

بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های بافت همبند لثه در افراد دیابتیک مبتلا به پریودنتیت

دکتر فرین کیانی یزدی^۱ - دکتر مسعود گل شاه^۲ - دکتر محبوبه رزمخواه^۳ - دکتر عباس قادری^۴

۱- استادیار گروه آموزشی پریودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲- پریودنتیست

۳- استادیار مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- استاد گروه آموزشی ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Apoptosis of gingival connective tissue cells in diabetic individuals with chronic periodontitis

Farin Kiani Yazdy¹, Masoud Golshah^{2†}, Mahboobeh Razmkhah³, Abbas Ghadery⁴

1- Assistant Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2†- Periodontist

3- Assistant Professor, Cancer Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

4- Professor, Department of Immunology and Cancer Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Background and Aims: Apoptosis or programmed cell death plays an important role in the pathogenesis of many diseases. Previous studies suggest that apoptosis is involved in the pathogenesis of periodontal disease. On the other hand, it is also suggested that diabetes mellitus enhances apoptosis of connective tissue cells. Thus, we measured expression of proteins which are relevant to apoptosis in the gingival tissue of diabetic patients with chronic periodontitis in comparison to non diabetic individuals.

Materials and Methods: 25 patients with diabetes and chronic periodontitis and 16 non diabetic controls with chronic periodontitis were included in this study. 4 weeks after scaling and root planning and oral hygiene instructions, periodontal surgery was done and gingival tissues obtained during surgery, were sent to lab to investigate expression of Fas, P53, Bcl-2 and Survivin using real-time PCR technique. Data were analyzed using Mann-Whitney and Chi-squared.

Results: Pro-apoptotic proteins (Fas, P53) were significantly ($P < 0.05$) higher in gingival tissues of diabetics (9.5×10^{-6} , 2.4×10^{-6} , respectively) in comparison to non diabetics (9.4×10^{-7} , 5.6×10^{-7}), whereas the difference in expression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Survivin) between 2 groups was not significant (9.7×10^{-8} , 3.5×10^{-7} in comparison to 1.4×10^{-7} , 3.1×10^{-7} , respectively) ($P = 0.91$, $P = 0.29$ respectively).

Conclusion: Apoptosis was increased in gingival connective tissue of diabetic patients with chronic periodontitis in comparison with non diabetic ones. Therefore, intervention in expression or function of pro-apoptotic proteins (Fas, P53) could be a new goal in the treatment of periodontal disease of diabetic patients.

Key Words: Diabetes mellitus, Apoptosis, Chronic periodontitis, Real-time PCR

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2013;26(2):99-107

† مؤلف مسؤول: شیراز - خیابان قصرالدشت - قم آباد - دانشکده دندانپزشکی - گروه آموزشی پریودنتیکس

تلفن: ۶۲۸۵۲۷۷ نشانی الکترونیک: masoud_06@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های متعدد ایفا می‌کند. مطالعات پیشین پیشنهاد کننده نقش آپوپتوز در پاتوژنز بیماری پریدنتال می‌باشند؛ از طرف دیگر دیابت ملیتوس می‌تواند آپوپتوز سلول‌های بافت‌های همبندی را افزایش دهد. هدف از این مطالعه مقایسه میزان بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز در بافت لثه افراد دیابتیک و غیردیابتیک مبتلا به پریدنتیت مزمن بود.

روش بررسی: ۲۵ بیمار مبتلا به دیابت و پریدنتیت مزمن و ۱۶ فرد غیردیابتیک مبتلا به پریدنتیت مزمن در این مطالعه شرکت کردند. ۴ هفته پس از جرم‌گیری و تسطیح ریشه به همراه آموزش روش‌های بهداشت دهان، به منظور درمان پریدنتیت جراحی پریدنتال برای بیماران انجام شد و بافت‌های لثه‌ای به دست آمده حین جراحی به آزمایشگاه فرستاده شد تا به کمک روش Real-time PCR میزان بیان پروتئین‌های Fas، P53، Bcl-2 و Survivin بررسی گردد. داده‌ها توسط تست Mann-Whitney و Chi-squared آنالیز شدند.

یافته‌ها: پروتئین‌های پیش آپوپتوزی (Fas و P53) به شکل معنی‌داری در بافت لثه بیماران دیابتیک (به ترتیب $9/5 \times 10^{-6}$ و $2/4 \times 10^{-6}$) بیشتر از افراد غیردیابتیک (به ترتیب $9/4 \times 10^{-7}$ و $5/6 \times 10^{-7}$) بیان شده بود ($P < 0/05$)، درحالی‌که تفاوت در میزان بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی (Survivin و Bcl-2) معنی‌دار نبود (به ترتیب $9/7 \times 10^{-8}$ و $3/5 \times 10^{-7}$ در مقابل $1/4 \times 10^{-7}$ و $3/1 \times 10^{-7}$) (به ترتیب $P = 0/91$ و $P = 0/29$).

نتیجه‌گیری: میزان آپوپتوز در بافت همبند لثه افراد دیابتیک مبتلا به پریدنتیت مزمن بیشتر از افراد غیردیابتیک با شرایط پریدنتال یکسان بود. بنابراین تداخل در بیان یا عملکرد پروتئین‌های پیش آپوپتوزی (Fas و P53) می‌تواند هدف جدیدی در درمان بیماری پریدنتال مبتلایان به دیابت باشد.

