

KONDISI SUBPOPULASI LIMFOSIT PENDERITA *EARLY-ONSET PERIODONTITIS* PENGUNJUNG KLINIK PERIODONSIA RUMAH SAKIT GIGI & MULUT FKGUI

Dewi Nurul Mustaqimah

Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

Dewi Nurul Mustaqimah: Kondisi Subpopulasi Limfosit Penderita *Early-Onset Periodontitis* Pengunjung Klinik Periodonsia Rumah Sakit Gigi & Mulut FKGUI. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2000: 7 (Edisi Khusus): 512-518

Abstract

In the last decade, much attention has been devoted to study immunologic factors in early-onset periodontitis (EOP). This study was designed to investigate peripheral blood lymphocyte subpopulations cells in patients with EOP. 32 patients with EOP and 10 normal healthy control subjects were included in the study. Peripheral blood T-lymphocytes, helper T-cells, suppressor T-cells, B-lymphocytes, natural killer (NK) cells, and the Th/Ts ratio were determined using appropriate monoclonal antibodies and the indirect immunofluorescence method. In the EOP group, T lymphocytes and helper T-cells were found to be significantly lower where as NK cells was significantly higher than the control group. They had normal numbers of B-lymphocytes, suppressor T-cells, and the Th/Ts ratio. These findings could contribute to the science about EOP in Indonesia, and to the immunopathogenesis of EOP.

Abstrak

Dalam dekade terakhir banyak dilakukan penelitian mengenai faktor-faktor imunologi pada penderita *early-onset periodontitis* (EOP). Penelitian ini dilakukan untuk meneliti subpopulasi sel limfosit darah tepi penderita EOP. 32 penderita EOP dan 10 subyek sehat sebagai kontrolnya diperiksa untuk penelitian ini. Limfosit T, Th (helper), Ts (supresor), B, NK (*Natural Killer*), dan rasio Th/Ts ditentukan dengan menggunakan antibodi monoklonal yang sesuai dan dengan metoda imunofluoresensi tidak langsung. Dalam kelompok EOP ditemukan proporsi limfosit T dan sel Th lebih rendah bermakna sedangkan sel NK lebih tinggi bermakna dibandingkan dengan data pada kelompok kontrol. Proporsi limfosit B, Ts, serta rasio Th/Ts-

nya ditemukan normal. Penemuan ini dapat menambah khasanah ilmu mengenai keadaan EOP di Indonesia serta pendalaman mengenai imunopatogenesis penderitanya.

Pendahuluan

Early-Onset Periodontitis (EOP) terdiri dari sekelompok penyakit yaitu *Prepubertal Periodontitis* (PP) lokal dan menyeluruh, *Juvenile Periodontitis* (JP) lokal dan menyeluruh, serta *Rapidly Progressive Periodontitis* (RPP). Penyakit ini terjadi hanya pada individu berisiko tinggi untuk mengeritanya dengan ciri spesifik adanya destruksi periodontal yang berat dan dimulai pada usia muda/ remaja.¹ Destruksi berat pada jaringan penyangga gigi yang terjadi tidak sepadan dengan jumlah plak gigi yang ada. Keadaan tersebut diperkirakan karena adanya peningkatan kepekaan inang. Walaupun tidak dapat disangkal bahwa bakteri periodontal patogen sangat berperan sebagai penyebab EOP, namun keberadaan hanya bakteri tersebut tidak cukup untuk menyebabkan timbul atau berkembangnya penyakit bersangkutan.²

Respons imun lokal maupun sistemik terhadap antigen bakteri berperan penting dalam patogenesis penyakit.³ Yang pertama berperan adalah respons kekebalan selular.⁴ Limfosit T (sel CD3+) berpartisipasi dalam proses inflamasi destruktif penyakit periodontal. Interaksi antara limfosit T *helper* (Th/ sel CD4+) dan limfosit T *suppressor* (Ts/ sel CD8-) penting untuk imunoregulasi diferensiasi sel T maupun B (sel CD19+).⁵ Adanya gangguan imunoregulasi akan menyebabkan terjadinya keadaan patologis pada jaringan periodonsium.¹ Penelitian ini dilakukan untuk meneliti keadaan subpopulasi limfosit penderita EOP diperbandingkan terhadap kelompok individu dengan jaringan periodonsium sehat menggunakan antibodi monoklonal dengan metoda flow sitometri dua warna.

