

LEVELS OF MALONDIALDEHYDE AND CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN PULP INFLAMMATION DUE TO LPS INDUCTION DURATION

Arlina Nurhapsari*, Andina Rizkia Putri Kusuma*

* Department of Conservative Dentistry, Sultan Agung Islamic University

Correspondence: arlina@unissula.ac.id

Keywords:

Inflammation pulp,
Lipopolysaccharide,
Malondialdehyde,
Calcitonin Gene-Related
Peptide

ABSTRACT

Background: Administration Lipopolysaccharide (LPS) to pulp tissue might produce inflammation. Inflammation occurs, which can lead to oxidative stress and neuropeptides release. Malondialdehyde (MDA) is an oxidative stress measure, while calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a neuropeptide found in large amounts in the pulp. This study attempted to analyze levels of CGRP and MDA in LPS inflamed rat pulp tissue

Method: Wistar rats' maxillary incisors were treated to LPS stimulation. A total of 30 mice were separated into six groups, each with five animals. The groups were created by administering LPS to the pulp for 6, 12, 24, 48, and 72 hours. Rat without pulpal exposure (0 hour) served as controls. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to measure the levels of MDA and CGRP in the pulp tissue.

Result : MDA and CGRP levels were found to be significantly different in all groups ($p < 0.05$ mohon diberi keterangan apakah $</>=$). With LPS administration, MDA levels increased on average, whereas CGRP levels fluctuated.

Conclusion: The presence of inflammation in the pulp was shown by changes in MDA and CGRP levels after 6 hours of LPS injection. The effect of rising MDA levels on inflamed pulp tissue did not produce effects that were directly proportional to or vice versa with CGRP levels that showed fluctuated.

PENDAHULUAN

Inflamasi pulpa atau pulpitis merupakan salah satu penyakit pulpa yang paling banyak diderita oleh masyarakat baik anak-anak maupun dewasa. Inflamasi pulpa merupakan reaksi pertahanan jaringan pulpa dalam menghadapi infeksi dari bakteri⁽¹⁾. Durasi paparan dari iritan mempengaruhi keadaan inflamasi pada jaringan pulpa. Gejala awal inflamasi pulpa adalah rasa nyeri ringan hingga berat pada penderitanya dan bila tidak dirawat akan menyebabkan nekrosis pulpa dan kerusakan yang bertambah pada struktur gigi yang tersisa^(2,3).

Pemberian induksi menggunakan lipopolisakarida (LPS) telah banyak dilakukan^(4,5). Paparan LPS pada pulpa akan memicu respon

imun bawaan jaringan pulpa sebagai tahap awal inflamasi. Selanjutnya, saat suasana inflamasi terjadi akan memicu timbulnya stress oksidatif pada sel karena peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas ini mengakibatkan kondisi inflamasi bertambah parah dan berakhir menjadi kerusakan pada jaringan pulpa⁽⁶⁾. Ketika radikal bebas bereaksi dengan lipid, maka akan membentuk senyawa *malondialdehyde* (MDA)^(6,7). *Malondialdehyde* lebih sering digunakan dalam penelitian biomedis sebagai penanda stres oksidatif khususnya pada berbagai keadaan klinis yang berkaitan dengan proses peroksidasi lipid⁽⁸⁾.

Nyeri yang terjadi pada pulpitis, dipengaruhi oleh peningkatan neuropeptida *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) yang dilepaskan oleh ujung syaraf bebas (*free nerve Eending*) pada pulpa⁽⁹⁾. CGRP merupakan asam amino peptida yang terletak pada serabut saraf C dan A delta. CGRP berfungsi memediasi fase vasodilatasi tahap akhir dan lebih dominan pada inflamasi pulpa⁽¹⁰⁾. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh durasi pemberian LPS pada jaringan pulpa tikus terhadap kadar CGRP dan MDA.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan *post test control group design*. Penelitian ini menggunakan 30 tikus Wistar jantan umur 8-10 minggu dengan berat 200-250 gram. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok dengan 5 tikus per kelompoknya. Kelompok dibagi berdasarkan durasi pemberian LPS pada pulpa dengan durasi 0, 6, 12, 24, 48, dan 72 jam.