کلید واژه‌ها: دیابت ملیتوس، آپوپتوز، پریدنتیت مزمن، Real-time PCR

وصول: ۹۱/۰۶/۲۱ اصلاح نهایی: ۹۲/۰۳/۱۲ تایید چاپ: ۹۲/۰۳/۱۷

مقدمه

باشد (۵).

برعکس کاهش سرعت آپوپتوز در برخی ارگان‌های بدن می‌تواند منجر به بقا و تجمع سلول‌های غیرطبیعی شده که نهایتاً ممکن است تبدیل به تومورهای سرطانی شوند (۵). شواهد زیادی در دست است که به هم خوردن تعادل آپوپتوز سلول‌ها نقش مهمی را در بسیاری از عوارض دیابت ایفا می‌کند، که به عنوان مثال می‌توان به نقش آپوپتوز در نوروپاتی حاصل از دیابت و یا میکروکاریدال آپوپتوز اشاره نمود (۱).

در رابطه با اختلال در ترمیم زخم افراد مبتلا به دیابت تحقیقات زیادی صورت گرفته و نتایج مختلفی حاصل شده است. کاهش در تعداد فیبروبلاست‌ها در زخم‌های افراد دیابتیک به عنوان یک فاکتور مهم در تأخیر ترمیم زخم در این افراد عنوان می‌شود. این کاهش می‌تواند به علت تغییر در بروز فاکتورهای رشدی، پاسخ‌های التهابی تغییر یافته و یا افزایش پروتئین‌های Glycosylated باشد. امروزه علاوه بر عوامل فوق، افزایش آپوپتوز هم به عنوان فاکتوری که می‌تواند تعداد فیبروبلاست‌ها را در این افراد کاهش دهد و منجر به اختلال در ترمیم زخم شود، مطرح می‌گردد (۶).

به بیان دیگر، عدم دستیابی به تعداد کافی فیبروبلاست‌ها در بافت‌های در حال ترمیم افراد دیابتیک می‌تواند تحت تأثیر دو مکانیزم

دیابت به عنوان یک بیماری شایع تهدیدکننده سلامت کل سیستم بدن شناخته شده است. از آنجایی که دیابت منجر به تغییر در محیط میکروسکوپی سلولی بسیاری از بافت‌های بدن می‌شود همراه با عوارض گسترده‌ای در ارگان‌های مختلف می‌باشد. محیط دهان یکی از مناطقی است که می‌تواند تأثیرپذیر از بیماری دیابت باشد. این بیماری می‌تواند منجر به تخریب سریع تر نسوج پریدنتال و افزایش ریسک از دست دادن دندان‌ها شود (۱).

دو پروسه سلولی که تحت تأثیر دیابت قرار می‌گیرند عبارتند از: التهاب و آپوپتوز (۱). آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌ها است که توسط سیگنال‌های مختلفی تحریک و آغاز می‌شود و منجر به تغییرات مورفولوژیک واضحی در سلول‌ها می‌شود (۳،۲).

آپوپتوز به عنوان یک مکانیزم اساسی برای پاکسازی و برداشته شدن سلول‌های ناخواسته شناخته شده است. وجود پروسه آپوپتوز، به طور طبیعی در بدن سبب جلوگیری از بروز برخی بیماری‌های خودایمنی، تومورال و عفونی می‌شود (۴).

بطوریکه بالا رفتن میزان آپوپتوز به صورت غیرطبیعی می‌تواند عامل برخی از بیماری‌های دژنراتیو مانند Multiple saclerosis، روماتوئید آرتریت، دیابت نوع I و برخی عفونت‌های ویروسی مانند ایدز

باشد:

پریدنتال در حیوانات دیابتیک، تاکنون هیچ مطالعه انسانی در این زمینه انجام نشده است. همچنین در رابطه با نقش میزان کنترل بیماری دیابت نیز مطالعه‌ای در دست نیست. به علاوه در هیچ یک از مطالعات حیوانی انجام شده از روش Real-time PCR استفاده نشده است و روش‌های میکروسکوپی و ایمنوهیستوشیمیایی به کار رفته است. در نتیجه این جای خالی در بین مطالعات گذشته انگیزه انجام این تحقیق گردید تا با طراحی مناسب، کمبودهای موجود را تا حد ممکن پوشش دهد.

باتوجه به اینکه نظریاتی درمورد تداخل دارویی در مراحل مختلف آپوتوز وجود دارد، که می‌تواند برحسب لزوم آپوتوز سلول‌های مختلف را تعدیل نماید، به نظر می‌رسد که مشخص شدن جزئیات این فرآیند در افرادی که مبتلا به هر دو بیماری دیابت و پریدنتیت هستند، راهگشای درمان‌های آتی باشد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه میزان بیان پروتئین‌های دخیل در آپوتوز در بافت لثه افراد دیابتیک و غیردیابتیک مبتلا به پریدنتیت مزمن بود.

