

# ФИБРОЗНА РЕАКЦИЈА НА ГИНГИВАТА КАКО РЕЗУЛТАТ НА ЦИКЛОСПОРИНСКА ТЕРАПИЈА

Митиќ К.<sup>1</sup>, Поповска М.<sup>1</sup>, Јовановиќ Р.<sup>2</sup>, Костадиновска-Куновска С.<sup>2</sup>, Стефановска Е.<sup>1</sup>, Ристоска С.<sup>1</sup>

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, <sup>1</sup>Клиника за болести на устата и пародонтот  
УНИВЕРЗИТЕТСКИ КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР - Скопје, <sup>2</sup>Институт за патолошка анатомија

Циклоспорин-индуцираната фиброза во гингивалните ткива, претставува значаен проблем за пародонтолозиите. Зголемениите гингивални ткива можат да ја зголемаат акумулацијата на микроорганизмиите и да го компримираат оралното здравје кај оваа група на пациенти.

Цел на истражувањето: да се испита влијанието на циклоспоринските дози врз фибробластната активност во однос на синтезата на колагенот.

Материјал и метод: За реализација на испитаваната цел, беа истражени 120 бубрежно-трансплантирани пациенти кај кои постоело гингивално зголемување. Врз основа на дневната доза на циклоспориној, пациентите беа поделени во четири групи (100 mg, 125mg, 150mg, 175mg). Со пародонтолошките прегледи беа утврдени следни индекси: индекс на денитален плак (ИДП) по Silness-Loe, индекс на гингивална инфламација (ИГИ) по Loe-Silness, и индекс на гингивално зголемување по Mc Gaw и сор. Од сите пациенти беше земен биоптичен материјал и по стандардната хистолошка обработка, беше боен со хемалаун еозин за одредување на колаген и ретикулин во гингивалната структура.

Резултати: Kruskal-Valisov тестот покажа дека не постои статистички значајна разлика во дистрибуција на фреквенциите на колагенот кај различните испитувани групи (Хи-квадрат=3,41;  $p>0,05$ ) како и во однос на ретикулиној (Хи-квадрат=3,349;  $p>0,05$ ).

Сpearman-овиот коефициент на корелација беше позитивен во однос на колагенот со индексот на денитален плак (ИДП); ( $\rho=0,246$ ;  $p<0,01$ ), исто така помеѓу колагенот и индексот на гингивално зголемување (ИГЗ); ( $\rho=0,192$ ;  $p<0,05$ ), како и помеѓу ретикулиној со индексот на гингивална инфламација (ИГИ) ( $\rho=0,240$ ;  $p<0,01$ ).

Заклучоци: Формирањето на ретикуларна мрежа, а исто така и продукцијата на колаген од страна на фибробластите не е зависна од аплицираната доза на циклоспориној. Опстранување на локалните фактори и намалување на гингивалната инфламација водат кон намалување на гингивалното зголемување.

**Клучни зборови:** гингивално зголемување, колаген ретикулин, денитален плак, циклоспорин.

Медикаментозно-индуцираното гингивално зголемување било предмет на научни истражувања уште во триесеттите години кога се потврдиле повеќе медикаменти кои учествуваат како етиолошки фактор во индуцирањето на гингивалното зголемување. Три големи медикаментозни групи биле асоцирани со јатрогеното гингивално зголемување: антиконвулзиви (особено фенитоин), калциум блокатори (нифедипин) и имуносупресив (циклоспорин). И покрај тоа што нивните фармацевтски ефекти и примарните таргет ткива се сосема различни, тие делуваат слично на гингивалните ткива, предизвикувајќи фиброзно гингивално зголемување (11, 7, 21).

Асоцијацијата меѓу циклоспоринската терапија и гингивалното зголемување прво била забележана во раните осумдесетти години како компликација од третманот на ренално-трансплантираните пациенти (12).

Иако патогенезата е недоволно разјаснета, се смета дека фиброзата настанува заради пореметување на хомеостазата на колагената синтеза и деградација, особено на колаген тип I, резултирајќи во зголемена акумулација на колагени фибри во гингивалните сврзни ткива, што е потврдено и со имунохистохемиски анализи на стаорци (19).

Зголемена акумулација на екстрацелуларен матрикс и неколку инфламаторни клетки во гингивалното сврзно ткиво потврдено е и на експериментални модели на стаорци кои биле третирани со циклоспорин А (28).

Метаболизмот на колагенот прецизно е балансиран преку колагената синтеза и деградација во одржување на ткивниот волумен. Schincaglia и сор. (28) во своите истражувања се согласни за постоењето на стимулаторниот ефект на циклоспоринот на хуманите гингивални фибробласти, за разлика од James и сор. (18) кои посочуваат за неафектирана или инхибирана колагена синтеза по циклоспоринскиот третман.

Колагената деградација може да биде екстрацелуларна, инволвирајќи ја секрецијата на колагеназата и 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 (107). In vitro студиите покажаа дека циклоспоринот ја инхибира продукцијата на лизозомалната протеиназа катепсин L, но не и катепсин B, во хумани гингивални

фибробласти (4). Циклоспоринот исто така може да ја инхибира фагоцитозата на тип 1 колаген во in vitro и in vivo студии (19).

