

بررسی ارتباط سیگاری غیر فعال و میزان ظرفیت آنتی اکسیدان تام و پراکسیداسیون لیپیدی بزاق در نوجوانان ۱۲-۱۵ سال

دکتر مینا مطلب نژاد^۱ دکتر مهدی پور امیر^۲ دکتر نیلوفر جناییان^۳ دکتر مجتبی رنجبر عمرانی^۴ دکتر علی بیژنی^۵ دکتر فاطمه یارمند^۶

۱- دانشیار گروه آموزشی بیماری های دهان، فک و صورت، مرکز تحقیقات مواد دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۱- دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، استاد گروه بیوشیمی بیوفیزیک، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- دانشیار گروه پرودنتولوژی، دانشکده ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- عضو هیئت علمی گروه بیماری های دهان، فک و صورت، دانشکده ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۴- پزشک، مرکز تحقیقات بیماری های غیرواگیر کودکان، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۶- دستیار گروه بیماری های دهان، فک و صورت، دانشکده ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

خلاصه:

سابقه و هدف: سیگاری غیر فعال (Passive Smoking) یکی از مشکلات مهم سلامت عمومی می باشد و کودکان حساس ترین گروه در معرض دود تنباکوی موجود در محیط هستند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط وضعیت سیگاری غیر فعال و ظرفیت آنتی اکسیدان تام و پراکسیداسیون لیپیدی بزاق در نوجوانان ۱۲ تا ۱۵ ساله می باشد.

مواد و روش ها: این مطالعه همگروهی تاریخی بود که بر روی ۶۰ نوجوان ۱۲ تا ۱۵ ساله انجام شد. گروه مورد افراد سیگاری غیر فعال و گروه کنترل کودکان غیر سیگاری بودند که از نظر سن و جنس مشابه سازی شدند. بزاق غیر تحریکی هر دو گروه به روش Spitting جمع آوری شد و در آزمایشگاه ظرفیت آنتی اکسیدان تام بزاق با روش FRAP و پراکسیداسیون لیپیدی بزاق با روش TBARS، اندازه گیری شد. جهت مقایسه یافته ها از آزمون آماری، independent T-test استفاده شد.

یافته ها: میزان آنتی اکسیدان تام بزاق در گروه مورد $(1218/8 \pm 511/5)$ و در گروه شاهد $(1490/5 \pm 379/3)$ بود که تفاوت آماری معنی داری نشان داد. $(P=0/023)$ میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گروه مورد $(14/6 \pm 0/6)$ و در گروه شاهد $(14/4 \pm 0/8)$ ، بود و تفاوت دو گروه از نظر آماری معنی دار نبود. $(P=0/176)$

نتیجه گیری: به نظر می رسد قرار گرفتن در معرض دود سیگار در نوجوانان موجب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدان تام بزاق شده و از این طریق سلامت حفره دهان را به خطر بیندازد.

کلید واژه ها: سیگاری غیر فعال، تنباکو، آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدی، بزاق

وصول مقاله: ۹۲/۴/۱۸ اصلاح نهایی: ۹۲/۷/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۹/۲۶

مقدمه:

از وزن خود در مقایسه با بزرگسالان دریافت می کنند.^(۱) اثرات زیان بار دود تنباکوی موجود در محیط برای کودکان حتی در مواجهه کم با آن، شامل بیماری های تنفسی، آسم، عوارض بیهوشی بوده و در نوزادان، خطر سندرم مرگ ناگهانی و وزن کم در زمان تولد را افزایش می دهد و موجب، adverse lipid profile شده که کاهش در تجمع هموگلوبین را بدنبال دارد.^(۳) رادیکال های آزاد و گونه های واکنشی اکسیژن (ROS) که توسط منابع مختلفی مثل سلول های التهابی یا آلاینده های محیطی تولید می شوند، مدیاتورهای مهمی برای بسیاری از بیماری ها و اختلالات انسانی است.^(۳،۱) به خوبی

سیگاری غیر فعال یا اکسپوز بودن با دود تنباکوی موجود در محیط یکی از توجهات اصلی در سلامت عمومی می باشد. کودکان بیشترین گروه در معرض خطر برای دود تنباکوی موجود در محیط هستند و از آنجایی که در کودکان لوله های برونشیل کوچک تراست و سیستم ایمنی آنها تکامل کمتری دارد، این افراد در مواجهه با دود سیگار بیشتر مستعد بروز عواقب گوشی و تنفسی هستند. آنها همچنین تند تر تنفس می کنند در نتیجه مواد شیمیایی مضر بیشتری را به نسبت هر کیلوگرم

