенезата на гингивалното зголемување кај пациенти третирани со циклоспорин кое се должи на неговата интеракција со медикаментот и неговата улога во апоптозата и инфламацијата Buduneli (16).

Нашите добиени наоди од спроведеното истражување докажуваат статистички несигнификантна позитивна корелација помеѓу концентрација на циклоспорин во серум со апоптоза и колаген за ($p < 0,05$), а статистички сигнификантна негативна корелација помеѓу концентрација на циклоспорин во серум со ретикулин за ($p < 0,05$). Концентрацијата на медикаментот не е во корелација со апоптозата и степенот на пролиферација на колаген, иако постои корелација со намалување на ретикуларната мрежа во стромата за која во моментот немаме соодветно патогенетско објаснување.

Сметаме дека се потребни подетални молекуларни анализи кои ќе ги одгатнат овие сложени патогенетски механизми. Сепак ова е индиректен доказ дека процесите на апоптоза и аберантна синтеза на колаген, повеќе се последица на присутната инфламаторна состојба во гингивалната строма, отколку на дејството на

циклоспоринот во крвта. Во тој контекст хроничната инфламација веројатно би била последица на супримирањето специфичен имунитет под дејство на имуносупресивниот медикамент.

Според (15) фамилијата на протеините bcl-2, претставуваат протоонкогени кои се инволвирани во протекција на клетките против клеточната смрт. Испитувајќи го ефектот на ЦсА во експресијата на bcl-2 во гингивалните ткива, утврдено е дека медикаментот влијае на неговата експресија на начин кој е зависен од возраста и времетраењето на терапијата. При состојби на зголемена експресија доаѓа до клеточно преживување, а со тоа и до појава на туморозни состојби во организмот.

Наодите од нашето истражување укажуваат дека постои сигнификантно зголемена експресија на антиапоптозниот протеин Bcl-2 во гингивалниот епител кај пациентите кои беа подложени на терапија со 175мг циклоспорин во однос на останатите подгрупи и контролната група ($p < 0,01$). Но, спроведената статистичка анализа докажува дека не постои сигнификантна разлика помеѓу сите групи меѓусебе, како ни помеѓу останатите испитаници кои примаа пониски дози од максималната во однос на контролната група ($p > 0,05$).

Добиените резултати сметаме дека се должат на тоа да кај пациентите кои примаат доза од 175мг, апоптозата е на критично високо ниво што "алармира" хитна активација на антиапоптозните механизми (зголемена експресија на bcl-2).

Нашите добиени резултати се во согласност со авторите (17), кои ја испитуваа инхибицијата на гингивалната епителна клеточна апоптоза кај ЦсА третираната група, а кои не докажаа статистичка сигнификантна разлика меѓу оваа испитуваната група и контролата (пациенти со гингивитис) во однос на имунолокализацијата на p53 и bcl-2. И во испитувањата на Пандилова (77) се регистрира сигнификантност на разликите за bcl-2 помеѓу клинички здраво ткиво и испитуваните групи само за губиток на атачмент до 3мм.

Од добиените резултати на оваа истражување, регистриравме статистички незначајна позитивна корелација помеѓу концентрацијата на циклоспорин во серум и апоптозата. Нашите резултати се во согласност со резултатите на Bulut и сор. (18)

кои евидентирале само сигнификантна позитивна корелација меѓу серумското ниво на циклоспорин и степенот на експресија на bcl-2, додека серумската концентрација не беше во корелација со апотозата или со експресијата на p-53. Во нашите испитувања беше констатирана статистички сигнификантна разлика помеѓу контролната група во однос на подгрупите кои примаат циклоспорин во сите испитувани дози т. е. 100мг, 125мг и 175мг.

Гингивалните кератиноцити одгледувани во култури со ниска концентрација на Ca, покажуваат bcl-xl фактор, кој ја супримира апотозата и воедно предизвикува инхибиција на ДНА фрагментација. Циклоспоринот е добро познат Ca- антагонист (8).

Апотозата како процес на диригирана смрт инволвира каскада од специфични биохемиски процеси кои го зголемуваат нивото на интрацелуларниот Ca^{2+} . Затоа може да се претпостави дека ЦсА- индуцираното гингивално зголемување може да се одвива преку зголемена експресија на bcl-2 и покачено ниво на серумска концентрација на ЦсА (11).

Испитувањата докажуваат, а искуството потврдува дека денталниот плак служи како депо за ЦсА и со тоа се овозможува гингивалното ткиво да биде постојано изложено на дејството на медикаментот, процес кој би водел кон супресија на апотозата во гингивалниот епител (68)

Според Bulut (19) поголемо присуство на bcl-2 позитивни епителни клетки се докажани кај биопсии од пациенти кои биле третирани со медикамент, за разлика од останатите биопсии кои не биле третирани со медикамент, индицирајќи дека постои можност за учество на bcl-2 во развојот на гингивалната хиперплазија.

Протеинот bcl-2 ја превенира или ја редуцира клеточната смрт индуцирана во нашиот случај од циклоспоринот и инфламацијата. Нашите резултати се во согласност со Saito и сор. (84), кои детектираат висока експресија на bcl-2 во гингивалниот епител кај гингивалното зголемување. Што се однесува до p53, тие детектирале позитивна експресија во нуклеусот на епителните клетки, додека не била евидентна експресија кај контролните пациенти. Се смета дека bcl-2 може да

води кон клеточна акумулација, акантоза и со тоа p-53 може да биде инволвиран во патогенезата на медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување преку оштетувања на ДНК (43).

Паралелно на овие наоди постојат студии кои покажуваат зголемено ниво на p53 во гингивалниот епител кај нифедипин-третираните животни, кои објавуваат дека постои зависност помеѓу степенот на експресија на p53 и примената доза на медикаментот. Експресијата на p53 во гингивалните ткива претставува можен маркер за ДНК оштетувањето иницирано од цитотоксичното дејство на медикаментот кој предизвикува гингивално зголемување.

Budunelli и сор. (16) испитувајќи го ефектот и нивото на IL-15, забележале статистички поголемо присуство на овој цитокин кај пациенти со гингивитис во однос на пациенти кои имале здрава гингива. Про-инфламаторниот цитокин IL-15 се создава кај ткивни лезии и хронични инфламаторни заболувања. IL-15 локално се создава во инфламираното ткиво чија примарна улога е регулација на леукоцитарната инфилтрација и експресија на моноцитниот хемотактичен протеин (MCP-1) кој при зголемена активност доаѓа до секреција на TGF- β 1. TGF- β 1 ја намалува матрикс деградацијата и го зголемува депонирањето на матриксот истовремено, резултирајќи во зголемена маса на екстрацелуларен матрикс.

