

مقایسه غلظت فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در مایع شیار لثه ای در حالت سلامت و بیماری پریدونتال

نیلوفر جنابیان^{۱*} (DDS,MS)، مهدی پورامیر^۲ (PhD)، کیوان نعیمی^۳ (DDS)، علی بیژنی^۴ (MD)

- ۱- مرکز تحقیقات مواد دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
- ۲- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل
- ۳- دانشگاه علوم پزشکی بابل
- ۴- مرکز تحقیقات بیماریهای غیرواگیر کودکان امیرکلا، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۱/۱۲/۳، اصلاح: ۹۲/۱۲/۱۶، پذیرش: ۹۲/۸/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: فاکتور رشد سلولی عروقی (Vascular Endothelium Growth Factor, VEGF) باعث رشد سلول های اندوتلیال، تحریک آنژیوژنز و افزایش نفوذ پذیری عروق می شود و فاکتور مهمی در التهاب و ترمیم زخم می باشد. هدف از این مطالعه مقایسه میزان VEGF در مایع شیار لثه ای (GCF) بیماران پریدونتیت، ژنژیویت و افراد سالم می باشد.

مواد و روشها: این مطالعه مورد شاهدهی بر روی ۴۵ نفر از مراجعین به بخش پریدونتولوژی دانشکده دندانپزشکی بابل در سه گروه ۱۵ نفر با بیماری پریدونتیت، ۱۵ نفر با بیماری ژنژیویت و ۱۵ نفر بدون مشکل پریدونتال انجام شد. وضعیت پریدونتال با اندازه گیری عمق پاکت، از دست رفتن لثه چسبیده، bleeding plaque index و on probing بررسی شد. نمونه گیری VEGF بعد از ایزوله کردن محیط از GCF بیماران به وسیله کن کاغذی انجام شد و مقادیر با روش الایزا اندازه گیری و مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: میانگین غلظت VEGF در بیماران گروه پریدونتیت $61/38 \pm 90/63$ پیکوگرم بر میلی لیتر، در گروه ژنژیویت $31/53 \pm 63/64$ پیکوگرم بر میلی لیتر و در گروه افراد سالم $14/50 \pm 6/17$ pg/ml پیکوگرم بر میلی لیتر بدست آمد. از لحاظ آماری بین میانگین غلظت VEGF در گروه های مورد مطالعه اختلاف معنی دار بدست نیامد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بین غلظت VEGF و شدت بیماری پریدونتال همبستگی چندانی وجود ندارد.

واژه های کلیدی: مایع شیار لثه ای، عمق پاکت، پریدونتیت، ژنژیویت، VEGF.

مقدمه

سلول های التهابی، سایتوکاین ها و دیگر سلول های التهابی نقش دارند، افزایش پیدا می کند و وضعیت التهاب در محل ضایعه شدت بیشتری پیدا می کند (۲). سایتوکاین ها و مدیاتورهای درگیر در فرآیند رگ سازی زیاد می باشند اما مهمترین آن که دخیل در این فرآیند و به طور اختصاصی فعالیت می کند فاکتور رشدی سلول های اندوتلیال (Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF است VEGF یک گلیکوپروتئین همودیمریک با وزن مولکولی تقریباً ۴۵ KD است و به عنوان مدیاتور اصلی آنژیوژنیزس بوده که به گیرنده VEGF در سطح سلول های اندوتلیال متصل می شود (۳). VEGF در بافت پریدونشیوم درون سلول های اندوتلیوم، پلازما سل ها، ماکروفاژها، اپیتلیوم سالکولار و ژنژیوال قابل شناسایی است. بر اساس مطالعاتی کمی که تاکنون

پریدونتیت بیماری التهابی بافت های حمایت کننده دندان می باشد که توسط میکروارگانیسم های خاص ایجاد می گردد و با تخریب وسیع لیگامان پریدونتال و استخوان آلوئولار به همراه تشکیل پاکت، تحلیل لثه و یا هر دو مشخص می شود. ژنژیویت بیماری التهابی لثه است و از نظر بالینی حضور attachment loss قابل تشخیص باعث افتراق ژنژیویت از پریدونتیت میگردد (۱). رگ سازی یکی از فرآیندهای مهم در روند پیشرفت بیماری های التهابی مزمن است. فرآیند رگ سازی با ساخت عروق خونی جدید و انتقال مواد پیش التهابی و التهابی به محل ضایعه و تغذیه و اکسیژن رسانی به بافت های ملتهب میتواند نقش مهمی در شدت التهاب بازی کند. همچنین با افزایش تعداد سلولهای اندوتلیال عروقی در واقع توانایی تولید مولکول هایی که در مهاجرت و انتقال

