

PENGARUH INDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (LPS) TERHADAP OSTEOPONTIN TULANG ALVEOLARIS TIKUS PADA MASA ERUPSI GIGI

Didin Erma Indahyani*, Al-Supartinah Santoso**, Totok Utoro***, Marsetyawan HNE****

*Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jember

**Bagian Pedodontia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

***Bagian Patologi Anatomi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

**** Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstract

Tooth eruption is a complex process that involves osteoclasts to form the eruption pathway. Lipopolysaccharide (LPS) is a bacterial component that plays multifunctional roles in inflammatory reactions, and one of these roles is powerful stimulation of bone resorption. Osteopontin (OPN) is a phosphorylated glycoprotein the expression of which is associated with migration, attachment and signaling of osteoclast. The objective of this study was to investigate the effect of LPS on rat alveolaris bone osteopontin during the period of tooth eruption. Fifty five Wistar male albino rats, five days of age were divided into three groups. The first group was not subjected to any treatment. The second group was induced with LPS at five days of age. The third group was induced with LPS at nine days of age. Expression of OPN was analyzed by immunohistochemical (IHC) approach. The results showed significant differences in OPN expression ($p < 0.05$) within the treated subjects. It was concluded that LPS induction during tooth eruption increases the level of alveolar bone osteopontin.

Key words: tooth eruption; lipopolysaccharide; osteoclast; osteopontin

Pendahuluan

Erupsi gigi merupakan peristiwa kompleks yang prosesnya melibatkan sel organ gigi dan tulang alveolar di sekitarnya.¹ Pada peristiwa erupsi tersebut ada peningkatan sel mononukleus di regio korona folikel yang positif terhadap *tartrate-resistance acid phosphate* (TRAP) (enzim yang hanya terdapat pada prekursor osteoklas, maka disebut sebagai petanda osteoklas), disertai

peningkatan jumlah osteoklas di sekitar tulang alveolar. Osteoklas tersebut berfungsi meresorpsi tulang alveolar di korona benih gigi untuk membuat saluran atau jalan erupsi.^{1,2}

Keradangan pada tulang alveolar yang terjadi pada masa erupsi menyebabkan gangguan pada proses erupsi yaitu berupa erupsi terlambat atau bahkan prematur.³ Dilaporkan bahwa geligi yang mengalami erupsi prematur ditemukan dalam keadaan karies, hipoplastik dan goyang,⁴ kualitas

*Alamat korespondensi: e-mail address: didinermae@yahoo.com

gigi yang jelek misalnya gigi dengan porositas tinggi, hipokalsifikasi, maupun hipoplasia email yang akan memudahkan terjadinya karies.⁵

Lipopolisakarida (LPS) adalah salah satu penyebab terjadinya kelainan periodontium. Bahan ini merupakan struktur utama dinding sel bakteri gram negatif yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *hospes*. Lipopolisakarida bersifat endotoksin yang menginduksi diproduksinya faktor lokal yaitu sitokin proinflamatori seperti interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE₂).⁶ Prostaglandin dan sitokin proinflamatori mengakibatkan terjadinya destruksi jaringan periodontium, dengan cara menstimulasi pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas dan penurunan jumlah dan aktivitas osteoblas.⁷

Penelitian Umezaki dkk.⁸ menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi dengan LPS *E. coli* di daerah mukosa regio molar pertama rahang atas jumlah dan ukuran osteoklas meningkat dalam setiap penambahan dosis LPS dan menyebabkan resorpsi tulang alveolar. Resorpsi tulang terjadi oleh adanya degradasi struktur kristal hidroksiapatit (HA) dan struktur organik kolagen, akibat pH rendah berkisar $\pm 3,0-4,5$ yang ditimbulkan oleh aktivitas osteoklas.⁹

