

저용량 독시사이클린 투여가 만성 치주염에 미치는 임상적 미생물학적 효과

김상준, 엄홍식, 장범석, 이재관*

강릉대학교 치과대학 치주과학교실

Clinical and microbiologic effects of the subantimicrobial dose of doxycycline on the chronic periodontitis

Sang-Jun Kim, Heung-Sik Um, Beom-Seok Chang, Jae-Kwan Lee*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kangnung National University

ABSTRACT

Purpose: Tetracycline and its chemically modified non-antibacterial analogues can inhibit certain host-derived tissue destructive collagenases such as matrix metalloproteinases. The purpose of this study was to evaluate clinical and microbiologic effects of the subantimicrobial dose of doxycycline(SDD) in conjunction with scaling and root planing.

Materials and methods: A total of 30 patients with chronic periodontitis who were going to receive scaling and root planing were randomly allocated to receive either a doxycycline hyclate for 3 months or nothing. Clinical probing depth, clinical attachment level, gingival recession, and bleeding on probing were measured by one periodontist. After a periodontal examination, microbial samples were collected using sterile paper points. The effect of SDD in conjunction with scaling and root planing on alterations of the periodontal pathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*) were also assessed using 16S rRNA polymerase chain reaction.

Results: During the treatment period, clinical parameters for both treatment group and control group were improved. After 3 months, reductions in probing depth and gains in clinical attachment level were significantly greater for the SDD group than control group. Microbial analysis showed that there was no alteration of the periodontal pathogens and no difference between the groups.

Conclusion: This study suggested that the subantimicrobial dose of doxycycline as an adjunct therapy with scaling and root planing might be effective and safe in the management of chronic periodontitis. (*J Korean Acad Periodontol* 2009;39:37-44)

KEY WORDS: subantimicrobial dose of doxycycline; chronic periodontitis; periodontal pathogen.

서론

치주질환은 복합 감염성 질환으로 치주조직의 파괴는 치주 병인균 또는 치주 병인균의 대사 산물에 의해 발생한다. 치주 병인균에 대해 숙주가 과도한 반응을 보일 경우 염증 세포에 의해 matrix metalloproteinase(MMP)와 단백질 분해 효소의 활성도가 증가한다¹⁾. 이 때 활성화된 MMP는 치주조직의 주요 구성물인 교원질을 파괴하여 결합조직의 부

착과 지지골 상실을 유발한다²⁻⁴⁾.

화학요법제는 기계적인 치료방법의 결과를 증진시켜주고, 전통적인 방법으로 치료가 어려운 부위에서 더 나은 결과를 보인다고 알려져 있다. 화학요법제 치료에는 전신적인 항생제 복용, 국소적인 항생제의 적용, 숙주 반응 조절 등의 방법이 있다^{5,6)}.

테트라사이클린은 1940년대 후반부터 치주질환의 치료에 사용되기 시작하였다. 테트라사이클린 계열의 항생제는 혈장보다 치은혈구액 내에 높은 농도로 집중되는 성질, sub-stantivity가 큰 점, 섬유아세포와 결합조직의 부착을 증진시키는 등의 이점이 인정되어 전신적 또는 국소적 적용으로 치주치료에 병용되어져 왔다. 그러나 장기간 항균 효과를 위하여 하루에 100~200 mg의 테트라사이클린을 전신적으

Correspondence: Dr. Jae-Kwan Lee

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kangnung National University, 120 Gangneung Daehangno, Gangneung City, Gangwon Province, 210-702, Korea

E-mail: periojk@kangnung.ac.kr, Tel: 033-640-3199, Fax: 033-640-3113

* 이 연구는 2007년 강릉대학교 학술연구조성비(2007-0103) 지원으로 수행됨.

Received: Dec. 11, 2008; Accepted: Jan. 7, 2009

로 복용하는 것은 세균에 대한 내성 발현 및 위장관 장애 등 기타 전신적인 부작용을 초래할 수 있다⁷⁻¹¹⁾.

