

HASIL PENELITIAN

EKSPRESI GEN *CYP19* DALAM KULTUR SEL OSTEOBLAS DARI PERIODONTITIS TULANG ALVEOLAR AGRESIF DISTIMULASI DENGAN VITAMIN D DAN ATAU DEKSAMETASON

Dahlia Herawati*, Sri Kadarsih Soejono**, Wayan T Artama*** dan Suryono*

*Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Indonesia

** Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

*** Fakultas kedokteran Hewan, Universitas gadjah Mada

ABSTRAK

Latar Belakang. Estrogen mengatur homeostasis tulang dan disekresikan oleh gonad dan ekstraponad. Selain itu, androgen diubah menjadi estrogen oleh enzim aromatase P450 yang dihasilkan oleh sitokrom P450 aromatase. Ini diproduksi oleh gen sitokrom *CYP19*. Vitamin D berperan dalam mengatur homeostasis kalsium dan ekspresi gen aromatase langsung. Deksametasone bertindak sebagai anti inflamasi, menghentikan peradangan dan meningkatkan kecepatan penyembuhan. Kerusakan parah tulang alveolar di periodontitis agresif dapat terjadi di usia muda.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji ekspresi gen *CYP19* dalam kultur sel osteoblas periodontitis agresif tulang alveolar pasien dengan stimulasi vitamin D dan atau deksametasone.

Metode. Fragmen tulang alveolar dari pasien periodontitis agresif dikultur dalam dimodifikasi F-12 medium dilengkapi dengan serum janin sapi (FBS) 20%, antibiotik (penisilin streptomisin) 5%, dan fungizone 2%. Sel-sel osteoblas yang tumbuh dalam kultur dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok 1: kultur diperlakukan non, kelompok 2: diperlakukan dengan vitamin D 10^{-6} mol/L, kelompok 3: diperlakukan dengan deksametasone 10^{-7} mol/L, dan kelompok 4: diperlakukan dengan kombinasi vitamin D dan deksametasone pada dosis yang sama. Setelah 24 jam perlakuan dihentikan, semua kelompok kultur yang diamati dengan teknik imunositokimia dan menghitung persentase *CYP19* ekspresi gen dan sel osteoblas dalam kultur.

Hasilnya menunjukkan bahwa persentase rata-rata *CYP19* ekspresi gen untuk kelompok 1, 2, 3, dan 4 adalah 44.18, 38.66, 35.26 dan 31.13%, masing-masing, dan perbedaan yang signifikan antara perlakuan dengan $p < 0.05$.

Disimpulkan bahwa perlakuan terbaik untuk meningkatkan jumlah sel osteoblas, adalah kombinasi vitamin D dan deksametasone, walaupun persentase ekspresi gen *CYP19* adalah nilai terendah di antara kelompok. *Maj Ked Gi*; Juni 2011; 18(1): 1-5

Kata kunci: *CYP19*, kultur osteoblas, periodontitis agresif, vitamin D, deksametasone

ABSTRACT

Background. Estrogens regulate bone homeostasis and secreted by gonads and extragonades. In addition, androgens convert into estrogens by P450 aromatase enzyme which produced by cytochrome P450 aromatase. This cytochrome produced by gene *CYP19*. Vitamin D play a role in regulating calcium homeostasis and direct aromatase gene expression. Dexamethasone act as anti inflammatory, stop the inflammation and increase the speed of healing. Severe damage of alveolar bone in aggressive periodontitis could be happened in young ages.

The objective of this study was to examine the gene expression *CYP19* in the osteoblast cell culture of alveolar bone aggressive periodontitis of patients with stimulation of vitamin D and or dexamethasone.

Methods. Fragments of alveolar bone from aggressive periodontitis patients were cultured in modified F-12 medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) 20%, antibiotic (penicillin streptomycin) 5%, and fungizone 2%. The osteoblast cells which grown in the culture were divided into 4 groups. Group 1: non treated culture, group 2: treated with vitamin D 10^{-6} mol/L, group 3: treated with dexamethasone 10^{-7} mol/L, and group 4: treated with combination of vitamin D and dexamethasone at the same dose. After 7 days the treatment were stopped, all group of culture were observed by immunocytochemistry technique and counted the percentage of gene expression *CYP19* and the osteoblast cell in the culture.

The result showed that the average percentage of gene expression *CYP19* for group 1, 2, 3, and 4 were 44.18, 38.66, 35.26 and 31.13%, respectively, and a significant difference among treatment with $p < 0.05$.

