

Evaluation of bacterial metabolic products in saliva after ozone treatment on the basis of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) – own investigations

Ocena produktów metabolizmu bakteryjnego w ślinie po zabiegu ozonoterapii na podstawie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) – badania własne

Lidia Pijankowska-Beksa¹, Anna Fabiańska², Barbara Pacholczyk-Sienicka², Stefan Jankowski², Joanna Szczepańska¹

¹ Katedra i Zakład Stomatologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska
Chair and Department of Paediatric Dentistry, Medical University of Lodz, Poland
Head: prof. dr hab. J. Szczepańska

² Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska
Institute of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Lodz, Poland
Head: dr inż. Ł. Albrecht

Abstract

Introduction. The presence of 'Streptococcus mutans' is considered to be the main cause of carious lesions. Ozone has, among others, antibacterial and remineralisation potential. Pyruvic acid, produced by cariogenic bacteria, is degraded by ozone to carbon dioxide and acetate or other organic acids of high pKa. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) can determine the character and degree of oxidation of organic substances placed in the magnetic field. It is becoming more widely available as a diagnostic technique, and is used in the chemical analysis of various body fluids such as urine, serum, plasma, cerebrospinal fluid, bile, seminal fluid, saliva, sweat, tears and amniotic fluid. **Aim of the study.** To identify metabolites characteristic of saliva, to determine the connection between changes of its chemical composition and applied ozone therapy, and to assess the effectiveness of the said therapy in the treatment of dental caries. **Material and methods.** The saliva of patients undergoing ozone therapy (twenty-four children aged 6-8) was examined by NMR. Before the procedure, the state of the deciduous and permanent

Streszczenie

Wprowadzenie. Obecność bakterii *Streptococcus mutans* uznawana jest za główną przyczynę powstawania ubytków próchnicowych. Ozon posiada m.in. właściwości przeciwbakteryjne i remineralizujące. Kwas pirogronowy produkowany przez bakterie kariogenne jest rozkładany pod wpływem ozonu do dwutlenku węgla i octanu lub innych kwasów organicznych o wysokim pKa. W celu określenia charakteru i stopnia utleniania substancji organicznych stosuje się magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), który techniką uniwersalną, umożliwia badanie umieszczonych w polu magnetycznym próbek ciekłych, stałych i gazowych. Obrazowanie metodą NMR jest coraz powszechniej dostępną techniką diagnostyczną i znajduje zastosowanie w chemicznej analizie także wielu płynów ustrojowych, w tym śliny. **Cel pracy.** Celem podjętych badań było określenie metabolitów charakterystycznych dla śliny i powiązania zmian jej składu chemicznego z zastosowaną terapią ozonem oraz ocena efektywności ozonoterapii w leczeniu próchnicy. **Materiał i metoda.** Badania laboratoryjne produktów metabolizmu bakterii w ślinie

KEYWORDS:

dental caries, saliva, dental ozone therapy, Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

HASŁA INDEKSOWE:

próchnica, ślina, ozonoterapia, magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)



teeth was assessed, as well as oral hygiene. After ozone treatment and topical fluoridation, the resting mixed saliva was collected from patients at four time points. The saliva samples were then evaluated for the presence of glucose, pyruvate, acetate, and formate using NMR. The results were statistically analyzed.

Results. The conducted studies showed a decrease in the signal intensity of glucose and pyruvate in saliva after the application of ozone. The average concentration of glucose was 0.311 mM before the treatment, 0.172 mM after the ozone treatment, 0.113 mM after 15 minutes and 0.105 mM after 30 minutes. The average concentration of pyruvate was 0.113 mM before surgery, 0.082 mM immediately afterwards, 0.066 mM after 15 minutes, and 0.054 mM after 30. In the case of acetate and formate, the results were not identical with measurements under *in vitro* conditions.

Conclusions. NMR spectroscopy provides an insight into the nature and extent of oxidation of chemical compounds contained in saliva after the application of ozone in the prophylactic treatment within the oral cavity.

Introduction

Despite significant progress in preventive dentistry, tooth decay remains one of the most common diseases, causing irreversible changes within the masticatory system. The presence of *Streptococcus mutans* is considered to be the main cause of cavities, and the majority of preventive treatments are carried out with intent to eliminate bacteria or to inhibit their virulence, by neutralizing acids produced as a result of the fermentation of *S. mutans* carbohydrates.¹

Ozone has aroused great interest in recent years due its wide spectrum of antibacterial effects and the fact that approximately 99% of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*² can be eliminated by its application lasting as short as 10 seconds. The construction of bacterial cells makes them exceptionally susceptible to ozone. The negative electric charge on the bacteria attracts bipolar gas molecules with a positive electric charge. The cell membrane of bacteria suffers from absence of cholesterol which protects it from the oxidative properties of ozone. Atomic oxygen formed from the breakdown of ozone

przeprowadzono u 24 dzieci w wieku 6-8 lat. Przed zabiegiem określano stan zębów mlecznych i stałych oraz higieny jamy ustnej. Po przeprowadzeniu zabiegów ozonoterapii, a następnie fluoryzacji kontaktowej pobierano od pacjentów spoczynkową ślinę mieszaną w czterech punktach czasowych. Następnie próbki śliny oceniano pod kątem obecności glukozy, pirogronianu, octanu i mrówczanu z wykorzystaniem NMR. Wyniki badań poddano analizie statystycznej.

Wyniki. W prowadzonych badaniach uzyskano zmniejszenie intensywności sygnału glukozy oraz pirogronianu w ślinie po zastosowaniu ozonu. Średnie stężenie glukozy przed zabiegiem wynosiło 0,311 mM, zaraz po ozonoterapii 0,172 mM i następnie po 15 i 30 minutach odpowiednio: 0,113 i 0,105 mM. Wyjściowo średnie stężenie pirogronianu wynosiło 0,113 mM, bezpośrednio po zabiegu 0,082 mM i następnie spadło do 0,066 mM i 0,054 mM. W przypadku octanu i mrówczanu wyniki nie były tożsame z pomiarami w warunkach *in vitro*. **Podsumowanie.** Zastosowanie spektroskopii NMR pozwala określić rodzaj i zakres utleniania związków chemicznych zawartych w ślinie po zastosowaniu ozonu w zabiegach profilaktycznych w jamie ustnej.