این مقاله حاصل پایان نامه کیوان نعیمی دانشجو دندانپزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۰۳۲۴۴۰ دانشگاه علوم پزشکی بابل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر نیلوفر جنابیان

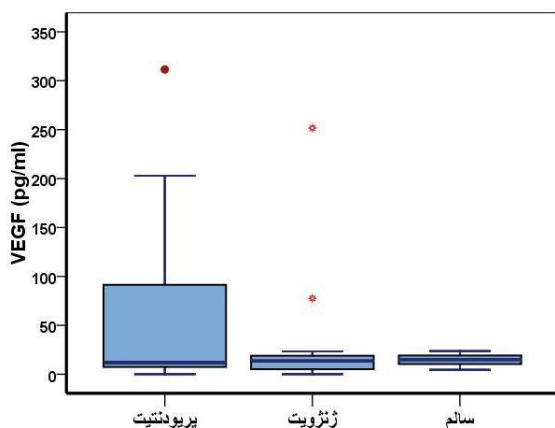
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده دندانپزشکی، بخش پریدونتیکس، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۹۱۴۰۸

e-mail: njenabian@hotmail.com

دستگاه انکوباتور شیکر دار با دور آرام قرار داده شد. پس از آن محتویات داخل چاهک ها ریخته شد دوباره مراحل شستشو و خارج نمودن چاهک ها انجام شد. سپس به چاهک ها $100 \mu\text{L}$ HRP-استرپتوآویدین اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق روی دستگاه انکوباتور شیکر دار با دور آرام قرار گرفت. پس از آن محتویات داخل چاهک ها ریخته شد، مراحل شستشو و خارج نمودن چاهک ها انجام شد. سپس $100 \mu\text{L}$ محلول TMB به چاهک ها اضافه و به مدت ۵/۰ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه انکوباتور شیکر دار با دور آرام در تاریکی قرار داده شد. در این مرحله چاهک ها رنگ آبی می گیرند. سپس $50 \mu\text{L}$ محلول Stop را که اسید می باشد به هر چاهک اضافه گردید که زرد رنگ می شوند و بلافاصله در دستگاه الیزا ریدر مدل Rayto با طول موج 450 nm جذب نمونه ها خوانده شد. داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد. برای بررسی متغیرهای کمی در سه گروه سالم، ژنژیویت و پریودنتیت از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تقییمی توکی استفاده شد و همچنین با ضریب همبستگی پیرسون ارتباط بین شاخص های پریودنتال و VEGF نشان داده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه ۱۵ نمونه (۷ نمونه مذکر و ۸ نمونه مونث) در گروه پریودنتیت مزمن با میانگین سنی $39/73 \pm 5/31$ سال، ۱۵ نمونه (۷ نمونه مذکر و ۸ نمونه مونث) در گروه ژنژیویت با میانگین سنی $35/07 \pm 5/62$ سال و ۱۵ فرد سالم (۸ نمونه مذکر و ۷ نمونه مونث) با میانگین سنی $34/6 \pm 6/61$ سال به عنوان گروه کنترل شرکت داشتند. مقدار غلظت فاکتور رشد سلول اندوتلیال عروقی (VEGF) در گروه پریودنتیت مزمن با میانگین $61/38 \pm 9/63 \text{ pg/ml}$ بیشترین در بین گروههای مورد مطالعه بود. این مقدار در گروه بیمارانی ژنژیویت $31/53 \pm 63/64 \text{ pg/ml}$ بدست آمد. همچنین میانگین غلظت VEGF در گروه افراد سالم (گروه کنترل) $14/50 \pm 6/17 \text{ pg/ml}$ بدست آمد و کمترین در بین گروهها بود. بین گروههای مورد مطالعه اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P=0/140$) بدیهی است در مقایسه دو به دو گروهها نیز اختلاف معنی داری دیده نشد. نمودار ۱ توزیع غلظت VEGF را در گروههای مختلف نشان می دهد.



نمودار ۱. مقایسه غلظت VEGF در سه گروه پریودنتیت، ژنژیویت و سالم

انجام شده است مشاهده کرده اند که در افراد پریودنتیت میزان VEGF مایع شیار لثه ای زیاد است (۳-۴)، بر همین اساس معتقدند که این سایتوکاین نقش کلیدی را در بیماری پریودنتیت ایفا می کند. بر اساس این فرضیه و با توجه به حجم کم مطالعات انجام شده، هدف از این مطالعه مقایسه میزان VEGF در مایع شیار لثه ای افراد سالم، ژنژیویت ناشی از پلاک و پریودنتیت مزمن می باشد که همبستگی بین غلظت VEGF و شدت بیماری پریودنتال مشخص گردد.