روش بررسی

کلیه افراد وارد شده در این مطالعه براساس میزان از دست رفتن چسبندگی بالینی (۳ میلی‌متر یا بیشتر)، مبتلا به پریدنتیت مزمن متوسط تا پیشرفته بودند. به علاوه، داشتن حداقل ۱۴ دندان (به جز دندان‌های مولر سوم) و تأیید نیاز به انجام جراحی پریدنتال در فاز دوم درمان، پس از ارزیابی نتایج فاز یک درمان (حداقل پس از ۴ هفته) از دیگر معیارهای ورود به مطالعه بودند. معیارهای خروج نیز شامل حاملگی، مصرف دخانیات، مصرف وسیع آنتی‌بیوتیک در ۲ ماه گذشته، مصرف کورتیکواستروئید در ۶ ماه گذشته، سابقه درمان پریدنتال در ۶ ماه گذشته، وجود شرایط سیستمیک یا مصرف داروهایی که در پاتوژن بیماری پریدنتال یا روند درمان تداخل ایجاد کنند و نیز منع تجویز جراحی پریدنتال بنا به نظر پزشک معالج بیمار بودند.

جهت انتخاب افراد دیابتیک مبتلا به پریدنتیت مزمن متوسط تا شدید، پس از طی مراحل اداری، فرم‌های معاینه رایگان دندانپزشکی در مرکز دیابت درمانگاه شهید مطهری شیراز قرار داده شد و بیماران متقاضی نام و مشخصات خود را در این فرم‌ها ثبت می‌کردند. سپس بیماران جهت معاینه دندانپزشکی فرا خوانده شده و تمام درمان‌های

تخریکات کافی جهت پرولیفراسیون این سلول‌ها وجود ندارد و یا اینکه مرگ برنامه‌ریزی شده این سلول‌ها افزایش می‌یابد (۶).

پریدنتیت به عنوان یک بیماری عفونی، التهابی و مهم‌ترین عامل از دست رفت دندان‌ها در بالغین شناخته می‌شود (۷). پروسه‌های پیچیده التهابی و ایمونولوژیک در پیشرفت پریدنتیت دخیل هستند. فعالیت‌های بافتی در یک پریدنتیوم بیمار شامل فعالیت‌های سلولی در رابطه با اینفیلتراسیون سلول‌های التهابی و تخریب و بازسازی بافت‌های اپی‌تلیالی و همبندی می‌باشند (۸).

با توجه به اینکه آپوتوز مسؤول از بین رفتن سلول‌های ناخواسته، صدمه دیده و عفونی در بدن می‌باشد، اخیراً تحقیقات مربوط به آن دستخوش تحولات و پیشرفت‌های زیادی شده است. بطوریکه امروزه به هم خوردن تنظیم پدیده آپوتوز در بدن (کاهش یا افزایش آن) به عنوان یک نظریه جدید در پاتوژن و نحوه ایجاد برخی بیماری‌ها، که مکانیزم بروز آنها کاملاً شناخته شده نیست، مطرح می‌شود (۹).

به نظر می‌رسد که وجود فاکتورهای پیش آپوتوزی و ضدآپوتوزی، تعیین‌کننده میزان مقاومت و یا مستعد بودن سلول‌ها به آپوتوز باشد. این فاکتورها نقش مهمی را در ایجاد، پیشرفت و مزمن شدن برخی بیماری‌های دژنراتیو، خود ایمنی و بدخیم ایفا می‌کنند. بنابراین شناسایی عوامل تأثیرگذار بر روی این فاکتورها، و نهایتاً بر روی پروسه آپوتوز، می‌تواند نویددهنده شناسایی جنبه‌های ناشناخته برخی بیماری‌ها و ارائه‌دهنده روش‌های درمانی جدید باشد (۱۰).

علیرغم مشخص بودن نقش بیماری دیابت در پاتوژن پریدنتیت، هنوز نیاز به انجام مطالعات پایه‌ای جهت بررسی جزئیات نحوه تأثیر هیپرگلیسمی و سایر عوارض سیستمیک بیماری دیابت بر روی پاتوژن بیماری‌های مختلف، از جمله پریدنتیت، احساس می‌شود.

با توجه به تأکیدی که در مورد نقش آپوتوز سلول‌های مختلف دفاعی، بافت همبند و استخوانی در پاتوژن پریدنتیت وجود دارد و با در نظر گرفتن تأثیر هیپرگلیسمی بر روی آپوتوز سلول‌های نسوج مختلف، هدف از این تحقیق پایه‌ای بررسی و مقایسه آپوتوز سلول‌های بافت همبند لثه در افراد غیردیابتیک و افراد دیابتیک (با قند خون کنترل شده و کنترل نشده) می‌باشد.

علیرغم مطالعات انجام شده در رابطه با بررسی آپوتوز بافت‌های

تحقیقات سرطان سرطان دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ارسال می‌شدند.

استخراج RNA و تهیه cDNA

میزان بیان ژن‌های P-53، Fas، Survivin و Bcl-2، جهت بررسی میزان آپوپتوز، توسط تکنیک (qRT-PCR) Quantitative real time-PCR آنالیز شدند. جهت استخراج RNA، ابتدا سلول‌ها توسط ۱/۵ میلی‌لیتر Trizol لیز شدند. سپس ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به آن‌ها اضافه شد تا یک محلول شیری به دست آید. پس از آن محلول در سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، فاز بدون رنگ سطحی به یک تیوب دیگر منتقل شد، به نحوی که با ناحیه اینترفاز که حاوی DNA و پروتئین‌های سلولی است تماسی حاصل نشود. جهت رسوب RNA، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت (Overnight) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن مجدداً در سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. ایزوپروپانول به دقت خارج شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ سرد به رسوب RNA اضافه شد و تیوب به مدت ۱۶ ساعت (Overnight) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مجدداً تیوب‌ها سانتریفوژ شده و ماده شناور سطحی (Supernatant) به طور کامل خارج شد. به منظور خشک کردن رسوب RNA، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در زیر هود قرار داده شد. سپس رسوب موردنظر در ۱۱ میکرولیتر آب DEPC حل شد. نهایتاً از RNA استخراج شده، cDNA توسط کیت cDNA synthesis (Fermentas, Canada) و طبق دستورالعمل کارخانه سنتز شد.

