

## مقایسه میزان سطح بزاقی و مایع شیار لثه ای آلکالین فسفاتاز در بیماران پریدونتیت سیگاری، غیر سیگاری و افراد سالم

دکتر محمد کتابی<sup>۱\*</sup> دکتر منوچهر مصری پور<sup>۲</sup> دکتر احسان رفیعی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار گروه پریدونتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- استاد گروه بیوشیمی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۳- دستیار تخصصی گروه پریدونتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

### خلاصه:

**سابقه و هدف:** با توجه به اینکه ارتباط میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز ALP در بزاق و پریدونتیت در مطالعات محدودی مورد مطالعه قرار گرفته است و در هیچ تحقیقی ارتباط میزان غلظت ALP به صورت همزمان در مایع شیار لثه ای و بزاق در افراد سیگاری بررسی نشده است. هدف از این تحقیق مقایسه میزان غلظت سطح ALP مایع شیار لثه ای و بزاق در بیماران پریدونتیت سیگاری، غیر سیگاری و افراد سالم بود.

موادوروش ها: در این مطالعه که از نوع توصیفی تحلیلی است، ۹۰ بیمار با محدوده سنی ۵۰-۳۵ و بدون هیچ بیماری سیستمیک انتخاب و به ۳ گروه مساوی پریدونتیت و سیگاری، پریدونتیت و غیر سیگاری و سالم تقسیم شدند. در گروه اول و دوم مایع شیار لثه ای از پاکتهای ۷-۵ میلی متری جمع آوری شد. در گروه سوم، مایع شیار لثه ای از شیار لثه ای سالم برداشت شد. ۵ میلی لیتر بزاق غیر تحریکی نیز از همه نمونه ها جمع آوری شد. سپس میزان غلظت ALP در مایع شیار لثه ای و بزاق در نمونه های جمع آوری شده اندازه گیری شد. از آزمون های آماری ANOVA و توکی برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها استفاده شد.

یافته ها: میانگین میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای و غلظت بزاقی آن در گروه اول و دوم بیشتر از گروه سوم بود. ( $P=0/001$ ) میانگین میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای در گروه اول بیشتر از گروه دوم بود. ( $P=0/023$ ) میانگین میزان غلظت ALP بزاق در گروه اول و دوم تفاوت معنی داری نداشت. ( $P> 0/05$ )

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق بیانگر آن است که میزان غلظت مایع شیار لثه ای ALP و سطح بزاقی آن می تواند به عنوان مارکر پریدونتیت محسوب شود. به علاوه میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای در بیماران پریدونتیت سیگاری بیشتر از افراد غیر سیگاری است. این امر شاید یکی از دلایلی است که در افراد سیگاری احتمال تخریب استخوان آلوئو لار بیشتر است.

کلید واژه ها: آلکالین فسفاتاز، پریدونتیت، بزاق، مایع شیار لثه ای، استعمال دخانیات

وصول مقاله: ۹۲/۹/۱۲ اصلاح نهایی: ۹۳/۷/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۳/۷/۲۵

### مقدمه:

سریع بوده که متعاقب آن بیماری برای مدت طولانی به مرحله سکون و عدم فعالیت وارد می شود.<sup>(۱)</sup>

این ویژگی همراه با چند عاملی بودن بیماریهای پریدونتال شناخت، طبقه بندی و درمان این بیماری ها را مشکل می کند.<sup>(۲)</sup> چنانچه بیماری در فاز کوتاه فعالیت تشخیص داده شود، درمان آسان تر و موثر تر خواهد بود. از اینرو در دهه های گذشته تعدادی از نشانگرهای التهابی و تخریبی پریدونتیت استخراج شده اند.<sup>(۳،۲)</sup> منابع بالقوه جهت جمع آوری نشانگرها

بیماریهای پریدونتال از جمله بیماریهای رایج دهان و دندان محسوب می شود. پریدونتیت شدید دسته ای از این بیماریها است که استخوان آلوئولر در اطراف دندان تحلیل رفته و نهایتا ممکن است منجر به لقی و از دست رفتن دندانها گردد. یکی از خصوصیات این بیماری آن است که تخریب استخوان به صورت دوره ای صورت می گیرد. دوره های فعالیت بیماری کوتاه و

\* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر محمد کتابی، آدرس: اصفهان - خ جی - ارغوانیه - دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان - دانشکده دندانپزشکی Email: ketabimohammad@yahoo.com

شدت بالای تخریب پریدونتال می باشد. (۱۳-۱۵) تاثیرات مختلف سیگار بر نسوج پریدونشیوم به شرح زیر است: حدود ۹۰ درصد از بیماران دارای پریدونتیت مقاوم سیگاری هستند. (۱۶) سیگار باعث واکنش نامطلوب به درمانهای جراحی و غیر جراحی پریدونتال می گردد. (۱۷) واکنش سیگارها به درمانهای رژنراتیو نامطلوب تر از غیر سیگارها است. (۱۸) و ارتباط مستقیمی بین مصرف سیگار و شکست ایمپلنت های دندانان مشاهده می شود. (۱۹) از طرفی نتایج بعضی از تحقیقات بیانگر تاثیر سیگار بر تغییرات سطح و فعالیت بیو مارکرها و واسطه های شیمیایی در مایع شیار لثه ای و بزاق است (۱۵) و تعداد محدودی از مطالعات نشان داده است که میزان سرمی ALP در افراد سیگاری بیشتر از غیر سیگارهاست. (۲۰،۲۱) با توجه به اینکه ارتباط میزان غلظت ALP در بزاق و پریدونتیت در مطالعات محدودی مورد مطالعه قرار گرفته است و در هیچ مطالعه ای میزان ارتباط غلظت ALP به صورت همزمان در مایع شیار لثه ای و بزاق در افراد سیگاری بررسی نشده است، هدف از این تحقیق مقایسه میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای و بزاق در بیماران پریدونتیت سیگاری، غیر سیگاری و افراد سالم بود.

#### مواد و روش ها:

این تحقیق یک مطالعه توصیفی است و نمونه ها از بین مراجعه کنندگان به بخشهای تشخیص و پریدونتولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) انتخاب شدند. افراد مورد مطالعه دارای شرایط زیر بودند:

- ۱- عدم وجود هر گونه بیماری سیستمیک
- ۲- افراد سیگاری حداقل بایستی به مدت ۱ سال و روزی ۱۰ عدد سیگار یا بیشتر استعمال کرده باشند (۲۲)
- ۳- عدم مصرف هیچ گونه دارویی در شش ماه گذشته
- ۴- بیماران دارای پریدونتیت حداقل دارای ۲۰ دندان بوده و در ۵ ناحیه دارای پاکت های ۵ میلی متر یا بیشتر باشند.

التهابی و تخریبی بیماریهای پریدونتال به ترتیب اهمیت شامل مایع شیار لثه ای، بزاق، سرم و ادرار می باشند. بزاق به آسانی قابل جمع آوری بوده و شامل نشانگرهای موضعی و سیستمیک جهت تشخیص بیماریهای پریدونتال است. (۲-۵) بزاق ممکن است به طور جداگانه از غدد پاروتید، ساب مندیبولار، ساب لینگوال یا بطور مخلوطی از ترشحات غدد فوق همراه با غدد کوچک به صورت تحریکی یا غیر تحریکی جمع آوری شود. (۳)

مایع شیارلثه ای (GCF) مهمترین منبع جهت آنالیز نشانگرهای التهابی و تخریبی بیماریهای پریدونتال می باشد. این مارکرها عموماً آنزیم ها، سیتوکین ها و واسطه های شیمیایی هستند که در زمان فعالیت بیماری به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می یابند. عمده مارکر های جدا شده از مایع شیار لثه ای واسطه های شیمیایی التهاب و آماس هستند. (۶) روش های مهم جمع آوری مایع شیار لثه ای شامل نوارهای کاغذی جاذب (paper strip) که به دو صورت داخل لثه ای و لبه لثه ای می باشند، نخ هایی به هم تابیده از قبل وزن شده، میکروپیپت و شستشوی داخل سالکوسی از روش های معمول جمع آوری مایع شیار لثه ای هستند. یکی از معایب این نوارها وقتی که در داخل شیار لثه ای قرار می گیرند تحریک ایپی تلیوم سالکولار و تغییر حجم و جریان GCF است. (۱)