최근에는 저용량의 테트라사이클린 계열의 항생제가 항미생물작용과는 무관한 기전으로 교원질분해효소의 활성을 억제하고, 교원질 합성을 증진시키며, 중성구와 파골세포의 기능을 억제하고, 결합조직 및 기저막 분해에 관여하는 MMP를 억제한다는 사실이 밝혀졌다¹²⁻¹⁶⁾.

또한 저용량 독시사이클린(subantimicrobial dose of doxycycline: SDD)이 항생제 투여 시 나타날 수 있는 내성균의 발현 없이 치주조직의 상태를 개선시킬 수 있음을 보고하는 문헌도 있다^{11,17-19)}. 따라서 중증도의 만성 치주염 환자에서 비외과적 치주치료와 저용량 독시사이클린을 병용하면 매우 유용할 것으로 생각된다.

그러나 치주치료에 동반된 저용량 독시사이클린의 임상적 효과와 내성균 발현 여부에 대한 연구는 많았지만 저용량 독시사이클린으로 인한 치주 병인균의 변화에 대한 평가는 거의 없었다.

이 연구는 비외과적 치주치료와 함께 저용량 독시사이클린의 투여가 중증도의 만성 치주염 환자의 치유에 미치는 임상적 효과와 치주병인균에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

강릉대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자 중 4분악으로 나누어 분악 당 4 mm 이상의 치주낭 깊이를 한 부위 이상 가지는 중증도의 만성 치주염 환자 30명을 대상으로 하였다. 연구 대상의 평균 연령은 47.9세(34세~62세)로 남자가 14명, 여자가 16명이었다.

전신질환이 있는 자, 최근 6개월 이내에 치주치료를 받은 경험이 있는 자, 최근 6개월과 실험 기간 동안 항생제 치료를 받은 자, 테트라사이클린 제제에 과민 반응이 있는 자는 연구대상에서 제외하였다.

각 연구 대상에게 실험의 목적 및 취지를 설명하고 동의를 구하였다.

이 연구는 강릉대학교 치과병원 임상시험심사위원회의 승인을 받았다(승인 번호: IRB 2007-8).

2. 연구방법

1) 실험군 설정

30명을 무작위로 추출하여 15명을 실험군으로, 15명을 대조군으로 설정하였다.

대조군은 구강위생교육과 함께 치석제거술 및 치근활택술을 국소마취 하에 4분악으로 나누어 4회에 걸쳐 시행하였다.

실험군은 대조군과 동일한 방식으로 구강위생교육과 치석제거술 및 치근활택술을 시행하고 캡슐당 독시사이클린 20 mg의 SDD 제제(덴티스타®, 하나제약)를 하루 2번씩 3개월간 복용하도록 하였다.

2) 치태 샘플 채취

채취할 부위를 거즈로 닦아내고 공기로 건조시킨 후 멸균된 paper point를 이용하여 30초간 치은 열구에 적용한 후 250 μ l의 멸균된 증류수가 든 Eppendorf tube로 즉시 옮겼다.

4분악으로 나누어 각 분악 당 가장 깊은 부위에서 치태 샘플을 채취하여 한 사람 당 4개의 샘플을 얻었다.

수집된 치태 샘플은 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

3) 임상지수 측정 및 치태 샘플 채취 시기

모든 환자에서 초진 시 임상지수 측정 및 치태 샘플 채취를 시행하였다.

임상지수는 치주낭 탐침 깊이, 치은 퇴축, 임상 부착 수준, 탐침 시 출혈 유무를 측정하였다.

임상지수 측정은 치아의 협측 근원심, 협측 중앙면, 설측 근원심, 설측 중앙면의 6부위에서 시행하였으며, 치주낭 탐침과 치은퇴축량 측정은 Marquis Color coded Probe (Hu-Friedy, USA)를 사용하여 1 mm 단위로 측정하였다.