Saito и сор. (84) наоѓаат зголемена експресија на TGF- β 1 во зголемена гингива и покачено ниво на IL-15 во гингивалниот флуид кај оваа група пациенти. Сите овие податоци ја потврдуваат хипотезата дека продукцијата на IL-15 како продукт на локалната инфламација, индиректно води кон зголемена секреција на TGF- β 1 во гингивално зголемените ткива. Јаката гингивална инфламација вообичаено ја придружува ЦсА-индуцираното гингивално зголемување. Од добиените податоци во литературата и од нашите добиени резултати можеме да сумираме дека не постои генерализирана шема по која би се објаснил овој процес, дека гингивалното зголемување е поврзано со различни параметри како и постоење на хетерогени фибробласти, моноцити или макрофаги.

Литературата не упатува на фактот дека апоптозата е зголемена кај реналната тубулоинтерстицијални фибробласти и макрофаги кај ЦсА третирани

пациенти. Понатаму евидентен литературен податок кој е апострофиран во библиографските единици е фактот дека ЦсА ја индуцира експресијата на p53 додека експресијата на bcl-2 ја намалува.

Неодамна овие факти беа потврдени, во кој повторно беше докажана релацијата повисоки дози ЦсА - зголемена апоптозата во тубуларните епителни клетки во клеточни култури.

Niimi и сор. (68) сметаат дека епителната клеточна пролиферација не е зголемена кај ЦсА гингивалните ткива, ишекулирајќи дека животниот век на кератиноцитите е екстендиран, резултирајќи во зголемена дебелина на епителниот слој. Во овој контекст може да се сумира дека акантозата која се јавува кај ЦсА групата, може да се должи на анти-апоптотичниот ефект на IL-15 и адитивниот ефект на ЦсА, како и на други останати фактори. Всушност, Esposito и сор (33), тврдат дека ЦсА ја афектира различно клеточната популација, и различните одговори кон ЦсА зависат од клеточниот тип.

Инхибиторниот ефект на ЦсА кон IL-15, може делумно да го превенира анти-апоптотичниот ефект на IL-15, и последователно да ја зголеми апоптозата кај ЦсА третираните пациенти.

Во суштина литературните податоци кои во моментот ни се на дофат докажуваат дека апоптозата е сигнификантно зголемена кај реналните ткива со ЦсА-инуцирана фиброзна дегенерација. Овој факт, делумно може да се објасни преку ефектот на ангиотензин II. Aizawa (1) потврдува дека ангиотензин II ја зголемува апоптозата, а од друга страна ја зголемува продукцијата на TGF- β и тромбоцитниот фактор на раст. Факторите на раст ја зголемуваат количината на екстрацелуларниот матрикс, кое резултира во фиброзна лезија во бурежните интерстицијални клетки. Во овие испитувања докажана е строга корелација на степенот на фиброза со апоптозата.

Тргнувајќи од овие факти претпоставуваме дека идентичен механизам поврзан со апоптозата можеби има иста улога и во гингивалните ткива преку

експресија на TGF- β . Зголемената апоптоза кај гингивалните ткива, може да резултира во зголемување на гингивалното ткиво преку факторите на раст.

Нашите наоди докажуваат дека ИГЗ е во умерена позитивно статистички сигнификантна корелација со хиперекспресијата на bcl-2 и со p53. Сметаме дека добиените резултати претставуваат случајна корелација, бидејќи ИГЗ не корелира со дебелината на епителот, иако кај овие пациенти постои гингивално зголемување (но епителот не учествува во создавањето на гингивалното зголемување).

Иако денес е потврдено дека епителните алтерации кај циклоспорин-А индуцираното гингивално зголемување, се должат на зголемената пролиферативна активност предизвикана од циклоспоринот, сепак неможат да се занемарат и ефектите на други фактори како намалена десквамација наспроти зголемената пролиферација. Овие наши сознанија се сериозно поткрепени со наодите на Cetinkaya (24) каде исто така не е регистрирана сигнификантна корелација меѓу епителната дебелина и епителната клеточна опсервација.

Испитувајќи ја пролиферативната активност евидентиравме сигнификантно зголемена пролиферација кај испитаниците во однос на контролната група ($p < 0,01$). Констатирана е сигнификантност меѓу испитаниците од контролната група и испитаниците кои беа подложени на циклоспоринска терапија од 100 мг. Исто така во оваа студија забележавме сигнификантност на разликите на вредностите помеѓу сите испитаници од оформените подгрупи кои беа различно циклоспорински третирани, освен помеѓу оние групи кои примаа циклоспорин со доза од 100 мг и 125мг.

Применетата имунохистохемиска анализа не упати кон фактот кој говори дека контролните примероци покажуваат слабо или недектибилно имунохистохемиско боене за експресијата на Ki-67 антиген во јадрата од базалните слоеви. Во ламина проприја, се забележува интензивна експресија на Ki-67 во фибробластите кај хиперпластични ткива. Ki-67 антиген-позитивно обоени јадра, беа забележани во базалните и супрабазалните слоеви густо наредени кај хиперпластичниот гингивален епител, додека постепено како се оди кон

елонгираните епителни продолжетоци кои длабоко навлегуваат во ламина проприја нивниот распоред станува проретчен и хаотичен.

Степенот на експресија на Ki-67 беше сигнификантно повисок во групите кои примаа циклоспоринска терапија наспроти контролните групи. Највисоки вредности за Ki-67 беа детектирани во групата со 175мг, додека меѓу групите не постои статистички значајна разлика.

Поткрепа на нашите резултати се добиените наоди од истражувањата на Saito (84), Moughal (64) кои индицираат зголемен број на Ki-67 и во кератиноцитите и во леукоцитите или фибробластите, како и односот делбени клетки со не-делбени кои сметаат дека не е сигнификантен.

Од друга страна пак бројот на апоптотичните клетки, беше зголемен кај медикаментозните групи во однос на контролната група со присутна пародонтална болест. Сметаме дека зголемените гингивални лезии кај пациентите третирани со различни дози циклоспорин се должат многу повеќе на пролиферативните отколку на апоптотичните процеси.

Ki-67 антиген-позитивно обоени јадра, беа забележани во базалните и супрабазалните слоеви густо наредени кај хиперпластичниот гингивален епител, додека постепено како се оди кон елонгираните епителни продолжетоци кои длабоко навлегуваат во ламина проприа нивниот распоред станува проретчен и хаотичен. Контролните примероци покажуваат експресија на Ki-67 антиген во јадрата од базалните слоеви. Во ламина проприа, интензивна експресија на Ki-67 беше забележана во фибробластите кај хиперпластични ткива, додека кај контролите слаба или недектибилно имунохистохемиско боење.

Zoeller и сор. (103) известуваат дека процентот на Ki-67 позитивни клетки е помал од 10% кај нормална клеточна популација, кај диспластична орална мукоза околу 10%, и кај орално сквамозен клеточен карцином околу 83%. Кај гингивалните зголемувања оваа вредност е околу 10%, што значи дека е компарабилна со диспластичната орална мукоза. Интересно е да се забележи во ова истражување дека во елонгираните епителни продолжетоци, има намалена

супресија на Ki-67, кој индицира дека клеточната пролиферација била намалена во овие издолжени делови. Оваа инхибиција на растот кај гингивалната хиперплазија, може да ја превенира експанзијата на ДНК-оштетените клетки кои покажуваат експресија на p53 протеинот во гингивалните ткива.