Tinjauan Pustaka

Periodontitis adalah penyakit kronis dengan penyebab multifaktorial.² Penyakit EOP dikaitkan dengan keberadaan bakteri patogen (seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Bacteroides forsythus*), gangguan respons kemotaktik neutrofil dan atau monosit, penyakit autoimun, predisposisi genetik, dan adanya gangguan mekanisme imun (seperti meningkatnya ekspresi molekul MHC *major histocompatibility complex* kelas II, gangguan fungsi sel Th dan Ts, aktivasi poliklonal sel B oleh plak bakteri).^{6,7}

Bakteria di atas ditemukan sebagai mikroflora yang dominan pada lesi periodontal berat.⁸ *P. gingivalis* paling sering ditemukan dengan proporsi lebih tinggi daripada bakteri-bakteri lain dalam plak subgingiva,⁹ sedangkan *A. actinomycetemcomitans* (yang sering dinyatakan sebagai bakteri paling terkait dengan lesi JP) ternyata tidak selalu ditemukan dalam lesi JP.^{10,11} Berdasarkan hasil observasi bahwa sejumlah spesies bakteri didapatkan berhubungan bermakna dengan lesi berat, Kamma dkk (1995)⁸ menyatakan bahwa penyebab dari destruksi periodontal adalah lebih dari satu spesies. Namun keberadaan hanya bakteri saja tidak cukup kuat untuk menimbulkan penyakit.² Pendapat ini juga diperkuat oleh penemuan Schenkein & Van Dyke (1994)¹² serta Gemmel dkk (1996)¹³ bahwa ditemukannya bakteri patogen periodontal tertentu dalam mulut seseorang tidak selalu disertai dengan adanya lesi klinis periodontitis yang secara awal terlihat berupa kerusakan perlekatan.

Keadaan-keadaan di atas menyatakan bahwa ada faktor-faktor lain baik lokal maupun sistemik yang turut berperan.²

Penyakit periodontal selain sebagai infeksi lokal, juga sebagai respons inang yang mengakibatkan rusaknya jaringan ikat. Sistem imun sangat berperan dalam membatasi infeksi dalam sulkus gingiva ataupun jaringan ikat di sekitarnya. Selain itu sistem imun juga mengakibatkan perubahan-perubahan jaringan ikat dalam proses yang kompleks seperti siklus dari destruksi dan rekonstruksi. Leukosit sangat berperan dalam pertahanan periodontal karena banyak bakteri patogen periodontal yang resisten terhadap mekanisme antimikroba dalam serum. Baik dalam inflamasi periodontal akut maupun kronis, neutrofil, monosit, dan limfosit segera berpartisipasi dalam respons imun terhadap penyakit periodontal. Sel neutrofil yang pertama dan segera bergerak ke luar dari pembuluh darah menuju epitel penghubung dan memasuki sulkus untuk menghadapi bakteri sebagai antigen. Kemudian diikuti oleh monosit dan limfosit yang ke luar dari pembuluh darah masuk ke jaringan ikat dan berkembang menjadi makrofag jaringan dan limfosit yang teraktifkan.¹⁴ Selain itu, reaksi imun limfosit T dan B, yang memproduksi berbagai limfokin dan antibodi, merupakan protektor efektif terhadap antigen. Tetapi bila terjadi gangguan fungsi imunoregulasi, reaksi akan terjadi justru ke arah inang berupa perusakan seperti resorpsi tulang alveolar dan kerusakan fibroblast.¹⁵