Морфолошките студии изведени на хумана циклоспорински третирана гингива, регистрираат намалена колагена фагоцитоза (27), со која се во согласност и Kataoka и сор. (19) кои ја потврдуваат намалената фагоцитоза и кај експериментални модели на стаорци. Интересно е што во овие испитувања, пронајдена е сигнификантна супресија на колаген тип 1 и на колагеназната mRНК. Циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување се должи на намалената деградација на колаген тип 1, преку редукција на колагената фагоцитоза од фибробластите, а не поради зголемената синтеза на колагенот.

Неодамнешните студии, известуваат дека циклоспоринското зголемување на гингивата претставува таков тип на зголемување, каде релативно е зголемен неколагениот матрикс со релативно намален колаген-матрикс, спореден со нормалните гингивални ткива.

Yamsaki и сор. (36) 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 регистрирањето 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 добиена од гингивално зголемување кое не е резултат на циклоспоринското дејство, и сметаат дека таа се должи на инхибицијата на T-лимфоцитната функција. Ултраструктурните и имунохистохемиските истражувања документираат активна протеинска синтеза и секреција, со намалени цитотоксични или дегенеративни промени.

Миофибробластите обично се асоцирани со доцните фази на ткивниот „turnover“, и нивното присуство во сврзните и гингивалните ткива, Boltchi и сор. (5) претпоставуваат дека се должи на медикаментозно условеното егзацерирање 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. (34) 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 $\mu$ 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 (25). Добиените резултати *in vitro*, само делумно ги потврдуваат *in vivo* обсервациите, бидејќи матрикс синтезата не е пропорционално следена и со клеточна маса.

Bartold (3), 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 васкуларизираните ткива (гингивата). Индуцираната пролиферација на фибробластите кое резултира во продукција на матрикс компоненти, само делумно

го објаснуваат проблемот на зголемената ткивна маса и целуларитет.

Циклоспорин-индуцираното зголемување на гингивата претставува интересен пример на ткивно-специфичен механизам, при кој циклоспоринот го стимулира нивото на TGF- $\beta$  *in vivo* и ја зголемува неговата продукција во реналните клетки и лимфоцитите и доведува до ренална фиброза и нефропатија (33). Тргувајќи од овој податок, се чини разумно да се очекува дека ќе постои висока експресија на TGF- $\beta$ 1 и CTGF кај циклоспоринското зголемување на гингивата, но спротивно од овие очекувања Echelard (15) известува за постоење на висока инфламација на ткивата и за непостоење на зголемено ниво на TGF $\beta$  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 нифедипин и фенитоин (32).

Тромбоцитниот фактор на раст (PDGF) претставува хемоатрактант за фибробластната пролиферација и за синтезата на глюкозаминоглюкани, фибронектин и колаген. Зголеменото ниво на овој фактор во гингивата можеби е одговорен за пролиферација на фибробластите и продукцијата на екстрацелуларниот матрикс (5).

Резултатите од студијата на Boltchi и сор. (5) сугерираат за слаба поврзаност меѓу фибробластната активност и клиничките знаци на гингивалното разраснување поддржувајќи ја хипотезата за постоење на мултифакториелен концепт во патогенезата на ова заболување.

Неодамна беше демонстрирано дека циклоспоринот не само што го блокира имуниот систем преку инхибиција на сигнали преку T клеточниот рецептор (превенира продукција на цитокини кои нормално го стимулираат имуниот одговор), туку ја стимулира и продукцијата на TGF $\beta$ 1 кој прет-

ставува најодговорен цитокин за продукцијата на екстрацелуларниот матрикс, колагените фибри, глюкозаминоглюкани и протеоглюкани.

Група автори (17), по пат на имунохисто-хемиски анализи на цитоскелетонот кај нормални и хипертрофирани гингивални фибробласти третирани со циклоспорин и TGF $\beta$ 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 $\beta$ 1), отколку од циклоспоринот. Циклоспоринот не индуцирал морфолошки промени во фибробластните култури добиени од хипертрофирани и нормална гингива.

Постоењето на функционални хетерогени субпопулации на фибробласти во нормална гингива е документирано уште во лабораториските испитувања на Hassel и Stanek во 1983 година, кои ги потенцираат бројните функционални параметри како што се нивото на клеточната пролиферација, протеинската синтеза, колагената продукција, и одговорот кон различни хемиски супстанции. Хетерогените фибробласти и нивниот колагенолитички одговор кон циклоспоринот беше испитуван од Tripton и сор. (30). Изолирани беа 14 различни гингивални фибробластни видови од здрави индивидуи, на кои им беше одредувана колагеназната активност и ткивниот инхибитор на металопро-теиназата, пред и по терапија со циклоспорин (0, 1-0, 75ng/ml). Студијата покажа впечатливи интер-индивидуални разлики во колагеназната активност пред и по терапија со циклоспорин.

Индивидуалната преосетливост на гингивата, може да биде поврзана со генетската предиспозиција. Детектирање на различни гингивални одговори кон циклоспоринот и неговиот главен метаболит OL-17, манифестирани преку зголемена синтеза на протеини и колагена продукција бил испитуван од страна на Zebrowski (37), Schincaglia (28), кој

покажал дека одговорот е дозно-зависен и сигнификантен кај концентрација на медикаментот од 500ng/ml. Спротивни наоди кои говорат за намалена фибробластната синтеза, ни даваат истражувањата на Friskop(16) .