آلکالین فسفاتاز (ALP) یکی از مارکرهای مهم تحلیل استخوان است. در بیماران با پریدونتیت پیشرفته، میزان ALP در مایع شیار لثه ای به نحو چشمگیری افزایش می یابد. (۷) Azizi و همکاران و Darba و همکاران همچنین نشان دادند که غلظت آنزیم ALP در بزاق غیر تحریکی بیماران مبتلا به پریدونتیت بیشتر از افراد سالم است. (۸،۹)

از طرفی ثابت شده است که مصرف دخانیات یک عامل مهم خطرساز در بروز و شدت بیماریهای پیشرفته پریدونتال می باشد. (۱۰) در حالیکه سیگار باعث کاهش واکنش های التهابی و خونریزی از لثه می شود. (۱۱،۱۲) نتایج مطالعات فراوانی حاکی از آنست که مصرف دخانیات یک عامل خطرساز مهم در شیوع و

بدین ترتیب میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای و غلظت بزاقی آن از نمونه های جمع آوری شده سه گروه اندازه گیری شد. در پایان یافته های عددی بدست آمده توسط آزمون ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته ها:

در مطالعه حاضر که با هدف مقایسه میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای و بزاق در بیماران پریدونتیت سیگاری، غیر سیگاری و افراد سالم انجام گرفت نتایج زیر حاصل گردید

۱- میانگین غلظت ALP مایع شیار لثه ای و غلظت بزاقی آن در بیماران پریدونتیت سیگاری و غیر سیگاری بیشتر از افراد سالم بود. این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود.

( $P = 0/001$ ) (جدول ۱)

۲- میانگین غلظت ALP مایع شیار لثه ای سیگاری های دارای پریدونتیت بیشتر از پریدونتیت های غیر سیگاری بود. این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P = 0/023$ ). در حالیکه میانگین غلظت بزاقی ALP افراد پریدونتیت سیگاری و غیر سیگاری تفاوت معناداری نداشت. (جدول ۱)

جدول ۱ - میانگین غلظت آنزیم ALP به تفکیک پریدونتیت غیر سیگاری و پریدونتیت سیگاری بر اساس آزمون ANOVA

ALP میزان	سالم	پریدونتیت غیر سیگاری	پریدونتیت سیگاری	pvalue
مایع شیار لثه ای	$8/36 \pm 2/19$	$16/4 \pm 5/4$	$26/53 \pm 5/2$	0/001
بزاق	$8/75 \pm 3/2$	$19/2 \pm 7/6$	$18/7 \pm 7/5$	

با استفاده از فرمول محاسبات در این نوع تحقیقات، حداقل حجم نمونه ۸۴ نفر تعیین شده که در نهایت ۹۰ نفر از مراجعین به بخش تشخیص و پریدونتولوژی که واجد شرایط فوق بودند، وارد مطالعه شدند و در سه گروه پریدونتیت و سیگاری، پریدونتیت و غیر سیگاری و سالم قرار گرفتند.

کلیه نمونه ها به مدت ۲ ساعت قبل از جمع آوری بزاق از هرگونه خوردن و آشامیدن منع شدند. ۱۵ دقیقه قبل از جمع آوری بزاق از آنها خواسته شد که به مدت یک دقیقه دهان خود را با آب شستشو دهند. پس از ۱۵ دقیقه نمونه ها کلیه بزاق خود را فرو دادند بلافاصله به مدت ۲ دقیقه از بیماران خواسته شد که بزاق موجود در دهان خود را در ظرف های استریل تخلیه کنند.<sup>(۲۳)</sup>

مایع شیار لثه ای از نواحی دارای پاکت (۷-۵) میلی متر در افراد گروه های ۱ و ۲ و از شیار لثه ای سالم در گروه سوم توسط پیپر پوینت شماره ۳۵ جمع آوری شد. حدود ۵ میلی لیتر از بزاق غیر تحریکی از کلیه نمونه ها جمع آوری شد.

نمونه های جمع آوری شده از مایع شیار لثه ای و بزاق جهت تعیین میزان غلظت ALP به آزمایشگاه فرستاده شدند.