Jumlah sel T dan B dalam jaringan periodontal sakit ditemukan sekitar 3 kali lipat daripada jaringan sehat.¹⁴ Juga sel T di epitel sulkus lebih banyak daripada di epitel mulut. Bahkan dalam epitel poket sel T lebih sering ditemukan dalam bentuk lapisan, dan hanya kadang-kadang terlihat dalam kelompok-kelompok kecil atau sel tunggal.⁵ Berdasarkan fungsinya, sel T terbagi menjadi T *helper* CD4+ (Th) yang membantu stimulasi sel B untuk berdiferensiasi menjadi sel plasma dan memproduksi antibodi, serta T *suppressor-inducer* yang menginduksi proliferasi sel T *cytotoxic* CD8+ (Tc) atau sel T

suppressor CD8+ (Ts), serta menstimulasi sifat sitotoksik sel imun dan aktivitas membunuh bakteri. Selain itu Th berdasarkan profil produksi sitokin stabilnya, dibagi menjadi Th1 (memproduksi IL-2, IL-3, IL-12, IFN- γ , GM-CSF /*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, serta TNF- β) dan Th2 (memproduksi IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan GM-CSF).^{14,16} Di sini terlihat pentingnya peran sel T dalam fungsi proteksi terhadap penyakit periodontal. Jadi adanya gangguan pada regulasi sel T ataupun fungsi limfosit akan mempermudah progresi penyakit periodontal.¹⁵

Subyek dan Metoda

Pemilihan Subyek

Berdasarkan pemeriksaan klinis dan radiografis periodontal ditetapkan 32 orang menderita EOP di antara para pengunjung klinik Periodonsia Rumah Sakit Gigi & Mulut FKGUI sejak Juli 1999 hingga April 2000, yang memenuhi syarat untuk disertakan dalam penelitian ini. Sebelum ditentukan sebagai subyek penelitian, kepada yang bersangkutan dimintai persetujuannya terlebih dahulu (*informed consent*). Mereka berusia antara 21 hingga 45 tahun (rerata 34 tahun). Syarat-syarat tersebut adalah berusia 18–40 (± 5) tahun, tidak menderita penyakit sistemik, dalam waktu minimal 2 minggu tidak minum antibiotika terutama dari golongan kuinolon dan klindamisin, dalam 3 bulan terakhir tidak mendapatkan perawatan bedah /nonbedah /maupun *maintenance* periodontal. Semua penderita mempunyai kerusakan tulang alveolar berat pada area terkena EOP, dengan skor perdarahan pada probing ≥ 25 dan jumlah gigi goyang ≥ 2 . Subyek kontrol terdiri dari individu sehat berumur 22–46 tahun (rerata 31 tahun), tanpa kerusakan berarti dari bukti radiogram tulang alveolarnya, memenuhi syarat tersebut di atas kecuali keadaan tulangnya, dan secara klinis tidak menderita penyakit periodontal.

Pengambilan Sampel Penelitian

Darah 3 ml diambil dari vena antekubital yang ditampung dalam tabung *vacutainer* dari Becton & Dickinson berisi EDTA cair. Sampel ini segera dianalisis.

Flow Sitometri Dua Warna

Sediakan 6 tabung 12 x 75 mm sekali pakai merk Falcon. Namai A, B, C, D, E, F. Masukkan 100 ul sampel darah ke setiap tabung. Bubuhkan 20 ul reagen A ke tabung A (leucoGate berisi antibodi anti-CD45+ dengan label FITC/ *fluorescein isothiocyanate* dan antibodi anti-CD14 dengan label PE *Phycoerythrin*, untuk memisahkan limfosit dari sel-sel lainnya), reagen B ke tabung B (kontrol, untuk mengontrol adanya kemungkinan ikatan antibodi yang non-spesifik sebab adanya reseptor Fc pada IgG. Tabung ini berisi IgG1 dengan label FITC dan IgG2a dengan label PE), reagen C ke tabung C (CD3+/CD19+ untuk mengidentifikasi sel T dan sel B yang terdiri dari antibodi anti-CD3+ dengan label FITC dan antibodi anti-CD19+ dengan label PE), reagen D ke tabung D untuk mengidentifikasi sel T dan sel Th yang terdiri dari antibodi anti-CD3+ dengan label FITC dan antibodi anti-CD4+ dengan label PE), reagen E ke tabung E (CD3+/CD8+ untuk mengidentifikasi sel T dan sel Ts yang terdiri dari antibodi anti-CD3+ dengan label FITC serta antibodi anti-CD8+ dengan label PE), dan reagen F ke tabung F (CD3+/CD16+CD56+ untuk mengidentifikasi sel T dan sel NK yang berisi antibodi anti-CD3+ dengan label FITC, antibodi anti-CD16+ dengan label PE serta antibodi anti-CD56+ juga dengan label PE) (Tabel 1). Homogenkan setiap tabung dengan cara mengetuk secara perlahan dengan telunjuk. Inkubasikan semua tabung pada suhu ruang di tempat gelap selama 20 menit. Lalu tambahkan 2 ml larutan G (*lysing solution*: NH₄Cl untuk melisiskan sel darah merah) yang telah diencerkan dengan buades 1 : 9 ke setiap tabung. Homogenkan setiap tabung dengan cara mengetuk perlahan