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 (26). Овие ефекти биле модифицирани со додавање на супернатанти од лимфоцитните култури, индицирајќи за можна интеракција меѓу лимфоцитните продукти и гингивалните фибробласти.

Chabria и сор. (8) во своите истражувања докажуваат дека кај „осетливите пациенти,“ постои одредена микстура на фибробласти и лимфоцитни субпопулации кои реагираат со циклоспоринот во инфламираните гингивални ткива, со краен исход на гингивално зголемување.

**Цел на трудот:** да се испита влијанието на циклоспоринските дози врз фибробластната активност во однос на синтезата на колагенот.

## Материјал и метод

За остварување на поставената цел, проследени се вкупно 120 пациенти со бубрежна трансплантација на возраст од 16-62 год., кај кои дијагностициравме гингивално зголемување. На Клиниката за болести на устата и пародонтот, при Стоматолошкиот Клинички Центар „Св. Пантелејмон“ во Скопје и Клиниката за нефрологија-Клинички Центар-Скопје, кај сите испитаници беа спроведени :комплетна анамнестичка постапка и клинички преглед. На Институтот за патолошка анатомија и Институтот за фармакологија при Медицинскиот факултет во Скопје беа спроведени дел од параклиничките испитувања содржани во целта на оваа студија.

Оформената група од 120 испитаници ја сочинуваа пациенти со бубрежен трансплантат и стабилна графт функција. Пост-трансплантациската имunosупресивна терапија кај сите испитаници се состоеше од циклоспорин (Neoral; 6-8mg/kg/ден) за постигнување на C2 ниво (концентрација во серум 2 часа по администрација на медикаментот), преднизолон (1 mg/kg/ден) mycophenolate mofetil (Cellcept 1, 5-2g/ден) и Diltiazem (2x90mg), кој ја подобрува ресорпцијата на циклоспоринот. По спроведената анамнеза кај испитаниците беа исклучени 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.

Според дневната доза на циклоспоринот, пациентите беа групирани во 4 групи:

- **Прва група** од 30 пациенти, каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесуваше 100mg;
- **Втора група** од 30 пациенти каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесуваше 125mg;
- **Трета група** од 30 пациенти каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесуваше 150mg;
- **Четврта група** од 30 пациенти каде вкупната дневна доза на примениот циклоспорин изнесуваше 175mg.

По извршената анамнеза, кај сите пациенти, беше извршен темелен пародонтолошки клинички преглед, при што утврдивме постоење на гингивално зголемување. Клиничкиот преглед за анализа на гингивалниот статус, беше реализиран преку примена на следните индексни вредности:

- **индекс на дентален плак по Silness-Loe (1963)**, според кој присуството и количината на дентален плак е вреднувано од 0-3 (ИДП)

- 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 по Loe-Silnes (1964):**

- 0- не постои воспаление на гингивата, таа е со бледо розева боја, цврста конзистенција и со ситнозреста 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 по Mc Gaw и сор. (50)**

- 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).

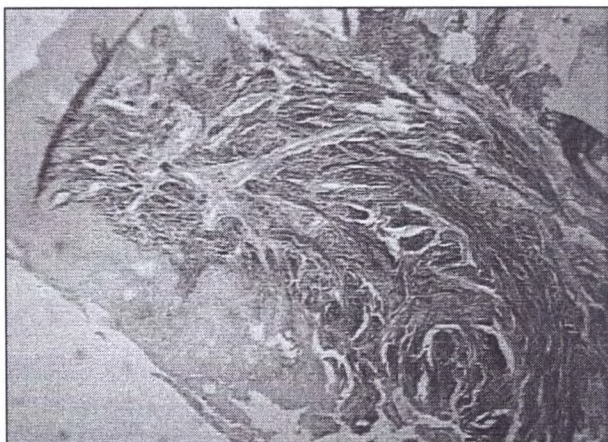
Од сите испитувани пациенти беше земен биоптичен материјал од зголемената интердентална папила под инфилтрациона анестезија и фиксиран во 10% неутрален формалин, по што следуваше стандардна патохистолошка обработка на Институтот за патолошка анатомија при Медицинскиот факултет во Скопје. Понатаму ткивните примероци беа вкалани во парафински блокчиња од кои беа направени ткивни пресеци со дебелина од 4-6 микрони. Така подготвените ткивни пресеци беа стандардно монтирани на предметни стакла и обоени со хемалаун еозин и хистохемиски со Van Gieson, Retikulin, PAS и Alcian blue, додека пресеците за имунохистохемиското бојење беа монтирани на силански предметни стакла и боени со Авидин-Биотинска техника (ABC-Avidin Biotin Complex), LSAB + варијанта.