Факторите кои ја супримираат клеточната пролиферација не се целосно познати, иако за p53 протеинот и TGF- β е потврдено дека имаат одредена импликација во патогенетските збиднувања на гингивалните зголемувања.

Bulut и сор. (17) во своите имунохистохемиски испитувања кај циклоспорин-зголемена гингива и системски здрави контролни субјекти со гингивит, ги испитувале степенот на инфламаторните промени и експресијата на одредени клеточни антигени (Ki 67, CD 71, CD 98, CD 45, CD 50, CD 11a, CD 162, CD 227, CD 231).

Резултатите покажале слично ниво на експресија за Ki-67 во гингивалниот епител кај циклоспорин-третираните ренални реципиенти и здрава контролна група, покажувајќи слична пролиферативна активност во базалните епителни клетки кај двете групи како и во нашата студија.

Иако овие наоди се совпаѓаат со наодите од многу авторитети чиј предмет на проучување се токму патогенетските случувања во ткивните зголемувања, сепак овие резултати се во спротивност со претходните хистопатолошки студии кои известуваат за асоцијација меѓу зголемените епителни слоеви кај нифедрин и циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување и зголемената митотска активност (66).

Понатаму, стручните и научните истражувачи (69) известуваат за инхибиторниот ефект на циклоспоринот кон кератиноцитниот раст директно или индиректно. Во *in vitro* студиите се регистрирани анти-пролиферативните ефекти на циклоспоринот на кератиноцитите сметајќи дека, пролиферацијата можеби се одвивала на не променет начин кај циклоспоринските ткива. Со оваа теза согласни се Niimi и сор. (68) кои поради зголемениот број на ДНК полимераза алфа (+) во базалните кератиноцити, сметаат дека феноменот на гингивална хиперплазија не се

должи на зголеменото ниво на кератиноцитната пролиферација, туку на зголемениот животен век на кератиноцитите.

Во добиените наоди на нашето испитување, евидентиравме умерена позитивна сигнификантна корелација ($p < 0,05$) за ИГИ со апоптотичниот индекс и пролиферативниот индекс Ki-67. Овие резултати даваат поткрепа дека инфламацијата предизвикува апоптоза, а релативно зголемената дебелина на епителот се должи на компензаторната епителна пролиферација што се гледа од зголемената експресија на Ki-67 за кој корелацијата со ИГИ е неспорна.

Слични резултати регистриравме и во истражувањата на Пандилова (77), која смета дека постои силна позитивна корелација помеѓу инфламацијата и апоптозата, која учествува во губитокот на атачментот, но не и во настанокот и прогресијата на рецесијата.

Тргувајќи од добиените резултати за зголемениот моноклеарен клеточен инфилтрат кај ткива кои биле третирани со циклоспорин во однос на не третирани ткива (контролна група), Bulut и сор. (21) го подржуваат размислувањето за учеството на инфламацијата и локалните инфламаторни стимули во развојот на гингивалното зголемување, кој сепак останува дека е мултифакториелен процес. Клеточната композиција и присуството на инфламаторни клетки ја рефлектира неговата хронична природа, која може да резултира во долготраен локален стимулаторен процес кој води кон гингивално зголемување.

Добиените наоди од ова истражување укажуваат на статистички неситнификантна позитивна корелација помеѓу Ki-67 и дебелината на епителот за ($p < 0,05$). По однос на овој наод сметаме дека овој навидум апсурден резултат, се должи најверојатно на фактот што релативното зголемување на Ki-67 е реактивен и компензаторен механизам на позначително зголемената апоптоза (поради воспалението) така што пролиферативните клетки практично компензираат за апоптотичните кератиноцити и не допринесуваат за сигнификантно задебелување на епителот, иако дебелината на епителот е зголемена во однос на контролната група.

Тумор супресивниот ген p53, е важен во активирањето на апоптозните процеси во клетките, и е поврзан со сите форми на инхибиција на клеточната репликација. Неговата експресија е есенцијална за апоптотичните одговори при случај на акумулација на ДНК оштетувања. Експресијата на p53 е исто така поврзана и со регулација на ткивната динамика преку индукција на апоптозата во терминалната фаза на диференцирање на клетките вклучувајќи ги и инфламаторните клетки се всушност сознанијата до кој дошол Pezela (78).

Краткиот полуживот на p53 и bcl-2 честопати предизвикува нивна минимално ниво на детектирање кај здрави индивидуи. Мутантниот p53 протеин има полуживот од 24 часа во споредба со дивниот тип p53, кој има полу-живот од околу 20 минути (8).

Во согласност со претходно изнесените податоци, нашите резултати покажаа процентуална разлика меѓу контролната група и подгрупите кои беа тераписки подложени со циклоспорин во доза од 100мг, 125мг, и 175мг. Детектирањето на p53 во нашата контролна група е разбирливо поради присутната инфламација која ја зголемува експресијата на p53, кое води кон иницијација на процесот на апоптоза. Присуството на апоптотични клетки и експресија на дивниот-тип p53, во субепителниот инфламаторен инфилтрат, сугерира за улогата на апоптотичната клеточна смрт како важен феномен во регулација на инфламаторниот одговор кон бактериите. Всушност овој висок процент на апоптотични клетки зборува за значајната улога на апоптозата во превенција на зголемен целуларитет и топографска екстензија на истиот. Земајќи ја предвид хипотезата за молекуларната регулација на овој феномен поткрепена со *in vitro* испитувањата, можеме да заклучиме дека гингивалниот моноклеарен клеточен инфилтрат покажува експресија на апоптозно-превенирачки (проинфламатори) и апоптозно-индуцирачки цитокини (анти-инфламатори).

Од добиените наоди на нашето истражување сметаме дека детекцијата на p53 и bcl-3, сугерира цитокина регулација која или ќе ја отпочне или ќе ја инхибира апоптозата, која е сепак поприлично индивидуална со варијации во големината на целуларитетот на инфилтратот. Не постоење на интергрупни разлики меѓу

соодветните медикаментозни дози, укажува на непостоење на корелација меѓу експресијата на p53 и дозата на медикаментот. Со помош на Spearman Rank корелации детектиравме статистички несигнификантна позитивна корелација помеѓу медикаментозната концентрација во серум и апоптозата.

Постоењето на позитивна корелација меѓу апоптозата и p53 како и корелацијата на bcl-2 и p53 беше демонстрирана во истражувањата спроведени од Tonetti (92)

Слични резултати се добиени и од истражувањата на Mougai и сор. (64) кои детектирале минимално ниво на bcl-2 кај пациенти со пародонтална болест одредуван во гингивалниот флуид. За разлика од нив, Buduneli и сор. (15) известуваат за постоење исто ниво на bcl-2 и кај медикаментозната група и кај контролната група, додека кај агресивната пародонтопатија тие детектираат зголемена фреквенција на bcl-2.

