

УЛОГАТА НА СЛОБОДНИТЕ РАДИКАЛИ ВО ПАТОГЕНЕТСКИТЕ МЕХАНИЗМИ НА ПАРОДОНТАЛНАТА БОЛЕСТ КАЈ ПУШАЧИ

Дирјанска К.¹, Накова М.¹, Ивановски К.¹, Грчев А.², Дејанова Б.¹

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје, ¹Катедра за орална патологија и пародонтологија

²Катедра за максилофацијална хирургија

Слободните радикали како високо реактивни молекули реагираат со различни биомолекули при што настанува нивна оксидација и оштетување на различни биолошки структури. Противштетното делување на слободните радикали организмот се бори со антиоксидативниот систем.

Целта на овој труд беше да се утврди паритетноста на слободните радикали во патогенетските збиднувања на пародонталната болест, како и промените на антиоксидативниот статус на пародонталните ткива преку клиничко-биохемиски параметри. Реализацијата на поставената цел беше спроведена кај две групи на пациенти со дијагностицирана хронична пародонтална болест, поделени во три подгрупи по клинички стадиуми, при што пациентите беа селектирани на непушачи и пушачи. Како контролна група ни послужија пациентите без клинички знаци на пародонтална болест. Кај сите испитаници беа спроведени клинички и параклинички испитувања при што беа проследени индексот на дениталниот плак, индексот нагингивалната инфламација и степеноот на пародонталната деструкција. Кај сите групи беше земен исечок одгингивалното ткиво. Со колориметриска метода беше одредувано нивоот на слободните радикали, а со спектрофотометриски есеј нивоот на антиоксидативниот капацитет вогингивалното ткиво. Регистрирана е разлика на просечните вредности на слободните радикали и антиоксидативниот капацитет вогингивалното ткиво помеѓу пародонталните

болни-непушачи и пушачи која е статистички значајна за $p < 0,05$. Слободните радикали и оксидативниот стрес може да имаат важна улога во патогенетските механизми на пародонталната болест. Во случај на дисбаланс помеѓу продукцијата на слободните радикали и способноста за неутрализација на антиоксидативните доаѓа до оксидативен стрес со кој може да се објасни биохемиската алка на сложените патогенетски механизми за настанување на ова заболување. Покрај тоа, пушењето предизвикува и намалување на антиоксидативниот капацитет што води кон уште поизразено нарушување на рамноста меѓу слободните радикали и антиоксидативната заштита.

Клучни зборови: пародонтална болест, слободни радикали, антиоксидативен капацитет,гингивално ткиво,непушачи,пушачи.

Научните сознанија за етиопатогенезата на пародонталната болест значајно се променети во последните неколку децении. Познато е присуството на патогените микроорганизми и нивниот дисбаланс со имунолошкиот одговор на домаќинот како важен услов за појавата на клиничките знаци и симптоми на пародонталната болест.

Постојат многу докази потврдени и емпириски и експериментално кои укажуваат дека развојот на пародонталната болест зависи и од голем број ризик фактори.

Денес се повеќе се обрнува внимание на ефектите од пушењето, на хормоналниот дисбаланс, генетската предиспозиција, системските заболувања за кои се верува дека го модифицираат одговорот на пародонтот кон пародонтопатогените.

Во поново време литературните податоци говорат за се поголемата инволвираност на слободните радикали во етиопатогенетските механизми во иницијацијата и прогресијата на пародонталната болест.

Кога Мс. CordKelle и Fridovich го откриле ензимот супероксид дисмутаза кој ја катализира разградбата на супероксидниот анјон создаден при унивалентната редукција на кислородот почнува историјата на слободните радикали, Chapple (4).

Слободните радикали се високо реактивни транзиторни хемиски супстанции (атом, јон или молекули) кои во својата структура имаат еден или повеќе неспарени електрони, Halliwell (7).

