ARTICOL DE CERCETARE

Efectul ozonului medical asupra nivelului seric al markerului superoxid dismutaza în tratamentul complex al parodontitelor marginale cronice

Andrei Pîrgari[1*]

[1]*Catedra de odontologie, parodontologie şi patologie orală, Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu", Chişinău, Republica Moldova.*

Autor corespondent:
Andrei Pîrgari
Catedra de odontologie, parodontologie şi patologie orală
Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu"
bd. Ştefan cel Mare şi Sfânt, 165, Chişinău, Republica Moldova, MD-2004
e-mail: andreipirgari@hotmail.com

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

La ora actuală, în terapia parodontală nu există niciun algoritm terapeutic de aplicare a ozonului medical în tratamentul complex al parodontitei marginale cronice (PMC). Reducerea stresului oxidativ joacă un rol critic în tratamentul complex al bolii parodontale. Rezultatele obţinute în urma aplicării sistemice a ozonului medical la pacienţii cu PMC, ar putea servi drept temei pentru o nouă metodă de tratament a bolii parodontale, ceea ce este de o importanţă majoră.

Ipoteza de cercetare

Nivelul seric crescut al markerului superoxid dismutaza (SOD) ar putea fi asociat cu parodontita marginală cronică, forma gravă, iar aplicarea sistemică a ozonului medical ar putea echilibra statutul antioxidant.

Noutatea adusă literaturii ştiinţifice din domeniu

Pentru prima dată, a fost efectuată analiza în dinamică a nivelului seric al markerului SOD la pacienţii cu PMC, forma gravă şi demonstrată eficienţa modulării statutului antioxidant cu ozon medical, aplicat sistemic, argumentată în baza investigaţiilor paraclinice de laborator.

Rezumat

Introducere. Boala parodontală continuă să reprezinte o problemă majoră de sănătate. Cercetările recente au scos în evidenţă şi rolul factorilor de risc, cum ar fi: formarea radicalilor liberi (RL), care provin din mediul interior şi din mediul exterior. Superoxid dismutaza (SOD) este o metaloenzimă antioxidantă, implicată în sistemul de apărare împotriva ROS.

RESEARCH ARTICLE

The effect of medical ozone on the serum level of the superoxide dismutase marker during the complex treatment of chronic marginal periodontitis

Andrei Pirgari[1*]

[1]*Chair of odontology, periodontology and oral pathology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.*

Corresponding author:
Andrei Pîrgari
Chair of odontology, periodontology and oral pathology
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy
165, Stefan cel Mare şi Sfant ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004
e-mail: andreipirgari@hotmail.com

What is not known yet, about the topic

Currently, there is no therapeutic scheme for the use of medical ozone în periodontal therapy for the complex treatment of chronic marginal periodontitis (CMP). The reduction of oxidative stress plays a critical role în the complex treatment of periodontal disease. The obtained results after systemic administration of medical ozone în patients with CMP, may serve as grounds for a new method of treatment of periodontal disease, which is of great importance.

Research hypothesis

The high level of serum of the superoxide dismutase marker (SOD) may be associated with the severe form of chronic marginal periodontitis and the systemic administration of the medical ozone may balance the antioxidant status.

Article's added novelty on the scientific topic

For this first time a dynamic analysis of the SOD marker în patients with severe CMP was performed, and the efficiency of modulation of antioxidant status, with systemic administration of medical ozone, was proved and supported by laboratory tests.

Abstract

Introduction. Periodontal disease continues to be a major health problem. Recent research has also shown the important role of risk factors, such as the formation of free radicals (FR), which can be endogenous and exogenous. The superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant metalloenzyme involved în the defense system against reactive oxygen spices (ROS). Together

Prezentă atât în interiorul cât şi în afara membranelor celulare, SOD, împreună cu glutation peroxidaza şi catalaza, fac parte din sistemul primar intern de apărare anti-oxidantă al organismului şi joacă un rol critic în reducerea stresului oxidativ, implicat în dezvoltarea unei game largi de afecţiuni degenerative, ce pun viata în pericol. În acest context, acţiunea antioxidantă a ozonului medical *merită luată* în *consideraţie*. Actualitatea aplicării ozonului medical în cazul proceselor degenerative în regiunea oro-maxilo-facială este determinată de dereglarea statusului antioxidant, implicat în dezvoltarea PMC. Astfel, aspectele utilizării ozonului medical la pacienţii cu PMC necesită o studiere mai aprofundată.

Material şi metode. Pentru acest studiu, au fost selectaţi 96 de pacienţi, femei şi bărbaţi, cu vârsta cuprinsă între 41 şi 73 de ani, cu diagnosticul de PMC forma gravă. Pacienţii au fost divizaţi în două loturi – lotul de control (52 de pacienţi), căruia i-a fost administrat un tratament parodontal clasic, nechirurgical (scalarea şi planarea radiculară, SRP) şi lotul de studiu (44 de pacienţi), căruia i-a fost administrat un tratament parodontal clasic, nechirurgical, complementat cu ozon medical, aplicat sistemic în forma de autohemoterapie majoră (AHTM). Evaluarea nivelului seric al markerului stresului oxidativ SOD, s-a realizat pe baza analizei sangvine, prin m*etoda* fotometrică (enzimatică). Examinarea pacienţilor s-a efectuat în dinamică: până la tratament, după tratament şi la intervale de 1, 3 şi 6 luni de la tratament.

Rezultate. Numărul pacienţilor cu nivelul seric al markerului SOD în normă, a crescut de la 11% la 84% (p<0,001) imediat după tratament şi la 95 % (p<0,001) – la 1 lună după tratament, ajungând la 100% (p<0,001) la 3 luni după tratament şi menţinându-se în normă la 6 luni după tratament.

Concluzii. Modularea nivelului seric al superoxid dismutazei a redus stresul oxidativ, implicat în patogeneza parodontitei marginale cronice, forma gravă, şi a condus la echilibrarea homeostaziei redox.

Cuvinte cheie: parodontită marginală cronică (PMC), specii reactive de oxigen (ROS), ozon medical, superoxid dismutază (SOD).

with glutathione peroxidase, ROS is part of the primary antioxidant system of defense of the body, which can be found inside and outside the cells' membranes and has a critical role în the reduction of oxidative stress that causes the development of a wide range of degenerative diseases, which endanger life. în this context, it is important to consider the antioxidative action of medical ozone. The relevance of using medical ozone în degenerative processes of the oral maxillofacial region is determined by the disruption of the anti-oxidative status, which is involved în the development of CMP. Thus, the use of medical ozone în patients with CMP requires further and thorough research.

