

## **Влияние стабилизированного диоксида хлора и хлоргексидных (ХГД или СНХ) ополаскивателей рта в живом организме на клетки, вовлеченные в периодонтальное заживление**

Клиницисты могут принять решение назначить использование противомикробного средства для полоскания рта в качестве дополнения к процедурам гигиены полости рта и после хирургических вмешательств, когда физическая гигиена полости рта может быть ограничена хирургическими повязками, швами и ослабленными тканями десны. Лекарственные ополаскиватели могут улучшить вкус, запах и комфорт для пациентов в послеоперационный период. Проблема для клинициста заключается в том, чтобы уравновесить необходимость подавления зубного налета и возможного вредного воздействия на заживляющие ткани, особенно для регенеративных процедур. Слюс заявил о проблеме: «Антисептика, независимо от используемого агента, всегда должна регулироваться двумя основными принципами: максимальная бактерицидная эффективность; минимальное повреждение клеток ткани». Его ответом на проблему был раствор Дакина. Приготовленный из карбоната натрия, хлорированной извести и борной кислоты, раствор Дакина представлял собой 0,5% нейтральный гипохлорит натрия. Лечение Каррела-Дакина широко использовало раствор Дакина в Первой мировой войне и с помощью него было достигнуто значительное улучшение в спасении конечностей и их здоровья.

Диоксид хлора ( $\text{ClO}_2$ ) - это молекулярный свободный радикал, содержащийся в растворах хлорита. Его антимикробная активность может быть вызвана за счет ингибирования синтеза белка. Он окисляет метионин, выводя его из употребления в ведущем триplete бактериальной матричной РНК. Риденур и другие сообщают о его эффективности против вируса полиомиелита, кишечной палочки и других водных патогенов и спор. Ратклифф и Болин сообщили о его эффективности в отношении суспензий пародонтальных патогенов. Как активный ион,  $\text{ClO}_2$  дает мало шансов любому микроорганизму развивать устойчивость.

$\text{ClO}_2$  использовался в коммунальных системах водоснабжения для поддержания низкого количества бактерий и удаления путем окисления неприятных вкусов, цветов и запахов, обнаруженных в некоторых озерных и речных источниках. При обработке воды он имеет преимущество перед хлором в том, что он не генерирует тригалометанов или галогенуксусных кислот, которые могут быть канцерогенными. Было обнаружено, что  $\text{ClO}_2$  полезен для контроля биопленок в системах приготовления пищи, обработки бумаги и оросительной воды.  $\text{ClO}_2$  имеет преимущество в контроле загрязненности ватерлинии в стоматологических отделениях и больничных системах водоснабжения.

Оральное потребление  $\text{ClO}_2$  и хлорита изучалось на людях. В проспективных клинических испытаниях Лубберс и др. не обнаружили никаких физиологических проблем у 10 мужчин, которые пили растворы диоксида хлора в течение 12 недель. У них не было соответствующих изменений показателей жизнедеятельности, изменений при испытаниях клинической химии, уровня тироксина или гематологических показателей. В сопутствующем исследовании у трех мужчин с дефицитом глюкозо-6-фосфата не было никаких изменений после дополнительных 8 недель. В проспективном исследовании, проведенном сообществом, Майкл не обнаружил никаких эффектов, связанных с гематологическим или химическим воздействием сыворотки, у 198 человек по сравнению со 118 не подвергавшимися контролю. Тузилл и др. проанализировали состояние здоровья младенцев и не выявили влияния ни на внутриутробную, неонатальную или младенческую смертность, ни на долю недоношенных детей. Каниц наблюдал за родами в течение 2 лет и не обнаружил статистически значимых отличий от норм низкого веса при рождении или преждевременных родов. Обзор токсичности не выявил известного риска при использовании воды, обработанной  $\text{ClO}_2$ , в диализных отделениях.