Заради присуството на неспарени електрони во својата структура слободните радикали се извонредно реактивни молекули и реагираат со различни биомолекули; протеини, липиди, липопротеини и др. Во текот на таа реакција доаѓа до оксидација на биомолекулите и нивно оштетување. На овој начин можат да бидат оштетени различни биолошки структури: сидовите на крвните садови, клеточните мембрани, DNK во јадрото. Во човечкиот организам се врши продукција на слободните радикали, дури и во текот на физиолошките процеси кои се одвиваат во клетките: оксидативната фосфорилација во митохондриите, фагоцитозата, биотрансформацијата на материите во ендоплазматскиот ретикулум и оксидоредуктивните процеси во присуство на метали. Но, освен во физиолошки услови овие високореактивни молекули можат да настанат и при ултравиолетово зрачење, радијација, пушење, загадување на животната средина, користењето на анестетици, аналгетици и цитостатици.

Најпознати се слободните радикали на кислородот: O_2 - супероксидниот анјон; HO_2 - перхидроксилен радикал; H_2O_2 -

водород пероксид, OH - хидроксилен радикал и др.

Еднаш создадени слободните радикали можат да реагираат меѓу себе, што е најповолен, но воедно и најмалку веројатен исход, со оглед на нивниот краток живот. Доколку продукцијата на слободните радикали е во физиолошки рамки тогаш антиоксидативниот систем на организмот ги врзува за себе, формирајќи реактивно стабилни соединенија.

Меѓутоа, кога продукцијата е зголемена или кога антиоксидативниот систем во организмот е истрошен (малнутриција, диети, зголемена физичка активност) тогаш зголеменото присуство на слободни радикали ќе придизвика верижна реакција на создавање на сè поголем број на слободни радикали кои можат да бидат и пореактивни од иницијалниот. Ваквата верижна реакција тече се додека не ја прекине некој од антиоксидативните механизми во организмот.

Против слободните радикали организмот се бори со посебни механизми кои се вклучуваат во т.н. антиоксидативна заштита. Антиоксидативната заштита на организмот ги опфаќа сите органски и неоргански молекули кои можат да ги неутрализираат слободните радикали, а се класифицираат во две групи: ензимски и неензимски. Од ензимите кои се значајни како антиоксиданси се издвојуваат: супероксид дисмутазата, глутатион редуктазата, каталазата, глутатион пероксидазата и за нив се смета дека претставуваат прва линија на антиоксидативната заштита.

Во зависност од местото на дејствување антиоксидансите може да бидат екстраклеточни и интраклеточни.

Екстраклеточните антиоксиданси се протеини врзани за железото-феритин, трансферин, лактоферин, хемосидерин и протеини врзани за бакарот-церулоплазмин, Halliwell и Gutteridge (8).

Антиоксидативната активност е карактеристична и за малите молекули какви што се албумините, аскорбатот, алфа - токоферолот, билирубините и уратите, Frei и cor.

(5). Овие молекули се вбројуваат во групата на неензимските антиоксиданси.

Интраклеточните антиоксиданси какви што се супероксид дисмутазата, глутатион пероксидазата, каталазата, глутатионот и глутатион редуказата ги елиминираат создадените слободни радикали во клетките. Многу од овие антиоксиданси се откриени во плунката и во гингивалниот флуид, Moore и сор. (14).

Никотинот е главен алкалоид во цигарите и е одговорен за оштетувањето на имуниот систем, Singh и сор. (17). Никотинот пенетрира низ епителната бариера на кожата и оралната мукоза, Hanes и сор. (9) и е способен да афектира во имунолошката одбрана, Neher (15), а ја менува и функцијата на фибробластите, колагената продукција и на секрецијата, Giannopoulou и сор. (6).

Zhang и сор. (20), Sano и сор. (16), Yildiz и сор. (19) укажуваат на влијанието на никотинот на генската експресија, секрецијата на хормоните и модулацијата на ензимската активност.