Wstęp

Pomimo znacznych postępów w stomatologii prewencyjnej, próchnica nadal pozostaje jedną z najczęstszych chorób występujących u ludzi, powodując nieodwracalne zmiany w zakresie narządu żucia. Obecność bakterii *Streptococcus mutans* uznawana jest za główną przyczynę powstawania ubytków próchnicowych, a celem większości zabiegów profilaktycznych obecnie stosowanych jest eliminacja bakterii lub zahamowanie ich zjadliwości, poprzez neutralizację kwasów wytwarzanych przez *S. mutans* w procesie fermentacji węglowodanów.¹

Ze względu na właściwości zainteresowanie ozonem w ostatnich latach wzrosło. Gaz ten posiada szerokie spektrum przeciwbakteryjne i już 10-sekundowa aplikacja powoduje 99% eliminację bakterii *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*.² Budowa komórek bakteryjnych sprawia, że są one wrażliwe na działanie ozonu. Ujemny ładunek elektryczny bakterii przyciąga bipolarną cząsteczkę gazu z dodatnim ładunkiem elektrycznym. Błona komórkowa bakterii nie posiada cholesterolu chroniącego przed utleniają-



reacts with unsaturated fatty acids, phospholipids and proteins, leading to the almost immediate destruction of microorganisms.^{3,4}

In addition, isolated studies have shown that ozone has remineralizing properties. Pyruvic acid produced by cariogenic bacteria significantly contributes to lowering the pH in the oral cavity. It has been proven that under the influence of ozone, pyruvic acid is decomposed to carbon dioxide and acetate or other organic acids with high pKa values, leading to impairment or even destruction of the ecological niche required for the development of cariogenic bacteria. Ozone oxidizes the organic matter which has been changed by dental caries, enabling faster incorporation of calcium, phosphate and fluoride into the structure of the enamel.^{5,6}

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) can be used to determine the nature and degree of oxidation of organic substances.⁷ It has previously been used to determine the structures of chemical compounds and biomolecules, and has recently become increasingly popular in metabolomic studies. Metabolomics is the branch of science involved in the exploration of changes in metabolic profile and in identifying markers that appear at the onset of disease in the cells, tissues, and body fluids that arise as a result of various chemical reactions. NMR, a universal technique of examining liquid, solid and gas samples placed in a magnetic field, is becoming more and more commonly available as a diagnostic technique.^{8,9} Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy enables the concentration of any given substance in the test area to be evaluated, and for metabolite levels to be measured. In addition, NMR is used in the chemical analysis of body fluids such as urine, serum, plasma, cerebrospinal fluid, bile, seminal fluid, sweat, tears, amniotic fluid, and saliva.¹⁰⁻¹³

The aim of the study

The aim of the study was to perform a quantitative and qualitative *in vivo* evaluation by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of the oxidative effect of ozone on organic compounds present in human saliva favouring the development of dental caries.

cymi właściwościami ozonu. Tlen atomowy, powstały z rozpadu ozonu, reaguje z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, fosfolipidami i białkami, prowadząc prawie do natychmiastowej destrukcji mikroorganizmów.^{3,4}

Poza tym, nieliczne badania dowodzą, że ozon posiada właściwości remineralizujące. Kwas pirogronowy produkowany przez bakterie kariogenne znacząco przyczynia się do obniżenia pH w jamie ustnej. Wykazano, że pod wpływem ozonu kwas ten rozkładany jest do dwutlenku węgla i octanu lub innych kwasów organicznych o wysokim pKa. W ten sposób niszczone jest kwaśna nisza ekologiczna niezbędna do rozwoju bakterii próchnicotwórczych. Ozon, utleniając substancje organiczne zmiany próchnicowej, umożliwia szybsze wbudowanie jonów wapniowych, fosforanowych oraz fluorkowych w strukturę szkliwa.^{5,6}

W celu określenia charakteru i stopnia utleniania substancji organicznych stosuje się magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR).⁷ Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego stosowana dotąd głównie do określania struktury związków chemicznych oraz biocząsteczek znajduje ostatnio coraz szersze zastosowanie w badaniach metabolomicznych. Metabolomika jest nauką zajmującą się poszukiwaniem zmian w profilu metabolicznym i określeniem markerów pojawiających się w momencie zapoczątkowania choroby w komórkach, tkankach oraz płynach ustrojowych, które powstają w wyniku różnych reakcji chemicznych. NMR jest techniką uniwersalną, umożliwiającą badanie umieszczonych w polu magnetycznym próbek ciekłych, stałych i gazowych. Obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) jest coraz powszechniej dostępną techniką diagnostyczną.^{8,9} Protonowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwia badanie poziomu metabolitu i określenie stężenia danej substancji w badanym obszarze. Ponadto technika NMR znajduje zastosowanie w chemicznej analizie płynów ustrojowych, takich jak: mocz, surowica, osocze, płyn mózgowo-rdzeniowy, żółć, płyn nasenny, pot, łzy, płyn owodniowy, a także ślina.¹⁰⁻¹³



Materials and methods

Characteristics of the study group

Laboratory tests were performed on the saliva of patients undergoing ozone therapy (24 children aged 6-8 years) who reported to the Department of Developmental Age Dentistry, Medical University of Lodz in 2013-2014. In all the children, before ozonation of the first permanent molars, the state of the deciduous and permanent teeth was determined and the state of oral hygiene evaluated using the OHI by *Greene* and *Vermillion*. The DMF and DMFT indices were calculated for each child.

The DIAGNOdent pen 2190 (KaVo, Poland) laser device was used to evaluate the condition of the teeth, together with a standard visual-tactile scale. Before examination, the subjects underwent tooth cleaning with a brush on a slow handpiece. After thorough drying, advancement and severity of caries were assessed with tip A, designed for testing occlusal surfaces. The evaluation was made by observing the occlusal surfaces of teeth without fillings and without the presence of a fissure sealant. The tip of the device was brought towards the tooth so that the beam was perpendicular to its long axis. The highest value indicated by the device was noted on the patient's card.

To interpret the results, the Hibst and Paulus scale was used, covering four ranges of values:

(0-13) – no need to carry out preventive actions,

(14-20) – the need to perform intensified preventive treatments by the patient at home,

(21-29) – the need to implement professional preventive treatments or minimal dentistry intervention depending on the risk factors for development of dental caries.

(> 30) – dental intervention required, as well as professional preventive treatments.¹⁴

Clinical evaluation of the teeth was performed using dental mirrors and a blunt probe. Fissures were categorized as carious if a lesion characteristic of the destruction of hard dental tooth structure was discovered. Fissures were evaluated according to the DIAGNOdent scale with one modification: in the case when a DIAGNOdent value over 30 was found but visible changes were assessed as initial or arrested caries (chalk-white or brown

Cel pracy

Celem pracy była ilościowa i jakościowa ocena w warunkach *in vivo* utleniającego wpływu ozonu na obecne w ślinie ludzkiej związki organiczne predysponujące do rozwoju próchnicy z zastosowaniem techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Material i metoda

Charakterystyka grupy badanej

Badania laboratoryjne śliny pacjentów poddawanych zabiegowi ozonoterapii przeprowadzono w grupie 24 dzieci w wieku 6-8 lat zgłaszających się do Zakładu Stomatologii Wieków Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2013-2014. Przed przystąpieniem do ozonowania pierwszych stałych zębów trzonowych u wszystkich dzieci wykonano badania wstępne, gdzie określano stan zębów mlecznych i stałych oraz stan higieny jamy ustnej za pomocą wskaźnika OHI wg *Greene'a* i *Vermilliona*. Dla każdego dziecka obliczono wskaźnik puw, puwp, PUW oraz PUWp.

