

بررسی اثر استرس بر میزان آزاد سازی یون های فلزی در بزاق بیماران تحت درمان ارتودنسی ثابت "یک مطالعه Pilot"

دکتر فریبرز امینی^۱، دکتر هژیر رحیمی^{۲*}، دکتر ساغر هرندی^۳، دکتر ریحانه حاج رضایی^۴، دکتر سارا آیرملو^۵، دکتر فاطمه بلدی^۶

۱- دانشیار گروه ارتودنسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دندانپزشکی تهران

۲- متخصص ارتودنسی

۳- متخصص پروتزهای دندانی

۴- متخصص بیماری های دهان

خلاصه:

سابقه و هدف: استرس فیزیولوژیک از طریق ایجاد تغییرات در خصوصیات بزاق روی کروژن آلیاژهای ارتودنسی تاثیر می گذارد. این مطالعه با هدف سنجش تاثیر استرس در میزان یون های نیکل (Ni) و کروم (Cr) در بزاق بیماران تحت درمان دستگاه های ثابت ارتودنسی ترتیب داده شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه quasi-clinical trial تعداد ۱۰ بیمار شرکت کردند. جمع آوری نمونه بزاق بیماران در سه مرحله متفاوت به ترتیب زیر انجام شد، T1: قبل از قرار دادن دستگاه های ارتودنسی، T2: سه ماه پس از قرار دادن دستگاه های ثابت ارتودنسی و قبل از ایجاد استرس، T3: ۱۵ دقیقه پس از ایجاد استرس از طریق تست استرس (Trier Social Stress Test). میزان یون ها از طریق روش Atomic Absorption Spectrophotometry اندازه گیری شد. داده ها از طریق آزمون های آماری ANOVA، Post hoc Bonferroni آنالیز شدند.

یافته ها: تحقیق روی تعداد ۱۰ نفر و در سه مرحله انجام گرفت. میزان یون کروم به ترتیب $5/21 \pm 3/38$ و $5/42 \pm 2/44$ و در مورد یون نیکل به ترتیب $12/78 \pm 5/26$ و $14/02 \pm 5/14$ و بالاخره $14/9 \pm 5/75$ رسید و این تغییرات به لحاظ آماری معنی دار نبود. ($P < 0/04$)

نتیجه گیری: به نظر می رسد که استرس بر میزان آزاد سازی یون های فلزی در بزاق بیماران تحت درمان ارتودنسی ثابت تاثیر نداشته باشد.

کلید واژه ها: آلیاژهای ارتودنسی، نیکل، کروم، بزاق، استرس، Trier Social Stress Test

وصول مقاله: ۹۲/۳/۱۳ اصلاح نهایی: ۹۳/۲/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۳/۲/۱۳

مقدمه:

اثرات *in vitro* سیتوتوکسیک و تخریب DNA روی سلول ها را نشان داده اند.^(۶-۸)

طی دو دهه اخیر در مطالعات گوناگون به این امر که آزادسازی این اجزا از اپلانیس های ارتودنسی باعث اثرات سوء سیستمیک یا داخل دهانی می شود، پرداخته شده است. تاکنون مطالعات متعددی با هدف اثبات سازگاری زیستی آلیاژهای ارتودنسی بصورت *in vivo* به سنجش محتوای نیکل و کروم در بزاق^(۹-۱۶)، خون^(۹)، ادرار^(۱۷) و سلول های مخاط دهانی^(۷،۱۸) در بیماران تحت درمان ارتودنسی پرداخته

آزاد شدن یون های فلزی از اپلانیس های ارتودنسی جزئی از روند اضمحلال و Biodegradation آلیاژ است.^(۱) دستگاه های ارتودنسی با ساختار فلزی به طور متوسط شامل ۵۰ تا ۸ درصد نیکل و ۱۷ تا ۲۲ درصد کروم هستند.^(۲،۳) اگرچه آلیاژهای ارتودنسی حاوی مواد آنتی کروژن اند اما ثابت شده است که در محیط دینامیک دهان مستعد کروژن می باشند.^(۱) در برخی از افراد حساسیت در تماس با نیکل یا کروم مشاهده شده است.^(۴، ۵) بعلاوه مطالعات *in vivo* و

انجام این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشکده مورد تأیید قرار گرفت. پس از توضیح مراحل انجام تحقیق برای نمونه ها از آنها رضایت نامه گرفته شد و (در مواردی که بیماران زیر ۱۸ سال بودند از والدین آنها رضایت نامه گرفته شد).