dengan telunjuk. Inkubasikan pada suhu ruang di tempat gelap selama 7 menit. Sentrifugasikan dengan kecepatan 200 x g selama 5 menit. Buang supernatan dengan cara membalik tabung 180° satu kali ke atas kertas saring tanpa diketuk. Pelet berisi limfosit akan tertinggal di dasar tabung. Tambahkan 2 ml bufer FACSflow ke setiap tabung untuk mencuci limfosit. Sentrifugasikan semua tabung dengan kecepatan 200 x g selama 5 menit. Buang supernatan dengan cara sama. Masukkan 500 ul formaldehida 1 % ke setiap tabung untuk memfiksasi sel. Inkubasikan pada suhu 4° C selama 20 menit. Baca dengan FACScan yang sebelumnya telah dikalibrasikan. Penelitian dilakukan secara duplo.

Tabel 1. Antibodi monoklonal dengan label Fluoresens untuk analisis subpopulasi limfosit

Antibodi	Konjugat	Kespesifikan
Anti-CD45+ (anti-Hb1)	FITC	leukosit
Anti-CD14+ (leu-M3)	PE	monosit
IgG1 (clone X40)	FITC	kemungkinan adanya
IgG2a (clone X39)	PE	antibodi nonspesifik
Anti-CD3+ (leu-4)	FITC	T matur
Anti-CD19+ (leu-12)	PE	B
Anti-CD4+ (leu-3a)	PE	Th
Anti-CD8+ (leu-2a)	PE	Ts
Anti-CD16+ (leu-11c)	PE	NK /neutrofil
Anti-CD56+ (leu-19)	PE	NK / T

FITC = *fluorescein isothiocyanate*. PE = *phycoerythrin*, CD = *cluster of differentiation*. Seluruh antibodi dari Becton & Dickinson, USA

Analisis statistik

Kemaknaan hasil-hasil prosedur flow-sitometri dianalisis menggunakan uji Student's t (data-data EOP menunjukkan distribusi normal). Digunakan toleransi nilai p sebesar < 0.05. Pengolahan data dilakukan dengan bantuan *soft ware computer SPSS for MS Windows 9.0*.

Hasil

Tabel 2. menunjukkan keadaan subpopulasi limfosit serta rasio Th/Ts darah tepi penderita EOP dan kelompok kontrol. Proporsi sel T, Th dan NK penderita EOP ditemukan berbeda bermakna dengan proporsi kelompok kontrol. Dalam hal ini proporsi sel T dan sel Th penderita EOP lebih rendah, sedangkan proporsi sel NK-nya lebih tinggi daripada kontrol. Rerata nilai proporsi sel Ts, B, dan rasio Th/Ts penderita EOP tidak berbeda dengan pada kelompok kontrol. Rerata data kelompok kontrol setiap proporsi sel limfosit dan rerata rasio Th/Ts dalam penelitian ini juga berada dalam spektrum nilai standart normal acuan internasional (Becton & Dickinson)(Tabel 3).