It was concluded that the best treatment for increasing the number of osteoblast cells, was the combination of vitamin D and dexamethasone, eventhough the percentage of gene expression *CYP19* was the lowest value among the groups. *Maj Ked Gi*; Juni 2011; 18(1): 1-5

Key words: *CYP19*, osteoblast cell culture, aggressive periodontitis, vitamin D, dexamethasone

PENDAHULUAN

Estrogen merupakan hormon yang normal

dan ada dalam tubuh wanita dan sedikit pada pria. Peran fisiologis estrogen salah satunya adalah pemeliharaan massa tulang. Pada pria, steroid ini pen-

ting untuk fusi epifisis dan pemeliharaan massa tulang pada pria dewasa muda¹.

Androgen dan estrogen merupakan hormon penting dalam mengatur homeostasis tulang, demikian juga pada dimorfisma seksual yang mempengaruhi pertumbuhan dan pemeliharaan tulang. Meskipun estrogen dan androgen dipercaya mempunyai efek langsung pada tulang, beberapa androgen diaromatisasi menjadi estrogen, menimbulkan asumsi bahwa efek skeletal yang sebelumnya diduga disebabkan oleh androgen sebenarnya disebabkan oleh estrogen.² Sebanyak 20-30% laki-laki tua mengalami defisiensi testosteron atau androgen dibandingkan lelaki muda.³

Estrogen ini dapat bersumber dari intragonad (ovarium) dan ekstragonad (fibroblas jaringan lemak dan kulit). Pembentukannya diperantarai oleh enzim aromatase, baik yang ada intragonad atau ekstragonad.¹

Bukti lain ditunjukkan bahwa biosintesis estrogen ekstragonadal berhubungan dengan metabolisme tulang. Aromatase suatu enzim sitokrom P450 terlibat dalam konversi steroid androgenik menjadi estrogen telah dibuktikan ada dalam tulang, dugaan kuat bahwa ekspresi aromatase dalam jaringan memainkan peran penting pada osteoporosis baik pada pasca menopause maupun pada pria.⁴

Aromatase dikode oleh gen tunggal, *CYP19*⁵, dapat dideteksi pada kultur osteoblas manusia dalam penelitian tentang *aromatase activity* dan ekspresi gen *CYP19*. Beberapa studi menunjukkan bahwa penggunaan promoter dan pengaturan ekspresi gen aromatase dalam osteoblas adalah spesifik, berbeda pada tiap-tiap jaringan seperti plasenta, ovarium dan jaringan lemak. Pada penelitian didapatkan hasil bahwa vitamin D dan deksametason adalah stimulator poten pada transkripsi *CPY19*.⁵ Pada proses remodeling terjadi mekanisme homeostasis tulang yang dilakukan oleh estrogen, androgen, gen *CYP19*, yang terdapat pada osteoblas dan estrogen dan androgen dalam darah. Pada periodontitis agresif general, kerusakan tulang alveoler pendukung gigi lebih dari 50% dan terjadi pada usia yang relatif muda. Stimulator paling poten terhadap gen *CYP19* pada kultur osteoblas adalah vitamin D dan deksametason.

Periodontitis adalah inflamasi pada periodontium yang meluas melalui gingiva dan menimbulkan kerusakan jaringan ikat pelekatan dengan gigi. Kerusakan periodontal yang menjadi nyata secara klinis selama dewasa atau awal masa dewasa dikenal sebagai periodontitis agresif.⁶ Lesi periodontitis agresif sering ditandai oleh hilangnya pelekatan ligamen periodontal yang cepat. Kasus ini dideteksi secara klinis melalui kecepatan dan keparahan hilangnya tulang sesudah dilakukan perawatan periodontitis. Lepasnya perlekatan ligamen periodontal yang parah biasanya dihubungkan dengan terjadinya kedalaman

probing sebesar 7 mm atau lebih, hilangnya tulang alveoler parah yang terjadi sampai pada furkasi atau kehilangan tulang alveoler secara radiografik lebih dari 50%, pada usia muda.^{7,8} Pola kerusakan tulang alveoler berbentuk angular dan vertikal didapatkan sekitar molar pertama dan insisivus pertama. Kerusakan tulang yang terlokalisir pada tipe penyakit periodontal tersebut tidak diketahui penyebabnya.⁹

