

STRESUL OXIDATIV LA GRAVIDELE CU GINGIVITĂ ȘI CARII DENTARE

CAMELIA DALAI¹, C. DALAI², IOANA IGNAT ROMANUL³, OTILIA MICLE⁴, MARIANA MUREȘAN⁵, LIANA ANTAL⁶, F. BODOG⁷

^{1,2,3,4,5,6,7}Universitatea din Oradea

Cuvinte cheie: gingivită, carii dentare, gravidă

Rezumat: Introducere: Producerea de oxidanți este inevitabilă în organismele aerobe inclusiv în corpul uman care deține un sistem antioxidant complex de apărare. Există un echilibru între oxidanți și antioxidanți. Dacă acest echilibru este modificat în favoarea oxidanților atunci apare stresul oxidativ.(20) Scopul studiului: Scopul acestui studiu a fost de a evalua markerii stresului oxidativ în serul și în saliva femeilor gravide cu carii dentare și gingivită și de a investiga utilizarea de metode simple de laborator de determinare a unor antioxidanți precum ceruloplasmina, acidul uric în evaluarea clinică și tratamentul afecțiunilor dentare. Material și metodă: Cercetările noastre au fost efectuate pe 27 de femei gravide sănătoase cu vârsta cuprinsă între 18 și 39 ani, în a cincea și a noua lună de sarcină, selectate dintre pacientele Spitalului de Obstetrică-Ginecologie, Oradea. Rezultatele au fost comparate cu un grup de control asemănător cu grupul de studiu privind vârsta, IMC (index de masă corporală), tensiunea arterială. Pentru demonstrarea stresului oxidativ am dozat concentrația malondialdehidei utilizând metoda cu acid tiobarbituric (TBA) și a ceruloplasminei cu metoda Ravin. Analize suplimentare precum acidul uric, fierul și proteina C reactivă s-au făcut pe analizorul HITACHI 912 Roche Diagnostics și folosind reactiv Greiner Diagnostic, Germania. Rezultate și discuții: MDA salivară a fost mai mare în ambele grupuri studiate, comparativ cu grupul maror. Concentrația salivară a ceruloplasminei este mai mică la gravidele cu carii dentare sau cu gingivită, în comparație cu grupul de control. Nu am obținut diferențe semnificative ale concentrației acidului uric atât în ser, cât și în salivă la gravide comparativ cu grupul de control. Valorile proteinei C reactive în salivă s-au aflat sub limita de detecție a metodei (<0.8mg/dl). Concluzii: Indicatorii agresiunii oxidative dozați pot oferi un instrument de monitorizare a stării de sănătate orală a gravidelor.

Keywords: gingivitis, dental caries, pregnant women

Abstract: Introduction: ROS production is inevitable in all aerobic organisms including in the human body which posses a complex antioxidant defence system. There is a balance between ROS and antioxidants. If this balance is disrupted in favour of ROS, an oxidative stress situation is created.(20) Purpose: The aim of this study was to evaluate the oxidative stress markers in serum and saliva of pregnant women with gingivitis and dental caries and to investigate the use of simple methods such as the determination of some antioxidants such as ceruloplasmin and uric acid for the clinical monitoring of the dental diseases and treatment. Materials and methods: Our research was carried out on 27 normal pregnant women aged between 18 and 39 years-old, in the fifth to ninth month of pregnancy, selected among the patients attending the Obstetrics and Gynaecology Clinics of Oradea. The results were compared with a control group matched with the study groups in terms of age, BMI, blood pressure. For proving the oxidative stress, we established the level of malondialdehyde using a method with thiobarbituric acid (TBA) and the level of ceruloplasmin with the Ravin method. The supplementary measurements such as uric acid, iron and CRP were done on HITACHI 912 Roche Diagnostics and using reagent Greiner Diagnostic, Germany. Results and discussions: The salivary MDA was higher in both studied groups compared to the reference one. We found the ceruloplasmin concentration in saliva lower in pregnant women with dental caries or with gingivitis in comparison to the control group. No significant differences were registered between the control group and pregnant women in salivary and serum uric acid concentration. CRP was immeasurable in all saliva samples, the values obtained were below the analytical range (<0.8mg/l). Conclusions: The indicators of oxidative aggression may provide a tool for monitoring the oral health of the pregnant women.

