

بررسی تاثیر غلظت های مختلف تتراسایکلین و زمان های مختلف شستشو بر رشد باکتریال

دکتر محمد توکلی^۱ دکتر احمد مقاره عابد^۲ دکتر نرگس نقش^۳ دکتر انسیه باطنی^۴ دکتر جابر یقینی^{۱#}

۱- استادیار گروه پرودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲- دانشیار گروه پرودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳- دستیار گروه پرودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۴- پرودنتیست

خلاصه:

سابقه و هدف: هدف از این تحقیق بررسی مدت دوام اثرآنتی باکتریال تتراسایکلین در غلظت های مختلف این دارو و زمان های مختلف شستشو بر رشد باکتریال در محیط کشت میکروبی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه ی تجربی که نمونه های آن قطعات ریشه دندان های کشیده شده ی افراد مبتلا به بیماری پرودنتال بود، پس از برداشت جرم و سمان نکروزه بر روی سطح دندان و اکسپوز توپول های عاجی، قطعات ریشه توسط دیسک دو طرفه الماسی بریده شده و داخل اتوکلاو قرار گرفتند. سپس نمونه ها تحت تاثیر تتراسایکلین با غلظت های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، و با زمانهای متفاوت قرار گرفتند. سپس دندان ها در هر گروه به مدت ۱۰ دقیقه، یک و دو هفته با ۲۰ میلی لیتر نرمال سالین شسته شده و پس از آن به محیط کشت میکروبی استرپتوکوک موتانس انتقال داده شدند تا در نهایت از نظر قطر هاله عدم رشد که حاکی از تاثیر آنتی بیوتیک بر روی باکتری است، مورد بررسی قرار گیرند. اطلاعات به دست آمده توسط آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی معنی دار از نظر آماری ($P \text{ value} < 0.05$) در شرایط مختلف آزمون ۱۷/۵ میلی لیتر بود که این رقم هم در گروهی که ۶۰ ثانیه در تتراسایکلین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار داشتند و هم در گروه هایی که ۲۴۰ ثانیه در تتراسایکلین با غلظت های متفاوت بوده و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شسته شده بودند، به دست آمد.

نتیجه گیری: نتیجه مطلوب در گروهی دیده شد که ۱۲۰ ثانیه در تتراسایکلین به غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفته و ۱۰ دقیقه در نرمال سالین شستشو داده شدند.

کلید واژه ها: تتراسایکلین، بیماری پرودنتال، محیط کشت باکتریال

وصول مقاله: ۹۰/۱۱/۹ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۲/۷ پذیرش مقاله: ۹۱/۱/۳۰

مقدمه:

دندان های افراد بالغ به شمار می آید.^(۱) با توجه به ماهیت میکروبی بیماریهای التهابی پرودنتال از یک طرف و در ارتباط بودن باکتری های اختصاصی با اشکال مختلف کلینیکی

بیماری انساج پرودنتال جز شایع ترین بیماری های عفونی دهان محسوب می گردد. این بیماری مهمترین علت از دست دادن

پریودنتیت و از طرف دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیکها به عنوان درمان کمکی در حذف میکروارگانیسم‌های اختصاصی، منطقی به نظر می‌رسد که از تتراسایکلین و مترونیدازول به دلیل تاثیر مثبت آنها بر روی باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی به ویژه در موارد بسیار مخرب و پیشرونده پریودنتیت و مواردی که به درمان‌های معمول جواب نمی‌دهند بیش از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شود. از مسائل قابل توجه در مورد تتراسایکلین‌ها این است که اشکال سنتتیک و طبیعی آن علاوه بر اثرات ضد میکروبی توانایی مهار فعالیت آنزیم‌های کلاژنولیتیک را دارند.^(۲) میزان این دارو در ترشحات لثه به دو تا ده برابر میزان آن در خون می‌رسد. باید توجه داشت که کاربرد این آنتی‌بیوتیک در مقادیر کم و به مدت طولانی به خاطر اثرات جانبی متنوع و همچنین ایجاد سوشهای مقاوم میکروبی توصیه نمی‌شود.^(۳) از جمله اثرات تتراسایکلین عبارتند از: کانی زدایی کردن سطح عاج^(۴)، جذب تتراسایکلین توسط عاج و آزادسازی تدریجی آن^(۵،۶) متوقف کردن روند کلاژنولیتیک ایجاد شده توسط التهاب^(۷،۸) و جلوگیری از چسبندگی لامینین و سلول‌های اپیتلیالی به سطح ریشه دندان.^(۹)