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر فاطمه یارمند، دستیار بیماری های دهان، فک و صورت، بخش بیماری های دهان، فک و صورت بابل - جنب فرمانداری - خیابان نوشیروانی - دانشگاه علوم پزشکی - دانشکده ی دندانپزشکی بابل، بخش بیماری های دهان، شماره ی تلفن: ۰۹۱۲۶۰۱۸۰۶۲ پست الکترونیک: f_yarmand_86@yahoo.com

مواد و روش‌ها:

تحقیق با طراحی همگروهی- تاریخی انجام گرفت و تعداد ۶۰ نوجوان ۱۲ تا ۱۵ ساله مقطع راهنمایی در دو گروه ۳۰ تایی مورد بررسی قرار گرفتند. گروه مورد سیگاری غیر فعال و گروه شاهد غیر سیگاری بودند. و با معیارهای کتب مرجع و با استفاده از کوتینین بزاق انتخاب شدند.^(۱۰) لذا از بین آنان ۳۰ نفر سیگاری غیر فعال (کوتینین بزاق بیشتر از ۰/۰۵ نانوگرم در میلی لیتر) به عنوان گروه مورد و ۳۰ نفر غیر سیگاری (کوتینین بزاق کمتر از ۰/۰۵ نانوگرم در میلی لیتر) به عنوان گروه شاهد وارد مطالعه شدند. نیمی از هر گروه مونث و نیمی مذکر بودند. دو گروه از نظر سن نیز مشابه شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل: سن ۱۲ تا ۱۵ سال، عدم وجود بیماری سیستمیک، عدم مصرف هر گونه دارو شامل داروهای ایمنوساپرسیو، مکمل های ویتامینی و NSIADs، عدم وجود پریدنتیت با از دست رفتن چسبندگی لثه مساوی یا بیش از ۳ میلی متر، عدم وجود پوسیدگیهای rampant بود. قبل از شروع کار از والدین رضایت نامه کتبی اخذ و پرسشنامه با کمک والدین و کودکان توسط فرد پژوهشگر تکمیل شد.

نمونه گیری بزاق:

تمامی نمونه‌ها بین ساعت ۹-۱۱ صبح جمع آوری شد بدین ترتیب که از تمام افراد خواسته شد که ۹۰ دقیقه قبل از نمونه گیری، از خوردن، آشامیدن و مسواک زدن بپرهیزند و سپس بزاق غیر تحریکی به روش Spitting به حجم ۲ سی سی جمع آوری شد. هنگام جمع آوری بزاق، فرد می بایست در حالت نشسته و کاملاً راحت بوده و با چشمان باز در حالی که کمی به سمت جلو خم شده بود، بزاق خود را در مدت ۱۰ دقیقه و در هر دقیقه ۲-۱ بار در لوله آزمایش تخلیه می کند.^(۴،۱)

مراحل آزمایشگاهی

بعد از جمع آوری بزاق در لوله آزمایش، درب آن محکم بسته شد و در اسرع وقت به آزمایشگاه بیوشیمی منتقل گردید؛

شناخته شده است که اکسپوژن تنفسی با کارسینوژن های محیطی مانند پلی سیکلیک آروماتیک هیدروکربنات یا دود سیگار در ارتباط با افزایش خطر بیماری می باشد.^(۴) بزاق مجهز به مکانیسم های حفاظتی متنوعی از جمله آنزیم های مختلف، پارامترهای ایمونولوژیک و فاکتور های آنتی اکسیدان می باشد که مواد خطر را خنثی کرده و نهایتاً یک محیط حفاظت شده بین عوامل آسیب رسان و پوشش مخاطی دهان فراهم می کند.^(۵) نشان داده شده است که اثر ضد سرطان زایی احتمالی بزاق به طور آشکاری سبب مهارآغاز و پیشرفت سرطان دهان در مدل حیوانی می شود^(۶) که این اثر آنتی کارسینوژنیک را می توان به سیستم های آنتی اکسیدانی بزاق نسبت داد.^(۷)

دود سیگار دربردارندهی اکسیدان ها و پرو اکسیدان هایی ست که قادر به ایجاد ROS و تقویت استرس اکسیداتیو است.^(۸) یک پک از دود سیگار حاوی بیش از ۱۰۱۵ رادیکال آزاد است.^(۹) استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن ماکرومولکول هایی مانند لیپیدها، پروتئین ها و DNA آسیب می بیند که ناشی از ایجاد رادیکال های آزاد و گونه های واکنشی اکسیژن است که به مقدار زیاد در دود تنباکوی موجود در محیط وجود دارد.^(۳)