انجام Real-Time PCR کمی

میزان بیان ژن‌های ذکر شده با استفاده از پرایمرهای مناسب طراحی شده در نرم‌افزار Primer-blast بررسی گردید. لازم به ذکر است که از ژن 18s-rRNA به عنوان ژن Housekeeping برای مقایسه میزان بیان ژن‌ها استفاده شد. این ژن صحت cDNA به دست آمده را ارزیابی می‌کند. تکنیک qRT-PCR برای هر نمونه ۲ بار تکرار

دندانپزشکی مورد نیاز به ایشان اعلام می‌گردید. به بیمارانی که حائز معیارهای ورود به مطالعه بودند، توضیح کاملی درمورد این طرح تحقیقاتی داده می‌شد و در صورت موافقت بیمار با شرکت در این مطالعه، فرم رضایت آگاهانه توسط آنها امضا می‌شد. برای این بیماران درخواست آزمایش FBS و HbA1c جدید داده شد و درمورد وضعیت سیستمیک بیمار و نیاز به تغییر پروسه‌های معمول جراحی پریدونتال با پزشک معالج مربوطه مشاوره انجام شد که در اکثریت قریب به اتفاق موارد، جراحی‌های پریدونتال بدون تغییر خاصی قابل انجام بود.

براساس منتشرات انجمن دیابت امریکا، هدف درمانی در افراد دیابتیک رسیدن به FBS بین ۹۰ تا ۱۳۰ mg/dl و HbA1c کمتر از ۷ درصد می‌باشد. براین اساس بیمارانی که به این اهداف درمانی دست پیدا کرده باشند، به عنوان مبتلایان به دیابت کنترل شده (کنترل خوب) در نظر گرفته می‌شوند و در غیر این صورت وضعیت بیماری دیابت آنها کنترل نشده (کنترل ضعیف) می‌باشد و نیازمند به تغییر در میزان داروها یا روش درمانی هستند (۱۱،۱۲).

افراد گروه کنترل نیز از مراجعه‌کنندگان به بخش پریدونتولوژی دانشکده دندانپزشکی شیراز و به صورت همخوان از لحاظ سن و جنس انتخاب شدند، که آنها نیز پس از آشنایی با این طرح تحقیقاتی، در صورت تمایل فرم رضایت آگاهانه را امضاء می‌کردند.

برای تمامی بیماران وارد شده به مطالعه، فاز اول درمان‌های پریدونتال به منظور رفع التهاب و برداشت فاکتورهای موضعی صورت گرفت و روش‌های بهداشت دهان به طور کامل به آنها آموزش داده شد. پس از گذشت حداقل ۴ هفته، وضعیت پریدونتال بیماران دوباره ارزیابی گردید (Re-evaluation) و در صورت لزوم به انجام فاز دوم درمان پریدونتال، جراحی فلپ پریدونتال انجام شد.

تمامی بافت‌های لثه‌ای که هنگام جراحی فلپ پریدونتال جدا می‌شدند (شامل بافت گرانولیشن و نواحی جدا شده به وسیله برش‌های ساب مارژینال) با یک پنس استریل و بدون آلوده شدن به بزاق یا مخاط بیمار (به منظور عدم اختلاط با RNAهای باکتریایی، قارچی، سلول‌های متفلس شده و سایر موارد)، درون تیوب‌های استریل مخصوص قرار داده شده و در فریزر نگهداری می‌شدند. در انتهای جراحی، تیوب‌ها جمع‌آوری شده و پس از اختصاص کد به هر نمونه، به صورت بسته‌بندی در یخ خشک، جهت آزمایش‌های لازم به مرکز

دیابتیک مبتلا به پریدنتیت را تشکیل می‌دادند. از ۲۵ فرد دیابتیک حاضر در مطالعه، ۱۳ نفر (۳ مرد و ۱۰ زن) دیابت کنترل شده و بقیه (۳ مرد و ۹ زن) دیابت کنترل نشده داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی تفاوت افراد مورد مطالعه در دو گروه غیردیابتیک و دیابتیک از نظر سن و جنس

	جنس	سن (سال)
غیردیابتیک	زن ۱۲، مرد ۴	۴۸/۷±۱۱/۹
	زن ۱۹، مرد ۶	۵۳/۸±۸/۹
دیابتیک	زن ۱۰، مرد ۳	۵۳/۶±۱۰/۱
	زن ۹، مرد ۳	۵۴±۸

افراد شرکت‌کننده در این مطالعه، از نظر سن و جنس مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از آزمون‌های Mann-Whitney و Chi-Squared نشان داده شد، گروه‌های مورد مطالعه از نظر این دو فاکتور با هم اختلاف نداشتند ($P > 0.05$).