اولین مرحله نمونه گیری بزاق قبل از باند براکت های ارتودنسی به دندان ها انجام شد (T1) سپس درمان ارتودنسی ثابت از طریق باند کردن براکت Stainless Steel 0.22 (A1S1303: USA و CA و Monrovia و 3M/ Unitek) بندهای (American Othodontics Sheboygan Wis)

آرچ وایرهای Ni-Ti (Wire G&H, company in USA) آغاز شد به تمام بیماران دستورات بهداشت دهانی شامل استفاده از مسواک های ارتودنسی و نوع مشخصی از خمیردندانی (USA), Proctor & Gamble, Crest, Regular (داده شد. پس از ۳ ماه از شروع درمان نمونه گیری مرحله دوم انجام شد (T2). در این مرحله استرس سایکولوژیک از طریق Trier Social Stress Test یا TSST که عبارتست از ۱۰ دقیقه معرفی تست برای بیمار، ۵ دقیقه صحبت کردن بیمار و ۵ دقیقه انجام فعالیت arithmetic (شمارش متوالی اعداد) در مقابل ۲ دندانپزشک مرد و ۱ دندانپزشک زن انجام شد. (۳۱)

جمع آوری نمونه های بزاق از بیماران پس از ۱۵ دقیقه از انجام تست TSST، برای سومین بار (T3) انجام شد.

به بیماران هم بصورت کتبی و شفاهی توصیه گردید ۲۴ ساعت قبل از نمونه گیری از خوردن کلیه ی غذاها و نوشیدنی های با محتوای بالای نیکل و کروم پرهیز کنند. همچنین به بیماران دستورات لازم مبنی بر عدم مسواک زدن و استفاده از مواد حاوی فلوراید در شب قبل از نمونه گیری داده شد. (۹) کلیه نمونه گیری ها بین ساعات ۱۹-۱۶ انجام پذیرفت تا تاثیر مداخله گر ساعات روزانه و مواد غذایی خورده شد حذف گردد. (۱۰،۲۷)

بزاق غیر تحریک شده در این مطالعه جمع آوری و مورد سنجش قرار گرفت. در زمان جمع آوری بزاق، از شرکت کنندگان خواسته شد تا دهانشان را با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر

اند. برخی مطالعات با مقایسه بزاق بیماران ارتودنتیک و بدون درمان ارتودنسی تفاوت قابل توجهی در میزان نیکل و کروم نشان ندادند. (۱۲، ۱۳) از سوی دیگر، آزادسازی این یون ها تغییرات قابل توجهی را بسته به زمان نمونه گیری و ارتباط آن با مراحل درمان ارتودنسی نشان می دهد. (۱۴-۱۶ و ۱۱-۳۰) میزان مستعد بودن آلیاژهای ارتودنسی به کروژن تا حد زیادی وابسته به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بزاق است (۱) در مطالعات In-vivo مذکور به بررسی اثرات قابل توجه عوامل سیستمیک و سیگار، رژیم غذایی، زمانی از روز که نمونه گرفته می شود، پرداخته شده است. ممکن است استرس و اضطراب از طریق تاثیر بر ترکیب (۱۹) و اسیدیته بزاق بر روی رفتارهای کروژن آلیاژ موثر باشد (۲۰-۲۳) اگر چه تا کنون مطالعه ای در این رابطه صورت نگرفته است.

روند رو به افزایش استرس در زندگی روزمره در گروه های سنی که تحت درمان ارتودنسی هستند، به خوبی مبین اهمیت این مطالعه می باشد. (۲۴، ۲۵)

بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین تاثیر استرس فیزیولوژیک در میزان آزادسازی نیکل و کروم از دستگاه های ثابت ارتودنسی در بزاق بیماران تحت درمان در بخش ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد سال ۱۳۹۱ تا ۹۲ ترتیب داده شد.

مواد و روش ها:

این مطالعه، quasi - Clinical Trial روی ۱۰ بیمار دارای ارتودنسی ثابت انجام شد. نمونه ها از میان ۵۳ بیمار مراجعه کننده به بخش ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد در سال ۱۳۹۱ تا ۹۲ انتخاب شدند.