Do oceny stanu zębów wykorzystano urządzenie laserowe DIAGNOdent pen 2190 firmy KaVo oraz standardową skalę wizualno-dotykową po uprzednim oczyszczeniu zębów szczoteczką profilaktyczną na mikrosilnik. Po dokładnym osuszeniu oceniano zaawansowanie ogniska próchnicowego za pomocą końcówki A, przeznaczonej do badania powierzchni żujących. Oceny dokonywano na powierzchniach okluzyjnych zębów bez wypełnień oraz bez obecności laku szczelinowego. Końcówkę urządzenia zbliżano do zęba w taki sposób, aby wiązka promieniowania była prostopadła do długiej osi zęba. W karcie pacjenta odnotowano najwyższą wartość wskazaną przez urządzenie.

Do interpretacji wyników posłużono się skalą Hibsta i Paulusa, obejmującą 4 przedziały wartości:

(0-13) – brak konieczności przeprowadzania zabiegów profilaktycznych,

(14-20) – potrzeba wykonywania zintensyfikowanych zabiegów profilaktycznych przez pacjenta w domu,

(21-29) – konieczność wdrożenia profesjonalnych zabiegów profilaktycznych lub minimalnej



stain, without interrupting the continuity of enamel) during clinical examination, the tooth was determined as only requiring observation during the following check-up, after 3, 6 and 12 months or, in special cases, more frequently.

Children and their caregivers were given individual oral hygiene instructions, both during every check-up and directly before ozone therapy. The parents were familiarized with the plan of the study, and were given written information regarding therapy and the importance of oral cavity hygiene, proper diet and prevention and treatment methods. Lastly, they were asked to complete a questionnaire. The results of the tests were noted in the clinical study tab of own design.

Sampling and their preparation for testing

Resting mixed saliva was obtained from 24 children (12 girls and 12 boys) between 9:00 AM and 11:00 AM. In the period preceding the collection of saliva, patient's behavior did not differ from previous hygiene and dietary habits. The saliva was collected into polypropylene tubes at four points in time: the first marked **P** (taken before surgery), the second marked as **N** (taken immediately after surgery), the third marked as **15** (taken 15 minutes after surgery), and the fourth as **30** (taken 30 minutes after surgery). The samples were transported in ice, on the same day, to the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of the Institute of Organic Chemistry, Technical University of Lodz.

The OzonyTron (Mymed) was utilized for ozone treatment using an open system with a CA-caries tip and an attached ground electrode. Ozone was applied locally, and the time and intensity of treatment was determined individually for each patient by the surgeon based on an inductive table developed and provided by the manufacturer. Ozone emission on the surface lasted roughly 30 to 120 seconds for each tooth. The average concentration of ozone was administered, followed by local application of Fluor Protector paint (Ivoclar Vivadent Poland).

Measurement of ^1H NMR spectra

All ^1H NMR spectra were collected with

interwencji stomatologicznej w zależności od czynników ryzyka rozwoju próchnicy,

(>30) – wymagana interwencja stomatologiczna jak również wykonanie profesjonalnych zabiegów profilaktycznych.¹⁴

Klinicznej oceny stanu zębów dokonywano przy użyciu lusterka stomatologicznego i tępego zgłębnika. Bruzdy uznawano za objęte procesem próchnicowym, gdy wykryto zmianę charakteryzującą się destrukcją tkanek twardych zęba. Do obowiązującej oceny bruzd wg skali DIAGNOdentu wprowadzono pewną modyfikację własną. W przypadku, gdy za pomocą DIAGNOdentu odnotowano wartość powyżej 30 jednostek, jednak w badaniu klinicznym zmianę kwalifikowano do próchnicy początkowej lub zatrzymanej (kredowo-biała lub brunatna plama bez przerwania ciągłości szkliwa), wówczas ząb oznaczano jako wymagający jedynie obserwacji na kolejnej wizycie kontrolnej, przeprowadzanej po 3, 6 i 12 miesiącach, a w wybranych przypadkach częściej.

Wśród dzieci i ich opiekunów przeprowadzono także, przed zabiegiem ozonoterapii oraz podczas każdej wizyty kontrolnej, indywidualny instruktaż higieny jamy ustnej. Rodziców zapoznano z planem badań, wyjaśniono oraz przekazano pisemną informację na temat przeprowadzanego zabiegu, zwrócono uwagę na istotność przestrzegania higieny jamy ustnej i właściwej diety, uświadamiano o znaczeniu podjętych działań profilaktyczno-leczniczych oraz poproszono o uzupełnienie ankiety. Wyniki badań odnotowano w karcie badania klinicznego własnego projektu.

Pobieranie próbek i ich przygotowanie do badania

Mieszana ślinę spoczynkową uzyskano od 24 dzieci (12 dziewczynek i 12 chłopców) pomiędzy godziną 9.00 a 11.00. W okresie poprzedzającym zbieranie śliny zachowanie pacjenta nie różniło się od dotychczasowych nawyków higieniczno-żywnościowych. Ślinę pobierano do polipropylenowych probówek w czterech punktach czasowych: pierwszy oznaczony jako **P** – próbka pobrana przed zabiegiem, drugi oznaczony jako **N** – próbka pobrana bezpośrednio po zabiegu,

the use of a 700 MHz Bruker Avance II Plus spectrometer equipped with a 5 mm Z-gradient broadband decoupling inverse probe. The standard proton spectra with water presaturation (zgpr pulse program, Bruker) were acquired over a spectral width of 0-10 ppm at 25°C. The relaxation delay enabling a return to the equilibrium state d1 was 3 seconds. There were 256 scans, collecting 64 K data points in acquisition time AQ = 2.3 s with the total experiment time for each sample was 23 min. 3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionic acid sodium salt (TSP) was used for calibration of chemical shifts and determining concentrations of glucose, pyruvate, acetate, and formate.¹⁵ Samples were prepared by mixing 0.5 ml saliva (after centrifugation) with 0.1 ml deuterium oxide with TSP-d₄.

Statistical Analysis

The results were subjected to statistical analysis. The method used was statistical inference based on χ^2 ANOVA test of Friedman ranks.

Results

Figure 1 shows the ¹H NMR spectrum recor-

trzeći oznaczony jako **15** – próbka pobrana 15 min po zabiegu oraz czwarty **30** – próbka pobrana 30 min po zabiegu. Próbkę były transportowane w lodzie tego samego dnia do Pracowni Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Instytutu Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej.

Do zabiegu ozonoterapii wykorzystano urządzenie OzonyTron firmy Mymed, emitujące ozon w systemie otwartym za pomocą końcówki CA-caries z dołączoną elektrodą uziemiającą. Ozon była aplikowany miejscowo, a czas oraz intensywność zabiegu ustalał lekarz indywidualnie w procesie leczenia dla każdego pacjenta na podstawie tabeli indukcyjnej opracowanej przez producenta. Emisja ozonu trwała od 30 do 120 sekund na powierzchnię zęba, stosując średnią koncentrację ozonu, a następnie stosowano miejscową aplikację preparatu fluorkowego Fluor Protector.