임상 부착 수준은 백악법랑경계부를 기준으로 치주낭 기저부까지의 거리를 치주낭 깊이 측정 시 동시에 측정하였다.

탐침 시 출혈은 치주낭 탐침 10초 후 치은 출혈이 있는 경우를 1, 없는 경우를 0으로 하였다.

측정자간의 오류를 줄이기 위해 치주과 전공의 한 명이 측정하였다.

치석제거술 및 치근활택술을 4주간 4회에 걸쳐 시행하였고, 실험군의 경우 치석제거술 및 치근활택술 시행과 동시에 SDD 제제를 복용하도록 하였다.

치석제거술 및 치근활택술 시행 종료 1개월(SDD 복용 2

개월), 2개월 후(SDD 복용 3개월)에 임상지수 측정과 치태 샘플 채취를 시행하였다(Fig. 1).

4) 치태 샘플의 DNA 준비

- ① -20°C 의 냉동고에서 보관한 샘플을 37°C 항온 수조에 10분 동안 보관하였다.
- ② Paper point를 제거하고 20초 동안 vortexing 후 5분 동안 13,000 rpm에서 원심분리하였다.
- ③ 상층액은 버리고 멸균된 증류수 $100\mu\text{l}$ 를 넣었다. 20초 동안 vortexing 후 5분 동안 13,000 rpm에서 원심분리하였다.
- ④ 상층액은 버리고 멸균된 증류수 $50\mu\text{l}$ 를 넣었다. 20초 동안 vortexing를 시행하였다.
- ⑤ 25% Chelex 100(BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) $12.5\mu\text{l}$ 를 넣고 56°C 항온 수조에 30분간 보관하였다.

- ⑥ 100°C 끓는 물에 10분 동안 넣은 후 5분 동안 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 새로운 Eppendorf tube에 옮긴 후 -70°C 의 냉동고에 보관하였다.

5) 치주 병원성 세균의 PCR

이 연구에서는 16S rRNA-based polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*의 변화 유무를 검사하였다²⁰⁾.

Ashimoto 등²¹⁾이 제안한 종 특이적 PCR primer를 사용하였고 염기 서열과 증폭 크기는 다음과 같았다(Table 1).

PCR 과정은 다음과 같았다.

- ① AccuPower[®] HotStart PCR PreMix(바이오니아)에 멸균된 증류수 $16\mu\text{l}$, $1\mu\text{M}$ primer 1, $1\mu\text{M}$ primer

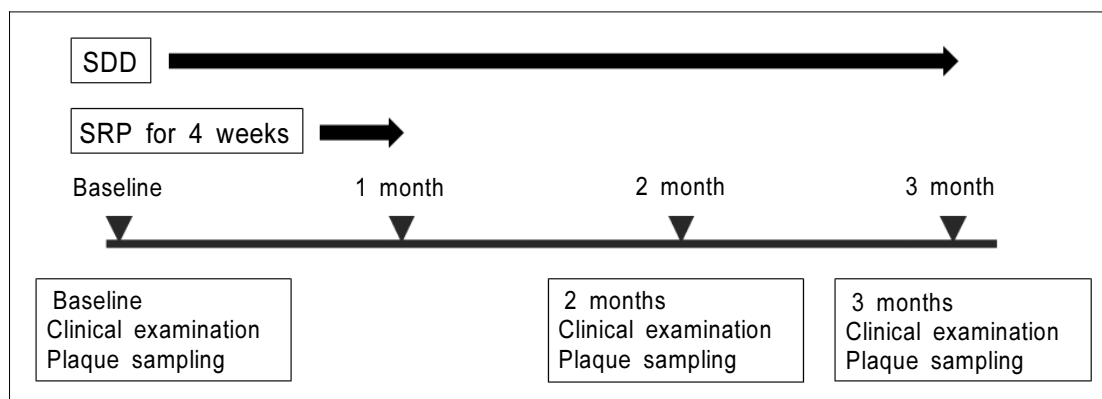


Figure 1. Study design.