Osteoporosis (OPN) merupakan glikoprotein yang terfosforilasi, yang biasa disebut sebagai *bone sialoprotein I* ataupun *secreted phosphoprotein I* (SPP1).¹⁰ Bahan ini mempunyai sekuen *arginin-glycin-aspartic acid* (Arg-gly-asp. atau disebut juga RGD atau *polyaspartic acid side*) berperan penting untuk adesi sel yang dapat dikenali oleh integrin sel tulang yaitu $\alpha_v\beta_3$. Ikatan OPN dengan $\alpha_v\beta_3$ menyebabkan kemotaksis osteoklas maupun osteoblas, bergerak ke daerah resorpsi tulang,¹¹ perlekatan dan signaling osteoklas¹² dan untuk migrasi osteoklas.¹³ Bahan OPN merupakan *marker* awal regenerasi jaringan periodontium karena terdeteksi dengan cukup tinggi pada hari ke 3 dan 7 setelah dilakukan pembuatan flap periodontium.¹⁴ Juga terdeteksi secara imunohistokimia pada saat terjadinya semetogenesis¹⁵ dan selama proses resorpsi gigi.¹⁶

Tingginya osteoklas pada masa erupsi menyebabkan terbentuknya saluran erupsi yang digunakan gigi bergerak ke dalam rongga mulut. Penyakit periodontium yang diakibatkan oleh LPS menunjukkan terjadinya destruksi tulang alveolar. Apabila penyakit periodontium tersebut terjadi pada masa erupsi, menyebabkan peningkatan osteoklas di tulang alveolar, akibatnya terjadi erupsi prematur. Oleh karena OPN berperan penting pada fungsi

osteoklas, bagaimana ekspresinya pada tulang alveolar jika tikus terinduksi LPS pada masa erupsi gigi, belum diketahui. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi OPN tulang alveolar pada tikus yang diinduksi LPS selama masa erupsi.

Bahan dan Cara Kerja

LPS *E. Coli* (Sigma®, LPS *E coli*, dengan kode 0111: B4), *mouse monoclonal antibody against rat OPN* (antibodi monoklonal ini dikembangkan oleh Michael Solursh dan Ahnders Franzen yang diperoleh dari *The Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD, The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242*), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Bovine's fixative*, *diluent buffer*, *biotinylated anti mouse IgG*, *Avidin-biotin peroxidase*, *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB), *counter stain Mayer's*, dan *canada balsam*.

Persiapan Sampel

Lima puluh lima ekor tikus *Wistar* jantan umur 5 hari yang telah sesuai dengan kriteria sampel, dipilih secara acak, dibagi 3 kelompok. Kelompok I (20 ekor) merupakan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan apapun. Kelompok II (20 ekor) adalah kelompok perlakuan yang diberi induksi LPS sejak umur 5 hari. Kelompok III (15 ekor) adalah kelompok perlakuan yang diinduksi LPS ketika tikus berumur 9 hari. Induksi LPS didasarkan pada metode Umezaki dkk.,⁸ yang dimodifikasi yaitu, LPS disuntikan di gingiva sebelah bukal tikus regio gigi molar rahang atas kanan, dengan dosis 5 μ g/PBS 0,05ml, diberikan 1 kali sehari selama 5 hari. Kelompok I dan II dibagi menjadi 4 sub kelompok yang terdiri dari 5 ekor tikus, yang akan didekapitasi pada umur 9, 13, 17 dan 21 hari, sedangkan kelompok III menjadi 3 sub kelompok (masing-masing 5 ekor tikus) yang akan didekapitasi pada umur 13, 17 dan 21 hari.

Pulasan Imunohistokimia (IHC)

Tulang alveolaris kanan atas difiksasi dengan *Bovine's fixative*, kemudian didemineralisasi menggunakan asam asetat/formalin salin, ditanam dalam blok parafin dan dipotong secara seri setebal 6 μ m dalam arah bukolingual dan diletakkan pada slide yang dilapisi dengan TES (3-*aminopropyltriethoxysilane*). Dilakukan deparafinisasi kemudian slide dimasukkan dalam 0,3% H₂O₂ dalam metanol

100ml, 10 menit. Cuci dalam air mengalir 10-15 menit, air distilasi, dikocok-kocok, PBS 3x masing-masing 5 menit. Teteskan *non immune serum* 1: 50 pada *slide*, inkubasi selama 30 menit. Cuci dengan PBS, teteskan antibodi primer (antibodi monoklonal OPN) yang telah diencerkan dengan *buffer diluent* dengan pengenceran 1:500. Letakkan pada tempat yang lembab dan inkubasi semalam pada suhu 4°C. Cuci dengan PBS 3x, kemudian teteskan antibodi sekunder (*biotinylated anti mouse IgG*) (1:200), inkubasi 30 menit. Cuci dengan PBS, teteskan avidin-biotin, (1:100), inkubasi 30 menit. Cuci dengan PBS, teteskan 3,3'-*diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB), inkubasi 10-20 menit, observasi di bawah mikroskop sampai muncul warna coklat. Cuci dengan PBS, kemudian cuci dalam air mengalir. *Counterstain* dengan Mayer's. Dilakukan rehidrasi. Irisan yang digunakan sebagai kontrol, diproses secara rutin dan menggunakan non-immun serum sebagai pengganti antibodi primer. Irisan sebagai kontrol negatif ini akan memberikan reaksi negatif (tidak terwarnai). *Slide* diamati di bawah mikroskop cahaya.