Periodontitis agresif dibedakan dari periodontitis kronis terutama pada: 1) Kecepatan perkembangan penyakit meskipun individu sehat secara umum; 2) akumulasi plak dan kalkulus tidak banyak; dan 3) riwayat keluarga ada juga yang menderita penyakit periodontal agresif, hal ini kemudian mendukung adanya sifat genetik pada periodontitis agresif.¹⁰ Diperkuat bahwa penyakit dengan kejadian bersamaan dalam suatu keluarga merupakan satu refleksi dari pengaruh genetik yang kuat. Sejumlah studi menunjukkan bahwa periodontitis agresif bisa terjadi lebih dari satu orang dalam satu keluarga.⁷

Periodontitis agresif dibedakan menjadi lokal dan general.^{11,8} Periodontitis agresif general lebih banyak dijumpai di klinik seperti yang dilaporkan bahwa di Amerika prevalensi periodontitis agresif lokal dari populasi *adolescent* diperkirakan kurang dari 1%, prevalensi terendah sekitar 0,2%. Pada periodontitis agresif general di Sri Lanka didapatkan 8% dari populasi penyakit periodontal yang diperiksa, demikian menurut.¹²

Bakteri plak pada periodontitis agresif general seperti *Porphyromonas gingivalis* dan *Prevotella* merupakan bakteri anaerob gram-negatif, adapun *Actinobacillus actinomycetemcomitans* merupakan bakteri fakultatif Gram-negatif. Bakteri gram-negatif melepaskan lipopolisakarida (LPS) berasal dari dinding sel dan dilepaskan saat bakteri lisis.¹³ Tindakan scaling & root planing merupakan tindakan awal dari fase terapi penyakit periodontal, yaitu tindakan non-bedah untuk menghilangkan semua deposit pada permukaan gigi. Tindakan tersebut dilakukan untuk menghilangkan LPS sehingga dapat menghentikan kerusakan tulang alveoler.¹⁴

Tulang secara tetap mengalami proses remodeling. Dalam remodeling, tulang diresorpsi terutama pada permukaan, dan diikuti dengan fase pembentukan tulang. Pada dewasa normal, ada keseimbangan antara sejumlah tulang yang diresorpsi oleh osteoklas dan sejumlah tulang yang dibentuk oleh osteoblas.¹⁵

Permasalahannya: Bagaimanakah profil ekspresi gen *CYP19*, dari kultur osteoblas periodontitis agresif general pada tanpa stimulasi dan setelah stimulasi menggunakan vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason?

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji ekspresi gen *CYP19* dalam kultur sel osteoblas periodontitis agresif tulang alveolar pasien dengan stimulasi vitamin D dan atau deksametason.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental mengukur kadar gen *CYP19* kultur osteoblas dari media kultur tulang alveoler periodontitis agresif general, stimulasi langsung menggunakan vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason, sama seperti pada perawatan periodontitis agresif yaitu pada pencangkakan tulang secara lokal atau langsung pada area yang rusak.

1. Pemilihan subjek penderita periodontitis agresif
Penderita periodontitis agresif general, pada Rontgen photo ada kerusakan tulang alveoler lebih 50% dari akar gigi, usia antara 20-35 tahun, 6 orang.
2. Pembuatan kultur osteoblas dan stimulasi vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason.
3. Pemeriksaan *CYP19* menggunakan imunohistokimia

Pemeriksaan kepadatan gen *CYP19* yaitu sampel kultur osteoblas periodontitis agresif general baik tanpa maupun dengan stimulasi vitamin D, deksametason, dan vitamin D + deksametason dilakukan dengan menghitung sel yang terwarnai. Secara rinci cara kerja penelitian sebagai berikut:

1. Kultivasi Tulang:

- a. Mengambil tulang dari kamar operasi; b. Tulang dicuci 3 kali di suhu kamar dengan aquadest steril; c. Tulang direndam dalam Hams-12/F-12 + 20% FBS + Penstrep 5% + fungizone 2% dan disimpan 1 malam dalam 4 °C; d. Tulang diletakkan di cawan petri, dilepaskan trabeculae ; e. Tulang dicuci dengan larutan PBS + Penstrep (100 µg/ml); f. Ditambahkan 10 ml larutan PBS sampai darah dan lemak bersih/hilang; g. Untuk merangsang eksplan, disiapkan plate wells diisi 1 ml media penumbuh dengan pre inkubasi dari plate selama 20 menit, pH 7,2; g. Trabeculae dipotong-potong 1-3 mm; h. Eksplan dibagikan rata dalam cawan-cawan melalui tepi wells; wells didiamkan selama 15 menit, dalam 37°C; i. Eksplan diinkubasi dalam 37°C selama 5-7 hari. Setelah periode tersebut, dicek perkembangan sel-sel yang diluar eksplan, dan medium penumbuh diganti dengan medium penumbuh baru 3 hari sekali. Untuk mengetahui perkembangan eksplan, diamati dengan mikroskop inverted setiap hari; j. Jika sudah konfluen, eksplan tulang dan lapisan sel ditanam dalam wells terpisah. Pelepasan lapisan sel dilakukan dengan tripsinasi.

