

ROLUL MALONDIALDEHIDEI ÎN EVALUAREA STATUSULUI OXIDATIV DIN DEPRECIERILE TERITORIULUI PARODONTAL

Toma Vasilica¹, Goriuc Ancuta¹, Cioloca Daniel¹, Irina Nechifor², Surdu Amelia^{3*}, Maftai George², Foia Liliana¹, Filip Florina⁴

¹ Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa Iași, Facultatea de Medicină Dentară, Departmentul de Chirurgie

² Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa Iași, student doctorand

³ Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa Iași, Facultatea de Medicină Dentară, Departmentul Implantologie, Restaurări amovibile, Tehnologie

⁴ Universitatea de Medicină și Farmacie Grigore T. Popa Iași, Facultatea de Medicină, Departmentul Științe Medicale I

*Autor corespondent:

Surdu Amelia, Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" - Iași, E-mail: amelia.surdu@yahoo.com

THE ROLE OF MALONDIALDEHYDE IN EVALUATION OF THE OXIDATIVE STATUS OF PERIODONTAL IMPAIRMENT (Abstract).

Periodontal disease includes multiple and complex mechanisms that simultaneously encapsulate tissue destruction due to bacterial aggression, as well as exaggerated defense mechanisms of the host, which give rise to multiple contradictions in etiopathogenesis and management of the disease, the oxidative status playing a significant role. Objective. Considering the importance of the pro- and antioxidants balance within periodontal condition, we designed a clinical and biochemical study to estimate the levels of a biomarker of oxidative stress, malondialdehyde - MDA in the gingival fluid (GCF). Material and methods. The assessment has been performed in clinically healthy subjects (n=15) and periodontal patients with chronic periodontitis (n=16) versus aggressive periodontitis (n=11). Being a marker of lipid peroxidation, for all individuals malonyldialdehyde gingival fluid levels has been determined from the isolated supernatant, following centrifugation of crevicular fluid, through colorimetry techniques. Results. The separate MDA assessment displayed statistical significance of the values recorded in patients with chronic periodontitis compared to the group of healthy patients ($p < 0.0001$), but also those with the aggressive form of disease ($p < 0.0001$), without statistically significance between the two types of periodontal impairment. Conclusion. Despite the limitations imposed by the small size of the sample, the results obtained may be relevant, MDA being the only biomarker considered for determination. However, measuring other lipid peroxidation products such as conjugated dienes, volatile hydrocarbonates could shed some light upon the dimension of the pro/antioxidant balance in the development of periodontal impairment.

Keywords: periodontal, gingival fluid, malondialdehyde

INTRODUCERE

Dezvoltarea parodontitei presupune existența mai multor factori asociați, de la susceptibilitatea genetică la infecția bacteriană, răspunsul metabolic sau modificările anatomice la nivelul țesuturilor orale, toate acestea necesitând a fi luate în considerare atunci când diagnosticăm condiția de afecțiune parodontală [1].

Expresia diagnosticului acestei maladii cu natură plurivalentă poate fi realizată prin analiza mai multor parametri biologici, un rol aparte în aprecierea răspunsului metabolic în cadrul procesului activ de boală avându-l markerii tisulari ai țesutului conjunctiv (colagen, proteoglicani, osteocalcina, osteonectina, fibronectina, enzime), mulți

dintre aceștia având o expresie semnificativă la nivelul fluidului crevicular [2].

Lichidul sulcular (GCF), care în mod fiziologic se află într-o cavitate inaparentă, sub formă de transudat, pentru ca în condiții patologice, mediate mai ales prin proces inflamator să fie convertit la exudat, prezintă o serie de roluri, de la cel mecanic, de diluție și spălare a substanțelor din șanțul gingival, până la acela de apărare, realizat prin lizozim, imunoglobuline, peroxidaza, leucocite [3]. Acest rol crește în cazul gingivitelor, lichidul devenind un veritabil exudat inflamator.