Имеется несколько сообщений об использовании  $\text{ClO}_2$  для контроля зубного налета или лечения гингивита. Свежесмешанная форма  $\text{ClO}_2$  имела некоторые полезные эффекты, но ее pH был

слишком низким для комфортного дальнейшего использования. Стабилизированный фосфатным буфером ClO<sub>2</sub> при открытом использовании имел преимущества, заключающиеся в уменьшении кровотечения и глубины пародонтального кармана. Нет информации об его использовании в послеоперационных ситуациях и очень мало информации о стабилизированном ClO<sub>2</sub> и его влиянии на клетки. В тестах на кожных фибробластах лошадей сравнивали свежеприготовленный раствор хлористой кислоты и диоксида хлора с хлоргексидином (ХГД). Все концентрации ХГД были токсичными для фибробластов, а концентрации 0,05% и более были летальными, как было определено исключением трипанового синего. Продукт с хлорной кислотой, разведенный в соотношении 10: 1, не был токсичным, но при использовании в полном объеме или в разбавленном виде 1: 1 был смертельным. Сопутствующие тесты против золотистого стафилококка показали, что эффективны были только неразбавленная хлористая кислота-диоксид хлора и ХГД в концентрации 0,5% и более. Этот раствор хлористоводородной кислоты и диоксида хлора имел низкий pH около 3-4; нет никаких сообщений относительно клеточной токсичности нейтральным, стабилизированным буфером ClO<sub>2</sub>.

В настоящее время целью исследования было определение в живом организме эффектов стабилизированного буфером ополаскивателя рта с диоксидом хлора на культурах клеток, участвующих в заживлении пародонта. Оценка проводилась как количественными методами измерения меченого тритидом тимидина как косвенным параметром пролиферации клеток, так и колориметрическим анализом для количественной оценки гибели и лизиса клеток, основанным на измерении активности лактатдегидрогеназы, выделяемой из цитоплазмы поврежденных клеток в супернатант.

## Материалы

Фибробласты десны человека (ФДЧ) были выделены из образца, взятого из десны здорового взрослого пациента. Первичные культуры фибробластов были приготовлены и выращены в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) + 10% эмбриональной сыворотки теленка (FCS). Время удвоения для этих клеток составило 48 часов. Клетки периодонтальной связки выделяли с поверхности корня здорового, свежедобытого третьего моляра и выращивали в среде DMEM + 10% FCS. Эти клетки росли медленнее, чем ФДЧ, и имели время удвоения 84 часа. Остеобласты были получены из доступной мышинной клеточной линии (MC3T3-E1), установленной путем последовательного расщепления коллагеназой эмбриона C57BL / 6 / плода кальварии. У них было время удвоения 48 часов. Остеобласты выращивали в MEM + 10% FCS для слияния, трипсинизировали и подсчитывали в гемоцитометре для корректировки плотности клеток для анализов.

Коммерчески доступное средство для полоскания рта с ClO<sub>2</sub>, 0,1% ClO<sub>2</sub>-0,2% фосфатный буфер в деионизированной воде, использовали в полном объеме и в шести серийных разведениях по 50% в сочетании со средой для анализа непосредственно перед использованием для обеспечения свежести: 0,10, 0,050, 0,025, 0,0125, 0,00625 и 0,00313%. В качестве контроля использовалась коммерчески доступная жидкость для полоскания рта с ХГД, 0,12% глюконата хлоргексидина в 11,6% спирта, в полной концентрации и в разведениях (0,12, 0,060, 0,030, 0,015, 0,0075 и 0,00375%). Неоспоримые клетки также были использованы.