Во однос на p53 тие детектирале позитивна експресија во нуклеусот на епителните клетки, додека пак кај пациентите кои ја оформија контролната група ваквиот наод не бил потврден.

Во консултираната литература дојдовме до сознанија кои велат дека bcl-2 може да води кон клеточна акумулација, акантоза и со тоа p-53 може да биде инволвиран во патогенезата на медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување преку оштетувања на ДНК.

Тргувајќи од релевантните податоци во литературата, можеме да се сложиме дека експресијата на p53 во здраво ткиво е сосема незначителна, додека нејзината зголемена експресија во групата со пародонтопатија и во медикаментозните групи јасно ја наметнува неговата улога во соодветните патогенетски процеси.

Испитувајќи ја експресијата на p53 евидентиравме статистички сигнификантно поголема експресија на p53 во гингивалниот епител ($p < 0.01$), кај испитаниците кои ја сочинуваа контролната група и испитаниците кои во терапијата беа оптеретени со циклоспорин во доза од 175мг.

Овие резултати, се веројатно поради тоа што кај контролната група степенот на воспаление условува да "turn-over-of" на клетките од епителот биде на патолошко високо ниво, и со тоа настанува активација на p53, чија функција претставува "кочење" на клеточниот циклус со цел на оштетените клетки да им се овозможи во почетокот време за поправка (вклучувајќи и поправка на ДНК оштетувања), за потоа да влезат во делба, со цел да се избегне клетки со евентуално оштетена ДНК да влезат во клеточна делба. Ова е еден од механизмите за спречување на малигна пролиферација. Во нормални услови p53 дозволува во делба да влезат само клетки со беспрекорно стабилна ДНК.

Статистичката анализа на групите кои применуваа циклоспорин, споредени меѓу себе докажа непостоење меѓугрупна разлика помеѓу оние кои примаа 100 мг, 125мг и 150мг циклоспорин во терапевтски цели ($p > 0,05$). Исто така не е евидентирана статистичка значајност на разликите на вредностите ни меѓу испитаниците од контролната група и групата која примаше циклоспорин во доза од 175мг.

Со помош на Spearman Rank Correlations се регистрира статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу времетраењето на медикаментозната терапија и p53. Ова претставува една заштитна реакција на епителот кој се брани од оштетувањата.

Несигнификантна позитивна корелација постоеше помеѓу времетраење на терапијата и апоптозата, Ki-67 и bcl2.

Статистички сигнификантната позитивна корелација меѓу дозата на медикаментот и апоптозата, Ki-67, и bcl2, ја објаснуваме преку причинско-последичната поврзаност на циклоспоринот и денталниот плак, кој предизвикувајќи имуносупресија во гингивалните ткива и заради хроничниот воспалителен одговор даваат оштетување на епителот. Ова оштетување се должи на соодветната апоптоза, реактивна антиапоптотска активност (bcl2) и p53 кој се обидува да го стопира клеточниот циклус кај оштетените клетки.

Во биоптичните примероци на медикаментозно третирани пациенти кај испитуваната група на оваа студија евидентирана е поголема инфламаторна лимфоцитна инфилтрација во гингивалната строма кај испитаниците кои примале циклоспорин со доза 150мг и 175мг во однос на контролната група. Помеѓу нив и испитаниците кои ја оформија контролната група евидентна е статистичка значајност на разликите на вредностите ($p < 0,01$). Спроведената статистичката анализа помеѓу групата испитаниците подложени со циклоспоринска терапија од 175мг и оние кои примаа медикамент во доза од 150мг ($p < 0,0$), потоа оние испитаници кои примаа доза на циклоспорин од 100 и 125мг ($p < 0,01$) покажаа сигнификантност на разликите на вредностите. Исто така констатирана е статистичка сигнификантност помеѓу испитаниците на контролната група и испитаниците од подгрупите кои тераписки го користеле циклоспоринот во доза од 150мг, 175 мг.

Во ткивните исечоци забележана е поголема инфилтрација со макрофаги во гингивалната строма кај испитаниците третирани со циклоспорин во однос на испитаниците кои ја сочинуваа контролната група. Помеѓу нив е евидентирана статистичка значајност на разликите на вредностите ($p < 0,01$). Меѓугрупните сигнификантности на разликите беа прилично варијабилни (зависно од примената доза), кои укажуваат дека макрофагниот инфилтрат не е дозно зависен, туку веројатно постои некој друг фактор кој се вклучува во патогенетските механизми и кој има позначително влијание од дозата на применетиот медикамент.

Макрофагите се разликуваат во нивната локализација, морфологија, и функција. Макрофагите се главните медијатори за сврзно-ткивниот turnover, одржување и репарација.

Антителото CD68 реагира со макрофагите кои се типично присутни во ткивата кои покажуваат секреција на проинфламаторни цитокини како IL-1, IL-6, i TNF- α , организирање на неутрофилите и нивна дегранулација. Тие ја забрзуваат имуно посредуваната ткивна деструкција Zwaldo (104).

Во своите истражувања, авторите утврдуваат дека сите слоеви на сулкусниот и пародонталниот цел, се обоени интензивно, со присуство на макрофаги при постоење на гингивит и пародонтопатија Segueier (86).

Иако ефектот на циклоспоринот на гингивалните ткива бил предизвик за многу научници, сепак патогенезата за нејзиното настанување е само делумно разјаснета и ни одалеку точно дефинирана. Резултатот од клеточните култури и имунохистохемиските студии, сугерираат дека плак индуцираните инфламаторни промени се сигнификантни во патогенезата на оваа состојба. Одредени автори (31, 32), кои компарираат циклоспорин-третираните пациенти со здрави субјекти, документираат зголемен број на CD68 (+) мононуклеарни клетки, плазма клетки, CD3 (+) Т лимфоцити, и повисок однос на CD4:CD8 кај циклоспорин групата.

Сите овие и многу други податоци, сугерираат дека самостојно, ни еден целуларен или молекуларен фактор не може да биде фундаментален во развојот на гингивалното зголемување. Иако е познат фактот дека плакот индуцира повеќе инфламаторни промени во гингивалните ткива, авторите сметаат дека повеќе клетки кој ја условуваат плак продукцијата, можат да ја модулираат интеракцијата фибробласт-медикамент во гингивално зголемување.

Макрофагните субсетови можеби се најодговорни за недостатокот на пародонталната деструкција во услови на зголемена експресија на факторите за раст во гингивалните ткива. Бидејќи макрофагите се главни извори за синтеза на проинфламаторни цитокини и полипептидни фактори на раст, тие се критични во регулацијата на многу патолошки процеси, како пародонтопатија, која инволвира хронична инфламација и ткивна самодеструкција.