کوتینین محصول شکسته شدن نیکوتین بوده و می تواند در مایعات مختلف بدن از جمله بزاق شناسایی شود و ارزیابی غلظت کوتینین بزاق جهت ارزیابی اکسپوژن با دود تنباکوی موجود در محیط به علت ساده بودن، نیمه عمر طولانی تر نسبت به نیکوتین در پلاسما و اختصاصی بودن برای تنباکو، ارجح است.^(۱۱)

با توجه به این امر که کودکان و نوجوانان قربانیان اصلی دود تنباکوی موجود در محیط هستند و با نظر به اینکه اکثر مطالعات انجام شده مرتبط با اثرات اکسیداتیو و آتروژنیک ناشی از سیگاری غیر فعال در بزرگسالان انجام شده است، در این مطالعه به بررسی تاثیر سیگاری غیر فعال بر میزان ظرفیت آنتی اکسیدان تام و پراکسیداسیون لیپیدی بزاق در نوجوانان ۱۲ تا ۱۵ سال پرداخته شده است.

همچنین میزان آنتی اکسیدان بزاقی در افراد دو گروه و در هر دو جنس در افراد سیگاری غیر فعال نسبت به افراد غیر

P Value	شاهد تعداد=۳۰	مورد تعداد=۳۰	
۰/۰۲۳	۱۴۹۰/۵±۳۷۹/۳	۱۲۱۸/۸±۵۱۱/۵	آنتی اکسیدان بزاق تعداد=۶۰
۰/۱۷۶	۱۴/۴±۰/۸	۱۴/۶±۰/۶	پراکسیداسیون لیپیدی تعداد=۶۰

سیگاری کاهش معنی داری داشت، افزایش در پراکسیداسیون لیپیدی در هر دو جنس در هر دو گروه دیده شد که تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. (جدول ۲)

جدول ۲- میزان آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی در دو گروه سیگاری غیر فعال و غیر سیگاری به تفکیک جنس (بر حسب میکرومول)

P value	سیگاری غیر فعال تعداد=۱۵	غیر سیگاری تعداد=۱۵	
۰/۰۳۵	۱۲۱۰/۳۲±۴۸۸/۳۹	۱۴۹۸/۷۵±۳۸۱/۲۶	آنتی اکسیدان مونث تعداد=۳۰
۰/۱۵۶	۱۴/۸۹±۰/۸۹	۱۴/۷۹±۰/۶۷	پراکسیداسیون لیپیدی
۰/۰۴۲	۱۲۳۸/۷۲±۴۸۰/۶۸	۱۴۸۳/۲۴±۳۷۶/۸۲	آنتی اکسیدان مذکر تعداد=۳۰
۰/۱۸۴	۱۴/۵۹±۰/۸۱	۱۴/۵۱±۰/۷۲	پراکسیداسیون لیپیدی

بحث:

در مطالعه‌ی حاضر که بر روی ۶۰ نوجوان ۱۲ تا ۱۵ سال در دو گروه ۳۰ نفری صورت گرفت. تفاوت پراکسیداسیون لیپیدی بزاقی در افراد سیگاری غیر فعال نسبت به غیر سیگاری از لحاظ آماری معنی دار نبود. ($P=0/1$) در حالی که میزان آنتی اکسیدان تام بزاقی در گروه سیگاری غیر فعال نسبت به غیر سیگاری به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. ($P=0/02$) بروز پراکسیداسیون لیپیدی القا شده توسط رادیکال‌های آزاد سبب تغییرات قابل توجهی در غشاء سلول می شود. و

در آزمایشگاه، بزاق در سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا دبری ها از آن جدا شود، سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدان تام بزاق با روش FRAP انجام شد.

در این روش با احیای آهن توسط آنتی اکسیدانها، کمپلکس Fe^{2+} - TPTZ رنگ می گیرد که توسط اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل $FeSO_4$ استاندارد سنجیده می شود.^(۱۱) همچنین با روش TBARS ، $MDA(Malonidialdehyde)$ که حاصل پراکسیداسیون لیپیدهاست با $TBA (Thiobarbituric acid)$ واکنش می دهد که حاصل آن ماده ای صورتی است که ماکزیمم جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر می باشد که توسط اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.^(۱۲) در پایان آزمایشات، اطلاعات بدست آمده با روش آماری independent T test شد.