Все клеточные линии выращивали до слияния, высвобождали с трипсином, подсчитывали, ресуспендировали в культуральной среде и разделяли на 96-луночные планшеты для микротитрования. Их инкубировали с тестовыми концентрациями в течение 30 минут. Чтобы оценить влияние агентов на пролиферацию клеток, после контрольного ополаскивателя клетки промывали культуральной средой и инкубировали со средой, дополненной [3H]-тимидином (50-100 000 ЧИМ на чашу). Клетки инкубировали в течение ночи, промывали и лизировали в 0,1%

додецилсульфате натрия, детергенте, который разрушает клеточную мембрану, а радиоактивность измеряли в сцинтилляционном счетчике. Все анализы были выполнены в трех экземплярах.

Анализ лактатдегидрогеназы проводили по набору инструкций производителя для измерения цитотоксического потенциала растворимых веществ путем анализа активности цитоплазматического фермента, высвобождаемого поврежденными клетками. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) быстро высвобождается в клеточный супернатант при повреждении плазматической мембраны. Во всех анализах использовали концентрацию клеток  $10^5$  кл / мл в культуральной среде, в которой использовался формат 96-луночного планшета. Активность ЛДГ определяется сопряженной реакцией, при которой соль нитротетразолия синего (СНС) восстанавливают до красителя формазана, а полученный цвет измеряют путем измерения оптической плотности при 500 нм. Диапазон чувствительности этого набора составляет от 3,91 мЕд / мл до 62,5 мЕд / мл. Все анализы были в трех экземплярах.

Дисперсионный анализ нескольких групп был использован для выявления различий между группами лечения. Значимость была установлена при  $P < 0,05$ .

## Результаты

В анализах поглощения меченного тритием тимидина  $^{3}H$  вызывал значительную гибель клеток при 0,1 и 0,05%, но при меньших концентрациях гибель клеток значительно не увеличивалась, по сравнению с контрольной группой. Все концентрации ХГД вызывали значительную гибель клеток всех протестированных типов клеток ( $P < 0,05$ ). При всех концентрациях ХГД, за исключением 0,003%, имела место полная гибель клеток, и при этой концентрации гибель клеток была значительно выше, чем в контрольных группах ( $P < 0,05$ ). Эти результаты были согласованы для всех трех клеточных линий - ФДЧ, периодонтальной связки и остеобластов.

Высвобождение ЛДГ из ФДЧ не отличалось от такового у контролей при любой концентрации  $ClO_2$ . ХГД при 0,12-0,015% показал значительно большее выделение ЛДГ, чем  $ClO_2$  или контрольные группы ( $P < 0,05$ ). Для линии клеток периодонтальной связки  $ClO_2$  при всех концентрациях не показал какого-либо значительного увеличения высвобождения ЛДГ по сравнению с контрольными группами, однако ХГД при 0,12-0,03% обладал значительно более высоким высвобождением ЛДГ, чем  $ClO_2$  и контрольные группы ( $P < 0,5$ ). Остеобласты не показали какого-либо значительного увеличения ЛДГ при  $ClO_2$ . ХГД при 0,12-0,015% показал значительно большее выделение ЛДГ остеобластами, чем  $ClO_2$  и контроли ( $P < 0,05$ ).

## Обсуждение

Диоксид хлора в качестве стабилизированной буфером жидкости для полоскания рта оказывал минимальное влияние на ФДЧ, клетки периодонтальной связки и остеобласты. Только в самых высоких концентрациях  $ClO_2$  оказывал влияние на пролиферацию клеток, и не было значительного влияния на высвобождение ЛДГ в любых клетках при любых концентрациях. Стабилизированный буфером ополаскиватель для рта с  $ClO_2$  активен против летучих соединений серы, что делает его хорошим выбором против неприятного запаха изо рта и, возможно, для лечения пародонта. Несмотря на то, что мало исследований было проведено с этим препаратом, его антибактериальная активность и низкая токсичность дают знать, что он будет эффективным послеоперационным средством для промывания.

