

## Influence of oxidative stress on functional-morphological changes in dental pulp

### Wpływ stresu oksydacyjnego na zmiany czynnościowo-morfologiczne w miazdze zęba

Wioletta Dyduch-Dudek, Joanna Zarzecka

Katedra Stomatologii Zachowawczej z Endodoncją, Instytut Stomatologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, Polska

Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Dental Institute, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Collegium Medicum in Cracow, Poland

Head: prof. J. Zarzecka

#### Abstract

Reactive oxygen species play a key role in the basic biological processes taking place in the human body. However, the excessive activity of these molecules, together with concomitant oxidative stress, impairs the morphological-functional functions of the system, including a negative impact on dental pulp. These processes lead to oxidation of the proteins and lipids present in the matrix cells of dental pulp. As a result of changes, many cells may lose, or change, their biological functions. The cells most prone to such changes are odontoblasts and fibroblasts in the endodontium. Changes in the structure of collagen and non-collagen proteins not only disrupt connective tissue homeostasis, but also impair defensive reactions when dental pulp trauma, or inflammation, occur. Blood vessels and nerves are also damaged. As a result, this can lead to lesions in the dentine-pulp complex, trigger pulpitis and accelerate tissue aging in the endodontium. However, the body possesses defence mechanisms that protect against exposure to oxygen free radicals. The enzymatic anti-oxidative protection offered by saliva is of great importance here.

#### Streszczenie

Reaktywne formy tlenu odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Nadmierna aktywność tych cząstek i związany z tym stres oksydacyjny przyczynia się jednak do upośledzenia funkcji morfologiczno-czynnościowych ustroju, w tym również działa negatywnie na miazgę zęba. W wyniku tych procesów następuje utlenianie białek i lipidów będących składnikami komórek macierzy miazgi. W wyniku zachodzących zmian wiele komórek może stracić lub zmienić swoje funkcje biologiczne. Głównie narażone na te zmiany są odontoblasty i fibroblasty endodontium. Zmiany w budowie białek kolagenowych, jak i niekolagenowych wpływają nie tylko na zaburzenie homeostazy tkanki łącznej, ale również na upośledzenie reakcji obronnych w przypadku urazu miazgi lub rozwijających się procesów zapalnych. Uszkodzeniu ulegają również naczynia krwionośne i nerwy. W efekcie mogą prowadzić do zmian chorobowych w obrębie kompleksu miazgowo-zębionowego i powodują rozwój stanów zapalnych miazgi i przyspieszanie procesów starzenia tkanek w obrębie endodontium. W organizmie istnieją jednak mechanizmy obronne chroniące przed ekspozycją na wolne rodniki tlenowe, gdzie duże znaczenie ma enzymatyczna ochrona antyoksydacyjna śliny.

#### KEYWORDS:

oxidative stress, dental pulp, free radical, inflammation

#### HASŁA INDEKSOWE:

stres oksydacyjny, miazga, wolny rodnik, zapalenie

## Introduction

Oxygen is one of the most important elements needed for life on Earth. It is used in numerous biochemical processes in the human body. The reaction of oxygen with molecules leads to changes in the level of oxidation in the body and as a result to the development of reactive oxygen species. The products of these reactions are more reactive than oxygen molecules in their basic state. The term “free radical” – reactive oxygen species (ROS) – refers to an atom or molecule with one or more unpaired electrons, and it is this feature that conditions a powerful reaction with other compounds due to the urge to get rid of the excess electron and create a more stable system. Among the most important reactive oxygen species are superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen.<sup>1</sup> These molecules appear in many metabolic processes in the human body. They include the respiratory chain, purine nucleotide metabolism, as well as oxidoreductase- and cytochrome P-450-mediated reactions. Free radicals mainly form in the oral cavity as a result of metabolic diseases, inflammation and aging processes in the body as well as following contact with materials designed to restore dental tissue.<sup>2</sup> The overproduction of free radicals combined with the breaking of barriers raised by defensive mechanisms, designed to facilitate the removal or neutralisation of free radicals from the body, disturbs equilibrium in the body, a condition defined as oxidative stress.<sup>3</sup> This long-term process has a negative impact at the subcellular level, which in turn disrupts metabolism and destroys morphological elements within the cell. These changes result in a loss of, or a change in, biological functions and, as a consequence, may cause lesions. These lesions also affect the dentine-pulp complex, and may contribute to pulpitis and aging processes in the endodontium.<sup>4-6</sup>