### ХИСТОХЕМИСКИ МЕТОДИ

(Методи за сврзно ткиво)

#### VAN GIESON

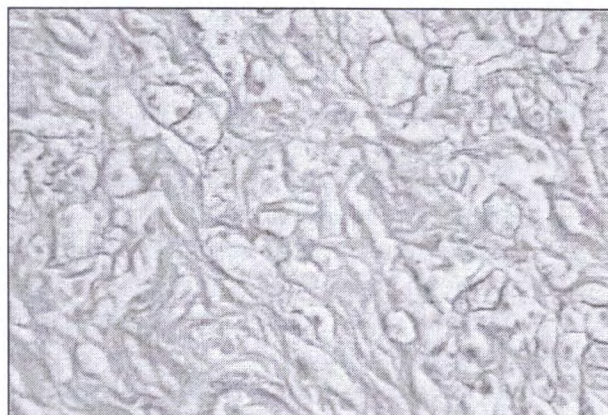
Ова бојење се користи за прикажување на колагените влакна во парафинските пресеци. Резултат: Јадрата се плави, колагените влакна се црвено-пурпурни, а цитоплазмата, мускулните влакна и орожнетиот епител се пребоени жолто. Според степенот на присуството на колаген се користеа +, ++, +++ (слика бр. 1).



Слика 1. Van Gieson h 40; Колаген (+++)

#### ГОМОРИЕВА МЕТОДА ЗА РЕТИКУЛИНСКИ ВЛАКНА

Се користи за прикажување на ретикулинските влакна во ткивните пресеци. Резултат: Ретикуларните влакна се обоени црно, а основата е зелена. Присуството на ретикулин беше одредено кај сите препарати и нотирано со +, ++, +++ (слика 2).



Слика 1. Ретикулин (+++) x 400

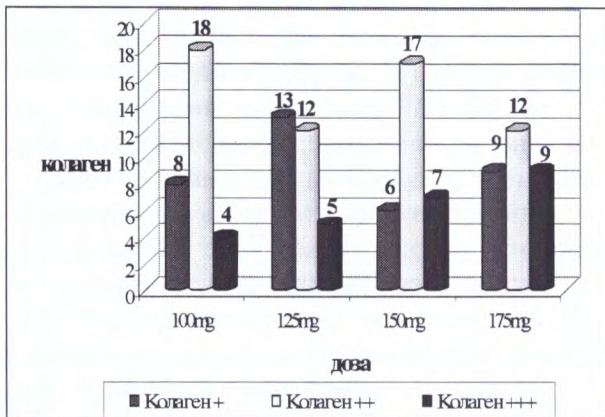
**Статистичка анализа:** Во статистичка анализа на добиените резултати од клиничката и патохистолошката студија беа користени методи на дескриптивна и аналитичка статистика. Беа користени методите на еднофакторска непараметриска анализа на варијанса по Крускал Валис (Kruskal - Wallis Тест), Ман-Витниев У тест на инверзија (Mann-Whitney U test of the inversion) и Spearman-ов коефициент на корелација.

Нивото на веројатност на остварување на нултата хипотеза согласно меѓународните стандарди за био-медицински науки беа 0,05 и 0,01. Свкупната статистичка анализа е направена со помош на персонален сметач IBM-pentium IV pro со адекватен статистички софтвер од Институтот за социјална медицина, статистика и истражување во здравството на Медицинскиот Факултет во Белград.

### Резултати

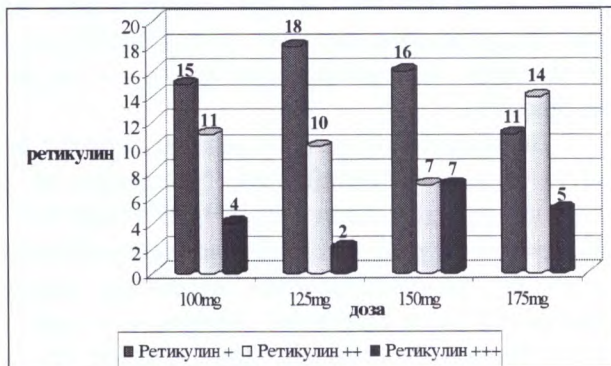
Дистрибуцијата на фреквенците на различните вредности на колагенот (1, 2, 3)

кај различните испитувани групи со графички приказ, е претставена на графиконот 1. Направениот Крускал-Валисов тест покажа дека не постои статистички значајна разлика во дистрибуција на фреквенците на колагенот кај различните испитувани групи (Хи-квадрат=3,41;  $p>0,05$ ).



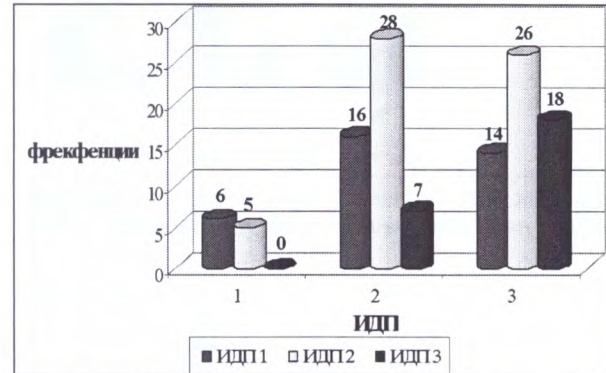
Графикон 1. Колаген кај испитуваните пациенти

Дистрибуција на фреквенците на различните степени на ретикулин кај испитуваните четири групи на пациенти третирани со различни дози на циклоспорин (100, 125, 150 и 175mg) е прикажана на графикон 2. Направената статистичка анализа со Крускал-Валисовиот тест, покажа: Хи-квадрат=3,349;  $p>0,05$ ; односно не постои статистички значајна разлика во дистрибуцијата на фреквенците кај различните испитувани групи.