تتراسایکلین حداقل ۱۹ ساعت پس از اولین دوز مصرفی در مایع لثه ای با غلظت ۱۰ تا ۲۰ بار بیشتر از سطح خونی آن آشکار می‌شود.^(۱۰) از طرفی Thomas و همکاران به این موضوع اشاره کردند که کاهش قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم کلاژناز در مایع لثه‌ای بیمارانی که تتراسایکلین را به صورت موضعی استفاده کردند وجود دارد. دوز دارو در این افراد ۲۰ میلی گرم دوبار در روز بود.^(۱۱) همچنین در مطالعه‌ای دیگر دیده شد که تتراسایکلین با دوز ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر از ترشح ترانسفرین آلفا توسط منوسیت‌های تحریک شده توسط سمان جلوگیری می‌کند.^(۱۲)

طی مطالعه‌ای نشان داده شد که میانگین چسبندگی بدست آمده و همچنین کاهش در عمق پروب در ضایعات داخل استخوانی پریودنتال پس از کاربرد داکسی‌سایکلین ۲۵ درصد و ممبران، بیشتر از استفاده از ممبران به تنهایی می‌باشد و

داکسی‌سایکلین همراه با کاهش عفونت در ناحیه باعث افزایش رژنراسیون می‌گردد.^(۱۳) همچنین با استفاده از ممبران قابل جذب محتوی تتراسایکلین بعد از جرم‌گیری و تسطیح سطح ریشه (SRP) scaling and root planing) قابل توجهی در عمق پاکت، شاخص پلاک و خونریزی هنگام پروب کردن بعد از ۲۸ روز در مقایسه با SRP به تنهایی دیده شده است.^(۱۴) از طرفی استفاده ثانویه از دوز پایین داکسی‌سایکلین به همراه جرم‌گیری و صاف کردن سطح ریشه اثر بیشتری در درمان پریودنتیت بزرگسالان داشته است.^(۱۵) اخیراً یک فرمولاسیون جدید از تتراسایکلین تحت عنوان chitosan film معرفی و جهت درمان پریودنتیت تحت آزمایش قرار گرفته است. این فرمولاسیون جدید دارای خواص مکانیکی عالی همراه با ترکیب یکنواخت و قدرت آزادسازی غلظت موثری از تتراسایکلین در پاکت پریودنتال می‌باشد.^(۱۶) از نظر کلینیکی نیز کاربرد موضعی تتراسایکلین خصوصاً داکسی‌سایکلین با دوز پایین در کاهش تحلیل استخوان در زنان یائسه مبتلا به پوکی استخوان تاثیر بسزایی دارد.^(۱۷) اخیراً با بررسی بر روی افراد دیابتیک دارای پریودنتیت مزمن مشاهده کردند که مصرف دوز ساب آنتی میکروبیال داکسی‌سایکلین همراه با SRP در مقایسه با SRP به تنهایی نتایج بهتری در کاهش عمق پاکت و به دست آوردن چسبندگی لثه‌ای داشته است.^(۱۸)

بنابراین با توجه به اثرات مفید آنتی‌باکتریال تتراسایکلین (غلظت بالاتر در محل و با دوز کمتر، پذیرش خوب آن توسط بیمار) و با توجه به شیوع بالای بیماریهای پریودنتال و اثرات جانبی نامطلوب این دارو در کاربرد سیستمیک آن لزوم تحقیق بیشتر در مورد کاربرد موضعی تتراسایکلین احساس می‌شود.^(۱۹،۲۰) اگر تتراسایکلین توسط عاج جذب شده و در طول زمان آزاد شود کاربرد موضعی آن در پاکت پریودنتال می‌تواند راهگشای بسیاری از مسائل باشد.

هدف از این تحقیق بررسی مدت دوام اثر آنتی‌باکتریال تتراسایکلین با غلظت‌های متفاوت تتراسایکلین در زمان‌های مختلف کاربرد آن و همچنین زمانهای متفاوت شستشو با نرمال

سالین در محیط کشت میکروبی است.