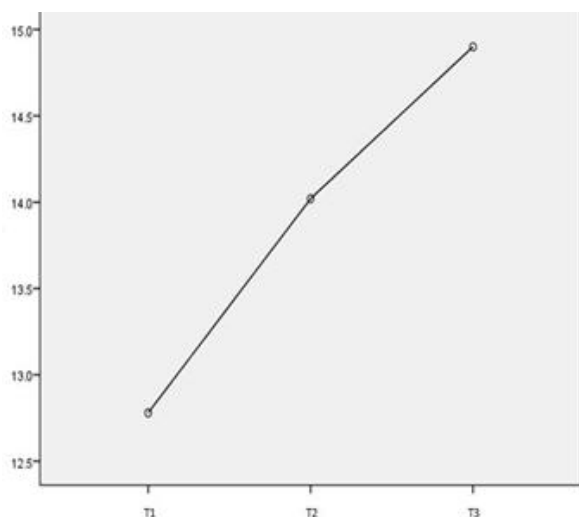
معیارهای انتخاب بیماران شامل موارد زیر بود: گروه سنی ۱۲ تا ۲۵ سال، نبود تاریخچه مشکلات سیستمیک، عدم مصرف الکل و سیگار، عدم مصرف دارو و فقدان هر گونه ترمیم فلزی داخل دهانی (آمالگام و پروتز ثابت) یا دستگاه های متحرک ارتودنسی در شروع درمان ارتودنسی ثابت و علاقه مندی به مشارکت در کلیه مراحل این مطالعه بود. (۲۶-۳۱)

جدول ۱ میزان نیکل و کروم بزاق را در زمان های متفاوت نشان می دهد.

جدول ۱- میزان نیکل و کروم بزاق در ۳ مرحله اندازه گیری

مرحله	کرومیوم	نیکل
اول	۵/۲ ± ۳/۳۸	۱۲/۷۸ ± ۵/۲۶
دوم	۵/۴۲ ± ۲/۴۴	۱۴/۰۲ ± ۵/۱۴
سوم	۶/۲۷ ± ۲/۶۸	۱۴/۹۰ ± ۵/۷۵
	P < /	P < /

هر دو یون در طول زمان روندافزایشی را نشان می دهد این در حالی بود که میزان کروم بین T1 و T3 تفاوت قابل ملاحظه ای را نشان نداد. ($P < 0/4$)



نمودار ۱- میزان نیکل بزاق در ۳ مرحله اندازه گیری

برای مدت ۳۰ ثانیه شستشو دهند و سپس بعد از ۲ دقیقه بزاق خود را داخل تیوب تخلیه کنند. تیوب ها از قبل با آب مقطر و ۲ بار چرخاندن استون شستشو داده شد.

مقدار ۵ میلی لیتر بزاق از هر بیمار جمع آوری گردید و نمونه ها قبل از ارسال برای آنالیز حداکثر به مدت ۷ روز در یخچال نگهداری شدند.^(۲۸-۳۱)

در هر نمونه هر ۱ میلی لیتر بزاق با ۵ میلی لیتر از Triton X-100) ساخت کشور آلمان و (Merck Darmstadt) رقیق سازی شد.

محتوای فلزی بزاق از طریق اسپکتوفتومتر Atomic Absorption (GTA120) ساخت کشور استرالیا با graphit oven مورد آنالیز قرار گرفت.

تعداد نمونه ها متناسب با هدف تحقیق برای بررسی توزیع نرمال، انحراف معیار و خطای استاندارد انتخاب شد. داده های توصیفی در قالب میانگین و انحراف استاندارد گزارش گردید. توزیع نرمال داده ها از طریق آزمون نرمالیتی Kolmogorov Smirnov مورد آنالیز قرار گرفت.

در نتیجه تغییرات در میزان نیکل و کروم در زمان های متفاوت از طریق آنالیز مکرر آماری واریانس (ANOVA) و Post hoc Bonferroni Test -مورد سنجش قرار گرفت. فرضیه کرویت داده ها از طریق تست Mauchly مورد سنجش قرار گرفت. مبنای قابل توجه بودن آماری ($P < 0/05$) بود.

یافته ها:

تعداد ۱۰ نمونه شامل ۶ زن و ۴ مرد با سن $15/6 \pm 3/5$ (با دامنه سنی ۲۱-۱۲ سال) در این مطالعه شرکت کردند. کلیه معیارهای انتخاب نمونه ها در تمام مراحل تحقیق در نظر گرفته شد. نمونه ها در طول تحقیق فاقد بیماری سیستمیک و مصرف دخانیات و رستوریشن فلزی بودند. نتایج Kolmogorov-Smirnov Test و Mauchly Sphericity Test برای هیچ یک از اندازه گیری ها معنادار نبود.