### *Pulp lesions connected with oxidative stress*

Dental pulp is an immature, gelatinous and embryonic connective tissue with a complex histological structure. It consists mainly of cells, the overwhelming majority of which are fibroblasts, odontoblasts, undifferentiated

## Wprowadzenie

Tlen jest jednym z najważniejszych pierwiastków dla funkcjonowania życia na ziemi, jest wykorzystywany w organizmie ludzkim w niezliczonej liczbie procesów biochemicznych. Reakcja tlenu z innymi cząstkami prowadzi do zmiany jego stopnia utlenienia i w rezultacie do powstania jego reaktywnych form. Produkty tych reakcji są bardziej reaktywne niż cząsteczka tlenu w stanie podstawowym. Termin „wolny rodnik” – reactive oxygen species (ROS) oznacza atom lub cząsteczkę mającą jeden lub więcej niesparowanych elektronów i ta cecha warunkuje ogromną reaktywność z innymi związkami, spowodowaną dążeniem do pozbycia się nadmiarowego elektronu i stworzenia układu o większej stabilności. Do najważniejszych reaktywnych form tlenu należą: anion ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i tlen singletowy.<sup>1</sup> W ludzkim organizmie cząsteczki te powstają w wielu procesach metabolicznych. Należą do nich: łańcuch oddechowy, metabolizm nukleotydów purynowych, reakcje zachodzące z udziałem oksydoreduktaz lub cytochromu P-450. W jamie ustnej wolne rodniki powstają głównie na skutek chorób metabolicznych, stanów zapalnych, procesów związanych ze starzeniem się organizmu oraz w kontakcie z materiałami służącymi do odbudowy tkanek zęba.<sup>2</sup> W wyniku nadprodukcji wolnych rodników oraz przełamania bariery mechanizmów obronnych ułatwiających usuwanie lub neutralizację ich z organizmu, dochodzi do zaburzenia równowagi w organizmie określanego jako stres oksydacyjny.<sup>3</sup> Proces ten występujący długotrwale działa negatywnie na poziomie subkomórkowym powodując zaburzenia metabolizmu oraz destrukcję elementów morfologicznych w obrębie komórki. Zmiany te powodują utratę lub zmianę biologicznych funkcji, a w rezultacie mogą prowadzić do zmian chorobowych. Zmiany dotyczą również kompleksu miazgowo-zębionowego i mogą przyczynić się do rozwoju zapalenia miazgi i procesów starzenia endodontium.<sup>4,5,6</sup>

### *Zmiany w miazdze związane ze stresem oksydacyjnym*

Miazga zęba jest niedojrzałą, galaretowatą tkanką łączną typu embrionalnego, o złożonej budo-

mesenchymal cells, granulocytes, lymphocytes, macrophages, plasma cells and mast cells. Like all typical connective tissue dental pulp also contains collagen fibres and proteoglycans. This tissue is also highly vascularised and innervated. The nerves are mainly concentrated in sensory nerve fibres forming the Raschkow plexus as well as in the vasomotor nerve fibres forming the subodontoblastic plexus.<sup>7</sup> The action of reactive oxygen species results in oxidation of amino acid residues in the polypeptide chain of collagen fibres and proteoglycans, which in turn leads to the chain's break-up and the formation of crosslinks or their modification. Most prone to oxidation are amino acids such as cysteine, methionine, and tryptophan as well as amino acids with free amino, amide and hydroxyl groups. As a result of changes, many proteins may lose, or change, their biological functions. Oxidised proteins in dental pulp easily form aggregates and accumulate in the cytoplasm of odontoblast cells and over time their number declines. They also impede the production of the basic substance of dental pulp and procollagen. Changes in the structure of collagen and non-collagen proteins not only disturb connective tissue homeostasis, but also impair defensive reactions when dental pulp trauma and inflammation occurs.<sup>2,5</sup>