* SDD: subantimicrobial dose of doxycycline, SRP: scaling and root planing.

Table 1. Species-Specific Primers Used for PCR

Primer pairs (5'-3')	Size of amplification(bp)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	557
<i>Tannerella forsythia</i> GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641
<i>Porphyromonas gingivalis</i> AGC CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404

2를 넣었다.

- ② 각각의 PCR tube에 genomic DNA를 2 μ ℓ씩 넣어 최종 20 μ ℓ가 되게 하였다.
- ③ 30분 이상 예열된 PCR 기기(GeneAMP PCR SYSTEM 9700[®], Perkin Elmer, USA)에 샘플이 담긴 각각의 PCR tube를 rack에 넣었다.
- ④ 각 세균에 따라 PCR 조건을 세팅한 후 PCR 기기를 작동하였다(Table 2).

6) Agarose gel 전기영동

PCR 과정 후 반응물은 1% agarose gel 전기영동으로 세균종의 존재에 대하여 검사하였다.

3. 통계학적 분석

SDD 제제 복용 후 시간 경과에 따라 같은 대상에서 반복하는 검사치를 분석하기 위해 일반선형모형 중 반복측정 분산분석(Repeated measures analysis of variance)을 사용하였다.

모든 통계학적 분석은 SPSS for Windows 14.0(SPSS Inc., Korea)을 이용하였다.

결과

중등도의 만성 치주염을 가진 30명의 환자를 무작위로 선정하여 대조군은 치석제거술 및 치근활택술을 시행하였고, 실험군은 치석제거술 및 치근활택술과 SDD 제제를 3개월간 투약하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험군 15명 중 4명과 대조군 15명 중 7명은 내원하지 않아 연구 결과에서 제외하여 실험군 11명, 대조군 8명을 대상으로 결과를 얻었다.

1. 치주낭 탐침 깊이

치주낭 깊이의 평균값은 실험군과 대조군 모두 실험 2개월, 3개월 후 치료 전과 비교하여 유의성 있는 감소를 보였다(Table 3)($p<0.01$).

치료 전과 3개월 후 치주낭 탐침 깊이 변화량은 실험군 1.18 \pm 0.39 mm, 대조군 0.79 \pm 0.42 mm로 나타났다. 실험군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 2)($p<0.05$).

Table 2. PCR Thermal Cycle

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> 95 $^{\circ}$ C(2분)–94 $^{\circ}$ C(30초)–55 $^{\circ}$ C(1분)–72 $^{\circ}$ C(2분)–72 $^{\circ}$ C(10분)–4 $^{\circ}$ C(∞) 30 cycles
<i>Tannerella forsythia</i> 95 $^{\circ}$ C(2분)–95 $^{\circ}$ C(30초)–60 $^{\circ}$ C(1분)–72 $^{\circ}$ C(1분)–72 $^{\circ}$ C(2분)–4 $^{\circ}$ C(∞) 36 cycles
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 95 $^{\circ}$ C(2분)–95 $^{\circ}$ C(30초)–60 $^{\circ}$ C(1분)–72 $^{\circ}$ C(1분)–72 $^{\circ}$ C(2분)–4 $^{\circ}$ C(∞) 36 cycles

Table 3. Mean Pocket Depth(Mean \pm SD; mm)

	Baseline	2 months	3 months
SDD	3.68 \pm 0.55	2.73 \pm 0.39*	2.50 \pm 0.38* [†]
Control	3.49 \pm 0.57	2.76 \pm 0.21*	2.70 \pm 0.22*

* : Statistically significant difference compared to baseline ($p<0.01$)

[†] : Statistically significant difference compared to control group ($p<0.05$)

* SDD : subantimicrobial dose of doxycycline

2. 임상 부착 수준

임상 부착 수준의 평균값은 실험군과 대조군 모두 실험 2개월, 3개월 후 치료 전과 비교하여 유의성 있는 감소를 보였다(Table 4)($p<0.01$).

