

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAKROLİMUSUN TEK BAŞINA VEYA NİFEDİPİN
İLE BİRLİKTE KULLANIMININ DİŞETİ DOKUSU
ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ferda PAMUK

**Samsun
Kasım-2011**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TAKROLİMUSUN TEK BAŞINA VEYA
NİFEDİPİN İLE BİRLİKTE KULLANIMININ
DİŞETİ DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ferda PAMUK

Danışman:

Doç.Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA

Samsun

Kasım-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Periodontoloji Programı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç.Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

Üye: Prof.Dr. Nuro! ARIK,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

Üye: Prof.Dr. Bahar KURU,
Marmara Üniversitesi, İstanbul

Üye: Prof. Dr.Gökhan AÇIKGÖZ,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

Üye:Yrd. Doç.Dr. Bülent AYAS,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

Tezin adı: Takrolimusun Tek Başına Veya Nifedipin İle Birlikte Kullanımının
Dişeti Dokusu Üzerine Etkisi

Tezi teslim eden: Ferda PAMUK

Tez savunma sınav tarihi: 26.12.2011

Danışmanı: Doç.Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr.Süleyman KAPLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, daima beni destekleyen ve tez çalışmamda büyük emeği geçen sayın hocam Doç.Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA'ya,

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve tezimi gerçekleştirmemde büyük emekleri olan sayın hocam Prof.Dr. Nurol ARIK'a,

Tez çalışmam esnasında değerli fikirlerinden yararlandığım ve yardımlarını gördüğüm tez komite hocalarım Prof.Dr. Gökhan AÇIKGÖZ ve Prof. Dr. Adnan KORKMAZ'a,

Beni bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan ve her zaman destekleyen sayın hocam Doç.Dr. Gonca ÇAYIR KELEŞ'e,

Doktora eğitimim boyunca beni akademik çalışmalarında destekleyen hocalarım Doç.Dr Umur SAKALLIOĞLU, Doç.Dr Eser SAKALLIOĞLU, Yrd.Doç.Dr. Müge LÜTFİOĞLU'na,

Stereolojik analizleri gerçekleştiren, bilgisini ve zamanını esirgemeyen sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Bülent AYAS'a,

Histopatolojik verilerin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof.Dr.Yavuz GÜLBAHAR'a

Tezimde kullandığım verilerin istatistiksel analizlerini yapan Prof.Dr. Yüksel BEK ve Prof.Dr. Mehmet ÇETİNKAYA'ya,

Çalışmam süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan arkadaşım Yrd.Doç.Dr. Burcu BAŞ'a,

Çalışmam boyunca gösterdikleri anlayış ve yardımları için Periodontoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarım ve asistan arkadaşlarıma, beni daima destekleyen aileme,

Ve tezimde emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi tarafından desteklenmiştir (PYO.DIS.1904.09.008).

ÖZET**TAKROLİMUSUN TEK BAŞINA VEYA NİFEDİPİN İLE BİRLİKTE
KULLANIMININ DİŞETİ DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ****Dt. Ferda PAMUK, Doktora Tezi****Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Kasım 2011**

Çalışmamızın amacı; takrolimus ve nifedipinin tek başına veya kombine kullanımının kısa dönem ve uzun dönemde neden olduğu dişeti değişikliklerinin makroskopik, histopatolojik ve stereolojik yöntemler kullanılarak karşılaştırılması ve hücre proliferasyonunu inhibe eden, sellüler apoptozisi indükleyen bir protein olan Fosfotaz ve tensin (PTEN), 10. kromozomdan silinmiş homolog, ekspresyonunun ilaca bağlı dişeti büyümesindeki rolünün immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

80 adet erkek Sprague-Dawley rat, 8 eşit gruba ayrıldı; 1. grup: 8 hafta takrolimus, 2. grup: 8 hafta nifedipin, 3. grup: 8 hafta takrolimus ve nifedipin, 4. grup: 8 hafta distile su, 5. grup: 24 hafta takrolimus, 6. grup: 24 hafta nifedipin, 7. grup: 24 hafta takrolimus ve nifedipin ve 8. grup: 24 hafta distile su. Histomorfometrik incelemeler kapsamında epitel kalınlığı, bağ dokusunun kalınlığı ve yüksekliği, stereolojik incelemeler kapsamında, fibroblast hacim yoğunluğu, kollajen hacim yoğunluğu ve kan damarlarının hacim yoğunluğu hesaplandı. İmmünohistokimyasal inceleme kapsamında ise PTEN ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirildi.

5. 6. ve 7.gruplarda epitel kalınlığı ve bağ dokusu genişliğinin sırasıyla kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı ($P<0,05$; $P<0,001$). Bağ dokusu yüksekliğinin ise 5. ve 7. grupta istatistiksel anlamlı artış olduğu saptandı ($P<0,001$). Fibroblast hacim yoğunluğu ve kollajen hacim yoğunluğunun 7.grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak fazla olduğu bulundu ($P<0,001$). PTEN immunreaktivitesinin ise ilaç uygulanan deney gruplarının tümünde (1.,2.,3.,5.,6.,7.grup) kontrol gruplarına (4.ve8.grup) göre istatistiksel anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$).

Çalışmamızın bulguları, ilaç kullanım süresinin kombine ilaç kullanımına göre dişeti büyümesi şiddetini etkileyen daha önemli bir faktör olduğunu ayrıca PTEN'nin dişeti büyümesi patogeneğinde rol oynadığını düşündürmektedir.

ABSTRACT
THE EFFECTS OF TACROLIMUS ON THE GINGIVAL TISSUES
ALONE OR IN COMBINATION WITH NIFEDIPINE

Dt. Ferda PAMUK, Ph.D. Thesis

University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Kasım 2011

The aim of this study is to compare the gingival changes induced by short term and long term tacrolimus and nifedipine administration alone or in combination, using macroscopic, histopathologic and stereological methods and to evaluate immunohistochemically the role of PTEN expression, a protein that inhibit cell proliferation and induces cellular apoptosis, in drug-induced gingival overgrowth.

Eighty Sprague-Dawley male rats were equally divided into eight groups as; group 1: tacrolimus 8 weeks, group 2: nifedipine 8 weeks, group 3: tacrolimus and nifedipin 8 weeks, group 4: distilled water 8 weeks, group 5: tacrolimus 24 weeks, group 6: nifedipin 24 weeks, group 7: tacrolimus and nifedipin 24 weeks, group 8: distilled water 24 weeks. Histomorphometric analysis included the measurements of epithelial thickness, connective tissue thickness and height and stereological analysis included the measurements of volumetric densities of fibroblasts, collagen fibers and vessels. In addition, phosphatase and tensin (PTEN) expression was determined immunohistochemically.

Epithelial thickness and connective tissue thickness respectively was statistically significantly increased in groups 5, 6 and 7 compared to group 8 ($P<0,05$) while connective tissue height was significantly increased in group 5, 7 ($P<0,001$). Volumetric densities of fibroblasts and collagen fibers was significantly increased in group 7 compared to control group ($P<0,001$). PTEN immunoreactivity was significantly decreased in all experimental groups (groups 1,2,3,5,6,7) compared to the control group (groups 4 and 8) ($p<0.05$).

The results of our study suggest that duration of drug administration seems to be a more important factor which affect the severity of gingival overgrowth compared to the combined drug treatment and PTEN might play a role in the pathogenesis of gingival overgrowth.

SİMGELER VE KISALTMALAR

PTEN: Fosfotaz ve tensin 10. kromozomdan silinmiş homolog

DNA: Deoksiribonükleik asit

IL: İnterlökin

KKB: Kalsiyum kanal blokörü

İV: İntravenöz

NFAT: Aktive edilen T hücrelerinin nükleer faktörü

TBF-β1: Transforme edici büyüme faktörü-β1

FDA: Food and Drug Administration

MMF: Mikofenolat mofetil

SBP: Sistolik kan basıncı

ATPaz: Adenozin trifosfataz

ATP: Adenozin trifosfat

HLA: Human lökosit antijen

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

FH: Fibroblast hacmi

KFH: Kollajen fibrillerin hacmi

KDH: Kan damarlarının hacmi

HE: Hematoksilen-eosin

PBS: Fosfat buffer solüsyonu

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ÖZET (İNGİLİZCE)	v
SİMGELER KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Dişeti Büyümesi ve Dişeti Büyümesine Neden Olan İlaçlar	6
2.2. Takrolimusa Bağlı Dişeti Büyümesi	10
2.2.1. Takrolimus'un Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	11
2.2.2. Takrolimus'un Klinik Kullanım ve Yan Etkileri	13
2.3. Nifedipine Bağlı Dişeti Büyümesi	15
2.3.1. Nifedipin'in Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	15
2.3.2. Nifedipin'in Klinik Kullanım ve Yan Etkileri	17
2.4. Takrolimus ve Nifedipine Bağlı Dişeti Büyümesini Etkileyen Risk Faktörleri	18
2.5. Takrolimus ve Nifedipine Bağlı Dişeti Büyümesinde Hücresel ve Moleküler Değişiklikler	23
3. MATERYAL METOD	29
3.1. Deney Protokolü	29
3.2. Deney Grupları	29
3.3. Histopatolojik ve Histomorfometrik İnceleme	30
3.4. Stereolojik İnceleme	31
3.5. İmmünohistokimyasal İnceleme	34
3.6. İstatistiksel İnceleme	34
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	83
8.1. Ek 1	83
9. ÖZGEÇMİŞ	84

1.GİRİŞ

Dişeti, periodontal ligament, alveol kemiği ve sementten oluşan, dişleri çevreleyen ve destekleyen dokular periodonsiyumu oluşturmaktadır. Yaka tarzında diş çevreleyen dişetin ana görevi, daha derin periodontal dokuları korumaktır.

Dişeti hastalıkları içerisinde önemli bir yer tutan dişeti büyümeleri, çeşitli ilaçların yan etkisi olarak da karşımıza çıkmaktadır. Dişeti büyümesine neden olan birçok ilaç vardır; bu ilaçlar terapötik etkilerine göre antikonvülsanlar, kalsiyum kanal blokerleri ve immüsupresif ilaçlar olarak 3 ana gruba ayrılır (Marshall ve Bartold, 1999). İmmüsupresif bir ilaç olan takrolimus ve kalsiyum kanal blokeri olan nifedipin bu ilaçlardan bazılarıdır. Nifedipine bağlı dişeti büyümesi ilk olarak 1984 yılında Lederman ve ark. (1984) tarafından, takrolimusa bağlı dişeti büyümesi ise Adams ve Famili (1991) tarafından rapor edilmiştir. İlaça bağlı dişeti büyümesi ile ilgili yapılan klinik ve deneysel çalışmalara rağmen takrolimusun tek başına veya nifedipin ile birlikte kullanımının meydana getirdiği dişeti büyümesinin etyopatogenezinde aydınlatılması gereken birçok nokta bulunmaktadır.

Yapılan çok sayıda klinik çalışma sonuçlarının; bireysel farklılıklar, buna bağlı ilaç metabolizması ve doku cevabında değişiklikler göstermesi nedeniyle çelişkili olması araştırmacıları deneysel çalışmalara yöneltmiştir(Rost ve Baker, 1978; Hall ve Squier, 1982; Carrel ve ark., 1983; Latimer ve ark., 1985; do Nascimento ve ark., 1985; Seibel ve ark., 1989; Kitamura ve ark., 1990; Nyska ve ark., 1990; Fu ve ark., 1995; Nieh ve ark., 1996; Prabhu ve Mehta, 2006). Literatürde; fenitoin, oksodipin, siklosporin gibi ilaçların dişeti dokusundaki etkilerini çalışmak için kedi, köpek, dağ gelinciği, kobay ve sıçan gibi çeşitli hayvan modelleri kullanılmıştır (Rost ve Baker, 1978; Hall ve Squier, 1982; Carrel ve ark., 1983; Latimer ve ark., 1985; do Nascimento ve ark., 1985; Seibel ve ark., 1989; Kitamura ve ark., 1990; Nyska ve ark., 1990; Fu ve ark., 1995; Nieh ve ark., 1996; Prabhu ve Mehta, 2006). Sıçanlar, küçük olması, pahalı olmaması ve manüplasyonunun kolay olması nedeniyle deneysel çalışmalarda en fazla tercih edilen hayvan modelleridir. Sıçan modeli kullanımı; genetik predispozisyon, doz ve ilaç uygulama yolları gibi bazı önemli değişkenlerin kontrolüne olanak sağlamaktadır. Ayrıca, sıçanlardaki ilaca cevap, insanlar ile karşılaştırıldığında daha uniformdur (Nassar ve ark., 2008).

İlaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen birçok risk faktörü vardır. Bunlar; yaş, cinsiyet, genetik predispozisyon gibi bireysel faktörler, ilaç dozu, serum konsantrasyonu, kullanım süresi gibi farmakolojik faktörler ve mikrobiyal dental plak birikimi, dişeti inflamasyonu gibi periodontal faktörlerdir. Bu faktörlerin dişeti büyümesi patogenezindeki rolü ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları çelişkili olup bu konuda halen kesin bir fikir birliği sağlanamamıştır (Çetinkaya ve ark., 2006).

İlacın kullanım süresi, dişeti büyümesi patogenezinde rol oynadığı bilinen önemli bir farmakolojik risk faktörüdür. İlaçların dişeti büyümesine neden olabilmesi için belirli bir süre kullanılması gereklidir ve çoęu ilaç için kullanım süresi arttıkça dişeti büyümesi şiddetinin arttığı rapor edilmiştir (Fu ve ark., 1998; Haniastuti ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Brkić, 2004; Sekiguchi ve ark., 2007; Nassar ve ark., 2008).

Kombine ilaç kullanımı da ilaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen diğer bir risk faktörüdür. Böbrek transplantasyon sonrasında, immünsupresif ajanlar ve kalsiyum kanal blokerleri nefrotoksititeyi azaltmak ve sonrasında yüksek kan basıncını tedavi etmek için çoğunlukla bir arada kullanılmaktadır (Van der Schaaf ve ark., 1995; Cezário ve ark., 2008). Transplantasyon yapılan hastalarda nifedipin ve takrolimusun kombine kullanımı, ilaçların tek başına kullanımına göre daha fazla dişeti büyümesine neden olmaktadır (Ellis ve ark., 2004; Wondimu ve ark., 2001; Spolidorio ve ark., 2002; Spolidorio ve ark., 2006; Flynn ve ark., 2006; Costa ve ark., 2006; James ve ark., 2001; McKaig ve ark., 2002; Greenberg ve ark., 2008). Ancak bu çalışmalara karşıt olarak, takrolimus ve kalsiyum kanal blokerlerinin kombine kullanımı ile dişeti büyümesi şiddeti arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını rapor eden çalışmalar da vardır (Lima ve ark., 2008). Bu konuda yapılan çok sayıda klinik çalışmaya rağmen, takrolimus ve nifedipinin kombine kullanımının dişetinde meydana getirdiği değişiklikleri karşılaştıran herhangi bir deneysel çalışma bulunmamaktadır.

Takrolimus ve nifedipine bağlı dişeti büyümesinin histopatolojisi, diğer ilaca bağlı dişeti büyümeleri ile benzerlikler göstermektedir. Histopatolojik olarak bu lezyonları birbirinden ayırmak mümkün değildir. İlaca bağlı dişeti büyümesinin en belirgin histopatolojik özellikleri; değişen kalınlıkta düzensiz çok katlı parakeratinize epitel, subepitelyal bağ dokusu derinliklerine penetre rete pegler ve onlarla ilişkili düzensiz yerleşimli kollajen fibril kümeleridir. Ayrıca, bağ dokuda vaskülarizasyon ve

inflatuar hücre infiltrasyonu izlenmektedir (Rateitschak-Pluss ve ark., 1983; Hallmon ve Rossmann, 1999; Fermin ve ark.,2007). İlaça bağlı dişeti büyümesi görülen bireylerde; daha yüksek oranda hücre proliferasyonu, Deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi ve kollajen sentezi rapor edilmesine rağmen (Fujii ve ark., 1994; Takeuchi,2004; Takeuchi ve ark., 2007) ilaca bağlı dişeti büyümesinde, ilaçların dişeti epitel hücrelerine, fibroblastlar ve kollajen sentezi üzerine etkisi halen tam olarak bilinmemektedir.

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü organizmada denge halinde bulunur. Bu dengenin bozulması ilaca bağlı dişeti büyümesinin patogeneziinde önemli rol oynar. İlaça bağlı dişeti büyümesinde çeşitli proliferasyon belirleyicilerinin rolü araştırılmıştır (Saito ve ark., 1999; Çetinkaya ve ark., 2006; Bulut ve ark., 2006) ve bu lezyonlarda bu belirleyicilerin seviyelerinin arttığı saptanmıştır. İlaça bağlı dişeti büyümesinin patogeneziinde hücre proliferasyonunun artışından çok hücre ölümünün azalmasının önemli rol oynadığını rapor eden araştırmacılar da vardır (Niimi ve ark., 1990; Shimizu ve ark., 2002). Hücre ölümü (apoptozis), doku büyümesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Bhathal ve Gall, 1985; Wyllie, 1992; Shimizu ve ark., 2002). Apoptozisin baskılanması dişeti dokusunda büyümeye neden olabilmektedir (Nishikawa ve ark., 1996; Shimizu ve ark., 2002). Nitekim azalmış apoptozisin hücre proliferasyonu ile birleştiğinde dişeti büyümesinin birçok formunda etkili olabileceği rapor edilmiştir (Kantarci ve ark., 2007; Jung ve ark., 2009).

PTEN, fizyolojik bir substrat olarak fosfatidilinositol-3-4-5 trifosfatı kullanan çift yönlü özgünlüğü olan bir protein ve lipid fosfotazdır (Maehama ve Dixon, 1998; White ve ark., 2006). İlk olarak malign hastalıklarda rol aldığı gösterilmiş olmasına rağmen, daha sonraki yıllarda PTEN ekspresyonu veya aktivitesinin; romatoid artrit, astım ve pulmoner fibrozis gibi doku yıkımı ve yeniden yapılanması ile karakterize olan malign olmayan hastalıkların patogeneziyle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Pap ve ark., 2000; Kwak ve ark., 2003; White ve ark., 2003; 2006). PTEN; lipid fosfataz aktivitesi sayesinde hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve hücre büyümesini inhibe eden, sellüler apoptozisi başlatan bir proteindir (Stambolic ve ark., 1998; Tamura ve ark., 1998; 1999; White ve ark., 2006; Nho ve ark., 2006). Yaptığımız literatür incelemesinde ilaca bağlı dişeti büyümesinde PTEN'in rolünü inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Epitel ve/veya bağ dokusunda PTEN'in hücre proliferasyonu

ve apoptozis arasındaki denge üzerine etki ederek dişeti büyümesi patogeneğinde rol oynayabileceği bu çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır.

Bu deneysel çalışmanın amacı; takrolimus ve nifedipinin tek başına veya kombine kullanımının kısa dönem ve uzun dönemde neden olduğu dişeti değişiklerinin makroskopik, histomorfometrik ve stereolojik yöntemler kullanılarak karşılaştırılması ve hücre proliferasyonunu inhibe eden, sellüler apoptozisi indükleyen bir protein olan PTEN ekspresyonunun dişeti büyümesindeki rolünün immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

Periodonsiyum; dişeti, periodontal ligament, kök yüzeylerini kaplayan sement ve alveol kemiği gibi dişleri destekleyen dokulardan oluşmaktadır. Periodontal dokular; yerleşimleri, doku özellikleri, hücresel ve kimyasal kompozisyonları açısından farklı olmalarına rağmen, tek bir ünite gibi birlikte görev yaparak dişlere destek sağlarlar (Bartold ve ark., 2000).

Ağız mukozasının bir bölümü olan dişeti, dişlerin alveol çıkıntılarını ve boyun kısımlarını çevreler. Dişeti, anatomik özelliklerine göre serbest dişeti, yapışık dişeti ve interdental dişeti olmak üzere üç bölüme ayrılır. Serbest dişeti, dişleri bir yaka gibi saran ancak diş ile bağlantısı olmayan dişetin servikal bölümüdür. Yapışık dişeti, serbest dişeti olduğundan başlayarak mukogingival birleşime kadar uzanan alveol kemiğinin periostuna sıkıca tutunan bölümdür. İnterdental dişeti ise, dişlerin kontakt noktalarının altındaki alanı dolduran dişeti bölümüdür (Fiorellini ve ark., 2007).

Dişeti, merkezde bağ dokusu ve onu çevreleyen çok katlı yassı epitelden oluşur. Epitel dokusu, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre; oral epitel, sulkuler epitel ve birleşim epiteli olmak üzere üç bölüme ayrılır. Dişeti epitelinin temel hücreleri keratinositler olup, keratinosit olmayan hücreler (Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri, melanositler ve enflamatuvar hücreler) de bulunur. Epitelin en önemli fonksiyonu diş bir yaka tarzında çevrelemek ve daha derin periodontal dokuları korumaktır. Bu durum keratinositlerin proliferasyonu ve farklılaşması ile sağlanır. Epitelin bazal tabakasında keratinositler mitozla proliferer olur. Suprabazal tabakalarda ise mitoz nadir görülür. Prolifere olan hücreler çoğunlukla daha üst tabakalara göç ederken, çok az bir kısmı proliferer olduğu yerde kalır. Farklılaşma ise keratinizasyon adı verilen ve bazal tabakadan göç eden hücrelerde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik olaylar zinciridir (Fiorellini ve ark., 2007).

Oral epitel, serbest dişeti ile yapışık dişeti yüzeyini kaplayan keratinize epiteldir. Sulkuler epitel, serbest dişeti kenarından birleşim epiteline kadar uzanan ve gingival sulkusun yumuşak duvarını örten, keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Morfolojik ve kimyasal özelliklerine rağmen, eğer oral kaviteye açılırsa veya sulkustaki bütün bakteriler elimine edilirse sulkuler epitelin keratinize olabilme potansiyeli vardır. Bunun aksine oral epitel, eğer dişle temas ederse keratinize olma özelliğini kaybeder. Sonuç olarak sulkustaki lokal irritasyon sulkus keratinizasyonunu engellemektedir.

Birleşim epiteli gingival sulkusun tabanından apikale doğru kısa bir mesafede uzanan keratinize olmayan çok katlı yassı epitelidir. Birleşim epitelinin dış yüzeyine yapışmasına dişeti fibrilleri destek olmaktadır (Fiorellini ve ark., 2007).

Dişeti epitelinin birçok önemli savunma fonksiyonu vardır (Bartold ve ark., 2000). Epitel hücreleri periodontal dokuda çoğunlukla metabolik olarak aktiftirler ve sitokin, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve enzimleri sentezleyerek eksternal uyarılara cevap verirler (Fiorellini ve ark., 2007). Mikrobiyal dental biofilmin yerleşimini takiben epitel hücreleri; nötrofil toplanması ve göçü ile ilgili olan interlökin (IL)-1 beta , IL-8 gibi sitokinleri ve intersellüler adezyon molekülü-1 gibi adezyon moleküllerini sentezleyerek periodontal patojenlere karşı konak doku cevabının başlatılması ve düzenlenmesinde görev alırlar (Miyasaki ve ark., 1997).

Dişeti, bağ dokusu ana hücreleri, fibriller, damarlar, sinirler ve hücrelerarası matriksten oluşmaktadır. Bağ dokusunun esas fibrilleri kollajen fibrillerdir. Kollajen fibrillerin yanı sıra retiküler ve elastik fibrillerin de olduğu bilinmektedir. Elastik lif sistemi, kollajen lifler arasına dağılan oksitalan, elanin ve elaunin liflerden oluşmuştur. Dişeti bağ dokusunun ana hücre tipi fibroblastlar olup; mast hücreleri, savunma hücreleri, osteoblast ve osteoklastlar, sementoblast ve sementoklastlar da bağ dokuda yer alan hücrelerdir (Fiorellini ve ark., 2007).

2.1. DİŞETİ BÜYÜMESİ VE DİŞETİ BÜYÜMESİNE NEDEN OLAN İLAÇLAR

Dişeti hastalıkları, dişetini etkileyen farklı hastalıkların daha kapsamlı bir tanımıdır. Gingivitis tek bir hastalığı temsil etmemektedir. Mikroorganizmaların neden olduğu dişeti inflamasyonu gingivitisin en yaygın formudur. Ancak; dişetini etkileyen atrofi, dişeti büyümesi ve neoplaziler de gingivitis olarak kabul edilmektedir (Mariotti, 1999).

1999 Dünya Periodontoloji Çalıştayı'nın yaptığı sınıflamaya göre dişeti büyümeleri, dişeti hastalıkları arasında yer almaktadır (Armitage, 1999). Dişeti büyümeleri; diş-dişeti ilişkisinin bozulmasına yol açan, estetik fonksiyonel problemler yaratan ve ağız hijyenini zorlaştıran lezyonlardır. Dişeti hacmindeki artış dişeti hastalığının genel bir özelliğidir. Bu durum için kabul edilen terminoloji "dişeti büyümesidir". Bu terim klinik olarak tanımlayıcıdır ve geçmişte kullanılan "gingival hiperplazi" veya "gingival hipertrofi" gibi terimlerin yanlış patolojik tanımlamalarını

önlmektedir (Carranza ve Hogan, 2007). Dişeti büyümesini bağ dokusunda genişlemiş oval veziküloid çekirdeklerin görüldüğü fibroblast sayısında artış ile karakterize bir çeşit fibroplazi olarak tarif eden araştırmacılar da vardır (Wysocki ve ark.,1983; Seymour ve Jacops, 1992). Ancak; fibroblastların sayıca artmadığını, normal dişeti ile benzer fibroblast ve ekstrasellüler kollajen varlığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Rostock ve ark., 1986; McGaw ve Porter, 1988). Her ne kadar fibroepitelyal hiperplazi olarak tarif edilse de bu lezyonlarda ne epitelde ne de bağ dokusunda hücre proliferasyonu tam olarak gösterilememiştir. Bu nedenle kullanılan hiperplazi ya da hipertrofi terimleri bu lezyonları tarif etmekte yetersiz kalmaktadır.

Dişeti büyümeleri etyolojik faktörler ve patolojik değişikliklere göre

(Carranza ve Hogan, 2007)

I. İnflamatuar Dişeti Büyümleri

A- Akut

B- Kronik

II. İlaç Kullanımına Bağlı Dişeti Büyümleri

A- Antikonvülsanlar

B- İmmünsüpresanlar

C- Kalsiyum Kanal Blokerleri (KKB)

III. Sistemik Hastalıklarla İlişkili Dişeti Büyümleri

A- Dişeti Büyümesine Neden Olan Durumlar

- Hamilelik
- Puberte
- C Vitamini Eksikliği
- Plazma Hücreli Gingivitis
- Nonspesifik Durumlara Bağlı Dişeti Büyümleri (Pyojenik Granülom)

B-Dişeti Büyümlerine Neden Olan Sistemik Hastalıklar

- Lösemi
- Granülamatöz Hastalıklar (Wegener's Granulomatosis, Sarkoidozis)

IV. Neoplastik Dişeti Büyümleri (Gingival Tümörler)

A-Benign Tümörler

B-Malign Tümörler

V. Yalancı Dişeti Büyümeleri

Dişeti büyümeleri yerleşim ve dağılım şekillerine göre (Carranza ve Hogan, 2007)

Lokalize: Tek diş veya bir grup diş ait dişeti büyümesi

Generalize: Bütün ağızda görülen dişeti büyümesi

Marjinal: Marjinal dişetinde görülen dişeti büyümesi

Papiller: İnterdental papillerde görülen dişeti büyümesi

Diffüz: Marjinal dişeti, yapışık dişeti ve papillerde görülen dişeti büyümesi

Ayrık: Saplı veya sapsız izole edilebilen tümör benzeri dişeti büyümesi

Dişeti büyümeleri şiddetine göre (Carranza ve Hogan, 2007)

Sınıf 0: Dişeti büyümesi belirtileri yoktur.