در این مطالعه، میزان بیان پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز، Bcl-2 و Survivin و همچنین پروتئین‌های القاکننده آپوپتوز، p53 و Fas، در سطح ژنی میان افراد دیابتیک و غیردیابتیک مقایسه شد که نتایج آزمون Mann-Whitney حاکی از آن است که سطح بیان ژنی فاکتورهای القاکننده آپوپتوز در افراد دیابتیک به شکل معنی‌داری نسبت به افراد غیردیابتیک افزایش دارد ($P < 0.05$). درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در میزان بیان mRNA فاکتورهای مهارکننده آپوپتوز دیده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- میزان بیان ژن‌های بررسی شده در دو گروه دیابتیک و غیردیابتیک

Genes	غیردیابتیک (میان)	دیابتیک (میان)	P-value
Bcl-2	$1/4 \times 10^{-7}$	$9/17 \times 10^{-8}$	۰/۲۹
Survivin	$3/1 \times 10^{-7}$	$3/5 \times 10^{-7}$	۰/۹۱
P53*	$5/6 \times 10^{-7}$	$2/4 \times 10^{-6}$	*۰/۰۳
Fas*	$9/4 \times 10^{-7}$	$9/5 \times 10^{-6}$	*۰/۰۲

*P-value < 0.05

گردید. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه Bio-Rad (Chromo4 Real-time PCR Detector, Bio-Rad/USA) و محلول SYBER green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) مشخص گردید.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۱۵۰ نانومتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی و غلظت $1 \times$ (Applied Biosystems) SYBER green I و DEPC treated water بود.

ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه مرحله تخریب ابتدایی (Initial denaturation) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از آن ۴۰ سیکل که شامل مرحله تخریب در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و مرحله واسرشت (Extension) رشته‌های DNA در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. نور فلورسانس ساطع شده پس از این مرحله در هر سیکل اندازه‌گیری شد. PCR تکثیر شده با استفاده از محنی ذوب و الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

بیان نسبی ژن‌های p53، Fas، Survivin و Bcl-2 نسبت به گروه کنترل و ژن 18s-rRNA، با استفاده از روش کمی‌سازی نسبی (Relative quantitation-RQ) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. برای مقایسه سن و جنس افراد گروه‌های مطالعه از آزمون‌های Mann-Whitney و Chi-Squared استفاده شد. آزمون Mann-Whitney برای مقایسه میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه بین افراد دیابتیک و غیردیابتیک و همچنین بررسی رابطه سطح بیان و کنترل نشده به کار گرفته شد. همچنین بررسی رابطه سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه و غلظت HbA1c و FBS در افراد دیابتیک با آزمون Spearman's rho صورت گرفت.

یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۴۱ نفر (۱۰ مرد و ۳۱ زن) با دامنه سنی ۳۶ تا ۶۳ سال صورت گرفت که ۱۶ نفر آنان (۴ مرد و ۱۲ زن) گروه افراد غیردیابتیک مبتلا به پریدنتیت و مابقی (۶ مرد و ۱۹ زن) گروه افراد

پیشرفت این بیماری می‌تواند تحت تأثیر عوامل موضعی (مؤثر بر تجمع پلاک)، سیستمیک (دیابت ملیتوس و عفونت HIV) و یا عوامل محیطی (سیگار و استرس) قرار گیرد (۱۴). دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی پیچیده است و به وسیله افزایش مزمن قند خون مشخص می‌شود و افزایش استعداد به عفونت و ترمیم ضعیف زخم‌ها از عوارض آن هستند (۱۵). افراد مبتلا به دیابت ۳ برابر بیشتر در خطر ابتلا به پریدونتیت هستند (۱۶) و پریدونتیت ششمین عارضه دیابت معرفی شده است (۱۷). با توجه به شدت و سرعت بیشتر پیشرفت پریدونتیت در مبتلایان به دیابت (۱۸) و اثرات درمان پریدونتال در بهبود کنترل قند (۱۹)، شناخت بهتر پاتوژن بیماری‌های پریدونتال در این افراد، می‌تواند منجر به درمان‌های الحاقی جدیدتر برای کنترل بیشتر هر دو بیماری گردد. به عنوان مثال استفاده از تتراسایکلین‌ها می‌تواند منافی در بهبود شرایط هر دو بیماری را فراهم کند (۲۰،۲۱). در مطالعه حاضر، به مقایسه میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در ضایعات پریدونتال افراد دیابتیک و غیردیابتیک پرداخته شده است.

پروتئین‌های مختلفی در القاء آپوپتوز نقش دارند که از آن میان به P53 و Fas می‌توان اشاره کرد. P53 در تنظیم ژن‌های پیش آپوپتوتیک متعددی دخیل است و در صورت ایجاد آسیب برگشت‌ناپذیر به DNA، فعال شده و منجر به القاء فرآیند آپوپتوز می‌شود (۲۲). رسپتور Fas (APO-1 یا CD95) با اتصال به Fas-L موجبات تشکیل DISC را فراهم آورده و به القاء فرآیند آپوپتوز می‌انجامد (۲۳). در مقابل پروتئین‌هایی مثل BCL2 و Survivin پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک به شمار می‌روند. BCL2 یک پروتئین مهارکننده آپوپتوز و عضو اصلی خانواده BCL2 است. یکی از مکانیسم‌های اثر این پروتئین، مهار تشکیل کانال‌های غشاء خارجی میتوکندری (MACs) می‌باشد (۲۴). Survivin (BIRC5) از مهم‌ترین پروتئین‌های بازدارنده آپوپتوز (IAPs) است که با اتصال فیزیکی به کاسپاز، مانع از عملکرد صحیح آن و تجزیه سلول می‌شود (۲۵،۲۶).