치료 전과 3개월 후 임상 부착 수준의 변화량은 실험군 1.06 ± 0.33 mm, 대조군 0.72 ± 0.28 mm로 나타났다. 실험군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 3)($p<0.05$).

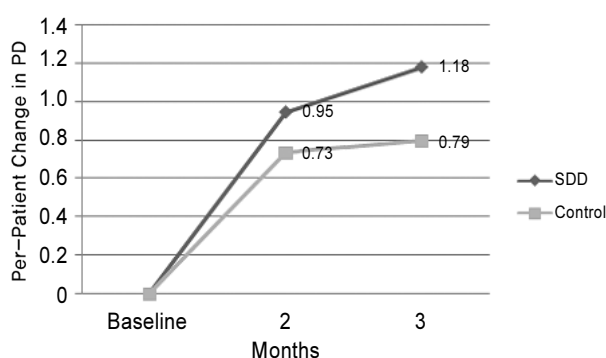


Figure 2. Per-patient change in probing depth.

3. 치은퇴축

치은퇴축량은 실험군과 대조군 모두 실험 2개월 후 치료 전과 비교하여 유의성 있는 증가를 보였다($p<0.05$).

실험 3개월 후 치은퇴축량은 실험군과 대조군 모두 2개월 후에 비하여 감소하여 치료 전과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

치은퇴축 값에서 실험군과 대조군 사이에는 유의한 차이가 없었다(Table 5).

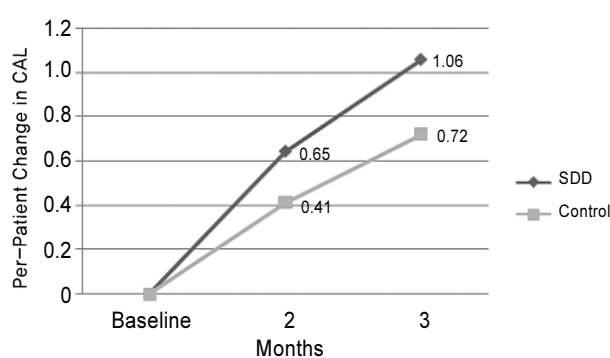


Figure 3. Per-patient change in clinical attachment level.

Table 4. Mean Clinical Attachment Level(Mean \pm SD; mm)

	Baseline	2 months	3 months
SDD	4.55 \pm 0.52	3.90 \pm 0.57*	3.49 \pm 0.44* [†]
Control	4.40 \pm 0.74	3.99 \pm 0.74*	3.68 \pm 0.55*

* : Statistically significant difference compared to baseline ($p<0.01$)

[†] : Statistically significant difference compared to control group ($p<0.05$)

Table 5. Mean Gingival Recession(Mean \pm SD; mm)

	Baseline	2 months	3 months
SDD	0.87 \pm 0.45	1.17 \pm 0.41*	1.00 \pm 0.43
Control	0.91 \pm 0.60	1.23 \pm 0.67*	0.98 \pm 0.53

* : Statistically significant difference compared to baseline ($p<0.05$)

Table 6. Bleeding on Probing(Mean \pm SD; %)

	Baseline	2 months	3 months
SDD	56.88 \pm 21.09	20.47 \pm 9.20*	14.83 \pm 6.87*
Control	55.95 \pm 24.30	24.74 \pm 13.22*	25.73 \pm 18.77*

* : Statistically significant difference compared to baseline ($p<0.01$)

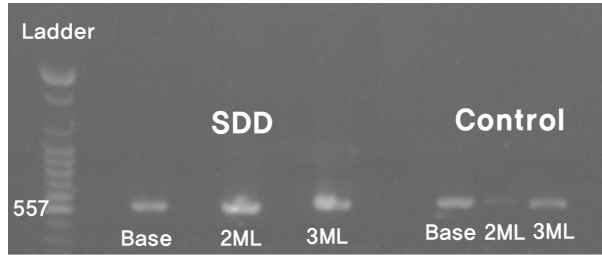


Figure 4. Electrophoresis results of *A. actinomycetemcomitans* PCR amplification.