Tabel 2. Kondisi subpopulasi limfosit dan rasio Th/Ts darah tepi kelompok *Early-Onset Periodontitis* dan kontrol

Sel	N	Rerata	SD	SE
T EOP	32	61.8438 *	8.8504	1.5695
Kontrol	10	69.8000	5.6332	1.7814
Th EOP	32	31.59 *	7.25	1.28
Kontrol	10	37.70	4.92	1.56
Ts EOP	32	28.63	7.56	1.34
Kontrol	10	30.10	5.26	1.66
B EOP	32	13.75	5.16	0.91
Kontrol	10	14.40	5.99	1.89
NK EOP	32	20.81 *	8.53	1.51
Kontrol	10	12.90	6.94	2.19
Th/Ts EOP	32	1.1800	0.4073	F200E-02
Kontrol	10	1.2930	0.3442	0.1089

* Berbeda bermakna dengan $P < 0.05$

Tabel 3. Nilai rerata setiap proporsi subpopulasi limfosit dan rasio Th/Ts Kelompok kontrol serta nilai rerata acuan internasionalnya (B & D)

Kelompok	T	Th	Ts	B	NK	Th/Ts
Kontrol	69.8	37.7	30.10	14.40	12.90	1.2930
B & D	9.4-84.6	28.5-60.5	11.1-38.3	6.4-22.6	5.6-30.9	0.9-3.6

Karena sel B sangat tergantung kepada regulasi sel Th dan Ts, menurunnya jumlah sel Th (menyebabkan sel B tidak /kurang berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel plasma) serta meningkatnya jumlah sel Ts (menekan sel B untuk tidak memproduksi antibodi) menyebabkan penyakit periodontal yang ada berkembang menjadi lebih berat.¹⁵

Dalam penelitian ini ditemukan jumlah proporsi sel T maupun Th penderita EOP lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrolnya (61.8438 vs 69.8 dan 31.59 vs 37.70). Hal ini diperkirakan sebagai adanya penurunan fungsi pertahanan jaringan pada penderita EOP karena rendahnya kemampuan sel T dan sel Th yang bersangkutan. Malberg dkk (1992)¹⁷ menuliskan sel Th aktif dapat menstimulasi proses-proses imunopatologis baik secara langsung (sebab perannya sebagai sel T *inducer/helper* atau T *effector*) ataupun secara tidak langsung (melalui beberapa limfokin yang diproduksi). Sel Th tersebut dapat beraksi sebagai sel sitotoksik yang mampu menghancurkan fibroblast dan sel epitel. Baker dkk (1999)¹⁸ juga menuliskan adanya peran destruksi dari sel Th dalam kerusakan tulang alveolar melalui produknya yaitu IL-1, IL-2, IL-6, dan IFN- γ . Pada penderita EOP dalam penelitian ini ditemukan rendahnya proporsi sel Th, yang berarti kemungkinan rendahnya kemampuan perusakan fibroblast, sel-sel epitel, dan tulang alveolar, maupun perangsangan sel B untuk berdiferensiasi dan berproliferasi. Rendahnya proporsi sel T maupun Th di sini tidak disertai dengan peningkatan proporsi sel Ts terhadap kontrolnya (28.63 vs 30.10). Berarti mungkin juga tidak ada penekanan terhadap sel B untuk tidak berproliferasi.

Data proporsi sel B dari kelompok EOP di sini relatif tidak berbeda dengan kontrolnya (13.75 vs 14.40), sehingga diperkirakan baik dalam jaringan periodonsium maupun dalam serumnya tidak terlalu padat dengan antibodi. Keadaan ini menunjang penemuan rendahnya proporsi sel T dan Th dalam penelitian ini yang dapat diartikan rendahnya fungsi pertahanan jaringan yang bersangkutan.