Пушењето се вбројува и во ризик факторите за настанување на пародонталната болест. Во поновите истражувања се укажува на податокот дека пародонталната болест кај пушачите е понапредната во споредба со непушачите без оглед на нивото на оралната хигиена. Како што беше спомнато, пушењето е една од алките во сложените механизми на создавањето на слободните радикали. Поради тоа, се поголем интерес предизвикуваат истражувањата во кои се корелираат пушењето, антиоксидативната заштита на пародонтот и прогресијата на пародонтопатијата.

Материјал и метод

За реализација на поставената цел на Клиниката за болести на устата и пародонтот беа проследени 90 пациенти, поделени во две групи на возраст од 20 до 55 години.

Во првата група беа опфатени 45 пациенти, кои се непушачи, со клинички знаци на

хронична пародонтална болест. Во зависност од клиничкиот стадиум на заболувањето, пациентите беа поделени во три подгрупи од по 15 пациенти.

Во втората група беа опфатени 45 пациенти - пушачи, со дијагностицирана пародонтална болест, исто така, поделени во три подгрупи од по 15 пациенти, по клинички стадиуми. Како контролна група ни послужија 30 испитаници без клинички знаци на пародонтална болест. Дијагнозата беше поставена врз база на анамнестички податоци, клинички преглед и рентгенолошки наод.

И во првата и во втората испитувана група кај пациентите не беше нотирано хронично бубрежно заболување, хепатално заболување, инфективно, кардиоваскуларно заболување. Пациентите не беа под антибиотска терапија, ниту беа алергични на лекови.

А во втората испитувана група пациентите беа долгогодишни пушачи, кои во просек пушеа по една кутија цигари дневно.

Кај сите пациенти беа направени клинички и параклинички испитувања.

Клинички беа проследени следните параметри:

- I Индекс на дентален плак по Silness-Loe (1963),
- II Индекс на гингивална инфламација по Loe-Silness(1964),
- III Степенот на пародонталната деструкција според класификацијата предложена од American Academy of Periodontology (1999).

По извршениот клинички преглед и нотирањето на индексните вредности, кај сите групи на пациенти беа спроведени параклинички испитувања. Тие се состоеја во одредување на:

- Слободни радикали во исечоци од гингивалното ткиво.
- Тотален антиоксидативен статус во исечоци од гингивалното ткиво.

Земените примероци од гингивалното ткиво прво се мереа на аналитичка вага, па

беа ставени во 1 ml фосфатен пуфер и замрзнати на минус 80 целзиусови степени. На крајот примероците беа хомогенизирани 5 минути во хомогенизаторот „MICROSON ultrasonic cell disruptor“, како и центрифугирани 5 минути на 5.000 вртежи.

За одредување на слободните радикали во гингивалното ткиво беше користена колориметриска метода со фотометар F.R.E.E. Тоталниот антиоксидативен статус беше определуван со (Randox, Crumlin, UK) спектрофотометриски есеј (600 nm).

Добиените резултати од испитуваните групи беа статистички обработени преку примената на Статистика 6, при што беа одредувани просечните вредности на слободните радикали и антиоксидативниот капацитет и ANOVA.

Резултати

Резултатите од клиничко - биохемиските претраги се претставени на следните табеларни прикази.

На табела 1 даден е приказ на просечните вредности на слободните радикали и антиоксидативниот капацитет во гингивално ткиво кај контролната група и пациентите од прв, втор и трет клинички стадиум на

пародонтопатија (пушачи). Од прикажаните резултати се забележува зголемување на вредноста на слободните радикали со напредување на клиничкиот стадиум на пародонтопатија. Нашите резултати, пак, за антиоксидативниот капацитет покажуваат намалување на нивото на антиоксиданси во сите три клинички стадиуми на болеста. Просечната вредност на антиоксидативниот капацитет во третиот клинички стадиум на пародонтопатија и припаѓа на големата редукција на антиоксидативната одбрана.