Sınıf 1: Dişeti büyümesi interdental papilde görülür.

Sınıf 2: Dişeti büyümesi papilla ve marjinal dişetinde görülür.

Sınıf 3:Dişeti büyümesi kronunu üçte birini veya daha fazlasını içerir

İlaç kullanımına bağlı dişeti büyümesi, fibrotik dişeti büyümesi ana başlığı altında incelenir. İlaça bağlı dişeti büyümesi dişetin hedef organ olmadığı tedavilerde kullanılan ilaçların yan etkisi olarak karşımıza çıkar. İlk rapor edilen olgudan sonra (Kimball ve ark., 1939), yaklaşık 70 senedir dişeti büyümesi ile ilgili araştırma yapılmaktadır. Sayıları gittikçe artan bir çok ilaç dişetinde büyümeye neden olmaktadır. Dişeti büyümesi ile ilgili ilaçlar terapötik etkilerine göre antikonvülsanlar, KKB'leri ve immüsupresif ilaçlar olarak 3 ana gruba ayrılır (Marshall ve Bartold, 1999).

İlaç kullanımını takiben ilk altı ayda dişeti büyümesi önce interdental papillerde küçük değişiklikler şeklinde başlar ve ileri dönemlerde dişin vestibüler yüzü ile ilişkili olarak diş kronunun tamamını kaplayacak boyuta ulaşabilir (Thomason ve ark., 2005; Lima ve ark., 2008). Bu lezyonlar ağızdaki bütün bölgeleri etkileyebilir fakat anterior bölgede papiller arasında ve vestibül yüzeylerde daha sık görülür (Rateitschak-Plüss ve ark., 1983; Adams ve Davies, 1984; Hallmon ve Rossmann, 1999; Thomason ve ark. 2005; Sekiguchi ve ark., 2007). Dişsiz bölgelerde ise dişeti

büyümesi görülmez (Lucas ve ark., 1985; Boltchi ve ark., 1999; Hallmon ve Rossmann, 1999). Ancak nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinin dental implantlar çevresinde de olduğu rapor edilmiştir (Hallmon ve Rossmann, 1999). Dişeti büyümesinin ileri evrelerinde oklüzyon engellenebilir, beslenme yetersizliği, çiğneme ve konuşma bozuklukları, estetik ve psikolojik problemler oluşabilir. Çocuklarda görüldüğünde ise dişlenmede kronolojik değişikliklere neden olabilir (Hallmon ve Rossmann, 1999; James ve ark., 2000; Sekiguchi ve ark., 2007; Lima ve ark., 2008). Dişeti büyümesi oral hijyeni olumsuz etkilediğinden, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi fokal oral infeksiyon gelişimine de yol açabilir (Seymour ve ark., 1987; Lima ve ark., 2008).

İlaça bağlı dişeti büyümesi literatürde ilk olarak Kimball (1939) tarafından fenitoin kullanımına bağlı olarak rapor edilmiştir. Aynı yan etkiye sahip olduğu bilinen diğer antikonvülsan ilaçlar; etoin (Paganone), mefenitoin (Mesantoin), suksinamidler (Zerontin), metsuksinamidler (Celontin) ve valproik asit (Depakenel)'dir. Fenitoin, ilk olarak 1938 yılında antiepileptik ilaç olarak kullanılmış ve halen epilepsi tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmaya devam etmektedir. Özellikle grand mal, temporal lob ve psikomotor nöbetlerin tedavisinde, ayrıca bazı nevralsi formları ve kardiyak aritmilerin tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardan biridir. Fenitoin, antikonvülsan ilaçlar içinde en fazla dişeti büyümesine neden olan ilaçtır. Yapılan çalışmalarda fenitoin kullananların %3–84.5'inde dişeti büyümesi geliştiği rapor edilmekle birlikte (Glickman ve Lewitus, 1941; Panuska ve ark., 1961; Angelopoulos ve Goaz, 1972), bu oran ortalama olarak %50'dir (Seymour ve ark., 1996). Diğer bir antikonvülsan ilaç olan sodyum valproat kullanımına bağlı rapor edilen dişeti büyümesi olguları büyük oranda çocuk hastalardır. Fenobarbitona bağlı büyüme ise, interdental papilde lobüler görüntü olmaksızın düzgün yüzeye sahip büyümeler şeklindedir ve diğer ilaca bağlı dişeti büyümelerinin aksine anterior bölgeden çok posterior bölgede izlenir. Histolojik ve klinik görünümü herediter gingival fibromatozise benzer, ancak bu olgularda ailesel öykü mevcut değildir. Diğer bir antiepileptik ilaç olan vigabatrin, gamma-aminobütirik asit için selektif ve irreversibl bir inhibitördür (Marshall ve Bartold, 1999).

İmmünespresif ilaçlar, immün sistemin çeşitli bileşenleri üzerinde seçici inhibisyon yaparlar (Seymour ve Heasman, 1988). İmmünespresif ilaçlardan siklosporin, organ naklinden sonra doku reddini önlemek amacıyla en sık kullanılan

ajandır (Spolidorio ve ark., 2006). Ayrıca ilaç; romatoid artrit, psöriasis, nefrotik sendrom gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Spolidorio ve ark., 2005; 2006). Genel olarak nefrotoksisite, hepatotoksisite, hipertansiyon ve nörotoksisite gibi yan etkileri görülmekle birlikte, siklosporinin ağız içinde en önemli yan etkisi dişeti büyümesidir (Spolidorio ve ark., 2006). Siklosporine bağlı dişeti büyümesi, ilk kez Rateitschak-Pluss ve ark. (1983) tarafından rapor edilmiştir. Önce karaciğer transplantasyonunda ve daha sonra böbrek transplantasyonunda kullanılan, hasta ve greft sağ kalımı sağlayan, siklosporine alternatif diğer immünsupresif ajan ise takrolimustur.

2.2. TAKROLİMUSA BAĞLI DİŞETİ BÜYÜMESİ

Takrolimus 1984 yılında Tsukuba'da bulunan ve 1989'da ilk kez kullanılan yeni bir immünsupresif ajandır. İlk olarak solid organ transplantasyonunda alıcılarda doku reddini önlemek için klinik deneylerde kullanılmıştır. Nefrotoksisite, nörotoksisite ve glukoz metabolizma hastalıkları gibi ortak yan etkileri olmakla beraber; takrolimusun, siklosporinden farklı olarak dişeti büyümesine neden olup olmadığı veya daha az oranda neden olduğu tartışmalı bir konudur (Spolidorio ve ark., 2005; Nassar ve ark., 2008).

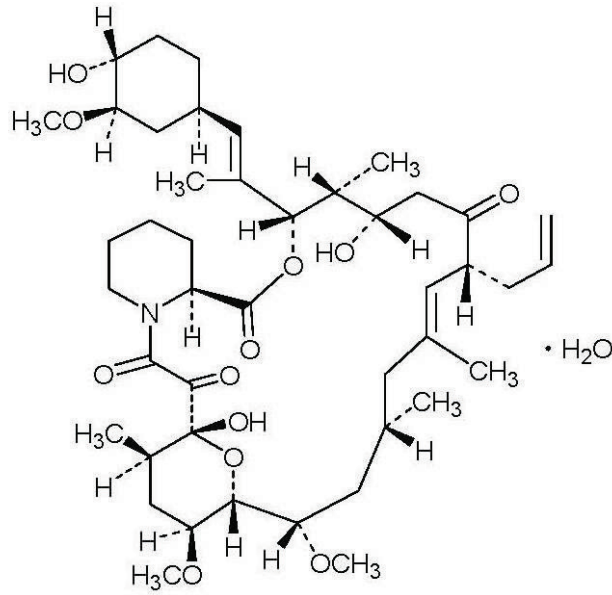
Dental literatürde, takrolimusa bağlı dişeti büyümesi ilk olarak Adams ve Famili (1991) tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda takrolimusun dişeti büyümesine neden olmadığı (James ve ark., 2001; Spolidorio ve ark., 2005) veya siklosporine oranla daha az büyümeye neden olduğu bildirilmiştir (Ellis ve ark., 2004; Prabhu ve Mehta, 2006). Siklosporin kullanımı takrolimus ile değiştirildiğinde dişeti büyümesinin hızla azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. (Bader ve ark., 1998; Hernandez ve ark., 2000; Prabhu ve Mehta, 2006).

Takrolimusa bağlı oluşan dişeti büyümesinin prevalansına yönelik çalışmalar sınırlıdır. Büyüme ve şiddeti değerlendirmek için kullanılan yöntemler çalışmaya göre farklılık göstermesine rağmen sonuçları genelde birbirine yakındır (James ve ark., 2001, Oettinger-Barak ve ark., 2001, Wondimu ve ark., 2001; Ellis ve ark., 2004; Sekiguchi ve ark., 2007). Değişik oranlar verilmekle birlikte kontrollü klinik çalışmalarda dişeti büyümesi insidansı ortalama %10-15 arasında rapor edilmektedir (Ellis ve ark., 2004; Sekiguchi ve ark., 2007). Araştırmalarda varılan ortak nokta, takrolimus kullananlarda

dişeti büyümesi insidansının ve şiddetinin siklosporinden daha az olduğudur (Ellis ve ark., 2004).

2.2.1. Takrolimus'un Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Streptomyces tsukubaensis mikrobiyal besi ortamından izole edilen bir makrolid antibiyotik olan takrolimus, $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ kimyasal formülüne sahiptir ve molekül ağırlığı 822.03'tür. İlaç beyaz kristaller veya kristalin tozu olarak bulunur ve pratik olarak suda çözülmez. Etanol, metanol ve kloroformda ise serbestçe çözülür (Kino ve ark., 1987; Prabhu ve Mehta, 2006).



Şekil-1. Takrolimusun kimyasal yapısı (Iwasaki, 2007)

Takrolimusun gastrointestinal sistemden emilimi, safra tuzlarına bağımlı değildir. Etkinliğinin ve emiliminin göreceli olması sebebiyle nadiren intravenöz (iv) kullanımı gerekebilir. Özellikle gastrointestinal bozukluğu olan hastalarda oral kullanımda emilimi çok değişkendir ve biyoyararlanımı %25 civarındadır. Katı gıdaların mideden boşalmasının takrolimus kullananlarda siklosporin kullananlara oranla daha hızlı olması nedeniyle gastrik motilite bozukluğu olanlarda takrolimus kullanımının yararlı olduğu düşünülmektedir (Danovitch, 2001).

Takrolimusun yarı ömrü yaklaşık 8 saattir. İlacın gastrointestinal ve karaciğer mikrozomal enzim sisteminde bulunan sitokrom-P450-3A tarafından metabolize

edilmesiyle birçok metabolit ortaya çıkmaktadır. İlacın sitokrom-P450-3A ve p-glikoprotein yolu ile gastrointestinal metabolizması 'ilk geçiş metabolizması' olarak bilinmektedir. Karaciğer, ilaç metabolizması için en önemli yer olarak kabul edilmektedir. İlacın bazı metabolitleri potansiyel olarak immünsupresyon ve nefrotoksik etkiye sahip olabilirler. İlacın çok az bir kısmı böbrek yolu ile olmak üzere genellikle safra yolu ile atılır. Bu sebeple böbrek işlev bozukluklarında ilaç dozunun ayarlanmasına gerek yoktur (Plosker ve Foster, 2000).

Takrolimus da siklosporin gibi bir kalsinörin inhibitörüdür. Kalsinörin inhibitörleri, hücre sitoplazmasında bulunan immünofilin adlı proteinlere bağlanarak hücrel etkilerini gösterirler (Cardenas ve ark., 1994). İlaç diffüzyon ile hücre içine girer ve FK506 bağlayıcı protein-12'ye bağlanır. Oluşan kompleks, normal şartlar altında aktive edilen T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) gibi molekülleri defosforilize eden bir fosfataz olan kalsinörine bağlanır. Defosforilize olan NFAT çekirdeğe girer ve orada IL-2 gibi birçok sitokinin promoter bölgelerine bağlanır (Bierer ve ark., 1990; Tepperman ve ark., 2010). Böylece, kalsinörini bloke eden takrolimus, IL-2 transkripsiyonunu inhibe eder. IL-2 transkripsiyonunu inhibe etmesinin yanı sıra takrolimus, nitrik oksit sentaz aktivasyonu, hücre degranülasyonu ve apoptozis gibi kalsiyum bağımlı olayları da inhibe eder. Takrolimus aynı zamanda mast hücrelerinde hem degranülasyonu hem de IL-3,-5 gibi sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonuna engel olur. Sonuç olarak IL-3,-4,-5, interferon- γ , tümör nekrozis faktör- α ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör gibi diğer sitokinlerin üretimi de azalır (Ruzicka ve ark., 1999; Zabawski ve ark., 2000; Bornhövd ve Burgdorf, 2001; Nghiem ve ark., 2002; Köse ve Açıkgöz, 2003). Glikokortikoid ve progesteron aktivitesi artar ve transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ekspresyonu güçlenir. Siklosporinde olduğu gibi, öncelikli olarak tip 2 yardımcı T hücrelerine göre, Tip 1 T yardımcı hücreleri baskılanır, böylece T hücresi tarafından yönlendirilen toksisite bozulur (Ellis ve ark., 2004). Kalsinörin inhibitörlerinin ana avantajı, diğer hızlı çoğalan hücreleri etkilemeden immün sistem üzerinde seçici etkileri olmasıdır (Reem, 1992; Klee ve ark., 1998; Tepperman ve ark., 2010). Benzer etki mekanizmasına rağmen, takrolimus siklosporinden 100 kat daha fazla immünsupresif kapasiteye sahiptir (Jacobson ve ark., 1998; Ellis ve ark., 2004), primer ve kurtarıcı (rescue) tedavide siklosporine karşı etkili bir alternatif olarak kabul edilir. Hatta primer tedavide takrolimusun, akut ve kronik

karaciğer reddinin önlenmesinde siklosporinden daha etkili olabileceği öne sürülmektedir (Spencer ve ark., 1997; Ellis ve ark., 2004).

2.2.2 Takrolimus'un Klinik Kullanımı ve Yan Etkileri

Takrolimusun kapsül formu ve iv steril solüsyon formu mevcuttur. Kapsül formu, 0.5mg, 1mg ya da 5mg anhidroz takrolimus içermektedir. İnaktif bileşenleri ise laktaz, hidroksi propil metilselüloz, kroskarmeloz sodyum ve magnezyum stearatdır. Steril solüsyon (iv takrolimus enjeksiyonu) ise 1ml'de 5mg anhidroz takrolimus içerir, sadece iv infüzyonla uygulanır. Takrolimus enjeksiyonu 0.09 sodyum klorit enjeksiyonu ya da %5 dekstroz enjeksiyonu ile seyreltilerek kullanılmalıdır (Plosker ve Foster, 2000). Transplantasyonda kullanılan siklosporinin yan etkilerinin ortaya çıkışı ile yaşanan güçlükler sonucunda, daha az toksik fakat daha etkin bir kalsinörin inhibitörünün geliştirilmesi çabalarının ürünü olarak takrolimus kullanıma sunulmuştur (Adalı, 2007).

1987'de ilk in vitro çalışmalar ve deneysel çalışmaların yayınlanmasını takiben, takrolimus organ transplantasyonlarında kullanılmak üzere immünesupresif bir ajan olarak kabul edilmiştir (Kapturczak, 2004; Ellis ve ark., 2004). 1994 yılında ise ilacın karaciğer transplantasyonu sonrası greft reddini önlemek amacıyla kullanımı Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır (Adalı, 2007). Takrolimus bugün allojenik karaciğer, böbrek veya kalp transplantasyonu yapılan hastalarda organ reddinin profilaksisi için endikedir. Takrolimus ayrıca miyastenia gravis, artrit ve atopik dermatit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Iwasaki, 2007). Kalp nakli geçiren hastalarda takrolimusun azatioprin veya mikofenolat mofetil (MMF) ile kullanımı önerilmektedir (Plosker ve Foster, 2000). Son yıllarda ülseratif kolit, atopik dermatit ve egzema tedavisinde topikal olarak da kullanılmaktadır (Hiraoka, 2001; Niwa, 2003). İlaç, takrolimus ve HCO-60 hipersensitivitesi olan hastalarda kontrendikedir (Magee ve ark., 2011).

Takrolimusun diğer tüm immünesupresif ajanlar gibi istenmeyen yan etkileri mevcuttur. Bunlar;

a. Nefrotoksisite: Kalsinörin inhibitörleri nefrotoksisite sendromlarına neden olabilirler. Bunlar; glomerül filtrasyon hızında geri dönüşümlü azalma, akut mikrovasküler hastalık, kronik ilerleyici olmayan glomerül filtrasyon hızıdır. Ayrıca

ilacın hipertansiyon ve elektrolit anormalliklerine de neden olduğu rapor edilmiştir. Bu yan etkiler sodyum tutulumu ve ödem, hiperpotasemi, hipomagnazemi, hiperkloremik asidoz ve hiperürisemi şeklinde görülür. Siklosporin ile karşılaştırıldığında nefrotoksik yan etkileri benzerdir (Magee ve ark., 2011).

b. Gastrointestinal yan etkiler: Siklosporin kullanan hastalarda hafif bilirübin yüksekliği ve orta düzeyde serum aminotransferaz yüksekliği ile karakterize hepatotoksisite izlenmekle birlikte bu durum genellikle önemli klinik sonuçlar yaratmaz. Buna karşın takrolimus daha çok iştahsızlık, bulantı ve kusma, ishal ve karında huzursuzluk hissi yaratır (Magee ve ark., 2011).

c. Kozmetik yan etkiler: Siklosporin kullanan hasta gruplarında daha yaygındır. Özellikle bayanlarda belirgindir. Yüz görünümünde kabalaşma ve hipertrikozis hastanın yaşam kalitesini etkileyebilir. Siklosporin kullanımında daha belirgin olmak üzere dişeti büyümesi cerrahi girişim gerektirebilir. Bu komplikasyon siklosporinden takrolimusa geçiş gerekçesi olabilir (Magee ve ark., 2011).

d. Hiperlipidemi: Siklosporin kullanımı hiperlipidemi gelişimini artırır. Takrolimus kullanımına bağlı bu komplikasyon daha azdır (Magee ve ark., 2011).

e. Hiperglisemi: Takrolimus kullanımında siklosporine göre daha fazladır. Transplantasyondan sonraki dönemde gelişen hiperglisemi varlığında, kortikosteroid dozlarının daha hızlı azaltılması gerçekçi bir yaklaşım olabilir (Magee ve ark., 2011).

f. Nörotoksisite: Doza bağlı titreme, hissizlik, uykusuzluk ve nadiren epileptik ataklar izlenebilir (Magee ve ark., 2011).

g. Hiperürisemi ve gut: Özellikle birlikte diüretik kullanımı var ise sorun olabilir (Magee ve ark., 2011).

h. Oral yan etkiler: Ağız içinde en önemli yan etkisi dişeti büyümesidir (Spolidorio ve ark., 2006). Diğer oral lezyonlar tam olarak açıklanmamıştır. Birçok vaka raporu; takrolimus kullanan bireylerde dişeti büyümesi şiddetinin Siklosporin kullanan bireylerden daha az olduğunu ileri sürmektedir (Spolidorio ve ark., 2006).

i. Diğer: Titreme, baş ağrısı, beyaz kan hücrelerinin sayısının azalması ve enfeksiyon ihtimali vardır (Magee ve ark., 2011).

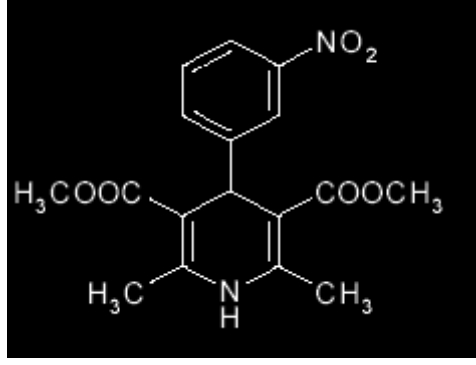
2.3. NİFEDİPİNE BAĞLI DİŞETİ BÜYÜMESİ

KKB'lerinin yaygın kullanımını 1980'li yıllarda başlamıştır. Bu gruptaki ilaçlar değişik kimyasal yapıda olup hepsinin ortak özelliği hücrelere kalsiyum geçişini engellemeleridir (Marshall ve Bartold, 1999). KKB'leri hipertansiyon, koroner arter spazmları, anjina pectoris ve kardiyak aritmiler gibi kalp damar hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar düz kas ve kalp hücrelerinin hücre membranlarından kalsiyum iyon geçişini engellerler. Bu durum kalp kasına oksijen desteği sağlayarak, koroner arterler ve arteriollerin genişlemesini direkt olarak tetikler ve periferel damarları genişleterek hipertansiyonu azaltır. Bu ilaçlar dihidropiridin türevleri (amlodipin, felodipin, nikardipin, nifedipin), benzotiazin türevleri (diltiazem) ve fenilalkilamin türevleri (verapamil)'dir (Hallmon ve Rossmann, 1999). Bu ilaçlardan bazıları dişeti büyümesine neden olmaktadır (Lederman ve ark., 1984; Lucas ve ark., 1985; Nishikawa ve ark., 1991). Nifedipine bağlı dişeti büyümesi ilk olarak 1984 yılında Lederman ve ark. (1984) tarafından rapor edilmiştir.

Nifedipin en fazla dişeti büyümesine neden olan KKB'idir (Barclay ve ark., 1992). Nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinin prevalansı %6.3-83 arasında rapor edilmekle beraber, kontrollü klinik çalışmalarda ortalama % 44 olarak bildirilmektedir (Fattore ve ark., 1991; Barclay ve ark., 1992; Ellis ve ark., 1999; Castro ve ark., 2010). Bu geniş aralık, dişeti büyümesini değerlendirmek için kullanılan yöntemlere veya popülasyonun örnekleme tekniğine bağlı olabilir (Ellis ve ark., 1999; Castro ve ark., 2010). Diltiazem, amlodipin ve felodipine bağlı dişeti büyümesi ise nadir izlenir (Marshall ve Bartold, 1999). Diltiazem'in dişeti büyümesi insidansı %20 iken, verapamile bağlı dişeti büyümesi %4 oranında görülür. Dihidropiridin türevi olan isradipinin ise bazı vakalarda nifedipine alternatif olarak kullanıldığı ve dişeti büyümesine neden olmadığı rapor edilmiştir (Westbrook ve ark., 1997).

2.3.1. Nifedipin'in Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Nifedipin, 1,4-dihidropiridin türevi bir kalsiyum antagonistidir. Nifedipin, [3,5-Pyridinedicarboxylic asit ,1,4-dihidro-2 ,6-dimetil-4-(2-nitrofenil), dimetilester] $C_{17}H_{18}N_2O_6$ kimyasal formülüne sahiptir ve molekül ağırlığı 346,33'tür.



Şekil-2. Nifedipinin kimyasal yapısı (Ishizawa ve ark., 2009)

Nifedipin, L tipi bir Ca⁺² kanal blokeridir ve genelde anjina pectoris ve hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Klinik çalışmalar nifedipinin koroner ateroskleroz, kardiyak hastalıklar ve böbrek disfonksiyonunun önlenmesi gibi dolaşım ile ilgili organlar üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Lichtlen ve ark., 1990; Poole-Wilson ve ark., 2004; Ishizawa ve ark., 2009). Nifedipinin antihipertansif etkisinin ötesinde en azından kısmen böbrek üzerinde organ koruyucu etkilere sahip olduğu da ileri sürülmektedir. Ancak nifedipinin detaylı etki mekanizması henüz tanımlanamamıştır (Ishizawa ve ark., 2009).

Nifedipin, 30-180 mg'lık doz aralığında, yaklaşık 1.7 saatlik eliminasyon yarılanma süresi ile sıfır derece kinetiği sergiler. Bu, nabzın etkisi göz önüne alındığında anlamlıdır ve kan basıncı plazma ilaç konsantrasyonu ile uyumludur (Swanson ve ark. 1987; Snider ve ark., 2008). Renal bozukluk, şiddetli olmadıkça ki bu durumda yarılanma süresi yaklaşık olarak 3.5 saate uzar (CrCl< dakikada 25 mL), nifedipinin yarılanma süresini etkilemez (Chung ve ark. 1987; Snider ve ark., 2008). Dozun % 60-80'i inaktif bir metabolit olarak idrarla atılır (Snider ve ark., 2008). Nifedipin hepatik olarak metabolize edilir ve % 92-98'i proteine bağlıdır. Kronik karaciğer hastalığı yarılanma süresini uzatabilir ve hedef dokudaki etkisini azaltabilir (Snider ve ark., 2008).

Oral uygulamadan sonra nifedipin hemen hemen tümüyle absorbe olur. Hızlı salınımlı nifedipin formülasyonlarının, sistemik yararlanımı ilk geçiş etkisine bağlı olarak %45-56 arasındadır. Kontrollü salınan nifedipin formülasyonlarının, kapsüle

göre rölatif biyoyararlanımı ise %68-86 oranındadır ve ilk dozdan sonra yaklaşık 6-12 saat içinde plato oluşturmaktadır. Nifedipinin plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık olarak %95'tir. Oral uygulamadan sonra nifedipin bağırsak duvarı ve karaciğerde metabolize olur. Metabolitleri inaktiftir. Nifedipin metabolitleri halinde başlıca böbrekler ve %5-15 oranında da safra ile atılır. İdrarda bulunan değişmeden kalan madde miktarı %0.1'in altındadır (Drug Information, 2011).

Nifedipin, anjinada olduğu gibi hipertansiyonda da etkisini arteriyel bir vazodilatör gibi hareket ederek gösterir. Kalsiyum iyonları, kalpteki inotropik ve kronotropik aktiviteye katkı sağlayarak düz kas kontraksiyonunu düzenler (Rosendorff ve ark. 2007; Snider ve ark., 2008). Vasküler düz kaslardaki L-tipi kanallar, kontraksiyonu potansiyalize eden kalsiyum iyonlarının girişine izin verir (Abernathy ve ark. 1999; Snider ve ark., 2008). Nifedipin gibi dihidropiridin KKB'leri, arteriyel dokuda özellikle koroner arterlerde vazodilasyona neden olan kalsiyum iyonlarının akışını önleyerek ve bu şekilde myokardiyal oksijen teminini artırarak L-tipi kanala bağlanırlar (Snider ve ark., 2008). Myokardiyal oksijen talebi, periferel vasküler dirençteki azalma ile düşürülür (Snider ve ark., 2008). KKB'leri aynı zamanda, sistolik kan basıncındaki (SBP) düşüş ile görülen afterload'daki düşüşten de sorumludur (Snider ve ark., 2008). Kan basıncındaki düşüş başlangıç değerine bağlıdır ve daha yüksek kan basınçlı hastalar daha anlamlı bir düşüş gösterirler (Frishman ve ark., 1989; Snider ve ark., 2008). Birçok çalışmada, vasküler koruyucu özelliklere katkı sağlayan dihidropiridin KKB'lerin kullanımı ile yeni aterosklerotik lezyonların gelişiminde bir azalma olduğu gösterilmiştir (Wenzel ve ark., 1997; Snider ve ark., 2008).