2. Pelepasan Lapisan Sel

- a. Kultur sel osteoblas diambil dari inkubator;
- b. Menyedot medium pertumbuhan sampai habis; c. Menambahkan PBS hangat, digojok dan dibuang. Diulangi sampai 3 kali; d. Menambahkan tripsin 0,25% ke dalam kultur dan dikerjakan di bawah mikroskop. Bila sel lepas, akan bergerak; e. Untuk menghentikan aktivitas tripsin, ditambahkan Ham-12/F-12 + media penumbuh (FBS 20% + Penstrep 5% + fungizone 2%); f. Setelah sel lepas, dimasukkan dalam tube steril, disentrifuge 3000 rpm selama 3 menit dalam 4°C; g. Pellet yang didapat ditanam di plate wells; h. Di dalam kultur ditambahkan Ham-12/F-12 + media penumbuh (FBS 20% + Penstrep 5% + fungizone 2%) hingga 1ml; i. Disimpan dalam inkubator pada 37°C. Dibiarkan 7-12 hari sampai sel tumbuh dan dilakukan perlakuan terhadap kultur sel.

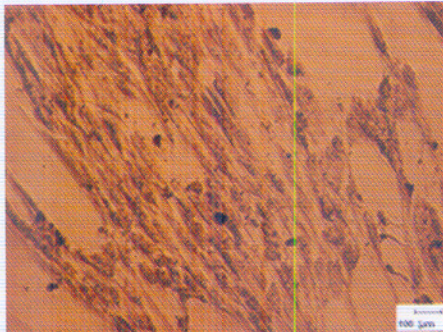
3. Perlakuan kultur eksplan sel:

- a. Mengambil eksplan sel dari inkubator;
- b. Menambah media penumbuh (FBS 20% + Penstrep 5%+fungizone 2%) 1 ml;
- c. Perlakuan :
Kontrol; 2) + DEX 10^{-7} mol/L 0,01 mg; 3) + Vit D 10^{-6} mol/L 0,03ml; 4) + Vit D 10^{-6} mol/L + DEX 10^{-7} mol/L ;
- d. Diinkubasi selama 1 minggu pada inkubator CO₂ 37°C;
- e. Diamati dibawah mikroskop inverted

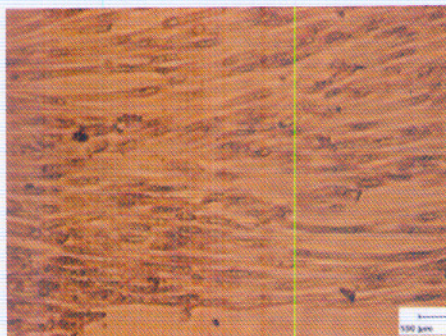
4. Imunohistokimia Eksplan Sel (*CYP19*):

- a. Mengambil kultur sel yang sudah tumbuh;
 - b. Difiksasi methanol, dibilas aquadest; c. Direndam H₂O₂ 3% , 5-10 menit; d. Dicuci aquadest. Dibilas dengan PBS; e. Ditambah blocking normal serum dengan Background erase selama 10-15 menit; f. Dicuci dengan PBS; g. Ditambah antibodi primer dengan *CYP19*; h. Dicuci dengan PBS; i. Ditambah Trekkie universal/Biotin, inkubasi 20 menit; j. Dicuci dengan PBS; k. Ditambah TrekAvidin-HRP Label, inkubasi 10 menit; l. Dicuci dengan air kran; m. Ditambah substrat DAB, inkubasi selama 5 menit; n. Dicuci dengan air kran, keringkan di udara; o. Ditetesi dengan HE/Hematoxilin, diinkubasi 1 menit; p. Dibilas dengan alkohol dan dikeringkan di udara.
- Cara menghitung persentase gen *CYP19* menggunakan Rumus : $\text{positif} / (\text{positif} + \text{negatif}) \times 100 \%$