Etiopatogenia afectării parodontale este extrem de complexă, reflectând o combinație între inițierea și menținerea inflamației cronice prin diverși factori microbieni cauzali și produșii lor. Aproximativ 20 de specii bacteriene din cele peste 300 care populează cavitatea orală au fost recunoscute ca fiind asociate cu boala parodontală. Germenii orali, precum și produșii lor de metabolism, toxine, celule degradate, pot penetra (mai mult sau mai puțin direct) țesuturile profunde, extinzându-și potențialul de patogenitate la nivel sistemic, îndeosebi la indivizii cu susceptibilitate la boala parodontală [4].

În ultimii câțiva ani, un număr considerabil de studii au examinat diferite aspecte ale răspunsului gazdă în lichidul gingival, inclusiv relația de markeri specifici pentru fazele active ale bolii parodontale [5]. Diferiți indicatori ai răspunsului inflamator acut (enzime lizozomale enzimele beta-glucuronidaza și collagenază, enzima citoplasmatică aspartat aminotransferază, și metabolitul acidului arahidonic - PGE2 – prostaglandina E2) s-au dovedit a fi asociate cu pierderea de atașament clinic la periodontita cronică la adulți și parodontită experimentală în modele animale. În contrast cu aceasta, relația dintre indicatorii răspunsului imun umoral în GCF din cadrul bolii parodontale active este echivocă [6].

Mai mult decât atât, pentru un număr de indicatori ai răspunsului imun celular identificate în ultimii ani în GCF (interleukina-1 alfa, IL-1 beta, factorul de necroză tumorală alfa), este încă necunoscută relația lor în fazele active ale bolii parodontale. Acumularea leucocitelor polimorfonucleare (PMN) este semnul distinctiv celular de inflamație acută.

Dovezile din studiile GCF sugerează că hiperreactivitatea acestor celule joacă un rol critic în fazele active ale unor forme ale bolii parodontale. Activarea metabolică a PMN poate fi asociată cu un număr de reacții cu potențial distructiv [7].

Mecanismul efector major care poate fi identificat în mod specific cu intervenția PMN pentru distrugerea țesutului, este legat de efectul de sinergie cu eliberarea de proteaze PMN și generarea de metaboliți reactivi ai oxigenului de către aceste celule [8]. Amorsarea PMN, în cazul în care răspunsul PMN este sporit de către agenții care nu inițiază răspunsul, poate fi un mecanism important pentru activarea PMN în mediul crevicular; de exemplu, citokine cum ar fi IL-1 beta și TNF-alfa, precum și lipopolizaharide eliberate din bacteriile Gram-negative la nivel subgingival, pot servi această funcție [6].

Boala parodontală este o tulburare inflamatorie în care leziunile tisulare se instalează prin interacțiunile complexe dintre agenții patogeni și componente parodontale ale mecanismului de apărare gazdă [9, 10]. Diagnosticul bolii parodontale a fost bazat în primul rând pe măsurile clinice și radiologice de distrugere a țesutului parodontal, dar, în timp ce acești parametri oferă o măsură de distrugere existent în trecut, ele sunt de utilitate limitată în diagnosticul parodontopatiilor [11]. Fenotipul parodontitelor este caracterizat prin hiperinflamație care implică de altfel eliberarea excesivă de către leucocitele

polimorfonucleare neutrofile a radicalilor liberi ai oxigenului, precum și eliberarea de cantități apreciabile de enzime proteolitice [12].

Există numeroase date din literatură care atestă modificarea statusului oxidativ în cursul parodontitelor, fără însă a exista dovezi clare în ce privește implicarea lor în căile de semnalizare. Stresul oxidativ este o tulburare a statusului homeostatic fiziologic dintr-o celulă, țesut sau organ, definit ca "o condiție care rezultă atunci când există un dezechilibru grav între nivelul radicalilor liberi într-o celulă și apărarea antioxidantă, în favoarea primului" [13]. În sistemele biologice, stresul oxidativ este caracterizat de următorii parametri: creșterea și formarea de specii chimice cu caracter oxidant, scăderea antioxidantilor cu greutate moleculară mică și a celor liposolubili, tulburări ale balanței

redox celulare, alterarea oxidativă a componentelor celulare (biomembrane, proteine, ADN, ARN) [14].