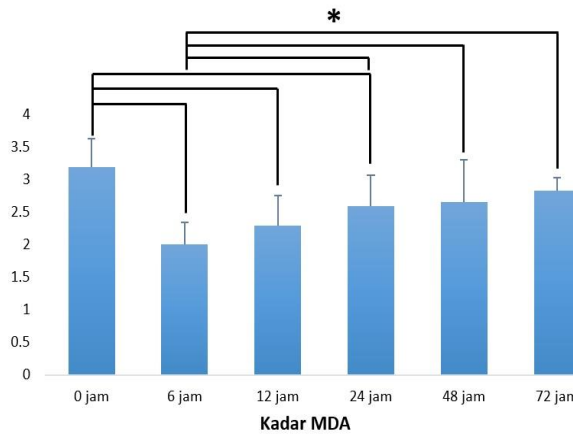
Pada kelompok durasi 6, 12, 24, 48, dan 72 jam tikus dianestesi menggunakan Ketamin 75-100 mg/kg BB, ditambah xylazine 5-10 mg/kg BB secara intra peritoneal, perlakuan ini sesuai dengan penelitian Ohkura dkk⁽⁴⁾. Setelah tikus tidak sadar dilakukan preparasi pada gigi insisivus rahang atas dengan memotong bagian mahkotanya ± 7 mm hingga margin gingiva menggunakan *bur disk straight*. Selanjutnya dilakukan pengeburan dengan *metal bur low speed* ukuran 10, kemudian akses menuju ruang pulpa diperbesar menggunakan *K-file* ukuran 15 – 45 hingga tampak perdarahan dari atap pulpa yang terbuka. Kavitas dibersihkan dengan larutan salin, hingga terjadi hemostasis. *Paper point* dipotong 5 mm pada bagian ujung, kemudian direndam di LPS 20mg/ml dan dimasukkan ke kavitas untuk berkontak dengan pulpa. Kavitas ditutup dengan tumpatan *Glass*

ionomer cement (GIC). Tikus dikorbankan sesuai dengan durasi pemberian LPS yaitu 0, 6, 12, 24, 48, dan 72 jam, kemudian dilakukan pengambilan sampel gigi insisivus rahang atas.

Jaringan pulpa diekstrirasi menggunakan *barbed broach #40* dari apikal dan dibersihkan dengan NaCl. Jaringan pulpa dibilas dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sedingin es (pH 7,4) untuk menghilangkan kelebihan darah secara menyeluruh dan timbang sebelum homogenisasi. Jaringan digerus dan dihomogenkan dalam PBS (berat jaringan (g): PBS (mL) volume=1:9) dengan homogenizer kaca di atas es. Sonikasi suspensi dengan *ultrasonic cell disrupter* atau dengan *freeze thaw-cycles* untuk memecah sel lebih lanjut. Homogenkan kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada 5000xg untuk mendapatkan supernatan. Kadar CGRP dan MDA dari supernatan yang dihasilkan ditentukan dengan menggunakan kit immunoassay enzim (CGRP dan MDA ELISA Kit; Bioenzy). Kadar CGRP dinyatakan dengan nilai pg/mL, sedangkan MDA dengan nilai nmol/mL. Data diolah dan dianalisis dengan uji *One way Anova* menggunakan SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL), hasil $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan. Semua data disajikan sebagai *mean \pm standar deviasi*.

HASIL PENELITIAN

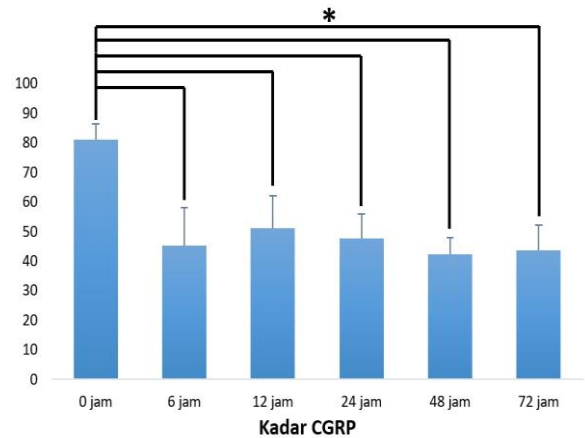
Pada kelompok yang diberikan LPS menunjukkan rerata kadar CGRP dan MDA



Gambar 1. Tingkat kadar MDA sesuai dengan pemberian LPS. Terdapat perbedaan signifikan antar kelompok (* $p < 0,05$)

lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi LPS (0 jam). Tingkat kadar MDA menunjukkan rerata yang meningkat seiring dengan lamanya pemberian LPS, dengan rata-rata terendah 2 nmol/mL pada kelompok 6 jam dan rata-rata tertinggi 2,83 nmol/mL terdapat pada kelompok 72 jam. Tingkat kadar CGRP berfluktuasi dengan rata-rata kadar terendah 42,17 pg/mL terdapat pada kelompok 48 jam dan rata-rata tertinggi 51,12 pg/mL pada kelompok 12 jam.