INTRODUCERE

Boala inflamatorie parodontală afectează 10% până la 15% din populație și este o cauză majoră de edentație la adulți.(1,2) La femeile gravide frecvența gingivitei variază de la 35% până la 100% și crește în al doilea trimestru de sarcină.(3) De asemenea, studiile au demonstrat că rezoluția inflamației

gingivale a avut loc după ce gravidele au fost învățate metoda corectă de igienizare dentară.(4)

Acumularea progesteronului activ și a estrogenului în țesuturile gingivale poate determina o permeabilitate vasculară mai mare și o creștere sporită a numărului de bacterii oferind

¹Autor corespondent: Dalai Camelia, Str. Privighetorii, Nr. 18, Oradea, România, E-mail: cameliadalai@gmail.com, Tel: +40740 236973
Articol intrat în redacție în 25.06.2012 și acceptat spre publicare în 29.08.2012
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2012;2(4):91-95

ASPECTE CLINICE

astfel factorii esențiali pentru creșterea bacteriană (vitamina K).(5,6,7,8)

Anumite studii au subliniat că gingivita și parodontita par a fi factori independenți de risc pentru nașteri premature sau pentru greutatea scăzută la naștere a fătului.(9,10,11,12,13,14) Infecțiile parodontale pot cauza gazdei răspunsuri sistemice cu o creștere a concentrației citokinelor serice, un posibil mecanism al nașterii premature.(15,16) Numeroase studii au demonstrat că aceste boli ale femeii gravide afectează un grup predispozant din populație care prezintă un răspuns inflamator/îmun exagerat la bacteriile patogene acumulate pe dinți și în jurul țesuturilor gingivale care la rândul lui duce la fenomenul de distrucție tisulară.(17,18) Răspunsul exagerat caracterizat prin hiperinflamație nu reușește să îndepărteze patogenii cauzatori și determină formarea de enzime proteolitice eliberate de neutrofile, mediatori preinflamatori și oxidanți (ROS). Toți acești factori cauzează distrucția parodonțiului și a osului alveolar adiacent.(19) Producerea de oxidanți este inevitabilă în organismele aerobe inclusiv în corpul uman care deține un sistem antioxidant complex de apărare. Există un echilibru între oxidanți și antioxidanți. Dacă acest echilibru este modificat în favoarea oxidanților atunci apare stresul oxidativ.(20)

SCOP

Scopul acestui studiu a fost de a evalua markerii stresului oxidativ în serul și în saliva femeilor gravide cu carii dentare și gingivită și de a investiga utilizarea de metode simple de laborator de determinare a unor antioxidanți precum ceruloplasmina, acidul uric în evaluarea clinică și tratamentul afecțiunilor dentare.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

Cercetările noastre au fost efectuate pe 27 de femei gravide sănătoase cu vârsta cuprinsă între 18 și 39 ani, în a cincea și a noua lună de sarcină, selectate dintre pacientele Spitalului de Obstetrică-Ginecologie Oradea.

Grupul de femei gravide a fost împărțit în următoarele loturi:

- (1) gravide cu carii dentare n=12
- (2) gravide cu gingivită n=15

Rezultate au fost comparate cu lotul de control:

(3) femei sănătoase neînsărcinate n=15 asociate cu persoanele studiate din punct de vedere al vârstei, IMC (indicele de masă corporală), tensiune arterială.

Clinic, gravidele cu gingivită au fost caracterizate prin edem gingival, o culoare roșie-vioacee a marginii gingivale, sângerări gingivale spontane sau induse de periajul dentar sau masticație. La examinarea locală gravidele care prezentau carii dentare s-au caracterizat prin distrucții reduse ale țesuturilor dure dentare. Un consimțământ informat scris a fost agreat de către toți participanții la studiu înainte de înscriere și studiul a fost aprobat de comitetul instituțional de etică. Probe venoase materne au fost colectate pe nemâncate. Sângele a fost recoltat în vacuainere. Exemplarele au fost transportate la laborator imediat după recoltare și centrifugate la 1500g pentru 10 minute cu scopul de a separa serul. Probele de salivă nestimulată au fost recoltate în condiții de repaus între orele 7.30 și 10.30 a.m. Pacienții au stat la pat și au scuipat în recipiente sterile de plastic în decursul a 5 minute, timp în care saliva s-a acumulat în planșeul bucal. Subiecții au fost rugați să nu înghită saliva în timpul recoltării. Probele de salivă au fost centrifugate (forța de centrifugare: 1,000g) timp de 10 minute pentru a îndepărta bacteriile și alte reziduuri. Fluidul clar rezultat a fost folosit pentru examinările biochimice.