بعد از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، اندازه گیری غلظت آنزیم توسط متخصص با استفاده از کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم انجام شد. آزمایش اندازه گیری غلظت آنزیم ALP در مایع لثه ای به علت کوچک بودن حجم نمونه حاصل از مایع شیار لثه ای و رقیق شدن مایع مذکور با تغییراتی نسبت به روش اندازه گیری آن در سرم انجام گرفت. نمونه های جمع آوری شده مایع شیار لثه ای در ۲۵۰ میکرولیتر از بافر ۲۰۰ mM Tris، ۲۰۰ mg/mL of p-۱ و 20 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.8 ± 0.1) nitrophenol phosphate رقیق و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. واکنش سپس با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از NaOH متوقف و میزان جذب توسط اسپکترو فوتومتر خوانده و تبدیل به واحد فعالیت آنزیم می شد.

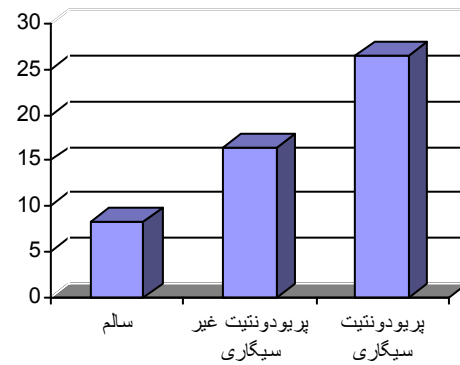
غلظت ALP در بزاق توسط دستگاه اتوانالیز بیوشیمی (Furuno, Japan) مورد سنجش قرار گرفت.

فعالیت پریدوننتیت است که شناسایی مارکرهای التهابی و تخریبی مایع شیار لته ای و بزاق در دهه های اخیر مورد توجه قرار گرفته است و در مطالعات مختلفی از این بیو مارکرها برای پیش بینی پیشرفت پریدوننتیت مزمن اسفاده کرده اند. (۲۴)

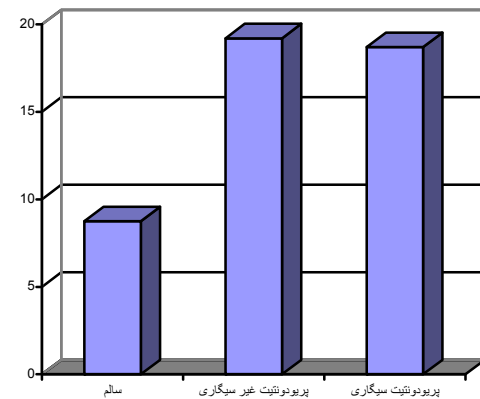
بنابر این اگر کیت تشخیصی در کنار یونیت دندانپزشکی وجود داشته باشد که با تعیین مارکرهایی در مایع شیار لته ای فعالیت بیماری مشخص شود. قطعاً این امر درمان بیماری را در زمان مناسب میسازد. آلکالین فسفاتاز آنزیم مهمی است که در متابولیسم استخوان موثر می باشد. اندازه گیری این آنزیم به عنوان مارکر مهم تخریب استخوان آلبیولار در مایع شیار لته ای و بزاق در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. (۲۵)

از طرفی مصرف دخانیات و بالاخص سیگار احتمال تحلیل استخوان آلوئو لار را افزایش می دهد. این در حالیست که التهاب و خونریزی از لته در افراد سیگاری به علت تغییر در عروق کوچک لته کمتر از افراد غیر سیگاری است. هدف از این تحقیق همانگونه که قبلاً نیز ذکر شد مقایسه میزان سطح بزاقی و مایع شیار لته ای ALP در بیماران پریدوننتیت سیگاری و غیر سیگاری با افراد سالم بود. میانگین غلظت ALP در تمامی نمونه ها به طور معنی داری در مایع شیار لته ای از بزاق بیشتر بود. این یافته با توجه به اینکه حجم بزاق نسبت به مایع شیار لته ای بسیار بیشتر می باشد. منطقی است. (۲۶)

نتیجه دیگر این تحقیق نشان داد که غلظت آلکالین فسفاتاز مایع شیار لته ای و بزاق در افراد پریدوننتیت سیگاری و غیر سیگاری بیشتر از افراد سالم بود. این یافته با نتایج اغلب تحقیقات مشابه است. (۷،۸) در تحقیق Azizi و همکاران غلظت ALP بزاق در افراد سالم و بیماران با پریدوننتیت مقایسه گردید. نتایج حاکی از اختلاف معنی دار بین غلظت ALP در بزاق افراد سالم با پریدوننتیت بود. که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد Totan در تحقیق خود تفاوت معنی داری بین غلظت آنزیم ALP در گروه های بیماران پریدوننتال با شدت مختلف نشان نداد. اما غلظت ALP در نواحی سالم و