Untuk membedakan hasil pengamatan antara sampel, dilakukan *scoring* sebagai berikut 1) OPN tidak terdeteksi adalah - (skor 0); 2) OPN terdeteksi lemah adalah + (skor 1); 3) OPN terdeteksi sedang ++ (skor 2); 4) OPN terdeteksi kuat +++ (skor 3).¹⁷ Dilakukan analisis dari data yang telah terkumpul dengan uji Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui perbedaan antara kelompok-kelompok dilakukan uji dengan *Mann-Whitney Test*

Hasil

Hasil pengamatan pada seluruh kelompok penelitian menunjukkan bahwa OPN terdeteksi pada tulang alveolar yang diinjeksi LPS maupun tidak (Tabel 1). Kontrol negatif (irisian yang diproses secara rutin, menggunakan serum normal sebagai pengganti antibodi primer) tidak terwarnai, artinya negatif.

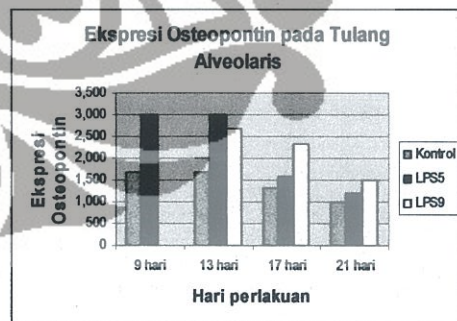
Uji Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada ekspresi OPN tulang alveolar tikus yang tidak ataupun diinduksi LPS. Ekspresi OPN terdeteksi kuat pada tikus normal (kontrol) umur 9 hari, dan terjadi penurunan pada umur 17 juga 21 hari. Analisis statistik dengan uji Mann Whitney diketahui bahwa penurunan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$), artinya OPN yang terdeteksi pada umur 9, 13, 17 maupun 21 adalah sama. OPN yang dideteksi pada tikus yang

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku ekspresi OPN tulang alveolaris

Perla kuan/ Hari	Kontrol		Induksi LPS			
	Rerata	Simpangan baku (±)	Induksi umur 5 hari		Induksi umur 9 hari	
			Rerata	Simpangan baku (±)	Rerata	Simpangan baku (±)
9	1,667	0,577	3,000	0,000	-	-
13	1,667	0,577	3,000	0,000	2,666	0,577
17	1,333	0,577	1,600	0,547	2,330	1,150
21	1,000	0,000	1,200	0,447	1,500	0,570

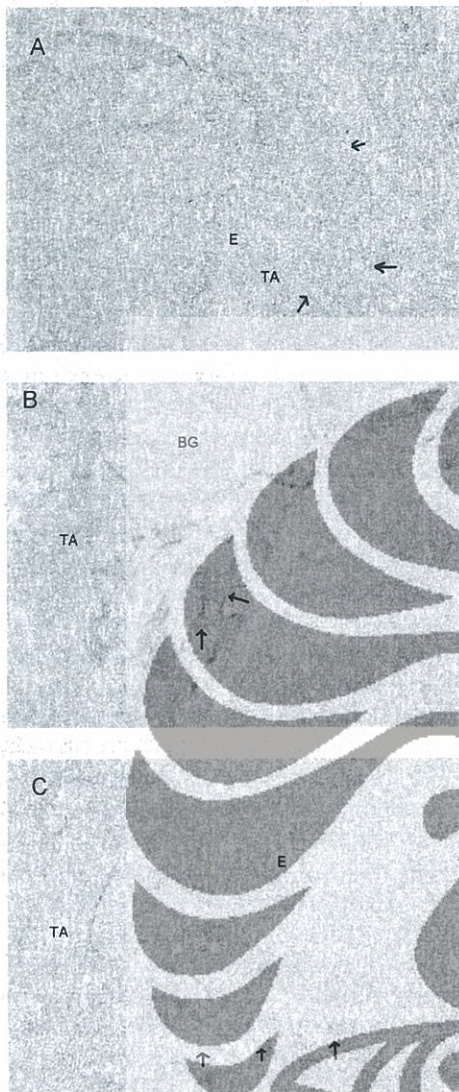
diinduksi LPS sejak berumur 5 hari, pada umur 9 dan 13 hari secara bermakna terdeteksi paling kuat dibandingkan dengan kelompok lain, dan akan mengalami penurunan pada umur 17 dan 21 hari.