Sel NK para penderita EOP ini lebih tinggi bermakna terhadap kontrolnya (20.81 vs 12.90). Data ini menunjukkan meningkatnya populasi sel pembunuh terhadap jaringan periodang yang diinduksi oleh bakteri. Sel NK merupakan bagian dari respons imun selular yang tidak spesifik¹⁵ dan adalah salah satu di antara sel-sel yang bertanggung jawab terhadap sitotoksitas selular yang tanpa pengenalan terlebih dahulu.³ Walaupun hingga kini peran sel NK dalam penyakit periodontal belum diketahui¹³ tetapi lebih tingginya proporsi sel NK darah tepi menggambarkan sel NK menekan proporsi sel T dan sel Th. Diperkirakan pada individu bersangkutan dapat /akan terjadi perusakan sel-sel jaringan yang progresif. Penemuan ini juga berbeda dengan hasil penelitian Cembrangil dkk (1990a)³ pada penderita JP dan RPP. Mereka menemukan hanya sel NK darah tepi yang jumlahnya meningkat sedangkan proporsi sel-sel lainnya tidak berbeda dengan data individu kontrolnya.

Rasio Th/Ts penderita EOP tidak berbeda bermakna dengan pada kontrolnya (1.890 vs 1.2930). Steidley dkk (1992)¹⁹ menyatakan rasio Th/Ts serum sebesar 1 : 1 berkaitan dengan ke tidak mampuan inang untuk berespons dalam reaksi limfosit campuran autolog (*autolog mixed lymphocyte reaction* AMLR, suatu pengukuran imunoregulasi termasuk stimulasi sel Th oleh sel-sel self-T autolog). Bahkan Raber-Durlacher dkk (1991)⁷ menuliskan rasio Th/Ts darah tepi sebesar 1 : 1 sebagai keadaan rendahnya respons sel T terhadap bakteri oral yang berkaitan dengan periodontitis. Rasio Th/Ts yang rendah di serum (rasio 1.75-2 menunjukkan respons imun normal /seimbang) mewakili keadaan rasio di jaringan gingiva yang umumnya lebih rendah lagi. Hal ini menunjukkan adanya kaitan antara penyakit periodontal dengan imunoregulasi dan limfosit T terutama Th.^{2,19} Baik Kinane dkk² maupun Meng & Zheng⁵ menyatakan bahwa rasio Th Ts rendah berkaitan dengan mening-

katnya peradangan gingiva yang ditemukan berupa warna gingiva yang lebih merah bermakna serta skor perdarahan pada probing (*bleeding on probing* /BOP) yang lebih tinggi bermakna. Tetapi dalam penelitian ini tidak didapatkan korelasi antara BOP dengan rasio Th/Ts-nya ($r = 0.2379$).

Walaupun proporsi sel T, Th, dan NK dalam penelitian ini ditemukan berbeda bermakna dengan kontrolnya, tetapi nilai-nilai seluruh proporsi subpopulasi limfosit penderita EOP ini masih dalam lingkup data normal acuan internasional menurut Becton & Dickinson (B & D). Tentunya data kontrol penelitian ini juga berada dalam standart normal acuan B & D tersebut, tetapi perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan acuan data normal subpopulasi limfosit orang Indonesia dengan periodontal sehat, mengingat adanya perbedaan pola penyakit periodontal dan mulut, kebiasaan makan dan gizi, cara hidup, iklim, serta kebudayaan di Indonesia. Dengan demikian keadaan subpopulasi limfosit penderita EOP di Indonesia akan menjadi lebih jelas dan pasti.

Dalam penelitian ini flow sitometri dua warna secara jelas menunjukkan perbedaan antara subpopulasi penderita EOP dan subyek dengan jaringan periodonsium sehat. Data-data proporsi atau jumlah relatif sel T, Th, dan NK penderita EOP berbeda bermakna dengan data-data kontrolnya. Disimpulkan bahwa kemungkinan individu Indonesia dengan EOP mempunyai kemampuan sel T dan Th rendah, dan mungkin rendahnya kemampuan sel T dan Th tersebut sebab adanya penekanan oleh proporsi sel NK.

Penemuan ini bermanfaat bagi khasanah ilmu mengenai keadaan EOP di Indonesia, serta pengembangan imunopatogenesis EOP. Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan pada penderita EOP dengan jumlah subyek lebih besar guna mempertegas hasil penelitian ini, dan untuk mencari data subset limfosit dari individu dengan periodonsium sehat sebagai acuan normal orang Indonesia.