The occurrence of oxidative stress at the endodontium level also triggers oxidation of fats. Lipid peroxidation in dental pulp mainly concerns polyunsaturated fatty acids present in the membrane phospholipids of fibroblast and odontoblast cells. This process consists of three phases: initiation, propagation and termination. Lipid peroxidation products influence the physical properties of cell membranes. The hydrophobicity of the inner part of a cell's membrane declines while the permeability of the cytoplasmic membrane is increased. This, in turn, leads to depolarisation, i.e. a reduction in the difference in electrical potential between the inside of the cell and the extracellular environment. This process disturbs the reception of stimuli from the ends of Tomes' fibers. The formation of dentine during its development and later possible repair are impeded. This process disturbs the defensive function of the pulp, i.e. its

wie histologicznej. Składa się głównie z komórek, z których przeważającą część stanowią fibroblasty, odontoblasty, niezróżnicowane komórki mezenchymatyczne oraz granulocyty, limfocyty, makrofagi, komórki plazmatyczne i komórki tuczne. Miazga zęba, jako typowa tkanka łączna zawiera również włókna kolagenowe oraz proteoglikany. Tkanka ta jest również tkanką dobrze unaczynioną i unerwioną. Nerwy zebrane są głównie w czuciowe włókna nerwowe tworzące splot Raszkowa oraz naczynio-ruchowe włókna nerwowe tworzący splot pododontoblastyczny.<sup>7</sup> W wyniku działania reaktywnych form tlenu dochodzi do utleniania reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym włókien kolagenowych i proteoglikanów, co prowadzi do jego rozerwania, utworzenia wiązań krzyżowych lub ich modyfikacji. Najbardziej podatne na utlenianie są takie aminokwasy, jak: cysteina, metionina, tryptofan oraz aminokwasy z wolną grupą aminową, amidową oraz hydroksylową. W wyniku zachodzących zmian wiele białek może stracić lub zmienić swoje funkcje biologiczne. W miazdze zęba utlenione białka łatwo tworzą agregaty i kumulują się w cytoplazmie komórek odontoblastów z czasem doprowadzając do zmniejszenia ich liczby, wpływają również na zahamowanie wytwarzania substancji podstawowej miazgi i prokolagenu. Zmiany w budowie białek kolagenowych, jak i niekolagenowych wpływają nie tylko na zaburzenie homeostazy tkanki łącznej, ale również na upośledzenie reakcji obronnych w przypadku urazu miazgi lub rozwijających się procesów zapalnych.<sup>2,5</sup>

W wyniku rozwoju stresu oksydacyjnego na poziomie endodontium dochodzi również do utleniania tłuszczów. W miazdze zęba peroksydacja lipidów dotyczy głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów błonowych komórek fibroblastów i odontoblastów. Proces ten składa się z trzech faz: inicjacji, propagacji oraz terminacji. Produkty peroksydacji lipidów wpływają na właściwości fizyczne błon komórkowych. W komórce następuje obniżenie hydrofobowości wewnętrznej części błony i zwiększenie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, przez co dochodzi do depolaryzacji, czyli obniżenia różnicy potencjału elek-

ability to form reparative, defensive and sclerotic dentine in response to large numbers of immune cells.<sup>2,5</sup>