Hasil uji *One way Anova* untuk kadar CGRP dan MDA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p=0,000$). Uji *Post Hoc LSD* untuk kadar MDA, tampak perbedaan yang signifikan antara kelompok 6 jam dengan kelompok 24, 48 dan 72 jam, sedangkan untuk kelompok 6 jam dan 12 jam tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Gambar 1). Pada uji *Post Hoc LSD* untuk kadar CGRP kelompok pemberian LPS 6, 12, 24, 48, 72 jam, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar masing-masing kelompok (Gambar 2).



Gambar 2. Tingkat kadar CGRP sesuai dengan pemberian LPS. Terdapat perbedaan signifikan antar kelompok (* $p < 0,05$)

PEMBAHASAN

LPS adalah komponen dinding sel bakteri gram negatif, yang umumnya berperan dalam infeksi endodontik dan banyak digunakan untuk menginduksi reaksi inflamasi pada jaringan pulpa gigi secara *in vivo* dan *in vitro* ^(11,12). Selain penggunaan LPS untuk induksi inflamasi, dapat menggunakan teknik dengan memapar pulpa pada rongga mulut agar terinfeksi bakteri. Namun, teknik paparan pulpa pada rongga mulut mempunyai kelemahan karena induksi dengan bakteri dapat menyebabkan perbedaan profil molekuler di antara subjek ⁽¹³⁾. Pada penelitian ini induksi pada pulpa dengan LPS berhasil dilakukan karena terjadi perubahan yang signifikan pada kadar MDA dan CGRP kelompok pemberian LPS dibandingkan dengan kelompok normal (0 jam).

Induksi LPS sebagai mediator yang mengawali proses inflamasi akan menyebabkan peningkatan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , bila inflamasi tidak segera ditangani maka akan terjadi suasana inflamasi yang berlebihan. Suasana inflamasi ini mengakibatkan akumulasi jumlah ROS seperti (H_2O_2 , O_2^- dan OH^-) dalam jaringan, bila jumlah ROS lebih banyak dibandingkan jumlah antioksidan akan menyebabkan stres oksidatif ⁽¹⁴⁾. Stres oksidatif akan mengakibatkan kematian sel dan

kerusakan jaringan. Stres oksidatif dalam jaringan dapat ditentukan dengan kadar MDA⁽¹⁵⁾. Pada penelitian ini, kadar MDA pada kelompok 6, 12, 24, 48, 72 jam menunjukkan peningkatan seiring dengan lamanya pemberian induksi LPS. Hal ini menunjukkan bertambah lama paparan iritan pada pulpa akan menyebabkan suasana inflamasi yang bertambah parah, sehingga stress oksidatif juga meningkat yang ditandai dengan kadar MDA. Peningkatan kadar MDA berkaitan dengan tingkatan keparahan kerusakan jaringan, karena kadar MDA yang meningkat menyebabkan kerusakan sel dan keadaan patologis yang bertambah parah

Stres oksidatif adalah salah satu faktor dan mekanisme penting yang mengatur fungsi fisiologis normal sel saraf dan dapat menyebabkan perubahan di banyak jalur pensinyalan molekuler. Beberapa tahun ini, banyak bukti yang menunjukkan CGRP dapat melawan stres oksidatif^(16,17). CGRP adalah vasodilator yang sangat kuat, sehingga pelepasan peptida ini menghasilkan pembentukan edema, peningkatan aliran darah, dan perekrutan sel inflamasi ke area lokal⁽¹⁸⁾. Pada penelitian ini kadar CGRP pada kelompok normal (0 jam) mempunyai kadar paling tinggi, karena CGRP banyak ditemukan di ujung saraf sensorik pada dentin terutama dari akson bermielin yaitu saraf A-delta. Tingkat kadar CGRP yang fluktuatif pada penelitian ini, berhubungan dengan keadaan patologis jaringan pulpa yang terjadi seiring dengan waktu pemberian. Walaupun secara uji *Post Hoc* tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok 6,12, 24, 48, 72 jam, tetapi menariknya dari rerata tampak hasil yang naik turun.

Pada penelitian ini kadar CGRP yang fluktuatif pada kelompok LPS, menunjukkan hubungan yang masih belum jelas mengenai keterlibatan CGRP dalam stres oksidatif. Pada satu sisi produksi CGRP difasilitasi oleh ROS⁽¹⁹⁾, tetapi disisi lain

CGRP berkaitan dengan peningkatan ekspresi enzim antioksidan^(20,21). Oleh karena itu, tingginya kadar CGRP pada jaringan pulpa sehat dan jaringan pulpa terinflamasi menunjukkan peran CGRP dalam inflamasi, penyembuhan dan regenerasi di dalam pulpa gigi⁽²²⁾.