Material and methods. For this study, 96 patients, men and women, aged 41-73, diagnosed with severe CMP were selected. The patients were divided into two lots – the control lot of 52 patients, which received a classical non-surgical periodontal treatment (scaling and root planing treatment (SRP); and the research lot of 44 patients, which received the same treatment complimented with medical ozone în the form of major autohaemotherapy (MAHT). Based on blood analysis, the photometric method was used, în order to evaluate serum level of the oxidative stress marker SOD. The examination of patients was carried out by observing the dynamics of the results before the treatment, after the treatment and at 1, 3, and 6 months after the treatment.

Results. The number of patients having a normal serum level of the SOD marker, increased from 11% to 84% (p<0.001) immediately after the treatment, and up to 95% (p<0.001) în 1 month after the treatment, attaining the maximum of 100% (p<0.001) în 3 months, and still keeping în the same condition în 6 months after the treatment.

Conclusions. Modulation of the serum level of the superoxide dismutase has reduced oxidative stress, involved în the pathogenesis of the severe chronic marginal periodontitis and led to the balance of the redox homeostasis.

Key words: chronic marginal periodontitis (CMP), reactive species of oxygen (ROS), medical ozone, superoxide dismutase (SOD).

Introducere

Parodontita marginală continuă să reprezinte o problemă majoră de sănătate, fiind una din cele mai răspândite şi frecvente boli ale corpului uman. În patogeneza bolii parodontale, rolul determinant îi revine factorului microbian şi răspunsului imuno-inflamator al organismului.

Prezenţa bacteriilor parodontopatogene a fost demonstrată în numeroase studii [1, 2]. Susceptibilitatea gazdei în declanşarea bolii parodontale este o condiţie obligatorie [3]. Răspunsul imuno-inflamator al organismului la agresiunea bacteriană este declanşat printr-un mecanism specific, care este influenţat de predispoziţia genetică a fiecărui individ în parte [4].

Cercetările recente au scos în evidenţă şi rolul factorilor de risc, cum ar fi: formarea radicalilor liberi (RL) [5, 6, 9], care provin din mediul interior (fagocitoză, catabolism incomplet, producere de energie etc.) şi din mediul exterior (stresul [7,

Introduction

Marginal periodontitis continues to remain a major health problem and it is considered the most widespread and frequent disease of the human body. The microbial factor and the body immune / inflammatory response has a major role în the pathogenesis of periodontal disease.

The presence of the periodontal pathogens bacteria has been proved în numerous studies [1, 2]. The host's predisposition for the development of the periodontal disease must be a mandatory condition [3]. The immune-inflammatory response of the body to the bacteria aggressiveness is triggered by a specific mechanism, which is influenced by the genetic predisposition of each individual [4].

Recent research has shown the role of risk factors such as the formation of free radicals (FR) [5, 6, 9], which come from the internal environment (phagocytosis, incomplete catabolism, production of energy, etc.) and from the external envi-

8], tabagismul, alcoolismul, aerul poluat, alimentele procesate, unele tipuri de medicamente etc.)

Radicalii liberi (RL) sunt atomi sau molecule ce conţin în structura lor unul sau mai mulţi electron liberi, ceea ce le determină instabilitatea. RL încearcă încontinuu să devină stabili, obţinând starea de echilibru prin cuplarea cu alte grupări electrofile ale altor participanţi la reacţii, transformându-i, astfel, în alţi RL [9]. Având o activitate crescută, RL distrug aparatul genetic al celulelor, împiedică funcţionarea corespunzătoare a ADN-ului, atacă structura membranelor celulare, blochează enzimele şi perturbă funcţiile fiziologice [9]. Toate acestea conducând, în final, la dezvoltarea a numeroase boli degenerative, inclusiv, ateroscleroză, accident vascular cerebral, infarct miocardic, afecţiuni inflamatorii acute şi cronice, diverse tulburări neurodegenerative, îmbătrânire prematură [11]. Datorită prezenţei oxigenului în atmosferă şi aproape în toate substanţele care compun organismul, interacţiunea RL cu oxigenul este inevitabilă, creându-se, astfel, specii reactive de oxigen (ROS).

Superoxid dismutaza (SOD) este o metaloenzimă antioxidantă, implicată în sistemul de apărare împotriva speciilor reactive de oxigen (ROS). Ea converteşte radicalii superoxid în H_2O şi în H_2O_2, care, apoi, este catalizat în O_2 şi H_2O de GSH-Px şi catalază [12]. Este un proces cu mai multe etape, care necesită un număr de cofactori metalici ("trace metal" – cupru, zinc, mangan şi fier). SOD se produce în organismul uman, dar scade odată cu înaintarea în vârsta. Acest antioxidant enzimatic, până nu demult, nu putea fi suplimentat oral, deoarece molecula proteică a SOD este rapid dezactivată de mediul *acid* şi de enzimele conţinute în tractul digestiv [13, 14].

Se cunosc mai multe clase de SOD:

- intracelulară
  - forma citosolică, cupru-zinc SOD (Cu-Zn SOD/SOD1); neutralizează RL produşi în urma activităţii metabolice din citoplasmă;
  - forma mitocondrială, mangan SOD (Mn SOD/SOD2); neutralizează RL produşi în mitocondrii în urma creării energiei celulare.
- extracelulară, Cu-Zn SOD (EC SOD/SOD3).

Prezentă atât în interiorul, cât şi în afara membranelor celulare, SOD este unul dintre sistemele primare interne de apărare anti-oxidantă a organismului şi joacă un rol critic în reducerea stresului oxidativ, implicat în dezvoltarea diferitor boli ce pun viaţa în pericol. Deşi beneficiile SOD merg dincolo de simpla neutralizare a anionilor superoxid, ameninţarea de expunere la superoxid nu ar trebui să fie subestimată [11].

Studiile au arătat că SOD posedă un rol critic în reducerea inflamaţiei interne şi în diminuarea durerii inflamatorii. De exemplu, studiile efectuate la Universitatea din Pittsburg au demonstrat că supraproducţia de ROS este asociată cu dezvoltarea unor condiţii, implicate într-o gamă largă de afecţiuni, de la boli cardiovasculare, la tulburări neurologice şi patologii pulmonare. Conform acestor studii, SOD este un candidat ideal pentru prevenirea daunelor celulare şi tisulare iniţiate de ROS, cum ar fi superoxidul [15]. Un alt studiu a remarcat că durerea cronică, asociată cu inflamaţia, scade atunci când superoxidul este neutralizat [16]. Artrita este o altă condiţie

ronment (stress [7, 8], smoking, alcohol, polluted air, processed food, some types of medication, etc.).