Pentru demonstrarea stresului oxidativ am dozat concentrația malondialdehidei utilizând metoda cu acid

tiobarbituric (TBA) și a ceruloplasminei cu metoda Ravin. Analize suplimentare precum acidul uric, fierul și proteina C reactivă s-au făcut pe analizorul HITACHI 912 Roche Diagnostics și folosind reactiv Greiner Diagnostic, Germania.

Acidul uric a fost măsurat cu testul enzimatic fotometric utilizând TBHBA (2, 4, 6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid) (Cat. No. 1 3021 99 10 704), Diasys, Germany.(9,10) De asemenea, am estimat faptul că nivelul de fier seric are un rol important în formarea de oxidanți. Doza de fier a fost determinată folosind testul fotometric cu Ferene (Cat. No. 1 1911 99 10 704), Diasys, Germany.(11) Proteina C-reactivă (CRP) a fost determinată cu metoda imunoturbidimetrică (Cat. No. CPTXLH00), Diagam, Belgium.(12,13) Datele sunt exprimate ca medie \pm SD (deviația standard). Pentru a stabili importanța diferențelor a fost aplicat testul studentului. Valorile $P < 0.05$ au fost considerate din punct de vedere statistic semnificative. Coeficientul de corelație al lui Pearson a demonstrat conexiuni între parametrii studiați (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html>).

REZULTATE

Rezultatele studiului sunt prezentate în tabelul nr. 1. Nu au fost observate diferențe importante în ceea ce privește vârsta, IMC, tensiunea arterială la femeile gravide și la cele neînsărcinate în momentul înscrierii în studiu (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 1. Valorile MDA, ceruloplasminei, acidului uric, fierului, CRP la femeile gravide cu gingivită și carii dentare

	MDA nmoli/ml	Ceruloplasmină mg/dl	Acid uric g/l	Fe μ g/dl	CRP
Lot 1 Ser	2.84 \pm 0.84	43.75 \pm 3.54	3.13 \pm 0.50	102.14 \pm 44.76	2.30 \pm 2.44
Lot 1 Salivă	1.01 \pm 0.49	1.14 \pm 0.51	2.81 \pm 3.33	1.44 \pm 1.35	< 0.8
Valorile serice P ale lotului 1 comparate cu valorile salivare P ale lotului 1	0.001	0.0001	0.78	0.0001	
Lot 2 Ser	3.07 \pm 1.11	46.48 \pm 6.36	3.12 \pm 0.96	98.75 \pm 24.65	4.21 \pm 3.47
Lot 2 Salivă	1.26 \pm 0.6	1.92 \pm 1.02	3.14 \pm 1.62	2.48 \pm 4.11	<0.8
Valorile serice P ale lotului 2 comparate cu valorile salivare P	0.005	0.0001	0.98	0.0001	
P lot 1 - lot 2 ser	0.63	0.29	0.99	0.83	
P lot 1 - lot 2 salivă	0.48	0.32	0.75	0.16	
Lot de control Salivă	0.64 \pm 0.23	2.99 \pm 1.70	2.63 \pm 1.44		<0.8
P Lot 1 - control salivă	0.02	0.027	0.88		
P Lot 2 - control salivă	0.01	0.03	0.46		
Control Group Ser	1.91 \pm 0.33	32.11 \pm 1.62			
P lot 1-control Ser	0.005	0.0001			
P lot 2-control Ser	0.006	0.0001			

ASPECTE CLINICE

Loturi: (1) femei gravide cu carii dentare n=12
(2) femei gravide cu gingivită n=15

(3) femei neînsărcinate n =15

Tabelul nr. 2. Parametrii clinici studiați pe loturi

	Mediu de proveniență	Vârsta (ani)	Greutate (kg)	Înălțime (m)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Vârsta sarcinii (săptămâni)
Lot 1 n=12	41.66% U 58.33% R	30.1 ± 4.95	69.5 ± 14.69	1.65 ± 0.06	115.6 ± 13.25	70.8 ± 9.70	33.85 ± 7.60
Lot 2 n=15	40% U 60% R	27.08 ± 4.67	74.08 ± 12.67	1.67 ± 0.03	112.08 ± 11.12	71.91 ± 10.09	25.95 ± 8.81
Lot de control (n= 15)	70% U 30% R	26.09 ± 3.74	67.02 ± 9.80	1.65 ± 0.05	116.90 ± 9.53	70.55 ± 8.31	-