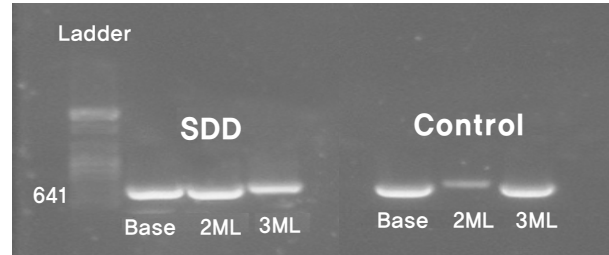


Figure 5. Electrophoresis results of *T. forsythia* PCR amplification.

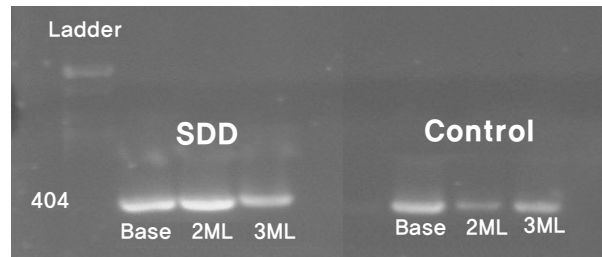


Figure 6. Electrophoresis results of *P. gingivalis* PCR amplification.

4. 탐침 시 출혈

탐침 시 출혈의 빈도는 실험군과 대조군 모두 실험 2개월, 3개월 후 치료 전과 비교하여 유의성 있는 감소를 보였다($p < 0.01$).

탐침 시 출혈 빈도에서 실험군과 대조군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 6).

5. 미생물학적 분석

치주 병인균 3가지 *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*를 검사하여 시간이 지남에 따라 존재의 변화를 알아보았다.

*A. actinomycetemcomitans*가 검출된 샘플의 경우 실험군, 대조군 모두 2개월, 3개월 후에도 검출되었다(Fig. 4).

*T. forsythia*가 검출된 샘플의 경우에도 실험군, 대조군 모두 2개월, 3개월 후 검출되었다(Fig. 5).

*P. gingivalis*가 검출된 샘플의 경우에도 실험군, 대조군 모두 2개월, 3개월 후 전기영동 결과에서 검출되었다(Fig. 6).

연구 대상들의 결과는 같았으며 그 중 대표 그림을 선택하여 삽입하였다.

고찰

치주 조직의 파괴는 세균에 의한 직접적인 손상도 있지만, 대부분은 치주 병인균에 대한 숙주의 면역-염증 반응에 의하여 발생한다. 숙주 조절을 통한 치료는 숙주의 면역-염증 반응의 파괴적 측면을 감소 혹은 변형시켜, 치주 조직의 파괴를 줄이는 것을 목적으로 한다²²⁾.

숙주 조절을 위한 약제로 저용량 독시사이클린(SDD), 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs), bisphosphonates, 법랑 기질 단백질, 성장인자, 골형성 유도 단백질 등이 연구되고 있다²²⁾.

NSAIDs는 그람음성 세균 벽의 lipopolysaccharide(LPS)에 대한 반응으로 중성구, 대식세포, 섬유아세포, 치은상피세포에서 생성되는 prostaglandin E_2 (PGE₂)의 발생을 억제하여, 파골세포에 의한 골흡수 촉진 억제, 섬유아세포의 기능 저해 억제 등 면역 반응에 대한 억제와 조절 효과를 얻게 된다^{23,24)}. 그러나 NSAIDs는 위장관 장애, 혈소판 응집 감소로 인한 출혈, 신장과 간 손상 등의 부작용이 있으며, 장기간의 복용 중 복용을 중지하게 되면 치료 이전의 급속한 치조골 상실이 진행되는 “rebound effect”가 발생한다고 보고되었다²⁵⁾.