Pomiary NMR

Widma ¹H NMR zostały zarejestrowane za pomocą spektrometru NMR Bruker Avance II Plus 700 MHz wyposażonego w szerokopasmową sondę gradientową typu „inverse” z gradientem w osi Z. Standardowe widma protonowe z presaturacją

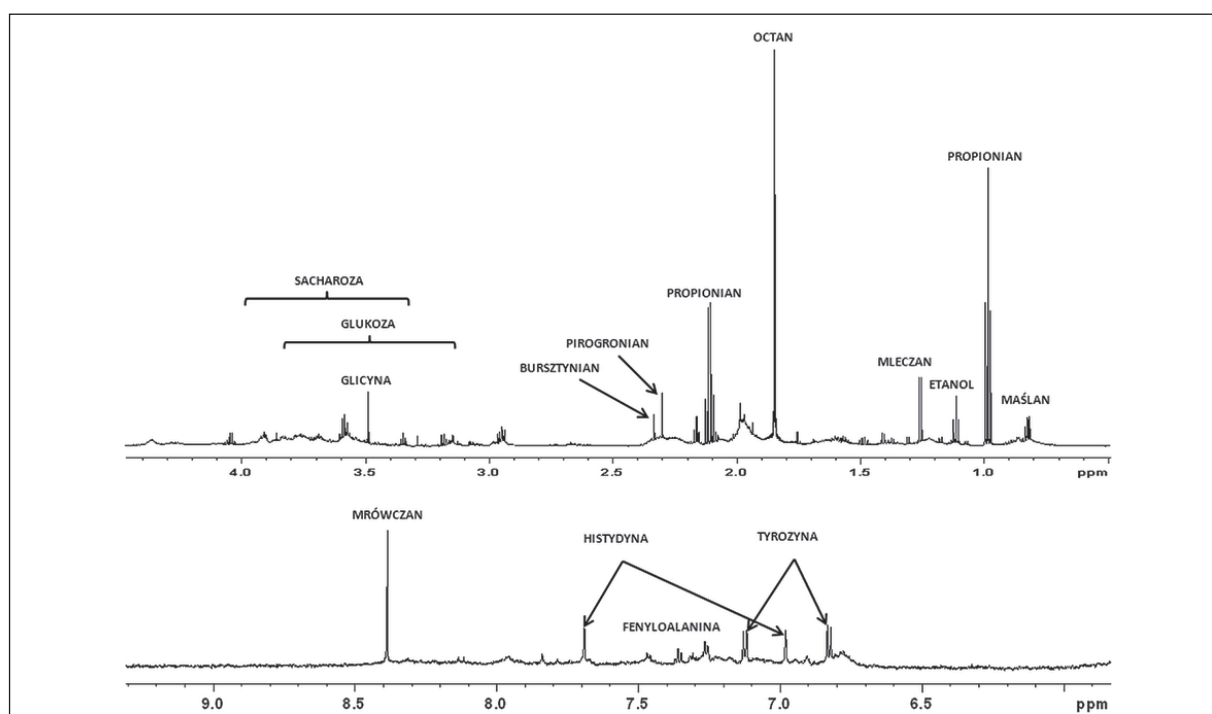


Fig. 1. ¹H NMR spectrum for saliva sample immediately after ozone treatment (700MHz).

Widmo ¹H NMR zarejestrowane dla próbki śliny bezpośrednio po ozonowaniu (700 MHz).

Table 1. Assessment of statistical significance between pairs of glucose samples taken at various time points

Comparison of pairs of mean glucose values from four time points	n	Value of Z statistics according to Wilcoxon regarding ranks of differences for the pairs	p
Glucose P & Glucose N	24	2.442857	0.014572
Glucose P & Glucose 15	24	4.2	0.000027
Glucose P & Glucose 30	24	3.914286	0.000091
Glucose N & Glucose 15	24	2.114286	0.034492
Glucose N & Glucose 30	24	2.114286	0.034492
Glucose 15 & Glucose 30	20	0.485325	0.627446

Table 2. Assessment of statistical significances between pairs of pyruvate samples taken at various time points

Comparison of pairs of average pyruvate values from four time points	n	Value of Z statistics according to Wilcoxon regarding ranks of differences for the pairs	p
Pyruvate P & Pyruvate N	24	0.457143	0.647569
Pyruvate P & Pyruvate 15	24	2.6	0.009323
Pyruvate P & Pyruvate 30	24	3.8	0.000145
Pyruvate N & Pyruvate 15	24	3	0.0027
Pyruvate N & Pyruvate 30	24	3.428571	0.000607
Pyruvate 15 & Pyruvate 30	24	2.014286	0.04398

Table 3. Assessment of statistical significances between pairs of acetate samples taken at various time points

Comparison of pairs of average acetate values from four time points	n	Value of Z statistics according to Wilcoxon regarding ranks of differences for the pairs	p
Acetate P & Acetate N	24	3	0.0027
Acetate P & Acetate 15	24	2.771429	0.005581
Acetate P & Acetate 30	24	3.257143	0.001126
Acetate N & Acetate 15	24	1.828571	0.067465
Acetate N & Acetate 30	24	1.971429	0.048676
Acetate 15 & Acetate 30	24	1.8	0.071862

ded for a saliva sample immediately after ozone administration (700 MHz). The changes in signal intensity of various compounds (glucose, pyruvate, acetate, and formate) in human saliva before and after ozone treatment, measured with NMR

wody ^1H NMR (sekwencja zgpr, Bruker) zostały wykonane w zakresie spektralnym od 0-10 ppm w temperaturze 25°C. Czas opóźnienia relaksacyjnego umożliwiający powrót obserwowanego układu spinów do stanu podstawowego d1 wyno-



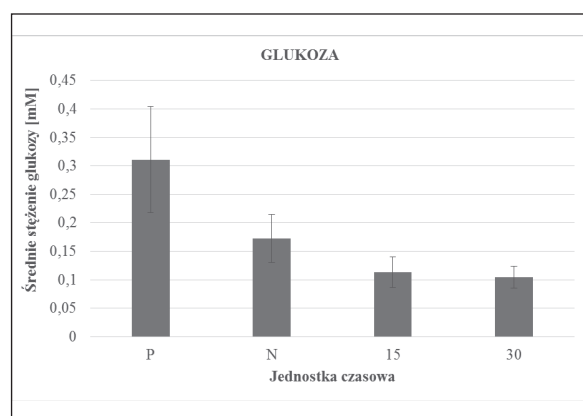


Fig. 2. Average concentration of glucose measured with NMR at four time points after ozone treatment (vertical axis – average glucose amount, horizontal axis – time scale)

Średnie stężenie glukozy badane metodą NMR w czterech punktach czasowych od zabiegu ozonoterapii.

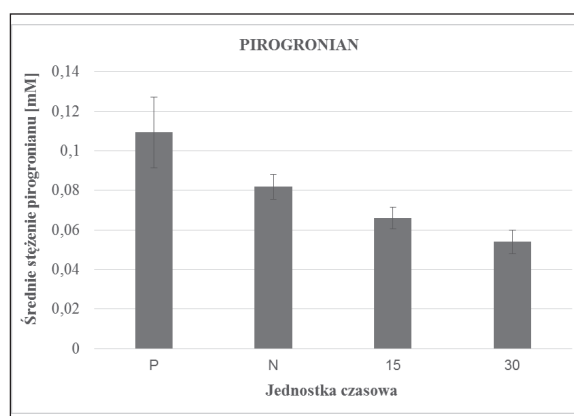


Fig. 3. Average concentration of pyruvate measured with NMR at four time points after ozone treatment (vertical axis – average pyruvate amount, horizontal axis – time scale)

Średnie stężenie pirogronianu badane metodą NMR w czterech punktach czasowych od zabiegu ozonoterapii.