Хлоргексидиновые жидкости для полоскания рта в настоящее время популярны в качестве дополнения для гигиены полости рта и контроля зубного налета. Антимикробная активность ХГД в искусственных условиях заключается в разрушении мембран бактериальных клеток и преципитации их цитоплазмы. Его вирулицидный эффект заключается в инактивации ДНК-полимеразы. ХГД связывает карбонильные, сульфатные и фосфатные группы и может препятствовать адсорбции бактерий. Активность ХГД в природных условиях рассматривается как скопившаяся бактериальная цитоплазма; но что это может сделать с клетками хоста?

ХГД оказывает негативное влияние на различные культуры клеток, обнаруженных в тканях пародонта. Применение ХГД к корневым поверхностям снижает крепление HGF. ХГД при 0,001% ингибирует включение [<sup>3</sup>H]-лейцина в белок с помощью HGF и вызывает высвобождение [<sup>51</sup>Cr] из HGF, фибробластов крайней плоти и клеток HeLa. ХГД на уровне 2,0% вызывал эпителиальный гиперкератоз в щечном мешке хомяка, некоторую гиперхромазию и удлинение желудка. ХГД повлиял на уплотнение липидов в мембранах эпителиальных клеток щеки. ХГД при 0,1 мМ был летален для эпителиальных клеток кожи человека. ХГД в концентрации 0,02% был токсичным для клеток HeLa в культуре. В 1 мМ ХГД лизировал эритроциты человека. При 0,02% ХГД вызывал повреждение клеток полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯ) и ингибировал хемотаксическую реакцию клеток ПМЯ на фМЛФ. ХГД на 0,2% препятствовал миграции ПМЯ в искусственной среде. Макрофаги показали цитотоксичность при поглощении трипанового синего при 0,005% ХГД.

СНХ повлиял на микроциркуляцию в щечном мешке хомяка, вызывая воспаление. СНХ в 0,02 и 0,12% уменьшил сложность разрыва кожи крысы. СНХ, применяемый после операции на открытых ранах нёба, препятствует заростанию раны, что приводит к большему количеству грануляционной ткани, отсутствию закрытия эпителия и вредному воздействию на кость. СНХ, введенный в целлюлозные губки, имплантированные подкожно в спину крыс, вызывал увеличение гиалуроновой кислоты, но задержку образования коллагена. Когда раны на открытой коже у собак промывали СНХ или раствором Рингера с лактатом в качестве контроля в течение 24 дней, клинически и гистологически не было выявлено различий. СНХ при 0,05% в растворе Рингера с лактатом использовали в качестве лаважа для голеностопного сустава у шести лошадей и вызывали хромоту, выпот, отек, болезненность, кровянистую синовиальную жидкость, изъязвление синовиальной оболочки, воспаление и увеличение количества макрофагов и ПМЯ, которые не были разрешены через 8 дней. Использование 0,0005% СНХ и ЭДТК в трис-буфере в качестве лаважа для голеностопных суставов у лошадей вызывало хромоту, выпот в суставах и кровянистую синовиальную жидкость, которые исчезли в течение 8 дней.

Наше исследование подтверждает вышеприведенные высказывания о том, что СНХ токсичен для клеток человека, имеющих отношение к заживлению пародонта, и включает культивируемые костные клетки, которые ранее явно не тестировались. Имеются клинические отчеты о средствах для полоскания рта с СНХ, применяемых после операции у людей и собак для контроля зубного налета, которые описывают хорошие результаты. Тем не менее, в случаях регенеративных процедур, когда СНХ может проникать в поддесневые области, где СНХ может разрушать новые и слабые грануляции из пародонтальной связки или кости, может быть риск. Можно было бы подумать о том, чтобы не использовать СНХ, пока не сформируется новый эпителиальный слой. Это обычно от 6 до 7 дней заживления при операции пародонтального лоскута; но после процедуры регенерации ткани может не быть уплотнения, пока барьер не будет удален.