یافته‌ها:

این مطالعه بر روی ۶۰ نوجوان ۱۲ تا ۱۵ ساله در دو گروه ۳۰ نفره ی سیگاری غیر فعال و غیر سیگاری انجام شد. سن افراد شاهد $12/9 \pm 0/5$ و در گروه مورد $12/8 \pm 0/6$ بود ($P < 0/8$). میزان آنتی اکسیدان بزاقی و پراکسیداسیون لیپیدی به تفکیک گروه‌ها در جدول ۱ ارائه گردید و نشان می‌دهد که در گروه سیگاری غیر فعال نسبت به غیر سیگاری میزان آنتی اکسیدان بزاقی به میزان ۲۷۱ میکرومول و یا ۱۸/۲ درصد کمتر است. ($P < 0/03$) در گروه سیگاری غیر فعال نسبت به سیگاری میزان پراکسیداسیون لیپیدی ، بیشتر شد. اما این افزایش معنی دار نبود. ($P = 0/176$) (جدول ۱)

جدول ۱- میزان آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی در دو گروه سیگاری غیر فعال و غیر سیگاری (بر حسب میکرومول)

پراکسیداسیون غشاء لیپیدی در ارتباط با پاتوژن‌های بسیاری از بیماری‌های دژنراتیو مانند آترواسکلروز، پیری، سرطان‌زایی و دیابت مطرح است.^(۳)

آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان موادی شناخته می‌شوند که در غلظت نسبتاً بالایی به طور آشکاری میزان اکسیداسیون لیپید، پروتئین، کربوهیدرات و DNA را مهار می‌کنند. این آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان دهنده‌ی قوی عمل می‌کند و اتم‌های هیدروژن را جهت جفت شدن با الکترون‌های جفت نشده‌ی رادیکال‌های آزاد، اهدا می‌کند.^(۷،۵) پیشنهاد شده است که گونه‌های واکنشی اکسیژن سبب پراکسیداسیون لیپیدی غشاء می‌شود و نیز سمیت پراکسیدهای اسید چرب ایجاد شده علل مهمی برای سوء عملکرد سلول است.^(۱۳)

پلازما حاوی مولکول‌های آنتی‌اکسیدان متعددی بوده و عامل TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام) عملاً دربرگیرنده‌ی تمامی آنها می‌باشد. آلومین، اسید اوره، بیلیروبین و اسید اسکوربیک ترکیبات آنتی‌اکسیدان اصلی پلازما به شمار می‌روند که در طی التهاب مزمن، دچار کاهش می‌شود و استعمال دخانیات نیز از طریق بروز یک فرآیند التهابی منجر به این امر می‌شود.^(۱۴)

از طرف دیگر، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) به دنبال استنشاق دود سیگار در مواردی بر سیستم دفاعی بدن غلبه کرده و آسیب‌های اکسیداتیو به پروتئین‌های انتخابی، لیپیدها و DNA را منجر شود.^(۱۵-۱۸) با وجود اینکه مکانیسم‌های درگیری در پاتولوژی‌های مرتبط با استعمال دخانیات هنوز هم جای بحث دارد، به نظر می‌رسد رادیکال‌های آزاد نقش اساسی در پاتوژن‌های بیماری‌های مرتبط با استعمال دخانیات را داشته باشند.^(۱۷)

نتایج مطالعه حاضر مشابه با نتایج مطالعه‌ی Zalata و همکارانش می‌باشد که در آن به ارزیابی ارتباط بین دود تنباکوی موجود در محیط و آسیب به DNA سلولی در نتیجه‌ی استرس اکسیداتیو در کودکان پرداخت.^(۳) در این مطالعه ۶۴ کودک ۱ تا ۸ سال انتخاب شدند و نمونه‌ی خونی افراد مورد ارزیابی قرار گرفت، نتایج بیانگر این امر بود که