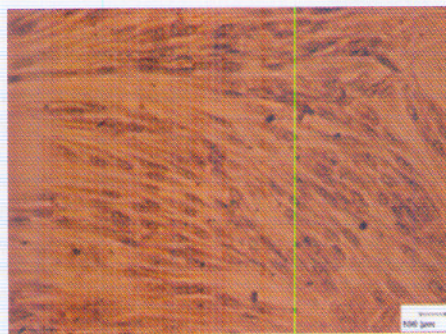
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN



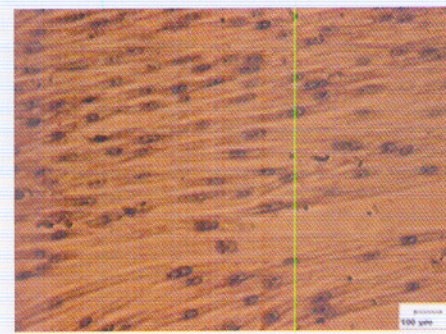
Gambar 1. Kontrol



Gambar 2. Diberi Vitamin D



Gambar 3. Diberi deksametason



Gambar 4. Diberi Vitamin D + Deksametason

Tabel 1. Jumlah rerata osteoblas pada kontrol, stimulasi vit D, Deksametason, Vit D + Deksametason

Rasio	Osteoblas							
	Kontrol		Vitamin D		Deksametason		Vitamin D + Deksa	
	Positif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Jumlah	1798	1589	1927	3157	2475	4379	2175	5004
Rerata	89.9	79.45	96.35	157.85	123.75	218.95	108.75	250.2
Jumlah total osteoblas	6768		5084		6854		7179	
Rerata osteoblas	338.4		254.2		342.7		358.95	

Untuk osteoblas positif, $p=0,001$ ($p<0,005$) berarti bahwa keempat perlakuan menunjukkan jumlah sel osteoblas yang berbeda. Untuk osteoblas negatif, $p=0,000$ ($p<0,001$) berarti bahwa keempat perlakuan menunjukkan jumlah sel osteoblas yang berbeda nyata.

Tabel 2. Data Persentase Ekspresi Gen *CYP19* Penderita Periodontitis Agresif

Lapang pandang	Perlakuan			
	Kontrol (%)	Vit D (%)	Dex (%)	Vit D + Dex (%)
Jumlah	883.67353	773.309526	705.31362	622.747774
Rerata	44.183676	38.6654763	35.265681	31.13738887

$p=0,001$ ($p<0,05$) berarti bahwa keempat perlakuan menunjukkan ekspresi gen yang berbeda nyata.

Peran estrogen yang pada wanita dan pria sama adalah perannya dalam mengatur homeostasis tulang. Pada homeostasis tulang selalu ada resorpsi dan diikuti oleh pertumbuhan atau perbaikan tulang. Kerusakan tulang alveoler yang besar pada periodontitis agresif kemungkinan disebabkan oleh ketidakmampuan osteoblas dalam memperbaiki kerusakan tulang yang dilakukan oleh osteoklas. Osteoblas bertanggung jawab pada proses pembentukan tulang oleh karena itu estrogen lokal yang ada dalam osteoblas menjadi perhatian dalam penelitian ini. Estrogen bersumber pada intragonad dan ekstragonad, namun pembentukannya diperantarai oleh enzim aromatase yang dibuat oleh gen *CYP19*. Dengan asumsi semakin banyak gen *CYP19* semakin banyak aromatase yang terbentuk, dan semakin banyak estrogen yang diproduksi maka penelitian ini selain melihat ekspresi gen *CYP19* juga memberikan stimulasi pada gen tersebut.

Hasil penelitian menunjukkan rerata persentase *CYP19* pada kontrol lebih tinggi dibandingkan setelah stimulasi vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason. Hal ini kemungkinan disebabkan karena: Gen *CYP19* pada penderita periodontitis agresif tidak merespon stimulasi karena adanya gangguan pada gen tersebut. Hal ini sesuai dengan pendapat bahwa periodontitis agresif bersifat kelainan genetik terlihat adanya riwayat keluarga yang juga menderita penyakit periodontal agresif, hal ini kemudian mendukung adanya sifat genetik pada periodontitis agresif.¹⁰ Meskipun peneliti lain menunjukkan adanya peningkatan gen *CYP19*, karena memang tulang yang dipakai pada penelitian tersebut adalah tulang sehat berasal dari potongan tulang yang fraktur dari suatu kecelakaan⁴, pada penelitian ini menggunakan tulang alveolar yang meradang bahkan sudah resorpsi karena berasal dari penderita periodontitis agresif.