Можеби кај инфламаторните заболувања како пародонтопатија, основниот баланс меѓу продукцијата на про-инфламаторни цитокини и есенцијални фактори на раст е круцијална во детерминирање на степенот на инфламаторните ткивни оштетувања.

Покрај макрофагите, фибробластите заедно со епителните клетки можат да учествуваат во продукција на фактори на раст на местото каде се одвива

зараснувањето. Иако тоа е минорно во однос на макрофагите, сепак постои можност овие клетки локално да дадат свој допринос во гингивалното зголемување (47). Специфични макрофажни фенотипови покажуваат експресија на проинфламаторен цитокин IL-1 β или полипептидниот фактор на раст PDGF-B откриени во медикаментозно-зголемена гингива.

Постоењето на висока корелација со ИГЗ и LCA и CD68 сметање дека е сосема разбирлива со оглед на комплексната градба на ткивото (колаген и ретикулин) на гингивалната строма и зголеменото количество на дентален плак кој провоцира макрофажна реакција како дел од неспецифичниот вроен имунитет. Резултатите говорат за посилна корелација во однос на макрофажниот инфилтрат, а за релативно послаба корелација со лимфоцитниот инфилтрат како компонента од стекнатиот специфичен имунитет. Наша претпоставка е дека овие резултати делумно се должат на ефектот на циклоспоринот на Т-лимфоцитите, но веројатно и на некои други фактори кои се вклучени во оваа комплексна имунолошка реакција.

Во оваа студија исто така регистриравме и позитивна корелација на степенот на LCA и CD-68 со апоптозата, ИДП, ИГИ, ИГА. Сметање дека добиените вредности се должат на синергистичкиот однос на цитокината дисрегулација и различните степени на апоптоза и зголемената клеточна делба кои се можеби и најзначајните фактори во патогенезата на овој ефект.

Jambring и сор. (48) сметаат дека инфламацијата е важен фактор во регулацијата на клеточниот turn-over кај хуманата гингива. Забележана е зголемена апоптоза на кератиноцитите во длабоките партии на сулкусниот џеп кој се наоѓа блиску до припојниот епител, веројатно заради постојаното изложување кон денталниот плак во оваа регија кој е важен фактор во прогресија на пародонтопатијата. Постојењето на позитивна корелација на макрофагите и лимфоцитите со апоптозата, ИДП, ИГИ, и ИГА и пролиферативните кератиноцити може да ни помогне во разбирањето на важноста на клеточниот "turnover" кај нормалните ткива кои последователно преминуваат во патолошка состојба.

Од добиените резултати на нашите испитувања како и бројните стручни и научни трудови кои во многу нешта се неунифицирани и контрадикторни, можеме

да сумираме дека во ткивното гингивално зголемување во основа лежат комплексни имуно патогенетски збиднувања испреплетени со локални иритирачки фактори. Секој од нив на свој начин партиципира во длабоките ткивни случувања чиј краен исход е гингивалната хиперлазија.

На голем дел од прашањата од областа на оваа проблематика дали промените на гингивата се дозно медикаментозно условени, какви се апоптотичните случувања во хиперплазираната и нормална гингива, какви се корелативните соодноси помеѓу клиничкиот наод со патохистолошките и морфометриските наоди кај сите испитувани групи како и на што се должи степенот на експресија на bcl-2, p53 и Ki-67 во корелација со дозата и времетраењето на циклоспоринската терапија добивме одговор.

Но, во оваа студија расветлувајќи ги пред нас поставените задачи, истражувањето ни отвори нови видици и предизвици во истражувањето на оваа тема, која секако во некоја друга прилика ќе биде дополнително експлоатирана, со желба и надеж што попрецизно да се приближиме до разјаснување на оваа горка енигма, која во иднина ќе биде од големо дијагностичко и прогностичко значење.

Заклучоци

Врз основа на добиените податоци од клиничките и параклиничките испитувања, спроведената статистичка обработка и анализа на добиените резултати, можеме да ги изнесеме следните заклучоци:

1. Дебелината на епителот кај испитаниците кои беа третирани со циклоспорин е значително поголема во однос на контролната група која покажува висока сигнификантност. Статистичка значајност на разликите на вредностите е евидентирана и кај испитуваната група која беше подложена со највисока доза на циклоспоринска терапија во однос на останатите пониски дози која е последица на дозно-зависна реакција.

2. Од патохистолошкиот наод, можеме да ја потврдиме хроничната инфламаторна реакција, составена од лимфоцити и плазма клетки, што говори за долготрајно делување на агенсите од денталниот плак и неможност за нивно елиминирање поради веќе постоечката имunosупресија. Формирањето на ретикуларна мрежа, а потоа и продукција на колаген од страна на фибробластите е зависна од аплицираната доза: поголема доза на медикаментот-поголема имunosупресија-поголема продукција на колаген-поголем степен на гингивално зголемување.

3. Евидентирана е статистички сигнификантна разлика на депонирање на колаген во гингивалната строма помеѓу контролните примероци и примероците од испитаниците кои се третирани со медикамент.

4. Дебелината на епителот не е во статистички сигнификантна корелација со ИГЗ.

5. Констатирана е високо статистички значајна разлика за индексот на гингивална инфламација (ИГИ) меѓу групата со најниска доза (100 мг) и групите со 150 мг и 175 мг, но не и помеѓу останатите групи што не наведува на мислење дека дозите на медикаментот до 150мг, не резултираат во силно изразена гингивална инфламација за разлика од дозите над 150мг кои се критични за овој индекс.

6. Позитивната корелација на индексот на гингивално зголемување (ИГЗ) со индексот на дентален плак (ИДП), индексот на гингивалната инфламација (ИГИ) и индексот на губиток на атачмент (ИГА), кај пациентите со доза над 150 мг, наметнува потреба од елиминирање на денталниот плак, превенција и санирање на гингивалната инфламација.

7. Степенот на гингивалното зголемување се должи на различните медикаментозни дози, кој недвосмислено ја истакнува улогата на циклоспоринот како есенцијален фактор во процесот на гингивалното зголемување.

8. Силно развиените форми на гингивално зголемување се евидентирани кај пациентите кои имаа вредност над 700ng/ml во серум и кои примаа доза од 175mg.

9. Заради стимулаторниот ефект на циклоспоринот во продукција на колаген, зголеменото гингивално ткиво последователно ја отежнува плак елиминацијата, ја зголемува гингивалната инфламација, и влијае врз губитокот на атачмент.

10. Сигнификантна статистичка разлика за губиток на атачмент, постоеше помеѓу контролната група и сите групи третирани со медикамент, а исто така и меѓу подгрупата со 175 мг и подгрупите од 100 мг и 125 мг. како последица на имunosупресијата која доведува до инхибирана резистентност на пародонтално-ткивниот комплекс. кон активноста на плак-либерираните продукти што се реперкуира врз пародонталниот статус.

11. Времетраењето на циклоспоринската терапија и степенот на гингивалното зголемување покажаа негативна статистички сигнификантна корелација, која веројатно се должи на временски редуцирана сензитивност на пародонтот и фибробластите кон медикаментот.