CRP nu a putut fi calculată pentru nicio probă de salivă întrucât valorile obținute au fost sub limita de detecție a metodei (< 0.8mg/dl). MDA salivară a fost mai mare în ambele grupuri studiate, comparativ cu grupul martor (tabel nr. 1). Concentrația salivară a ceruloplasminei este mai mică la gravidele cu carii dentare sau cu gingivită, în comparație cu grupul de control (tabel nr. 1). Nu am obținut diferențe semnificative ale concentrației acidului uric atât în ser, cât și în salivă la gravide comparativ cu grupul de control (lot 1 p=0,88, lot 2 p=0.46). O diferență semnificativă a apărut între MDA salivar și din ser, ceruloplasmină și fier la loturile studiate (p=0.0001 tabel nr.1). Concentrația salivară și serică de acid uric la loturile studiate a fost asemănătoare (tabelul nr. 1).

Analiza MDA, a ceruloplasminei, a fierului și acidului uric în ser nu a dezvăluit nicio diferență semnificativă între femeile gravide cu gingivită și cele cu carii dentare (tabelul nr. 1). Aceeași parametri în saliva loturilor studiate nu au prezentat variații remarcabile. În comparație cu serul lotului control, nivelul de MDA și de ceruloplasmină au fost foarte mari la femeile gravide (tabelul nr. 1).

DISCUȚII

Oxigenul molecular inspirat poate fi folosit de către celule numai după ce este activat. Activarea constă în procese de reducere ceea ce înseamnă că la fiecare pas metabolic moleculele câștigă un electron. Deci, se formează un oxigen anionic numit superoxid, peroxid și hidroxil etc., astfel încât în cele din urmă aceste transformări duc la formarea apei.(22)

Oxigenul activat în interiorul celulei depășește necesitățile celulei. Aici este menținut în echilibru de intervenția enzimelor antioxidante precum superoxid dismutaza, catalaza, glutatión peroxidaza. În ciuda acestui echilibru, aproximativ 2% din oxidanți trec din celule în sânge. Sângele posedă alți antioxidanți precum vitamina E, C, ceruloplasmina, bilirubina, acidul uric. Stresul oxidativ reprezintă un dezechilibru între producerea de oxidanți și nivelul de factori antioxidanți.

Brock et al au considerat că efectul acestui dezechilibru dintre oxidanți și antioxidanți constă în distrucția parodontiului pacienților cu parodontită.(23) Sursa principală de anion superoxid (O₂⁻) și de alți oxidanți responsabili de inițierea reacțiilor patologice este lanțul respirator. Oricum, prezența lui în țesuturile parodontale rezultă din activarea fagocitelor (neutrofile și macrofage), agenții celulari antibacterieni principali.(24,25) Radicalul hidroxil (OH) este unul dintre cei mai periculoși oxidanți, fiind capabil de distrugerea moleculelor precum proteine ADN și lipide. Peroxidul de (H₂O₂), în ciuda faptului că este considerat a fi un oxidant mai slab, poate trece membrana nucleară și leza ADN-ul.(26) Radicalul hidroxil inițiază obișnuitul lanț de reacții cunoscut sub numele de peroxidare lipidică ducând la vasodilatare și resorbție osoasă.(27)

Wang et all au sugerat faptul că anionul superoxid este implicat în resorbția osoasă. Studiile au demonstrat prezența acestui anion în resorbția osului adiacent osteoclastelor.(28)

MDA este rezultatul ruperii lanțului lung de atomi de carboni din acizii grași și este considerat un marker specific stresului oxidativ. Valorile postprandiale exagerate de glucoză și trigliceride se datorează unor diete hipercalorice și sunt absorbite în torentul sangvin extrem de repede. Concentrațiile crescute de glucoză și lipide au generat oxidanți la un nivel care depășește capacitatea ciclului Krebs și a electronilor transportori de pe membrana internă mitocondrială formând astfel adenozin trifosfat. Scurgerile de electroni duc la reducerea unui singur electron din oxigenul molecular formând astfel superoxidul (O²⁻) și, mai apoi, oxidanți.(29)