Nifedipinin hücre içine kalsiyum girişini inhibe etmesi sonucu; kalsiyuma bağlı bir enzim olan adenosin trifosfataz (ATPaz) enzimi etkilenir. ATPaz enzimi enerji tüketerek adenosin trifosfatı (ATP) parçalayamaz. Böylelikle myokard fonksiyonları en az enerji ve en az oksijen ihtiyacı ile devam ettirilir. Periferde düz kas hücrelerine kalsiyum girişinin bloke edilmesi sonucu kontraktilite azalır ve uzun süreli arteriyel vazodilatasyon sağlanmış olur (Lederman ve ark., 1984; Lucas ve ark., 1985; Güncü,2006).

2.3.2. Nifedipin'in Klinik Kullanımı ve Yan Etkileri

Dihidropiridin türevi KKB'leri özellikle sol ventriküler hipertrofi, asemptomatik aterosklerozlu, angina pectorisli, sabit atriyum fibrilasyonu ve periferik arter hastalığı olan, izole sistolik hipertansiyonlu, metabolik sendromlu ve hamile olan hipertansiyonlu hastalarda birinci basamak tedavidir (Lewington ve ark., 2002; Staessen ve ark., 2003; Snider ve ark., 2008). KKB'leri özellikle stabil angina pectorisli hastalarda iskemik kalp hastalığının tedavisi için yavaş salınımı özelliğinden dolayı uygun bir birinci basamak ajan olarak tavsiye edilmektedir (Chobanian ve ark., 2003; Snider ve ark., 2008). Diğer muhtemel endikasyonlar, yüksek koroner hastalık ve diyabet riski olan hastaları kapsamakta ve bu yüksek riskte, kalsiyum kanal blokerlerinin, kardiyovasküler hastalık, felç insidansı, Raynaud sendromu ve spesifik aritmiyi azalttığı gösterilmiştir (Chobanian ve ark., 2003; Snider ve ark., 2008).

Hızlı salınan nifedipinin formülü refleks sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu aktivasyon yüz kızarmasına, taşikardiye, myokardiyal iskeminin ağırlaşmasına ve serebrovasküler iskemiye neden olur. Bu nedenle sadece uzun süre etkili formları kullanılmalıdır (Snider ve ark., 2008). Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde nifedipinin iyi bilinen pozitif etkileri dışında, üreme organlarında, deride ve periodonsiyumda oluşabilen yan etkileri hakkında halen bilgi eksikliği vardır (Brkić, 2004). Nifedipin ile yapılan klinik çalışmalarda asteni (yorgunluk), ödem, baş ağrısı, baş dönmesi, periferik ödem, vazodilatasyon, palpasyon, konstipasyon gibi yan etkilerin oluştuğu belirtilmiştir (Drug Information, 2011).

2.4. TAKROLİMUS VE NİFEDİPİNE BAĞLI DİŞETİ BÜYÜMESİNİ ETKİLEYEN RİSK FAKTÖRLERİ

Yapılan birçok klinik ve deneysel çalışmaya rağmen, bu ilaçların dişeti büyümesine neden yol açtığı halen bilinmemektedir. Dişeti büyümesi etyopatogenezini anlamaya yönelik bu çalışmalarda bireysel farklılıklar, genetik, farmakolojik ve periodontal faktörler araştırılmış ve kesin bir fikir birliği sağlanamamıştır (Seymour ve ark., 2000). İlaç kullanan tüm bireylerde dişeti büyümesi görülmemektedir, bu lezyonların sıklığı ve şiddeti bireysel farklılıklar göstermektedir. Yapılan birçok klinik ve deneysel çalışmanın sonuçları dişeti büyümesinin sıklığını, şiddetini etkileyen ve bireyler arası farklı dişeti cevabına neden olan çeşitli risk faktörleri olduğunu ortaya

koymuştur. Bunlar; yaş, cinsiyet, genetik predispozisyon gibi bireysel faktörler, ilacın dozu, serum, tükürük konsantrasyonu gibi farmakolojik faktörler ve mikrobiyal dental plak birikimi ve dişeti inflamasyonu gibi periodontal faktörlerdir. Ancak bu risk faktörlerinin dişeti büyümesine etkileri ve hangi faktörlerin bu lezyonların oluşumunda daha önemli olduğu konusunda halen kesin bir fikir birliği bulunmamaktadır (Seymour ve ark., 2000; Trackman ve Kantarcı, 2004).

Yaş; ilaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen bireysel bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (Ellis ve ark., 2004; Cezário ve ark., 2008). Yapılan klinik çalışmalarda takrolimus kullanan hastalarda dişetinde meydana gelen değişikliklerin şiddeti ve yaş arasında negatif ilişki olduğu rapor edilmiştir. (Ellis ve ark., 2004; Cezário ve ark., 2008). Nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinde ise yaş bir risk faktörü olarak bildirilmezken (Ellis ve ark., 1999), siklosporin ve nifedipinin kombine kullanıldığı hastalarda yaşın dişeti büyümesini etkilediği tanımlanmıştır (Seymour ve ark., 2000). Kesin bir fikir birliği olmamakla birlikte bu ilişkide androjen metabolizması ve dişeti fibroblastları arasındaki ilişki üzerinde durulmaktadır. Çocuklarda ve gençlerde yüksek olan androjen seviyesi sonucunda aktif metabolitler dişeti fibroblast alt grupları üzerine etki ederek kollajen sentezinde artışa veya kollajenaz sentezinde azalmaya neden olmaktadır. Bu durum çocukların ve gençlerin dişeti büyümesine daha duyarlı olmasında etkilidir (Seymour ve ark., 2000).

Hastanın cinsiyeti de ilaca bağlı oluşan dişeti büyümesinin sıklığı ve şiddetini etkilemektedir. Takrolimus ile ilgili yapılan klinik çalışmaların çoğunda dişeti büyümesinin erkeklerde daha fazla olduğu gösterilmiştir (Spolidorio ve ark., 2006; Sekiguchi ve ark., 2007; Cezário ve ark., 2008; Reali ve ark., 2009). Kadınlarda daha az dişeti büyümesi görülmesinin nedeninin kadınların sağlık bilinçlerinin daha fazla olması ve oral hijyene daha fazla önem vermesi olduğu ileri sürülmektedir. (Reali ve ark., 2009). Benzer şekilde, nifedipine bağlı dişeti büyümesinde erkeklerin daha duyarlı olduğu yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Ellis ve ark., 1999). Bu duyarlılığın nedeni ise, dişeti büyümesi oluşabilmesi için gerekli serum konsantrasyon seviyesinin erkeklerde daha düşük olmasıdır. Her iki cinsiyette de bu konsantrasyona ulaşıldığında lezyonun şiddeti arasında farklılık görülmediği bildirilmiştir. (Ishida ve ark., 1995; Seymour ve ark., 2000).

Fenitoin, siklosporin, takrolimus veya KKB’i kullanan her hastada dişeti büyümesi görülmediğinden, literatürde bireyler arası duyarlılığı ve genetik predispozisyonu ortaya koyan “duyarlı” ve “duyarlı olmayan” terimleri kullanılmaktadır (Hallmon ve Rossmann, 1999; Spolidorio ve ark., 2002; Brkić, 2004; Sakagami ve ark., 2006; Flynn ve ark., 2006). Genetik predispozisyon; ilaç, hücre ve plağa bağlı inflamasyon arası ilişkiler gibi birçok faktör üzerinde etkilidir. Bu faktörler arasında gingival fibroblastların heterojenitesi, kollajenolitik aktivite, ilaç-reseptör bağlantısı, ilaç metabolizması, kollajen sentezi yer almaktadır (Boltchi ve ark., 1999). Takrolimus, nifedipin, siklosporin ve fenitoin gastrointestinal ve karaciğer mikrozomal enzim sisteminde bulunan sitokrom-P450-3A tarafından metabolize edilir (Plosker ve Foster, 2000; Seymour ve ark., 2000). Sitokrom P450 geni, ilaç düzeylerinde bireyler arası farklılıklara neden olacak şekilde polimorfizm göstermektedir. İlaç metabolizmasına genetik geçiş yapan bu varyasyonlar, hastalarda ilaçların serum ve doku konsantrasyonlarını etkileyerek dişeti cevabını değiştirebilir (Seymour ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarında IL-6 gen polimorfizmi ile dişeti büyümesi arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (Kota ve ark., 2010). Human Lökosit Antijen (HLA) gen ekspresyon tipi, genetik predispozisyonda önemlidir ve dişeti büyümesinde riskin belirlenmesinde önemli bir genetik belirleyicidir (Boltchi ve ark., 1999; Seymour ve ark., 2000; Lima ve ark., 2008). HLA ekspresyonu ve dişeti büyümesi insidansı arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda HLA-DR1 ve HLA-A68’in dişeti büyümesine karşı koruyucu, HLA-DR2, HLA-B19 ve HLA-B37’nin ise dişeti büyümesi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Margiotta ve ark., 1996; Seymour ve ark., 2000; Lima ve ark., 2008). HLA-A24 ekspresyonunun ise ilaca bağlı oluşan dişeti büyümesine karşı koruyucu bir faktör olduğunu ileri süren çalışmalar olmasına rağmen (Thomason ve ark., 1996), dişeti büyümesi gelişimi için bir risk faktörü olduğunu ileri süren araştırmalar da vardır (Lima ve ark., 2008).

Bireysel risk faktörlerinin yanı sıra dişeti büyümesinin sıklığı ve şiddetini etkileyen farmakolojik risk faktörleri (ilacın dozu, serum ve tükürük konsantrasyonları ve kullanım süresi) de tanımlanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçlarının farklılığı; büyük oranda kullanılan metodların farklılıkları, kan örneklerinin alınma zamanı ve çalışılan hasta sayısı ile ilişkilidir. Ancak çoğu araştırmacı dişetinde

değişikliklerin başlaması için ilacın dokularda belli bir eşik değere ulaşması gerektiğini ve bu eşik değerın bireyden bireye farklılık gösterdiğini savunmaktadır (Seymour ve ark., 2000). Takrolimus dozu, serum seviyesi ve dişeti büyümesi arasındaki ilişkiyi inceleyen az sayıda çalışmanın çoğunda takrolimus dozu ve dişeti büyümesi arasında bir ilişki bulunamazken (Ellis ve ark., 2004; Costa ve ark.,2006; Cezário ve ark., 2008), yapılan deneysel bir çalışmada takrolimus verilen sıçanlarda iki hafta içerisinde oluşan dişeti büyümesinin yüksek doza bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (Prabhu ve Mehta, 2006). Nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinin dozla ilişkisini inceleyen çalışmalarda da çelişkili sonuçlar alınmıştır. Dozun dişeti büyümesi için bir risk faktörü olduğunu savunan araştırmaların yanı sıra (Morisaki ve ark., 1993; Ishida ve ark., 1995; Fu ve ark., 1998; Haniastuti ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Brkić, 2004; Flynn ve ark., 2006; Bullon ve ark., 2007), ilacın dozu ile dişeti büyümesi arasında ilişki olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur (Barclay ve ark., 1992). Sonuç olarak; ilaç dozunun dişetindeki değişikliklerin zayıf bir belirleyicisi olduğu ve dişeti büyümesi ile doz arasındaki ilişkiyi yorumlamak için ilacın dozu ile hastanın vücut ağırlığını ilişkilendirmenin daha doğru olacağı düşünülmektedir (Seymour ve Heasman, 1988; Seymour ve Jacobs, 1992; Fu ve ark., 1995).

Deneysel çalışmalarda nifedipin serum-kan seviyesinin artmasının, lezyonların sıklığı ve şiddetini arttırdığı belirtilmiştir (Ishida ve ark., 1995; Haniastuti ve ark., 2002; Shimizu ve ark., 2002; Kato ve ark., 2005). Yapılan deneysel bir çalışmada, serum nifedipin konsantrasyonunun ketokonazol tarafından uzun süre yüksek tutulması nedeniyle nifedipinin neden olduğu dişeti büyümesini anlamlı bir şekilde arttırdığı da tespit edilmiştir (Kato ve ark., 2005). Ellis ve ark. (1993) nifedipinin, hastaların dişeti oluşu sıvısında da bulunduğunu göstermişler ve nifedipinin aslında dişeti dokularına kan akımından ulaşabildiğini, daha sonra da dişeti oluşu sıvısının içine penetre olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca dişeti büyümesi görülen hastaların dişeti oluşu sıvısındaki nifedipin konsantrasyonunun, plazmadakinden çok daha yüksek olduğu da rapor edilmiştir (Ellis ve ark., 1993; Shimizu ve ark., 2002).

İlaca bağlı dişeti büyümesinde bir diğer risk faktörü olarak ilacın kullanım süresi tanımlanmıştır. Nifedipine bağlı dişeti büyümesinde ilacın uzun dönem kullanımının dişeti büyümesi şiddetini arttırdığı rapor edilmiştir (Fu ve ark., 1998; Haniastuti ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Brkić , 2004). Takrolimusun süre ile ilişkisini araştıran

çalışma sayısı ise sınırlıdır (Sekiguchi ve ark., 2007; Nassar ve ark., 2008). Yapılan klinik bir çalışmada nakil sonrası takrolimus kullanan hastalarda 30 gün içinde dişetinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, süre uzatıldığında (90 gün) hastaların %10'unda dişeti büyümesi izlenmiştir (Sekiguchi ve ark., 2007). Deneysel bir çalışmada; kısa süreli takrolimus uygulamalarının dişeti büyümesine yol açmadığı, fakat uzun süreli takrolimus uygulanan sıçanların hepsinde dişeti büyümesi olduğu gösterilmiştir (Nassar ve ark., 2008).

Kombine ilaç kullanımı da takrolimusa bağlı dişeti büyümesini etkileyen bir risk faktörü olabilir. Organ nakil hastaları sadece takrolimus veya siklosporin kullanıp monoterapi alabildikleri gibi, KKB'leri ve diğer immünsupresif ajanlarla (azatioprin, mikofenolat mofetil, mikofenolat sodyum) veya kortikosteroidlerle (prednisolone) kombine olarak da kullanabilmektedir (James ve ark., 2001; Adalı, 2007). Bu ajanların birarada kullanılması yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Ellis ve ark., 2004; Costa ve ark., 2006; Cezário ve ark., 2008). İmmünsupresif ajanlar ve kalsiyum kanal blokerleri çoğunlukla nefrotoksititeyi azaltmak ve nakil sonrası yüksek kan basıncını tedavi etmek için birarada kullanılmaktadır (Van der Schaaf ve ark., 1995; Cezário ve ark., 2008). Ketokonazol ve nifedipinin birlikte kullanıldığı bir deneysel çalışmada; ketokonazolün nifedipinin neden olduğu dişeti büyümesini anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Kato ve ark., 2005). Birçok klinik çalışmada; transplantasyon yapılan hastalarda nifedipin ve takrolimusun kombine kullanımının, ilaçların tek başına kullanımına göre daha fazla dişeti büyümesine neden olduğu rapor edilmiştir (Wondimu ve ark., 2001; James ve ark., 2001; McKaig ve ark., 2002; Spolidorio ve ark., 2002; Ellis ve ark., 2004; Flynn ve ark., 2006; Spolidorio ve ark., 2006; Costa ve ark., 2006; Greenberg ve ark., 2008). Ancak, takrolimus ve KKB'lerinin kombine kullanımı ile dişeti büyümesi arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını rapor eden araştırmacılar da vardır (Lima ve ark., 2008).

Plak kontrolünün iyi olmaması ve dişeti inflamasyonu, kullanılan ilacın tipinden bağımsız olarak dişeti büyümesini şiddetlendirir (Seymour ve Heasman, 1988; Nishikawa ve ark., 1991; Seymour ve Jacobs, 1992; Morisaki ve ark., 1993; Thomason ve ark., 1996; Seymour ve ark., 1996; Hallmon ve Rossmann, 1999; Ellis ve ark., 1999; Chiu ve ark., 2001; Trackman ve Kantarcı, 2004; Sakagami ve ark., 2006; Lima ve ark., 2008; Reali ve ark., 2009). Nitekim, histolojik çalışmalar da büyümüş dişetinde kısmen

inflatuar hücre infiltrasyonun bulunduğunu göstermiştir (Lucas ve ark., 1985; Sakagami ve ark., 2006). Dişeti inflamasyonunun ilaca bağlı dişeti büyümesinin başlangıcı için gerekli olduğunu ileri süren çalışmalar bulunsada (Morisaki ve ark., 1993; Takeuchi ve ark., 2007) inflamasyonun dişeti büyümesini modifiye edebileceğini fakat lezyonların başlangıcı için gerekli olmadığını savunan araştırmalar da vardır (Seymour ve ark., 1987; Barclay ve ark., 1992; Spolidorio ve ark., 2002). Yapılan deneysel bir çalışmada siklosporine bağlı oluşturulan deneysel dişeti büyümesinde yapılan makroskopik, histopatolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda siklosporinin plak birikimi olmasada dişeti büyümesine neden olduğu, dental plak birikiminin bu etkiyi arttırdığı görülmüştür (Çetinkaya ve ark., 2004). Bu bulgular ışığında plak birikimi ve dişeti inflamasyonunun dişeti büyümesinin başlangıcı için gerekli olmadığı, ancak lezyonların şiddetini arttıran bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir.

2.5. TAKROLİMUS VE NİFEDİPİNE BAĞLI DİŞETİ BÜYÜMESİNDE HÜCRESEL VE MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Dişeti büyümesi, sellüler ve intersellüler elementlerdeki artışın neden olduğu dokunun histolojik olarak büyümesi anlamına gelir (Fujii ve ark., 1994; Takeuchi ve ark., 2007). İlaça bağlı dişeti büyümesinin en önemli histopatolojik özellikleri, değişen kalınlıkta düzensiz çok katlı parakeratinize epitel, subepitelyal bağ doku derinliklerine penetre rete peg yapısı ve onlarla ilişkili düzensiz yerleşimli kollajen fibril kümeleridir. Bağ dokusu değişik miktarda ara madde ve dens yapıda kollajen içermektedir. İlaça bağlı dişeti büyümesi görülen bireylerde daha yüksek oranda proliferasyon, DNA sentezi ve kollajen sentezi belirtilmiştir (Fujii ve ark., 1994; Takeuchi,2004; Takeuchi ve ark., 2007). Nifedipine bağlı dişeti büyümesinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ilacın direkt olarak fibroblastları etkilediği ve bunun sonucunda hücre proliferasyonu ve matriks sentezinin arttığı rapor edilmiştir (Fu ve ark., 1998). Nifedipinin dişeti fibroblastlarını kollajen üretmek için uyardığı böylece dişeti büyümesine neden olduğu savunulurken (Brkić, 2004; Bullon ve ark.,2007) nifedipinin kollajen sentezini etkilemediğini rapor eden çelişkili in vitro çalışmalar da vardır (Nishikawa ve ark., 1991; Fujii ve ark., 1994; Tipton ve ark., 1994; McKevitt ve Irwin, 1995; Henderson ve ark., 1997; Matsumoto ve ark., 2001; Sakagami ve ark., 2006).

Ayrıca nifedipinin kollajen yıkımı üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, nifedipinin hem intraselüler ve hem de ekstraselüler kollajen yıkım yollarını etkilediği, ilacın intraselüler yolda dişeti fibroblastları yoluyla kollajen fagositozunu azalttığı rapor edilmiştir (Tipton ve ark., 1994; Kataoka ve ark., 2001; Sakagami ve ark., 2006). Siklosporin ve nifedipinin tek başına veya kombine kullanımının neden olduğu dişeti büyümelerinin karşılaştırılmasını amaçlayan deneysel bir çalışmada, dişeti dokusunda kollajen ve fibroblast yoğunluğunda artış olduğu belirtilmiştir (Spolidorio ve ark., 2002). Takrolimusun dişeti bağ dokusunun ekstraselüler matriks komponentleri ve özellikle dokular arası kollajen metabolizması üzerine etkilerini inceleyen çalışma sayısı ise diğer ilaçlara göre kısıtlıdır ve sonuçlar çelişkilidir (Gagliano ve ark., 2005; Nassar ve ark., 2008).

Bağ dokusunda vaskülarizasyon ve enflamatuar hücre infiltrasyonu, ilaca bağlı dişeti büyümesinin diğer histopatolojik özelliklerindedir (Rateitschak-Pluss ve ark., 1983). İnflamatuar hücre infiltrasyonunda dominant hücreler, T lenfositler ve monositlerdir, B lenfositleri ise yok denecek kadar azdır. Lenfositler daha çok bağ doku fibrillerine komşudur, hiçbir nükleer ve sitoplazmik anormallik görülmemesine rağmen bu hücreler neoplastik olabilecek miktarlara ulaşabilirler (Deliliers ve ark., 1986). Nifedipine bağlı dişeti büyümesi diğer ilaca bağlı dişeti büyümeleri ile benzer özelliklere sahiptir. Histopatolojik olarak bu lezyonları birbirinden ayırmak mümkün değildir. Ancak immünohistokimyasal boyama teknikleri ve elektron mikroskop incelemesi ile ilaçlar arası farklılıkların ortaya konulmasının mümkün olduğu bildirilmektedir (Seymour ve ark., 1996).

İlaca bağlı dişeti büyümesi patogenezinde sitokin ve büyüme faktörlerinin etkisi üzerine de dikkat çekilmiştir (Saito ve ark., 1996; Iacopino ve ark., 1997; Atilla ve Kütükçüler, 1998; Modeer ve ark., 2000). Büyüme faktörleri ilaçlar için önemli hedeflerdir ve epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü β , bazik fibroblast büyüme faktörü, bağ dokusu büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin ilaca bağlı dişeti büyümesinin patogenezinde rol oynayabilecekleri gösterilmiştir (Saito ve ark., 1996; Ellis ve ark., 2004, Cetinkaya ve ark., 2006; Takeuchi ve ark., 2007).

Periodontal hastalığın başlangıcı ve ilerlemesinde önemli rol oynayan sitokinlerin dişeti büyümesindeki rolü de araştırılmıştır. IL-1 α , -6 ve -8 gibi inflammatuar

sitokinlerin de ilaca bağlı oluşan dişeti büyümesi ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (Ruhl ve ark., 2004; Takeuchi ve ark., 2007). Periodontal hastalığı olan bireylerin dişeti oluğu sıvısında anlamlı ölçüde yüksek seviyede bulunan IL-1'in potansiyel bir fibroblast proliferasyon düzenleyicisi olduğu rapor edilmiştir (Kjeldsen ve ark., 1993; Takeuchi ve ark., 2007). Nifedipin ve IL-1 α karışımının hücre proliferasyonunu arttırdığını ve bunun da IL-1 α 'nın nifedipinine bağlı oluşan dişeti büyümesi için bir önemli olabileceğini göstermişlerdir (Takeuchi, 2004; Sato ve ark., 2005; Takeuchi ve ark., 2007). Ayrıca yapılan başka bir deneysel çalışmada IL-6'nın, fibroblast benzeri bağ doku hücrelerinin metabolizması ve büyüme üzerinde uyarıcı etkiye sahip olduğu, bu nedenle fibroblastların etkilendiği hastalıklarda IL-6'nın patojenik role sahip olduğu kabul edilmiştir (Myrillas ve ark., 1999; Brki, 2004).

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü normalde organizmada denge halinde bulunur. Bu dengenin bozulması ilaca bağlı dişeti büyümesinin patogenezinde önemli rol oynar. İlaca bağlı dişeti büyümesinde çeşitli proliferasyon belirleyicilerinin rolü araştırılmıştır. Bunlardan en eski olanı; proliferen olan hücrelerde DNA sentezinde DNA polimeraz-delta için yardımcı protein olarak görev yapan "proliferating cell nuclear antigen" (PCNA)'dir (Miyachi ve ark., 1978). Hücredeki konsantrasyonu direkt olarak hücrenin proliferatif aşaması ile ilişkilidir; G1 fazında artar, G1/S fazında pik yapar, G2 fazında düşmeye başlar ve M fazı ve interfaz aşamalarında en düşük seviyeye iner (Kurki ve ark., 1986). Cotrim ve ark., (2003)'nin yaptığı çalışmada ise siklosporine bağlı dişeti büyümesinde PCNA ekspresyonunun bağ dokuda arttığı gösterilmiştir. Çetinkaya ve ark. (2006), yaptıkları deneysel çalışmada ise epitelyal hücre proliferasyonu yani mitotik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilen PCNA ekspresyonunun siklosporine bağlı dişeti büyümesi görülen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde; Bulut ve ark. (2006), siklosporine bağlı dişeti büyümesi olan böbrek nakli geçirmiş bireylerden ve sistemik sağlıklı bireylerden alınan dişeti örneklerini değerlendirmiş ve PCNA ekspresyonunun siklosporine bağlı dişeti büyümesi görülen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Diğer bir nükleer protein olan Ki67'nin rolü ise ilk olarak nifedipine bağlı dişeti büyümesinde araştırılmış ve dişeti büyümesinde gözlenen artmış epitel kalınlığının, keratinositlerin artan mitotik aktiviteleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Saito ve ark., 1999). Tümör baskılayıcı

bir gen olan ve hiperproliferatif sinyaller ile aktive olan p53'ün rolünü inceleyen bir araştırmada ise nifedipin ile tedavi edilen sıçanların dişeti epitel tabakasında güçlü bir p53 protein boyanması olduğu ve doz ve tedavi süresi arttıkça p53 pozitif dişeti hücrelerinin sayılarının arttığı gösterilmiştir (Haniastuti ve ark., 2002).