Free radicals (FR) are atoms or molecules that have în their structure one or several free electrons, which determine their instability. FR are constantly trying to become stable and thus are obtaining the balance status through pairing with other electrophile groups participating at the reaction and transforming them into other FR [9]. Due to their high activity the FR destroy the genetic source of the cells, impeding the appropriate functioning of the DNA and attack the structure of the cells membranes, blocking the enzymes and disrupting the physiological functions [9], which finally lead, to the development of numerous degenerative diseases, including atherosclerosis, stroke, heart attack, acute and chronic inflammatory diseases, various neurodegenerative disorders, as well as premature aging [11]. Due to the presence of oxygen în the atmosphere and în almost all the particles of the body the interaction of FR with the oxygen is inevitable, thus the emergence of reactive oxygen species (ROS).

Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidative metalloenzyme, which participates în the defense system against the reactive oxygen species (ROS). It transforms the superoxide radicals into H_2O and H_2O_2, which consequently is catalyzed into O_2 and H_2O by the GSH-Px and the catalase [12]. This is a multi-stage process, which requires a number of metal co-factors ("trace-metal" – copper, zinc, manganese and iron). It should be pointed out that the SOD produced by the body decreases during the aging process. Until recently, it was impossible to orally supplement this antioxidant enzyme because the SOD protein molecule was rapidly deactivated by the extremely acid environment and enzymes located în the digestive tract [13, 14].

Several types of SODs have been identified:

- intracellular
  - the cytosolic form, copper-zinc SOD (Co-Zn SOD/SOD1), neutralizes the FR, which are produced following the metabolic activities within the cytoplasm;
  - mitochondrial form, manganese SOD (Mn SOD/SOD2), neutralizes the FR, which are produced în the mitochondria following the creation of the cell energy.
- extracellular, Co-Zn SOD (EC SOD/SOD3).

The SOD is located inside and outside the cell membrane and it is one of the primary internal anti-oxidant defense system of the body, and plays an important role în the reduction of the oxidative stress, which causes the development of various life threatening diseases. The benefits of SOD go beyond a simple neutralization of superoxide anions, although the danger of exposure to superoxide should not be underestimated [11].

Research has shown that the SOD has a critical role în the reduction of internal inflammation and în the reduction of pain caused by this inflammation. For example, studies performed at the University of Pittsburg have shown that over production of ROS is associated with the development of certain conditions ranging from heart disease, to neurological disorders and pulmonary disease. According to these studies, SOD is a perfect candidate for preventing the cells' and tissue' damages caused by the ROS, such as the superoxide [15]. Another study highlighted that chronic pain caused by inflammation decreas-

în care este implicat superoxidul. Cercetătorii coreeni au demonstrat că SOD şi GSH-Px sunt semnificativ mai puţin active la pacienţii cu poliartrită reumatoidă, decât la grupul normal, de control. De asemenea, aportul alimentar de antioxidanţi a fost mai redus în grupul pacienţilor cu artrită, decât în grupul de control [17]. Superoxidul, de asemenea, face ravagii prin reacţia lui cu oxidul nitric (NO), formând peroxinitritul, o altă moleculă extrem de reactivă, care, ulterior, induce daune celulare şi tisulare. Peroxinitritul este implicat în mai multe boli, inclusiv accidentul vascular cerebral, boala Alzheimer şi ateroscleroză [18]. SOD s-a dovedit a fi foarte eficientă în tratamentul inflamaţiei colonice din colita indusă experimental la şoareci [19]. Tratamentul cu SOD scade ROS generate de stresul oxidativ şi, astfel, inhibă activarea celulelor endoteliale şi interacţiunea leucocite-celule endoteliale [12]. Recent, o echipa de cercetare, a subliniat faptul că un nivel scăzut al SOD şi al statutului total antioxidant poate juca un rol mult mai important decât creşterea izolată al nivelului total de colesterol sau de trigliceride în dezvoltarea aterosclerozei [20]. Prin urmare, antioxidanţii primari, cum ar fi SOD, sunt prima şi cea mai importanta linie de apărare împotriva RL derivaţi din oxigen, cu potenţial distructiv [21]. Astfel, metodele de modulare a nivelului acestor antioxidanţi pot deveni terapii importante pentru tratamentul bolilor degenerative, dintre care face parte şi PMC.

În acest context, acţiunea antioxidantă a ozonului medical *merită luată* în *consideraţie*.

În condiţii normale de *temperatură* şi presiune atmosferică, datorită instabilităţii şi solubilităţii ridicate, ozonul se dizolvă instantaneu în apă şi lichidele biologice, în fluidele extracelulare, în stratul subţire de apă, care acoperă pielea şi cel al mucoasei tractului respirator, intestinal, vaginal etc. Fiind un oxidant puternic, reacţionează imediat cu un număr de molecule prezente în fluidele biologice: antioxidanţi, proteine, carbohidraţi şi, în special, cu acizii graşi polinesaturaţi (PUFAs), de aceea, nu mai rămâne în formă gazoasă [22].

Reacţia ozonului cu atât de multe molecule implică câteva procese fundamentale, care se derulează simultan:

- pe de o parte, ozonul este consumat, inevitabil, în timpul oxidării acizilor ascorbic şi uric, grupărilor sulfhidrice (SH) al glutationului redus (GSH), proteinelor şi glicoproteinelor prezente în apa plasmei [23]. Reacţia este importantă, pentru că generează ROS, care, la rândul lor, declanşează un lanţ de reacţii biochimice în sânge. ROS sunt neutralizate în primele 30-60 de secunde de sistemul antioxidant (SA).
- pe de altă parte, are loc reacţia de peroxidare a lipidelor [24]. În mediul hidrofil al plasmei, un mol al unei olefine nesaturate (acidul arahidonic, transportat de albumină, ori prezenţa în plasmă a trigliceridelor şi chilomicronilor) şi un mol de ozon, duc la formarea a doi moli de aldehide şi a unui mol de peroxid de hidrogen (H_2O_2) [25]:
  O_3 + antioxidanţi = ROS;
  O_3 + acid arahidonic (sau trigliceride şi chilomicroni) **= H_2O_2 + LOPs;**

Aceste reacţii, finalizate în câteva secunde, consumă doza administrată de ozon şi generează peroxid de hidrogen, care

es when the superoxide is neutralized [16]. The superoxide is the cause of another disease called arthritis. Korean researchers have demonstrated that the SOD and the GSH-Px are significantly less active în patients with rheumatoid polyarthritis than for the average control group. Additionally, the dietary intake of antioxidants was lower for patients with arthritis than that of the control group [17]. The superoxide causes serious damage by reacting with the nitric oxide (NO) and forming peroxynitrite, which is another extremely reactive molecule which subsequently damages the cells and tissues. Peroxynitrite causes various diseases, including stroke, Alzheimer's disease and arteriosclerosis [18]. SOD has been demonstrated to be very efficient during the treatment of colon inflammation în experimentally induced colitis în mice [19]. The ROS, which are generated by oxidative stress, is decreased during the treatment with SOD and thus it inhibits the activity of endothelial cells and the leukocytes-endothelial cells interaction. Recently, a team of researchers underlined the fact that a low level of SOD and of the total antioxidant status can have a more important role than the separated gradual increasing of cholesterol level or of triglycerides during the development of the arteriosclerosis disease [20]. Consequently, the first antioxidants, such as SOD, are the most important factors for the defense against the oxygen derived FR, which have a destructive potential [21]. Thus, new methods of modulation of the level of these anti-oxidants may become important new therapies în the treatment of degenerative diseases, including CMP.