KESIMPULAN

Perubahan kadar MDA dan CGRP setelah 6 jam pemberian LPS, menunjukkan terjadinya inflamasi pada pulpa. Efek peningkatan kadar MDA pada jaringan pulpa yang terinflamasi, tidak menunjukkan hasil yang berbanding lurus atau sebaliknya dengan kadar CGRP yang cenderung fluktuatif. Peranan CGRP terhadap stres oksidatif yang terjadi pada inflamasi pulpa masih memerlukan investigasi lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hargreaves KM, Berman LH. Cohen's Pathways of the Pulp ed 11. 2016.
2. Zanini M, Meyer E, Simon S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *Journ al Endod.* 2017;43(7):1033–51.
3. Torabinejad M, Walton RE, Fouad AF. *Endodontics PRINCIPLES AND PRACTICE* 5th edition. Elsevier. 2015.
4. Ohkura N, Shigetani Y, Yoshiba N, Yoshiba K, Okiji T. Prostaglandin transporting protein-mediated prostaglandin E2 transport in lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. *J Endod [Internet].* 2014;40(8):1112–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.12.024>
5. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, et al. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *J Dent Res.* 2016;95(2):196–205.
6. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1493–505.
7. Soetojo A, Cahyadi EK, Prasetyo EA. Malondialdehyde expressions on pulp odontoblast cells after application of 2-hydroxyethyl methacrylate mixed with water, ethanol, and acetone solvents. *Saudi Endod J.* 2019;9:96–100.

8. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res.* 2013;54(3):852–8.
9. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in Dental Pulp: The Silent Protagonists. *J Endod.* 2008;34(7):773–88.
10. Berggreen E, Heyeraas KJ. The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret. *J Dent Res.* 1999;78(9):1535–43.
11. Ning T, Shao J, Zhang X, Luo X, Huang X, Wu H, et al. Ageing affects the proliferation and mineralization of rat dental pulp stem cells under inflammatory conditions. *Int Endod J.* 2020;53(1):72–83.
12. Li M, Tian J, Xu Z, Zeng Q, Chen W, Lei S, et al. Histology-based profile of inflammatory mediators in experimentally induced pulpitis in a rat model: screening for possible biomarkers. *Int Endod J.* 2021;54(8):1328–41.
13. Kim SA, Lim SS. T lymphocyte subpopulations and interleukin-2, interferon- γ , and interleukin-4 in rat pulpitis experimentally induced by specific bacteria. Vol. 28, *Journal of Endodontics.* 2002. p. 202–5.
14. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014.
15. Wang H, Ding X, Li S, Zheng H, Zheng X, Navin S, et al. Role of Oxidative Stress in Surgical Cavernous Nerve Injury in a Rat Model. 2015;00(October 2014):1–8.
16. Ding L, Song T, Yi C, Huang Y, Yu W, Ling L, et al. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS) Improves the Diabetic Cytopathy (DCP) via Up-Regulation of CGRP and cAMP. *PLoS One.* 2013;8(2):1–7.
17. Umoh NA, Walker RK, Millis RM, Al-Rubaiee M, R. PG, Haddad GE. Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Cardiomyocyte Survival through Regulation of Oxidative Stress by PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Ann Clin Exp Hypertens.* 2014;2(1):1007–.
18. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099–142.
19. Luca C De, Baldacci F, Mazzucchi S, Lombardo I, Curto L, Ulivi M, et al. CGRP Inhibitors and Oxidative Stress Biomarkers in Resistant Migraine: A Real-Life Study with Erenumab, Fremanezumab, and Galcanezumab. 2021;
20. Dang H, Li J, Liu C, Fu Y. CGRP attenuates hyperoxia-induced oxidative stress-related injury to alveolar epithelial type II cells via the activation of the Sonic hedgehog pathway. 2017;(2):209–16.
21. Liu Y, Zhang S, Xue J, Wei Z, Ao P, Shen B, et al. CGRP Reduces Apoptosis of DRG Cells Induced by High-Glucose Oxidative Stress Injury through PI3K/AKT Induction of Heme Oxygenase-1 and Nrf-2 Expression. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
22. Awawdeh LA, Lundy FT, Linden GJ, Shaw C, Kennedy JG, Lamey PJ. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(3):185–91.