(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) که از

مواد و روش ها:

مطالعه حاضر مطالعه ای تجربی و با روش نمونه گیری آسان است. نمونه های مورد مطالعه، دندان های کشیده شده افراد مبتلا به بیماری پریدونتال بود که تعداد آن ها نیز با توجه به فرمول آماری در هر گروه به دست آمد. ابتدا توسط اولتراسونیک اسکیلر جرم های موجود در سطح ریشه و تاج برداشته شد، سمان نکروده به طور کامل حذف گردید تا عاج اکسپوز شود. قطعات ریشه توسط دیسک دو طرفه الماسی به ابعاد 6×6 میلی متر و ضخامت ۲ میلی متر برش داده شدند. سپس قطعات ریشه به طور جداگانه در ورقه های آلومینیوم پیچیده و داخل اتوکلاو قرار گرفتند. نمونه ها به ۴۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند و در کل ۳۶۰ قطعه مورد مطالعه قرار گرفتند.

گروه ها با زمان های متفاوت ۰-۳۰-۶۰-۱۲۰ و ۲۴۰ ثانیه در محلول تتراسایکلین با غلظتهای متفاوت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفتند. برای تهیه محلول تتراسایکلین هیدروکلراید با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر یک عدد کپسول ۲۵۰ میلی گرم تتراسایکلین را در ۱۰ سی سی آب مقطر حل کردیم و به همین ترتیب محلول ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. پس از آن نمونه ها در زمان های مختلف ۱۰ دقیقه، ۱ هفته و ۲ هفته تحت شستشو با ۲۰ میلی لیتر نرمال سالین قرار گرفتند و سپس به محیط کشت میکروبی استرپتوکوک موتانس (*Streptococcus mutans*) انتقال داده شده و ۲۴ ساعت در انکوباتور ماندند تا در نهایت از نظر قطر هاله عدم رشد که حاکی از تاثیر آنتی بیوتیک بر روی باکتری است مورد بررسی قرار گیرند. تتراسایکلین بر باکتری اگریگاتیباکتر اکتینومایستم کومیتانس

پاتوژن های مهم پریدونتال است مؤثر می باشد. ^(۲۱) در این مطالعه از یک سو به دلیل اثربخشی تتراسایکلین بر استرپتوکوک موتانس و سهولت کشت آن ^(۲۲) و از سویی دیگر از آنجا که در مطالعه حاضر هدف بررسی دوام اثر آنتی باکتریال تتراسایکلین بر سطح ریشه دندان می باشد، لذا از محیط کشت میکروبی این باکتری استفاده شده است. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون ANOVA استفاده شد.

یافته ها:

چگونگی واکنش استرپتوکوک موتان نسبت به نمونه آغشته به تتراسایکلین با غلظت های مختلف در جدول ۱ آمده است. در نمونه هایی که ۶۰ و ۱۲۰ و ۲۴۰ ثانیه در غلظت های مختلف قرار گرفته بودند و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شدند، قطرهای قابل توجهی به دست آمد که این تفاوت با گروه های ۰ و ۳۰ ثانیه از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). ماکزیمم میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی معنی دار از نظر آماری در شرایط مختلف آزمون ۱۷/۵ میلی متر بود که این رقم هم در گروهی که ۶۰ ثانیه در تتراسایکلین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار داشتند و هم در گروه هایی که ۲۴۰ ثانیه در تتراسایکلین با غلظت های متفاوت بوده و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شسته شده بودند، به دست آمد.

جدول ۱ - میزان قطر هاله‌ی عدم رشد میکروبی (چگونگی واکنش استریتوکوک موتان نسبت به نمونه آغشته به تتراسایکلین با غلظت های ۱۰۰، ۲۵، ۵۰) میلی گرم بر میلی لیتر بر حسب میلی متر به تفکیک

زمان قرارگیری در تتراسایکلین/ثانیه					
غلظت					
میلی گرم بر میلی لیتر					
۰	۳۰	۶۰	۱۲۰	۲۴۰	زمان شستشو با نرمال سالین
۰	۰	۱۰/۵ ± ۰/۷۳	۱۵ ± ۰/۷۱	۱۷/۵ ± ۰/۷۶	۱۰ دقیقه
۰	۰	۱۵ ± ۰/۷۴	۱۷/۵ ± ۰/۷۹	۱۷/۵ ± ۰/۷۶	
۰	۰	۱۷/۵ ± ۰/۷۶	۱۴ ± ۰/۷۱	۱۷/۵ ± ۰/۷۸	
۰	۰	۸/۵ ± ۰/۷۸	۰	۰	۱ هفته
۰	۰	۰	۰	۹ ± ۰/۷۷	
۰	۰	۰	۰	۶ ± ۰/۷۷	
۰	۰	۰	۰	۰	۲ هفته
۰	۰	۰	۰	۰	
۰	۰	۰	۰	۰	