In this framework, the anti-oxidant action of medical ozone deserves to be taken into consideration.

Under normal temperature and atmospheric pressure, due to its instability and high solubility, ozone dissolves instantly în water, as well as în biological fluids, în extra cells fluids, or în the thin layer of water, which covers the skin, and the layer that covers the mucosa of the respiratory, intestinal and vaginal tract etc. Because it is a powerful anti-oxidant it reacts instantly with a number of the molecules that exist în the biological fluids: antioxidants, proteins, carbohydrates and mainly, with the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and it no longer remains în a gas form [22].

The ozone's reaction with so many molecules causes several main simultaneous processes:

- the ozone is inevitably consumed during the oxidation of the ascorbic and uric acids, sulfhydryl groups (SH) of reduced glutathione (GSH), proteins and the glycoproteins present în the water of plasma [23], an important reaction that generates ROS, which în its turn triggers, a chain of biochemical reactions în the blood. ROS is neutralized în the first 30-60 seconds by the anti-oxidant system (AS).
- on the other hand, lipid peroxidation reaction takes place [24]. One moll of an unsaturated olefin (the arachidonic acid transported by the albumin or the presence of the triglycerides and the chylomicrons în plasma) and one moll of ozone lead to the formation of two molls of aldehydes and one moll of hydrogen peroxide (H_2O_2) [25]:
  O_3 + antioxidants = ROS
  O_3 + arachidonic acid (or triglycerides and chylomicrons) = **H_2O_2 + LOPs;**

este un oxidant, dar nu o moleculă radical (de obicei, inclus injust în familia ROS), şi o varietate de aldehide, cunoscute sub numele de produşi de oxidare lipidica (LOPs).

Imediat ce ozonul se dizolvă în apa plasmatică şi reacţionează cu acizii graşi polinesaturati (PUFAs), concentraţia de H_2O_2 începe să crească, dar, la fel de rapid, scade, deoarece această moleculă neionizată pătrunde în eritrocite, leucocite şi trombocite, activează mai multe procese biochimice şi, simultan, este redusă la apă, datorită enzimelor intracelulare antioxidante: glutation-peroxidaza (GSH-Px), catalaza şi GSH. Acest moment important corespunde unui stres oxidativ acut şi tranzitoriu controlat, necesar pentru activarea biologică, fără vreo toxicitate, dar cu condiţia că doza de ozon este compatibilă cu capacitatea antioxidantă a sângelui [26].

În timp ce ROS sunt responsabile pentru efectele biologice imediate, LOPs sunt importanţi prin efectorii tardivi, care pot ajunge la orice organ, în special, la măduva osoasă, unde, după legarea de receptori în concentraţii submicromolare, determină adaptarea la stresul oxidativ acut repetat – o particularitate tipică a autohemoterapiei cu ozon [27].

Având o prezenţă tranzitorie în citoplasmă, H_2O_2 (generat de ozon) acţionează ca un mesager chimic al ozonului. În prezent, H_2O_2 este recunoscută drept o moleculă intracelulară de semnalizare, capabilă să activeze tirozin-kinaza, care fosforilează factorul de transcriere nucleară kB (NF-kB), ceea ce permite sinteza diferitor proteine [28, 29]. Practic, H_2O_2 funcţionează prin oxidarea cisteinei [30], care, la rândul ei, acţionează asupra celulelor mononucleare din sânge [31, 32], a trombocitelor [33], a celulelor endoteliale [34] şi a eritrocitelor [35, 25]. *Odată* pătrunse în celulă, moleculele de H_2O_2 sunt aproape imediat reduse la apă, iar lipoperoxizii – la hidroperoxizi.

Hidroperoxizii sau „peroxizii de ozon", termen propus de mai mulţi autori [25, 36], îşi asumă rolul de metaboliţi de ozon fiziologic activi. Datorită reacţiei selective a ozonului cu legăturile duble *C=C* ale acizilor graşi esenţiali, ozonoliza clasică, descrisa de Criegée, este reacţia dominantă în condiţii fiziologice, cu valori ale pH-ului ≤7,4. Ozonoliza durează doar fracţiuni de secundă, formând, în mare parte, lanţuri scurte de hidroxi-hidroperoxizi într-un mediu apos (peroxizi de ozon), care sunt, în mod evident, responsabili pentru efectul farmacologic în tratamentul sistemic cu ozon medical [36].

Peroxizii de ozon sunt compuşi reactivi de oxigen, asociaţi membranelor, ce acţionează ca mesageri secunzi prin intermediul reziduurilor de cisteină şi/sau prin reducere prin glutation (GSH). Mecanismul dat este mai puţin agresiv decât cel al radicalilor superoxid $O–O^-$ şi H_2O_2, şi preia reglarea antioxidantă fără SOD şi catalază, care, în schimb, sunt implicate în stresul oxidativ dezvoltat în condiţii patologice relevante. Hidroxi-hidroperoxidul cu lanţ scurt, cu tendinţă scăzută la reacţii radicale, ar putea iniţia reglarea mecanismelor protective de antioxidare în calitate de semnal redox (de ex., prin intermediul factorului nuclear *Nrf2*, în stres, sau prin intermediul factorului nuclear *NF-kB* în procese inflamatorii) [36].

Într-un tratament îndelungat, activitatea LOPs va culmina cu reglarea enzimelor antioxidante, cu apariţia proteinelor de stres oxidativ (OSP) – hemoxigenaza 1 – un marker tipic şi,

These reactions completed în a few seconds use the total amount of ozone, and generate peroxide of hydrogen that is an oxidant, but not a radical molecule (usually included în the ROS group) and a wide range of aldehydes, known as lipid oxidation products (LOPs).