На табела 2 е даден табеларен приказ на слободните радикали во гингивално ткиво во трите клинички стадиуми на пародонтопатија меѓу контролната група, пушачи и непушачи. Разликата на просечните вредности за слободните радикали помеѓу контролната група и трите клинички стадиуми на пародонтална болест е статистички сигнификантна за $p < 0,05$.

На табела 3 е даден приказ на антиоксидативниот капацитет во гингивално ткиво од трите клинички стадиуми на пародонтопатија помеѓу непушачи, пушачи и контролната група. И разликата на просечните вредности за антиоксидативниот капацитет во гингивалното ткиво, помеѓу пародонталните болни непушачи и пушачи е статистички значајна за $p < 0,05$.

ТАБЕЛА 1. ПРИКАЗ НА ПРОСЕЧНИТЕ ВРЕДНОСТИ НА ИСПИТУВАНИТЕ ПАРАМЕТРИ ВО КОНТРОЛНАТА ГРУПА И ВО ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ НА ПАРОДОНТОПАТИЈАТА ВО ГИНГИВАЛНО ТКИВО

Контролна група					
Слободни радикали	15	200,0	170,0	230,0	23,29929
Антиоксидативен капацитет	15	338,0	330,0	350,0	6,76123
Прв клинички стадиум					
Слободни радикали	15	396,0	380,0	410,0	9,10295
Антиоксидативен капацитет	15	297,3333	290,0	310,0	7,03732
Втор клинички стадиум					
Слободни радикали	15	439,3333	400,0	460,0	22,18966
Антиоксидативен капацитет	15	288,6667	280,0	300,0	9,15475
Трет клинички стадиум					
Слободни радикали	15	598,0	570,0	630,0	26,51145
Антиоксидативен капацитет	15	267,3333	250,0	280,0	13,87015

ТАБЕЛА 2. ПРИКАЗ НА АНАЛИЗА НА ВАРИЈАНСА НА СЛОБОДНИТЕ РАДИКАЛИ ВО ГИНГИВАЛНОТО ТКИВО ОД ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ ПОМЕЃУ НЕПУШАЧИ И ПУШАЧИ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА

Контролна група и прв кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
Слободни радикали	294537,8	2	147268,9	23893,33	42	568,8889	258,8711	0,000000
Контролна група и втор кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
Слободни радикали	494137,8	2	247068,9	18293,33	42	435,5556	567,2500	0,00
Контролна група и трет кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
Слободни радикали	1204840	2	602420,0	21440,00	42	510,4762	1180,114	0,00

ТАБЕЛА 3. ПРИКАЗ НА АНАЛИЗА НА ВАРИЈАНСА НА АНТИОКСИДАТИВНИОТ КАПАЦИТЕТ ВО ГИНГИВАЛНОТО ТКИВО ОД ТРИТЕ КЛИНИЧКИ СТАДИУМИ ПОМЕЃУ НЕПУШАЧИ И ПУШАЧИ И КОНТРОЛНАТА ГРУПА

Контролна група и прв кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
	SS	df	MS	SS	df	MS	F	p
Антиоксидативен капацитет	12413,33	2	6206,667	4306,667	42	102,5397	60,52941	0,000000
Контролна група и втор кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
Антиоксидативен капацитет	20604,44	2	10302,22	3453,333	42	82,22222	125,2973	0,000000
Контролна група и трет кл. стадиум кај непушачи и пушачи								
Антиоксидативен капацитет	39057,78	2	19528,89	4333,333	42	103,1746	189,2800	0,000000

Дискусија

Развојот и прогресијата на пародонталната болест е проследена со поголема колонизација на пародонтопатогени микроорганизми во денталниот плак, кои предизвикуваат зголемена цитокина експресија и имунолошка активност во гингивалното ткиво. Како резултат на оваа активност полиморфонуклеарните леукоцити (PMNL) се карактеризираат со зголемено искористување на кислородот и во нив се случува вистинска „респираторна експлозија“ која предизвикува зголемена продукција на слободни радикали со што PMNL ги „убиваат“ бактериите, но можат и да го оштетат локалното ткиво.