Through its network of blood vessels the pulp supplies nutrients and oxygen to the soft tissue of a tooth, which is reflected in the quality of reparative processes taking place in hard tissues. Lesions caused by oxidative stress that occur in the immediate vicinity of pulpal blood vessels result from damage to the endothelium of the vessels, the oxidation of blood lipoprotein and the reduced production of many vasoactive substances. As a result, equilibrium between the narrowing and expanding of blood vessels is disturbed. An increased flow of blood to the pulp causes active hyperaemia, whereby arteries and capillaries in the pulp widen as a result of an excessive inflow of blood. In cases of passive hyperaemia, blood outflow via venous blood vessels is impeded.<sup>8</sup>

Another of the main tasks of dental pulp is to register pain and its location. Nerve tissue is, however, especially prone to damage as an effect of oxidative stress. This is a consequence of intense aerobic metabolism, great susceptibility of cell membranes to oxidation as well as weak regenerative properties of this tissue. Effects are also noticeable in the Raschkow and subodontoblastic plexuses in the pulp. Episodes of oxygen deficiency in the pulp may lead to the excessive production of reactive oxygen species, lipid peroxidation and destabilisation of the cell membrane. The oxidative stress that occurs contributes to the damage and even the death of neurons. As a result, nerve cells disappear in specific areas of the basic pulp substance, which interrupts signals in the pulp region as well as signals from nerve endings located in Tomes' tubules in the dentine.<sup>9,10</sup>

### ***The effects of oxidative stress in pulp***

Functional-morphological changes in the dentine-pulp complex caused by the occurrence of oxidative stress promote inflammatory states in dental pulp and accelerate aging in the endodontium.

An increase in oxygen free radicals in the

trycznego pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem pozakomórkowym. Proces ten wpływa na zaburzenie w odbieraniu bodźców z zakończeń włókien Tomesa. Upośledzeniu ulega tworzenie zębiny podczas rozwoju i później ewentualna jej naprawa. Zaburzona przez to jest funkcja obronna miazgi, polegająca na tworzeniu zębiny naprawczej, obronnej, sklerotycznej oraz na odpowiedzi wielu komórek odpornościowych.<sup>2,5</sup>

Miazga poprzez sieć naczyń krwionośnych dostarcza substancje odżywcze i tlen do tkanek miękkich zęba, co ma odzwierciedlenie w jakości procesów naprawczych w tkankach twardych. Zmiany związane ze stresem oksydacyjnym, które następują bezpośrednio w obrębie naczyń krwionośnych miazgi wynikają z uszkodzenia śródbłonna naczyń, oksydacji lipoprotein krwi i zmniejszenia wytwarzania wielu substancji wazoaktywnych. W efekcie następuje zaburzenie równowagi pomiędzy procesami zwężania a procesami rozszerzania naczyń krwionośnych. Zwiększenie napływu krwi do miazgi prowadzi do przekrwienia czynnego, w którym w wyniku nadmiernego dopływu krwi do miazgi następuje poszerzenie naczyń tętniczych i włosowatych. W przekrwieniu biernym następuje utrudniony odpływ krwi przez naczynia żyłne.<sup>8</sup>

Jednym z głównych zadań miazgi jest również rejestracja odczuć bólowych i ich lokalizacja. Tkanka nerwowa jest jednak w szczególnym stopniu narażona na uszkodzenia będące efektem stresu oksydacyjnego. Wynika to z intensywnego metabolizmu tlenowego, dużej podatności błon komórkowych na oksydację oraz słabych właściwości regeneracyjnych tej tkanki. Efekty zauważalne są również na poziomie splotów: Raschkowa i pododontoblastycznego w miazdze. Epizody niedotlenienia miazgi mogą prowadzić do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu, peroksydacji lipidów i destabilizacji błony komórkowej. Powstały stres oksydacyjny przyczynia się do uszkodzenia, a nawet śmierci neuronów. W rezultacie następuje zanik komórek nerwowych w określonych obszarach substancji podstawowej miazgi, co skutkuje przerwaniem przekazywania sygnału w obrębie miazgi oraz sygnałów z zakończeń nerwowych znajdujących się w kanalikach Tomesa w zębinie.<sup>9,10</sup>