Dintre mediatorii biochimici cu rol semnificativ în algoritmul de apreciere a statusului oxidativ, unele date din literatură sugerează rolul potențial al malondialdehidei - MDA, produs de peroxidare lipidică prezent în mod fiziologic în țesuturi, în resorbția osoasă ce însoțește degradările țesutului parodontal [15]. Malondialdehida este produsul principal al peroxidării acizilor grași polinesaturați, interacționând ulterior cu proteine, peptide, fosfolipide și acizi nucleici și putând astfel indica augmentarea stresului oxidativ [16]. Nivelul TBARS (substanțe reactive la acidul tiobarbituric) este astfel crescut în sângele periferic la pacienții cu parodontită cronică [17].

SCOPUL STUDIULUI

Pornind de la considerentele menționate mai sus precum și o serie de studii care atestă rolul determinant al stresului oxidativ în distrucția țesutului parodontal, mediată la nivelul interacțiunii gazdă-microorganism, am conceput un studiu clinico-biochimic pentru a estima nivelurile unui parametru biochimic al stresului oxidativ (malondialdehida) în fluidul gingival crevicular (GCF) la subiecți clinic sănătoși și pacienți cu alterare parodontală de tip parodontită cronică versus cei cu parodontită agresivă. S-a urmărit în același timp, evaluarea rolului acestuia ca marker de stres oxidativ în alterarea parodontală.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru cercetarea de față am selectat 42 de subiecți, cu vârste cuprinse între 24 și 55 de ani, dintre pacienții atât fără modificări parodontale, dar și cei care au prezentat

semne clinice subiective (prurit gingival, tulburări fizionomice, tulburări masticatorii), sau obiective, ce ar fi putut orienta diagnosticul spre o formă de parodontită marginală cronică sau agresivă (sângerări gingivale, mobilitate dentară, prezența pungilor parodontale, retracție gingivală, migrări dentare). Toți pacienții incluși în studiu au semnat un consimțământ informat scris de aderare la această cercetare.

Pacienții au fost împărțiți în 3 loturi de studiu: lotul A pacienți cu parodontită cronică (n=16), lotul B pacienți cu parodontită agresivă (n=11) și lotul C pacienți sănătoși din punct de vedere parodontal (n=15). În studiul nostru, am folosit ca fluid de analiză, lichidul gingival (GCF), ținând cont de avantajele pe care acesta îl are, comparativ cu analiza de sânge. Probele au fost colectate în cabinetul de medicină dentară, prin metode neagresive, pentru a evita iritațiile mecanice.

În acest scop, am folosit stripuri special de hartie (Periopaper ProFlow Inc,

USA) introduce pentru interval scurt (30 secunde) în sanțul crevicular, interproximal, la nivelul zonelor cu aspect clinic relevant (modificări locale ale consistenței țesutului gingival).

Recoltarea s-a efectuat după evaluarea plăcii bacteriene (îndepărtarea prin periaj profesional a plăcii supragingivale), izolarea de salivă a campului cu comprese și uscarea cu aer a șanțului gingival. Au fost îndepărtate de la analize acele stripuri contaminate cu sânge. Probele au fost descărcate într-un volum de tampon fosfat salin la pH-7,4, și vortexate. Din fluidul gingival solvit în PBS (tampon fosfat salin) s-au realizat eșantioane de câte 100 μ l pentru evaluarea markerilor de stress oxidativ neenzimatici.

Examinarea clinică a țesuturilor parodontale a inclus măsurători și notări a variațiilor de indici de pe suprafețele tuturor dinților exceptând al treilea molar.