Антиоксидансите се присутни во мали концентрации во однос на супстанциите кои што се оксидираат, па тие можат да ја спречат или да ја намалат нивната оксидација.

Се додека постои рамнотежа помеѓу продукцијата на слободните радикали и антиоксидативната заштита на клетките, слободните радикали не го истакнуваат својот штетен ефект. Прекумерното создавање на слободните радикали над физиолошкото ниво или намалената концентрација на антиоксиданси доведува до оксидативен стрес.

Откривањето на реактивните оксигени супстанции, зголемувањето на бакарните и железни јони кои ја катализираат продукцијата на најголем број реактивни групи и

нарушениот баланс помеѓу оксидативниот и антиоксидативниот капацитет во пародонталниот џеб го потврдуваат нивното учество во прогресијата на пародонталната болест.

Во многу истражувања се истакнува дека пушењето цигари има за последица намалување на антиоксидативниот капацитет, поради што пушењето се вбројува во факторите на ризик за настанување на пародонтална болест. Се смета дека количеството на испушени цигари, како и долготрајноста на пушењето влијаат врз јачината на заболувањето.

Нашите резултати се во согласност со наодите на Chang и сор. (2), кои укажуваат на зголеменото ниво на слободните радикали заедно со намаленото ниво на антиоксидативниот капацитет во гингивалното ткиво кај пушачите со пародонтопатија.

Добиените резултати во текот на нашето истражување го наметнуваат прашањето: дали пушењето во патогенетските процеси на пародонталната болест предизвикува зголемена продукција на слободни радикали или, пак, го намалува антиоксидативниот капацитет на пародонталните ткива.

Како и да е точниот механизам со кој пушењето придонесува за развојот и клиничките манифестации на пародонталната болест е сè уште непознат.

Малубројни се информациите што ни се на располагање да ни укажат на акутните ефекти од пушењето цигари на нивото на слободните радикали и антиоксидансите во гингивалното ткиво кај пациентите со пародонтопатија. Повеќето истражувања се насочени кон влијанието од акутните ефекти на пушењето врз оксидативниот стрес и инфламацијата на *in vitro* модели и на животни.

Во поедини студии е анализирано дејството на акутните ефекти од пушењето кое предизвикува оштетување на ткивата со зголемено ниво на водороден пероксид 30 минути по пушењето, како и деградација на екстрацелуларните матрикс протеини. По 24 часа се зголемува нивото на глутатион редуказата, што претставува протективен механизам за клетките против оксидативниот стрес предизвикан од цигарите (10).

Во своите студии Krol (13), го проследил можното влијание на цигарите врз продукцијата на голем број реактивни оксигени супстанци, кое може да предизвика оксидативно оштетување на ендотелните клетки. Овие клетки го синтетизираат азотниот оксид од L-arginine под дејство на ендогените ензими и го регулираат тонусот на крвните садови и локалниот проток на крвта. Намалената концентрација на азотниот оксид е знак за ендотелна дисфункција придружена со намалена концентрација на аскорбинската киселина кај пушачите, што предизвикува вазоконстрикција на пародонталните ткива.

Во неколку студии е анализирана концентрацијата на мочната киселина кај пациенти - пушачи со дијагностицирана пародонтална болест, кои укажуваат на намалената концентрација на овој антиоксиданс во однос на контролната група (1). Овие резултати може да се објаснат со потрошувачката на мочната киселина во неутрализацијата на слободните радикали, чија концентрација прекумерно се создава во оваа состојба. Како последица на оксидативното оштетување на проетиените во локалното ткиво, постои можност мочната киселина да е присутна и во гингивалниот флуид. Мочната киселина е способна да формира комплекси со металните јони и да го намали оксидативниот потенцијал на железото, без оксидативни промени на самата киселина.