pulp impairs the mechanisms regulating immune response. The immune response is disturbed during the activation of Toll-like receptors, which are responsible for a cell's defence mechanisms against a bacterial attack.<sup>11,12</sup> Inflammation develops, a process involving both stationary cells, i.e. fibroblasts, osteoclasts and mast cells, as well as cells flowing via blood vessels, such as neutrophils, monocytes, macrophages and lymphocytes. The factors regulating the inflammatory process, mainly chemokine and cytokine, are impaired. The most important inflammation-inducing factors are interleukins IL-6 IL-8, IL-13, prostaglandin E2 and tumour necrosis factor (TNF). Pro-inflammatory cytokines induce the inflow of further inflammatory cells into the pulp, then synthesis of leukotrienes with a strong pro-inflammatory action occurs, while metalloproteinase, mast cells, tryptase and chymase are secreted. These processes lead to pulpitis, which may be acute or chronic in form. An increase in the concentration of oxygen free radicals, and a concomitant change in the biochemical activity of the pulp, is markedly visible in inflammatory states, evidenced in changes in enzyme activity, increased gene expression of different proteins as well as the release of neuropeptides.<sup>13,14</sup>

The action of reactive forms of oxygen can lead to changes in the form of atrophy and degeneration. The number of fibroblasts and mesenchyme cells drops, odontoblasts become smaller and also fall in number, degenerative lesions occur in the form of vacuoles or fat molecules, the number of fibrous elements increases, mineral deposits appear, pulp vascularisation occurs, the number of nerve endings decreases, their diameter and length are reduced, while nerve bifurcations undergo demyelination and calcification. These changes weaken the pulp's regenerative capability and response to trauma; they also reduce sensitivity and raise the excitability threshold, and slow the reparative processes down.<sup>15,16</sup>

### ***Defence mechanisms against reactive oxygen species***

Exposure to the effects of free radicals activates many defence mechanisms whose purpose

### ***Skutki rozwoju stresu oksydacyjnego w miazdze***

Zmiany czynnościowo-morfologiczne kompleksu miazgowo-zębionowego związane z występowaniem stresu oksydacyjnego przyczyniają się do rozwoju stanów zapalnych miazgi i przyspieszają procesy starzenia w obrębie endodoncium.

W wyniku wzrostu stężenia wolnych rodników tlenowych w miazdze następuje upośledzenie mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej. Zaburzeniu ulega odpowiedź immunologiczna na drodze aktywacji receptorów Toll-podobnych, które odpowiadają za mechanizmy obrony komórki przed atakiem bakterii.<sup>11,12</sup> Następuje rozwój procesu zapalenia, w którym biorą udział zarówno komórki stacjonarne: fibroblasty, osteoklasty i komórki tuczne, jak i komórki dopływające naczyniami krwionośnymi: neutrofile, monocyty, makrofagi i limfocyty. Następuje upośledzenie czynników regulujących proces zapalny, głównie chemokin i cytokin, z których najbardziej istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego pełnią: interleukiny: IL-6 IL-8, IL-13, prostaglandyna E2 oraz czynnik martwicy nowotworu TNF. Cytokiny prozapalne indukują napływ kolejnych komórek procesu zapalnego do miazgi, dochodzi do syntezy leukotrienów o silnym działaniu prozapalnym, wydzielane są metaloproteiny, komórki tuczne, tryptaza i chymaza. W wyniku tych procesów dochodzi do rozwoju zapalenia miazgi, które może mieć charakter ostry lub przewlekły. Wzrost stężenia wolnych rodników tlenowych i związana z tym zmiana aktywności biochemicznej miazgi widoczna jest w sposób istotny w stanach zapalnych, a potwierdzeniem tego są zmiany aktywności enzymów, nasilenie ekspresji genów różnych białek oraz uwalnianie neuropeptydów.<sup>13,14</sup>