Acest compus rezultat în urma peroxidării lipidice (ca și cale alternativă la degradarea prin beta oxidare fiziologică a acizilor grași) poate fi dozat în numeroase probe biologice, motiv pentru care am considerat că ar fi relevant determinarea valorii acesteia și la nivelul fluidului crevicular, ca expresie a peroxidării lipidice la nivel parodontal, în parodontitele agresive comparativ cu parodontitele cronice.

Malonildialdehida a fost determinată prin tehnici de colorimetrie din supernatantul izolat consecutiv centrifugării fluidului crevicular, prin metoda descrisă de Wallin și colaboratorii [18]. Analiza statistică a datelor s-a realizat cu ajutorul unui program software (SPSS Inc, versiunea 17.1, Chicago, IL, USA), valorile $p < 0,05$ fiind considerate semnificative statistic.

REZULTATE

Evaluarea pacienților luați în studiu relevă următoarele: dintre pacienții studiați 26% au fost diagnosticați cu parodontită agresivă, 38 % cu parodontită cronică iar 38% nu au prezentat afectare parodontală, aceștia fiind luați în studiu drept martori în evaluarea ulterioară a stresului oxidativ.

Într-o primă etapă am făcut o comparație între pacienții cu parodontită agresivă și cei cu parodontită cronică, urmărind câți dintre aceștia au prezentat factori favorizanți instalării bolii parodontale. Dintre subiecții selectați, 11 au fost bărbați iar un număr egal au fost femei. Dintre cei cu afectare parodontală prin parodontită cronică sau agresivă 8 au fost de gen masculin, iar 6 de gen feminin.

O examinare parodontală atentă este de importanță critică în activitatea de colectare a datelor, necesară pentru a se ajunge la un diagnostic și pentru a crea un plan de tratament. La nivelul cavității bucale au fost analizate: statusul gingival efectuat cu sonda parodontală OMS, determinând cele 4 unități gingivale (mezial, distal, vestibular și lingual), urmărind prezența sângerărilor, a fenomenelor inflamatorii de la nivelul gingiilor, precum și prezența simptomelor caracteristice ale bolii parodontale: sângerarea, recesiunea și prezența pungilor parodontale, prezența mobilității dentare și extinderea tartrului.

Rezultatele acestui studiu au indicat că și din punctul de vedere al gradului de igienă orală, datele indică la lotul studiat o medie a indicelui de placă de $34,96 \pm 6,72$, cu o valoare maximă foarte ridicată de 65.20 % și o medie a indicelui de tartru de $34.21 \pm 5,78$ și aici valoarea maximă fiind de 60.57%. Ambele valori maxime au fost înregistrate la pacienți provenind din mediul rural.

Tabel 1. Valorile medii ale parametrilor clinici în loturile de studiu

Parametrul	Valoarea minimă	Valoarea maximă	Deviația standard	Coeficientul de variație-%
Vârsta	24	55	10,72	114,94
Indicele de placă (%)	8,9	65,2	21,27	452,72
Indicele de tartru (%)	7,9	60,57	18,28	334,28
Indicele de sângerare (%)	30,12	85,6	18,29	334,87
Indicele gingival	1,13	2,78	0,49	0,25

Analiza statistică a indicilor de afectare parodontală a arătat o corelație puternică din punct de vedere statistic între aceștia, majoritatea pacienților prezentând la înrolarea în studiu sângerări, dureri sau tulburări fizionomice. Tulburările fizionomice au predominat în perioada de vârstă 30-49 de ani, îndeosebi la pacientele de sex feminin, consecutiv retracției gingivale.

Vârsta de la care persoanele fizice prezintă pierderi de atașament în unul sau mai multe situsuri începând de la 10% până la 50% au fost examinate în cadrul fiecărui

subgrup. Dintre modalitățile de explorare, cel mai sensibil test de diagnosticare pentru detectarea parodontitei este măsurarea prin sondaj a pierderii de atașament. În cazul pacienților incluși în studiu, am analizat prevalența și gradul de pierdere de atașament parodontal (recesiune gingivală, adâncimea pungilor parodontale), în cazul pacienților cu parodontită agresivă, identificându-se existența unei relații directe a afecțiunii cu prevalența tartrului dentar. Analiza indicilor parodontali este ilustrată în tabelul 2.