Aktivitas OPN pada umur 17 dan 21 hari tersebut tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok normal umur 17 dan 21 hari. Induksi LPS yang dilakukan pada tikus umur 9 hari, mengakibatkan OPN terdeteksi kuat pada umur 13 hari, yang lebih tinggi dari tikus kontrol tetapi lebih rendah dibandingkan tikus yang diinduksi sejak umur 5 hari. Aktivitas OPN akan mengalami penurunan pada umur 17 dan 21 hari yang reratanya tidak berbeda bermakna dengan OPN pada tikus normal umur 21 hari. Pada semua kelompok penelitian, tikus umur 17 dan 21 hari, OPN terdeteksi lemah jika dibandingkan dengan kelompok umur 9 dan 13 hari. Aktivitas OPN yang terdeteksi pada kelompok umur 17 dan 21 hari, mempunyai rerata yang tidak berbeda bermakna antara tikus yang tidak maupun diinduksi LPS. Gambaran histogram dan preparat yang menunjukkan ekspresi OPN pada tulang alveolar dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar-2.



Gambar 1. Histogram ekspresi osteopontin pada tulang alveolaris

Keterangan gambar : LPS5 = LPS diinduksikan pada tikus umur 5 hari; LPS9= LPS diinduksikan pada tikus umur 9 hari



Gambar 2: Ekspresi OPN pada tulang alveolar (pembesaran 100x)

Keterangan gambar: A. Ekspresi OPN pada tikus yang normal umur 21 hari, nampak warna coklat tipis (skoring 1); B. Ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi LPS, menunjukkan warna coklat tebal (skor 3); C. Ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi dengan LPS, terlihat warna coklat agak tebal (skor 2); (E, email; TA, tulang alveolaris; BG, benih gigi; anak panah, menunjukkan lokasi yang positif pada pewarnaan IHC).

Pembahasan

Pengertian mekanisme erupsi gigi yang pertama kali digambarkan adalah terjadinya peristiwa selular. Gigi yang belum erupsi akan terkurung dalam kriptal tulang alveolar. Supaya gigi dapat bergerak ke arah

rongga mulut harus terjadi resorpsi tulang untuk membentuk saluran/jalan erupsi. Erupsi terjadi jika mahkota telah terbentuk sempurna.¹⁸ Penemuan pada penelitian ini menunjukkan bahwa OPN terdeteksi kuat pada tikus yang normal, kelompok umur 9 dan 13 hari. Pada umur 9 dan 13 hari tikus masih mengalami masa erupsi. Pada masa erupsi ini diperlukan osteoklas untuk membuat saluran erupsi. Tingginya ekspresi OPN tersebut berhubungan dengan peningkatan jumlah osteoklas pada awal erupsi. Bahan OPN berperan penting pada fungsi osteoklas. Sekuen RGD pada OPN akan berikatan dengan integrin $\alpha_v\beta_3$ dari osteoklas, yang mengakibatkan perlekatan osteoklas pada daerah resorpsi dan meresorpsi tulang.¹¹ Ikatan sekuen RGD OPN dengan integrin $\alpha_v\beta_3$ juga diperlukan prekursor osteoklas melakukan proliferasi membentuk osteoklas yang multinukleus¹⁹ dan menstimulasi ekspresi CD44 pada permukaan sel osteoklas yang berfungsi untuk motilitas osteoklas di daerah resorpsi.¹²