W wyniku działania reaktywnych form tlenu mogą nastąpić również zmiany o charakterze zaniku i degeneracji. Zmniejsza się liczba komórek mezenchymalnych i fibroblastów, odontoblasty stają się mniejsze, spada również ich liczba, dochodzi do zmian zwyrodnieniowych w formie tworzenia wakuoli czy cząsteczek tłuszczu, zwiększa się liczba elementów włóknistych, pojawiają się złogi mineralne, zmniejsza się unaczynienie

is to control the degree of oxidation and to transform these radicals into inactive molecules. The defence system comprises the following constituents: free radical scavengers, antioxidant enzymes and preventive antioxidants.<sup>17,18</sup> Three main defence mechanisms against free radicals can be distinguished: the first line of defence, i.e. “preventive mechanisms”, which inhibit the emergence of oxygen free radicals, mainly hydroxyl radical, and their reaction with biological substances. The main participants in this process are antioxidant enzymes. The second line of defence is comprised of “reparative” mechanisms, which interrupt the free radical chain reaction and non-radical oxidation reactions. Antioxidants compete in the body with other compounds, which might be oxidised by reactive oxygen species and as a result prevent the peroxidation of biologically active compounds. The reaction between an antioxidant and a reactive oxygen species (RFT) results in a significantly less reactive compound than when a reaction occurs with biomolecules. The third line of defence, the so-called “last chance” mechanism, involves removing products of free radical reactions and repairing or eliminating damaged molecules.<sup>19</sup> Of the antioxidants described above enzymes and non-enzymatic substances stand out. The most important factor in the antioxidant defence of endodontium is the enzymatic antioxidant protection provided by saliva, which prevents the infiltration of microorganisms from the oral environment. The various components of this barrier, such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, represent the basic defence against free radicals and their non-radical derivatives.<sup>19-22</sup>

## Summary

Dental pulp performs many important functions. These include alimentary, sensory, defensive and generative-regenerative functions. The action of reactive oxygen species and constant oxidative stress destabilise internal homeostasis and the endodontium loses its basic functions, which may result in inflammation, or accelerate dental pulp aging.<sup>23</sup>

miazgi, zmniejsza się liczba zakończeń nerwowych – ich średnica i długość ulega redukcji, dochodzi do demielinizacji i zwapnienia rozgałęzień nerwowych. Zmiany powodują obniżenie zdolności regeneracyjnych oraz odpowiedzi na uraz, a także obniżenie wrażliwości i podniesienie progu pobudliwości, a procesy reparacyjne przebiegają w sposób zwolniony.<sup>15,16</sup>

## Mechanizmy obrony przed reaktywnymi formami tlenu

Ekspozycja na oddziaływanie wolnych rodników powoduje uaktywnienie wielu mechanizmów obronnych mających na celu zahamowanie stopnia oksydacji i przekształcenie się tych rodników w nieaktywne cząsteczki. W skład systemu ochronnego wchodzi: zmiatacze wolnych rodników, enzymy antyoksydacyjne oraz antyoksydanty prewencyjne.<sup>17,18</sup> Można wyróżnić trzy główne mechanizmy obrony przed wolnymi rodnikami: pierwsza linia obrony, tzw. mechanizmy prewencyjne, polegające na niedopuszczeniu do powstania wolnych rodników tlenowych, głównie rodnika wodorotlenowego i ich reakcji z substancjami biologicznymi. Biorą w niej udział głównie enzymy antyoksydacyjne. Druga linia obrony, tzw. mechanizmy naprawcze, polegające na przerwaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych i nierodnikowych reakcji oksydacji. Antyoksydanty konkurują w organizmie z innymi związkami, które mogłyby zostać utlenione przez reaktywne formy tlenu i przez to zapobiegają peroksydacji związków biologicznie czynnych. W wyniku reakcji antyoksydanta z reaktywnymi formami tlenu (RFT) powstaje związek znacznie mniej reaktywny, niż wtedy, gdyby doszło do reakcji z biocząsteczkami. Trzecia linia obrony, tzw. mechanizm ostatniej szansy, polega na usuwaniu produktów reakcji wolnych rodników oraz naprawie lub eliminowaniu uszkodzonych cząsteczek.<sup>19</sup> Wśród opisanych antyoksydantów wyróżnia się enzymy i substancje nieenzymatyczne. W obronie antyoksydacyjnej endodontium największe znaczenie ma enzymatyczna obrona antyoksydacyjna śliny, która zabezpiecza przed wniknięciem drobnoustrojów ze środowiska jamy ustnej. Elementy tej bariery, takie jak: dysmutazy ponadtlenukowe,