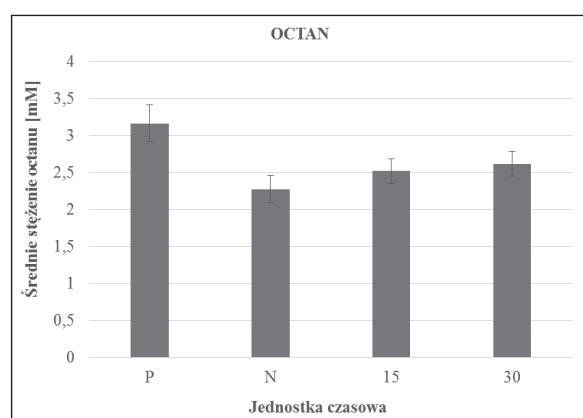


Fig. 4. Average concentration of acetate measured with NMR at four time points after ozone treatment (vertical axis – average acetate amount, horizontal axis – time scale)

Średnie stężenie octanu badane metodą NMR w czterech punktach czasowych od zabiegu ozonoterapii.

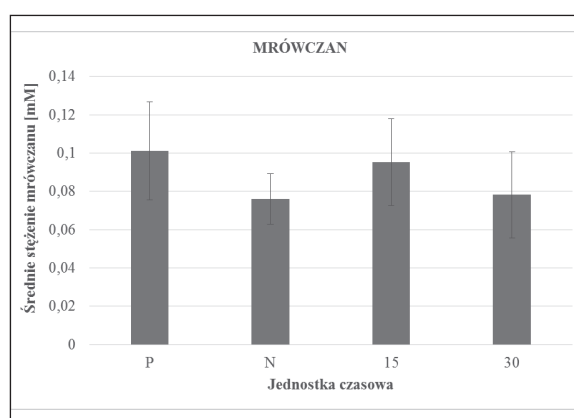


Fig. 5. Average concentration of formate measured with NMR at four time points after ozone treatment (vertical axis – average formate amount, horizontal axis – time scale)

Średnie stężenie mrówczanu badane metodą NMR w czterech punktach czasowych od zabiegu ozonoterapii.

spectroscopy, are illustrated by figures 2, 3, 4 and 5. A comparison of the metabolites detected in saliva at various time points after ozone application is presented in Tables 1, 2 and 3.

The mean concentration of glucose in saliva was 0.311 mM prior to treatment, 0.172 mM immediately after treatment, 0.113 mM after 15 minutes and 0.105 mM after 30 minutes (Fig. 2). The significance of the differences between the mean values of the four treatment groups (P, N, 15 and 30) was evaluated using the ANOVA test with

sił 3 s. Zastosowano 256 cykli pomiarowych po impulsie o częstotliwości radiowej w celu otrzymania odpowiedniego stosunku sygnał/szum. Czas zbierania danych po impulsie o częstotliwości radiowej, tj. czas akwizycji AQ = 2,3 s, natomiast całkowity czas pomiaru pojedynczej próbki wynosił 23 min. Do kalibracji przesunięć chemicznych oraz oznaczania stężeń glukozy, pirogronianu, octanu oraz mrówczanu zastosowana została sól sodowa kwasu trimetylosilo-2,2,3,3-tetradeuteropropionowego (TSP).¹⁵ Analizie poddano 0,5 ml śliny

Friedman ranks. Post-hoc multiple comparisons by Dunette revealed significant differences between samples for glucose ($p=0.00000$). Statistically significant differences in glucose level were noted between all compared pairs, with the exception of that between samples 15 and 30 (Table 1).

The greatest differences in signal intensities between the samples were obtained for pyruvate: 0.113 mM at baseline, 0.082 mM immediately after surgery, 0.066 mM after 15 minutes and 0.054 mM after 30 (Fig. 3). Significant differences in pyruvate concentration were found between all pairs apart from between samples P and N (Table 2).

The average level of acetate was 3.165 mM before surgery, 2.277 mM immediately after, 2.519 mM after 15 minutes, and 2,621 mM after 30 (Fig. 4). Significant differences were found between P and N, P and 15, P and 30, and N and 30, while no significant differences were noted between samples N and 15, and samples 15 and 30 (Table 3).

In the case of formate, no significant differences were noted between any samples ($p=0.46768$). The signal intensity of formate was 0.101 mM before treatment, 0.076 mM immediately after treatment, 0.095 mM after 15 minutes, and 0.078 mM after 30 minutes (Fig. 5).

No significant relationships were found regarding gender and signal intensity. Also, with regard to caries intensity and oral hygiene indicators: dmft, dmft, DMF, DMFT and OHI, it was found that the signal intensity of acetate 30 minutes after treatment elevated in cases where the surface DMF was higher. Children with higher DMF and DMFT values demonstrated significantly higher glucose concentrations before therapy, and 15 and 30 minutes afterwards. Children with good oral hygiene (measured with OHI) demonstrated lower levels of pyruvate in saliva collected immediately after treatment than in children with poorer OHI scores.

Statistical analysis also included survey questions about children's health, health awareness, eating habits and lifestyle in conjunction with obtained concentrations values of tested chemical compounds. Statistically significant differences

(po uprzednim odwirowaniu) do której dodano 0,1 ml roztworu D_2O z TSP- d_4 .

Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wykorzystano wnioskowanie statystyczne oparte na teście χ^2 Anova rang Friedmana.

Wyniki

Rycina 1 przedstawia widmo 1H NMR zarejestrowane dla próbki śliny bezpośrednio po ozonowaniu (700 MHz) (Fig. 1). Wyniki badań dotyczące zmian intensywności sygnału związków chemicznych (glukozy, pirogronianu, octanu i mrówczanu) w ślinie ludzkiej przed i po ozonowaniu za pomocą spektroskopii NMR ilustrują ryciny 2, 3, 4, 5. Porównanie par stężeń metabolitów wykrywanych w ślinie w poszczególnych punktach czasowych po miejscowej aplikacji ozonu przedstawiają tabele 1, 2 i 3.

Badając zawartość glukozy w ślinie przed zabiegiem średnie stężenie tego związku chemicznego wynosiło 0,311 mM, zaraz po ozonoterapii 0,172 mM i następnie po 15 i 30 minutach odpowiednio: 0,113 i 0,105 mM (Fig. 2). Za pomocą testu ANOVA rang Friedmana oceniano, czy rozważane wartości przeciętne w czterech porównywanych grupach: P, N, 15, 30 różnią się w sposób istotny statystycznie. Dla glukozy uzyskano poziom istotności $p=0,00000$, zatem następnie za pomocą testu post-hoc porównań wielokrotnych Dunetta określono różnice istotne statystycznie. W niniejszych badaniach dla glukozy uzyskano różnice istotne statystycznie dla wszystkich porównywanych par, poza stężeniem glukozy po 15 minutach od aplikacji ozonu w porównaniu z próbka śliny otrzymaną po 30 minutach (Tab. 1).