Menurut Marks,²⁰ pada awal terjadinya erupsi yaitu tahap intraoseous, di bagian korona dari folikel terjadi akumulasi sel mononukleus yang secara sitokimia dan ultrastruktural menggambarkan osteoklas. Wise dan Fan² mengatakan bahwa sel mononukleus yang positif dengan TRAP, terlihat meningkat pada tikus umur 3 hari, dan akan mengalami penurunan sampai waktu erupsi gigi selesai. Osteoklas diperlukan untuk resorpsi tulang alveolar di atas dan di sekitar benih gigi. Tanpa terjadinya resorpsi tulang alveolaris, gigi tidak mungkin akan erupsi.¹

Merry dkk.²¹ menunjukkan bahwa ekspresi mRNA OPN terdeteksi dengan kadar yang tinggi dalam osteoklas. Pada *Skeleton Canine*, OPN selalu terdeteksi dengan kuat pada osteoklas. Deposisi OPN ini menggambarkan inti kartilago dalam trabekula skunder dan sebagai lapisan permukaan trabekula yang mengalami resorpsi mikrolokasi.²²

Pada umur 17 hari gigi telah mengalami penetrasi mukosa, sehingga jumlah osteoklasnya menurun, dan umur 21 hari telah mengalami erupsi di rongga mulut, sehingga OPN terdeteksi lemah pada tikus umur 17 dan 21 hari. Walaupun erupsi telah selesai tetapi pembentukan akar gigi masih terus berlanjut. Pertumbuhan akar terjadi pada waktu gigi erupsi, dan diperkirakan memberikan kekuatan tekanan pada gigi untuk bergerak ke arah korona.³ Tekanan pada tulang alveolar menyebabkan peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas. Pertumbuhan akar gigi yang masih berlanjut meskipun gigi telah erupsi sempurna, menandakan masih berlangsungnya proses *remodeling* dalam

tulang alveolar. Oleh karena itu OPN tetap terdeteksi walaupun lemah. Proses resorpsi pada *remodeling* tulang secara fisiologis diperlukan untuk memberikan ruang deposisi bagi matriks tulang di daerah resorpsi,²³ sehingga diperlukan adanya osteoklas dan osteoblas yang seimbang.

Eksresi OPN terdeteksi dengan kuat pada tikus yang diinduksi dengan LPS pada kelompok umur 9 dan 13 hari. Eksresi ini lebih kuat jika dibandingkan dengan tikus tanpa induksi LPS. Bahan LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor CD14/ *Toll-like receptor-4* (TLR4) yang mengakibatkan sekresi sitokin proinflamatori dari beberapa tipe sel. CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat. Makrofag yang berikatan dengan bakteri karena adanya CD14 akan mensekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation*. Kelebihan jumlah sitokin akan menyebabkan shok endotoksin yang fatal.^{24,25} Lipopolisakarida yang diinduksikan pada tikus, dikenali oleh reseptor CD14 makrofag, akibatnya makrofag mensekresi sitokin proinflamatori di daerah tersebut. Sitokin proinflamatori berperan pada peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas.

Tingginya ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi LPS, diakibatkan adanya peningkatan osteoklas di daerah inflamasi, sehingga osteoklas mensekresi OPN untuk fungsi produksi maupun fungsional osteoklas itu sendiri. Selain itu OPN dapat disekresi oleh berbagai tipe sel yaitu sel T, makrofag, NK cells, osteoblas dan osteoklas. Beberapa mediator inflamatori dan faktor pertumbuhan termasuk IL-1, TNF- α dan PDGF, juga dapat mentstimulasi transkripsi OPN melalui aktivitas protein kinase C.²⁶ Bahan OPN juga diketahui dapat mentstimulasi migrasi makrofag maupun sel dendritik di daerah inflamasi.^{27,28} Makrofag, sitokin, osteoklas yang meningkat di daerah inflamasi dan mampu mensekresi OPN, mengakibatkan ekspresi OPN jauh lebih tinggi pada tikus yang diinduksi LPS, dibandingkan dengan kelompok normal. Pada kelompok umur 17 dan 21 hari tikus yang diinduksi LPS, terlihat adanya penurunan ekspresi OPN. Penurunan ini mempunyai rerata yang tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol umur 21 hari. Penurunan OPN pada umur ini disebabkan gigi telah mengalami erupsi dan induksi LPS dihentikan setelah 5 kali diinduksi. Menurut Lekic dkk.¹⁴ OPN terdeteksi dengan cukup tinggi pada hari ke 3 dan 7 setelah dilakukan pembuatan flap periodontium. Hal ini sesuai dengan penelitian ini bahwa setelah induksi LPS 4 kali berturut-turut, ekspresi OPN meningkat, kemudian menurun setelah umur 17 dan 21 hari.