Стабилизированный диоксид хлора может быть более безопасным для клеток во время заживления пародонта. ClO<sub>2</sub> не содержит алкоголя, чего не сказать о СНХ, поэтому, возможно, СНХ иногда и вызывает поражения слизистой оболочки полости рта. ClO<sub>2</sub> не вызывает окрашивания зубов, восстановительных или мягких тканей, как делает СНХ. ClO<sub>2</sub> не вызывает образования зубных камней, как сообщается для СНХ. Сообщалось, что ClO<sub>2</sub> не влияет на вкус и не

вызывает аллергические реакции, в отличие от СНХ. В отличие от СНХ, ионы свободных радикалов  $\text{ClO}_2$  не позволяют развиваться устойчивым видам.

### **Выводы**

Ополаскиватели для рта со стабилизированным диоксидом хлора менее токсичны, чем хлоргексидиновые для фибробластов десны человека, клеток периодонтальной связки и линии клеток остеобластов в искусственной среде. Пробирочные испытания на клеточных монослоях могут быть не совсем применимы к терапии, поэтому клиническую значимость результатов еще предстоит изучить.

## Effects of stabilized chlorine dioxide and chlorhexidine mouthrinses in vitro on cells involved in periodontal healing

Clinicians may elect to prescribe the use of an antimicrobial mouthrinse as an adjunct to manual oral hygiene procedures and after oral surgical procedures when physical oral hygiene may be limited by surgical dressings, sutures, and tender gingival tissues. Medicated mouthrinses might improve taste, odor, and comfort for patients during the postsurgical period. The problem for the clinician is balancing the need for plaque suppression and a possible detrimental effect on healing tissues, especially for regenerative procedures. Sluss<sup>1</sup> stated the problem, "Antisepsis, whatever the agent employed, must always be regulated by two cardinal principles: the maximum germicidal efficiency; the minimum injury to the tissue cells." His answer to the problem was Dakin's solution. Prepared from sodium carbonate, chlorinate lime, and boric acid, Dakin's was a mild 0.5% neutral sodium hypochlorite. The Carrel-Dakin treatment used Dakin's solution extensively in World War I and achieved a remarkable improvement in saving life and limb.<sup>2</sup>

Chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) is a molecular free radical found in chlorite solutions.<sup>3</sup> Its antimicrobial activity may be by inhibiting protein synthesis.<sup>4</sup> It oxidizes methionine, removing it from use in the lead triplet of bacterial messenger RNA.<sup>5</sup> Ridenour et al. reported its effectiveness against polio virus, *E. coli* and other water pathogens, and spores.<sup>6-8</sup> Ratcliff and Bolin reported its effectiveness on suspensions of periodontal pathogens.<sup>9</sup> As an active ion, ClO<sub>2</sub> offers little chance that any microorganism could develop resistance.

ClO<sub>2</sub> has been used in community water systems to maintain low counts of bacteria and to remove, by oxidation, the bad tastes, colors, and odors found in some lake and river sources.<sup>10</sup> In water treatments, it has an advantage over chlorine in that it generates no trihalomethanes or haloacetic acids that might be carcinogenic.<sup>11</sup> ClO<sub>2</sub> has been found useful in control of biofilms in food preparation,<sup>12</sup> paper processing,<sup>13</sup> and irrigation water systems.<sup>14</sup> ClO<sub>2</sub> has benefit in control of waterline contamination in dental units<sup>15,16</sup> and hospital water supplies.<sup>17</sup>

ClO<sub>2</sub> and chlorite ingestion has been studied in humans. In prospective clinical trials, Lubbers et al. found no physiological problems in 10 men who drank chlorine dioxide solutions for 12 weeks. They had no relevant alterations of vital signs, serum clinical chemistry, thyroxine levels, or hematological parameters.<sup>18-20</sup> In a companion study, three men with glucose-6-phosphate deficiency had no alterations after an additional 8 weeks.<sup>21</sup> In a community-based prospective study, Michael<sup>22</sup> found no hematological or serum chemistry exposure-related effects in 198 persons, compared with 118 non-exposed controls. Tuthill et al. reviewed infant health and found no effect on fetal, neonatal, or infant mortality, nor on proportion of premature infants.<sup>23</sup> Kanitz<sup>24</sup> followed births for 2 years and found no statistically significant difference from controls for low birth weight or preterm delivery. A review of toxicity found no known risk in using ClO<sub>2</sub>-treated water in dialysis units.<sup>25</sup>