Immediately after the ozone dissolves în the water of plasma and reacts with the polyunsaturated fatty acids (PUFAs), the concentration of H_2O_2 begins to increase, but it immediately decreases as unionized molecule penetrates quickly în erythrocytes, leucocytes and thrombocytes, activates several biochemical processes and is simultaneously subjected to water reduction, because of the antioxidant glutathione-peroxidase intra cells enzymes (GSH-Px), the catalase and GSH. This crucial moment corresponds to a transitional, controlled and acute oxidative stress, which is necessary for biological activation, without any toxicity, provided that the ozone dose is compatible with the antioxidant capacity of the blood [26].

While the ROS are responsible for immediate biological effects, the LOPs are important for late effects, which can affect any organ, especially bone marrow, where, after the connection of receptors în submicromolar concentrations, determine the adaptation to the repeated acute oxidative stress, which is a typical characteristic of major autohemotherapy with ozone [27].

Having a temporary presence în the cytoplasm, the H_2O_2 (generated by ozone) has a role of a chemical messenger of ozone. Currently the H_2O_2 is widely recognized as a signaling intra cell molecule, which is able to activate the tyrosine-kinase that phosphorylates the kB nuclear transcription factor (NF-kN), which allows the synthesis of a different number of proteins [28, 29]. Generally, H_2O_2 functions through the oxidation of the cysteine [30], which în turn has an influence over the mononuclear cells that are located în the blood [31, 32], the thrombocytes [33], and the endothelial cells [34] and of the erythrocytes [25, 35]. Once entering the cells, H_2O_2 molecules are almost instantly reduced to water and lipoperoxides to hydroperoxides.

The hydroperoxides or the so-called "ozone peroxides", a term proposed by various authors [25, 36], have the role of physiological active ozone metabolites. Due to the selective reaction of ozone with the *C=C* double bonds of the essential fatty acids, the classic ozonolysis, described by Criegée, is the main reaction within the physiological condition where the pH level is ≤7.4. The ozonolysis lasts only fractions of seconds, by developing mainly short chains of hydroxi-hydroperoxides în a watery environment (ozone peroxides), which are clearly responsible for the pharmaceutical effect during the systemic treatment with medical ozone [36].

The ozone peroxides are oxygen reactive compounds associated to cell membranes, which act as second messengers, through cysteine residues and/or reduction through glutathione (GSH), în a less aggressive way than the superoxide radicals $O\text{-}O^-$ and H_2O_2, and take over regulation of the antioxidants, without requiring the SOD and the catalase, as în the oxidative stress, developed as a result of certain relevant pathological conditions. The short chain hydroxi-hydroperoxide with decreased tendency to radical reaction could initiate the regulation of antioxidative protection mechanism, în a form of

probabil, cu eliberarea de celule stem. Răspunsul terapeutic, obținut după acest stres oxidativ repetat, *sugerează* un efect de precondiționare, capabil, eventual, să reechilibreze sistemul de oxido-reducere tisular, modificat de factorii patogeni [25].

Actualitatea aplicării ozonului medical în cazul proceselor degenerative în regiunea oro-maxilo-facială este determinată de dereglarea statutului antioxidant, implicat în dezvoltarea parodontitei marginale cronice. Astfel, aspectele utilizării ozonului medical la pacienții cu parodontite marginale cronice necesită o studiere mai aprofundată.

Scopul studiului

Evaluarea acțiunii ozonului medical, administrat sistemic, asupra nivelului seric al markerului stresului oxidativ superoxid dismutaza (SOD), la pacienții cu parodontită marginală cronică (PMC), forma gravă.

Material și metode

Pentru a îndeplini scopul propus în acest studiu, au fost selectați 96 de pacienți de ambele sexe, cu vârsta cuprinsă între 41 și 73 de ani, diagnosticați cu PMC, forma gravă. Pacienții au fost divizați în două loturi: cel de control (*n*=52), căruia i-a fost administrat un tratament parodontal clasic, nechirurgical (scalarea și planarea radiculară, SRP) și lotul de studiu (*n*=44), căruia i-a fost administrat un tratament parodontal clasic, nechirurgical, complementat cu ozon medical, aplicat sistemic, sub formă de autohemoterapie majoră (AHTM).

Toate metodele de tratament cu ozon medical au fost efectuate conform protocoalelor de lucru, elaborate de Societățile de Ozonoterapie și care au fost incluse în soft-ul generatorului de ozon medical, fapt care exclude posibilitatea unor erori de dozare a ozonului [10].

Generatoarele de ozon medical, precum și toate consumabilele (de unică folosință), au fost conforme cu directiva Uniunii Europene MDD 93/42, referitoare la echipamentele medicale [36].

În acest studiu, generarea ozonului medical s-a efectuat cu aparatul universal medical *Medozon Compact* (*Herrmann Apparatebau Gmbh*, Eslsenfeld, Germania).

Toți pacienții din lotul de studiu au urmat un curs de 6 ședințe de AHTM, o dată la trei zile. Având în vedere că majoritatea pacienților prezentau un anumit grad de dezechilibru al statutului antioxidant, concentrația inițială prescrisă de ozon medical a fost de 25 mg/mL (O_2-O_3), urmată de o creștere treptată, cu 5 mg/mL (O_2-O_3), la fiecare ședință ulterioară, până la o concentrație de 35 mg/mL (O_2-O_3).

Administrare sistemică a ozonului medical prin metoda AHTM

Pacientul a fost poziționat comod, *culcat* pe spate *pe canapeaua medicală*. A fost prelevat din vena cubitală 50-150 mL de sânge și introdus într-o sticla vidată sterilă, ce conținea o soluție de 3,13% de citrat de sodiu (anticoagulant) și o cantitate egală de ozon medical de o anumită concentrație, după care sângele era reperfuzat pacientului. Durata totală a procedurii a fost de 20-30 min.

Examenul de laborator

Evaluarea nivelului seric al SOD s-a realizat fotometric (enzimatică). Sângele venos s-a r*ecoltat à jeun,* în r*ecipient de*

a redox signal (e.g., though the stress nuclear factor *Nrf2* and the inflammatory processes nuclear factor *NFkB*) [36].

During a prolonged treatment, the LOPs activity will culminate în the up-regulation of the antioxidant enzymes, the development of the oxidative stress proteins (OSP) – hemoxigenase-1, a typical marker, and probably the release of stem cells. The therapeutic response achieved after this repeated oxidative stress suggests a preconditioning effect that can eventually rebalance the redox system, which has been modified through pathogen factors [25].