12. Дозата на медикаментот влијае на лимфоцитниот инфилтрат, кој бележи значително поголема инфилтрација во гингивалната строма кај испитаниците со 150 мг и 175мг во однос на дозите од 100 мг, 125 мг и контролните групи.

13. Кај примероците на испитуваните групи постои значително поголем макрофаген инфилтрат што зборува за назначената инфламаторна компонента во однос на ткивата на контролната група кој не е дозно зависен.

14. Коефициентот на корелација покажа силно позитивна корелација $r=0,7$ на индексот на гингивалното зголемување со макрофагите и нешто послаб индекс $r=0,3$

за лимфоцитите, кое само го потврдува силно изразениот воспалителен карактер на циклоспоринските ткива, во однос на ткивата со пародонтални заболувања.

15. Инфламацијата е најзначаен фактор во експресијата на апоптозата и пролиферацијата во гингивалните ткива, со потенциран ефект на пролиферацијата, во однос на апоптозата.

16. Концентрацијата на циклоспоринот во серум не корелира со апоптотичните процеси и пролиферацијата на колагенот, поради многу послабиот ефект на циклоспоринот, во однос на хроничната инфламација како последица од супримираниот специфичен имунитет.

17. Најголема експресија на апоптозата постои во групата со највисока доза на циклоспорин, која е доказ за учеството на апоптотичните процеси во етиопатогенезата на пародонталната деструкција и гингивалното разраснување.

18. Антиапоптотскиот протеин bcl-2 најмногу е застапен во групата со највисока доза на имуносупресив во однос на останатите групи и контролата.

19. p53 покажа најголема вредност во гингивалниот епител ($p < 0,01$) кај контролната и испитуваната група третирана со циклоспорин од 175 мг.

20. Присутната воспалителна компонента индуцира висока експресија на p53 кај контролната група и кај подгрупата со 175 мг.

Референци

1. **Aizawat, Ishizaka N, Kurokawa K et al.** Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int* 2001; 59:645-653
2. **Alaaddinoglu E.E. Oduncuoglu F.B, Bulut S, Handan O.** Apoptosis in cyclosporin A-induced gingival overgrowth:a histological study.*J Periodontol* 2005;76:166-170
3. **Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT.** FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis.*J Biol Chem* 2005b;280:12096-12012
4. **Arora PD, Silvestri L, Ganss B, Sodek J&McCulloch CA.** Mechanism of cyclosporine -induced inhibition of intracellular collagen degradation. *J Biol Chem* 2001;27:14100-9
5. **Atamas S.** Complex cytokine regulation of tissue fibrosis.*Life sciences* 2002;72:631-643
6. **Barak S, Engelberg IS, Hiss J.** Gingival hiperplasia caused by nifedipine.Histopathologic findings. *J Periodontol* 1987;58:639-642
7. **Baran J, Guzik W. et al.** Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infec.Immun.* 1996;64:4242-4248
8. **Bartek JBartkova J, Vojtesek B, et al.** Patterns of expression of the p53 tumor suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vivo. *Int J Cancer* 1990;46:839-844
9. **Belazi M, Thomopoulos GN, Markopolos AK&Papanayoti P.** Cyclosporin-induced gingival overgrowth: an ultrastructural study of the oral epithelial prickle cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993;25:591-601
10. **Bennet J. A. and Christian J. M.** Cyclosporin-induced gingival hyperplasia. *J Am Dent Assoc* 1985; 111: 272-273
11. **Berker E, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE.** Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaharide. *J Periodontal* 2005;76:964-971
12. **Birkenkamp KU, Coffey PJ.** FOXO transription factors as regulators of immune homeostasis: molekules to die for? *J Immunol* 2003;171:1623-1629

13. **Birraux J, Kirby JA, Thomason JM, Taylor JJ.** The effect of cyclosporine on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. *J Periodontal research* 2006;41(4):297-302
14. **Boltchi F, Rees T, Iacopino A.** Cyclosporine A -induced gingival overgrowth: A comprehensive review. *Quintessence International* 1999; 30(11); 775-783
15. **Buduneli E, Genel F, Atilla G, Kütükcüler N.** Evaluation of p53, bcl-2, and interleukin-15 levels in gingival crevicular fluid of cyclosporin A-treated patients. *J Periodontol* 2003 74(4):506-11
16. **Buduneli N, Buduneli E, Cinar S, Lappin D, Kinane DF.** Immunohistochemical evaluation of Ki-67 expression and apoptosis in cyclosporine A -induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2007;78(2):282-9
17. **Bulut O.E, Sökmensüer L.K, Bulut S, Tasman F. and Müftüoğlu S.** Immunohistochemical study of cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal transplant recipients. *J Periodontol* 2004;75(12):1655-62
18. **Bulut S, Handan O.** Apoptosis and expression of caspase-3 in cyclosporin - induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2007;78:2364-2368
19. **Bulut S, Handan O, Alaaddinoglu E.E. Oduncuoglu F.B.** Effect of cyclosporin A on apoptosis and expression of p53 and bcl-2 proteins in the gingiva of renal transplant patients. *J Periodontol* 2005;76:691-695
20. **Bulut S, Uslu H, Ozdemir HB and Bulut EO.** Analysis of proliferative activity in oral gingival epithelium in immunosuppressive medication induced gingival overgrowth. *Head & Face Medicine* 2006;2:1-6
21. **Bulut S, Uslu H, Ozdemir HB and Bulut EO.** Expression of caspase-3, p53, and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. *Head Face Med* 2006 20:2(1):17
22. **Carro OM, Evans SA, Leone CW.** Effect of inflammation on the proliferation of human gingival epithelial cells in vitro. *J Periodontol* 1997;67(11):1070-5
23. **Casasco A, Casasco M, Callogora M, Reguzzoni M, et al.** Localization of proliferating cell nuclear antigen-immunoreactivity in human dental pulp and gingiva. *Bull Group Int Rec Sci Stomatol Odontol* 1996;39:199681-85
24. **Cetinkaya B.O, Acikoz G, Aydin O, Korkmaz A, Keles C.** The relationship between proliferating cell nuclear antigen expression and histomorphometrical