Hücre proliferasyonunun gösterilmediği çalışmalarda hücre ölümünün yani apoptozisin azalmasının dişeti büyümesine neden olabileceği ileri sürülmüştür. Epitel, bazal tabakada proliferasyon ile ortaya çıkan ve çok katlı yassı epitelin yukarı doğru değişik katmanlarına hareket eden, kademeli olarak farklılaşma gösteren ve sonunda ölen keratinositler içerir (Shimizu ve ark., 2002). Dişeti epitelinin normal yapısı; büyüme, farklılaşma ve ölüm gibi bir dizi olaylar ile iyi bir şekilde düzenlenir. Bu homeostatik denge hiç şüphesiz ki epitel farklılaşmasının ve apoptozisin entegrasyonunu içermektedir (Lovas, 1986; Shimizu ve ark., 2002). Apoptozis, doku farklılaşmasının sonucunda meydana gelen hücre ölüm modelidir (Maruoka ve ark., 1997; Harada ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 2002) ve apoptozisin baskılanması dişeti büyümesinde artışa neden olabilir (Bhathal ve Gall, 1985; Wyllie, 1992; Nishikawa ve ark., 1996; Shimizu ve ark., 2002). Nitekim, nifedipinin endotelial hücrelerin (Sugano ve ark., 2002; Yamagishi ve ark., 2003; Castro ve ark., 2010) ve keratinositlerin (Shimizu ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Castro ve ark., 2010) apoptozisini bloke ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca siklosporine bağlı dişeti büyümesinde görölen epitelyal hiperplazinin keratinositlerdeki artış yüzünden olmadığı, daha çok hücre ömrünün artışına bağlı olduğu da bu hipotezi destekleyen diğer bir bulgudur (Niimi ve ark., 1990; Shimizu ve ark., 2002). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozis belirleyicilerinin seviyesinin dişeti büyümesindeki rolü araştırılmıştır (Geske ve Gerschenson, 2001; Sugano ve ark., 2002; Shimizu ve ark., 2002; Yamagishi ve ark., 2003; Handajani ve ark., 2003; Castro ve ark., 2010). Bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2'in apoptotik metabolik yolu düzenlediği ve hücre ölümüne karşı koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (Geske ve Gerschenson, 2001; Castro ve ark., 2010). Handajani ve ark. (2003) yaptıkları deneysel çalışmada, nifedipin ile tedavi edilen sıçanların dişeti dokularında doz ve sıklığa bağlı olarak Bcl-2 protein ekspresyonunun arttığını ve böylece nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinin gelişiminde Bcl-2 proteinin rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (Handajani ve ark., 2003). Caspase 3 ise inaktif salınan ve apoptozis sırasında aktive olan bir proteazdır; Bulut ve Özdemir (2007),

caspace-3 seviyesindeki azalmanın siklosporine bağılı dişeti büyümesinin patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda apoptozis sırasında bol miktarda ve seçici salınan Bax ise apoptozisi arttıran diğer bir pro-apoptotik proteindir (Geske ve Gerschenson, 2001; Castro ve ark., 2010). Siklosporine bağılı dişeti büyümesinde Bcl-2 ekspresyonunun arttığı diğer taraftan Bax ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Jung ve ark., 2008). Apoptozis başlangıcının diğer bir düzenleyicisi de, Bax gibi apoptozisi indükleyen genlerin aktivasyonu ile hareket eden p53 olarak bilinen bir tümör baskılayıcı gen dir (Geske ve Gerschenson, 2001; Castro ve ark., 2010). Dişeti büyümesi ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise Foxo ve Caspase 3 apoptozis indeksleri değerlendirilmiş; Foxo ve Caspase 3 salınımının fibroblastlarda proliferatif aktivitenin artmasına ve apoptozisin azalmasına neden olduğunu bildirilmiştir (Kantarıcı ve ark., 2007). Sonuç olarak; ilaca bağılı dişeti büyümesinde proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin önemli rolü olduğu düşünölmektedir.

Fosfotaz ve tensin (PTEN), 10. kromozondan silinmiş homolog, fizyolojik bir substrat olarak fosfatidilinositol-3-4-5 trifosfatı kullanan çift yönlü özgünlüğü olan bir protein ve lipid fosfotazdır (Maehama ve Dixon, 1998; White ve ark., 2006). İlk olarak malign hastalıklarda rol aldığı gösterilmiş olmasına rağmen daha sonraki yıllarda PTEN protein ekspresyonu veya aktivitesinin; romatoid artrit, astım ve pulmoner fibrozis gibi doku yıkımı ve yeniden yapılanması ile karakterize olan malign olmayan hastalıkların patogeneziyle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Kwak ve ark., 2003; White ve ark., 2003; 2006). PTEN lipid fosfataz aktivitesi sayesinde hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve hücre büyümesini inhibe eder, sellöler apoptozisi başlatır (Stambolic ve ark., 1998; Tamura ve ark., 1998; 1999; White ve ark., 2006; Nho ve ark., 2006).

Yapılan araştırmalarda, PTEN aktivitesinin kollajen matriks kontraksiyonuna cevap olarak arttığı gösterilmiştir (Nho ve ark., 2006). Kontraksiyon sırasında PTEN'in bu artışı fibroblast apoptozisinin indüksiyonuna neden olmaktadır. Doku tamirinin son aşamalarında kollajen matriks kontraksiyonunu takiben fibroblastlar apoptozis ile elimine edilir, böylece doku hücreleri azalır. Bu fizyolojik işlem, fibrotik doku oluşumunun azalmasında ve normal doku yapısının korunmasında önemli rol oynar (Nho ve ark., 2006). Pulmoner fibrozisli hastaların akciğerlerinden izole olmuş fibroblastlarda, azalmış PTEN ekspresyonu gözlenmiştir ve PTEN inhibisyonunun fibrotik akciğer hastalıklarının patogenezinde katkıda bulunduğu ileri sürölmüştür (White

ve ark., 2003; 2006). Ayrıca endometrial hiperplazili hastalarda PTEN'in tamamen kaybolduğu rapor edilmiştir (Tantbirojn ve ark., 2008). PTEN ilerlemiş birçok kanser türünde mutasyona uğrar ve PTEN ekspresyonunun kaybı veya azalmasının tümör insidansında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 1997; Stambolic ve ark., 2000; Eason ve ark., 2004). PTEN yetmezliği, fibroblastları miyofibroblastlara farklılaştırır ve onları aynı zamanda apoptozise karşı dirençli hale getirir. Yapılan literatür incelemelerinde ilaca bağlı dişeti büyümesinde PTEN'in rolünü inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. PTEN'in epitel ve/veya bağ dokusunda hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki denge üzerine etki ederek dişeti büyümesi patogenezinde rol oynayabileceği bu çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır.

Bugün itibariyle ilaca bağlı dişeti büyümesini engelleyecek etkili bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Dişeti büyümesinin patogenezinine yönelik yeni çalışmaların amacı, bu lezyonlarda görülen proliferasyon ve ölüm arasındaki dengeyi düzenleyecek yeni tedavi yaklaşımları konusunda literatüre ışık tutmaktadır. Bu bilgilerin ışığında; çalışmamızın amacı takrolimusun tek başına veya nifedipin ile birlikte kısa ve uzun dönem kullanımının meydana getirdiği dişeti değişikliklerinin makroskopik, histomorfometrik ve stereolojik yöntemler ile incelenmesi ve PTEN'in ilaca bağlı dişeti büyümesindeki rolünün immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesidir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney protokolü

Bu deneysel Araştırma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yerel Hayvan Etik Kurulu tarafından 29.05.2008 tarihinde 2008/19 numarası ile onaylandı. Laboratuvar çalışmalarında hayvanların bakımı ve kullanımı için uluslararası etik kurallara uyuldu.

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde yürütüldü. Çalışmada toplam 80 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Deney hayvanları 4-5 haftalık, ağırlıkları 100-120 gr arasında değişen, sistemik olarak sağlıklı ve daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış sıçanlar arasından seçildi. Sıçanlar; 22 ± 1 °C sıcaklık ve %50 nem oranında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık bir ortamda, her bir plastik kafese tek sıçan yerleştirilerek ve standart sıçan yemi verilerek beslenme şartları eşit olacak şekilde ayarlandı.

3.2. Deney Grupları

Seksen adet sağlıklı sıçan; rastgele olacak şekilde deney ilaçlarının 2 ay ve 6 ay sürelerle uygulandığı sayıca eşit 2 gruba ayrıldı. Her iki grup da eşit sayıda sıçan (n:10) içeren takrolimus, nifedipin, takrolimus+nifedipin ve kontrol olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Deney grupları aşağıdaki gibi isimlendirildi:

1. grup (takrolimus uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına distile su ile dilüe edilmiş takrolimus, 8 hafta boyunca her gün 1,5 mg/kg dozda intragasrik gavaj yolu ile verildi (Prabhu ve Mehta, 2006).

2. grup (nifedipin uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına 30 mg/kg dozda nifedipin, toz haline getirilip distile su ile dilüe edilerek her gün gavaj yoluyla 8 hafta boyunca verildi (Haniastuti ve ark., 2002).

3. grup (takrolimus+nifedipin uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına 8 hafta boyunca 1.5 mg/kg dozda takrolimus ve 30 mg/kg dozda nifedipin her gün gavaj yoluyla verildi.

4. grup (kontrol grubu; n:10): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir ilaç uygulanmadı. 8 hafta boyunca distile su gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

5. grup (takrolimus uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına distile su ile dilüe edilmiş takrolimus, 24 hafta boyunca her gün 1,5 mg/kg dozda intragastik gavaj ile verildi.

6. grup (nifedipin uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına 30 mg/kg dozda nifedipin, toz haline getirilip distile su ile dilue edilerek her gün gavaj yoluyla 24 hafta boyunca verildi.

7. grup (takrolimus ve nifedipin uygulanan grup; n:10): Bu gruptaki deney hayvanlarına 24 hafta boyunca 1.5 mg/kg dozda takrolimus ve 30 mg/kg dozda nifedipin her gün gavaj yoluyla verildi.

8. grup (kontrol grubu; n:10): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir ilaç uygulanmadı. 24 hafta boyunca distile su gavaj yoluyla sıçanlara verildi.

İlaçların hazırlanması:

Takrolimus: Prograf¹ 1 mg kapsül içeriği 1,5mg/kg dozda distile su ile dilue edilerek her gün intragastrik gavaj yoluyla verildi.

Nifedipin: Adalat Crono² 30 mg tablet içeriği 30 mg/kg dozda toz haline getirilip distile su ile dilue edilerek her gün intragastrik gavaj yoluyla verildi.

Deneye başlamadan önce ve 6 ay boyunca her hafta deney hayvanlarının ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Her ölçümden sonra hayvanların değişen ağırlıklarına göre hassas tartı³ kullanılarak ilaçların doz ayarlaması yapıldı. İlaçlar her gün aynı saatte gavaj yoluyla uygulandı. Kısa dönem ilaç uygulanan deney hayvanları 2 ay ve uzun dönem ilaç uygulanan sıçanlar 6 ay sonunda dekapitasyon metodu ile sakrifiye edildi.

3.3. Makroskopik ve histomorfometrik inceleme

Sakrifikasyon sonrasında, stereolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için sağ ve sol mandibula, 24-48 saat süreyle %10'luk formalin solüsyonunda bekletildi. Dişetindeki makroskopik değişiklikler stereomikroskopta⁴ incelendikten sonra örnekler %8'lik formik asitte 14 gün boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminin ardından örnekler 12 saat boyunca yıkandı ve rutin histolojik takip işlemlerine geçildi. Takip işlemlerinin ardından dokular parafine gömülerek rotary mikrotom⁵ ile bukkolingual yönde 1. molar dişten itibaren 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Sistematik

¹Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş., Kerry, İrlanda

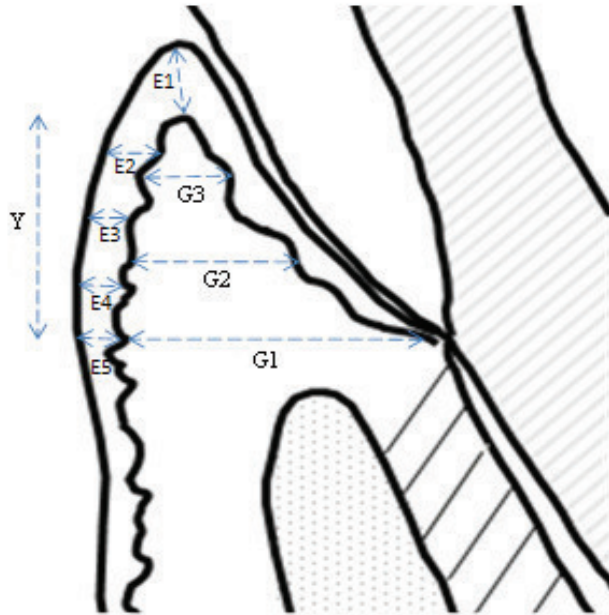
²Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd.Şti, Almanya

³Precisa XB 220A ,Dietikon, İsviçre

⁴Nikon SMZ 1500, Japonya

⁵Leira Mycosystems GmbH, Wetzlar, Almanya

rastgele örnekleme ile her 40. kesit alınarak hematoksilin-eosin (HE) ile boyandı. Bu örnekleme ile her bir örnekten 7-9 kesit elde edildi. Histolojik takip sonrası elde edilen bukko-lingual kesitlerde dişetinde meydana gelen değişiklikleri göstermek için histometrik ölçümler yapıldı. Şekil 3'te de belirtilen bölümlerde 20x objektif büyütmesinde; serbest dişetine ait bağ dokusunun üç farklı noktasında bağ dokusu genişliği (G_1, G_2, G_3), bağ doku yüksekliği (Y) ve serbest dişeti epitelinin beş farklı noktasında (E_1, E_2, E_3, E_4, E_5) epitel kalınlığı lineer olarak hesaplandı. Bu ölçümlerin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldı.



Şekil 3. Lineer ölçümlerin yapıldığı bölümleri gösteren temsili çizgiler. $G_{1,2,3}$: ölçülen bağ dokusu genişlikleri. $E_{1,2,3,4,5}$: ölçülen gingival epitel genişlikleri, Y : serbest dişeti yüksekliği (Nassar ve ark., 2008'den modifiye edildi)

3.4. Stereolojik inceleme

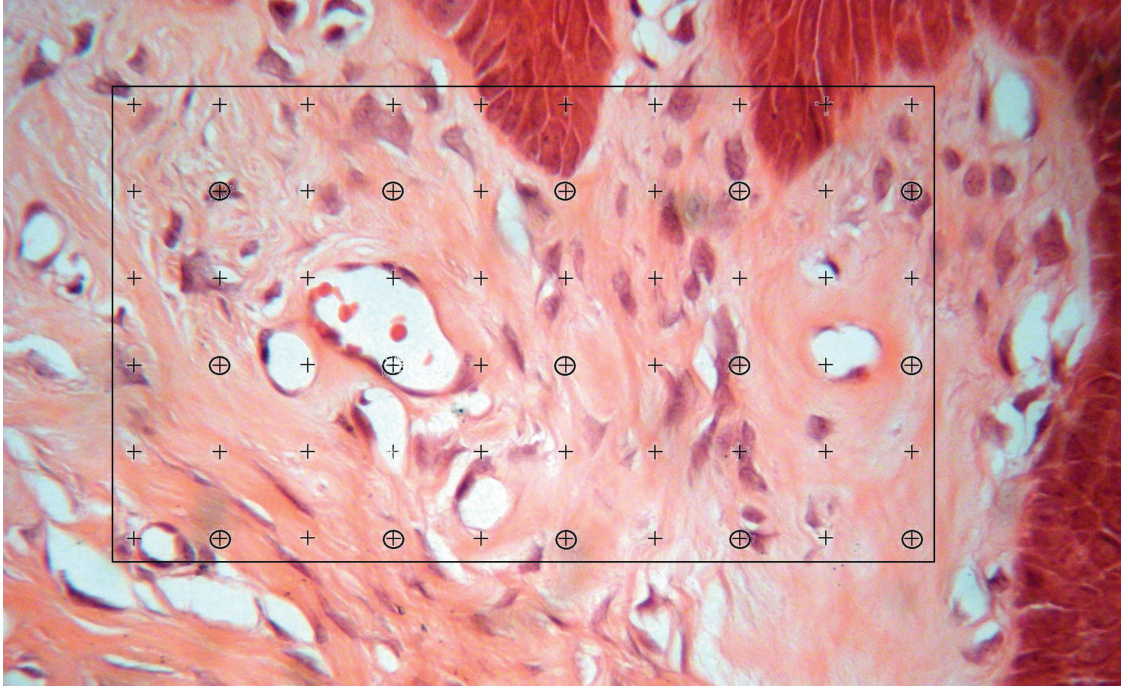
Stereolojik inceleme kapsamında; fibroblast hacmi (FH), kollajen fibrillerin hacmi (KFH) ve kan damarlarının hacmi (KDH) fraksiyon yöntemi ile hesaplandı.

Stereolojik inceleme, elde edilen kesitlerdeki bukcal ve lingual dişetine ait kesit profil görüntülerinin kamera ilaveli bir mikroskop aracılığı ile bilgisayara

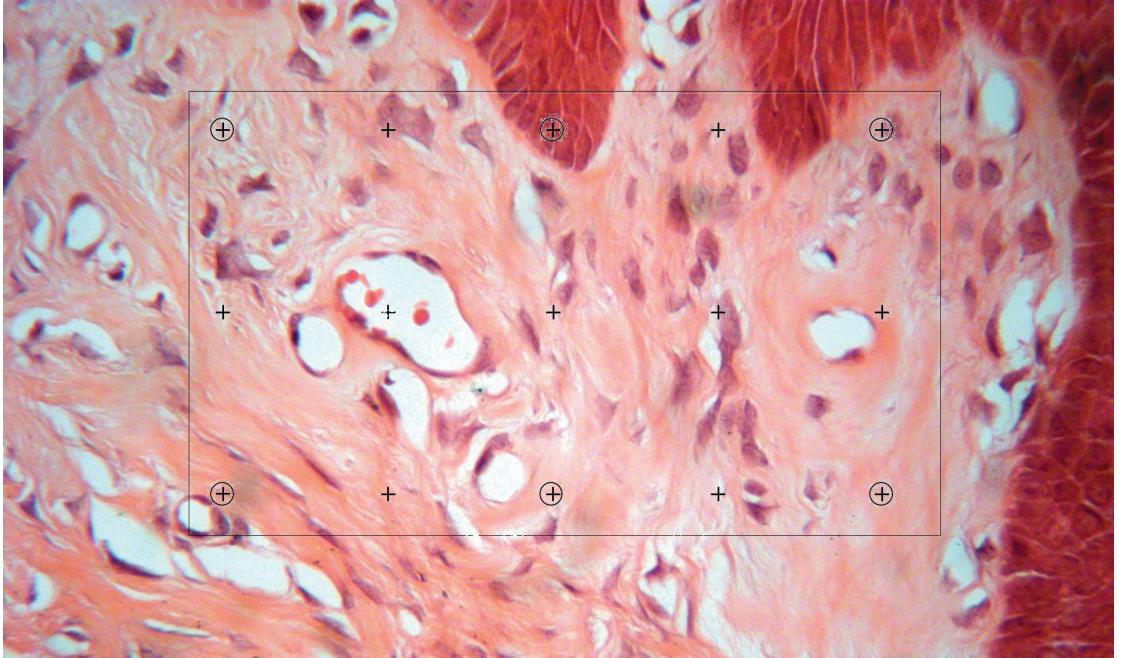
aktarılmasıyla gerçekleştirildi (West, 1999). Gruplardaki kollajen, fibroblast ve damar miktarları hacim fraksiyonu yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı (Howard ve Reed, 1998). Karşılaştırmalarda gruplardaki bu parametrelerin bağ dokusuna olan oranları kullanıldı. Bu oranların karşılaştırılmasında, bilgisayarda hazırlanan iki şablondan ($2 \times 1,3 \text{ cm}^2$ 'lik alanlar içeren bir "alan şablonu" ve sistematik dağılımlı noktalar içeren bir "nokta şablonu") yararlanıldı (Şekil 4,5,6). Nokta şablonunda bağ dokusu için ayrı, diğer parametreler için ayrı noktalar çizildi. Her iki şablon çalışma bölgelerine rastgele düşürüldükten sonra, ilgili çalışma bölgesindeki alanlara düşen noktalar 40x objektif büyütmesinde sayıldı. Bu şekilde elde edilen veriler, ilgili yapıların gerçek değerlerini temsil etmemekle birlikte, birbirlerine olan oranları gruplar arasında karşılaştırma yapabilecek bir parametre oluşturmaktadır. İlgili nokta sayıları oranlandıktan sonra her gruptaki ortalamaları alındı ve değerlendirme yapıldı.



Şekil 4: Alan örnekleme şablonunun 4x'lük objektif büyütmesinde ilgili bölgeye rasgele düşürülmesiyle ortaya çıkan sayımların yapıldığı alanlar (sarı renkli alanlar).



Şekil 5: Sayım alanları belirlendikten sonra 40x objektif büyütmesinde noktalar içeren asetatin ilgili alanlara düşürüldüğü görüntü. Fibroblastlara rastgelen tüm noktalar sayılırken, bağ doku için sadece dairesel noktalar sayıldı (bu örnekte Tablo 4'deki C2 alanı verildi).



Şekil 6: Kollajenlere rastgelen tüm noktalar sayılırken, bağ doku için sadece dairesel noktalar sayıldı (bu örnekte Tablo 4'deki C2 alanı verildi).

3.5. İmmünohistokimyasal inceleme

Her bir doku örneğinden rutin histolojik işlemler için alınan kesitlerin yanında, immünohistokimyasal işlemler için 5 µm kalınlığında 2-3 adet kesit pozitif şarjlı lamlara alındı. Kesitler, ksilen ve dereceli alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suda yıkandı. Ardından sitrat tampon solüsyonuna (pH.6.0) koyulan preparatlara mikrodalga ışınımı (mikrodalga fırında maksimum güç) ile antijen geri kazanımı işlemi gerçekleştirildi. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra 20 dakika boyunca %3'lük H₂O₂ ile endojen peroksit blokajı yapıldı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH.7,4) ile yıkanan (3x5 dakika) kesitlere oda ısısında 10 dakika boyunca protein⁶ blokajı uygulandı. Ardından primer antikor⁷ 1:100 dilüsyonla oda ısısında 1 saat uygulandı. PBS ile yıkanan (3x5 dakika) kesitler biyotinli antikora⁸ 20 dakika maruz bırakıldı. Tekrar PBS ile yıkanan (3x5 dakika) kesitler streptavidin-peroksidaz solüsyonunda⁹ 20 dakika bekletildi. Üçüncü kez PBS ile yıkanan (3x5 dakika) kesitler kromojene (DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydro chloride, DBS, Pleasanton, CA, USA) maruz bırakılarak boyanması sağlandı. Zıt boyama hematoksilin ile gerçekleştirildikten sonra kesitler dehidrate edilip kapatıldı.

PTEN'in immünohistokimyasal boyanma yoğunluğuna göre PTEN immünoreaktivitesi değerlendirildi. PTEN+ boyanan hücrelerin, boyanma yoğunlukları 0 (boyama yok), 1 (zayıf fakat belirlenebilir), 2 (belirgin), 3 (oldukça yoğun) olarak skorlandı. Hücrelerin belirtilen kategorideki yoğunluklarının yüzdesi ilgili yoğunluk kategorisiyle çarpılarak HSCORE hesaplaması yapıldı (Tanrıover ve ark., 2005). Bunun için her bir kesitteki 10 ayrı alanda 100x'lük objektif büyütmesinde, her yoğunluk kategorisi için hücrelerin yüzdesi ayrı ayrı belirlendi ve ortalamaları alındı. HSCORE şu formüle göre hesaplandı: $HSCORE = \sum P_i (i+1)$. i ; hücrelerin boyanma yoğunluk skorunu ve P_i ; ilgili yoğunluk skoruna ait hücrelerin yüzdesini temsil etmektedir.

3.6. İstatistiksel inceleme

Veriler Shapiro-Wilk testi ile normal dağılıma uygunluk yönünden araştırıldı. Normal dağılıma uyduğu tespit edilen verilerin değerlendirilmesinde parametrik testler

⁶Super Block, SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, Skytek Laboratories, Logan, Utah

⁷Anti-PTEN monoklonal antikor, 6H2.1, Millipore

⁸Biotinylated Link Antibody, SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, Skytek Laboratories, Logan, Utah

⁹Streptavidin/HRP Label, SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, Skytek Laboratories, Logan, Utah

kullanıldı. İnktraksiyon etkilerini görmek için Üç Yönlü Varyans Analizi yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) ve Post Hoc Tuckey testleri kullanıldı. 45 birimlik önemli fark, 70 birim standart sapma, %95 güven sınırı ve %80 power için örnek sayısı her grup için 10 sıçan olarak belirlendi. $P<0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesi için SPSS 15 Paket Veri Programı¹⁰ kullanıldı.

¹⁰SPSS 15 Inc., Chicago, IL

4. BULGULAR

Deney hayvanlarının çalışma öncesi vücut ağırlıklarının gruplar arasında farklılık göstermediği, 2 ve 6 aylık deney periyotları sonunda bütün hayvanlarında değişen oranlarda ağırlık artışı belirlendi. Bütün gruplarda deney sonrası vücut ağırlığının deney öncesine göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı ($P<0,05$).

Tablo 1. Deney Hayvanlarının Çalışma Öncesi ve Sonrası Ağırlıkları (gr)

Grup	Deney öncesi ağırlık ^a	Deney sonrası ağırlık ^b
1.grup	109,80 ± 7,16	240,90 ± 36,67
2.grup	111,80 ± 5,14	241,80 ± 42,03
3.grup	112,30 ± 5,52	253,60 ± 29,11
4.grup	108,70 ± 3,68	253,90 ± 33,72
5.grup	104,90 ± 3,48	361,90 ± 32,99
6.grup	108,30 ± 7,35	375,50 ± 26,21
7.grup	105,90 ± 6,23	297,40 ± 17,51
8.grup	108,20 ± 7,00	415,20 ± 49,62

(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. $P<0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Deney öncesi ağırlıklarda gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık yok ($P>0,05$)

^b Her grupta deney sonrası ağırlıklarda deney öncesi ağırlıklara göre istatistiksel anlamlı artış var($P<0,05$)

Dekapitasyon işlemini takiben etrafındaki yumuşak dokular ile çıkarılan mandibular molar dişler bölgesinde stereomikroskopta yapılan makroskopik değerlendirmede, kısa dönem ilaç verilen gruplarda (1.,2.,3.grup) dişeti büyümesi gözlenmezken uzun dönem ilaç verilen gruplarda (5.,6.,7.grup) dişeti büyümesi olduğu gözlemlendi. İlaç uygulanmayan kontrol gruplarında (4.,8.grup) ise dişetinde herhangi bir değişiklik izlenmedi. 5.grup ve 7.gruptaki dişetindeki makroskopik değişikliklerin, 6.grup ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu görüldü. Dişeti büyümesi görülen gruplarda lezyonların bukkal dişetinde olduğu, lingual dişetin daha az etkilendiği saptandı (Şekil 7 a-h).



Şekil 7a. Kısa dönem takrolimus uygulanan 1. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7b. Kısa dönem nifedipin uygulanan 2. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7c. Kısa dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 3. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7d. Kısa dönem kontrol grubuna (4.grup) ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7e. Uzun dönem takrolimus uygulanan 5. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7f. Uzun dönem nifedipin uygulanan 6. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7g. Uzun dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 7. gruba ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)



Şekil 7h. Uzun dönem kontrol grubuna (8.grup) ait mandibular molar bölgenin okluzal yüzeyden makroskopik görüntüsü (B:bukkal, L:lingual)

HE ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopunda 4x'lük büyütmede yapılan histopatolojik incelemede; makroskopik incelemeyi destekleyecek şekilde kısa dönem ilaç verilen gruplarda (1.,2.,3.grup) dişeti büyümesi gözlenmezken, uzun dönem ilaç verilen gruplarda (5.,6.,7.grup) bukkal dişeti dokusunun boyutlarında artış olduğu gözlemlendi. Doku boyutlarındaki bu artışın uzun dönem takrolimus uygulanan 5.grupta ve uzun dönem takrolimus ve nifedipinin kombine uygulandığı 7.grupta daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 8 e-h). Daha büyük büyütmede (10x) yapılan değerlendirmede; dişeti büyümesi görülen gruplarda epitel kalınlığının ve rete peg yapısının arttığı ve bağ dokusu boyutlarının genişlediği görüldü (Şekil 9e-h).