اثرات احتمالی رژیم غذایی، زمان و روش نمونه‌گیری نسبت داد. (۱۲-۱۴، ۱۰، ۱۲، ۱۴)

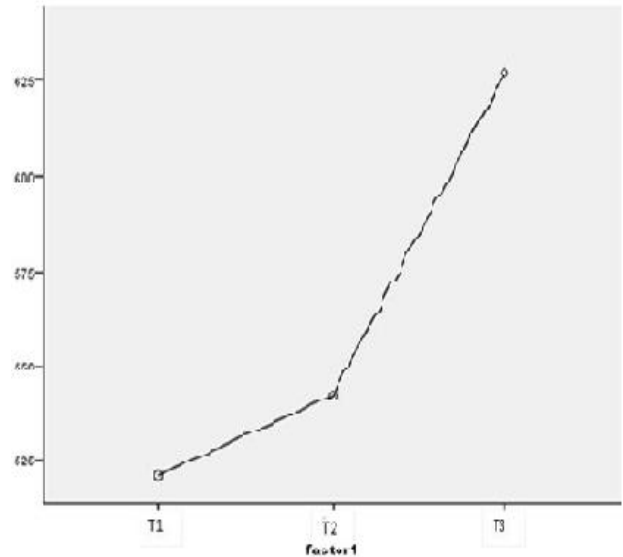
در مطالعه اخیر، رژیم غذایی شامل غذاها و نوشیدنی های غنی از ترکیبات نیکل و کروم از برنامه غذایی بیماران به مدت ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری حذف گردید. بعلاوه برای حذف اثرات مواد غذایی نمونه‌گیری روی تمام بیماران بعد از ظهر صورت گرفت.

بزاق اول صبح قبل از صبحانه (ناشتا) مناسب ترین زمان جهت نمونه‌گیری برای این مطالعه است. (۱۴) ولی به دلیل تداخل سیکل Circadian و تغییرات سطح کورتیزول اول صبح با استرس ایجاد شده در این مطالعه از نمونه‌گیری در این زمان اجتناب گردید. (۲۷)

شستشوی دهان قبل از نمونه‌گیری همچنین جمع‌آوری بزاق تحریک شده و غیر تحریک شده نیز روی محتوای یونی بزاق اثر می‌گذارد. (۲۰، ۲۶، ۲۸، ۱۳، ۱۴، ۲۶، ۲۸) مطالعاتی که روی بزاق تحریک شده صورت گرفته، تراکم بیشتر یون فلزی بزاق را (۲۸، ۲۸) به مقادیر بیشتر پروتئین بزاق تحریک شده نسبت داده‌اند. (۳)

استرس شرایط محیط دهان را از طریق کاهش اسیدیته بزاق تغییر می‌دهد. (۲۰-۲۳) افزایش اسیدیته بزاق آلیاژهای ارتودنسی را از طریق مکانیزم های Pitting و galvanic کروژن بیشتر مستعد کروژن می‌سازد. (۳) کاهش میزان اسیدیته از ۶/۷۵ به ۳ باعث افزایش ۱۰۰ برابری آزاد سازی یون های فلزی از براکت‌های ارتودنسی می‌گردد. (۲۹) بعلاوه، استرس سایکولوژیک باعث افزایش محتوای پروتئینی بزاق می‌گردد. (۱۹) نیکل تمایل به اتصال به پروتئین های بزاق دارد، بنابراین مقدار نیکل تحت تاثیر میزان پروتئین های بزاق قرار می‌گیرد. (۳) این مشاهدات اساس فرضیه مطرح شده در این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه اخیر از TSST برای ایجاد استرس روانی، اجتماعی در بیماران تحت درمان ارتودنسی ثابت استفاده گردید. این تست نخستین بار توسط Kirschbaum و همکارانش (۳۰) در سال ۱۹۹۳ مطرح شد و بعدها بعنوان یک تست قابل اطمینان جهت ایجاد استرس روانی-اجتماعی معرفی گردید. (۳۱)



نمودار ۲- میزان کروم بزاق در ۳ مرحله اندازه‌گیری

بحث:

تحقیق نشان داد که تغییرات میزان یون کروم و نیکل معنادار نبود. برای تایید این فرضیه که استرس می‌تواند باعث افزایش آزاد سازی یون های نیکل و کروم از دستگاه های ارتودنسی در بیماران تحت درمان گردد، در نمونه‌ها هیجان ایجاد شد. در حالیکه میزان هر دو یون در طی این مطالعه افزایش یافت، تنها تاثیر عمده استرس بر روی آزاد سازی یون نیکل معنادار بود.