Tikus yang diinduksi LPS pada umur 9 hari, terjadi peningkatan ekspresi OPN pada umur 13 hari. Walaupun tinggi ekspresi OPNnya tetapi tidak setinggi pada tikus yang diinduksi LPS sejak umur 5 hari pada kelompok umur 13 hari. Hal ini disebabkan pada umur 13 hari, selain gigi telah menembus mukosa (berarti secara fisiologis, osteoklas sudah mulai berkurang), pemberian LPS masih 2 kali, berarti dosis yang terpapar masih sedikit, dibandingkan pada tikus yang diinduksi LPS sejak umur 5 hari. Oleh karena LPS masih terus diinduksikan sampai 5 kali suntikan, maka LPS masih terus melakukan reaksi inflamasi sampai tikus berumur 17 hari, sehingga OPN masih tampak lebih tinggi dibandingkan kelompok yang lain.

Tingginya osteoklas pada awal terjadinya erupsi, mengakibatkan ekspresi OPN tulang alveolar tikus juga tinggi. Sekuen RGD pada OPN akan berikatan dengan integrin $\alpha_v\beta_3$ osteoklas, yang mengakibatkan reseptor CD44 osteoklas mengaktivasi pergerakan prekursor osteoklas untuk berproliferasi membentuk osteoklas baru dan bergerak serta melekat di daerah resorpsi. Lipopolisakarida yang mentstimulasi peningkatan sitokin proinflamatori, menyebabkan peningkatan osteoklas di daerah resorpsi. Pada masa erupsi yang secara fisiologis ditemui adanya peningkatan osteoklas, apabila diinduksi LPS maka osteoklas semakin tinggi dan ekspresi OPN juga lebih tinggi. Tingginya OPN akan mentingkatkan fungsi osteoklas. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka pada manusia apabila masa erupsi mengalami inflamasi pada jaringan periodontiumnya, dimungkinkan akan terjadi kelainan pada proses erupsi dari benih gigi permanennya.

Kesimpulan dan Saran

Induksi LPS pada masa erupsi menunjukkan adanya deteksi OPN yang sangat kuat pada tulang alveolar terutama pada awal erupsi. Ekspresi OPN akan terdeteksi dengan lemah dengan bertambahnya umur pada tikus yang tidak diinduksi maupun yang diinduksi LPS. Lipopolisakarida yang diinduksikan pada tikus yang lebih tua (9 hari), ekspresi OPN kelihatan terdeteksi dengan kuat, dan akan terdeteksi lemah dengan bertambahnya umur.

Disarankan dilakukan penelitian lanjutan dengan menganalisis ekspresi OPN bersamaan dengan ekspresi osteoklas, juga tingkat resorpsinya terutama pada tulang alveolar dan gignya.