Aynı kesitlerde ışık mikroskopunda yapılan histomorfometrik değerlendirme bulguları (epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği ve bağ dokusu yüksekliği) Tablo 2,3,4'de verildi. Epitel kalınlığı yönünden değerlendirildiğinde, kısa dönem ilaç verilen 1. 2. ve 3.gruptaki değerlerde kontrol grubuna (4.grup) göre istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı bulundu ($P>0,05$). Uzun dönem ilaç verilen bütün gruplarda (5. 6. 7.grup) epitel kalınlığının kontrol grubuna (8.grup) göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı ($P<0,05$) saptandı. 5. ve 7. grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmazken ($P>0,05$) uzun dönem nifedipin uygulanan 6.gruptaki artışın 5. ve 7. gruba göre istatistiksel anlamlı olarak daha az olduğu bulundu ($P<0,01$).

Bağ dokusu genişliği yönünden değerlendirildiğinde, kısa dönem ilaç uygulanan 1. 2. ve 3.grupta kontrol grubuna (4.grup) göre farklılık bulunmazken ($P>0,05$), uzun dönem ilaç uygulanan 5.,6. ve 7.grupta bağ dokusu genişliğinin kontrol grubuna göre (8.grup) istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı ($P<0,001$). 5. ve 7.gruptaki bağ dokusu genişliğinin sadece nifedipin uygulanan 6.gruba göre istatistiksel anlamlı olarak fazla olduğu ($P<0,001$) diğer taraftan 5. ve 7. grup arasında farklılık olmadığı bulundu ($P>0,05$).

Bağ dokusu yüksekliği değerlendirildiğinde ise benzer şekilde kısa dönem ilaç uygulanan 1. 2. ve 3.grupta kontrol grubuna (4.grup) göre farklılık bulunmazken ($P>0,05$), uzun dönem ilaç uygulanan 5. ve 7.grupta bağ dokusu yüksekliğinin kontrol grubuna göre (8.grup) istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı ($P<0,001$). Epitel kalınlığı ve bağ dokusu genişliği değerlerinden farklı olarak bağ dokusu yüksekliğinde 6.gruptaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü

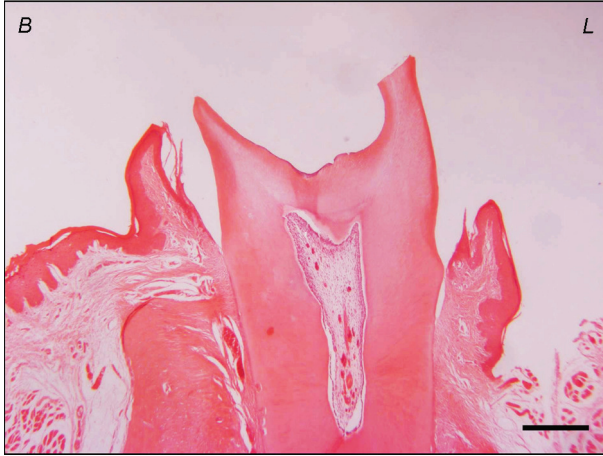
($P>0,05$). Diğer linear ölçümler ile benzer şekilde 5. grup ve 7. grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı bulundu ($P>0,05$).



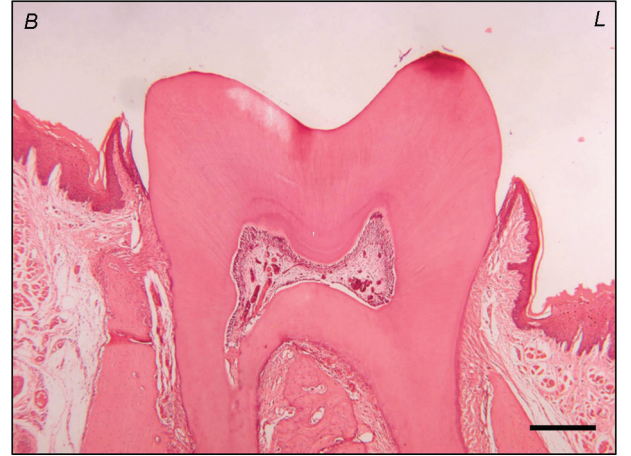
Şekil 8a. Kısa dönem takrolimus uygulanan 1.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkolingual yönde alınan kesitte görülen normal boyutlarda dişeti (HE, Bar=250µm)



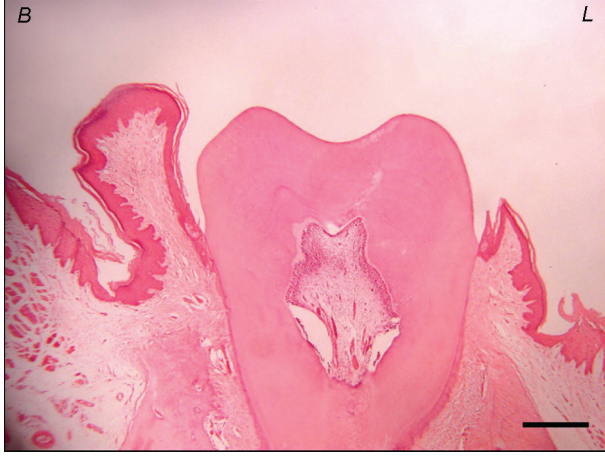
Şekil 8b. Kısa dönem nifedipin uygulanan 2.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkolingual yönde alınan kesitte görülen normal boyutlarda dişeti (HE, Bar=250µm)



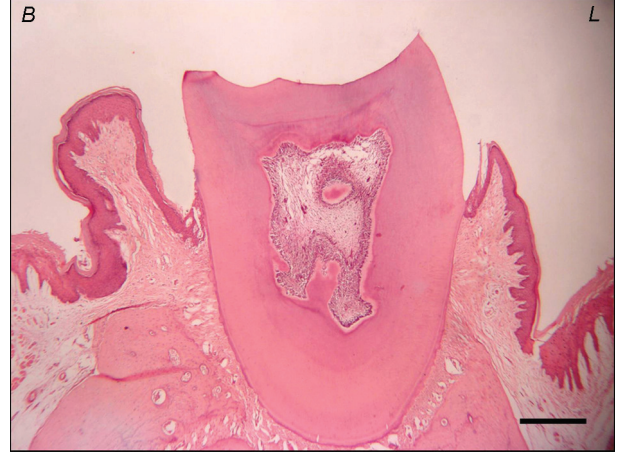
Şekil 8c. Kısa dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 3.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkolingual yönde alınan kesitte görülen normal boyutlarda dişeti (HE, Bar=250µm)



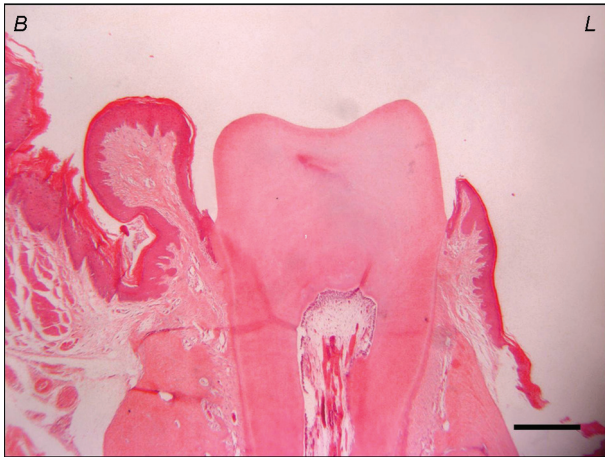
Şekil 8d. Kısa dönem kontrol grubuna (4.grup) ait mandibular birinci molar dişten bukkolingual yönde alınan kesitte görülen normal boyutlarda dişeti (HE, Bar=250µm)



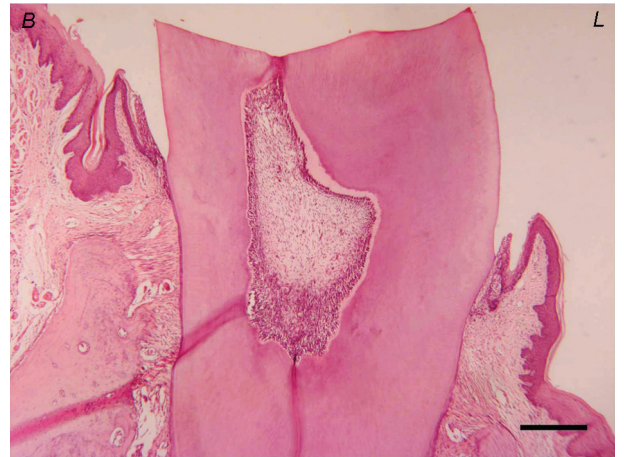
Şekil 8e. Uzun dönem takrolimus uygulanan 5.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkal-lingual yönde alınan kesitte görülen bukkal ve lingual dişeti boyutlarında artış (HE, Bar=250µm)



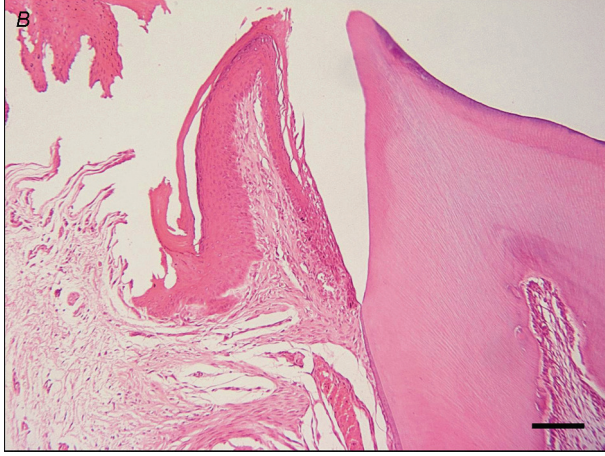
Şekil 8f. Uzun dönem nifedipin uygulanan 6.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkal-lingual yönde alınan kesitte görülen bukkal ve lingual dişeti boyutlarında artış (HE, Bar=250µm)



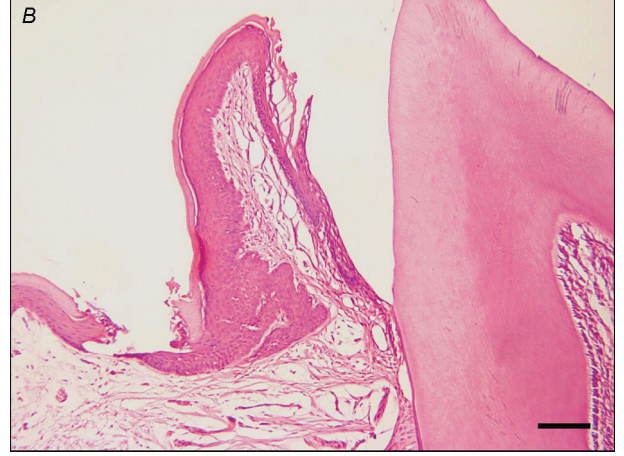
Şekil 8g. Uzun dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 7.gruba ait mandibular birinci molar dişten bukkal-lingual yönde alınan kesitte görülen bukkal ve lingual dişeti boyutlarında artış (HE, Bar=250µm)



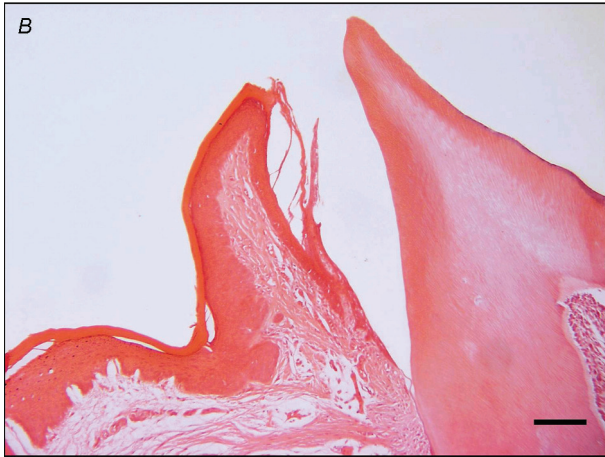
Şekil 8h. Uzun dönem kontrol grubuna (8.grup) ait mandibular birinci molar dişten bukkal-lingual yönde alınan kesitte görülen normal boyutlarda dişeti (HE, Bar=250µm)



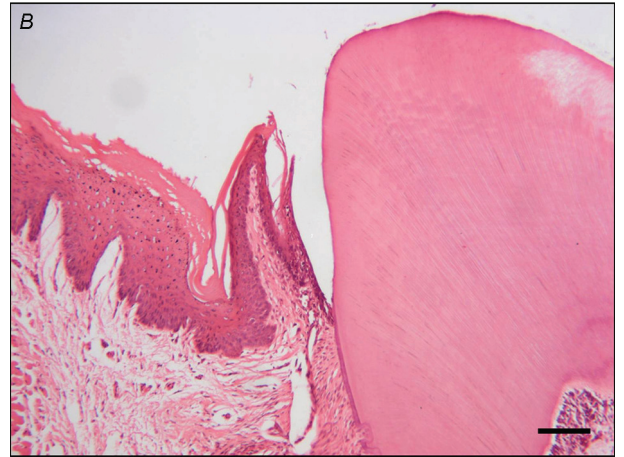
Şekil 9a. Kısa dönem takrolimus uygulanan 1.gruba ait normal kompozisyonda bukkal dişeti ve rete peg yapısı (HE, Bar=100µm)



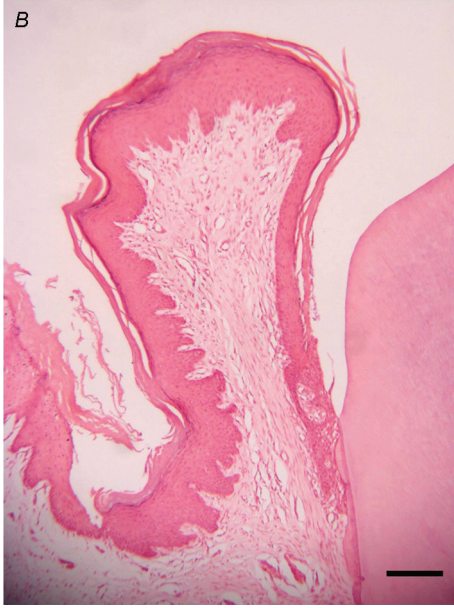
Şekil 9b. Kısa dönem nifedipin uygulanan 2.gruba ait normal kompozisyonda bukkal dişeti ve rete peg yapısı (HE, Bar=100µm)



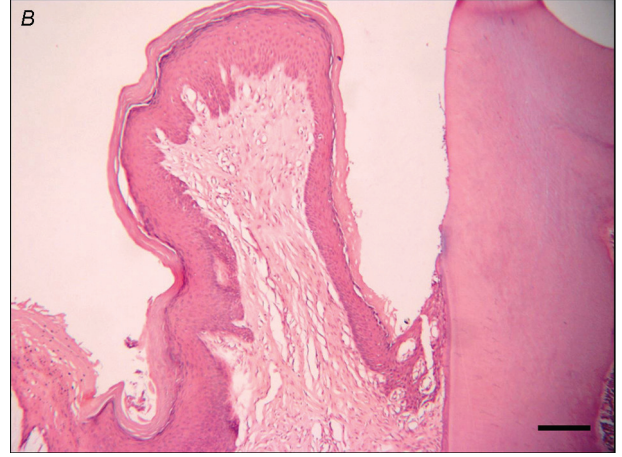
Şekil 9c. Kısa dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 3.gruba ait normal kompozisyonda bukkal dişeti ve rete peg yapısı (HE Bar=100µm)



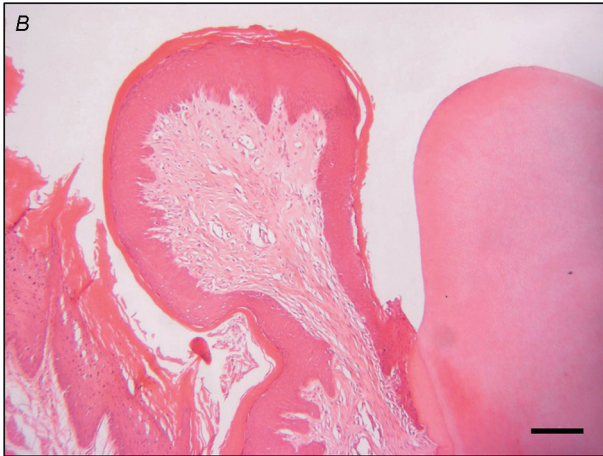
Şekil 9d. Kısa dönem kontrol grubuna (4.grup) ait normal kompozisyonda bukkal dişeti ve rete peg yapısı (HE, Bar=100µm)



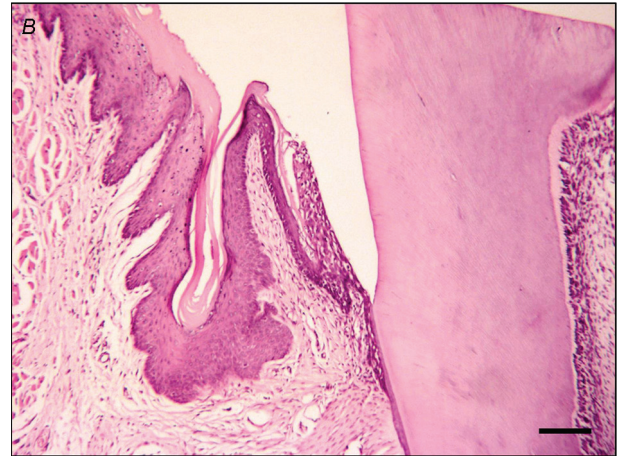
Şekil 9e. Uzun dönem takrolimus uygulanan 5.gruba ait bukkal dişeti epitel kalınlığı, bağ doku boyutları ve rete peg yapıda artış (HE, Bar=100µm)



Şekil 9f. Uzun dönem nifedipin uygulanan 6.gruba ait bukkal dişeti epitel kalınlığı, bağ doku boyutları ve rete peg yapıda artış (HE, Bar=100µm)



Şekil 9g. Uzun dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 7.gruba ait bukkal dişeti epitel kalınlığı, bağ doku boyutları ve rete peg yapıda artış (HE, Bar=100µm)



Şekil 9h. Uzun dönem kontrol grubuna (8.grup) ait normal kompozisyonda bukkal dişeti ve rete peg yapısı (HE, Bar=100µm)

Tablo 2. Epitel Kalınlığının Gruplara Göre Dağılımları (μm)

Grup	Epitel kalınlığı
1.grup	47,76 \pm 4,23 ^a
2.grup	49,99 \pm 5,74 ^a
3.grup	54,10 \pm 4,17 ^a
4.grup	45,34 \pm 8,02
5.grup	67,99 \pm 7,73 ^{b,d,e,f}
6.grup	56,15 \pm 3,39 ^{c,d}
7.grup	69,53 \pm 6,16 ^{b,d,e,f}
8.grup	46,98 \pm 7,43

(Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^b Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,05).

^c Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^d Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

^e 5.grup ve 7.grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^f 5. ve 7.grupta 6.gruba göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

Tablo 3. Bağ Doku Genişliğinin Gruplara Göre Dağlımları (μm)

Grup	Bağ doku genişliği
1.grup	131,71 \pm 18,07 ^a
2.grup	147,76 \pm 17,38 ^a
3.grup	151,71 \pm 22,91 ^a
4.grup	125,38 \pm 15,16
5.grup	231,70 \pm 21,35 ^{b,c,d,e}
6.grup	178,55 \pm 14,60 ^{b,c}
7.grup	243,23 \pm 21,42 ^{b,c,d,e}
8.grup	128,17 \pm 15,03

(Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. $P < 0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok ($P > 0,05$).

^b Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık var ($P < 0,05$).

^c Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var ($P < 0,001$).

^d 5.grup ve 7.grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ($P > 0,05$).

^e 5. ve 7.grupta 6.gruba göre istatistiksel anlamlı farklılık var ($P < 0,001$).

Tablo 4. Bağ Doku Yüksekliğinin Gruplara Göre Dağılımları (µm)

Grup	Bağ doku yüksekliği
1.grup	343,95 ± 31,98 ^a
2.grup	358,96 ± 49,65 ^a
3.grup	381,30 ± 53,66 ^a
4.grup	337,75 ± 46,77
5.grup	535,33 ± 59,62 ^{b,d,f,g}
6.grup	404,28 ± 16,85 ^{c,e}
7.grup	539,65± 93,37 ^{b,d,f,g}
8.grup	334,08 ± 40,37

(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^b Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,05).

^c Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

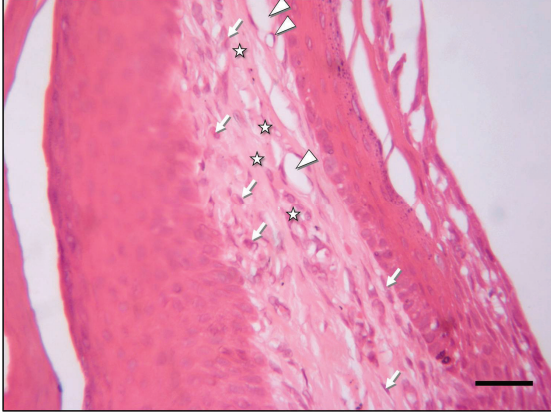
^d Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

^e Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

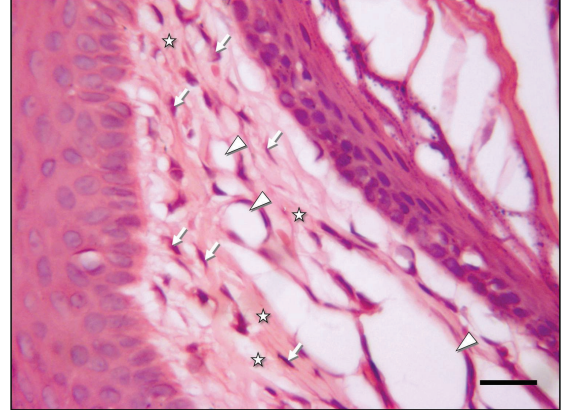
^f 5.grup ve 7.grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^g 5. ve 7.grupta 6.gruba göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

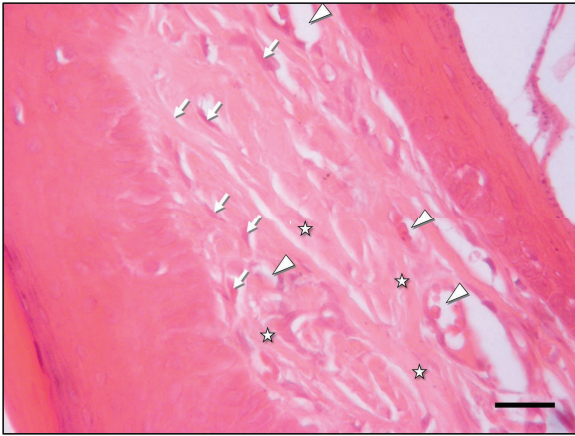
Stereolojik değerlendirme bulguları (tüm gruplardaki fibroblast hacim yoğunluğu, kollajen hacim yoğunluğu ve damar hacim yoğunluğu yüzdeleri) Tablo 5,6,7' de verildi. Fibroblast hacim yoğunluğunun sadece uzun dönem kombine ilaç uygulanan 7.grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksek olduğu (P<0,001), diğer uzun dönem gruplarda ise kontrol grubundan farklı olmadığı saptandı (P>0,05). Kollajen hacim yoğunluğu değerlendirildiğinde ise fibroblast hacim yoğunluğu ile benzer şekilde, uzun dönem ilaç uygulanan gruplardan sadece 7.grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı artış olduğu bulundu (P<0,001) Damar hacim yoğunluklarının ise gruplar arasında farklılık göstermediği saptandı (P>0,05). Fibroblast, kan damarları ve kollajen fibrillerin 40x'lık büyütmede görüntüleri Şekil 10(a-h)'da gösterildi.