Зголемената продукција на слободните радикали кај пушачите е резултат на вдишувањето на чадот од цигарите при што неутрофилните леукоцити директно се изложуваат на токсичните ефекти од никотинот.

Никотинот од цигарите предизвикува промени во фагоцитозата, зголемена продукција на слободни радикали, зголемена експресија на проинфламаторни цитокини, како што се IL-1 и IL-6. Со ова пушачите се изложени на зголемена гингивална вазоконстрикција, фиброза и намален проток на крвта во гингивалното ткиво. Никотинот е цитотоксичен за фибробластите и предизвикува редукација на клеточната пролиферација и на синтезата на протеините (18).

Jeng и сор. (11), истакнале дека токсичните компоненти од цигарите предизвикуваат сигнификантно намалување на ензимската активност на антиоксидансите, како и зајакнување на протективната улога на глутатионот против штетните ефекти од цигарите.

Испитувањата на експериментални животни покажале дека повеќекратното внесување на препарати што содржат глутатион придонесува кон намалувањето на вредностите на пародонталните индекси. Меѓутоа, нивната вистинска вредност во превенцијата и терапијата треба да се потврдат преку клинички студии.

Chang и сор. (3), демонстрирале дека цигарите предизвикуваат намалување на глутатионот во фибробластите и под влијание на пародонтогените микроорганизми создаваат хидрогени сулфиди, со што се активираат инфламаторните цитокини кои предизвикуваат оштетување на пародонталните ткива. Намаленото ниво на глутатионот може да претставува уште еден предиспонирачки фактор за настанувањето на пародонталната болест.

Во заштитата на оралните ткива значајна улога имаат и антиоксидансите во плунката. Во поедини истражувања кај пушачите е анализирана активноста на саливарната пероксидаза. Утврдено е дека нејзината активност кај пушачите се намалува. Како последица се јавува непотполна елиминација на водородниот пероксид од оралната средина и во реакција со останатите радикали и молекули, тој создава пореактивни радикали, кои ги оштетуваат биомолекулите (12).

Врз основа на анализирање на нашите резултати и литературните податоци можеме да одговориме на претходно поставеното прашање. Имено, сметаме дека пушењето, пред се, предизвикува намалување на антиоксидативниот капацитет во гингивалното ткиво кај пациентите со пародонтална болест.

По анализата на добиените резултати од испитувањето можеме да го заклучиме следното: слободните радикали и оксидативниот

стрес може да имаат важна улога во патогенетските механизми на пародонталната болест. Во случај на дисбаланс помеѓу продукцијата на слободните радикали и способноста за неутрализација на антиоксидансите доаѓа до оксидативен стрес со кој може да се објасни биохемиската алка на сложените патогенетски механизми за настанување на ова заболување. Покрај тоа, пушењето цигари предизвикува и намалување на антиоксидативниот капацитет што води кон уште поизразено нарушување на рамнотежата меѓу слободните радикали и антиоксидативната заштита.

THE ROLE OF FREE RADICALS IN PATHOGENESIS MECHANISM OF THE PERIODONTAL DISEASE BY SMOKERS

Dirjanska K., Nakova M., Ivanovski K., Grčev A., Dejanova B.

Summary

The free radicals as highly reactive molecules interact with different biomolecules in which their oxidation occurs as well as impairment of various biological structures. Against the damaging influence of free radicals the organism fights with an antioxidative system.

The aim of the present study was to establish the participation of free radicals in the pathogenetic processes of the periodontal disease, as well as the changes of the antioxidative status of the periodontal tissues by clinical-biochemical parameters. The realization of the given aim was performed through two groups of patients with diagnosed chronic periodontitis, divided in three subgroups by clinical stages, in which the patients were selected by smokers and non-smokers, as a control group we used patients without clinical symptoms of periodontal disease. In all the probands, clinical and paraclinical examinations were performed, also measuring the index of dental plaque, the index of

gingival inflammation and the degree of periodontal destruction. In all groups, a sample of the gingival tissue was obtained, using a colorimetric method, the level of free radicals was measured, and by spectrophotometric assay, the level of antioxidative capacity in gingival tissue was examined.