نمودار ۱- میانگین غلظت ALP در مایع شیار لته ای



نمودار ۲- میانگین غلظت ALP در بزاق

#### بحث :

مطالعات دو دهه اخیر نشان داده است که پریدوننتیت یک بیماری چند عاملی است که در دوره های فعالیت و سکون عارض می شود. دوره فعالیت معمولاً کوتاه و مخرب می باشد در حالیکه دوره سکون یا عدم فعالیت طولانی است. این مطلب نیز کاملاً روشن است که روش های تشخیصی معمول مانند عمق پاکت، حد چسبندگی و کلیشه های رادیو گرافی، گرچه ممکن است سابقه بیماری پریدوننتال را نشان دهند اما فاقد ارزش واقعی برای پیش بینی روند بیماری در آینده می باشند. به دلیل محدودیت در روش های تشخیصی و طبیعت سکون و

سیگاری احتمال تخریب استخوان آلوپولار بیشتر است. اگر چه در این زمینه تحقیقات بسیار کمی صورت گرفته است. اما این یافته با نتایج تحقیق Saito و همکاران<sup>(۲۱)</sup> که میزان آلکالین فسفاتاز سرمی افراد سیگاری را بیشتر از افراد غیر سیگاری دانستند همخوانی دارد. با این تفاوت که در تحقیق ذکر شده میزان آلکالین فسفاتاز در سرم اندازه گیری شده بود.

#### پیشنهادات:

این مطالعه بیشتر یک مطالعه بنیادی است که با مطالعات تکمیلی بعدی صورت کاربردی بیشتری پیدا خواهد کرد. افزایش آنزیم آلکالین فسفاتاز در مایع شیار لثه ای و بزاق می تواند به عنوان یک مارکر پرودونتیت و تخریب استخوان آلوپولار تلقی شود. تفاوت میزان غلظت آلکالین فسفاتاز مایع شیار لثه ای در افراد پرودونتیت سیگاری و غیر سیگاری شاید یکی از دلایلی است که در افراد سیگاری احتمال تخریب استخوان آلوپولار بیشتر است. البته اثبات قطعی این امر نیاز به تحقیقات تکمیلی وسیع تری دارد. در ضمن توصیه می شود در تحقیق دیگری میزان غلظت ALP در افراد سالم سیگاری و غیر سیگاری مقایسه گردد.

پرودونتیت از لحاظ آماری تفاوت معنی داری داشت. که کم و بیش با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.<sup>(۲۷)</sup>

نتایج این تحقیق تنها با مطالعه Yoshie که نشان داد غلظت ALP بزاق بیماران سالم و افراد مبتلا به بیماری پرودونتال تفاوتی ندارد همخوانی ندارد شاید علت اصلی این مغایرت در عدم تعریف و تقسیم بندی بیماریهای پرودونتال در تحقیق Yoshie می باشد که به درستی تفکیک ژنوتیپ از پرودونتیت انجام نشده است.<sup>(۲۸)</sup>

اما ارتباط احتمالی سیگار بر غلظت ALP در مایع شیار لثه ای در هیچ تحقیقی بررسی نشده است Heikinen و همکاران سطح بیو مارکهای بزاقی شامل ۸-MMP و الاستاز PMMها را در افراد پرودونتیت سیگاری ارزیابی و به این نتیجه رسیدند که سطح این بیومارکرها در افراد سیگاری تغییر می کند<sup>(۲۹)</sup>

تحقیق حاضر اگرچه در ادامه تحقیقات زیادی بود که ارتباط افزایش غلظت ALP و پرودونتیت را بررسی می کرد اما تنها تحقیق از این نوع می باشد که غلظت ALP به طور همزمان در بزاق و مایع شیار لثه ای و همچنین در سیگار ها و غیر سیگاری ها بررسی شده است.