Sarcina este o stare fiziologică, caracterizată printr-un nivel mare de glucoză și trigliceride în ser. La femeile gravide cu gingivită am observat un nivel mai mare de fier salivar comparativ cu femeile gravide care prezentau carii dentare, dar fără o importanță deosebită. Distrucțiile celulare sunt asociate cu eliberarea de enzime citocrome. Cantitatea de fier celular ajunge până la 1% din fierul total al organismului. Intervenția fierului în reacția Fenton și Haber-Weiss este o sursă de formare a hidroxilului care determină agresiunea oxidativă. Există câteva bacterii care necesită prezența fierului. Acestea sunt efectele nocive ale fierului în salivă. Nivelul înalt de fier salivar la femeile gravide cu gingivită este un factor care participă la formarea tipului periculos de oxidant (numit hidroxil) și în acest fel crește stresul oxidativ. Concentrația serică de MDA la femeile gravide este comparată cu lotul control format din femei neînsărcinate. Aceste rezultate au demonstrat că stresul oxidativ la femeile gravide nu este numai de origine salivară.

În studiul nostru am descoperit o concentrație salivară crescută de MDA la ambele loturi experimentale. Este probabil semnul unei producții intraorale locale datorate inflamației țesuturilor moi.

Stresul oxidativ este crescut la femeile gravide cu afecțiuni dentare în special datorită concentrației locale scăzute de ceruloplasmină. Concentrația salivară scăzută de ceruloplasmină poate contribui la creșterea distrucției gingiilor și a dinților mai mult decât modificările din ser. Rolul ceruloplasminei salivare constă în reducerea proceselor inflamatorii inițiate de agresiunile bacteriene locale.

Nivelurile sistemice și locale de antioxidanți în lichidul gingival scad în sarcină și parodontită. Sistemul de apărare antioxidantă este scăzut în ultima fază a sarcinii ceea ce deteriorează statusul periodontal.(30)

Wei D et al în 2010 au demonstrat ca peroxidarea lipidică a fost mai mare în regiunea periodontală cu o creștere a concentrației superoxid dismutazei. De asemenea, ei au subliniat că terapia conservatoare poate reface capacitatea antioxidantă modificând local și sistemic nivelul de MDA al superoxid dismutazei și al statusului total oxidative.(31)

Naofumi Tamaki et al. au constatat că o creștere sistemică a stresului oxidativ poate influența evoluția bolii parodontale.(32) Moore și alții. au sugerat că acidul uric contribuie la creșterea cu până la 70% a activității salivare totale antioxidante.(33)

ASPECTE CLINICE

În studiul prezent, acidul uric este componenta salivară antioxidantă aproape de concentrațiile de control. Nu este însă clar dacă conținutul acidului uric al salivei reflectă în mod direct concentrațiile plasmatiche sau numai producția salivară. Totuși pot apărea, interacțiuni între antioxidanții de curățare.(34) Mai multe studii pe această temă ar trebui să fie realizate. Unele cercetări au demonstrat o scădere antioxidantă în parodontită, local, în parodonțiu și plasmă.(35) De asemenea, ei au descoperit o relație inversă între concentrațiile plasmatiche de antioxidanți și vitamina C cu o creștere prevalentă în parodontită.(36) Dacă una din concentrațiile salivare de antioxidanți este scăzută, atunci o altă componentă salivară antioxidantă o poate compensa.

CONCLUZII

1. Femeile gravide cu gingivită și carii dentare au un stres oxidativ indicat de concentrațiile crescute de MDA și de nivelul scăzut de ceruloplasmină salivară.
2. Concentrația salivară și serică de acid uric la loturile experimentale a fost asemănătoare.
3. La femeile gravide cu gingivită și carii dentare, nivelul seric de MDA, ceruloplasmină și fier nu a prezentat variații semnificative.
4. Indicatorii stresului oxidativ pot fi o unealtă de monitorizare a sănătății orale la femeile gravide.