بحث:

با توجه به نتایج حاصله این طور استنباط می شود نمونه هایی که در تتراسایکلین قرار نگرفته بودند هیچ گونه هاله عدم رشد میکروبی را نشان ندادند که این موضوع کاملاً قابل پیش بینی بود. هیچ کدام از نمونه هایی که ۳۰ ثانیه در تتراسایکلین قرار گرفته و در زمان های ۱۰ دقیقه، ۱ هفته و ۲ هفته با نرمال سالین شستشو داده شدند هاله عدم رشد میکروبی را نشان ندادند که نشان دهنده این است که زمان ۳۰ ثانیه برای نفوذ تتراسایکلین به داخل عاج زمان مناسبی نیست.

نمونه هایی که ۶۰ ثانیه در محلول تتراسایکلین با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفته و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شدند هاله عدم رشد میکروبی به قطر با میانگین ۱۰/۵ میلی متر نشان دادند. در حالی که با دو برابر کردن غلظت آنتی بیوتیک با زمان شستشوی ۱۰ دقیقه، قطری با میانگین ۱۵ میلی متر مشاهده شد که این تفاوت با گروه قبل از نظر آماری معنی دار بود. این موضوع نشان دهنده آن است که افزایش دوز تتراسایکلین تاثیر قابل توجهی در افزایش قطر هاله داشته است. ماکزیمم میانگین قطر هاله عدم رشد میکروبی در شرایط مختلف آزمون ۱۷/۵ میلی متر بود که از نظر آماری

بهترین نتیجه درمانی معنی دار در این مطالعه به حساب می آمد. این رقم هم در گروهی که ۶۰ ثانیه در تتراسایکلین ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفته و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شدند و هم در گروه هایی که ۲۴۰ ثانیه در تتراسایکلین با غلظت های متفاوت قرار داشتند و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شده بودند به دست آمد. تمام نمونه هایی که ۲۴۰ ثانیه در غلظت های مختلف تتراسایکلین قرار داده شده و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شدند قطری با میانگین ۱۷/۵ میلی متر را نشان دادند که چون این رقم در سه غلظت متفاوت تتراسایکلین یکسان بودند و در زمان های کمتر هم این رقم مشاهده شده پس قابل صرف نظر کردن است. از میان نمونه هایی که ۱ هفته در نرمال سالین شستشو داده شده بودند، در گروهی که ۶۰ ثانیه در تتراسایکلین با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر قرار داده شده بود، هاله عدم رشد باکتری به قطر با میانگین ۸/۵ میلی متر مشاهده شد که احتمالاً خطا در مراحل آزمایش بوده است. زیرا در این زمان با غلظت بالاتر تتراسایکلین هاله عدم رشد باکتری دیده نشد. همچنین در گروهی که به مدت ۱۲۰ ثانیه در تتراسایکلین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفتند، احتمال خطا به علت قطر کمتر هاله عدم رشد وجود