مواد و روشها

این مطالعه مورد شاهدهی بر روی ۴۵ نفر از افراد مراجعه کننده به بخش پریودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی بابل در صورت نداشتن بیماری سیستمیک، عدم مصرف آنتی بیوتیک طی سه ماه گذشته، نداشتن ضایعه داخل دهانی، انجام ندادن SRP حداقل طی ۶ ماه گذشته، مصرف نکردن هر گونه دارویی که بر روی بافت پریودنشیوم تاثیر گذار است، عدم مصرف دخانیات انجام شد. این افراد به سه گروه مساوی سالم، ژنژیویت ناشی از پلاک و پریودنتیت مزمن بر اساس شاخصهای Clinical Attachment Loss، Gingival Index، CAL ≥ 1 ، گروه ژنژیویت ۱۵ نفر با $GI \geq 1$ و $CAL = 0$ نفر، گروه پریودنتیت مزمن نیز ۱۵ نفر با $GI \geq 1$ و $CAL \geq 2$ بودند. ابتدا از همه افراد گروه های شرکت کننده با استفاده از paper cone شماره ۴۰ به اندازه 1 mm درون سالکوس لثه به مدت ۳۰ ثانیه نمونه مایع شیار لثه ای گرفته شد معاینه کننده و گیرنده نمونه یک نفر بود. Paper های آغشته به مایع شیار لثه ای به میکروتیوب حاوی $250 \mu\text{L}$ PBS انتقال داده شد. در افرادی که ژنژیویت داشتند از سالکوس دندانی که بیشترین نشانه های التهاب (ادم، مثبت بودن BOP در معاینه جلسه قبل، قرمزی و بدون CAL) را دارند مایع شیار لثه ای گرفته شد. همچنین در افرادی که پریودنتیت مزمن داشتند از سالکوس دندانی که بیشترین میزان CAL و نشانه های التهاب را دارند و در افراد سالم از سالکوس مزو باکال دندان مولر اول چپ فک بالا و در صورت نبودن آن از مزو باکال دندان مولر یک راست فک بالا مایع شیار لثه ای نمونه گیری انجام شد. نمونه هایی که حاوی خون و بزاق بودند از مطالعه کنار گذاشته شدند. پس از گرفتن نمونه ها، با استفاده از ظروف دربدار اپیندورف به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای -80 درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا روز آزمایش که با استفاده از روش ELISA به بررسی و تحلیل آنها پرداخته شد.

روش آزمایشگاهی:

در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. برای بررسی مقدار VEGF از کیت الیزا VEGF human از کمپانی Abcam با شماره کاتالوگ ab100663 استفاده شد. تمام نمونه ها و مواد کیت به دمای محیط رسیده آنگاه $100 \mu\text{L}$ از نمونه ها و استانداردها را داخل چاهک ها اضافه کرده و روی پلیت را با چسب می چسبانیم. سپس نمونه ها را به مدت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه انکوباتور شیکر دار با دور آرام قرار داده و پس از آن محتویات داخل چاهک ها ریخته شدند و چاهک ها با محلول شستشو ۴ مرتبه شستشو داده شد. هر دفعه داخل چاهک ها $300 \mu\text{L}$ محلول شستشو ریخته شد. چاهک ها باید کاملاً خالی شوند. برای اینکار پلیت را روی دستمال کاغذی (Taping) می تکانیم. به چاهک ها $100 \mu\text{L}$ بیوتین آنتی بادی اضافه کرده و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی

معنی داری در غلظت VEGF گزارش نکردند و نتیجه گرفتند که افزایش VEGF ممکن است مرتبط با حضور بافت پرپودنتال سالم و همچنین تخریب بافت پرپودنتال باشد (۷). Guneri و همکاران (۶)، مطالعه Lucarini و همکاران (۸)، مطالعه Prapulla و همکاران (۲)، مطالعه Oliveira و همکاران (۹)، مطالعه Matarese و همکارانش (۱۰) نشان دادند که بیشترین مقدار VEGF در GCF در بیماران پرپودنتیت و کمترین مقدار آن در گروه افراد سالم یافت شد و آنها نتیجه گرفتند که سطح VEGF در GCF از افراد سالم به سمت پرپودنتیت افزایش می یابد و نقش کلیدی در پیشرفت بیماری های پرپودنتال دارد و می تواند به عنوان بیومارکر پیشرفت بیماری پرپودنتال در نظر گرفته شود که نتایج فوق با مطالعه حاضر همخوانی نداشت هر چند در این مطالعه هم این روند وجود داشت، ولی معنی دار نبود و این اختلاف می تواند به دلیل متغیر بودن غلظت VEGF در هر گروه مرتبط با مراحل مختلف بیماری در هنگام نمونه گیری مایع شیار لثه ای باشد. چند نمونه از گروه ژنژیویت مقدار عددی نزدیک به نمونه های گروه پرپودنتیت نشان دادند که میتواند به علت نزدیک بودن تبدیل ضایعه ژنژیویت به ضایعه پرپودنتیت مزمن باشد که از نظر بالینی قابل تشخیص نمی باشد. همچنین در تعدادی از نمونه های گروه سالم غلظت VEGF نزدیک به گروه ژنژیویت بدست آمد که میتواند مرتبط با مقادیر سبب کلینیکیال التهاب در بافت های سالم باشد.