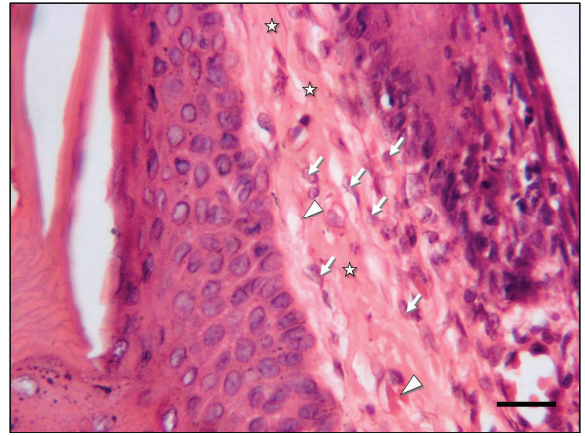
Şekil 10a. Kısa dönem takrolimus uygulanan 1.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



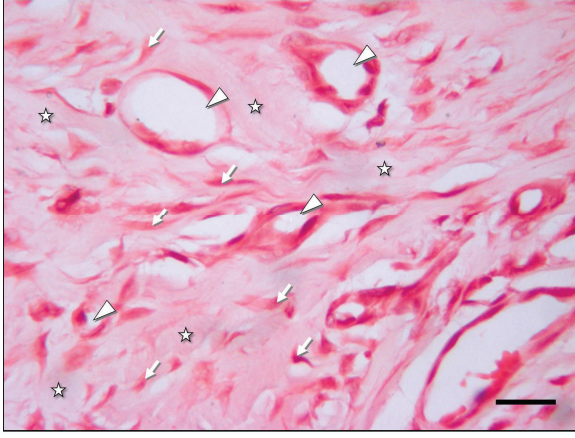
Şekil 10b. Kısa dönem nifedipin uygulanan 2.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



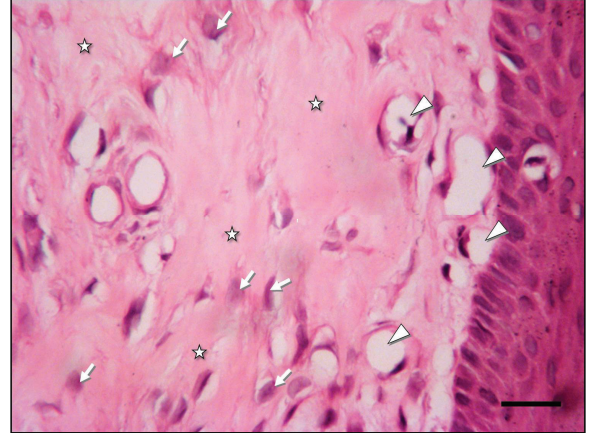
Şekil 10c. Kısa dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 3.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



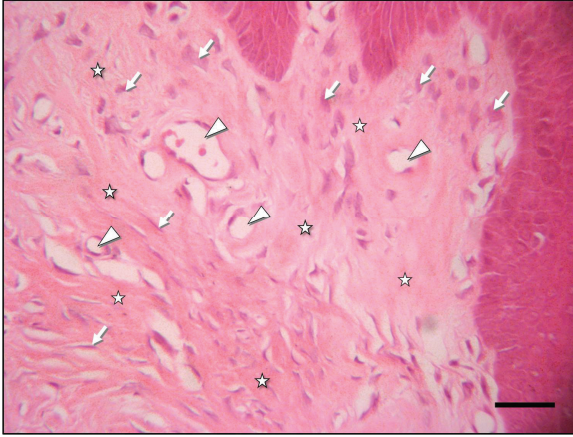
Şekil 10d. Kısa dönem kontrol grubuna (4.grup) ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



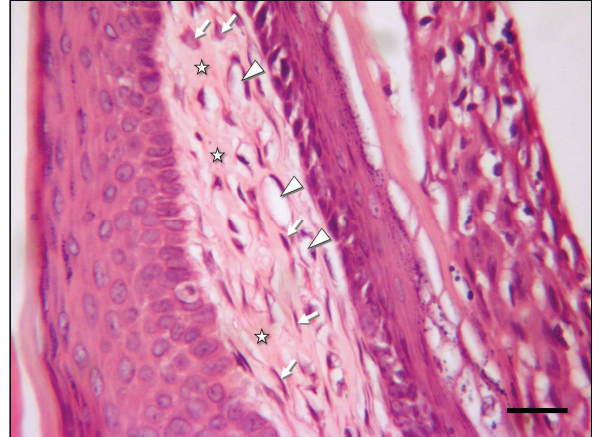
Şekil 10e. Uzun dönem takrolimus uygulanan 5.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



Şekil 10f. Uzun dönem takrolimus uygulanan 6.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



Şekil 10g. Uzun dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 7.gruba ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)



Şekil 10h. Uzun dönem kontrol grubuna (8.grup) ait kollajen, fibroblast ve kan damarları görüntüleri (HE, Bar=30µm, ok: fibroblast, yıldız: kollajen ok başı: damar)

Tablo 5. Deney Gruplarında Fibroblast Hacim Yoğunlukları (%)

Grup	Fibroblast Hacim Yoğunluğu
1.grup	0,219 ± 0,03 ^{a,c}
2.grup	0,232 ± 0,04 ^{a,c}
3.grup	0,239 ± 0,03 ^{a,c}
4.grup	0,213 ± 0,03
5.grup	0,242 ± 0,05 ^c
6.grup	0,229 ± 0,04 ^c
7.grup	0,295 ± 0,05 ^{b,d}
8.grup	0,217 ± 0,04

(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^b Kısa dönem gruplarına göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

^c Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^d Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

Tablo 6. Deney Gruplarında Kollajen Hacim Yoğunlukları (%)

Grup	Kollajen Hacim Yoğunluğu
1.grup	0,253 ± 0,04 ^{a,b}
2.grup	0,247 ± 0,04 ^{a,b}
3.grup	0,249 ± 0,03 ^{a,b}
4.grup	0,233 ± 0,03
5.grup	0,296 ± 0,04 ^{b,c}
6.grup	0,246 ± 0,03 ^{b,c}
7.grup	0,321 ± 0,08 ^{b,c}
8.grup	0,243 ± 0,03

(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^b Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^c Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

Tablo 7. DeneY Grublarında Damar hacim yoğunlukları (%)

Grup	Damar hacim yoğunluğu
1.grup	0,269 ± 0,05 ^a
2.grup	0,290 ± 0,06 ^a
3.grup	0,310 ± 0,07 ^a
4.grup	0,270 ± 0,04
5.grup	0,281 ± 0,04 ^b
6.grup	0,268 ± 0,06 ^b
7.grup	0,282 ± 0,07 ^b
8.grup	0,258 ± 0,05

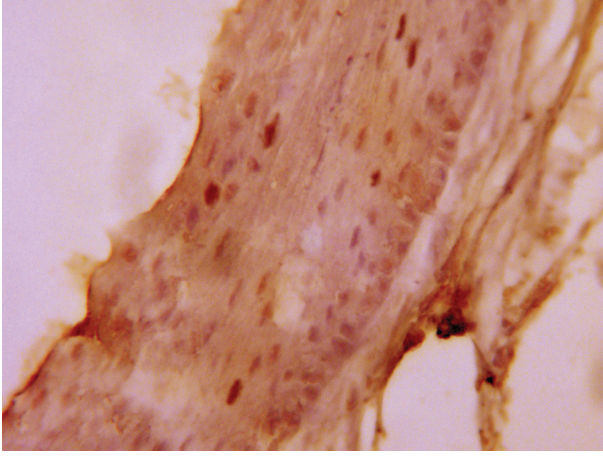
(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

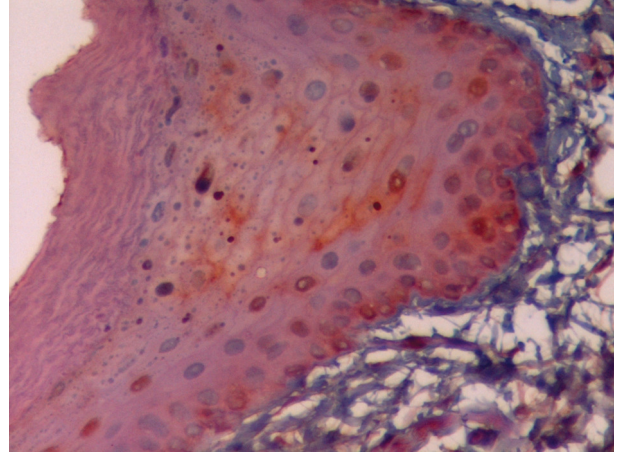
^bUzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

Yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede; epiteldeki hücrelerin çekirdeklerinde PTEN+ boyanma (PTEN immünreaktivitesi) izlenirken, bağ dokusundaki boyanmanın çekirdek düzeyinde olmadığı görüldü. Epitelde çekirdekleri boyanan hücrelerde boyanmanın heterojen olduğu, bütün gruplarda değişen yoğunluklarda PTEN + hücrelerin varlığı saptandı. PTEN immünreaktivitesinin kontrol gruplarında (4. ve 8.grup) deney gruplarına (1.,2.,3.,5.,6.,7.gruplar) göre daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 11a-h). Örneklerde, HSCORE yöntemi ile yapılan kantitatif değerlendirme sonucunda elde edilen bulgular Tablo 8'de verildi. Gruplar arası değerlendirmede ilaç uygulanan deney gruplarının tümünde (1.,2.,3.,5.,6.,7.grup) PTEN yoğunluğunun kontrol gruplarına (4. ve 8.grup) göre istatistiksel anlamlı olarak azaldığı saptandı (P<0,05). Kısa dönem ilaç uygulanan gruplardaki PTEN yoğunlukları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı görüldü (P>0,05). PTEN immünreaktivitesinin iki ilacın kombine uzun dönem uygulandığı 7.grupta, diğer gruplarla karşılaştırıldığında

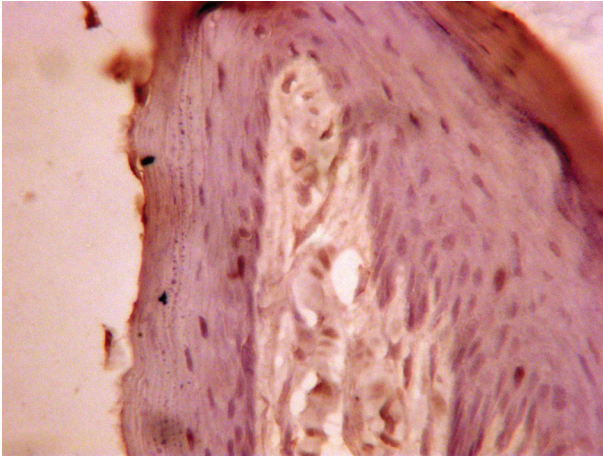
istatistiksel anlamlı olarak en düşük olduğu bulundu ($P<0,001$). İmmünohistokimya bulguları Tablo 8'de verildi.



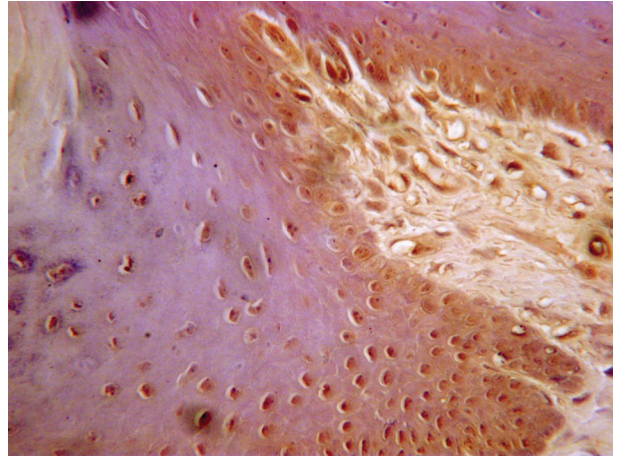
Şekil 11a. Kısa dönem takrolimus uygulanan 1.grupta az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



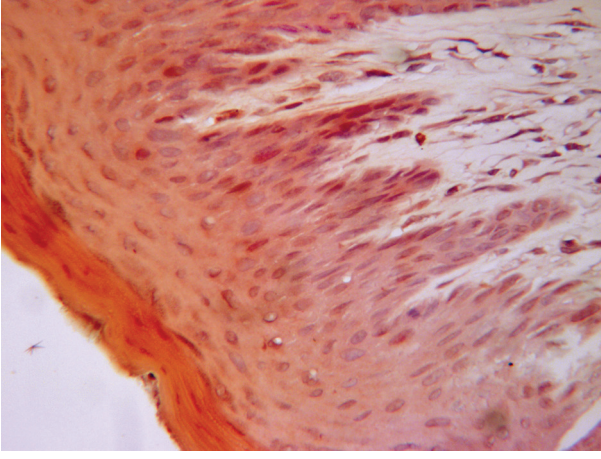
Şekil 11b. Kısa dönem nifedipin uygulanan 2.grupta az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



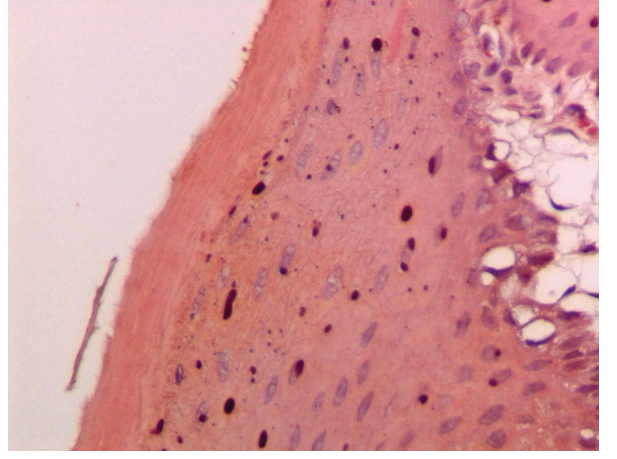
Şekil 11c. Kısa dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 3.grupta az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



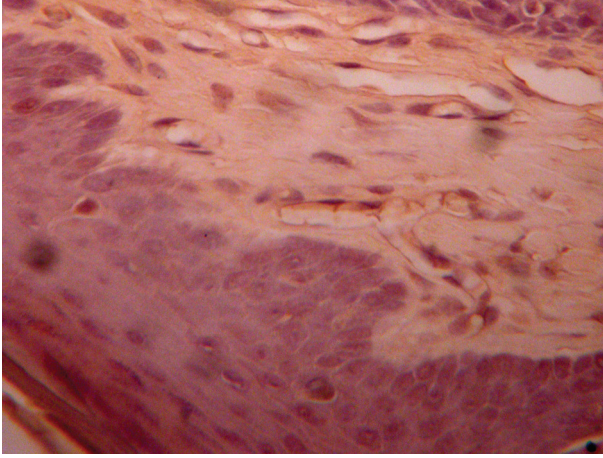
Şekil 11d. Kısa dönem kontrol grubunda (4.grup) çok sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



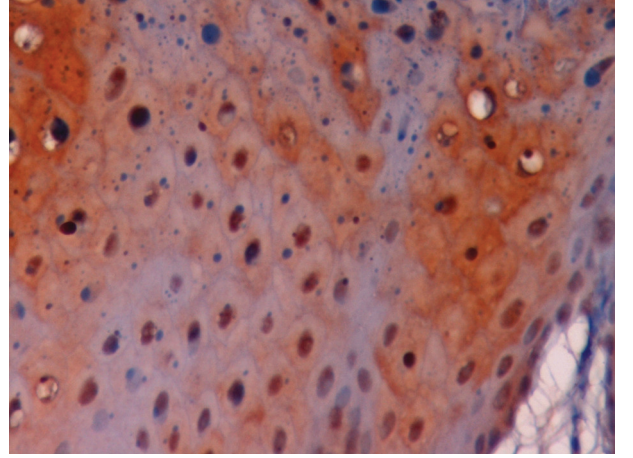
Şekil 11e. Uzun dönem takrolimus uygulanan 5.grupta az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



Şekil 11f. Uzun dönem nifedipin uygulanan 6.grupta az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



Şekil 11g. Uzun dönem takrolimus+nifedipin uygulanan 7.grupta çok az sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)



Şekil 11h. Uzun dönem kontrol grubunda (8.grup) çok sayıda PTEN+ hücreler (DAB, x40)

Tablo 8. PTEN HSCORE değerlerinin gruplara göre dağılımı (%)

Grup	PTEN immünreaktivitesi
1.grup	170,40 ± 29,90 ^{a,c,e}
2.grup	175,20 ± 22,24 ^{a,c,e}
3.grup	172,20 ± 19,44 ^{a,c,e}
4.grup	209,70 ± 22,47 ^e
5.grup	142,50 ± 19,90 ^{b,d,e}
6.grup	158,90 ± 25,44 ^{b,d,e}
7.grup	101,90 ± 15,18 ^b
8.grup	210,40 ± 21,58 ^e

(Veriler ortalama± standart sapma olarak verildi. P<0,05 istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi).

^a Kısa dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

^b Uzun dönem kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

^c Kısa dönem ilaç uygulanan gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^d 5. ve 6. grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (P>0,05).

^e 7.gruba göre istatistiksel anlamlı farklılık var (P<0,001).

Çalışmada iki ayrı ilacın ve zamanın etkisi ayrı ayrı Üç Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirildiğinde; ilaçların kombine kullanımının çalışmanın parametreleri üzerine etkisi olmadığı saptandı. Diğer taraftan zamanın tek başına bütün parametreler üzerine etkisi olduğu bulundu. Kısa dönem ve uzun dönem ilaç uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, zamanla ilaçların etkisinin arttığı görüldü. Uzun dönem ilaç uygulanan gruplardaki (5.,6. ve 7. grup) epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği, bağ dokusu yüksekliğinin kısa dönem ilaç uygulanan gruplara (1.,2. ve 3. grup) göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı (P<0,001).

5.TARTIŞMA

Dişeti hastalıkları arasında önemli bir yeri olan dişeti büyümesi, çeşitli ilaçların yan etkisi olarak da karşımıza çıkmaktadır. Dişeti büyümesine neden olan bir çok ilaç bulunmaktadır, immüsupresif bir ilaç olan takrolimus ve kalsiyum kanal blokeri olan nifedipin bu ilaçların arasında yer almaktadır.

Yaptığımız deneysel çalışmada; takrolimusun tek başına veya nifedipin ile birlikte dişeti dokusu üzerine etkileri, kontrol grupları ile karşılaştırılarak incelendi. Bu iki ilacın tek başına veya kombine olarak kısa dönem ve uzun dönem kullanımının dişetinde oluşturduğu değişikliklerin makroskobik, histomorfometrik ve stereolojik olarak incelendiği bu çalışma, ayrıca hücre proliferasyonunu indükleyen ve apoptozisi inhibe eden bir protein olan PTEN'in ilaca bağlı dişeti büyümesindeki rolünün değerlendirildiği ilk kontrollü çalışma olarak önem taşımaktadır.

İlaç kullanım süresi ve kombine ilaç kullanımı gibi farmakolojik risk faktörlerinin rolünün incelendiği bu çalışmada; makroskobik ve histomorfometrik bulgular değerlendirildiğinde, takrolimus ve nifedipinin tek başına veya kombine olarak kısa dönem kullanımının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dişeti büyümesine neden olmadığı; diğer taraftan uzun dönem ilaç uygulanan bütün deney gruplarında dişeti büyümesi olduğu saptandı. Uzun dönem ilaç uygulanan gruplarda görülen dişeti büyümesinin tek başına nifedipin verilen 6.grupta en az, kombine ilaç verilen 7.grupta ise en fazla olduğu görüldü

İlaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen risk faktörleri; yaş, cinsiyet, genetik predispozisyon gibi bireysel faktörler, ilacın dozu, serum konsantrasyonu, kullanım süresi ve kombine ilaç kullanımı gibi farmakolojik faktörler ve mikrobiyal dental plak birikimi ve dişeti enflamasyonu gibi periodontal faktörlerdir. Bu faktörlerin dişeti büyümesi patogenezindeki rolü ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları çelişkili olup, bu konuda halen kesin bir fikir birliği sağlanamamıştır (Seymour ve ark., 2000; Trackman ve Kantarcı, 2004).

İlaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen bireysel risk faktörleri; yaş, cinsiyet ve genetik predispozisyonudur. Yapılan çok sayıda klinik çalışmanın sonuçlarının bireysel farklılıklar ve buna bağlı ilaç metabolizmasında ve doku cevabındaki değişiklikler nedeniyle çelişkili olması araştırmacıları deneysel çalışmalara yöneltmiştir (Rost ve

Baker, 1978; Hall ve Squier, 1982; Carrel ve ark., 1983; Latimer ve ark., 1986; do Nascimento ve ark., 1985; Kitamura ve ark., 1990; Nyska ve ark., 1990; Fu ve ark., 1995 ; Nieh ve ark., 1996; Prabhu ve Mehta, 2006). İlaçların dişeti dokusundaki etkilerini çalışmak için geçmişte deney hayvanı olarak kedi, köpek, dağ gelinciği, kobay ve sıçan gibi çeşitli hayvan modelleri kullanılmıştır (Rost ve Baker, 1978; Hall ve Squier, 1982; Carrel ve ark., 1983; Latimer ve ark., 1986; do Nascimento ve ark., 1985; Kitamura ve ark., 1990; Nyska ve ark., 1990; Fu ve ark., 1995 ; Nieh ve ark., 1996; Prabhu ve Mehta, 2006). Bu deney hayvanları arasında; küçük olması, pahalı olmaması ve manüplasyonlarının kolay olmasından dolayı sıçanlar en fazla tercih edilen hayvan modelleridir.

Sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda ilaca bağlı dişeti büyümesinin genç ve erkek sıçanlarda %100 oranında izlendiği rapor edilmiştir (Morisaki ve ark., 1993; Ishida ve ark., 1995). Morisaki ve ark. (1993), siklosporin vererek oluşturdukları dişeti büyümesinin 15 günlük sıçanlarda %100, 30 günlük sıçanlarda %55 oranında olduğunu ve 60 günlük sıçanlarda dişeti büyümesinin oluşmadığını saptamışlar; Fischer sıçanların 8 haftalık olduğunda erişkin kabul edildiğini ve erişkin sıçanlarda dişeti büyümesi izlenmediğini bildirmişlerdir. Köpeklerde yapılan deneysel bir çalışmada, dişeti büyümesinin 6 aylık köpeklerde %100, 2 yaşındaki köpeklerde %42 olduğu rapor edilmiştir (Seibel ve ark., 1989). Del Pozo ve ark. (1995), 7 haftalık (ortalama vücut ağırlığı 176 gram) Wistar sıçanları genç, 40 haftalık (ortalama vücut ağırlığı 320 gram) sıçanları ise erişkin gruba dahil etmişlerdir. Bu veriler ışığında; takrolimus ve nifedipinin dişetine etkilerini incelediğimiz çalışmamızda duyarlılığı daha fazla olduğu bilinen ve ilaca cevabı hızlı olan, erkek cinsiyete sahip, genç gruba giren (5 haftalık ve vücut ağırlığı ortalama 100-120gr arası) Sprague Dawley sıçanlar kullanılarak yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığı gibi ilaca bağlı dişeti büyümesini etkileyebilecek faktörler standardize edildi.

Deneysel çalışmalarda dişeti büyümesi oluşabilmesi için gerekli süre, kullanılan hayvanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Makroskopik dişeti büyümesi oluşabilmesi için mongrel kedilerde 3 ay ve beagle köpeklerde 10 haftalık süre gereklidir (Hassell ve ark., 1982; Heijl ve Sundin, 1989). Sıçanlarda takrolimusa bağlı meydana gelen dişeti değişikliklerini inceleyen deneysel bir çalışmada kısa süreli tedavilerde (30 ve 60 gün) dişeti büyümesi oluşmadığı, ancak uzun süreli tedavide (180

ve 240 gün) ilacın dişeti büyümesine neden olduğu gösterilmiştir (Nassar ve ark., 2008). Nifedipin ile yapılan deneysel çalışmalarda ise kısa dönemde (3,6 ve 9 hafta veya 8,15,30 gün) dişeti büyümesi olduğu (Fu ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 2002) ve nifedipine bağlı dişeti büyümesinde ilacın uzun dönem kullanımının dişeti büyümesi şiddetini arttırdığı rapor edilmiştir (Fu ve ark., 1998; Haniastuti ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Brkić , 2004). Biz de bu literatürlerin ışığında çalışmamızda kısa dönem ilaç uygulama süresini 8 hafta ve uzun dönem ilaç uygulama süresini ise 24 hafta olarak belirledik.

Deneysel araştırmalarda takrolimus, oral ve subkütan olarak iki şekilde uygulanmaktadır. Etkinliđinin ve emiliminin göreceli olması sebebiyle ilacın klinikte intravenöz (iv) kullanımı ise nadiren gerekmektedir (Danovitch, 2001). Deneysel çalışmalarda takrolimus, oral olarak “gavage” yöntemi veya subkutan yol ile verilmiştir (Prabhu ve Mehta, 2006; Nassar ve ark., 2008; Spolidorio ve ark.,2005). Takrolimus ile yapılan deneysel çalışmalarda subkütan yol ile ilaç uygulanan deney hayvanlarında dişeti büyümesi oluşmazken, oral yoldan takrolimus uygulanan deney hayvanlarında dişeti büyümesi olduğu rapor edilmiştir (Praphu ve Mehta, 2006; Nassar ve ark., 2008; Spolidorio ve ark., 2005). Nifedipin ile yapılan deneysel çalışmalarda ilaç genellikle “gavage” yöntemi, “gastric feeding” yöntemi veya toz olarak diyeteye karıştırılarak uygulanmıştır (Morisaki ve ark., 1993; Fu ve ark.,1998; Chiu ve ark., 2001; Shimizu ve ark., 2002; Haniastuti ve ark., 2002; Spolidorio ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003; Brkić , 2004; Kato ve ark., 2005). Oral uygulamadan sonra, nifedipinin hemen hemen tümüyle absorbe olduğu bilinmektedir.

Bu literatür bilgileri ışığında, çalışmamızda 1,5 mg/kg dozda takrolimus ve 30 mg/kg dozda nifedipin hergün gavaj yoluyla uygulandı ve bu dozlarda uzun dönemde deney hayvanlarında dişeti büyümesinin olduğu görüldü. Çalışmamıza benzer bir deneysel çalışmada 1.5 mg/kg dozda oral yoldan takrolimus uygulanan sıçanlarda dişeti büyümesinin olduğu gösterilmiştir (Praphu ve Mehta, 2006). Nifedipin ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda ise 30 mg/kg dozda oral yoldan nifedipin uygulanan sıçanlarda dişeti büyümesinin olduğu bildirilmiştir (Fu ve ark., 1998; Haniastuti ve ark., 2002; Handajani ve ark., 2003).

Sıçanların periodontal dokuları insana oldukça fazla benzerlik göstermesine rağmen, anterior bölgedeki dişler ve periodontal dokular insandan oldukça farklıdır.

Farklı olarak keser dişlerin sürekli büyüüp yenilenmesi alt çenedeki incelemeleri etkileyebilmektedir (Klausen, 1991). Bu anatomik farklılıklar ve bu bölgedeki sürekli büyüme ve yenilenme (Del Fabbro ve ark., 2001) nedeniyle araştırmamızda çalışma bölgesi olarak sürme sürecinin tamamlandığı molar bölge seçilip ve değerlendirmeler bu bölgede yapılmıştır.

Sıçanlarda ilk kez deneysel dişeti büyümesi oluşturan Kitamura ve ark. (1990), siklosporin uyguladıkları deney hayvanlarında alt çene molar bölgede stereomikroskopta dişeti büyümesinin özellikle bukkal bölgede daha belirgin olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde 8 hafta ve 24 haftalık deney periyotları sonunda, dekapitasyon işlemini takiben etrafındaki yumuşak dokular ile çıkarılan mandibular molar dişler bölgesinde stereomikroskopta yapılan makroskopik değerlendirmede, kısa dönem ilaç verilen gruplarda (1.,2.,3.grup) dişeti büyümesi gözlenmezken, uzun dönem ilaç verilen gruplarda (5.,6.,7.grup) özellikle bukkal bölgede dişeti büyümesi olduğu gözlemlendi. İlaç uygulanmayan kontrol gruplarında (4. ve 8.grup) ise dişetinde herhangi bir değişiklik izlenmedi. Tek başına takrolimus uygulanan 5.grup ve kombine ilaç uygulanan 7.gruptaki dişeti değişikliklerinin tek başına nifedipin uygulanan 6.grup ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu ve lezyonların bukkal dişetinde olduğu, lingual dişetin daha az etkilendiği saptandı.

İlaca bağlı dişeti büyümesinin en önemli histopatolojik özellikleri, değişen kalınlıkta düzensiz çok katlı parakeratinize epitel, subepitelyal bağ doku derinliklerine penetre olan rete pegler ve onlarla ilişkili düzensiz yerleşimli kollajen fibril kümeleridir (Rateitschak-Pluss ve ark., 1983; Spolidorio ve ark., 2002; Nassar ve ark.,2008). Epitel kalınlığının ve bağ doku elemanlarının artışı dişeti büyümesinde rapor edilen önemli histometrik değişikliklerdir (Rateitschak-Pluss ve ark., 1983; Spolidorio ve ark., 2002; Nassar ve ark.,2008). Çalışmamızda yaptığımız histopatolojik incelemede, makroskopik incelemeyi destekleyecek şekilde kısa dönem ilaç verilen gruplarda (1.,2.,3.grup) dişeti büyümesi gözlenmezken, uzun dönem ilaç verilen gruplarda (5.,6.,7.grup) dişeti dokusunun boyutlarında artış olduğu gözlemlendi. Hem epitelde hem de bağ dokudaki bu boyutsal artışın uzun dönem takrolimus uygulanan 5.grupta ve uzun dönem takrolimus ve nifedipinin kombine uygulandığı 7.grupta daha belirgin olduğu görüldü. Dişeti büyümesi görülen gruplarda epitel kalınlığının ve rete peg yapısının arttığı, bağ dokusunun boyutlarının genişlediği görüldü. Nassar ve ark. (2008), yaptıkları deneysel

çalışmada uzun dönem takrolimus uygulanan (180 ve 240 gün) tüm sıçanlarda dişeti büyümesi oluştuğunu ve lezyonların alt molar dişlerin bukkal dişeti dokusunda daha belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. Dişeti epitelinin derin papiller girintilerle hiperplastik görünümü ve bağ dokunun boyutlarındaki artış da çalışmanın diğer bulgularıdır. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney gruplarında daha fazla kollajen lif gözlendiğini ve bunun da artan kollajen sentezini düşündürdüğünü ileri sürmüşlerdir (Nassar ve ark., 2008).