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده افزایش بیان ژن‌های P53 و Fas در بافت همبند لثه افراد دیابتیک مبتلا به پریدونتیت است که در مقایسه با افراد غیردیابتیک مبتلا به پریدونتیت، این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار است ($P < 0.05$). درمورد پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک گرچه در گروه افراد دیابتیک مبتلا به پریدونتیت کاهش بیان ژن BCL2 نسبت

افراد دیابتیک، همانطور که پیشتر عنوان شد، براساس میزان غلظت HbA1c خون محیطی، به دو گروه کنترل شده ($HbA1c \leq 7\%$) و کنترل نشده ($HbA1c > 7\%$) تقسیم شدند و رابطه کنترل بیماری و بیان ژن فاکتورهای دخیل در آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون Mann-Whitney، هیچگونه ارتباط معنی‌داری میان کنترل بیماری و بیان فاکتورهای بررسی شده در این مطالعه، دیده نشد و میزان بیان ژن هر دو گروه پروتئین‌های مهارکننده، Bcl-2 و Survivin، و القاء کننده، Fas و p53، در بافت همبند لثه افراد دیابتیک کنترل شده و کنترل نشده مبتلا به پریدونتیت از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

جدول ۳- میزان بیان ژن‌های بررسی شده در افراد دیابتیک کنترل شده و کنترل نشده

Genes	غیردیابتیک (میان)	دیابتیک (میان)	P-value
Bcl-2	$5/4 \times 10^{-8}$	$2/7 \times 10^{-7}$	0/07
Survivin	$1/8 \times 10^{-7}$	$6/1 \times 10^{-7}$	0/40
P53	$3/8 \times 10^{-6}$	3×10^{-6}	0/75
Fas	$2/3 \times 10^{-6}$	$1/3 \times 10^{-5}$	0/29

همچنین به کمک آزمون Spearman's rho رابطه سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه و غلظت HbA1c و FBS (به طور جداگانه) نیز در افراد دیابتیک بررسی شد (جدول ۴) و در هیچیک از موارد ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۴- نتایج تحلیل آماری (P-value) ارتباط بین بیان ژن‌های مورد مطالعه و سطح HbA1c و FBS خون افراد دیابتیک

Genes	HbA1c	FBS
Bcl-2	0/064	0/061
Survivin	0/277	0/291
P53	0/691	0/745
Fas	0/593	0/635

بحث و نتیجه‌گیری

پریدونتیت بیماری التهابی بافت‌های حمایت‌کننده دندان می‌باشد که توسط گروهی از میکروارگانیسم‌های خاص ایجاد شده و به تخریب وسیع لیگامان پریدونتال و استخوان آلوئولار می‌انجامد (۱۳). سرعت

تعداد کافی فیبروبلاست‌ها، ترمیم به سرعت کافی و کیفیت لازم انجام نمی‌شود. بنابراین می‌توان گفت افزایش بروز ژن‌های پرو آپتوتیک از مکانیسم‌های مهم دخیل در شدیدتر بودن بیماری‌های پریدنتال در مبتلایان به دیابت نیز می‌باشد. این موضوع در راستای نتایج مطالعه Kataria و همکاران (۳۱) در سال ۲۰۱۰ نیز می‌باشد که بیان بیشتر پروتئین‌های القاگر آپوپتوز (TWEAK و Fn14) را در بافت همبند لته‌ای بیماران مبتلا به پریدنتیت را نسبت به گروه کنترل نشان دادند، نتایج مطالعات ذکر شده نشان می‌دهد که بالا رفتن میزان بروز پروتئین‌های پرو آپتوتیک و افزایش میزان آپوپتوز بافت همبند لته در پاتوژن بیماری‌های پریدنتال مؤثر بوده و به نظر می‌رسد که این مکانیسم به واسطه بیماری دیابت تشدید شده و موجب وخیم‌تر شدن وضعیت بیماری پریدنتال می‌شود.

اهمیت کلینیکی نتایج مطالعه حاضر در پیشنهاد کردن هدف‌های جدید درمانی می‌باشد. از آنجا که تداخل در پروسه آپوپتوز از هدف‌گذاری‌های جدید و مؤثر در درمان بیماری‌های بدخیم و خود ایمنی می‌باشد، امروزه تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با تأثیر داروها بر پروسه آپوپتوز صورت می‌گیرد (۳۵-۳۲). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، میزان پروتئین‌های پرو آپتوتیک P53 و Fas در بافت همبند لته افراد دیابتیک مبتلا به پریدنتیت در مقایسه با افراد غیردیابتیک به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد ولی میزان پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک BCL-2 و Survivin کاهش چندانی نشان نمی‌دهند. بنابراین تداخل در ساخته شدن و یا عملکرد پروتئین‌های پرو آپتوتیک P53 و Fas، می‌تواند هدف درمانی جدید و مطلوبی در درمان بیماری پریدنتال مبتلایان به دیابت باشد.

از آنجا که سن و جنس افراد شرکت‌کننده در گروه‌های مطالعه تفاوت معنی داری نداشتند، می‌توان گفت نتایج این مطالعه تحت تأثیر سن و یا جنسیت شرکت‌کنندگان در مطالعه نیز قرار نگرفته است (جدول ۱).