Największe różnice w intensywności sygnału pomiędzy próbkami uzyskano dla pirogronianu. Wyjściowo średnie stężenie wynosiło 0,113 mM, bezpośrednio po zabiegu 0,082 mM i następnie spadło do 0,066 mM i 0,054 mM (Fig. 3). Porównując zawartość pirogronianu w czasie przebiegu badań różnic istotnych statystycznie nie uzyskano jedynie pomiędzy śliną pobraną przed zabiegiem a otrzymaną natychmiast po zabezpieczeniu powierzchni zgrzyzowych (Tab. 2).

were obtained between acetate values in sample 15 and the frequency of sweet consumption during the day, as well as between the concentration of salivary glucose in sample 15 and the presence of a snacking habit after evening tooth brushing.

Discussion

Caries on occlusal surfaces of newly erupted molars still presents a considerable challenge for dentists. This condition is primarily attributed to the increased susceptibility of the immature enamel fissures of permanent teeth to demineralization processes caused by organic acids, such as lactic acid and pyruvic acid, produced by bacteria, mainly *Streptococcus mutans*. A reduction in calorie intake, local application of fluoride medicines and elimination of the microbial flora contributes to preventing the development of carious lesions.¹⁶ However, another method of reducing the level of bacteria in the mouth is ozone therapy. Ozone (O₃) exerts potent antimicrobial properties against cariogenic microorganisms and other pathogens, which may significantly affect the formation and development of dental caries.¹⁷ By reacting with the unsaturated fatty acids constructing the cell membrane, ozone radically destroys bacteria, viruses and fungi in a very short time, thus preventing the formation of resistance. Therefore, the application of ozone in dental surgeries can serve as a viable, cost-effective, simple and convenient way of treating tooth decay, which supports conventional treatments that are currently widely used.⁷

Many studies have evaluated the effectiveness of ozone in oxidation of bacterial metabolites using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. However, these focus on the use of O₃ *in vitro*. By contrast, the present study determines the concentration of glucose and its metabolic products characteristic to human saliva after ozone therapy *in vivo*, via saliva collection from patients before and after ozone treatment of the occlusal surfaces of their first permanent molars.

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy is a technique that offers many advantages and is an alternative to labour-intensive and time-consuming analytical methods, enabling quick and non-

Średnia zawartość octanu przed zabiegiem wynosiła 3,165 mM, natychmiast po 2,277 mM, 15 minut od ozonoterapii wzrosła do 2,519 mM i 30 minut od zabiegu podwyższyła się do 2,621 mM (Fig. 4). Znamienne statystycznie okazały się analizy danych pomiędzy parami próbek octanu: P a N, P a 15, P a 30, N a 30, natomiast nieistotne statystycznie były różnice w stężeniach octanu pomiędzy próbkami pobranymi natychmiast po zabiegu i w odstępie 15 minut od zastosowania gazu oraz w parze 15 i 30 minut od ozonoterapii (Tab. 3).

W przypadku mrówczanu cztery wartości w poszczególnych przedziałach czasowych nie różniły się w sposób istotny statystycznie pomiędzy sobą ($p=0,46768$), dlatego nie sprawdzano zależności pomiędzy stężeniami średnich wartości tego związku. Intensywność sygnału mrówczanu przed zabiegiem wynosiła 0,101 mM, natychmiast po zabiegu 0,076 mM, po 15 minutach otrzymano 0,095 mM i po 30 minutach ponownie spadła do 0,078 mM (Fig. 5).

Analizując zależność między płcią a intensywnością sygnału badanych związków organicznych nie uzyskano różnic istotnie statystycznych. Oceniano również wpływ intensywności próchnicy i higieny jamy ustnej (puw, puwp, PUW, PUWp oraz OHI) na stężenie badanych związków. Stwierdzono, że im puw powierzchniowe było wyższe, tym intensywność sygnału octanu po 30 minutach od zabiegu była wyższa. Wyższymi wartościami PUW oraz PUWp odpowiadały istotnie wyższe stężenia glukozy przed ozonoterapią, po 15 oraz 30 minutach od zastosowania gazu. U dzieci z dobrym stanem higieny jamy ustnej, ocenianym za pomocą wskaźnika OHI, obserwowano niższą zawartość pirogronianu w ślinie pobranej natychmiast po ozonowaniu w porównaniu do próbek uzyskanych od osób z wyższymi wartościami tego wskaźnika.

Analizą statystyczną objęto również pytania ankietowe dotyczące stanu zdrowia dzieci, świadomości prozdrowotnej, nawyków żywieniowych oraz stylu życia w połączeniu z uzyskanymi stężeniami badanych związków chemicznych. Różnice istotne statystycznie otrzymano w zawartości octanu 15 w powiązaniu z częstością spożywania słodczy w ciągu dnia oraz zależność pomiędzy



invasive identification of many of the ingredients present in bioliquids with precise determination of their concentrations. High-resolution ^1H NMR spectroscopy provides valuable information on the breakdown of biomolecules and is a unique contribution to the analysis of biological processes and the functioning of the human body.¹⁸ This technique has revealed the interaction of ozone with organic compounds contained in human saliva. Decarboxylation of pyruvate by O_3 serves as an important example of its cariostatic properties. Pyruvic acid is a proton donor ($K_a = 3.20 \text{ mM}$), and is much more reactive than lactic acid ($K_a = 0.14 \text{ mM}$), and therefore may play an important role in the initiation process of demineralization of the teeth. According to an *in vitro* study, pyruvate is oxidized into acetate and CO_2 . Lactate is converted into pyruvate, which is an intermediate product, which then also degraded to acetate and carbon dioxide. Greater formate concentrations are associated with oxidative damage to carbohydrates such as glucose, sucrose and fructose.^{7,13,19}

Silwood et al.¹⁹, Chang et al.⁷ and Grootveld et al.¹³ report a high degree of decarboxylation of pyruvic acid under the influence of ozone acetate and carbon dioxide. Reduced pyruvate signal intensities were accompanied by increased acetate concentrations, while the decline in blood glucose resulted in an increase in formate. Our own results indicate a reduction of pyruvate and glucose signal intensity after using ozone in a clinical setting, but in the case of acetate and formate, the results were not consistent with those of other *in vitro* studies. In the present *in vivo* study, acetate content significantly decreased immediately after ozoning, yet rose again 15 minutes later. In the case of formate, differences in the average concentration between samples were not significant.

It should be noted, however, that the above experiments were carried out in different environments. Silwood et al.¹⁹ and Grootveld et al.¹³ conducted their studies *in vitro*, where non-stimulated human saliva was obtained from 12 patients, collected into test tubes and then centrifuged. Following this, 2.5-milliliter samples of purified saliva were treated with a

stężeniem glukozy w ślinie również pobranej po 15 minutach a istnieniem nawyku pojadania po wieczornym myciu zębów.