Daftar Pustaka

1. Ebersole JL. Immune Responses in Periodontal Diseases. In: Wilson Jr.TG, Kornman KS, eds. *Fundamentals of Periodontics*. Chicago: Quintessence Publ., 1996; 109-58.
2. Kinane DF, Johnston FA, Evans CW. Depressed helper-to-suppressor T-cell ratios in early-onset forms of periodontal disease. *J Periodont Res* 1989; 24:61-4.
3. Celenligil H, Kansu E, Ruacan S, Eratalay K, Caglayan G. Immunohistological analysis of gingival lymphocytes in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1990a; 17: 542-8.
4. Firatli E, Kantarci A, Cebeci I, Tanyeri H, Sonmez G, Carin M, et al. Association between HLA antigens and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996; 23:563-6.
5. Meng HX, Zheng LF. T cells and T-cell subsets in periodontal diseases. *J Periodont Res* 1989;24:121-6.
6. Carranza Jr.FA. Prepubertal and Juvenile Periodontitis. In: Carranza Jr.FA, Newman MG, eds. *Clinical Periodontology*, 8th ed. Philadelphia: Saunders. 1996; 336-42.
7. Carranza Jr.FA, Adams DF, Newman MG. Rapidly Progressive Periodontitis. Necrotizing Ulcerative Periodontitis, and Refractory Periodontitis. In: Carranza Jr.FA, Newman MG, eds. *Clinical Periodontology*, 8th ed. Philadelphia: Saunders. 1996; 329-35.
8. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodont Res* 1995; 30:66-72.
9. Booth V, Lehner T. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. *J Periodont Res* 1997; 32:54-6.
10. Han N, Xiao X, Zhang L, Ri X, Zhang J, Tong Y, et al. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. *J Periodont Res* 1991; 26:409-14.
11. Lopez NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in Juvenile Periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996; 23:101-5.
12. Schenkein HA, van Dyke TE. Early-onset periodontitis: systemic aspects of etiology and pathogenesis. *Periodontol 2000* 1994; 6:7-25.
13. Genmel E, Woodford V, Seymour GJ. Characterization of T lymphocyte clones derived from *Porphyromonas gingivalis* infected subjects. *J Periodont Res* 1996; 31:47-56.
14. Pietrzak ER, Polak B, Walsh LG, Savage NW, Seymour GJ. Characterization of serum antibodies to *Porphyromonas gingivalis* in individuals with and without periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 65-72.
15. Miyasaki KT. Altered Leukocyte Function and Periodontal Disease. In: Carranza Jr.FA, Newman MG, eds. *Clinical Periodontology*, 8th ed. Philadelphia: Saunders. 1996; 132-50.
16. Zafiroopoulos GKG, Flores-de-Jacoby L, Schoop B, Havemann K, Heymanns J. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets in patients with advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1990; 17:636-41.
17. Nisengard RC, Newman MG, Sanz M. Host Response: Basic Concepts. In: Carranza Jr FA, Newman MG, eds. *Clinical Periodontology*, 8th ed. Philadelphia: Saunders. 1996; 111-20.
18. Malberg K, Molle A, Strener D, Gangler P. Determination of lymphocyte populations and subpopulations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. *J Clin Periodontol* 1992; 19:155-8.
19. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Ropeman DC. CD4+ T Cells and the Proinflammatory Cytokines Gamma Interferon and Interleukin-6 Contribute to Alveolar Bone Loss in Mice. *Infect Immun* 1999; 67:2804-9.
20. Steidley KE, Thompson SH, McQuade MJ, Strong SL, Scheidt MJ, van Dyke TE. A Comparison of T4:T8 Lymphocyte Ratio in the Periodontal Lesion of Healthy and HIV-Positive Patients. *J Periodontol* 1992; 63:753-6.
21. Raber-Durlacher JE, Zeijlemaker WP, Meinesz AAP, Abraham-Impijn L. CD4 to CD8 Ratio and *In Vitro* Lymphoproliferative Responses During Experimental Gingivitis in Pregnancy and Post Partum. *J Periodontol* 1991; 62:663-7.