Daftar Acuan

1. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, Molecular, and Genetic Determinants of Teeth Eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(4):323-35.
2. Wise GE, Fan W. Changes in the Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Cell Population in Dental Follicles and Bony Crypts of Rat Molars during Tooth Eruption. *J Dent Res* 1989; 68(2): 150-6.
3. Kock G, Krieborg S. Eruption and Shedding of Teeth., Dalam: Koch G (Ed.) *Pediatric Dentistry: A Clinical Approach*, Munksgaard: Copenhagen 2001: 134-5
4. McNamara CM, Foley TF, Garvey MT, Kavanagh PT. Prematur Dental Eruption : Report of Case. *J of dent for Child* 1999: 70-2.
5. Wan AKL, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehade DI. A Longitudinal Study of *Streptococcus mutans* Colonization in Infants after Tooth Eruption. *J Dent Res* 2003; 82(7): 504-08.
6. Stashenko P. Interrelationship of Dental Pulp and Apical Periodontitis. In: Hargreaves KM, Goodis, (Eds). *Dental Pulp*. Chicago: Quintessence Publishing Co Inc. 2002: 389-409.
7. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Byan BD. Mechanisms of Alveolar Bone Destruction *Periodontology* 2000. 1997; 14:158-72.
8. Umezu A, Kaneko N, Toyama Y, Wanatabe Y, Itoh H. Appearance of Osteoclast by Injections of Lipopoly-saccharides in Rat Periodontium Tissue. *J Periodont Res* 1989; 24: 378-83.
9. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth Resorption. *Quintessence Int* 1999; 30: 9-25
10. Zhang Q, Domenicucci C, Goldberg HA, Wrana JL, Sodek J. Characterization of Fetal Porcine Bone Sialoproteins, Secreted Phosphoprotein I (SPPI, Osteopontin), Bone Sialoprotein, and a 23-kda Glycoprotein. *J Biol Chem* 1990; 265(13): 7583-9.
11. Ross FP, Chappel J, Alvarez JL, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, dkk. Interactions Between the Bone Mtrix Proteins Osteopontin and Bone Sialoprotein and the Osteolast Integrin $\alpha 5 \beta 3$ Potentiate Bone resorbtion. *J Biol Chem* 1993; 268 (13): 9901-7.
12. Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Achoenberger J, Rifas L, dkk. Osteopontin Deficiency Produces Osteoclast Dysfunction Due to Reduced CD44 Surface Expression. *Mol Biol cell* 2003; 14(1): 173-89.
13. Suzuki K, Zhu B, Rittlin SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, dkk. Colocalization of Intracellular Osteopontin with CD44 is Associated with Migration, Cell Fusion, and Resorption in Osteoclast. *J Bone MinerRes* 2002; 17: 1486-97.
14. Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Relation of Cellular Proliferation to Expression of Osteopontin and Bone Sialoprotein in Regenerating Rat Periodontium. *Cell and Tissue Res* 1996; 285(3): 491-500.
15. Yamamoto T, Domon T, Takashashi S, Arambawatta AK, Wakita M. Immunolocalization of Proteoglycans and Bone-related Noncollagenous Glycoproteins in Developing Acellular Cementum of Rat Molar, *Cell Tissue Res* 2004; 317(3):299-312.
16. Shigeyama Y, Grove TK, Strayhorn C, Somerman MJ. Expression of Adhesion Molecules During Tooth Resorption in Feline Teeth: A Model System for Aggressive Osteoclastic Activity. *J Dent Res* 1996; 75(9): 1650-7.
17. Garcia JMQ, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of Bone Extracellular Matrix Proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in Human dental pulp and Cultured Pulp Cell. *Int Endod J* 2003; 36: 404-10.
18. Farris J, Griffith R. *The Rat in Laboratory Investigation*. New York: Hafner Publ. 1971 : 118-20.
19. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T. An Adherent Condition is Required for Formation of Multinuclear Osteoclasts in The Presence of Macrophage Colony-Stimulating Factor and Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand. *Blood* 2000; 96(13): 4335-43.
20. Marks SCJr. The Basic and Applied Biology of Tooth Eruption. *Connect Tissue Res* 1995; 32 (1-4): 149-57.
21. Merry K, Doods R, Littlewood A, Gowen M. Expression of Osteopontin mRNA by Osteoclasts and Osteoblasts in Modelling Adult Human Bone. *J Cell Sci* 1993; 104: 1013-20.
22. Schnapper A, Meyer W. Osteopontin Distribution in The Canine Skeleton during Growth and Structural Maturation. *Cell tissues Organs* 2004; 178: 158-67.
23. Lerner UMH. New Molecules in The Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(2):64-81.
24. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, dkk. Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-5.
25. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immuno Biology*. 5th ed. New York: Garland Publishing 2001: 67-8.
26. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS, Osteopontin as a Means to Cope with Environmental Insults: Regulation of Inflammation, Tissue Remodeling, and Cell Survival. *J Clin Invest* 2001; 107(9): 1055-61.
27. Giachelli CM, Lobardi D, Johnson RJ, Murry CE dan Almeida M. Evidence for Role of Osteopontin in Macrophage Infiltration in Response to Patological stimuli *in Vivo*. *Am J Pathol* 1998; 152: 353-8.
28. Renkl AC, Wussler J, Ahrens T, Thoma K, Kon S, Uede T, dkk. Osteopontin Functionally Activities Dendritic Cells and Induces Their Differentiation toward a Th1-Polarizing Phenotype. *Blood* 2005; 106(3):946-55.