20 mg의 저용량 독시사이클린은 테트라사이클린에 비해 흡수율이 높아 장내 세균총에 대한 영향력이 낮아 소화기관 내 부작용이 적고, 소량으로 긴 반감기를 가져 약효가 장기

간 나타나며 치주낭 깊이, 임상 부착 수준, 치은 열구액 내 교원질 분해효소 활성도에서 유의성 있는 개선이 보고되었다^{12-16,26)}.

Caton 등²⁷⁾, Ciancio 등²⁸⁾, Kim 등¹⁹⁾의 연구에서 SDD 제제가 항균 작용과 무관한 기전으로 기계적 치료와 예방치료를 받은 만성 치주염 환자의 몇몇 임상지수를 개선시키고 교원질 분해 효소의 활성을 억제함으로써 치주 조직의 파괴를 억제함을 보고하였다. Genco 등²⁹⁾은 치주질환에서 세균의 유독성과 숙주의 감수성으로 인해 병리적인 MMP의 활성화가 촉진되고 파골세포가 조직의 파괴를 일으키기 때문에 이 MMP의 파괴활성을 감소시키고 제거하는데 목적이 있다고 하였다. Golub 등¹⁵⁾은 SDD 제제가 치주질환 환자의 치은 조직과 치은 열구액 내에 있는 교원질 분해 활성도를 억제하고 중성구 형 MMP(MMP-8,9)만을 선택적으로 억제하며 다른 세균에 대한 효과가 없고 내성이 발생되지 않음을 보고하였다. 이러한 연구 결과는 장기간의 SDD 제제 복용이 내성균의 발현 없이 기계적인 치료의 유용한 보조수단이 될 수 있음을 보여준다.

이 연구에서는 중등도의 만성 치주염 환자에서 치석제거술 및 치근활택술의 비외과적 치료가 치주낭 깊이 감소와 임상 부착 수준 획득, 탐침 시 출혈 감소에서 좋은 결과를 보여주었다($p<0.01$). 이는 비외과적 치주치료가 중등도의 만성 치주염을 효과적으로 치료할 수 있다는 기존의 보고들과 일치한다³⁰⁾. 비외과적 치료와 함께 사용된 SDD 제제는 치주낭 깊이 감소와 임상 부착 수준 획득에서 치료 효과를 더 증진시킴을 보여주었다. 실험 2개월 후의 결과에서 SDD 제제의 사용이 유의한 차이를 보이지 않았지만 3개월 후의 결과에서는 SDD 제제의 사용이 더 나은 치료 효과를 보였다($p<0.05$).

이 연구에서는 3개월간의 SDD 제제 복용이 *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*의 발현 빈도에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다. 이는 장기간의 SDD 제제 복용이 구강 내 세균총에 직접적인 영향을 주지 않는다는 기존의 결과를 뒷받침할 수 있다고 생각된다. 그러나 세균총의 변화나 내성균의 발현을 보다 정확히 알아보기 위해서는 세균의 발현 빈도만을 나타내는 이번 실험 방법보다는 전체적인 세균총의 종류와 양의 변화를 감지할 수 있는 Checkerboard DNA-DNA hybridization이나 Real-time PCR 등이 필요할 것으로 생각된다³¹⁾.

SDD 제제의 복용이 치료 결과를 증진시키고 임상 효과를

유지하는지 더 장기간의 연구가 필요할 것이며, 치주 판막술과 같은 외과적 치료와 함께 SDD 제제를 사용하는 것이 치료 결과에 미치는 영향에 대하여 연구도 더 행해져야 할 것으로 생각된다.