Tabel 2. Indicatorii procentuali în cazul subiecților cu recesiune gingivală

Prevalența	Lot parodontită cronică	Lot parodontită agresivă
$\geq 1 \text{ mm}$	41%	22%
$\geq 2 \text{ mm}$	30%	36,5%
$\geq 3 \text{ mm}$	14,7%	23,1%
$\geq 4 \text{ mm}$	11,3%	11,5%
$\geq 5 \text{ mm}$	2%	6,9%

Analiza separată a valorilor malonildialdehidei în lotul pacienților cu parodontită cronică în testul SPSS, reprezentată în figura 1, a arătat semnificație

statistică a valorilor înregistrate la pacienții cu parodontită cronică în comparație cu lotul pacienților sănătoși ($p < 0.0001$), dar și a celor cu formă agresivă de boală ($p < 0.0001$), fără a înregistra semnificație statistică între cele două tipuri de alterare parodontală.

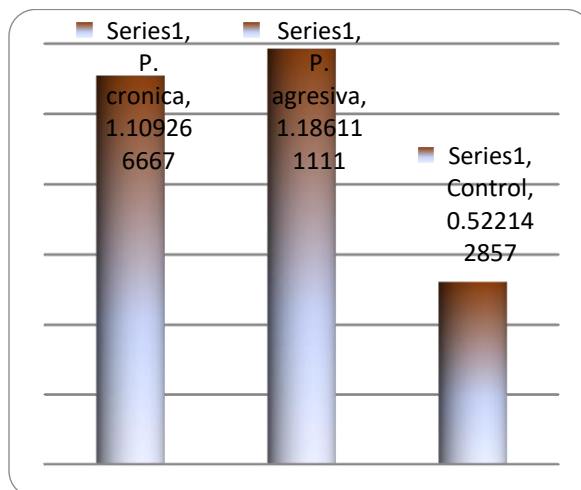


Figura 1. Valorile medii ale concentrației milimolare de MDA în GCF la loturile de pacienți cu alterare parodontală față de lotul control

DISCUȚII

Speciile reactive (ROS) sunt fără doar și poate o verigă importantă în medierea alterărilor din bolile inflamatorii la nivel parodontal (Baltacioglu et al, 2014). [19]. În ce măsură acumularea de ROS contribuie la creșterea gradului de recesiune, precum și mecanismele de semnalizare prin care celule precum monocitele controlează și modulează generarea de radical superoxid în cadrul fagocitozei normale, rămâne de stabilit [20]. Fragmente de ADN rezultate în urma acțiunii ROS asupra lanțurilor ADN reprezintă antigenul preferat pentru anticorpii umani anti ADN.

Importanța radicalilor liberi poate fi înțeleasă numai prin cunoașterea rolului lor. Radicalii liberi apar în anumite reacții de oxido-reducere în care au loc modificări

structurale mari, de pe urma cărora substanța respectivă își schimbă adesea funcția biologică (devine mai hidrosolubilă sau intervine în alt lanț de reacții metabolice) [21].

Prin formarea radicalilor liberi au loc modificări structurale rapide, schimbări funcționale permitând implicarea lor în reacții multiple [22]. Pe cale evolutivă, natura a selectat și înglobat în componenta organismelor, reacții generatoare de radicali liberi, cu roluri multiple: funcționale, de comunicare intercelulară sau distructive, citolitice.

Moștenirea susceptibilității la parodontită agresivă sau cronică este probabil insuficientă pentru dezvoltarea bolii: expunerea la mediu la potențialii agenți patogeni cu factori de virulență specifică este un pas necesar [23]. Incapacitatea gazdei de a

'negocia'' agresiunea bacteriană și de a evita daunele inflamației tisulare duce la inițierea procesului bolii.