The relevance of medical ozone application în the case of degenerative processes development în the oral and maxillofacial area is determined by the dysfunction of the antioxidant status, involved în the development of chronic marginal periodontitis. Therefore, a deeper and further research of all the aspects of use of medical ozone în patients diagnosed with chronic marginal periodontitis is needed.

Purpose of the study

Evaluation of the medical ozone effect în systemic administration, over the serum level of the oxidative stress marker – superoxide dismutase (SOD), în patients with severe CMP.

Material and methods

In order to achieve the purpose for this study, 96 patients, men and women, aged 41-73, diagnosed with severe CMP were selected. The patients were divided into two lots – the control lot of 52 patients, which received a classical non-surgical periodontal treatment (scaling and root planning treatment (SRP)); and the research lot of 44 patients, which received the same treatment complimented with medical ozone în the form of major autohemotherapy (MAHT).

All methods of medical ozone treatment were performed according to protocols established by the Ozone Therapy Societies and are included în the working software of the medical ozone generator. This fact excludes any error of ozone dosage [10].

Medical ozone generators, as well as all single use consumables, fulfilled the requirements of the EU medical device directives MDD (Directive 93/42) [36].

The device *Medozone Compact* (*Herrmann Apparatebau Gmbh*, Eslsenfeld, Germany) was used for the generation of medical ozone în this study.

All patients from the research lot received 6 sessions of MAHT, once every 3 days. Taking into consideration the fact that the majority of the patients showed a certain degree of unbalanced antioxidant status, the initial concentration of the medical ozone was 25 mg/mL of O_2-O_3, followed by a gradual increase by 5 mg/mL of O_2-O_3 at every new session until the concentration of 35 mg/mL of O_2-$O_3$was reached.

Systemic administration of medical ozone through MAHT method

The patient takes a normal position, laying on his/her back comfortably on the medical couch. A certain amount of venous blood (50-150 mL), is taken from the cubital vein into the sterile glass vacuum bottle, în which was initially added 3.13% of sodium citrate (anticoagulant) and is mixed with an equal amount of medical ozone, having a certain concentration, and afterwards this blood is infused back to the patient. The procedure lasts approximately 20-30 minutes.

recoltare (vacutainer), ce conţinea EDTA ca şi anticoagulant. Proba de sânge era pusă imediat în frigider, la 2-8°C. Valorile de refernţă (normale) pentru SOD au fost considerate 1200-1800 U/g Hb [12].

Testarea pacienţilor s-a efectuat în dinamică, până la tratament, imediat după tratament şi la intervale de 1, 3 şi 6 luni după tratament.

Analiza statistică efectuată

Analiza seriilor de date a fost efectuată cu ajutorul aplicaţiilor statistice ale programului *Microsoft Excel*. Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute şi relative. Un p<0,05 a fost coniserat statistic semnificativ.

Rezultate

Loturile nu au prezentat nicio diferenţă statistic semnificativă între parametri la etapa de până la tratament. În lotul de control, pe parcursul supravegherii, nu a fost constatată nicio schimbare statistic semnificativă a nivelului seric al SOD.

Pe de altă parte, în lotul tratat cu ozon medical, pacienţii cu valori crescute ale SOD au prezentat o scădere semnificativă a concentraţiilor serice medii după tratament, iar la 1 lună după tratament – o normalizare. Respectiv, la pacienţii cu nivele scăzute ale SOD, s-a constatat o creştere semnificativă ale concentraţiilor serice, până la normalizare. Astfel, proporţia pacienţilor cu nivele normale de SOD a crescut de la 11% la 84% (p<0,001) imediat după tratament, la 95% (p<0,001) – la 1 lună după tratament şi la 100% (p<0,001) – la 3 luni după tratament, cu menţinerea stării date la 6 luni după tratament (Figura 1).

Laboratory tests

The evaluation of the serum level of oxidative stress marker (SOD) was performed using the photometric (enzymatic) method. The venous blood was collected în a vacutainer, which contained the EDTA as anticoagulant, on an empty stomach. The blood sample was immediately stored în the refrigerator at a temperature of 2-8°C [12]. The evaluation of the serum level of the SOD marker indicators was made according to the average indicators of 1200-1800 U/g Hb [12].

The dynamic examination of patients was done before the treatment, after the treatment, at 1, 3, and 6 months after the treatment.

Statistical analysis performed

Analysis of data series was made with statistical applications of the *Microsoft Excel* program. Data are presented în absolute and relative values. A p<0.05 value was considered statistically significant.

Results

The data accumulated, before the treatment, did not show any statistically significant difference between the two lots. The control lot did not register any evident changes of the average value of the serum level of the SOD marker.

On the other hand, the lot treated with medical ozone has shown that în the patients with higher level of the SOD marker, had a significant decrease of the average values of the serum level of the SOD marker after the treatment and în 1 month after the treatment, a decrease up to normal level indicators. Consequently, the patients who had low levels of the SOD mar-

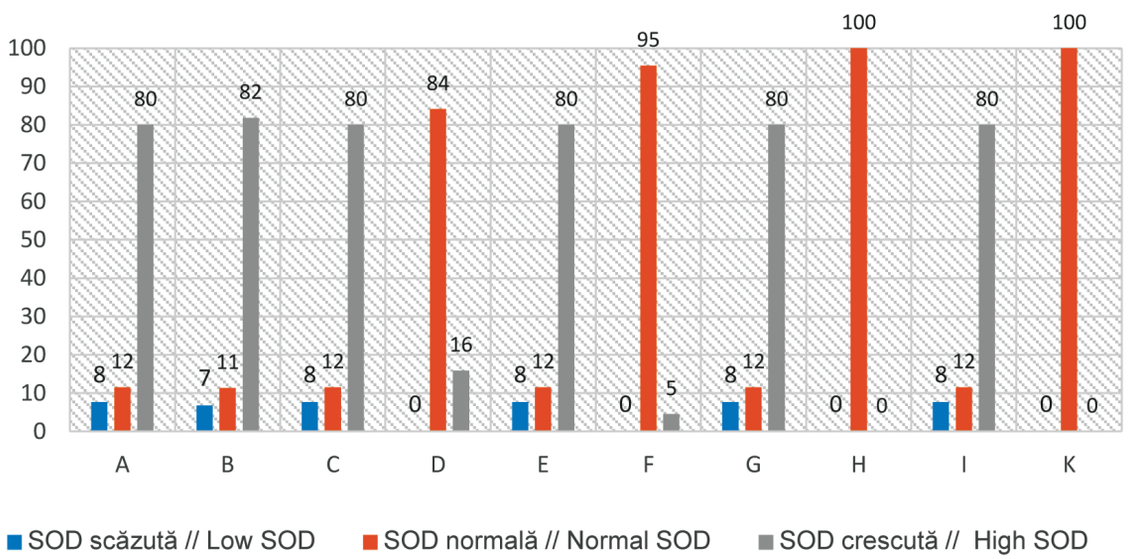

Fig. 1 Analiza comparativă a valorii medii al nivelului seric al SOD, între loturi până la tratament, după tratament, la 1 lună, la 3 luni şi la 6 luni după tratament. *Legendă:* (A) – PMCG până la tratament; (B) – PMCG + O_3 până la tratament; (C) – PMCG după tratament; (D) – PMCG + O_3 după tratament; (E) – PMCG la 1 lună după tratament; (F) – PMCG + O_3 la 1 lună după tratament; (G) – PMCG la 3 luni după tratament; (H) – PMCG + O_3 la 3 luni după tratament; (I) – PMCG la 6 luni după tratament; (I) – PMCG + O_3 la 6 luni după tratament.