Vitamin D akan meningkatkan mineralisasi dan deksametason akan meningkatkan metabolisme molekuler sehingga pengaruh lebih banyak pada osteoblas itu sendiri. Oleh karena itu pada stimulasi vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason meningkatkan pembentukan osteoblas, meskipun pada osteoblas tersebut tidak didapati gen *CYP19*. Osteoblas yang tidak ada *CYP19* (*CYP19* negatif) cukup banyak baik pada yang stimulasi maupun kontrol.

Estrogen, androgen baru dapat berfungsi dalam tubuh setelah berikatan dengan reseptor yaitu reseptor estrogen khususnya alfa dan reseptor androgen. Oleh karena itu gangguan pada pembentukan tulang alveolar setelah mengalami resorpsi bukan hanya pada adanya estrogen dan androgen tetapi juga pada adanya reseptor hormon tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Profil ekspresi gen *CYP19*, dari kultur osteoblas periodontitis agresif general pada tanpa stimulasi dan setelah stimulasi menggunakan vitamin D, deksametason, vitamin D + deksametason dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik untuk meningkatkan jumlah sel osteoblas, adalah kombinasi vitamin D dan deksametason, walaupun persentase *CYP19* ekspresi gen adalah nilai terendah di antara kelompok.

Disarankan selain pemeriksaan ekspresi gen *CYP19* juga diperlukan pemeriksaan reseptor estrogen (ER) dan reseptor androgen (AR).

DAFTAR PUSTAKA

- Jacob TZ: Aromatase dalam ginekologi. *Ethical Digest*, 2005 (13): 32-47.
- Masi L, Becherini L, Gennari L, Amedei A, Colli E, Falchetti A, Farci M, Silvestri S, Gonnelli S, & Brandi ML: Polymorphism of the aromatase gene in postmenopausal Italian women: distribution and correlation with bone mass and fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, 86:2263-2269. Dari jcem.endojournals.org pada 21 September 2005.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Van Herk E, Swinnen JV, & Bouillon R: An Aged Rat Model of Partial Androgen Deficiency: Prevention of Both Loss of Bone and Lean Body Mass by Low-Dose Androgen Placement. *Endocrinology*; 2000, 141:1642-1647.
- Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervia A, Naques X, Mellibovsky L, Carbonel J, Grinberg D, Balcells S, & Diez-Perez A: Regulation of *CYP19* gene expression in primary human osteoblasts: effects of vitamin D and other treatments. *European Journal of Endocrinology*, 2003, 148:519-526. <http://www.eje.org>.
- Enjuanes A, Garcia-Giralt N, Supervia A, Naques X, Ruiz-Gaspa S, Bustamante M, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, & Diez-Perez A: Functional analysis of the I.3, I.6, pII and I.4 promoters of *CYP19* (aromatase) gene in human osteoblasts and their role in vitamin D and dexamethasone stimulation. *European Journal of Endocrinology*. 2005, 153:981-988. <http://www.eje.org>.
- Beck JD & Arbes SJ: Epidemiology of Gingival and Periodontal Disease. In: Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, and Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. Saunders Elsevier. St Louis, 2006: 110- 131.
- Wilson TG & Kornman KS *Fundamentals of Periodontics*. 2nd ed. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago: 2003: 44, 171-184, 312, 323.
- Seiler JS & Herold RW: *The use of systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontal disease*. *General Dentistry*, 2005. www.agd.org. 155-159.
- Carranza FA & Takei HH: Bone Loss and Pattern of Bone Destruction. In: Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, and Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. Saunders Elsevier. St Louis, 2006a: 452-466.
- Novak MJ: Classification of Diseases and Condition Affecting the Periodontium. In: Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, and Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. Saunders Elsevier, St Louis, 2006: 100-109.
- Anonim. Periodontal diseases in children and adolescent. Academy report. *J. Periodontol*, 2003;74:1696-1704.
- Novak KF & Novak MJ Aggressive Periodontitis. In: Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, and Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. Saunders Elsevier, St Louis. 2006b: 506-510.
- Brooks GF, Butel JS & Morse SA: Jawetz, Melnick, & Adelberg's. *Medical Microbiology*. 22th ed., Lange Medical Books/McGraw-Hill. Medical Publishing Division. New York, 2001: 140-141.
- Carranza FA & Takei HH: The Treatment Plan. In: Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, and Carranza FA. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10th ed. Saunders Elsevier. St Louis, 2006b: 626-629.
- Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD & Boyan BD: Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, 1997:14: 158-172.