Există date din literatură care sugerează conceptul potrivit căruia activitatea antioxidantă locală scăzută din fluidul crevicular este mai degrabă consecința inflamației parodontale, mai curând decât să predisună la aceasta, având în vedere că terapia tradițională, nonchirurgicală, axată pe îndepărtarea factorilor favorizanți precum placa bacteriană și reducerea procesului inflamator [24] și astfel restabilește nivelul capacității antioxidante totale din fluidul crevicular la valori comparabile cu cele ale indivizilor fără alterare orală [25].

Sistemul imun este primul afectat de stresul oxidativ. Mai mult, datorită structurii bogate în acizi grași nesaturați, membranele celulare își pot pierde integritatea prin peroxidare, cu modificarea ulterioară a fluidității membranare și apariția alterărilor în semnalizarea intracelulară [26]. Boala parodontală agresivă este asociată în mare măsură nu doar cu răspuns imun exagerat, ci așa cum reiese din prezentul studiu, și cu un nivel semnificativ al stressului oxidativ.

Țintind investigarea unuia dintre mediatorii statusului oxidativ de tip nonenzimatic în fluidul gingival la pacienții cu parodontită cronică versus pacienți cu parodontită agresivă și cei sănătoși din punct de vedere parodontal, studiul nostru a putut releva diferențe între loturile analizate, cu semnificație statistică în special la cei cu parodontită agresivă, mai puțin la cei cu parodontită cronică în comparație cu lotul martor.

Datele noastre sunt în acord cu alte cercetări din literatură, care atestă idea că stresul oxidativ reprezintă un factor important

în patogeneza parodontitei, la un nivel înalt semnificativ în fluidul crevicular gingival (GCF) la pacienții cu parodontită, comparativ cu persoanele fără alterare în teritoriile de suport ale unităților dentare [27]. Având în vedere rolul pe care îl îndeplinesc radicalii liberi, statusul antioxidant al țesutului sănătos poate ajuta limitarea afectării sau distrucției tisulare. Neutrofilele sunt celulele inflamatorii predominante din interiorul țesuturilor parodontale afectate și, prin urmare, eliberarea enzimelor lizozomale ale acestora și generarea de specii reactive ale oxigenului sunt considerate ca fiind factorii predominanți în etiologia leziunilor țesuturilor locale.

Astfel, gama largă de valori înregistrate la pacienții sănătoși și cu parodontită ar putea fi măcar în parte explicate prin diferențele de activitate a bolii și fluxul de lichid crevicular, precum și de variațiile în numărul de polimorfonucleare neutrofile care migrează în șanțul gingival exprimat consecutiv instalării procesului inflamator.

CONCLUZII

Cu toate limitările impuse de dimensiunea mică a eșantionului de studiu, rezultatele obținute pot fi relevante, cercetarea unui număr semnificativ de probe aducând fără îndoială date suplimentare. MDA a fost singurul biomarker luat în acest studiu deoarece este produsul principal de peroxidare a lipidelor; totuși, măsurarea altor produse de peroxidare a lipidelor, cum ar fi dienele conjugate, hidrocarburile volatile ar putea întări și dimensiona implicațiile balanței pro-/antioxidanți în dezvoltarea alterărilor din ariile parodontale.