- alterations in cyclosporinA-induced gingival overgrowth in rats. *Toxicol Pathol* 2006;34:180-186
25. **Cetinkaya B.O, Acikoz G, Aydin O, Korkmaz A, Kelez C.** The relationship between proliferating cell nuclear antigen expression and histomorphometrical alterations in cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. *Toxicologic Pathology*, 2006;34:180-186
 26. **Chabria D. , Weintraub R. G. , & Kilpatrick N. M.** Mechanism and management of gingival overgrowth in paediatric transplant recipients : a review. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2003; 13: 220-229
 27. **Daley TD, Wysocki GP, May C.** Clinical and pharmacological correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1986;62: 417-421
 28. **Daley TD, Wysocki GP.** Cyclosporine therapy: its significance to the periodontist. *J Periodontol* 1984; 55:708-12
 29. **Das S.J, Parkar M.N, and Olseni.** Upregulation of keratinocyte growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72:745-52
 30. **Desai PB, Silver J. G.** Drug -induced gingival enlargements. *Canadian Dental Association* 1998; 64(4): 263-268
 31. **Echelard S,Hoyaux D, Hermans M, Daelemans P, Roth J, Philippart P, et al.** S100A8 and S100A9 calcium-binding proteins: localization within normal and cyclosporin A-induced overgrowth gingiva. *Connect Tissue Res* 2002;43:419-4
 32. **Echelard S. Hoyaux D, Hermans M, Daelemans P, Roth J.** S100A8 and S100 A9 Calcium -binding proteins: localization within normal and Connective Tissue CyclosporinA induced overgrowth gingiva. *Research* 2002 ; 43: 419-424
 33. **Esposito C, Fornoni A, Cornacchia F et al.** Cyclosporine induced different responses in human epithelial, endothelial, and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 2000; 58:123-130
 34. **Fuiano G, Pachianno G, Lotito MA, Vaia E, Matarasso S, Andreucci VE.** Relation of gingival hypertrophy and blood vessels of cyclosporine A in patients with renal transplants. *Ann Ital Med Int* 1989;4:161-166
 35. **Fujimori Y, Maeda S, Saeki M, Morisaki I, Kamisaki Y.** Inhibition by nifedipine of adherence- and activated macrophage-induced death of human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2001;415:95-103

36. **Gagliano N, Costa F, Tartaglia G.M, Pettinari L, Grizzi F, Sforza C, Portinaro N, et al.** Effects of aging and cyclosporin A on collagen turnover in human gingiva. *Open Dent J* 2009;3:219-226
37. **Gagliano N, Costa F, Tartaglia G.M, Pettinary L, et al.** Effects of aging and cyclosporin A on collagen turnover in human gingiva. *Open Dent J* 2009;3:219-226
38. **Genco R.J, and Mergenhausen S.E.** Host-parasite interactions in periodontal disease. American society for microbiology, Washington
39. **Genctoy G, Ozbek M, Avcu N, Kahraman S. et al.** Gingival health in renal transplant recipients: relationship between systemic inflammation and atherosclerosis. *Int J Clin Pract* 2007;61(4):577-582
40. **Graneli-Piperno A, Keane M.** Effects of cyclosporin A on T lymphocytes and accessory cells from human blood. *Transpl Proc* 1988;20:136-42
41. **Green D, Kroemer G.** The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biol* 1988;8:267-271
42. **Harald C, Gerhard H, Wirnsberger, Mauric A, Holzer H.** High prevalence of Chlamydia pneumoniae infection in cyclosporin A-induced post-transplant gingival overgrowth tissue and evidence for the possibility of persistent infection despite short-term treatment with azytromycin. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1890-1894
43. **Harris C C.** p53 the tumor suppressor gene: From the basic research laboratory to the clinic. *Carcinogenesis* 1996;17 :1187-98
44. **Hassell TM, Hefti AF.** Drug-induced gingival overgrowth: old, problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:103-137
45. **Hitzig C, Monteli R.A, Charbit Y, Teboul M.** Quntification of T6+ and HLA-dr+ Langerhans cells in normal and inflammed human gingiva. *J Biol Buccale* 1989;17:103-108
46. **Islam M, Burke JF Jr, McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, et al.** Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int* 2001;59:498-506
47. **James J. A. , Irwin C. R. , Linden G. J.** Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor- β 1. *Transplantation* 1998; 65:724
48. **Jarnbring F, Somogyi E, Dalton J, Gustafsson A and Klinge B.** Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and

- sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:1065-1071
49. **Jung Y.J, Jeong YJ, Jeong TS, Chung HJ, Kim WJ.** Inhibition of apoptotic signals in overgrowth of human gingival fibroblasts by cyclosporin A treatment. *Arch Oral Biol* 2008;53(11):1042-9
 50. **Jung Y.J, Kang C.G, Jeong J.Y, Kim S.H, Kwak G. Y, Kim W. J.** Proteomic analysis in cyclosporin A- induced overgrowth of human gingival fibroblasts. *Biol.Pharm. Bull.* 2009; 32(8):1480-1485
 51. **Kantarci A, augustin P, Firatli E, Sheff MC, Hasturk H, Graves D.T. and Trackman P.C.** Apoptosis in gingival overgrowth tissues. *J Den Res* 2007;86(9):888-892
 52. **Karpinia KA, Matt M, Fennel RS III, Hefti AF.** Factors affecting cyclosporine-induced gingival overgrowth in pediatric renal transplant recipients. *Pediatric Dentistry* 1996;18(7):450-455
 53. **Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, and Nagata T.** Drug-induced gingival overgrowth-a review. *Biol.Pharm.Bull* 2005;28(10):1817-1821
 54. **Kataoka M, Shimizu Y, Kunikiyo K, Asahara Y, Yamashita K, Ninomiya M, Morisaki I, Ohsaki Y, Kido J, Nagata T.** Cyclosporin A decreases the degradation of type I collagen in rat gingival overgrowth. *J Cell. Physiol* 2000; 182: 351-358
 55. **Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M.** In vivo hyperexpression of transforming factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997;63:1037-1039
 56. **Khoori A.H, Einollahi B, Ansari G, Moozeh M.B.** The effect of Cyclosporine with and without Nifedipine on gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Can Dent Assoc* 2003;69(4):236-41
 57. **King G. N. Fullinaw R. , Higgins T. J. , Walker R. G. , Francis D. M. & Wiesenfeld D.** Gingival hyperplasia in renal allograft recipients receiving cyclosporin-A and calcium antagonists. *Journal of Clinical Periodontology* 1993; 20: 286-293
 58. **Lauer G, Mai R, Pradel W, Proff P, Gendange T, Beyer J.** Influence of cyclosporin A on human gingival keratinocytes in vitro. *J Cranio-Maxillofacial Surgery* 2006;(34),Suppl.S2,116-122