이 실험의 한계 내에서 3개월 간 저용량 독시싸이클린의 병용은 중등도의 만성 치주염 환자에서 치주 병인균의 변화 없이 치주낭 탐침 깊이 감소와 임상 부착 수준 획득의 임상 지수 개선에 효과를 보여주었다.

참고문헌

1. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. J Periodontol Res 1996;31:90-98.
2. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4:197-250.
3. Birkedal-Hansen H. Role of cytokine and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontol Res 1993;28:500-510.
4. Ryan ME, Ramamurthy NS, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. Curr Opin Periodontol 1996;3:85-96.
5. Newman HN. Modes of application of anti-plaque chemicals. J Clin Periodontol 1986;13:965-974.
6. Greenstein G. Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: Assessing the clinical significance of the results. J Periodontol 2006;77:565-578.
7. Reynolds H, Mashimo P, Slot J et al. Use of tetracycline in the treatment of periodontitis. II. Microbiological studies. J Dent Res 1978;57:267.
8. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: Advantages and disadvantages. J Clin Periodontol 1990;17:479-493.
9. Heijl L, Dahlen G, Sundin Y, Wenader A, Goodson JM. A 4-quadrant comparative study of periodontal treatment using tetracycline containing drug delivery fibers and scaling. J Clin Periodontol 1991;18:111-116.
10. Olsvik B, Tenover F. Tetracycline resistance in periodontal pathogens. Clin Infecta Dis 1993;16(Suppl. 4):310-323.
11. Lee JY, Lee YM, Shin SY et al. Effect of subantimicrobial

- dose doxycycline as an effective adjunct to scaling and root planing. *J Periodontol* 2004;75:1500-1508.
12. Golub LM, Wolff M, Lee HM et al. Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontol Res* 1985;20:12-23.
13. Golub LM, Ciancio SG, Ramamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontol Res* 1990;25:321-330.
14. Golub LM, McNamara TF, Ryan ME et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:146-156.
15. Golub LM, Sorsa T, Lee HM et al. Doxycycline inhibits neutrophil(PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
16. Smith GN Jr, Mickler EA, Hasty KA, Brandt KD. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis Rheum* 1999;42:1140-1146.
17. Thomas J, Walker C, Bradshaw M. Long-term use of sub-antimicrobial dose doxycycline does not lead to changes in antimicrobial susceptibility. *J Periodontol* 2000;71:1472-1483.
18. Thomas JG, Metheny RJ, Karakiozis JM, Wetzel JM, Crout RJ. Long-term sub-antimicrobial doxycycline(Periostat) as adjunctive management in adult periodontitis: effects on subgingival bacterial population dynamics. *Adv Dent Res* 1998;12:32-39.
19. Kim YS, Paik JW, Kim CS, Choi SH, Kim CK. Clinical effect of the subantimicrobial dose of doxycycline(SDD) on the chronic periodontitis. *J Korean Acad Periodontol* 2002;32:415-425.
20. Position paper. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004;75:1553-1565.
21. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-273.
22. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's Clinical Periodontology, 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006:813-827.
23. Howell TH, Williams RC. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:177-196.
24. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64(Suppl. 5):432-444.
25. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH et al. Three year trial of flurbiprofen treatment in humans: post-treatment period. *J Dent Res* 1991;70:468.
26. Jeong SN, Han SB. The effects of low dose doxycycline regimen on gingival crevicular fluid enzyme activity of diabetic patients with periodontitis and adult periodontitis patients. *J Korean Acad Periodontol* 1997;27:701-722.
27. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:521-532.
28. Ciancio S, Ashley R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. *Adv Dent Res* 1998;12:27-31.
29. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992;63(Suppl. 4):338-355.
30. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8:57-72.
31. Socransky SS, Smith C, Martin L et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-792.