Dyskusja

Próchnica powierzchni żujących nowo wyrżniętych zębów trzonowych stanowi nadal ogromne wyzwanie dla lekarza dentysty. Stan ten przypisywany jest przede wszystkim zwiększonej podatności niedojrzałego szkliwa bruzd zębów stałych na procesy demineralizacyjne powodowane przez kwasy organiczne (np. kwas mlekowy i kwas pirogroonowy) wytwarzane przez bakterie, głównie *Streptococcus mutans*. Zmniejszenie podaży węglowodanów, miejscowe zastosowanie preparatów fluorkowych oraz eliminacja flory bakteryjnej przyczyniają się do zatrzymania rozwoju zmiany próchnicowej.¹⁶ Jednym ze sposobów obniżenia poziomu liczebności bakterii w jamie ustnej jest ozonoterapia. Ozon (O_3) wywiera silne działanie bakteriobójcze wobec drobnoustrojów próchnicotwórczych i innych patogenów, co może istotnie wpływać na powstawanie i zahamowanie rozwoju procesu próchnicowego.¹⁷ W reakcji z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi błony komórkowej ozon niszczy radykalnie bakterie, wirusy i grzyby w bardzo krótkim czasie, tym samym zapobiegając powstawaniu oporności. Zatem zastosowanie ozonu w gabinetach stomatologicznych może służyć jako trwały, oszczędny, prosty i wygodny sposób leczenia próchnicy zębów, wspomagający konwencjonalne metody leczenia, które aktualnie powszechnie są stosowane.⁷

Ocena efektywności ozonu w utlenianiu metabolitów bakteryjnych przy zastosowaniu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego została wykazana w publikacjach wielu autorów. Jednak dotychczasowe doniesienia przedstawiają wyniki badań wykorzystujących O_3 w warunkach *in vitro*. W niniejszej pracy określano stężenie glukozy i produktów jej metabolizmu charakterystycznych dla ludzkiej śliny po zabiegu ozonoterapii w warunkach *in vivo*, pobieranej od pacjentów przed i po ozonowaniu powierzchni zgryzowych pierwszych stałych zębów trzonowych.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jest techniką, która ma wiele zalet. Stanowi

HealOzone ozone disinfectant for 10 seconds, which corresponds to providing 4.484 mmol of oxidant. However, Chang et al.⁷ studied the effect of ozone on aqueous solutions of sodium pyruvate, α -glucose and also using the same batch of saliva, the generator and the time and concentration of applied gas as Silwood et al. and Grootveld et al.. The authors note that their results were not surprising considering the large amounts of ozone used, although the effectiveness of the gas can be limited by its solubility in water, which affects the rate and level of dissociation of compounds binding to O₃.

The intention of the present study was to evaluate the effect of ozone on the organic compounds found in saliva without specification of test conditions. From an ethical point of view, it is difficult to require school children to refrain from eating foods that might interfere in the analysis of saliva samples. It is also possible to assess the effectiveness of ozone regardless of hygienic-dietary habits and acquire the most reliable results of standard clinical procedures using ozone therapy. Relationships were observed between dmft, DMF, DMFT, OHI and frequency of carbohydrate intake, the presence of snacking following tooth brushing and the signal intensity of the tested chemical compounds. However, according to Grootveld and Silwood²⁰, patients recruited to participate in the study should completely abstain from any activities within the oral cavity (such as eating, drinking, brushing teeth and rinsing the mouth) for at least four hours prior to sample collection to avoid disturbances in measurements.

As demonstrated, NMR significantly contributes to evaluating the interaction of multiple biomolecules with ozone in human saliva. The presence of some discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies suggests that larger studies based on a higher number of samples from more subjects are required to obtain fully reliable results. It also seems important to develop standards of conduct when collecting saliva for NMR analysis.

Conclusions

1. NMR spectroscopy enables determining the nature and extent of oxidation of chemical

alternatywę dla pracochłonnych i czasochłonnych metod analitycznych, umożliwiając szybką i nieinwazyjną identyfikację wielu składników obecnych w biopłynach z dokładnym określeniem ich stężeń. Wysokiej rozdzielczości spektroskopia ¹H NMR dostarcza wielu cennych informacji dotyczących rozpadu biomolekuł i stanowi unikalny wkład w analizę procesów biologicznych oraz funkcjonowanie ludzkiego organizmu.¹⁸ Stosując tę technikę wykazano interakcję ozonu ze związkami organicznymi zawartymi w ludzkiej ślinie. Dekarboksylacja pirogronianu przez O₃ służy jako ważny przykład znaczących właściwości kariostatycznych tego gazu. Kwas pirogronowy jest potężnym donorem protonu (K_a=3,20 mM) i jest znacznie bardziej reaktywny niż kwas mlekowy (K_a=0,14 mM), zatem może odgrywać istotną rolę w inicjacji procesu demineralizacji zębów. Zgodnie z prowadzonymi badaniami *in vitro*, pirogronian utleniany jest do octanu i CO₂. Mleczan przekształcany jest do pirogronianu, będącego produktem pośrednim, który następnie również rozkłada się do octanu i dwutlenku węgla. Natomiast wzrost stężenia mrówczanu związany jest z oksydacyjnym uszkodzeniem węglowodanów, takich jak glukoza, sacharoza i fruktoza.^{7,13,19}

Badania Silwood i wsp.,¹⁹ Chang i wsp.,⁷ Grootveld i wsp.¹³ wykazały znaczny stopień dekarboksylacji kwasu pirogronowego pod wpływem ozonu do octanu i dwutlenku węgla. Zmniejszeniu intensywności sygnału pirogronianu towarzyszył wzrost stężenia octanu, natomiast spadek stężenia glukozy skutkowało wzrostem mrówczanu. Zgodnie z założeniami, w prowadzonych badaniach własnych, zaobserwowano zmniejszenie intensywności sygnału pirogronianu oraz glukozy po zastosowaniu ozonoterapii w warunkach klinicznych, jednak w przypadku octanu i mrówczanu wyniki nie były zgodne z innymi badaniami, z tym że przeprowadzonymi w warunkach *in vitro*. W obecnych badaniach *in vivo* bezpośrednio po ozonoterapii zawartość octanu znacznie zmalała, jednak w 15 minut od zabiegu obserwowano ponowny wzrost sygnału tego związku. W przypadku mrówczanu różnice w średnim stężeniu pomiędzy poszczególnymi prób-



- compounds contained in the saliva following ozone application.
2. Examination by NMR spectroscopy confirmed the therapeutic properties of ozone as a cariostatic agent.
 3. The environment of the oral cavity is the site of many complex biochemical processes and the effectiveness of ozone depends on the composition and characteristics of an individual's saliva.
 4. Ozone therapy can be a modern alternative serving as an adjunct to traditional preventive-conservative procedures.

kami nie były znaczące. Należy jednak nadmienić, iż ww. doświadczenia prowadzone były w różnych środowiskach. *Silwood* i wsp.,¹⁹ *Grootveld* i wsp.¹³ prowadzili badania w warunkach *in vitro*, gdzie niestymulowaną ludzką ślinę pobierano od 12 pacjentów do probówek i następnie wirowano. 2,5-mililitrowe próbki oczyszczonej śliny poddawano działaniu ozonu z urządzenia HealOzone w czasie 10 sekund, co odpowiada dostarczeniu 4,484 mmol tego utleniacza. Z kolei *Chang* i wsp.⁷ badali wpływ ozonu na wodne roztwory pirogronianu sodu i α -glukozy również z zastosowaniem tej samej porcji śliny, generatora oraz czasu i stężenia aplikowanego gazu jak *Silwood* i wsp. oraz *Grootveld* i wsp. Jak donoszą sami badacze, otrzymane przez nich wyniki nie były zaskakujące z uwagi na duży nadmiar zastosowanego ozonu, chociaż skuteczność zastosowanego stężenia gazu może być ograniczana rozpuszczalnością ozonu w wodzie, co wpływa na wydajność i poziom dysocjacji związków wiążących O_3 .