Histomorfometrik bulgularımız değerlendirildiğinde epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği ve yüksekliğinin kısa dönem ilaç verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık göstermediği bulundu. Epitel kalınlığı ve bağ dokusu genişliğinin uzun dönem ilaç verilen tüm gruplarda (5. 6. ve 7.grup) kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptandı. Ancak, sadece nifedipin uygulanan 6.gruptaki artışın diğer uzun dönem deney gruplarına göre daha az olduğu bulundu. Bağ dokusu yüksekliği yönünden değerlendirildiğinde, uzun dönem ilaç uygulanan gruplardan 5. ve 7. grupta istatistiksel anlamlı artış olduğu, 6. gruptaki artışın ise istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı. Nassar ve ark. (2008)'nın yaptıkları deneysel çalışmada çalışmamızın sonuçları ile benzer şekilde kısa dönem takrolimus uygulanan sıçanlarda epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği ve yüksekliği değerlerinde değişiklik gözlenmezken, uzun dönem takrolimus uygulanan sıçanlarda bu değerlerde artış olduğu gösterilmiştir. Diğer bir deneysel çalışmada, tek başına siklosporin, nifedipin ve bu ilaçların kombine olarak kullanıldığı deney gruplarında epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği ve yüksekliğinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (Spolidorio ve ark., 2002). Siklosporin ve takrolimus uygulanan sıçanlarda dişetinde meydana gelen morfolojik değişikliklerin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada, dördüncü hafta sonunda deney gruplarında dişeti büyümesi meydana geldiği ve dişetinin bukkal-lingual, mesio-distal ve vertikal yüksekliklerinde artış olduğu, ancak bu artışın siklosporin verilen grupta takrolimusa oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Prabhu ve Mehta, 2006).

Takrolimusa bağlı dişeti değişikliklerini inceleyen çalışma sayısı diğer ilaçlara göre daha azdır (Spolidorio ve ark., 2005; Prabhu ve ark., 2006; Sekiguchi ve ark., 2007; Nassar ve ark., 2008). Takrolimusa bağlı dişeti değişikliklerini ilk inceleyen çalışma 1991 yılında yapılmış ve 48 yaşında takrolimus kullanan bir hastada ilaç

kullanımının ilk 9 ayında dişetinde herhangi bir değişikliğe rastlanmazken, 12 aydan itibaren alt çenede insizal bölgede interdental papilde dişeti büyümesi olduğu rapor edilmiştir (Adams ve Famili, 1991). Yapılan klinik bir çalışmada transplantasyon sonrası takrolimus kullanan hastalarda 30 gün içinde dişetinde bir değişiklik gözlenmezken, 90 gün sonra takrolimus kullanan hastaların %10'unda dişeti büyümesi olduğu rapor edilmiştir (Sekiguchi ve ark., 2007). Spolidorio ve ark. (2005), 30 ve 60 gün boyunca takrolimus uyguladıkları sıçanlarda dişeti büyümesi oluşmadığını rapor ederken, diğer bir deneysel çalışmada çalışmamızın bulgularını destekleyecek şekilde 60 ve 120 gün boyunca takrolimus uygulanan sıçanlarda dişeti büyümesi oluşmadığı, fakat 180 ve 240 gün boyunca takrolimus uygulanan sıçanlarda dişeti büyümesi olduğu saptanmıştır (Nassar ve ark., 2008). Diğer taraftan deneysel bir çalışmada, takrolimus tedavisinin ikinci haftasında dişeti büyümesi olduğu gösterilmiştir ve iki hafta içerisinde dişeti büyümesi oluşumun takrolimusun yüksek dozda verilmesi ve ilacın uygulama yolu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Praphu ve Mehta, 2006).

Nifedipine bağlı dişeti büyümesinde ilaç kullanım süresinin rolünü inceleyen çalışmalarda ise takrolimus ile ilgili çalışmaların aksine sonuçlar çelişkili değildir. 3, 6 ve 9 hafta boyunca nifedipin uygulanan sıçanlarda 3-6 hafta arasında dişeti boyutlarının arttığı ve bunu takiben 6-9 hafta arasında dişeti büyümesinde bir artış olmadığı gösterilmiştir (Fu ve ark., 1998). Shimizu ve ark., yaptıkları deneysel çalışmada 8, 15, 30 gün boyunca nifedipin uygulanan sıçanlarda en fazla dişeti büyümesinin 30 gün nifedipin uygulanan grupta olduğunu rapor etmişlerdir (Shimizu ve ark., 2002). Benzer şekilde, daha uzun süre ve daha yüksek doz nifedipin verilen deney hayvanlarında daha belirgin dişeti büyümesi olduğu gösterilmiştir (Brkić ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda ise kısa dönem, yani 8 hafta tek başına veya takrolimus ve nifedipinin kombine uygulandığı sıçanlarda dişeti büyümesi oluşmazken; 24 hafta yani uzun dönem tek başına veya takrolimus ile kombine nifedipin uygulanan deney hayvanlarında dişeti büyümesi olduğu görülmüştür. Makroskopik ve histomorfometrik bulgular tek başına uzun dönem nifedipin uygulanan gruptaki (6. grup) dişeti büyümesinin diğer uzun dönem ilaç uygulanan gruplara (5. ve 7. grup) göre daha az olduğunu göstermektedir. Bu bulgular ilaç kullanım süresinin dişeti büyümesinin oluşumunu etkileyen önemli bir farmakolojik risk faktörü olduğunu düşündürmektedir.

İlacı bağlı dişeti bŸyŸmesinde kombine ilaç kullanımı diğer bir farmakolojik risk faktŸrŸdŸr. Transplantasyon yapılan hastalarda nifedipin ve takrolimusun kombine kullanımı, ilaçların tek başına kullanımına gŸre daha fazla dişeti bŸyŸmesine neden olmaktadır (Wondimu ve ark., 2001; James ve ark., 2001; McKaig ve ark., 2002; Spolidorio ve ark., 2002; Ellis ve ark., 2004; Spolidorio ve ark., 2006; Flynn ve ark., 2006; Costa ve ark.,2006; Greenberg ve ark., 2008). Ancak bu çalışmaların bulgularına karşıt olarak, takrolimus ve kalsiyum kanal blokerinin kombine kullanımı ile dişeti bŸyŸmesi arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı da gŸsterilmiřtir (Lima ve ark., 2008). Araştırdığımız ŸlŸde, takrolimus ve nifedipinin kombine kullanımının dişetinde meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen herhangi deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın makroskobik ve histomorfometrik bulguları takrolimus ve nifedipinin kombine olarak kısa dŸnem kullanıldığı 3.grupta dişetinde herhangi bir değişiklik olmadığını, ancak ilaçların uzun dŸnem kombine kullanıldığı 7. grupta dişeti bŸyŸmesinin oluştuğunu gŸstermektedir. Kombine ilaç kullanımının sadece uzun dŸnemde dişeti bŸyŸmesine yol aması, takrolimus ve nifedipine bağlı oluşan dişeti değişikliklerinin patogenezinde kombine ilaç kullanımının ilaç kullanım sŸresi kadar Ÿnemli bir değişken olmadığını gŸstermektedir. Bu iki parametrenin etkisi Ÿ YŸnlŸ Varyans Analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ilacın kullanım sŸresinin dişeti bŸyŸmesi için Ÿnemli bir risk faktŸrŸ olduğu, diğer taraftan kombine ilaç kullanımının daha zayıf bir belirleyici olduğu saptanmıştır.

İlacı bağlı dişeti bŸyŸmesi gŸrŸlen bireylerde; daha yŸksek oranda hŸcre proliferasyonu, DNA sentezi ve kollajen sentezi belirtilmiştir (Fujii ve ark., 1994; Takeuchi, 2004; Takeuchi ve ark., 2007). Takrolimusa bağlı dişeti bŸyŸmesinde ise, ilacın dişeti epitel hŸcrelerine, fibroblastlar ve kollajen sentezi Ÿzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir. Nassar ve ark. (2008), uzun dŸnem ilaç uygulanan sıçanlarda takrolimusun fibroblast sayısı ve kollajen sentezinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir Gagliano ve ark. (2005)'nın yaptığı in vitro çalışmada ise, takrolimusun kollajenaz gen ve protein ekspresyonunu indŸkleyerek tip-1 kollajen birikimini engellediği ve bŸylece ilacın dişeti bŸyŸmesine neden olmadığı gŸsterilmiřtir. Nifedipine bağlı dişeti bŸyŸmesinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ilacın direkt olarak fibroblastları etkilediği ve bunun sonucunda hŸcre proliferasyonu ve matriks sentezinin arttığı rapor edilmiştir (Fu ve ark., 1998). McKevit ve Irwin (1995),

nifedipine bağlı dişeti büyümesi oluşan hastaların fibroblastlarının dişeti büyümesi olmayanlara göre yüksek seviyede protein ve kollajen ürettiğini göstermişlerdir (McKevit ve Irwin, 1995; Sakagami ve ark., 2006). Fujii ve ark. (1994), nifedipine cevap veren bir hastadan alınan dişeti fibroblastlarının, nifedipine cevap vermeyen bir hastadan alınan fibroblastlardan daha fazla oranda proliferasyon, DNA ve kollajen sentezi gösterdiğini rapor etmişlerdir (Fujii ve ark., 1994; Takeuchi ve ark., 2007). Siklosporin ve nifedipinin tek başına veya kombine kullanımının neden olduğu dişeti büyümelerinin karşılaştırılmasını amaçlayan deneysel bir çalışmada dişeti dokusunda kollajen ve fibroblast yoğunluğunda artış olduğu belirtilmiştir (Spolidorio ve ark., 2002).

Stereolojik uygulamalar, biyolojik yapıların geometrik özelliklerinin (hacim, yüzey alanı, sayı v.b.) hesaplama yolu ile belirlenmesini sağlar. Böylece ince yapıdan sistemik düzeye kadar yer alan oldukça farklı büyüklükteki elemanlarda oluşan yapısal değişiklikler belirlenebilir. Stereolojik uygulamalar ile sağlanan bu bilgi, biyolojik yapıların kesitlerdeki görüntülerinden elde edilir. Stereolojik değerlendirmelerde, kesitlerde gözleyebildiğimiz bütün değişikliklere ait sayısal veriler elde edilebilir. Stereoloji, kesit alım işlemi ile oluşan bilgi ve boyut kaybını giderecek bir grup matematiksel ve istatistiksel metot sunmaktadır. Stereolojinin avantajı, hesaplamaların varsayımlara dayanan eski sayım tekniklerinde olduğu gibi gerçek değerinden sistematik olarak uzaklaşmamasıdır (Geinisman ve ark., 1996; West, 1999). Çalışmamızda stereolojik hücre sayım metodlarından hacim fraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Hacim fraksiyonu kısaca iki hacmin oranı olarak da tarif edilebilir. Diğer bir ifade ile incelediğimiz bir elemanın hacim fraksiyonu, o elemanın hacminin içerisinde bulunduğu referans hacmine oranıdır. Son yıllarda rutin histometrik değerlendirmelerin yerini stereolojik incelemeler almıştır ve ilaca bağlı dişeti büyümesinde doku boyutlarındaki artış, stereoloji ile daha objektif olarak değerlendirilebilmektedir.

Çalışmamızın stereolojik verileri değerlendirildiğinde; fibroblast hacim yoğunluğu ve kollajen hacim yoğunluğunun sadece uzun dönem kombine ilaç uygulanan 7.grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak fazla olduğu, diğer gruplarda ise kontrol grubundan farklı olmadığı saptandı. Damar hacim yoğunluklarının ise gruplar arasında farklılık göstermediği saptandı. Çalışmamız takrolimus ve

nifedipinin dişeti üzerine etkisini stereolojik olarak değerlendiren ilk çalışmadır. Takrolimusun 60,120,180,240 gün süreyle uygulandığı sıçanlarda fibroblast ve kollajen hacim yoğunluğu incelenmiş ve fibroblast ve kollajen hacim yoğunluklarının artışı ile karakterize dişeti büyümesi gözlemlendiği rapor edilmiştir (Nassar ve ark., 2008). Spolidorio ve ark. (2002), siklosporin ve nifedipinin tek başına ve kombine kullanımın dişeti büyümesi üzerine etkisini inceledikleri stereolojik çalışmada bütün ilaç uygulanan gruplarda fibroblast ve kollajen hacim yoğunluğunun arttığını, siklosporin ve nifedipinin kombine kullanıldığı grupta bu artışın daha belirgin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda dişeti büyümesi görülen gruplardan sadece histomorfometrik olarak en şiddetli dişeti büyümesinin olduğu saptanan kombine ilaç uygulanan 7.grupta fibroblast proliferasyonu ve kollajen birikimi tespit edildi. Makroskopik ve histomorfometrik bulgulardan farklı olarak uzun dönem ilaç uygulanan 5. ve 6. grupta fibroblast ve kollajen hacim yoğunluğundaki artışın istatistiksel anlamlı olmadığı bulundu. Histomorfometrik verilerimizin 5. ve 7.grupta benzer olmasına rağmen stereolojik bulgularımız iki ilacın kombine kullanıldığı 7.grupta hücre proliferasyonu ve kollajen seviyesinin daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Bu bulgular kombine ilaç kullanımının ilaç kullanım süresi kadar olmasa da ilaca bağlı dişeti büyümesi şiddetini etkilediğini düşündürmektedir.

İlaca bağlı dişeti büyümesinde çeşitli proliferasyon belirleyicilerinin rolü araştırılmıştır. Saito ve ark. (1999)'nın yaptığı çalışmada, bir nükleer protein olan Ki-67'nin rolünü nifedipine bağlı dişeti büyümesinde araştırılmış ve dişeti büyümesinde gözlenen artmış epitel kalınlığının keratinositlerin artan mitotik aktiviteleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Çetinkaya ve ark. (2006), yaptıkları deneysel çalışmada epitel hücre proliferasyonu yani mitotik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilen PCNA ekspresyonunun siklosporine bağlı dişeti büyümesi görülen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir. İnflamasyon şiddeti ve PCNA (%) arasındaki ilişki incelendiğinde ise hafif (+) ve orta şiddetli (++) inflamasyon varlığında mitotik aktivitenin arttığını, yoğun (+++) enflamasyon varlığında ise, bu artışın daha az olduğunu rapor etmişlerdir. Bulut ve ark. (2006), siklosporine bağlı dişeti büyümesi olan böbrek nakli geçirmiş bireylerden ve sistemik sağlıklı bireylerden alınan dişeti örneklerini değerlendirmişler ve PCNA ekspresyonunun siklosporine bağlı dişeti büyümesi görülen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak arttığını

rapor etmişlerdir. Tümör baskılayıcı bir gen olan ve hiperproliferatif sinyaller ile aktive olan p53'ün rolünü inceleyen bir araştırmada ise nifedipin ile tedavi edilen sıçanların dişeti epitel tabakasında güçlü bir p53 protein boyanması olduğu ve doz ve tedavi süresi arttıkça p53 pozitif dişeti hücrelerinin sayılarının arttığı gösterilmiştir (Haniastuti ve ark., 2002).

İlaça bağlı dişeti büyümesinin patogenezinde hücre proliferasyonunun artışından çok hücre ölümünün azalmasının önemli rol oynadığını rapor eden araştırmacılar da vardır. Shimizu ve ark., (2002)'nin yaptığı çalışmada, nifedipine bağlı dişeti büyümesinde keratinosit proliferasyonunda artış gösterilememiş olup, dişeti dokusundaki artışın keratinositlerin ömründeki artış ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Benzer şekilde Niimi ve ark., (1990), siklosporine bağlı dişeti büyümesinde keratinositlerin yaşam sürelerinin artışının önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada proliferasyon belirleyicileri olan Ki67 ve siklin B1 seviyelerinin nifedipine bağlı dişeti büyümesinde kontrol grubu ile benzer olduğu bulunmuş ve gingival hiperplazinin apoptozis belirleyicilerinin azalması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Castro ve ark., 2010).

Handajani ve ark. (2003) yaptıkları deneysel çalışmada, nifedipin ile tedavi edilen sıçanların dişeti dokularında doz ve sıklığa bağımlı olarak bir antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun arttığını ve böylece nifedipine bağlı oluşan dişeti büyümesinin etyopatogenezinde Bcl-2 proteinin rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bulut ve Özdemir (2007), caspase-3 seviyesindeki azalmanın siklosporine bağlı dişeti büyümesinin patogenezinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Kantarcı ve ark., (2007), dişeti büyümesinde Foxo ve Caspase 3 apoptozis indekslerini değerlendirmiş ve Foxo ve Caspase 3 salınımının fibroblastlarda proliferatif aktivitenin artmasına ve apoptozisin azalmasına neden olduğunu ve bu etkinin dişeti büyümesinin oluşumunda rol alabileceğini bildirmişlerdir.

Hücre proliferasyonunu inhibe eden ve apoptozisi indükleyen bir protein olan PTEN birçok ilerlemiş kanser türünde mutasyona uğrar. Nitekim, PTEN ekspresyonunun kaybı veya azalmasının yüksek tümör insidansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 1997; Stambolic ve ark., 1998; 2000; Tamura ve ark., 1998; 1999; Eason ve ark., 2004; White ve ark., 2006; Nho ve ark., 2006). Meme, beyin, prostat ve böbrek ile ilişkili kanserler, endometriyum karsinomu, malign melanom ve

tiroid tümörlerinde somatik PTEN kaybı ve mutasyonu gösterilmiştir (Yang ve ark., 2010). Endometriyumda yapılan bir çalışmada PTEN ekspresyon kaybının premalign evre boyunca kısmen endometriyal kanserlerle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Sarmadi ve ark., 2009). Son yıllarda bu proteinin ekspresyonu veya aktivitesinin; romatoid artrit, astım ve pulmoner fibrozis gibi doku yıkımı ve yeniden yapılanması ile karakterize olan malign olmayan hastalıkların patogeneziyle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Pap ve ark., 2000; Kwak ve ark., 2003; White ve ark., 2003; 2006).

Yapılan araştırmalarda, PTEN aktivitesinin kollajen matriks kontraksiyonuna cevap olarak arttığı gösterilmiştir (Nho ve ark., 2006). Kontraksiyon sırasında PTEN'in bu artışı fibroblast apoptozisinin indüksiyonuna neden olmaktadır. Doku tamirinin son aşamalarında kollajen matriks kontraksiyonunu takiben fibroblastlar apoptozis ile elimine edilir, böylece doku hücreleri azalır. Bu fizyolojik işlem fibrotik doku oluşumunun azalmasında ve normal doku yapısının korunmasında önemli rol oynar (Nho ve ark., 2006). Pulmoner fibrozisli hastaların akciğerlerinden izole olmuş fibroblastlarda azalmış PTEN ekspresyonu gözlenmiştir ve PTEN inhibisyonunun fibrotik akciğer hastalıklarının patogeneziye katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (White ve ark., 2003; 2006). Ayrıca endometrial hiperplazili hastalarda PTEN'in tamamen kaybolduğu rapor edilmiştir (Tantbirojn ve ark., 2008).

Bu bilgilerin ışığında, PTEN'in ilaca bağlı dişeti büyümesinin patogeneziinde rol alıp almadığını ilk kez araştırdığımız çalışmamızın immünohistokimyasal bulguları, PTEN immünreaktivitesinin kontrol gruplarında deney gruplarına (1.,2.,3.,5.,6.,7.grup) göre daha yoğun olduğunu göstermektedir. PTEN immünreaktivitesinin iki ilacın kombine olarak uzun dönem uygulandığı 7.grupta diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak en düşük olduğu bulundu. İlaç uygulanan gruplarda PTEN seviyesinin düşmesi çalışmamızın hipotezini desteklemektedir. Çalışmanın histomorfometrik ve stereolojik bulgularından farklı olarak kısa dönem ilaç uygulanan gruplarda da PTEN seviyesi düşük bulunmuştur. Ayrıca, PTEN'in kombine uzun dönem ilaç uygulanan 7.grupta en düşük seviyede olması dişeti büyümesinin etyopatogeneziinde hücrel ve moleküler mekanizmaların farklılık gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamız, multifaktöryel olduğu bilinen ve halen etyopatogeneziinde aydınlatılması gereken birçok nokta olan ilaca bağlı dişeti büyümesinde PTEN

ekspresyonunu değerlendiren ilk çalışmadır. Bulgularımız, ilaca bağlı dişeti büyümesinde dokudaki PTEN ekspresyonunun azaldığına ve bu proteinin dişeti büyümesi patogenezinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızın sınırları dahilinde, bulgularımızın destekleneceği ve bu proteinin seviyesini arttıracak tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncülük edecek yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Takrolimusun tek başına veya nifedipin ile birlikte kısa ve uzun dönem kullanımının meydana getirdiği dişeti değişikliklerinin makroskopik, histomorfometrik ve stereolojik yöntemler ile incelendiği ve PTEN'in ilaca bağlı dişeti büyümesindeki rolünün immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışmamızda;

1. Stereomikroskopta yapılan makroskopik değerlendirmede uzun dönem ilaç uygulanan gruplardaki (5.,6.,7.grup) tüm deney hayvanlarında dişeti büyümesi izlendi.

2. Histomorfometrik değerlendirmede epitel kalınlığı, bağ dokusu genişliği ve yüksekliğinin kısa dönem ilaç uygulanan 1. 2. ve 3. grupta kontrol (4. grup) grubu ile benzer olduğu görüldü.

3. Histomorfometrik değerlendirmede uzun dönem ilaç uygulanan 5.,6. ve 7.grupta epitel kalınlığının ve bağ dokusu genişliğinin kontrol grubuna göre (8.grup) istatistiksel anlamlı olarak arttığı görüldü.

4. Histomorfometrik değerlendirmede bağ dokusu yüksekliğinin uzun dönem ilaç uygulanan 5. ve 7.grupta kontrol grubuna göre (8.grup) istatistiksel anlamlı olarak arttığı 6. gruptaki artışın ise kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olmadığı görüldü.

5. Stereolojik değerlendirmede fibroblast hacim yoğunluğu ve kollajen hacim yoğunluğunun sadece uzun dönem kombine ilaç uygulanan 7.grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak fazla olduğu, diğer gruplarda ise kontrol grubundan farklı olmadığı görüldü.

6. Stereolojik değerlendirmede damar hacim yoğunluklarının gruplar arasında farklılık göstermediği görüldü.

7. İmmünohistokimyasal değerlendirmede bütün gruplarda epiteldeki hücrelerin çekirdeklerinde PTEN+ boyama (PTEN immünreaktivitesi) izlenirken, bağ dokudaki boyanmanın çekirdek düzeyinde olmadığı görüldü.

8. PTEN immünreaktivitesinin kontrol gruplarında (4. ve 8.grup) deney gruplarına (1.,2.,3.,5.,6.,7.grup) göre istatistiksel anlamlı olarak fazla olduğu görüldü

9. Zaman ve iki ilacın etkisi Üç Yönlü Varyans analizi ile değerlendirildiğinde zamanla doğru orantılı olarak ilaçların etkisinin arttırdığı görüldü.

10. Çalışmamızın bulguları PTEN'in dişeti büyümesi patogenezinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

11. Takrolimusun tek başına veya nifedipin ile birlikte kullanılarak oluşturulan deneysel dişeti büyümesinde yaptığımız makroskopik, histopatolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda ilaç kullanım süresi ve kombine ilaç kullanımı gibi ilaca bağlı dişeti büyümesini etkileyen risk faktörlerini de değerlendirdiğimiz deneysel çalışmamızın bulguları, ilaç kullanım süresinin kombine ilaç kullanımına göre dişeti büyümesi şiddetini etkileyen daha önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abernethy DR, Schwartz JB. Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med.* 1999; 4;341(19):1447-1457.
- Adalı A. Farklı immünsupresan ajanların gingival büyüme üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora tezi, 2007;26-43.
- Adams C.K.S., Famili P. A Study of the Effects of the Drug FK 506 on Gingival Tissues. *Transplant Proc.* 1991; 23(6): 3193-3194.
- Adams D, Davies G. Gingival hyperplasia associated with cyclosporin A. A report of two cases. *Br Dent J.* 1984;157(3):89-90.
- American Academy of Periodontology. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*, 1999.
- Angelopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;34(6):898-906.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
- Atila G, Kütükçüler N. Crevicular fluid interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 levels in renal transplant patients receiving cyclosporine A. *J Periodontol.* 1998;69(7):784-790.
- Bader G, Lejeune S, Messner M. Reduction of cyclosporine-induced gingival overgrowth following a change to tacrolimus. A case history involving a liver transplant patient. *J Periodontol.* 1998;69(6): 729-732.
- Barclay S, Thomason JM, Idle JR, Seymour RA. The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 1992;19(5):311-314.
- Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000.* 2000;24:28-55.
- Bhathal PS, Gall JA. Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferative stimulus. *Liver.* 1985;5(6): 311-325.
- Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9231-9235.
- Boltchi FE, Rees TD, Iacopino AM. Cyclosporine A-induced gingival overgrowth: a comprehensive review. *Quintessence Int.* 1999;30(11):775-83.
- Bornhövd, Burgdorf WH, Wollenberg A. Macrolactam immunomodulators for topical treatment of inflammatory skin diseases. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(5):736-743.
- Brkic Z. Influence of nifedipine on gingiva of wistar rats. *Vojnosanit Pregl.* 2004;61(1):5-8.
- Bullon P, Gallardo I, Goteri G, Rubini C, Battino M, Ribas J, Newman HN. Nifedipine and cyclosporin affect fibroblast calcium and gingiva. *J Dent Res.* 2007; 86(4): 357-362.