BIBLIOGRAFIE

1. Srinath R, Acharya AB, Thakur SL. Salivary and gingival crevicular melatonin in Periodontal health and disease. J Periodontol. 2010;81(2):277–83.
2. Armitage GC. Development of a classification system for Periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4(1):1–6.
3. Foia L, Toma V, Ungureanu D, Aanei C, Costuleanu M. Binomul diabet zaharat – boală parodontală factori etiologici și de risc. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2007; 3(3): 748-753.
4. Foia L, Pinteala T, Forna D, Cioloca Holban C, Chiriac AE. Inferior lip spinocellular carcinoma – etiologic factors – novel etiologic aspects - case report. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. 2014. 6(4): 111-113.
5. Nănescu S, Mârțu S, Ciomaga G, Toma V, Forna D, Foia L. Dual effects of flavonoids on dyslipidemia and periodontal disease. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. 2011; 3(4): 38-45.
6. Foia L, Toma V, Ungureanu D, Zlei M, Indrei A, Forna D, Filip F, Nanescu S. Evaluation of oral injuries in experimental induced diabetes by analysis of some gingival fluid markers. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. 2008; 112(4):1066-71.
7. Toma V, Filip F, Forna D, Trandafirescu M, Profire L, Foia L. Proinflammatory cytokines profile within gingival fluid in a young diabetic group. Medicina Stomatologică. 2010; 3(16): 19-21.
8. Checherita L, Brezilian C, Forna D, Stamatin O, Ioanid N, Foia L. Neuromuscular disabilities in patients diagnosed with algo-dysfunctional syndrome. Romanian Journal of Oral Rehabilitation. 2012; 4(2): 60-66.
9. Martin M, Maciac M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin induced increased activity of the respiratory chain complexes 1 and 4 can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vitro. J Pineal Res. 2000; 28:242–48.
10. Elattar TM. In vitro metabolism studies of (1,2,6,7-3-H) cortisol in human gingiva in health and disease. Steroids. 1975;25(3):355–64.
11. Shimozuma M, Tokuyama R, Tatehara S, Umeki H, Ide S, Mishima K, et al. Expression and cellular localization of melatonin synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. Histochem Cell Biol. 2011;135(4):389–96.
12. Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U, Ozcan G. Effect of initial periodontal therapy on oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva, and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. J. Periodontol. 2015. 86, 273–282.
13. Singh N, Chander Narula S, Kumar Sharma R, Tewari S, Kumar Sehgal P. Vitamin E supplementation, superoxide dismutase status, and outcome of scaling and root planing in patients with chronic periodontitis: A randomized clinical trial. J Periodontol. 2014; 85:242–9.
14. Verma PK, Raina R, Sultana M, Singh M, Kumar P. Total antioxidant and oxidant status of plasma and renal tissue of cisplatin-induced nephrotoxic rats: protection by floral extracts of *Calendula officinalis*. Linn. Ren. Fail. 2016; 38: 142–150.
15. Tanideh N, Jamshidzadeh A, Sepehrimanesh M, Hosseinzadeh M, Koochi-Hosseiniabadi O, Najibi A. et al. Healing acceleration of acetic acid-induced colitis by marigold (*Calendula officinalis*) in male rats. Saudi J. Gastroenterol. 2016; 22: 50–56.
16. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2005; 15:316–28.
17. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: A meta-analysis. Dis Markers [Article on the Internet] 2014. Article ID 931083.
18. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. Anal Biochem. 1993; 208:10–15.
19. Baltacioglu E, Yuva P, Aydin G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? J. Periodontol. 2014; 85: 1432–1441.
20. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 301:H2181–H2190.
21. Fischer M, Gransier TJM, Beckers LMG, Bekers O, Bast A, Haenen G. Determination of the antioxidant capacity in blood. Clin Chem Lab Med. 2005; 43:735–740.
22. Nosarev AV, Smaglyi LV, Anfinogenova Y, Popov SV, Kapilevich LV. Exercise and NO production: relevance and implications in the cardiopulmonary system. Front Cell Dev Biol. 2014; 2:73.
23. Powers SK, Talbert EE, Adhihetty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. J Physiol. 2011; 589:2129–2138.

24. Jówko E, Długołęcka B, Makaruk B, Cieśliński I. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur J Nutr.* 2015; 54(5):783–91.
25. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 90:7915–22.
26. Choe Y, Yu JY, Son YO, Park SM, Kim JG, Shi X et al. Continuously generated H₂O₂ stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 2012; 113, 1426–1436.
27. Akalin FA, Baltacıoglu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2007; 34: 558–565.