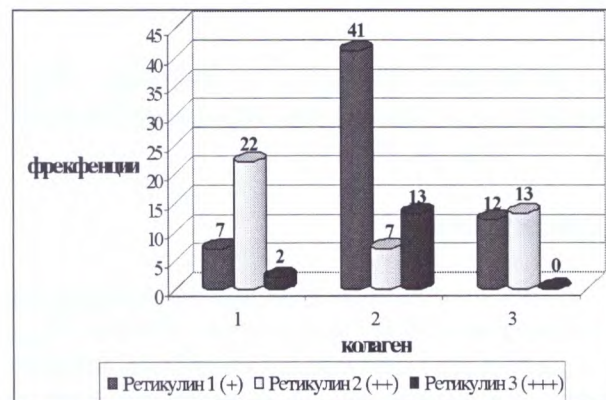
Графикон 2. Ретикулин кај испитуваните пациенти

На графикон 3 претставена е позитивна корелација на колагенот со индексот на дентален плак (ИДП); ( $p=0,246$ ;  $p<0,01$ ).



Графикон 3. Нивото на колаген во однос на индексот на дентален плак (ИДП)

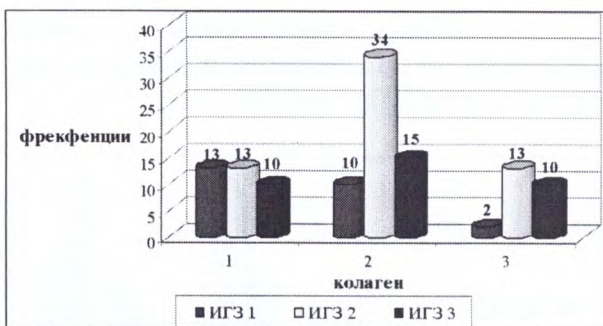
Степенот на застапеност на колаген во однос на степенот на застапеност на ретикулин е претставен на графикон 4. Spearman-овиот коефициент на корелација покажа дека колагенот негативно корелира со ретикулинот ( $p=-0,270$ ).



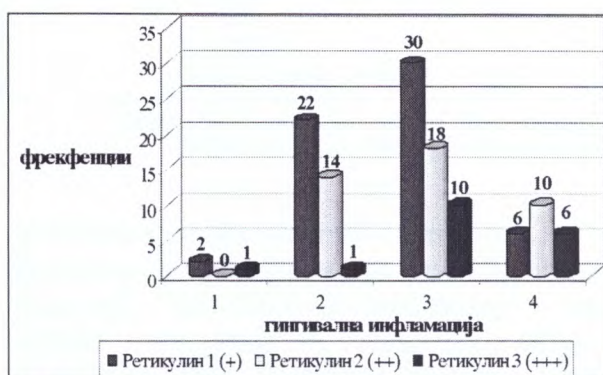
Графикон 4. Степен на застапеност на колаген во однос на степенот на застапеност на ретикулин

На графикон 5 е претставен степенот на застапеност на колаген во однос на индекс на гингивално зголемување (ИГЗ). Колагенот позитивно корелира со индексот на гингивално зголемување ( $p=0,192$ ;  $p<0,05$ ).

Графикон 6 ја претставува корелацијата на индексот на гингивалната инфламација (ИГИ) во однос на степенот на застапеност



Графикон 5. Степен на застапеност на колаген во однос на индекс на гингивално зголемување (ИГЗ)



Графикон 6. Степен на индекс на гингивална инфламација (ИГИ) во однос на степенот на застапеност на ретикулин

на ретикулин. Ретикулинот позитивно корелира со индексот на гингивална инфламација (ИГИ) ( $\rho=0,240$ ;  $p<0,01$ ).

## Дискусија

Циклоспорин-индуцираното гингивално зголемување (ГЗ), претставува комбинација од целуларни влијанија. Генерално дефицитот на контролата на раст, асоцирана со фибробластната хиперплазија и акумулација на матрикс компоненти, резултира во разраснување на ткивата, со релативно нормална архитектура. ГЗ може да биде резултат на зголемена клеточна пролиферација, зголемена синтетска активност, намалена деградација или заедничка комбинација на овие фактори (23).

Клеточната хомеостаза во ткивата претставува резултат од балансот меѓу интеракцијата на антагонистичките молекули, во

кои цитокините и факторите на раст играат огромна улога (11). 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. (5) сметаат дека медикаментите кои како несакан ефект индуцираат гингивално зголемување, предизвикуваат егзацербација на нормалниот ткивен turnover.

Според резултатите добиени од хистохемиското истражување, не е регистрирана статистички сигнификантна разлика во однос на колагенот и ретикулинот меѓу различните медикаментозни групи (графикон 1, 2). Оттука, се наметнува заклучокот дека медикаментозно-стимулираната продукција на колаген, а последователно и ретикулин, од страна на фибробластите не се одвива на дозно-зависен начин.