متوسط میزان نیکل و کروم قبل از قرار دادن دستگاه های ارتودنسی به ترتیب $5/21 \pm 3/38$ و $12/78 \pm 5/26$ گزارش شد که این مقادیر در محدوده نرمال می‌باشد. (۱۶) سپس نمونه‌گیری ۳ ماه بعد از قرار دادن دستگاه‌های ارتودنسی و قبل از ایجاد استرس تکرار گردید و مقدار نیکل و کروم به ترتیب به $6/27 \pm 2/68$ و $14/9 \pm 5/75$ افزایش یافت که این افزایش معنادار نبود. این یافته در هماهنگی با نتایج مطالعات In-Vivo پیشین با شرایط نمونه‌گیری مشابه است. (۱۲، ۱۳، ۲۶) با این حال برخی مطالعات افزایش در میزان یون های فلزی بزاق را بلافاصله پس از قراردادن دستگاه‌های ارتودنسی و در طی درمان طولانی مدت ارتودنسی نشان داده‌اند. (۱۵) تفاوت ها بین مطالعات مختلف را می‌توان به

ایجاد استرس می‌توانند یافته‌های بیشتری در این زمینه بدست آورند که می‌تواند تأیید کننده نتایج اولیه به دست آمده از این مطالعه می باشد. افزایش آزادسازی یون نیکل از اپلانیس های ارتودنسی در این مطالعه اهمیت شرایط روانی بیماران تحت درمان ارتودنسی را مورد تاکید قرار می‌دهد.

نتیجه گیری:

به نظر می رسد که استرس بر میزان آزاد سازی یون های فلزی در بزاق بیماران تحت درمان ارتودنسی ثابت تاثیر نداشته باشد.

References:

- 1-House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances--should we care? Am J Orthod Dentofacial Orthop 2008;133(4):584-92.
- 2-Grimsdottir MR, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A. Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1992;101(6):525-32
- 3-Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, Reimann S, Hoederath H, Eliades T, et al., Nickel concentration in the saliva of patients with nickel-titanium orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2009;135(1):59-65.
- 4-Kolokitha OE, Kaklamanos EG, Papadopoulos MA. Papadopoulos, Prevalence of nickel hypersensitivity in orthodontic patients: a meta-analysis. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2008;134(6):722.e1-722.e12
- 5-Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. Biomaterials, 1999. 20(18): 1647-57.
- 6-Ortiz AJ, Fernández E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: toxicity and DNA damage. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2011;140(3): 115-22
- vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2003;124(6):687-93
- 8-Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JA, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. Genet Mol Res 2008;7(4):1259-66.
- 9-Ao Lu G, Arun T, Izgi B, Yarat A. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. Angle Orthod 2001;71(5):375-9
- 10- Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. Eur J Orthod 2006. 28(3): 292-7.
- 11-Gjerdet NR, Erichsen ES, Remlo HE, Evjen G. Nickel and iron in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. Acta Odontol Scand 1991;49(2):73-8.
- 12-Kerosuo H, Moe G, Hensten-Pettersen A. Hensten-Pettersen, Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1997;111(6):595-8

زمان جمع آوری بزاق برای نمونه‌گیری ۱۵ دقیقه بعد از انجام این تست انتخاب گردید. در مطالعه ای Morse و همکارانش افزایش کورتیزول بزاق حاصل از استرس را در بیشترین میزان خود حدود ۳۰ دقیقه بعد از ایجاد استرس اندازه‌گیری کردند.^(۲۲) در مطالعه دیگری، بیشترین افزایش در کورتیزول بزاق و آلفا-آمیلاز در پاسخ به استرس حدود ۲۰ دقیقه بعد از ایجاد استرس مشاهده گردید.^(۲۷) از سوی دیگر سایر مطالعات بیشترین تغییر در فشار خون و قند خون را در ۱۵ دقیقه پس از ایجاد استرس گزارش کرده‌اند.^(۲۳،۲۴)

بر مبنای یافته‌های این مطالعه، استرس اثر معناداری بر روی افزایش میزان آزاد سازی کروم ندارد. اگرچه میزان نیکل بزاق به طور قابل توجهی پس از ایجاد استرس در مقایسه با مقدار اولیه افزایش نشان داد اما مکانیسم اثر استرس بر افزایش یون های فلزی بزاق نیازمند زمان می باشد.