دارد. تفاوت آماری در قطر هاله عدم رشد بین هر سه اندازه ۱۰/۵ و ۱۵ و ۱۷/۵ از نظر آماری معنی دار بود. بنابراین قطر هاله عدم رشد بیشتر باید نتیجه درمانی مطلوبتری به حساب آید. تمام نمونه‌هایی که ۲۴۰ ثانیه در غلظت های مختلف تتراسایکلین قرار داده شده و ۱۰ دقیقه با نرمال سالین شستشو داده شدند قطری با میانگین ۱۷/۵ میلی‌متر را نشان دادند که چون این رقم در سه غلظت متفاوت تتراسایکلین یکسان بودند و در زمان های کمتر هم این رقم مشاهده شده پس قابل صرف نظر کردن است. نمونه ای که ۶۰ ثانیه در تتراسایکلین به غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در نرمال سالین شستشوداده شده بود هاله ای با میانگین قطر ۱۷/۵ میلی‌متر را نشان داد که با نصف کردن غلظت آنتی بیوتیک یعنی ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و دو برابر کردن زمان شستشو یعنی ۱۲۰ ثانیه نتیجه‌ای مشابه از نظر آماری حاصل می شود، بنابراین با توجه به این که دوز کمتر برای ما مطلوب تر است، نتیجه مطلوب تر گروهی است که ۱۲۰ ثانیه در تتراسایکلین به غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفته بودند و ۱۰ دقیقه در نرمال سالین شستشو داده شدند. در مطالعه‌ی آزمایشگاهی Stabholz و همکاران در بررسی مقایسه‌ای طول مدت اثر تتراسایکلین و کلرهگزیدین، به این نتیجه رسیدند که ریشه های غوطه ور شده در محلول تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر (حداکثر به مدت ۵ دقیقه)، به مدت ۱۴ روز در محیط کشت میکروبی اثرات ضد باکتریایی خود را حفظ کرده بودند، در صورتی که در محلول تتراسایکلین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر ۱۰ تنها به مدت ۴ روز اثر ضد باکتریایی تتراسایکلین باقی مانده بود. (۲۳) Demirel نیز در مطالعه ای مشابه در بررسی دوام اثرات ضد باکتریایی داکسی سایکلین موضعی به روش agar diffusion inhibition assay بیان کرد که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۱۴ روز داکسی سایکلین از نظر بیولوژیک فعال می باشد و دوام طولانی مدت داکسی سایکلین هیدروکلراید بر سطح ریشه افراد

مبتلا به بیماری پریودنتال را نشان داد و از این فرضیه که سطوح ریشه را می توان به عنوان سوبسترای برای رسوب و رهاسازی آهسته‌ی تتراسایکلین به شکل موضعی دانست، حمایت کرد. (۲۴) در تحقیقی در سال ۲۰۰۴ در بررسی غلظت ماینوسیکلین در محیط کشت حاوی سلول های لیگامان پریودنتال human periodontal ligament cells (HPDLCs)، مشخص شد که غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر این دارو باعث تغییرات مورفولوژیک این سلول ها نمی شود. (۲۵) با توجه به غلظت مطلوب به دست آمده در مطالعه حاضر و همچنین دوز واحد تتراسایکلین احتمال تغییرات مورفولوژیک سلول های لیگامان پریودنتال بعید به نظر می رسد که البته خود، مطالعات بیشتری در این زمینه را می طلبد. از طرفی Shapira نیز نشان داد که تتراسایکلین با دوز ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از ترشح ترانسفرین آلفا توسط منوسیت های سمان تخریب شده جلوگیری می کند که این دوز با دوز مطلوب در تحقیق مورد بحث یکسان است. (۱۲)

نتیجه گیری:

با توجه به قطر هاله عدم رشد گروهی که ۱۲۰ ثانیه در تتراسایکلین به غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر قرار گرفته و ۱۰ دقیقه در نرمال سالین شستشو داده شده بود می توان نتیجه گیری کرد که حضور تتراسایکلین با این شرایط سبب جذب عاجی آن شده که به مرور زمان به دنبال آزادسازی آن می توان انتظار فعالیت آنتی باکتریال تتراسایکلین را در پاکت های پریودنتال داشته باشیم و این موضوع می تواند از راهکارهای درمانی مفید در بیماران دارای پاکت های عفونی باشد.

References:

- 1-Karlsson E, Lymer UB, Hakeberg M. Periodontitis From the Patient's Perspective, A Qualitative Study. *Int J Dent Hyg*. 2009 Feb;7(1):23-30.
- 2-Moghaddas H, Lafzi A. Clinical Comparison Between Bone Blend With And Without Doxycycline in the Treatment of Alveolar Vertical Defects. *J of Dental School, Shahid Beheshti University of Medical sciences*. 1999;(4)16:343-351.
- 3.Ciancio S, Mariotti A. Antiinfective therapy. In: Newman, Takei, Klokkevoid, Carranza. *Clinical Periodontology*. 11th ed. St.Louis. Elsevier Saunders. 2012:484.
4. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root Dentin Morphology After Different Modes Of Citric Acid And Tetracycline Hydrochloride Conditioning. *J Periodontol*. 1992Apr;63(4):303-9.
5. Pataro AL, Franco CF, Santos VR, Cortés ME, Sinisterra RD. Surface effects and desorption of tetracycline supramolecular complex on bovine dentine. *Biomaterials*. 2003 Mar;24(6):1075-80.
6. Rasimick BJ, Wan J, Musikant BL, Deutsch AS. Stability of Doxycycline And Chlorhexidine Absorbed On Root Canal Dentin. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):489-92. Epub 2010 Jan 15.
7. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The Role of Matrix Metalloproteinases in The Oral Environment. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb;65(1):1-13.
8. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix Metalloproteinases: Fold and Function of Their Catalytic Domains. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):20-8.
9. Madison JS, Hokett SD. The Effect of Different Tetracyclines On the Dentin Root Surface Of Instrumented, Periodontally Involved Human Teeth: A Comparative Scanning Electron Microscope Study. *J Periodontol*. 1997Aug;68(8):739-45.
10. Gordon JM, Walker CB, Murphy JC, Goodson JM, Socransky SS. Concentration of Tetracycline In human Gingival Fluid After Single Doses. *J Clin Periodontol*. 1981 Apr;8(2):117-21.
11. 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 Nov;12(2):32-9.
12. Shapira L, Houri Y, Barak V, Halabi A, Soskolne WA, Stabholz A. Human Monocyte Response To Cementum Extracts From Periodontally Diseased teeth: Effect of Conditioning With Tetracycline. *J Periodontol*. 1996 Jul;67(7):682-7.
13. Chaturvedi R, Gill AS, Sikri P. Evaluation of The regenerative Potential of 25% Doxycycline-Loaded Biodegradable Membrane vs Biodegradable Membrane Alone In the Treatment Of Human Periodontal Infrabony Defects: A Clinical And Radiological Study. *Indian J Dent Res*. 2008 Apr-Jun;19(2):116-23.
14. Soares PB, de Menezes HH, Naves Mde M, Taga EM, de Magalhães D. Effect of absorbent tetracycline-loaded membrane used in the reduction of periodontal pockets: an in vivo study. *Braz Dent J*. 2009;20(5):414-8.
15. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, et al. Treatment With Subantimicrobial Dose Doxycycline Improves The Efficacy Of Scaling And Root Planing in Patients With Adult Periodontitis. *J Periodontol*. 2000 Apr;71(4):521-32.
16. Ahmed MG, Harish NM, Charyulu RN, Prabhu P. Formulation And In Vitro Evaluation of Chitosan Films Containing Tetracycline for The Treatment Of Pperiodontitis. *Asian J Pharm*. 2009Aug;3(2):113-9.
17. Payne JB, Reinhardt RA. Potential Application Of Low-Dose Doxycycline to Treat Periodontitis In Post-Menopausal Women. *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):166-9.

18. Deo V, Gupta S, Bhongade ML, Jaiswal R. Evaluation Of Subantimicrobial Dose Doxycycline As An Adjunct To Scaling and Root Planing In Chronic Periodontitis Patients With Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical trial. *J Contemp Dent Pract*. 2010 May 1;11(3):009-16.
19. Greenstein G, Tonetti M. The Role of Controlled Drug Delivery For Periodontitis. The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol*. 2000Jan;71(1):125-40.
20. Singh S, Roy S, Chumber SK. Evaluation of Two Local Drug Delivery Systems As Adjuncts To Mechanotherapy As Compared To Mechanotherapy Alone In Management Of Chronic Periodontitis: A Clinical, Microbiological, And Molecular Study. *J Indian Soc Periodontol*. 2009 Sep; 13(3): 126-132.
21. Bokor-Bratić M, Brkanić T. Clinical Use Of Tetracyclines In The Treatment Of Periodontal Diseases. *Med Pregl*. 2000May-Jun;53(5-6):266-71.
22. Loimaranta V, Tenovu J, Koivisto L, Karp M. Generation Of Bioluminescent Streptococcus Mutans And Its Usage In Rapid Analysis Of The Efficacy Of Antimicrobial Compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998Aug;42(8):1906-10.
23. Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjö UM. Antimicrobial Properties Of Human Dentin Impregnated With Tetracycline HCl Or Chlorhexidine. An in vitro study. *J Clin Periodontol*. 1993Sep;20(8):557-62.
24. Demirel K, Baer PN, McNamara TF. Topical Application Of Doxycycline On Periodontally Involved Root Surfaces In Vitro: Comparative Analysis Of Substantivity On Cementum And Dentin. *J Periodontol*. 1991May;62(5):312-6.
25. Ge SH, Yang PS, Zhao N, Qi XM, Sun QF, Wang Y. Effects of Minocycline On Biobehavior Of Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2004Jul;39(4):284-6.