In vitro студиите покажаа дека циклоспоринот предизвикува сигнификантен пораст на колагената синтеза во култури на гингивални фибробласти, но не и на ДНК синтезата со специфично покачување на тип I проколаген (24). Zebrowski и сор. (37) сметаат дека зголемениот сврзно-ткивен матрикс кај пациентите кои биле третирани со циклоспорин се јавува поради зголеменото ниво на не-сулфатни глюкозаминоглюкани. 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 (6).

Добиените резултати одат во прилог на позитивна корелација помеѓу колагенот и индексот на дентален плак (ИДП) (графикон 3), ( $\rho=0,246$ ;  $p<0,01$ ). Иако во литературата постојат контрадикторни податоци околу дилемата дали оралниот биофилм е важен како тригер фактор или како фактор кој ја влошува состојбата на гингивалното зголемување.



ување, одредени студии покажаа сигнификантна корелација помеѓу инциденцата на гингивалното зголемување и количината на денталниот плак (13,1), додека Dahllöf и Modèer (10) го потенцираат позитивниот ефект од задоволителната орална хигиена која е способна да го редуцира, но не и да го превенира овој несакаан ефект.

Можната инволвираност на одредени бактериски видови во развојот на гингивалните лезии бил испитуван од Takada и сор. (31) кои детектирале поголема присутност на *Prevotella intermedia* кај пациентите со ГЗ, во однос на оние кои биле третирани со медикамент, а не развиле ГЗ, како и кај оние кои не примале медикаментозна терапија. Акијама и сор. (2) го одредувале субгингивалниот бактериски профил кај субјекти кои примале фенитоин, при што со квантитативната анализа која била спроведена пред и по пародонталниот третман, утврдиле два бактериски вида (*Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis*) кои сигнификантно биле асоцирани со ГЗ. Овие резултати се во спротивност со Smith и сор. (29), кои не детектирале разлики во оралната микробна популација кај пациенти со и без ГЗ.

Бактериските компоненти во денталниот плак можат да бидат препознаени од клеточните рецептори (Toll-like receptors) ТЛР на домаќинот, кои се сензори за патогено-асоцираните молекули (75). Во *in vitro* студиите спроведени на стаорци, клетки кои биле третирани со циклоспорин, покажале зголемена активација на ТЛР2 и ТЛР4. Препознавајќи ги клеточните компоненти како пептидоглюкани и липопротеини од страна на ТЛР2 и останатите мембрански компоненти како липополисахариди од страна на ТЛР4, води кон серија на случувања, вклучувајќи активација на нуклеарен фактор (НФ)- $\kappa$ B, кој резултира во цитокина продукција и експресија на адхезивните молекули во фибробластите (20). Според овие резултати, сметање дека интеракцијата на денталниот плак и соодветниот одговор на домаќинот, има важна улога во етиологијата на ГЗ, иако оваа релација сеуште не е во потполност јасна.

Познато е дека бактериите од денталниот плак продуцираат ММР (колагенази), кои предизвикуваат матрикс деструкција. Се поставува прашање дали циклоспоринот присутен во денталниот плак го негира ова дејство, со оглед на тоа дека неговата локална концентрација е многу поголема во денталниот плак и поради фактот што имунитетот е намален и постои несоодветен имунолошки одговор. Заради намалената имунолошка реакција и неелиминирање на агенсиите од плакот, се јавува состојба на пролонгирано присуство на истите со последователна хронична иритација на гингивата со консекутивно зголемување.

Иницијално како резултат на хроничната инфламација доаѓа до депонирање на богат мононуклеарен 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, колагенот негативно корелира со ретикулинот ( $\rho=-0,270$ ) (графикон 4).

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. На графикон 5 е претставен степенот на застапеност на колаген во однос на индекс на гингивално зголемување (ИГЗ) кај сите четири испитувани групи ( $\rho=0,192$ ;  $p<0,01$ ).

Овие резултати се должат на стимулаторниот ефект на циклоспоринот на фибробластите во синтеза на колаген и останати матрикс компоненти како и синергистичкиот ефект од локалното присуство на циклоспоринот во денталниот плак и плунката (14, 28). MacGaw i Niimi во своите студии го потврдуваат неговото локално присуство во кон-

центрација која е поголема од соодветната вредност во серум. Циклоспоринот е липофилен агенс кој со пасивна дифузија поминува од слободната плазмина фракција во плунката. Депото на циклоспоринот во денталниот плак и плунката, авторите сметаат дека синергистички учествува со циклоспоринот во серум во формирањето на гингивалните лезии. Споредено со фенитоин, циклоспоринот има повисок волумен на дистрибуција како и подолг полуживот, кој условува и до 200 пати поголеми вредности на циклоспоринот во гингивалниот флуид компариран со вредноста во серум. Оваа зголемена концентрација се должи на зголемената маса на гингивата. Ellis и сор. (14) тврдат, дека локалната концентрација на индуцирачките медикаменти во гингивалниот флуид, плак или во зголемените ткива можат да обезбедат информации за експресијата и патогенезата на гингивалното зголемување.

Ретикулинот е во позитивна корелација со индексот на гингивална инфламација (ИГИ) ( $\rho=0,240$ ;  $p<0,01$ ) кај сите испитувани групи (графикон б).