درمورد تأثیر میزان کنترل بیماری دیابت بر آپوپتوز سلول‌های بافت همبند لته، مقایسه‌ای بین گروه کنترل شده و گروه کنترل نشده از لحاظ میزان بیان ژن‌های P53، Fas، BCL-2 و Survivin انجام شد که در هیچیک از موارد تفاوت معناداری مشاهده نشد (جدول ۳). همچنین در مورد ارتباط بیان ژن‌های مذکور با میزان HBA_{1C} و

به افراد غیردیابتیک مبتلا به پریدنتیت دیده می‌شود، اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بیان ژن Survivin نیز در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲). این نتایج حاکی از میزان بیشتر آپوپتوز در بافت همبند لته افراد دیابتیک مبتلا به پریدنتیت می‌باشد که به نحوی در سازگاری با مطالعات قبلی است. در مطالعه Rai و همکاران در سال ۲۰۰۵ که بر روی زخم‌های دیابتیک صورت گرفت، افزایش میزان کلی آپوپتوز بافت همبند پوست با روش میکروسکوپ نوری بررسی شد و تغییرات مورفولوژی و DNA-Fragmentation نشان داده شد (۲۷).

مطالعات Desta و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۲۸)، Fu و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۹) و Kang و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۳۰)، به ترتیب افزایش آپوپتوز فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها و سلول‌های بافت همبندی را در ضایعات لته‌ای موش‌های دیابتیک نشان دادند که در راستای نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. علیرغم ارزشمند بودن مطالعات مذکور، در مقایسه با مطالعه حاضر دارای مشکلاتی برای تفسیر و تعمیم نتایج می‌باشند. به عنوان مثال در مطالعه Desta و همکاران (۲۸) زخم‌های موکوپریوستالی بر روی لته پالاتال دندان‌های قدامی موش‌های دیابتیک و سالم ایجاد شده بود و پس از چند روز، ترمیم این زخم‌ها بررسی شد. همچنین در مطالعات Fu و همکاران و Kang و همکاران ضایعات پریدنتال در موش‌ها به کمک لیگاپور و تلقیح میکروارگانسیم‌های خاصی (به ترتیب P.gingivalis و A.a) ایجاد شده بود (۲۹، ۳۰). ضمن اینکه در اکثر موارد دیابت موش‌ها به وسیله تزریق Streptozotocin القاء گردیده بود. بنابراین تعمیم نتایج این مطالعات به ضایعات پریدنتال انسان‌های مبتلا به دیابت، با توجه به اینکه هر دو بیماری روندی مزمن و طولانی دارند، مشکل می‌باشد. علاوه بر فقدان مطالعه انسانی، متدولوژی به کار رفته در این مطالعات اکثراً بررسی میکروسکوپی و ایمنوهیستوشیمیایی بوده است و تاکنون بررسی Real time PCR در این زمینه انجام نشده است. لذا نتایج مطالعه حاضر می‌تواند تا حدودی روشنگر نقش پدیده آپوپتوز در پاتوژن پریدنتیت در مبتلایان به دیابت و بیانگر شدت بالاتر پریدنتیت در این افراد باشد. با توجه به مطالعه Al-Meshat و همکاران (۶) افزایش بروز ژن‌های پرو آپتوتیک از مکانیسم‌های اصلی تأخیر ترمیم زخم‌های دیابتیک شناخته شده است که به علت عدم Repopulation و استقرار

در مطالعات آینده می‌توان به بررسی سایر فاکتورهای پیش آپوپتوزی و ضدآپوپتوزی پرداخت.

درنهایت، بروز پروتئین‌های پیش آپوپتوزی P53 و Fas در بافت همبند لثه افراد دیابتیک مبتلا به پرودنتیت در مقایسه با افراد غیردیابتیک افزایش معناداری نشان می‌دهد و این مسأله بیانگر میزان بالاتر آپوپتوز در این بیماری می‌باشد. بنابراین یافتن داروها و یا پروسه‌های تداخل‌کننده در مراحل ساخته شدن و یا عملکرد پروتئین‌های پروآپوپتوتیک ذکر شده احتمالاً می‌تواند منجر به بهبود شرایط بیماری پرودنتال و نتایج درمان در مبتلایان به دیابت شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به وسیله حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز براساس قرارداد شماره ۳۵۱۹ حمایت مالی گردیده و با مشارکت مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی شیراز به انجام رسیده است. این مطالعه از پایان‌نامه تخصصی دکتر مسعود گل شاه به شماره ۱۴۳۶، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز منتج شده است. بدین‌وسیله از راهنمایی و زحمات دکتر نصراله عرفانی، خانم نوشین چناری و آقای احمد حسینی و هم چنین از سوپروایزور مرکز دیابت درمانگاه شهید مطهری، سرکار خانم پاک فطرت تشکر و قدردانی می‌گردد.