katalaza, peroksydazy glutationowe, reduktaza glutationowa stanowią podstawową obronę przed wolnymi rodnikami i ich nierodnikowymi pochodnymi.<sup>19,20-22</sup>

### Podsumowanie

Miazga pełni wiele istotnych funkcji. Należą do nich funkcje: odżywcza, czuciowa, obronna oraz twórczo-odtwórcza. W wyniku działania reaktywnych form tlenu i utrzymującego się permanentnie stanu stresu oksydacyjnego następuje destabilizacja wewnętrznej homeostazy i utrata podstawowych funkcji endodontium, co może prowadzić do rozwoju zapalenia lub przyspieszenia procesów starzenia się miazgi.<sup>23</sup>

### References

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
2. Demirci M, Hiller K, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H: The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008;24:362-371.
3. Boveris A: Biochemistry of free radicals: from electron to tissues. *Medicina (B Aires)* 1998; 58: 350-356.
4. Kalisz O, Wolski T, Gerkowicz T, Smorawski M: Reaktywne formy tlenu oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób. *Ann UMCS, Sect DD* 2007; 62: 87-99.
5. Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J: Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007; 45: 284-289.
6. Halliwell B, Gutteridge JM: The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 125-126.
7. Wardas A, Ciešlik M, Ciešlik-Bielecka A: Biochemiczno-fizjologiczna aktywność miazgi zębów – na podstawie piśmiennictwa. *Czas Stomatol* 2007; 40: 263-268.
8. Abuja P, Albertini R: Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306: 1-17.
9. Borysewicz-Sańczyk H, Szczepański M, Kamianowska M: Cytoprotekcja – czynniki ochronne i mechanizmy ich działania w komórce. *Pol Merkurisz Lek* 2009; 26: 152.
10. Barnham K, Masters C, Bush A: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 205-214.
11. Sanchez A, Calpena A, Clares B: Evaluation the oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 16981-7004.
12. Mahanonda R, Pichyangkul S: Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007; 43: 41-55.
13. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
14. Calkosiński I, Dobrzyński M: Charakterystyka odczynu zapalnego. *Post Med Klin Dośw* 2009; 63: 395-408.
15. Augustyniak A, Skrzydlewska E: Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Post Med Klin Dośw* 2004; 58:194-201.
16. Golusińska-Kardach E, Napierała M, Sokalski J: Choroby przyzębia u palaczy tytoniu a parametry stresu oksydacyjnego. *Prz Lek* 2015; 72: 584-587.
17. Ray G, Husain S: Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002; 11: 1213-1232.

18. *Sroka Z, Gamian A, Cisowski W*: Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego." *Post Hig Med Dośw* 2005; 59: 34-41.
19. *Lewiński A, Sewerynek E*: Zmiatacze wolnych rodników. *Med Prakt* 2000; 9: 100-104.
20. *Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A*: Antioxidant therapy a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 135-159.
21. *Czajka A*: Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obrony organizmu. *Nowiny Lek* 2006; 75: 582-586.
22. *Galecka E, Jacewicz R, Mrowicka M, Florkowski A, Galecki P*: Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Post Hig Med Dośw* 2011; 65: 640-644.
23. *Nair PN*: Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 348-381.

Address: 31-155 Kraków, ul. Montelupich 4

Tel.: +4812 4245425

email: sekretariatpsz@uks.com.pl

Received: 4<sup>th</sup> March 2017

Accepted: 23<sup>rd</sup> August 2017