A difference of mean values of free radicals and antioxidative capacity in gingival tissue between periodontal patients - smokers and non-smokers which is statistically significant ($p < 0,05$). The free radicals and oxidative stress may play a major role in the pathogenetic mechanisms of the periodontal disease. In the instance of disbalance between production of free radicals and ability of neutralization of antioxidants, an oxidative stress occurs which may explain the biochemical chain of complicated pathogenetic mechanisms for occurrence of this disease, besides that, smoking develops decreased antioxidative capacity. It leads to further damage of the balance between free radicals and antioxidative protection.

Key words: periodontal disease, free radicals, antioxidative capacity, gingival tissue, non smokers, smokers.

Литература

- Battino M., Ferreiro MS., Gallardo I., Newman HN., Bulon P. The antioxidant capacity of saliva. *J. Clin. Periodontol* 2002 29 (3): 189-94.
- Chang YC. Huang FM. Tai KW. Yang LC. Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res* 2002; 37 (4) : 279-85.
- Chang YC. Lai CC. Lin LF. Ni WF. Tsai CH. The up-regulation of heme oxygenase-1 expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodontal Res* 2005; 40 (3) 252-7.
- Chapple ILC. The role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Mol. Pathol* 1996; 49; 247-55.
- Frei B. England L. Ames B. N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 86; 1989; 6377-6381.
- Giannopoulou C., Roehrich N. and Mombelli A. Effect of nicotine- treated epithelia cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J. Clin. Periodontol* 2001; 28; 769-775.
- Halliwell B. How to characterise biological antioxidants. *Free Radical Research Communications* 1990; 9; 1-31.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. & Cross C. E. Free radicals, antioxidants and human disease, where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1992;119; 598-620.
- Hanes P. J., Schuster G. S. and Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J. Periodontol* 1991; 62; 147-152.
- H van der Vaart. Postma DS. Timens W and Ten Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Torax* 2004; 59: 713-721.
- Jeng JH, Lan WH. Hahn LJ. Hsieh CC. Kuo MY. Inhibition of the migration, attachment, spreading, growth and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by arecoline, a major areca alkaloid, in vitro. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 371-375.
- Klein I., Nagler RM., Toffler R., van Der Viet A., Rernich AZ. Effect of cigarette smoke on oral peroxidase activity in human saliva: role of hydrogen cyanide. *Free. Radic. Biol. Med:* 2003; 35 (11): 1448-52.
- Krol K. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in pathogenesis of periodontitis. *Ann Acad Med Stetin* 2004; 50 (2): 135-48
- Moore S., Calder KAC., Miller N. et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Rad. Res. Comms.* 1994; 21 ; 417-425.
- Neher G. H. Nicotine- induced depression of lymphocytes growth. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1974; 41; 252-258.
- Sano A., Funabashi T., Kawaguchi M. Shinohara K. and Kimura F. Intravenous injections of nicotine decrease the pulsatile secretion of LIT by inhibiting the gonadotropin- releasing hormone (GnRH) pulse generator activity in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24; 397-407.
- Singh SP., Kalra R., Puttfarhen P. Kozak A., Tesfaigri J., Sopori M. L. Acute and chronic nicotine exposures modulate the immune system through different pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 2000;164; 65-72.
- Tsuchiya M. Asada A. Kasahara E. et al. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002; 105:1155-7.
- Yilds D., Ercal N. and Armstrong D. W. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 1998;130; 155-165.
- Zhang P. Liu B. Kang SW . Seo MS. Rhee SG. Obeid LM. *J Biol. Chem.* 1997; 272: 30615- 30618.