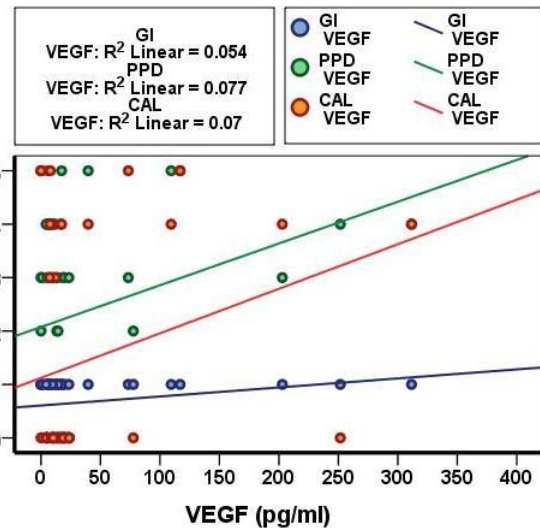
Booth و همکاران در تحقیق خود اعلام کردند که غلظت VEGF در GCF نقاط سالم بیشتر از نقاط مبتلا به بیماری های پرپودنتال می باشد (۵). این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشته و احتمالاً علت این تفاوت می تواند حضور مقادیر کمی التهاب و یا ترمیم در مقیاس سبب کلینیکیال بعد از حمله میکروبی باشد که با گسترش مقادیر غلظت VEGF در تداخل می باشد (۱۱ و ۱۲). همچنین علت احتمالی دیگر می تواند رگ سازی فیزیولوژیک در اطراف بافت لثه ای و بافت های پرپودنتال باشد که باعث بالاتر رفتن غلظت VEGF در مایع شیار لثه ای می شود. در مقایسه دو به دو میانگین گروه ها نیز اختلاف معنی داری بین گروه ها بدست نیامد.

با توجه به نتایج این مطالعه بین غلظت VEGF و شدت بیماری پرپودنتال همبستگی چندانی وجود ندارد. هر چند که با شدت گرفتن بیماری غلظت VEGF در مایع شیار لثه ای افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل محترم بخش پرپودنتولوژی و بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی بابل که در مراحل انجام مطالعه نهایت همکاری را داشتند تشکر و قدردانی می گردد.

همبستگی بین شاخص لثه ای (GI) و غلظت VEGF از لحاظ آماری وجود نداشت ($P=0/025$ و $r=-0/025$). از لحاظ آماری همبستگی بین مقادیر غلظت VEGF و عمق پاکت (PPD) وجود نداشت ($P=0/043$ و $r=0/03$). همبستگی بین مقدار از دست رفتن چسبندگی لثه ای (CAL) و غلظت VEGF از لحاظ آماری معنی دار بدست نیامد ($P=0/037$ و $r=0/032$). همچنین همبستگی سن بیماران و غلظت VEGF نیز معنی دار نبود ($P=0/06$ و $r=0/06$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. رابطه بین غلظت VEGF و شاخصهای پرپودنتال

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مقدار غلظت فاکتور رشد سلول اندوتلیال عروقی (VEGF) در گروه پرپودنتیت مزمن از دو گروه دیگر بیشتر بود. این مقدار در گروه بیماران ژنژیویت از گروه سالم بیشتر و از گروه بیماران پرپودنتیت کمتر بدست آمد. همچنین میانگین غلظت VEGF در گروه افراد سالم (گروه کنترل) دارای کمترین مقدار در بین گروه ها بود اما بین گروه های مورد مطالعه اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود. Booth و همکارانش و Guneri و همکارانش در مطالعات خود اعلام کردند که حجم مایع شیار لثه ای در بافت های بیمار پرپودنتال نسبت به بافت سالم افزایش می یابد (۵). در مطالعه حاضر نمونه های جمع آوری شده جهت بررسی مقدار VEGF از GCF بیماران تهیه گردید که مشابه مطالعه Prapulla و همکارانش می باشد (۲). نتایج مطالعه حاضر در توافق با نتایج مطالعه Keles و همکاران می باشد. آنها در مقایسه ۵ گروه بیمار شامل گروه ژنژیویت، گروه پرپودنتیت، گروه ژنژیویت به همراه دیابت نوع ۲، گروه پرپودنتیت به همراه دیابت نوع ۲ و گروه سالم به عنوان گروه کنترل اختلاف