REFERINȚE

1. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* 2005;76(12):2187-2193.
2. Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol.* 1999;1(4):110-116.
3. Lundgren D, Magnusson B, Lindhe J. Connective tissue alterations in gingivae of rats treated with estrogen and progesterone. A histologic and autoradiographic study. *Odontol Rev.* 1973;24:49-58.
4. Tilakaratne A, Soory M, Ranasinghe AW, Corea SM, Ekanayake SL, de Silva M. Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol.* 2000;27:787-792.
5. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontol Res.* 1980;15:111-122.
6. Jensen J, Liljemark W, Bloomquist C. The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol.* 1981;52:599-602.
7. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 1982;35:256-263.
8. Muramatsu Y, Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1994;35:139-151.
9. Radnai M, Gorzó I, Nagy E, Urban E, Novačk T, Paľ A. A possible association between preterm birth and early periodontitis. A pilot study. *J Clin Periodontol.* 2004;31:736-741.
10. Dörftbudak O, Eberhardt R, Ulm M, Persson GR. Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. *J Clin Periodontol.* 2005;32:45-52.
11. Jarjoura K, Devine PC, Perez-Delboy A, Herrera-Abreu M, D'Alton M, Papapanou PN. Markers of periodontal infection and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:513-519.
12. Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2006;107:29-36.
13. Radnai M, Gorzó I, Urban E, Eller J, Novačk T, Paľ A. Possible association between mother's periodontal status and preterm delivery. *J Clin Periodontol.* 2006;33:791-796.
14. Bobetsis YA, Barros SP, Offenbacher S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. *J Am Dent Assoc.* 2006;137:7S-13S.
15. Santos-Pereira SA, Giraldo PC, Saba-Chujfi E, et al. Chronic periodontitis and pre-term labour in Brazilian pregnant women: An association to be analysed. *J Clin Periodontol.* 2007;34:208-213.
16. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG.* 2002;109:527-533.
17. Boggess KA, Moss K, Madianos P, Murtha AP, Beck J, Offenbacher S. Fetal immune response to oral pathogens and risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1121-1126.
18. Kantarci A, Oyaizu K, van Dyke TE. Neutrophil mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology.* 2003;74(1):66-75.
19. Battino M, Ferreiro MS, Quiles JL, Bompadre S, Leone L, Bullon P. Alterations in the oxidation products, antioxidant markers, antioxidant capacity and lipid patterns in plasma of patients affected by Papillon-Lefevre syndrome. *Free Radical Research.* 2003;37(6):603-609.
20. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology.* 2000;43:160-232.
21. Kei Satoh. Serum lipid peroxides in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method". *Clin. Chim. Acta.* 1978;90:37-43.
22. Scully DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2002;61(1):137-143.
23. Halliwell B, Gutteridge JMG. Free radicals, other reactive species and disease in *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, UK; 1998. p. 617-783.
24. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *Journal of Clinical Periodontology.* 2004;31(7):515-521.
25. Kantarci A, Oyaizu K, van Dyke TE. Neutrophil mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology.* 2003;74(1):66-75.
26. Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. *Odontology.* 2003;91(1):13-18.
27. Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals. *Journal of Periodontology.* 2002;75(5):551-554.
28. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res.* 1999;31:261-272.
29. Wang ML, Hauschka PV, Tuan S, Steinbeck MJ. Exposure to particles stimulates superoxide production by human THP-1 macrophages and avian HD-11EM osteoclasts activated by tumor necrosis factor- α and PMA. *Journal of Arthroplasty.* 2002;17(3):335-346.

30. Iain LC. Chapple Potential Mechanisms Underpinning the Nutritional Modulation of Periodontal Inflammation. *J Am Dent Assoc.* 2009;140:178-184.
31. Ferda Alev Akahın, Esra Baltacıoğlu, Ahmet Alver, and Erdem Karabulut Total Antioxidant Capacity and Superoxide Dismutase Activity Levels in Serum and Gingival Crevicular Fluid in Pregnant Women With Chronic Periodontitis *Journal of Periodontology.* 2009;(3):457-467.
32. Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J.* 2010;55(1):70-8.
33. Naofumi Tamaki, Takaaki Tomofuji, Takayuki Maruyama, Daisuke Ekuni, Reiko Yamanaka, Noriko Takeuchi, and Tatsuo Yamamoto Relationship Between Periodontal Condition and Plasma Reactive Oxygen Metabolites in Patients in the Maintenance Phase of Periodontal Treatment *Journal of Periodontology.* 2008;79(11):2136-2142.
34. Moore S, Calder KAC, Millar NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radical Res.* 1994;21:417-425.
35. Chapple IL, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol.* 2007;2(2):103-110.
36. Chapple IL, Milward M, Dietrich T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr.* 2007;137(3):657-664.