FBS افراد دیابتیک مبتلا به پرودنتیت، نیز ارتباط معنی‌داری مشاهده نشده است (جدول ۴). از آنجا که مطالعه دیگری در این زمینه انجام نشده است، تفسیر این نتایج مشکل بوده و مقایسه با سایر مطالعات امکان‌پذیر نیست. اما با استناد به این نتایج می‌توان گفت دیابت با مکانیسم‌های دیگری به جز افزایش مزمن قند خون و تشکیل محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون (AGEs) نیز موجب افزایش آپوپتوز سلول‌های بافت همبند لثه می‌شود. بنابر مطالعه Graves و همکاران (۳۶) در سال ۲۰۰۷، دیابت از طریق افزایش گونه‌های اکسیژن فعال و افزایش TNF نیز می‌تواند موجب افزایش القای آپوپتوز شود. گرچه در مطالعه حاضر، مستقیماً به بررسی AGEs پرداخته نشده است، اما انتظار بر این است که با افزایش HBA_{1C} و کاهش میزان کنترل دیابت، میزان AGEs افزایش یافته باشد، همچنین نشان داده شده است که اضافه کردن AGEs به محیط کشت فیبروبلاست‌های پوست انسان، افزایش آپوپتوز را در پی خواهد داشت (۳۹-۳۷). به هر حال عدم تفاوت در میزان آپوپتوز دو گروه دیابتیک ممکن است ناشی از تعداد نسبتاً کم نمونه‌ها در هر یک از گروه‌های کنترل شده و نشده باشد، اگرچه تعداد کلی نمونه‌های دیابتیک کافی بودند. از آنجا که به دلیل محدودیت منابع مالی این امر در مطالعه حاضر میسر نبود، بنابراین تحقیق دیگری در زمینه تأثیر میزان کنترل دیابت با تعداد ۲ تا ۳ برابر در هر یک از گروه‌های کنترل شده و نشده پیشنهاد می‌شود، همچنین

منابع:

- 1- Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res*. 2006;85(1):15-21.
- 2- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88(3):355-65.
- 3- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501.
- 4- Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):191-200.
- 5- Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 1996;274(5291):1363-6.
- 6- Al-Mashat HA, Kandru S, Liu R, Behl Y, Desta T, Graves DT. Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes*. 2006;55(2):487-95.
- 7- Vieira BJ, de Souza AR, Aarestrup FM. Tumor necrosis factor-alpha expression and detection of apoptosis at the site of chronic periodontitis in AIDS patients. *J Periodontal Res*. 2003;38(6):606-10.
- 8- Koulouri O, Lappin DF, Radvar M, Kinane DF. Cell division, synthetic capacity and apoptosis in periodontal lesions analysed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Periodontol*. 1999;26(8):552-9.
- 9- Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science*. 1997;275(5302):960-3.
- 10- Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):12736-7.
- 11- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2007. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 1:4-41.
- 12- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*. 2011;34 Suppl 1:11-61.

- 13- Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Clinical periodontology 10th ed. St.louis: Saunders; 2006. chap 7: 100-9.
- 14- Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Clinical periodontology 10th ed. St.louis: Saunders; 2006. chap 21:355-61.
- 15- Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Clinical periodontology 10th ed. St.louis: Saunders; 2006. chap 17:284-311.
- 16- Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991;62(2):123-31.
- 17- Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.
- 18- Ainamo J, Lahtinen A, Uitto VJ. Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes. A report of 2 cases. *J Clin Periodontol.* 1990;17(1):22-8.
- 19- Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Clinical periodontology 10th ed. St.louis: Saunders; 2006. chap 18:312-29.
- 20- Miller LS, Manwell MA, Newbold D, Reding ME, Rasheed A, Blodgett J. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. *J Periodontol.* 1992;63(10):843-8.
- 21- Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG. Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol.* 1997;68(8):713-9.
- 22- Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 1998;12(19):2973-83.
- 23- Wajant H. Connection map for fas signaling pathway science STKE. http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_7966.
- 24- Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(2):191-201.
- 25- Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.* 2006;244(2):164-71.
- 26- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998;58(23):5315-20.
- 27- Rai NK, Suryabhan, Ansari M, Kumar M, Shukla VK, Tripathi K. Effect of glycaemic control on apoptosis in diabetic wounds. *J Wound Care.* 2005;14(6):277-81.
- 28- Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res.* 2010;89(6):609-14.
- 29- Fu YW, He HB, Ou JG. [Osteoblast apoptosis in experimental diabetic periodontitis in rats]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2009;27(3):252-5, 259.
- 30- Kang J, de Brito Bezerra B, Pacios S, Andriankaja O, Li Y, Tsiagbe V, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection enhances apoptosis in vivo through a caspase-3-dependent mechanism in experimental periodontitis. *Infect Immun.* 2012;80(6):2247-56.
- 31- Kataria NG, Bartold PM, Dharmapatri AA, Atkins GJ, Holding CA, Haynes DR. Expression of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and its receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 protein (Fn14), in healthy tissues and in tissues affected by periodontitis. *J Periodontal Res.* 2010;45(4):564-73.
- 32- Ottonello L, Bertolotto M, Montecucco F, Bianchi G, Dallegri F. Delayed apoptosis of human monocytes exposed to immune complexes is reversed by oxaprozin: role of the Akt/IkappaB kinase/nuclear factor kappaB pathway. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):294-306.
- 33- Zhou YJ, Wang JH, Zhang J. Hepatocyte growth factor protects human endothelial cells against advanced glycation end products-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(2):658-66.
- 34- Demidenko ZN, Vivo C, Halicka HD, Li CJ, Bhalla K, Broude EV, et al. Pharmacological induction of Hsp70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. *Cell Death Differ.* 2006;13(9):1434-41.
- 35- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25535-43.
- 36- Graves DT, Liu R, Oates TW. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis. *Periodontol 2000.* 2007;45:128-37.
- 37- Niu Y, Xie T, Ge K, Lin Y, Lu S. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(4):344-51.
- 38- Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(2):850-6.
- 39- Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12087-95.