Comparison of Gingival Crevicular Fluid Levels of VEGF in Periodontal Health and Diseased Conditions

N. Jenabian (DDS, MS)^{1*}, M. Pouramir (PhD)², K. Naimi (DDS)³, A. Bijani (MD)⁴

1. Dental Materials Research Center, Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

4. Non-Communicable Pediatric Diseases Research Center, Amirkola Children's Hospital, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(2); Feb 2014; pp: 29-33

Received: Feb 21st 2013, Revised: Mar 7th 2014, Accepted: Nov 6th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces proliferation of endothelial cells, stimulates angiogenesis, and increases vascular permeability and it is an important factor in inflammation and wound healing. The aim of this study was to compare the VEGF level of human gingival crevicular fluid (GCF) in periodontal health and disease.

METHODS: In this case-control study, forty-five subjects from periodontics department of Babol dental school were evaluated in three groups; periodontitis (group 1; n=15), gingivitis (group 2; n=15), without periodontal disease (group 3; n=15). Periodontal status was evaluated by measuring probing depth, clinical attachment loss, plaque and bleeding on probing. Samples obtained from GCF of patients after isolation by paper cone. VEGF was assessed by using an ELISA and compared.

FINDINGS: In periodontitis patients, the mean and standard deviation of VEGF collected from diseased sites were 61.38±90.63 pg/ml, in gingivitis patients, concentration of VEGF was 31.53±63.64 pg/ml and also concentration of VEGF in healthy patients was 14.50±6.17 pg/ml. There was no statistical difference between the mean concentrations of VEGF in studied groups.

CONCLUSION: The results of this study showed that there is no correlation between concentration of VEGF and periodontal situation.

KEY WORDS: *Gingival crevicular fluid, Probing pocket depth (PPD), Periodontitis, Gingivitis, Vascular endothelial growth factor.*

Please cite this article as follows:

Jenabian N, Pouramir M, Naimi K, Bijani A. Comparison of gingival crevicular fluid levels of VEGF in periodontal health and diseased conditions. J Babol Univ Med Sci 2014;16(2): 29-33.

*Corresponding Author; N. Jenabian (DDS)

Address: Department of Periodontology, Dental School, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Tel: + 98 111 2291408

E-mail: njenabian@hotmail.com

References

1. Novak MJ, Novak KF. Chronic periodontitis. In: Newman M, Takei H, Klokkelvold P, Carranza F, editors. Carranza's clinical periodontology. 10th ed. Philadelphia: Saunders Co 2006; pp: 494-9.
2. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007;78(9):1783-7.
3. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69(3):4-10.
4. Sakallioğlu EE, Aliyev E, Lütfoğlu M, Yavuz U, Açıkgöz G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of gingiva and gingival crevicular fluid in diabetic and systemically healthy periodontitis patients. *Clin Oral Investig* 2007;11(2):115-20.
5. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1998;33(8):491-9.
6. Güneri P, Unlü F, Yeşilbek B, et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol* 2004;75(1):91-7
7. Keles GC, Cetinkaya BO, Eroglu C, Simsek SB, Kahraman H. Vascular endothelial growth factor expression levels of gingiva in gingivitis and periodontitis patients with/without diabetes mellitus. *Inflamm Res* 2010;59(7):543-9.
8. Lucarini G, Zizzi A, Aspriello SD, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor, CD44 and CD133 in periodontal disease and diabetes: an immunohistochemical study. *J Clin Periodontol* 2009;36(1):3-10.
9. Oliveira TM, Sakai VT, Machado MA, et al. COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2008;79(6):1062-9.
10. Matarese G, Isola G, Anastasi GP, et al. Immunohistochemical analysis of TGF- β 1 and VEGF in gingival and periodontal tissues: a role of these biomarkers in the pathogenesis of scleroderma and periodontal disease. *Int J Mol Med* 2012;30(3):502-8.
11. Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2003;38(1):90-6.
12. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor. *J Cell Mol Med* 2005;9(4):777-94.