Zamysłem autorów powyższej pracy była ocena wpływu ozonu na związki organiczne znajdujące się w ślinie bez specyfikacji warunków badania. Z etycznego punktu widzenia trudno jest wymagać, aby dzieci w wieku wczesnoszkolnym do godzin południowych powstrzymywały się od spożywania pokarmów, które mogłyby wywoływać zakłócenia w analizie próbek śliny. Jednocześnie dzięki temu można ocenić skuteczność ozonu niezależnie od nawyków higieniczno-żywnościowych oraz uzyskać możliwie najbardziej wiarygodne wyniki dla standardowego postępowania klinicznego wykorzystującego terapię ozonem. Zgodnie z powyższymi założeniami zaobserwowano zależność między wartościami wskaźników: puwp, PUW, PUWp, OHI oraz częstością spożywania węglowodanów i obecnością nawyku pojadania po wieczornym myciu zębów a intensywnością sygnału badanych związków chemicznych. Jednak zdaniem *Grootveld* i *Silwood*²⁰ pacjenci rekrutowani do badań powinni całkowicie powstrzymać się od wszystkich działań w obrębie jamy ustnej (jedzenie, picie, szczotkowanie zębów, płukanie jamy ustnej itp.) przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem próbki śliny, aby uniknąć zaburzeń pomiarów.



Jak wykazano, technika NMR wnosi wiele w zakresie oceny wieloskładnikowych interakcji ozonu z biomolekułami ludzkiej śliny. Uzyskane pewne rozbieżności pomiędzy badaniami *in vivo* a *in vitro* sugerują, że powinny być prowadzone pomiary próbek większej liczby pacjentów, aby uzyskać w pełni wiarygodne wyniki. Istotnym wydaje się również opracowanie standardów postępowania przy pobieraniu śliny do analizy NMR.

Podsumowanie

1. Zastosowanie spektroskopii NMR pozwala określić rodzaj i zakres utleniania związków chemicznych zawartych w ślinie po zastosowaniu ozonu.
2. Badanie spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego potwierdza terapeutyczne właściwości ozonu w aspekcie kariostatycznym.
3. Środowisko jamy ustnej jest miejscem, gdzie zachodzą równocześnie skomplikowane procesy biochemiczne, a efektywność ozonoterapii zależy od osobniczego składu i właściwości śliny.
4. Ozonoterapia może być nowoczesną alternatywą wspomagającą tradycyjne postępowanie profilaktyczno-zachowawcze.

References

1. Barira I, Shahper NK, Asad UK: Dental caries: From infection to prevention. *Med Sci Monit* 2007, 13: 196-203.
2. Stübinger S, Sader R, Filippi A: The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: A review. *Quintessence Int* 2006, 37: 353-359.
3. Schneider HG: Skuteczność zależy od tego, czy uda nam się pokonać bariery dyfuzji. *Twój Prz Stomatol* 2006; 4: 50-51.
4. Kogut A: Ozonoterapia w praktyce stomatologicznej. *Mag Stomatol* 2007; 9: 112-118.
5. Lynch E: Comment on "The application of Ozone in dentistry: A systematic review of the literature". *J Dent* 2009; 37: 406-410.
6. Stefański T, Słota A, Siedlok M, Sikorska D, Stadnicki P, Wysoczańska-Jankowicz I, et al.: Ozonoterapia i miejscowe stosowanie fluorków w leczeniu próchnicy początkowej bruzd w zębach stałych – 6-miesięczne badania kliniczne. *Dent Med Probl* 2012; 49: 237-246.
7. Chang H, Lynch E, Grootveld M: Oxidative consumption of oral biomolecules by therapeutically-relevant doses of ozone. *ACES* 2012; 2: 238-245.
8. Sitter B, Bathen TF, Tessem MB, Gribbestad IS: High-resolution magic angle spinning (HR MAS) MR spectroscopy in metabolic characterization of human cancer. *J Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2009; 54: 239-254.
9. Pacholczyk B, Fabiańska A, Kusińska R, Potemski P, Kordek R, Jankowski S: Analysis of cancer tissues by means of spectroscopic methods. *Współcz Onkol* 2012; 16: 290-294.



10. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al.: Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007; 2: 2692-2703.
11. Kolokolova TN, Savel'ev OY, Sergeev NM, Shpigun OA, Sokolov KV, Skvortsova VI: Nuclear magnetic resonance spectroscopy in solving the analytical problems of medicine: Analysis of cerebrospinal fluid. *J Anal Chem* 2010; 65: 1073-1081.
12. Chang H, Silwood CJ, Lynch E, Grootveld M: High-resolution ¹H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by oral rinse peroxides. *Acta Odontol Scand* 2013; 71: 223-235.
13. Grootveld M, Silwood CJ, Lynch E: High resolution ¹H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by ozone: relevance to the therapeutic applications of this agent in clinical dentistry. *Biofactors* 2006; 27: 5-18.
14. Skomro P: Współczesna diagnostyka laserowa w ocenie zaburzeń mineralizacji na powierzchniach gładkich zębów u pacjentów po leczeniu stałym aparatem otodontycznym. *Implantoprotetyka* 2008; 4: 47-49
15. Sjobakk TE, Johansen R, Bathen TF, Sonnewald U, Juul R, Torp SH, et al.: Characterization of brain metastases using high-resolution magic angle spinning MRS. *NMR Biomed* 2008; 21: 175-185.
16. Składnik-Jankowska J, Ziętek M, Malicka B, Gmyrek-Marciniak A: Ocena skuteczności ozonu w leczeniu próchnicy na powierzchniach żujących zębów. *Ann Acad Med Stet* 2007; 53 (Suppl. 3): 131-136.
17. Baysan A, Lynch E: The use of ozone in dentistry and medicine. Part 2. Ozone and root caries. *Prim Dent Care* 2006; 13: 37-41.
18. Mikkonen JJW, Herrala M, Soininen P, Lappalainen R, Tjäderhane, Seitsalo H, et al.: Metabolic profiling of saliva in patients with primary Sjögren's syndrome. *Metabolomics* 2013; 3: 128: 10.4172/2153-0769.100012.
19. Silwood CJ, Lynch E, Claxson AW, Grootveld MC: ¹H and (¹³C) NMR spectroscopic analysis of human saliva. *J Dent Res* 2002; 81: 422-427.
20. Grootveld M, Silwood CJ: ¹H NMR analysis as a diagnostic probe for human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1-5.

Address: 92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
Tel.: +4842 6757516
e-mail: joanna.szczepanska@umed.lodz.pl

Received: 20th May 2015
Accepted: 16 August 2015