در مطالعات قبلی رابطه میان ترکیبات آلیاژ آرچ و ایر و آزاد سازی یونها مورد بررسی قرار گرفته بود.^(۲۹)

به طور رایج در ابتدای درمان ارتودنسی، آرچ و ایرهای Ni-Ti برای اکثر بیماران استفاده می شود، این در حالی است که در مراحل بعدی درمان، آرچ و ایرهایی با آلیاژهای متفاوت بر حسب نیاز هر بیمار به کار می رود.

این عامل مهم در تمام مطالعات پیشین نادیده گرفته شده است.^(۱۰، ۱۵، ۱۶)

مشابه مطالعات In vivo قبلی، مقدار نیکل و کروم بزاق اندازه گیری شده در این مطالعه از میزان جذب روزانه از طریق رژیم غذایی بیشتر نیست.

مطالعات Randomized Controlled Trial با نمونه گیری پیوسته در فواصل زمانی کوتاه و به مدت طولانی تر پس از

- 13-Kocadereli L, Ataç PA, Kale PS, Ozer D. Salivary nickel and chromium in patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2000;70(6):431-4.
- 14-Matos de Souza R, Macedo de Menezes L. Macedo de Menezes, Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2008;78(2):345-50
- 15-Amini F, Jafari A, Amini P, Sepasi S. Metal ion release from fixed orthodontic appliances--an in vivo study. *Eur J Orthod* 2012;34(1):126-30
- 16-Amini F, Rakhshan V, Mesgarzadeh N. Effects of long-term fixed orthodontic treatment on salivary nickel and chromium levels: a 1-year prospective cohort study. *Biol Trace Elem Res* 2012;150(1-3):15-20
- 17-Amini F, Rakhshan V, Sadeghi P. Effect of fixed orthodontic therapy on urinary nickel levels: a long-term retrospective cohort study. *Biol Trace Elem Res* 2012;150(1-3):31-6
- 18-Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res* 2008;11(1):51-6
- 19-Bosch JA, Brand HS, Ligtenberg TJ, Bermond B, Hoogstraten J, Nieuw Amerongen AV. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosom Med* 1996;58(4):374-82.
- 20-DUTKOVIC TR. Emotions, Oral Health and Salivary Ph Patterns. *J Dent Med* 1965;20:16-20
- 21-Feldman H. Salivary buffer capacity, pH and stress. *J Am Soc Psychosom Dent Med* 1974. 21(1): 25-30.
- 22- Morse DR, Schacterle GR, Esposito JV, Furst ML, Bose K. Stress, relaxation and saliva: a follow-up study involving clinical endodontic patients. *J Human Stress* 1981;7(3):19-26.
- 23-Sandin B, Chorot P. Chorot, Changes in skin, salivary, and urinary pH as indicators of anxiety level in humans. *Psychophysiology* 1985;22(2):226-30.
- 24-Heikkilä K1, Nyberg ST, Theorell T, Fransson EI, Alfredsson L, Bjorner JB, et al. Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116,000 European men and women. *BMJ* 2013; 346: 165.
- 25-McHale, S.M., et al., The role of daily activities in youths' stress physiology. *J Adolesc Health*. 51(6): p. 623-8.
- 26-Eliades T, Trapalis C, Eliades G, Katsavrias E. Salivary metal levels of orthodontic patients: a novel methodological and analytical approach. *Eur J Orthod* 2003;25(1):103-6.
- 27-Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(2):163-71
- 28-Singh DP, Sehgal V, Pradhan KL, Chandna A, Gupta R. Estimation of nickel and chromium in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *World J Orthod* 2008;9(3):196-202
- 29-Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2009;79(1):102-10
- 30-Kirschbaum CKM, Pirke DH. The Trier Social Stress Test--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 1993; 28(1-2): 76-81.
- 31-Dickerson SS, Kemeny ME. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull* 2004;130(3):355-91