Ретикулинот како склеропротеин се депонира во гингивалната строма во иницијалната фаза на хроничната инфламација, и дури подоцна после подолг временски период настанува негова замена со колаген. Присуството на денталниот плак и развојот на инфламаторниот одговор создаваат медиум за интеракција меѓу фибробластите и циклоспоринот. Инфламацијата води кон ткивни промени преку ослободување на различни медијатори кои се ослободуваат од активирани инфламаторни клетки. Во инфламаторна гингива, ткивото покажува високо ниво на ремоделирање, ефектот на циклоспоринот синергистички учествува со ендогените сигнали (инфламаторни медијатори), резултирајќи во зголемена репарација. Инфламаторните медијатори учествуваат како кофактори во индуцирање на гингивалното зголемување (32).

1. Од патохистолошкиот наод, можеме да ја потврдиме хроничната инфла-

маторна реакција, составена од лимфоцити и плазма клетки, што говори за долготрајно делување на агенсите од денталниот плак и неможност за нивно елиминирање поради имуносупресијата. Формирањето на ретикуларна мрежа, а потоа и продукцијата на колаген од страна на фибробластите не е зависна од аплицираната доза на циклоспоринот.

2. Иако не можеме да прецизираме дали гингивалното зголемување се јавува заради инфламаторната компонента или првично се јавува заради стимулаторниот ефект на циклоспоринот во продукција на колаген, сепак треба да се потенцира дека зголеменото гингивално ткиво последователно ја отежнува плак елиминацијата и ја зголемува гингивалната инфламација.
3. Од добиените резултати, се потврдува учеството на локалните фактори како важни етиолошки причинители, покрај медикаментозните варијабли, во развојот на гингивалното зголемување. Денталниот плак стимулативно делува во продукција на колаген во стромата на сврзното ткиво, која клинички се манифестира во зголемена гингива. Секако дека овие ефекти не треба да се набљудуваат изолирано, бидејќи во оралната празнина тие неминовно влијаат едни на други, што ја потврдува хипотезата за мултифактириелна етиологија на овој несакан ефект.

Генерално, можеме да резимираме дека во ризична група на пациенти спаѓаат пациентите со дневна доза од 175mg, кај кои треба да биде спроведена контролна плак програма, а во одредени случаи и хируршко отстранување на зголеменото гингивално ткиво.

Сметаме дека се потребни понатамошни испитувања од аспект на гингивалниот екстрацелуларен матрикс метаболизам и интеракцијата помеѓу циклоспоринот, имуниот одговор, цитокините, факторите на раст и

гингивалните клетки, кој ќе овозможат подобро разбирање на оваа проблематика, соодветна превенција и негов третман.

## GINGIVAL FIBROUS REACTION OF CYCLOSPORINE THERAPY

Mitić K., Popovska M., Jovanović R., Kostadinovska-Kunovska S., Stefanovska E., Ristoska S.

### Summary

**Background:** Cyclosporine-induced gingival overgrowth remains a significant problem for the periodontologist. Severe forms of gingival overgrowth can increased accumulation of micro-organisms and impair oral health at these group of patients. The aim of our study was to detect the influence of medicamentous doses to the fibroblast collagen synthesis.

**Method:** The patient sample was composed by 120 renal transplant patients, clinically diagnosed with gingival overgrowth, divided into four groups (100 mg, 125mg, 150mg, 175mg). All patients underwent a periodontal screening: plaque index (PI) Silnes-Löw, gingival inflammation index (GI) Löw-Silnes and gingival overgrowth index (GOI) proposed by MacGow. A sample of the tissue was taken from all the patients who were part of the research. Following the standard pathohistological processing, tissues were colored with hemalaun eosine to determine the collagen and reticulin in connective tissue.

**Results:** The results from Kruskal-Valis test showed that there isn't statistical deferences at distribution of collagen frequencies at different research groups (Chi-square=3,41;  $p>0,05$ ) and also the same results for the reticulin (Chi-square=3,349;  $p>0,05$ ).

There were a positive correlation between collagen and PI ( $\rho=0,246$ ;  $p<0,01$ ), than between collagen and GOI ( $\rho=0,192$ ;  $p<0,05$ ), and also between reticulin and GI ( $\rho=0,240$ ;  $p<0,01$ ).

**Conclusions:** Reticulin and collagen synthesis from gingival fibroblasts is not dose-dependent. Removal of the local factors and the decrease of the gingival inflammation leads to reduction of the gingival overgrowth.