نتیجه دیگر این تحقیق آن بود که میزان غلظت ALP مایع شیار لثه ای در افراد پرودونتیت سیگاری بیشتر از پرودونتیت غیر سیگاری بود. این امر شاید یکی از دلایلی است که در افراد

#### References:

- 1-Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. Carranza's clinical periodontology. 11nd ed. St.louis: Elsevier ; 2012.P: 160-162
- 2-Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T,etal. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. Arch Oral Biol 2012;57(4):413-20
- 3- Takeuchi Y, Nagasawa T, Katagiri S, Kitagawara S, Kobayashi H, Koyanagi T,etal. Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2012 ;83(6):766-72.
- 4- Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D 3rd, Kryscio RJ, Lin Y,etal. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. J Clin Immunol 2013;33(1):271-9.
- 5- Kibayashi M, Tanaka M, Nishida N, Kuboniwa M, Kataoka K, Nagata H,etal. Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. J Periodontol 2007;78(5):859-67.
- 6- Page RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J Periodontol 1992(4);63:356.
- 7- Beck JD. Issues in assessment of diagnostic tests and risk for periodontal diseases. Periodontol 2000 1995;7:100-8
- 8- Azizi A, Sarlati F, Baghizade A. Comparison of Salivary Alkaline Phosphatase in Periodontitis Patients and Healthy Subjects. J Res Dent Sci. 2011; 8 (1) :9-14.
- 9-Darba S, Singh P. Evaluating the levels of salivary alkaline and acid phosphatase activities as

- biochemical markers for periodontal disease: A case series. *Dent Res J (Isfahan)* 2012;9(1):41-5.
- 10- Han DH, Lim S, Kim JB. The association of smoking and diabetes with periodontitis in a Korean population. *J Periodontol* 2012;83(11):1397-406
- 11- Bergstrom J. Oral hygiene compliance and gingivitis expression in cigarette smokers. *Scand J Dent Res* 1990;98(6):497-503
- 12- Shimazaki Y1, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. The influence of current and former smoking on gingival bleeding: the Hisayama study. *J Periodontol* 2006;77(8):1430-5.
- 13- Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001;65(4):313-4
- 14- Moimaz SA1, Zina LG, Saliba O, Garbin CA. Smoking and periodontal disease: clinical evidence for an association. *Oral Health Prev Dent* 2009;7(4):369-76.
- 15- Gürlek O, Lappin DF, Buduneli N. Effects of smoking on salivary C-Telepeptide pyridinoline cross-links of type I collagen and osteocalcin levels. *Arch Oral Bio* 2009;54(12):1099-104.
- 16- MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol* 1992;63(11):908-13
- 17- Preber H, Bergstrom J. The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol* 1986;13(4):319-23
- 18- Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1995;22(3):229-34
- 19- De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(4):260-4
- 20- Sripanidkulchai B, Areejitnusorn P, Sriamporn S, Sripanidkulchai K, Kamsa-ard S. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase of people in Khon Kaen, the northeastern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004;5(1):54-7
- 21- Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T. Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men. *J Periodontol* 2003;74(12):1741-6.
- 22- Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res* 1997;76(10):1667-74.
- 23- De la pena VA, Dios PD, Rodrigues-Nunes I, Rodríguez-Segade S. Effect of ultra sonic scaling on salivary lactate dehydrogenase. *AM J Dent* 2005; 18(2):113-5.
- 24- Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T, et al. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol* 2012;57(4):413-20.
- 25- Kibayashi M, Tanaka M, Nishida N, Kuboniwa M, Kataoka K, Nagata H, et al. Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. *J Periodontol* 2007;78(5):859-67.
- 26- Nayak SU, Nayak DG, Uppoor AS, Pai KK. Evaluation of cortisol levels in gingival crevicular fluid and saliva in anxious and non-anxious patients with chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)* 2013;10(4):474-81.
- 27- Totan A, Greabu M, Totan C, Spinu T. Salivary Aspartate amino transferase, Alanine amino transferase and Alkaline phosphatase: possible markers in periodontal disease?. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(5): 612 – 615.
- 28- Yoshie H, Tai H, Kobayashi T, Oda-Gou E, Nomura Y, Numabe Y, et al. Salivary Enzyme Levels after scaling and interleukin-1 genotype in Japanese patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Mar; 78(3):498-503
- 29- Heikkinen AM, Sorsa T, Pitkaniemi J, Tervahartiala T, Kari K, Broms U, et al. Smoking affects diagnostic salivary periodontal disease biomarker levels in adolescents. *J Periodontol* 2010;81(9):1299-307