تنفس دود تنباکوی محیطی در ارتباط با افزایش در سطح اکسیدان‌ها و کاهش همزمان در سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در خون می‌باشد و این عدم تعادل اکسیدان آنتی‌اکسیدانی می‌تواند یکی از مکانیسم‌هایی باشد که منجر به آسیب DNA می‌گردد.^(۳) در مطالعه‌ای دیگر که با هدف ارزیابی اکسپوز با دود سیگار محیطی در بین کودکان گروه سنی ۵ تا ۱۱ سال انجام شد، نتایج نشان داد که سیگارکشیدن مادر، سن کمتر از ۷ سال، جنس مذکر و شرایط اجتماعی اقتصادی پایین، عوامل خطرسازی هستند که بطور معنی‌داری سلامتی کودکان را تحت تاثیر قرار می‌دهند.^(۱۵) در مطالعه‌ی ما نتایج حاصل در هر دو جنس مشابه بوده و سیگاری بودن والدین به تفکیک در نظر گرفته نشده بود. در مطالعات مشابه که در گروه‌های سنی دیگر در آلمان و ترکیه انجام شد، مشخص گردید که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام پلازما در گروه مورد کاهش یافته که مشابه با نتایج حاصل از این مطالعه می‌باشد و نیز استرس اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپیدی) افزایش یافته است که در مطالعه‌ی ما نیز این تفاوت دیده شد. اما از نظر آماری معنی دار نبود.^(۱۹،۲۰) با توجه به این امر که ارزیابی بزاق یکی از حیطه‌های تحقیقاتی در حال گسترش با کاربرد جهت اهداف پایه‌ای و بالینی است،^(۶) همچنین جمع‌آوری بزاق ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر بوده و نیز کمتر تهاجمی می‌باشد، در مطالعه‌ی حاضر نمونه‌گیری از بزاق افراد انجام شد که از مزایای این مطالعه می‌باشد و می‌تواند مطالعه‌ای اولیه جهت تاثیر اثرات نامطلوب تماس غیر مستقیم با دود تنباکو از طریق بزاق بوده که می‌تواند سلامتی بافت حفره دهان را تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد قرار گرفتن در معرض دود سیگار در نوجوانان موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام بزاق شده و می‌تواند از این طریق سلامت حفره دهان را به خطر بیندازد.

References:

- 1- Delpisheh A, Kelly Y, Brabin BJ. Passive cigarette smoke exposure in primary school children in Liverpool. *Public Health* 2006;120(1):65-9.
- 2- Skolnick ET, Vomvolakis MA, Buck KA, Mannino SF, Sun LS. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of adverse respiratory events in children receiving general anesthesia. *Anesthesiology* 1998;88(5):1144-53.
- 3- Zalata A, Yahia S, El-Bakary A, Elsheikha HM. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat Res* 2007;629(2):140-7.
- 4- Zappacosta B, Persichilli S, De Sole P, Mordente A, Giardina B. Effect of smoking one cigarette on antioxidant metabolites in the saliva of healthy smokers. *Arch Oral Biol* 1999;44(6):485-8.
- 5- Jafarzadeh A, Bakhshi H, Rezayati MT, Nemati M. Cigarette smoke-exposed saliva suppresses cellular and humoral immune responses in an animal model. *J Pak Med Assoc* 2009;59(11):760-3.
- 6- Sathishkumar T, Shanmugam S, Rameshkumar S, Rajavelan G, Haridoss V. Characterization of Salivary Glutathione reductase in Normal Individuals and its Implications on Smokers. *Researcher* 2010;2(4):74-81.
- 7- Nozad-Mojaver Y, Mirzaee M, Jafarzadeh A. Synergistic effects of cigarette smoke and saliva. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009;14(5):E217-21.
- 8- Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 2005;100(1):61-4.
- 9- Ahmed Mohammed Ahmed. Salivary Antioxidants Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in smokers comparing to Non-smokers. *J Bio Sci Res* 2013;4(1):4-9.
- 10- Motalebnejad M, Pooramir M, Jenabian N, Bijani A, Salehi M, Ranjbar M, et al. frequency of passive smoking among 12-15 year school children (Babol; 2011). *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2014;16(1): 90-94.
- 11- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measurement of FRAP "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-76.
- 12- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
- 13- Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diab Vasc Dis Res*;8(1):22-8
- 14- Moore S, Calder KA, Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994;21(6):417-25.
- 15- Kohen R, Tirosh O, Kopolovich K. The reductive capacity index of saliva obtained from donors of various ages. *Exp Gerontol* 1992;27: 161-168.
- 16- Chapple IL, Mason GI, Garner I, Matthews JB, Thorpe GH, Maxwell SR, et al. Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Ann Clin Biochem* 1997;34 (Pt 4):412-21.
- 17- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helblock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protect against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:110 003-6.
- 18- Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997;18:1359-1363.
- 19- Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid Peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig*. 2008;12(4):345-52
- 20- Yildirim F, Sermetow K, Aycicek A, Kocyigit A, Erel O. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *J Pediatr (Rio J)* 2011;87(6):523-8
- 21- Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Hendi SS, Kasraei S, Moghimbeigi A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18(4):e553-6.