- Bulut S, Uslu H, Ozdemir BH, Bulut OE. Analysis of proliferative activity in oral gingival epithelium in immunosuppressive medication induced gingival overgrowth. *Head Face Med.* 2006;19(2):13.
- Cardenas ME, Hemenway C, Muir RS, Ye R, Fiorentino D, Heitman J. Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* 1994;13(24): 5944-5957.
- Carranza FA, Hogan EL. Middle East And African Edition Carranza's Clinical Periodontology. 10th ed, 2007, Ch 23;373-390.
- Carrel R, Ba TT, Chapman MK. Gingival aberrations in Dilantin-treated guinea pigs. *J Pedod.* 1983; 7(3): 229-240.
- Castro LA, Elias LS, Oton-Leite AF, de Spíndula-Filho JV, Leles CR, Batista AC, Mendonça EF. Long-term effects of nifedipine on human gingival epithelium: a histopathological and immunohistochemical study. *J Oral Sci.* 2010;52(1):55-62.
- Cezário ES, Cota LO, Ferreira SD, Siqueira FM, Soares RV, Zenóbio EG, Coste FO. Gingival overgrowth in renal transplant subjects medicated with tacrolimus in the absence of calcium channel blockers. *Transplantation.* 2008;85(2):232-236.
- Chiu H, Fu E, Chiang CY, Liu D. Does Nifedipine Aggravate cyclosporin-induced gingival overgrowth? An experiment in rats. *J Periodontol.* 2001;72(4):532-537.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003;289(19):2560-2572.
- Chung M, Reitberg DP, Gaffney M, Singleton W. Clinical pharmacokinetics of nifedipine gastrointestinal therapeutic system. A controlled-release formulation of nifedipine. *Am J Med.* 1987;21;83(6B):10-14.
- Cota LO, Viana MB, Moreira PR, Gomez RS, Cortelli JR, Cortelli SC, Costa FO. Gingival overgrowth in cyclosporine, tacrolimus, or sirolimus-based immunosuppressive regimens and the single nucleotide IL-6 (-174 G/C) gene polymorphism. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):494-501.
- Cotrim P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction of transforming growth factor-beta1. *J Periodontol.* 2003;74(11):1625-1633.
- Çetinkaya BÖ. Ratlarda oluşturulan siklosporin A'ya bağlı dişeti büyümesinin makroskopik, histopatolojik, histomorfometrik ve immunhistokimyasal olarak incelenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, 2004:13-27.
- Çetinkaya BO, Acıkgöz G, Ayas B, Aliyev E, Sakallıoğlu EE. Increased expression of vascular endothelial growth factor in cyclosporin A-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol.* 2006;77(1):54-60.
- Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: A multiple choice question. *Kidney Int.* 2001;59(1):388-402.
- Del Fabbro M, Francetti L, Bulfamante G, Cribiù M, Miserocchi G, Weinstein RL. Fluid dynamics of gingival tissues in transition from physiological condition to inflammation. *J Periodontol.* 2001;72(1):65-73.

- Deliliers GL, Santoro F, Polli N, Bruno E, Fumagalli L, Risciotti E. Light and electron microscopic study of cyclosporin A-induced gingival hyperplasia. *J Periodontol.* 1986;57(12):771-775.
- del Pozo E, Lippuner K, Ruch W, Casez JP, Payne T, MacKenzie A, Jaeger P. Different effects of cyclosporin A on bone remodeling in young and adult rats. *Bone.* 1995;16(4 Suppl):271S-275S.
- De Oliveira Costa F, Diniz Ferreira S, de Miranda Cota LO, da Costa JE, Aguiar MA. Prevalence, severity, and risk variables associated with gingival overgrowth in renal transplant subjects treated under tacrolimus or cyclosporin regimens. *J Periodontol.* 2006;77(6): 969-975.
- do Nascimento A, Barreto Rde C, Bozzo L, de Almeida OP. Interaction of phenytoin and inflammation induces gingival overgrowth in rats. *J Periodontal Res.* 1985;20(4):386-391.
- Eason RR, Velarde MC, Chatman L, Till SR, Geng Y, Ferguson M, Badger TM, Simmen RC. Dietary exposure to whey proteins alters rat mammary gland proliferation, apoptosis, and gene expression during postnatal development. *J Nutr.* 2004;134(12):3370-3377.
- Ellis JS, Monkman SC, Seymour RA, Idle JR. Determination of nifedipine in gingival crevicular fluid: a capillary gas chromatographic method for nifedipine in microlitre volumes of biological fluid. *J Chromatogr.* 1993;621(1):95-101.
- Ellis JS, Seymour RA, Steele JG, Robertson P, Butler TJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth induced by calcium channel blockers: a community-based study. *J Periodontol.* 1999;70(1):63-67.
- Ellis JS, Seymour RA, Taylor JJ, Thomason JM. Prevalence of gingival overgrowth in transplant patients immunosuppressed with tacrolimus. *J Clin Periodontol.* 2004;31(2):126-131.
- Fattore L, Stablein M, Bredfeldt G, Semla T, Moran M, Doherty-Greenberg JM. Gingival hyperplasia: a side effect of nifedipine and diltiazem. *Spec Care Dentist.* 1991;11(3):107-109.
- Fiorellini JP, Kim DM, Ishikawa SO. Middle East And African Edition Carranza's Clinical Periodontology. 10th ed, 2007, Ch 4; 46-67.
- Flynn JC, Henderson JS, Johnson RB. Synergism between nifedipine and cyclosporine A on the incorporation of [³⁵S] sulfate into human gingival fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res.* 2006;41(4): 316-321.
- Frishman WH, Garofalo JL, Rothschild A, Rothschild M, Greenberg SM, Soberman J. The nifedipine gastrointestinal therapeutic system in the treatment of hypertension. *Am J Cardiol.* 1989;64(11):65F-69F.
- Fu E, Nieh S, Chang HL, Wang SL. Dose-dependent gingival overgrowth induced by cyclosporin in rats. *J Periodontol.* 1995; 66(7):594-598.
- Fu E, Nieh S, Hsiao CT, Hsieh Y, Wikesjö UM, Shen EC. Nifedipine-induced gingival overgrowth in rats: brief review and experimental study. *J Periodontol.* 1998;69(7): 765-771.
- Fujii A, Matsumoto H, Nakao S, Teshigawara H, Akimoto Y. Effect of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA synthesis and collagen synthesis of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine responders and non-responders. *Arch Oral Biol.* 1994;39(2):99-104.

- Geinisman Y, Gundersen HJ, van der Zee E, West MJ. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *J Neurocytol.* 1996;25(12):805-19.
- Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 2001;32(10):1029-1038.
- Glickman I, Lewitus M. Hyperplasia of the gingiva associated with Dilantin(sodium diphenyl hydantoinate) therapy. *J Am Dent Assoc.* 1941;28:1991
- Greenberg KV, Armitage GC, Shiboski CH. Gingival enlargement among renal transplant recipients in the era of new-generation immunosuppressants. *J Periodontol.* 2008;79(3):453-460.
- Güncü GN. Fenitoin ve nifedipin kullanan hastalarda diseti olugu sıvısı ve plazmadaki ilaç konsantrasyonlarının diseti büyümesi üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2006; 15-16.
- Hall BK, Squier CA. Ultrastructural quantitation of connective tissue changes in phenytoin-induced gingival overgrowth in the ferret. *J Dent Res.* 1982.61(7): 942-52.
- Hallmon WW, Rossmann JA. The role of drugs in the pathogenesis of gingival overgrowth. A collective review of current concepts. *Periodontol* 2000. 1999;21:176-196.
- Handajani J, Santoso AL, Haniastuti T, Utoro T, Sosroseno W. Effect of nifedipine on the expression of bcl-2 protein in rat gingiva. *Clin Oral Investig.* 2003;7(1): 56-58.
- Haniastuti T, Santoso AS, Agustiono P, Agustina D, Sosroseno W. Effect of nifedipine on the expression of p53 protein in rat gingiva. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(5):235-240.
- Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Maruoka Y, Toyoshima K, Yasumoto S. Overexpression of bcl-2 protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes in vitro. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(1):11-17.
- Hassell TM, Roebuck S, Page RC, Wray SH. Quantitative histopathologic assessment of developing phenytoin-induced gingival overgrowth in the cat. *J Clin Periodontol.* 1982;9(5):365-372.
- Heijl L, Sundin Y. Nitrendipine-induced gingival overgrowth in dogs. *J Periodontol.* 1989;60(2):104-112.
- Henderson JS, Flynn JC, Tucci MA, Tsao AK, Zebrowski EJ, Odlum O, Johnson RB. Site-specific variations in metabolism by human fibroblasts exposed to nifedipine in vitro. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(1):6-10.
- Hernández G, Arriba L, Lucas M, de Andrés A. Reduction of severe gingival overgrowth in a kidney transplant patient by replacing cyclosporin A with tacrolimus. *J Periodontol.* 2000;71(10):1630-1636.
- Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S, Moriyama Y, Nagao T, Kodera Y, Kanamaru A, Dohy H, Masaoka T, Japanese FK506 BMT (Bone Marrow Transplantation) Study Group. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(2):181-185.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology, Three-dimensional measurement in microscopy. First edition, BIOS scientific publishers, UK, 1998.

- Iacopino AM, Doxey D, Cutler CW, Nares S, Stoever K, Fojt J, Gonzales A, Dill RE. 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(1):73-83.
- Ishida H, Kondoh T, Kataoka M, Nishikawa S, Nakagawa T, Morisaki I, Kido J, Oka T, Nagata T. Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. *J Periodontol.* 1995;66(5):345-350.
- Ishizawa K, Yamaguchi K, Horinouchi Y, Fukuhara Y, Tajima S, Hamano S, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): development of drugs on endothelial cell protection for overcoming CKD. *J Pharmacol Sci.* 2009;109(1):14-19.
- Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(5):328-335.
- Jacobson P, Uberti J, Davis W, Ratanatharathorn V. Tacrolimus: a new agent for the prevention of graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(3):217-225.
- James JA, Boomer S, Maxwell AP, Hull PS, Short CD, Campbell BA, Johnson RW, Irwin CR, Marley JJ, Spratt H, Linden GJ. Reduction in gingival overgrowth associated with conversion from cyclosporin A to tacrolimus. *J Clin Periodontol.* 2000;27(2):144-148.
- James JA, Jamal S, Hull PS, Macfarlane TV, Campbell BA, Johnson RW, Short CD. Tacrolimus is not associated with gingival overgrowth in renal transplant patients. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(9): 848-852.
- Jung JY, 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):1042-1049.
- Jung JY, Kang GC, Jeong YJ, Kim SH, Kwak YG, Kim WJ. Proteomic analysis in cyclosporin A-induced overgrowth of human gingival fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(8): 1480-1485.
- Kantarci A, Augustin P, Firatli E, Sheff MC, Hasturk H, Graves DT, Trackman PC. Apoptosis in gingival overgrowth tissues. *J Dent Res.* 2007;86(9): 888-892.
- Kato T, Amano A, Kamisaki Y, Morisaki I. Enhancement of nifedipine-induced gingival overgrowth by concomitant ketoconazole in rats. *Pharmacology.* 2005;74(1):45-50.
- Kimball OP. The treatment of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. *J Am Dent Assoc.* 1939;112:1244-1245.
- Kimball ES, Fisher MC, Persico FJ. Potentiation of Balb/3T3 fibroblast proliferative response by interleukin-1 and epidermal growth factor. *Cell Immunol.* 1988;113(2):341-349.
- Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(9):1256-1265.
- Kjeldsen M, Holmstrup P, Bendtzen K. Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature. *J Periodontol.* 1993;64(11):1013-22.

- Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 1998; 29;273(22):13367-13370.
- Kitamura K, Morisaki I, Adachi C, Kato K, Mihara J, Sobue S, Hamada S. Gingival overgrowth induced by cyclosporin A in rats. *Arch Oral Biol.* 1990;35(6): 483-486.
- Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991;62(1):59-73.
- Köse O, Açıkgoz G. Topikal Makrolaktam Immünmodülatörler. *Dermatose.* 2003;2(1):15-23
- Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res.* 1986;166(1):209-219.
- Kwak YG, Song CH, Yi HK, Hwang PH, Kim JS, Lee KS, Lee YC. Involvement of PTEN in airway hyperresponsiveness and inflammation in bronchial asthma. *J Clin Invest.* 2003;111(7): 1083-1092.
- Latimer KS, Rakich PM, Purswell BJ, Kircher IM. Effects of cyclosporin A administration in cats. *Vet Immunol Immunopathol.* 1986;11(2):161-173.
- Lederman D, Lummerman H, Reuben S, Freedman PD. Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57(6):620-622.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet.* 2002;360(9349):1903-1913.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-1947.
- Lichtlen PR, Hugenholtz PG, Rafflenbeul W, Hecker H, Jost S, Nikutta P, Deckers JW. Retardation of coronary artery disease in humans by the calcium-channel blocker nifedipine: results of the INTACT study (International Nifedipine Trial on Antiatherosclerotic Therapy). *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990;4 Suppl 5:1047-1068.
- Lima RB, Benini V, Sens YA. Gingival overgrowth in renal transplant recipients: A study concerning prevalence, severity, periodontal and predisposing factors. *Transplant Proc.* 2008;40(5):1425-1428.
- Lovas JG. Apoptosis in human epidermis: a postmortem study by light and electron microscopy. *Australas J Dermatol.* 1986;27(1):1-5.
- Lucas RM, Howell LP, Wall BA. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a histochemical and ultrastructural study. *J Periodontol.* 1985;56(4):211-215.
- Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273(22): 13375-13378.
- Magee CC, Furst DE, Romain PL, Pharmacology and side effects of cyclosporine and tacrolimus, 2011;1-12.

- Margiotta V, Pizzo I, Pizzo G, Barbaro A. Cyclosporin- and nifedipine-induced gingival overgrowth in renal transplant patients: correlations with periodontal and pharmacological parameters, and HLA-antigens. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(3):128-34.
- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1):7-19.
- Marshall RI, Bartold PM. A clinical review of drug-induced gingival overgrowths. *Aust Dent J.* 1999;44(4): 219-232.
- Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama M, Toyoshima K. Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238(3):886-890.
- Matsumoto H, Noji I, Akimoto Y, Fujii A. Comparative study of calcium-channel blockers on cell proliferation, DNA and collagen syntheses, and EGF receptors of cultured gingival fibroblasts derived from human nifedipine, nicardipine and nisoldipine responders. *J Oral Sci.* 2001;43(4):261-268.
- McGaw WT, Porter H. Cyclosporine-induced gingival overgrowth: an ultrastructural stereologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988;65(2):186-190.
- McKaig SJ, Kelly D, Shaw L. Investigation of the effect of FK506 (tacrolimus) and cyclosporin on gingival overgrowth following paediatric liver transplantation. *Int J Paediatr Dent.* 2002;12(6):398-403.
- McKevitt KM, Irwin CR. Phenotypic differences in growth, matrix synthesis and response to nifedipine between fibroblasts derived from clinically healthy and overgrown gingival tissue. *J Oral Pathol Med.* 1995;24(2):66-71.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.* 1978;121(6):2228-2234.
- Miyasaki KT, Iofel R, Lehrer RI. Sensitivity of periodontal pathogens to the bactericidal activity of synthetic protegrins, antibiotic peptides derived from porcine leukocytes. *J Dent Res.* 1997;76(8):1453-1459.
- Modéer T, Domeij H, Andurén I, Mustafa M, Brunius G. Effect of phenytoin on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(10):491-499.
- Morisaki I, Kato K, Loyala-Rodriguez JP, Nagata T, Ishida H. Nifedipine-induced gingival overgrowth in the presence or absence of gingival inflammation in rats. *J Periodontal Res.* 1993;28(6):396-403.
- Myrillas TT, Linden GJ, Marley JJ, Irwin CR. Cyclosporin A regulates interleukin-1beta and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1999;70(3):294-300.
- Nassar CA, Nassar PO, Andia DC, Guimarães MR, Spolidorio LC. The effects of up to 240 days of tacrolimus therapy on the gingival tissues of rats –a morphological evaluation. *Oral Dis.* 2008;14(1): 67-72.
- Nghiem P, Pearson G, Langley RG. Tacrolimus and Pimecrolimus: From clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(2): 228-241.
- Nieh S, Fu E, Chang HL, Wang SL, Wikesjö UM. Histopathologic alterations of periodontium in cyclosporin-treated rats. Is the periodontium a target tissue for the drug? *J Clin Periodontol.* 1996;23(8): 730-736.
- Nifedipin: Drug Information. Up To Date. [Http://uptodate.com/contents/nifedipin-drug-information.2011](http://uptodate.com/contents/nifedipin-drug-information.2011).

- Niimi A, Tohnai I, Kaneda T, Takeuchi M, Nagura H. Immunohistochemical analysis of effects of cyclosporin A on gingival epithelium. *J Oral Pathol Med.* 1990;19(9): 397-403.
- Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H. Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. *J Periodontol.* 1996;67(5): 463-471.
- Nho RS, Xia H, Diebold D, Kahm J, Kleidon J, White E, Henke CA. PTEN regulates fibroblast elimination during collagen matrix contraction. *J Biol Chem.* 2006;281(44):33291-33301.
- Nishikawa S, Tada H, Hamasaki A, Kasahara S, Kido J, Nagata T, Ishida H, Wakano Y. Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a clinical and in vitro study. *J Periodontol.* 1991;62(1):30-35.
- Niwa Y, Terashima T, Sumi H. Topical application of the immunosuppressant tacrolimus accelerates carcinogenesis in mouse skin. *Br J Dermatol.* 2003;149(5):960-967.
- Nyska A, Waner T, Zlotogorski A, Pirak M, Scolnik M, Nyska M, Galiano A. Oxodipine-induced gingival hyperplasia in beagle dogs. *Am J Pathol.* 1990;137(3):737-739.
- Oettinger-Barak O, Barak S, Machtei EE, Ardekian L, Baruch Y, Peled M. Periodontal changes in liver cirrhosis and post-transplantation patients. I: clinical findings. *J Periodontol.* 2001;72(9):1236-1240.
- Panuska HJ, Gorlin RJ, Bearman JE, et al. The effect of anticonvulsant drugs upon the gingiva: a series of 1048 patients. *J Periodontol.* 1961;32:15
- Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S. Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res.* 2000;2(1):59–64.
- Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2000;59(2):323-389.
- Poole-Wilson PA, Lubsen J, Kirwan BA, van Dalen FJ, Wagener G, Danchin N, Just H, Fox KA, Pocock SJ, Clayton TC, Motro M, Parker JD, Bourassa MG, Dart AM, Hildebrandt P, Hjalmarsen A, Kragten JA, Molhoek GP, Otterstad JE, Seabra-Gomes R, Soler-Soler J, Weber S; Coronary disease Trial Investigating Outcome with Nifedipine gastrointestinal therapeutic system investigators. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with stable angina requiring treatment (ACTION trial): randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9437):849-857.
- Prabhu A, Mehta DS. A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporin and tacrolimus in rats: an experimental study. *J Periodontol.* 2006;77(2):265-270.
- Rateitschak-Plüss EM, Hefti A, Rateitschak KH. Gingival hyperplasia from cyclosporin A medication. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.* 1983;93(1): 57-65.
- Reali L, Zuliani E, Gabutti L, Schönholzer C, Marone C. Poor oral hygiene enhances gingival overgrowth caused by calcineurin inhibitors. *J Clin Pharm Ther.* 2009;34(3):255-260.
- Reem GH. Molecular mode of action of cyclosporin and FK506 in human thymocytes. *J Autoimmun.* 1992;5 Suppl A:159-165.

- Rosendorff C, Black HR, Cannon CP, Gersh BJ, Gore J, Izzo JL Jr, Kaplan NM, O'Connor CM, O'Gara PT, Oparil S; American Heart Association Council for High Blood Pressure Research; American Heart Association Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention. Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research and the Councils on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2007;115(21):2761-2788.
- Rost DR, Baker R. Gingival hyperplasia induced by sodium diphenylhydantoin in the dog: a case report. *Vet Med Small Anim Clin*. 1978; 73(5):585-587.
- Rostock MH, Fry HR, Turner JE. Severe gingival overgrowth associated with cyclosporine therapy. *J Periodontol*. 1986;57(5):294-299.
- Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA, Thomason JM. Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res*. 2004 ;83(4):322-326.
- Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol*. 1999;135(5):574-580.
- Saito K, Mori S, Iwakura M, Sakamoto S. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta, basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol Res*. 1996;31(8):545-555.
- Saito K, Mori S, Tanda N, Sakamoto S. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodontol*. 1999;70(6):581-586.
- Sakagami G, Sato E, Sugita Y, Kosaka T, Kubo K, Maeda H, Kameyama Y. Effects of nifedipine and interleukin-1alpha on the expression of collagen, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2006;41(4): 266-272.
- Sato N, Matsumoto H, Akimoto Y, Fujii A. The effect of IL-1alpha and nifedipine on cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Oral Sci*. 2005;47(2):105-110.
- Seibel W, Yahia NA, McCleary LB, Lesko LJ, Hassell TM. Cyclosporine-induced gingival overgrowth in beagle dogs. *J Oral Pathol Med*. 1989; 18(4):240-245.
- Sekiguchi RT, Paixão CG, Saraiva L, Romito GA, Pannutti CM, Lotufo RF. Incidence of tacrolimus-induced gingival overgrowth in the absence of calcium channel blockers:a short-term study. *J Clin Periodontol*. 2007;34(7):545-550.
- Seymour RA, Smith DG, Rogers SR. The comparative effects of azathioprine and cyclosporine on some gingival health parameters of renal transplant patients. A longitudinal study. *J Clin Periodontol* . 1987;14(10):610-613.
- Seymour RA, Heasman PA. Drugs and the periodontium. *J Clin Periodontol*. 1988;15(1):1-16.
- Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and the gingival tissues. *J Clin Periodontol*. 1992;19 (1);1-11.
- Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol*. 1996; 23 (3 Pt 1):165-175
- Seymour RA, Ellis JS, Thomason JM. Risk factors for drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol*. 2000;27(4):217-23.

- Shimizu Y, Kataoka M, Seto H, Kido J, Nagata T. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. *J Periodontol* . 2002;73(8):861-867.
- Silverstein LH, Koch JP, Lefkove MD, Garnick JJ, Singh B, Steflik DE. Nifedipine-induced gingival enlargement around dental implants: a clinical report. *J Oral Implantol*. 1995;21(2):116-120.
- Snider ME, Nuzum DS, Veverka A. Long-acting nifedipine in the management of the hypertensive patient. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(6):1249-1257.
- Spencer CM, Goa KL, Gillis JC. Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs*. 1997;54(6):925-975.
- Spolidorio LC, Holzhausen M, Spolidorio DM, Nassar CA, Nassar PO, Muscará MN. Cyclosporin but not tacrolimus significantly increases salivary cytokine contents in rats. *J Periodontol*. 2005;76(9):1520-1525.
- Spolidorio LC, Spolidorio DM, Massucato EM, Neppelenbroek KH, Campanha NH, Sanches MH. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. *Oral Dis*. 2006;12(3):309-314.
- Spolidorio LC, Spolidorio DM, Neves KA, Gonzaga HF, Almeida OP. Morphological evaluation of combined effects of cyclosporin and nifedipine on gingival overgrowth in rats. *J Periodontal Res*. 2002;37(3):192-195.
- Sugano M, Tsuchida K, Makino N. Nifedipine prevents apoptosis of endothelial cells induced by oxidized low-density lipoproteins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40(1):146-152.
- Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003. *J Hypertens*. 2003;21(6):1055-1076.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95(1):29-39.
- Stambolic V, Tsao MS, Macpherson D, Suzuki A, Chapman WB, Mak TW. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice. *Cancer Res*. 2000;60(13):3605-3611.
- Swanson DR, Barclay BL, Wong PS, Theeuwes F. Nifedipine gastrointestinal therapeutic system. *Am J Med*. 1987;21;83(6B):3-9.
- Takeuchi R. The effect of basic fibroblast growth factor on cell cycle in human gingival fibroblasts from nifedipine responder and non-responder. *J Oral Sci*. 2004;46(1): 37-44.
- Takeuchi R, Matsumoto H, Okada H, Hori M, Gunji A, Hakozaki K, Akimoto Y, Fujii A. Differences of cell growth and cell cycle regulators induced by basic fibroblast growth factor between nifedipine responders and non-responders. *J Pharmacol Sci*. 2007;103(2): 168-174.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 1998 5;280(5369): 1614-1617.
- Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res*. 1999;59:442-449.

- Tanriover G, Demir N, Pestereli E, Demir R, Kayisli UA. PTEN-mediated Akt activation in human neocortex during prenatal development. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(4-5):393-406.
- Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Niruthisard S. Detection of PTEN immunoreactivity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Med Assoc Thai.* 2008;91(8):1161-1165.
- Tepperman E, Ramzy D, Prodger J, Sheshgiri R, Badiwala M, Ross H, Rao V. Surgical biology for the clinician: vascular effects of immunosuppression. *Can J Surg.* 2010;53(1):57-63.
- Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS, Kelly PJ, Parry G, Dark J, Wilkinson R, Ilde JR. Determinants of gingival overgrowth severity in organ transplant patients. An examination of the rôle of HLA phenotype. *J Clin Periodontol.* 1996;23(7):628-634.
- Thomason JM, Seymour RA, Ellis JS. Risk factors for gingival overgrowth in patients medicated with ciclosporin in the absence of calcium channel blockers. *J Clin Periodontol.* 2005;32(3): 273-279.
- Tipton DA, Fry HR, Dabbous MK. Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. *J Periodontal Res.* 1994;29(6):401-409.
- Trackman PC, Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(3):165-175.
- van der Schaaf MR, Hene RJ, Floor M, Blankestijn PJ, Koomans HA. Hypertension after renal transplantation. Calcium channel or converting enzyme blockade? *Hypertension.* 1995;25(1): 77-81.
- Walker RG, Cottrell S, Sharp K, Tripodi R, Nicholls KM, Fraser I, Varigos GA, Butcher BE. Conversion of cyclosporin to tacrolimus in stable renal allograft recipients: quantification of effects on the severity of gingival enlargement and hirsutism and patient-reported outcomes. *Nephrology.* 2007;12(6): 607-614.
- Wenzel RR, Allegranza G, Binggeli C, Shaw S, Weidmann P, Lüscher TF, Noll G. Differential activation of cardiac and peripheral sympathetic nervous system by nifedipine: role of pharmacokinetics. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(7):1607-1614.
- West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 1999;22(2):51-61.
- Westbrook P, Bednarczyk EM, Carlson M, Sheehan H, Bissada NF. Regression of nifedipine-induced gingival hyperplasia following switch to a same class calcium channel blocker, isradipine. *J Periodontol.* 1997;68(7):645-650.
- White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL, Dickie EG, Livant DL, Markwart S, Toews GB, Arenberg DA. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(4):436-442.
- White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Kontos CD, Toews GB. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):112-121.
- Wondimu B, Nemeth A, Modeer T. Oral health in liver transplant children administered cyclosporin A or tacrolimus. *Int J Paediatr Dent.* 2001;11(6): 424-429.
- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11(2): 95-103.

- Wysocki GP, Gretzinger HA, Laupacis A, Ulan RA, Stiller CR. Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55(3):274-278.
- Yamagishi S, Inagaki Y, Abe R, Kikuchi S, Sasaki N, Takeuchi M. Nifedipine inhibits apoptotic cell death of cultured endothelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha. *Drugs Exp Clin Res.* 2003;29(4):141-145.
- Yang J, Ren Y, Wang L, Li B, Chen Y, Zhao W, Xu W, Li T, Dai F. PTEN mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136(9):1303-1311.
- Zabawski EJ, Costner M, Cohen JB, Cockerell CJ. Tacrolimus: pharmacology and therapeutic uses in dermatology. *Int J Dermatol.* 2000;39(10): 721-727.

EK 1



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HADYEK/110
Konu : Araştırma projeniz hk.

26/10/2010

Doç. Dr. Ö. Burcu ÇETİNKAYA
Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

2010/48 numaralı “SİROLİMUS’UN TEK BAŞINA VEYA TAKROLİMUS İLE BİRLİKTE KULLANIMININ DİŞETİ DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN STEREOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 25.10.2010 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.


Prof. Dr. Ferhat KOLBAKIR
HADYEK Başkan

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Samsun'da doğdum. 1987-1999 yılları arasında ilk, orta ve lise öğrenimimi Samsun' da tamamladım. 1999 yılında girdiğim Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2005 yılında mezun oldum ve 2006 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi (OMÜ) Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD.'nda doktora programıma başladım. 2006 yılından itibaren araştırma görevlisi olarak aynı kurumda çalışmaktayım.

Dt. Ferda PAMUK