Fig. 1 Comparative analysis of the average value of the serum level of the SOD marker, between the lots, before the treatment, after the treatment, at 1, 3 and 6 months after the treatment. *Legendă:* (A) – SCMP before treatment; (B) – SCMP + O_3 before treatment; (C) – SCMP after treatment; (D) – SCMP + O_3 after treatment; (E) – SCMP at 1 month after treatment; (F) – SCMP + O_3 at 1 month after treatment; (G) – SCMP at 3 months after treatment; (H) – SCMP + O_3 at 3 months after treatment; (I) – SCMP at 6 months after treatment; (I) – SCMP + O_3 at 6 months after treatment.

Discuţii

Prezentă atât în interiorul cât şi în afara membranelor celulare, SOD, împreună cu glutation-peroxidaza şi catalaza, fac parte din sistemul primar intern de apărare anti-oxidantă al organismului şi joacă un rol important în reducerea stresului oxidativ [11].

O serie de studii au demonstrat că nivelele markerelor stresului oxidativ şi leziunile oxidative sunt crescute în boala parodontală (BP), comparativ cu persoanele sănătoase, existând corelaţii semnificative între activitatea salivară antioxidantă şi severitatea BP [37-39]. Într-un alt studiu, bolnavii de parodontită generalizată cu PPr cu exudat purulent, au prezentat o mobilizare semnificativ redusă a potenţialului bactericid al mononuclearelor şi neutrofilelor, maladia fiind însoţită de intensificarea activităţii enzimelor de protecţie antioxidantă (SOD şi catalaza), dar care nu reuşeau, totuşi, să limiteze peroxidarea lipidelor [40]. Una din acţiunile ozonului medical asupra patogenezei afecţiunilor parodonţiului, o demonstrează scăderea activităţii proceselor de peroxidare a lipidelor şi stimularea concomitentă a sistemului de antioxidare [41, 42].

Rezultatul obţinut a demonstrat efectul de modulare al nivelului seric de SOD, indus de ozonoterapia sistemică. Modularea SOD şi a catalazei de catre ozonul medical a fost descrisă şi în alte studii clinice; această modulare implică, probabil, expresia genelor [43, 44]. Totalitatea modificărilor date reprezintă o adaptare metabolică care contribuie la integrarea reacţiilor homeostatice la diferite nivele, îndreptată spre ameliorarea proceselor de autoreglare ale organismului [45].

Concluzii

Nivelul seric crescut al superoxid dismutazei este asociat cu parodontita marginală cronică, forma gravă. Administrarea sistemică de ozon medical la pacienţii cu parodontită marginală cronică şi-a demonstrat eficienţa şi reprezintă un element cheie al terapiei antioxidante. Modularea nivelului seric al SOD a redus stresul oxidativ, implicat în patogeneza parodontitei marginale cronice, forma gravă şi a condus la *echilibrarea* homeostaziei redox.

Declaraţia de conflict de interese

Autorul declară lipsa conflictului de interese.

ker value showed a significant increase of the average value of serum level of SOD marker up to normal one. Therefore, the patients, having a normal serum level of the SOD marker, increased from 11% to 84% ($p<0.001$) immediately after the treatment and up to 95% ($p<0.001$) în 1 month after the treatment, raising up to 100% ($p<0.001$) în 3 months after the treatment and maintaining the same condition, at 6 months after the treatment (Figure 1).

Discussion

Together with glutathione peroxidase and catalase, the SOD is part of the primary internal antioxidant defense system of the body, and has a critical role în the reduction of the oxidative stress [11].

Various research studies have shown that the levels of the oxidative stress marker and the oxidative destructions are high în periodontal disease (PD) în relation with the healthy ones and there is a significant correlation between the saliva antioxidant activity and the severity of the PD [37-39]. Another study showed that patients with CMP with periodontal pockets (PP) with purulent exudates had a significantly reduced mobilization of mononuclears and neutrophils bactericide potential, having a higher activity of the antioxidant defence enzymes (SOD and catalase), however being unable to remove the intensification of the lipids peroxidation processes [40]. One of the effects of the medical ozone on the pathogenesis of the periodontal disease has been proved by the decrease of the activity of lipid peroxidation processes and the simultaneous stimulation of the antioxidant system [41, 42].

The impressive results obtained demonstrated the modulation effect of the serum level of the superoxide dismutase, induced by the systemic application of medical ozone. The SOD and catalase modulation by the medical ozone was observed during other clinical studies and it probably involves genes expression modulation [43, 44]. The overall number of these modifications is the metabolic adaptation, which promotes the integration of the homeostatic reactions at different levels and decrease the body's self-regulation disorders [45].

Conclusions

The increased serum level of the superoxide dismutase marker is associated with severe chronic marginal periodontitis. Systemic administration of medical ozone în patients with severe chronic marginal periodontitis demonstrated its effectiveness and represents a key element of the antioxidant therapy. The modulation of the serum level of the superoxide dismutase reduced the oxidative stress involved în the pathogenesis of sever chronic marginal periodontitis and led to rebalance of the redox homeostasis.

Declaration of conflicting interests

The author states lack of conflict of interest.