59. **Mariani G, Calastrini C, Carinci F, Bergamini L, Calastrini F, Stabellini G.** Ultrastructural and histochemical features of the ground substance in cyclosporin A induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1996;67:21-21
60. **McGaw T, Lam S, Coates J.** Cyclosporine-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores and cyclosporine levels in serum and saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1987;64:293-297
61. **Mitic K.** Periodontal therapy and CsA-induced gingival overgrowth. 11 Congress of Balkan Stomatological Society, Sarajevo; 2006
62. **Mitic K.** Ciklosporin-A induciran reaktiven gingivalen odgovor. Magisterski trud Skopje 2006
63. **Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K.** Interleukin 1 β , interleukin 6, β 2-microglobulin, and transforming growth factor α in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1999; 44:535-539
64. **Moughal, N.A, E. Adonginaki, Tornhill M.H, Kinane D.F.** In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infection and immunity* 1998;66:5190-5195
65. **Myrillas T.T, Linden G. J. , Marley J. J. , Irwin C. R.** Cyclosporin A regulates interleukin -1 beta and interleukin-6 expression in gingiva : implication for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999; 70(3) : 294-300
66. **Narayanan A, Meyers D, Page R.** Regulation of collagen production in fibroblasts cultured from normal and phenytoin-induced hyperplastic gingiva. *J Periodontal Res* 1998;23:118-121
67. **Nell A , Matejka M , Solar P , Ulm C , Sinzinger H** Evidence that cyclosporine inhibits periodontal prostaglandin I₂ synthesis. *J Periodont Res* 1996 ; 31: 131-134
68. **Niimi A, Tohnai I, Kaneda T et al.** Immunohistochemical analysis of effect of cyclosporin A on gingival epithelium. *J Oral Pathol Med* 1990;19:397-403
69. **Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuuttila ML.** Mitotic activity of keratinocytes in nifedipine- and immunosuppressive medication-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72:167-173

70. **Nurmenniemi PK.** Inflammatory cells and mitotic activity of keratinocytes in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication. *Acta universitatis ouluensis*, 2006
71. **Nurmenniemi PK, Pernu HE, Knuuttila ML.** Mast cell subpopulations in gingival overgrowth induced by immunosuppressive and nifedipine medication. *J Periodontol* 2004;75(7):933-8
72. **Odile MC, Suvia ASE & Cataldo WL.** Effect of inflammation on the proliferation of the human gingival epithelial cells in vitro. *J Periodontal* 1997;68:1070-1075
73. **Offenbacher S.** Periodontal disease : Pathogenesis *Ann Periodontal* 1996 ; 1 : 879-925
74. **Offenbacher S.** Periodontal disease : Pathogenesis. *Ann Periodontal* 1996 ; 1 : 879-925
75. **Page R.C.** The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991;26:230-242
76. **Paik JW, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK & Choi SH.** Inhibition of cyclosporine A -induced gingival overgrowth by azitromycin through phagocytosis : an in vivo and in vitro study. *J Periodontol* 2004;75(3):380-7
77. **Pandilova M.** Komparativna analiza na apoptotično odumiranje na kletkite vo tek na parodontalna bolest. *Doktorska disertacija* Skopje, 2003
78. **Pezela F, Micklem H. et al.** Antibody for detection p53 protein by immunohistochemistry in normal tissues. *J Clin Pathol* 1994;47:592-596
79. **Pisanty S, Rahamin E, Ben-Ezra D, Shoshan S.** Prolonged systemic administration of cyclosporin A affects gingival epithelium. *J Periodontol* 1990;61:131-141
80. **Ramon Y, Behar S, Kishon Y & Engelberg.** Gingival hyperplasia caused by nifedipine- a preliminary report. *Int J Cardiol* 1984;5:195-204
81. **Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *L Cell Biol* 1994;124:1-6
82. **Robbins SL, Cotran RS, Kumar V.** *Pathologic Basis of Disease* VII edition; Elsevier Saunders, 2005 ; 39-76
83. **Romito GA, Pustiglioni FE, Saraiva L, Pustiglioni et al.** Relationship of subgingival and salivary microbiota to gingival overgrowth in heart transplant patients following cyclosporin A therapy. *J Periodontol* 2004;75(7):918-24

84. **Saito K, Mori S, Tanda N, Sokamoto S.** Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodontol* 1999;70(6): 581-586
85. **Scincaglia GP, Forniti F, Cavallini R, Piva R, Calura G, del Senno L.** Cyclosporin-A increased type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* 1992;21:181-185
86. **Ségueier S. , Godeau G. , Brousse N.** Immunohistological and morphometric analysis of intraepithelial lymphocytes and Langerhans cells in healthy and diseased human gingival tissues. *Archives of Oral Biology* 2000; 45: 441-452
87. **Seumour RA, Thomason JM, Ellis JS.** Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with cyclosporine in the absence of calcium channel blockers. *J Clin Periodontol* 2005;32:273-279
88. **Seymour RA and Heasman PA.** Drugs and the periodontium. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 1-16
89. **Teodosijević M.** Oroparodontologija Patogeneza (imunologiska osnova) Naučna knjiga Beograd 1990 ; 134-138
90. **Teunissen M. B. , De Jager M. H. , Kapsenberg M. L. , Bos J. D.** Inhibitory effect of cyclosporin A on antigen and alloantigen presenting capacity of human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol.* 1991; 125: 309-16
91. **Thomason J. M. , Seymour R. A. , Ellis J. S. , Kelly P. J. Parry G. , Dark J. et al.** Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the role of HLA phenotype. *J Clin Periodontol* 1996; 23 : 628-634
92. **Tonetti M, Cortellini D, Lang N.** In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infect and imm.* 1998; 66(11):5190-5195
93. **Torrezan PR, Andrade Sobrino J, Denardin OV, Rapoport A.** Cyclosporine induced gingival hyperplasia in kidney transplants. *Rev Assoc Med Bras* 2005;51(4):200-5
94. **Trackman P.C, Kantarci A.** Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(3):165-175
95. **Uzel Mi, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff, MC, Firatli E, et al.** Connective tissue growth factor in phenitoin-induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001;72:921-931

96. **Varga E, Lennon MA&Mair LH.** Pre transplant gingival hyperplasia predicts severe cyclosporin-induced gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Clin Periodontol* 1998;25(3):225-30
97. **Willershausen-Zönnchen B. , Lemmen C. and Schumacher U.** Influence of Cyclosporine A on Growth and Extracellular Matrix Synthesis of Human Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology* 1992; 152: 397-402.
98. **Wondimu B, Berg U, Modeer T.** Renal function in cyclosporine-treated pediatric renal transplant recipients in relation to gingival overgrowth. *Transplantation* 1997;64:92-96
99. **Wondimu B. , Modeer T.** Cyclosporin A upregulates prostaglandin E2 production in human gingival fibroblasts challenged with tumor necrosis factor alpha in vitro. *J Oral Pathol Med* 1997; 26 : 11-6
100. **Wysocki G. P. Gretzinger H. A. and Laupacis A.** Fibrous hyperplasia of the gingiva : a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.* 1982; 55 : 274-278
101. **Yamasaki A, Rose G. G. , Pinero G. J. , Mahan C. J.** Ultrastructure of fibroblasts in cyclosporin A induced gingival hyperplasia. *J. Oral Pathol.* 1987; 16: 129-134
102. **Zebrowski EJ, Pylpas SP, Odlum O, Johnson RB.** Comparative metabolism of H³-glucosamine by fibroblast populations exposed to cyclosporine. *J Periodontol* 1994;65:565-567
103. **Zoeler J, Flentje M, Sinn P, Born JA.** Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasia and carcinomas. *Anal Cell Pathol* 1994;7:77-88
104. **Zwaldo G, Schlegel R & Sorg C.** A monolonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol* 1986;37:512-518