**Key words:** gingival overgrowth, collagen reticulin, dental plaque, cyclosporine.

### Литература

1. Armitage G.C. . Development of classification system for periodontal disease and conditions. *Ann of Periodontol* 1999;4(1):1-6.
2. Akiyama S, Amano A, Kato T, Takada Y, Kimura K. R. and Morisaki I. Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis* fimA variations with phenitoin -induced gingival overgrowth. *Oral Disease* 2006;12(1):51-56.
3. Bartold PM. Regulation of human gingival fibroblast growth and syntetic activity by cyclosporine A in vitro. *J Periodontal Res* 1989 ; 24: 314-321.
4. Bennet J. A. and Christian J. M. Cyclosporin-induced gingival hyperplasia. *J Am Dent Assoc* 1985; 111: 272-273.
5. Boltchi F, Rees T, Iacopino A. Cyclosporine A - induced gingival overgrowth: A comprehensive review. *Quintessence Internationa* 1999; 30(11); 775-783.
6. Brunet L, Miranda J, Farre M, Berini L and Mendieta C. Gingival enlargement induced by drugs. *Drug safety* 1996; 15(3):219-231.
7. Cebeci I, Kantarci A, Firatli E, Carin M, Tuncer O. The effect of verapamil on the prevalence and severity of cyclosporine - induced gingival overgrowth in renal allograft recipients. *J Periodontol* 1996; 67: 1201-1205.
8. Chabria D., Weintraub R. G. & Kilpatrick N. M. Mechanism and management of gongival overgrowth in paediatric transplant recipients : a review. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2003; 13: 220-229.
9. Correa J. D. Querios C.M. Costa J.E. et al. Phenytoin-induced gingival overgrowth: a review of the molecular, immune, and inflammatory features. *International Scholary Research Network* 2011; ID 497850.
10. Dahllöf G. and Modéer T. The effect of a plaque control program on the development of phenitoin-induced gingival overgrowth, a 2-year longitudinal study. *J of Clinical Periodontology* 1986;13(9):845-849.
11. Daley TD, Wysocki GP. Cyclosporine therapy: its significance to the periodontist. *JPeriodontol* 1984; 55:708-12.
12. Desai PB, Silver J.G. Drug - induced gingival enlargements. *Canadian Dental Association* 1998; 64(4): 263-268.
13. Dill R.E. and Iacopino A. M. Myofibroblasts in pfenitoin-induced hyperplastic connective tissue in the rat and in human gingival overgrowth. *J of Periodontol* 1997;68(4):375-380.

14. Ellis J. S. , Seymour R. A., Thomason J. M. et al. Gingival sequestration of amlodipine and amlodipine - induced gingival overgrowth. *Lancet* 1993; 341: 1102-1103.
15. 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; 43:419-424.
16. Friskopp J, Klintmalm G. Gingival enlargement : a comparison between cyclosporine and azathioprine treated renal allograft recipients. *Swed Dent J* 1986; 10 :85-92.
17. Iacopino AM, Doxey D, Cutler C, Nares S, Stoeber K, et al. Phenytoin and Cyclosporine A specifically regulate macrophage phenotype and expression of platelet-derived growth factor and interleukin-1 in vitro and in vivo: possible molecular mechanism of drug-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol* 1997; 68:73-83.
18. James J.A., Irwin C. R., Linden G. J. Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor-  $\beta$ 1. *Transplantation* 1998; 65:724. *J. Periodontol.* 1995; 66:339-344.
19. 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.
20. Kawai T. and Akira S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* 2006;13(5):816-825.
21. Khoori A, Einollahi B, Ansari G, Moozeh M. The effect of cyclosporine with and without nifedipine on gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Can Dent Assoc* 2003; 69(4) : 236-
22. Miayzaki H. Association between phenytoin-induced gingival hyperplasia and periodontopathic bacteria in institutionalized patients with severe motor and intellectual disabilities. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 2010;77(2):140-148.
23. 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.
24. MacGaw T., Porter H. Cyclosporine - induced gingival overgrowth: An ultrastructural stereologic study. *Oral Surg* 1988; (65);2: 186-190.
25. Nurmenniemi P.K., Pernu H. E., Knuutila L. E. Mitotic activity of keratinocytes in nifedipine - and immunosuppressive medication - induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001; 72: 167-173.
26. Oringer RJ, Rees TD, Blieden T, Damoulis P, Florellini J, Giannobele W et al. Modulation of the host response in periodontal therapy . *J Periodontol* 2002; 73 : 460 - 470.
27. O' Valle F., Mesa FL., Gomez - Morales M., Aguilar D., et al. Immunochemical study of 30 cases of cyclosporin A - induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994; 65: 724-730.
28. Radwan-Oczko M, Boratynska M, Klinger M, Zietek M. Risk factors of gingival overgrowth in kidney transplant recipients treated with cyclosporine A . *Ann Transplant* 2003;8(4):57-62.
29. Scincaglia G. P., Forniti F., Cavallini R, Piva R, Calura G, del Senno L. Cyclosporine A increased type procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Oral Pathol. Med.* 1992; 21:181-185.
30. Tripton DA, Stricklin GP, Dabbous MK. Fibroblast heterogeneity of collagenolytic response to cyclosporine. *J Cell Biochem* 1991 : 46: 152-165.
31. Takada K, Sugiyama H, Umezawa K, Mega J, and Hirsawa M. The subgingival microflora in phenytoin-induced gingival hyperplasia. *J of Periodontal Research* 2003 ;38(5):477-481.
32. Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004 ; 15(3): 165-175.
33. Uzel MI, Kantarci A, Hong HH, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, et al. Connective tissue growth factor in phenytoin- induced gingival overgrowth. *J Periodontol* 2001; 72:921-931.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Zebrowski EJ, Pylpas SP, Odlum O, Johnson RB. Comparative metabolism of H<sup>3</sup>- glucosamine by fibroblast populations exposed to cyclosporine. *J Periodontol* 1994;65:565-567.