Referințe / references

1. Slots J. *et al.* The occurence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* în destructive periodontal disease în adults. *J. Clin. Periodontol.*, 1986; 13: 570-577.
2. Slots J., Listgarten M. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetem comitans* în human periodontal diseases. *J. Periodontol.,* 1988; 15: 85-93.
3. Haffajee A., Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.*, 1994; 5: 78-111.
4. Hodgeand P. Michalowicz B. Genetic predisposition to periodontitis în children and young adults. *Periodontology*, 2001; 26 (1): 113-134.
5. El-Shinnawi U., Soory M. Actions of adjunctive nutritional antioxidants în periodontitis and prevalent systemic inflammatory diseases. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2015; 15 (4): 261-76.
6. Trivedi S., Lal N., Mahdi A., Singh B., Pandey S. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes and chronic periodontitis. *Int. J Periodontics Restorative Dent.*, 2015; 35(2): e14-9.
7. Satheesh M., Vijay Ch. The effect of stress on periodontitis. A clinic biochemical study. *J. Indian Soc. Periodontol.*, 2012; 16 (3): 365-9.
8. Iacopino A. Relationship between stress, depression and perio-dontal disease. *JCDA*, 2009; 75 (5): 329-330.
9. Nitu R, Corol D., Toma N. Radicali liberi în sisteme biologice; efectele lor citogenetice. Institutul de Genetică. Universitatea din Bucuresti, Institutul National de C&D pentru Fizică și Inginerie Nucleară „Horia Hulubei". Bucuresti, 2015; p. 17-24.
10. Societatea Științifica Română de Oxigen-Ozonoterapie (SSROOT). 2015. http://www.asociatia-ozonoterapie.ro/.
11. Maier C., Chan P. Role of superoxide dismutases în oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*, 2002; 8 (4): 323-34.
12. Superoxid-dismutaza.https://www.synevo.ro/superoxid-dismutaza/.
13. Regnault C., Soursac M., Roch-Arveiller M., Postaire E., Hazebroucq G. Pharmacokinetics of superoxide dismutase în rats after oral administration. *Biopharm. Drug Dispos.,*1996; 17 (2): 165-74.
14. Vouldoukis I., Conti M., Krauss P. *et al*. Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother. Res.*, 2004; 18 (12): 957-62.
15. Fattman C., Schaefer L., Oury T. Extracellular superoxide dismutase în biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 35 (3): 236-56.
16. Chung J. The role of reactive oxygen species (ROS) în persistent pain. *Mol. Interv*., 2004; 4 (5): 248-50.
17. Bae S., Kim S., Sung M. Inadequate antioxidant nutrient intake and altered plasma antioxidant status of rheumatoid arthritis patients. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003; 22 (4): 311-5.
18. Shin S., Kim J., Chung H., Jeong J. Zingerone as an antioxidant against peroxynitrite. *J. Agric. Food Chem.*, 2005; 53 (19): 7617-22.
19. Seguí J., Gironella M. Sans M. *et al.* Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 76 (3): 537-44.
20. Zawadzka-Bartczak E. Activities of red blood cell anti-oxidative enzymes (SOD, GPx) and total anti-oxidative capacity of serum (TAS) în men with coronary atherosclerosis and în healthy pilots. *Med. Sci. Monit.,* 2005; 11 (9): 440-4.
21. Kiefer D. Superoxide dismutase boosting the body's primary antioxidant defense. *Life Extension Magazine*, June 2006, p. 1-9.
22. Biologie. Lectia 1. 2013, p.1-53. http://media.tvrinfo.ro/media-tvr/other/201304/lectia-1_63165600.pdf
23. Halliwell B. Antioxidants în human health and disease. *Annu. Rev. Nutr*., 1996; 16: 33-50.
24. Pryor W., Squadrito G., Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic. Biol Med.*, 1995; 19 (6): 935-41.
25. Bocci V. Ozone – a new medical drug (2nd edition). Springer, 2011; p. 17-218.
26. Stone J., Collins T. The role of hydrogen peroxide în endothelial proliferative responses. *Endothelium*, 2002; 9: 231-238.
27. Bocci V. Ozone – a new medical drug. (1st edition). *Springer*, 2005; p. 5-250.
28. Barnes P., Karin M. Nuclear factor kappa B: a pivotal transcription factor în chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.,* 1997; 336 (15): 1066-71.
29. Baeuerle P., Henkel T. Function and activation of NF-kB în the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994; 12: 141-79.
30. Rhee S., Bae Y., Lee S., Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE,* 2000; (53): pe1.
31. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger în lymphocyte activation. *Nat. Immunol.*, 2002; 3 (12): 1129-34.
32. Bocci V., Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica,* 1990; 75 (6): 510-5.
33. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone: has ozone therapy a future în medicine? *Br. J. Biomed. Sci.*, 1999; 56 (4): 270-9.
34. Valacchi G., Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: release of factors from ozonated human platelets. *Mediat. Inflamm.,* 1999, 8: 205-209.
35. Bocci V. Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation. *Kluwer Academic Publischer*, 2002; p. 234-440.
36. Viebahn-Hänsler R., León Fernández O., Fahmy Z. Ozone în medicine: the low-dose ozone concept. Guidelines and Treatment, 2012: 408-424.
37. Ekuni D., Battino M., Tomofuji T. Studies on periodontal disease. *Springer,* 2014; p. 6-9.
38. Mendoza-Núñez V., Hernández-Monjaraz B., Santiago-Osorio E., Betancourt-Rule J., Ruiz-Ramos M. Tai Chi exercise increases SOD activity and total antioxidant status în saliva and is linked to an improvement of periodontal disease în the elderly. *Oxid. Med. Cell Longev.,* 2014: 603853.
39. Sang-Chul K., Ok-Su K., Ok-Joon K., Young-Joon K., Hyun-Ju C. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing în periodontal disease. *J. Periodontal Implant Sci.,* 2010; 40 (4): 164-71.
40. Мащенко И. С., Сербиненко Е. В. Определение бактерицидного и антиоксидантного потенциала нейтрофильных гранулоцитов у больных генерализованным пародонтитом. *Современная стоматология*, 2003. № 1, с. 51- 53.
41. Кравец О. Н. Выявление и коррекция нарушений свободнорадикального окисления в ротовой жидкости при хроническом генерализованном пародонтите. Диссертация кандидата медицинских наук. Казань, 2008.
42. Материалы по озонотерапии. Ассоциация российских озонотерапевтов, 2004. http://www.ozonetherapy.ru/tehnologii-ozonoterapii/materialy-po-ozonoterapii/
43. Martínez-Sánchez G., Al-Dalain S., Menéndez S. *et al.* Therapeutic efficacy of ozone în patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, 2005; 523: 151-161.
44. Martınez-Sanchez G., Delgado-Roche L., Dıaz-Batista A. *et al.* Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index în coronary artery disease. *European Journal of Pharmacology*, 2012; 691: 156-162.
45. Leontyeva G. V., Kolesova O. E. Non-specific mechanisms of sanogenic effect of ozone. Moscow, 2002. http://www.ozonterapiklinigi.com/literatur/Rusya%20Ozon%20Birli%C4%9Fi-Proceedings.pdf