There are a few reports on use of ClO<sub>2</sub> for plaque control or gingivitis therapy. A freshly mixed form of ClO<sub>2</sub> had some beneficial effects, but its pH was too low for comfort or continued use.<sup>26</sup> A phosphate buffer-stabilized ClO<sub>2</sub> in open-label use had the benefits of reduced bleeding and probing depths.<sup>27,28</sup> There is no information on use in postsurgical situations and very little information on stabilized ClO<sub>2</sub>.

\* Department of Orofacial Sciences, University of California, San Francisco, California

† Private Practice

‡ Department of Preventive and Restorative Dental Sciences, University of California San Francisco, California

The authors have no financial relationship to the manufacturers of any products used or mentioned in this article.

and its effect on cells. Tests on equine dermal fibroblasts compared a freshly mixed chlorous acid-chlorine dioxide solution with chlorhexidine (CHX).<sup>29</sup> All concentrations of CHX were toxic to the fibroblasts, and concentrations of 0.05% and greater were lethal, as determined by Trypan blue exclusion. The chlorous acid product diluted 10:1 was not toxic, but when used full strength or diluted 1:1, was lethal. Companion tests against *Staphylococcus aureus* found that only undiluted chlorous acid-chlorine dioxide and CHX at 0.5% and greater strengths were effective.<sup>29</sup> That chlorous acid-chlorine dioxide solution had a low pH of about 3-4; there are no reports concerning cell toxicity by a neutral, buffer-stabilized ClO<sub>2</sub>.

The aim of the present study was to determine the in vitro effects of a buffer-stabilized chlorine dioxide mouthrinse on cultures of cells involved in periodontal wound healing. Assessment was both by quantitative methods of measuring tritiated thymidine DNA labeling as an indirect parameter of cell proliferation and by a colorimetric analysis for quantification of cell death and cell lysis, based on the measurement of lactate dehydrogenase activity released from the cytoplasm of damaged cells into the supernatant.

#### Methods and Materials

Human gingival fibroblasts (HGF) were isolated from a specimen taken from the gingiva of a healthy adult patient. Primary cultures of fibroblasts were prepared and grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)+10% fetal calf serum (FCS). The doubling time for these cells was 48 hours. Periodontal ligament cells were isolated from the root surface of a healthy, freshly extracted third molar and were grown in DMEM+10% FCS. These cells grew slower than HGF and had a doubling time of 84 hours. Osteoblasts were obtained from an available mouse cell line (MC3T3-E1), established by sequential collagenase digestion of C57BL/6 embryo/fetal calvaria. They had a doubling time of 48 hours. Osteoblasts were grown in MEM+10% FCS to confluence, trypsinized, and counted in a hemocytometer to adjust cell density for the assays.

Commercially available ClO<sub>2</sub> mouthwash\*, a 0.1% ClO<sub>2</sub> · 0.2% phosphate buffer in deionized water, was used full strength and in six 50% serial dilutions combined with the assay medium immediately prior to use to ensure freshness: 0.10, 0.050, 0.025, 0.0125, 0.00625, and 0.00313%. As a control, commercially available CHX mouthwash†, 0.12% chlorhexidine gluconate in 11.6% alcohol, was used full strength and in dilutions (0.12, 0.060, 0.030, 0.015, 0.0075, and 0.00375%). Unchallenged cells were also used.

All cell lines were grown to confluence, released with trypsin, counted, re-suspended in culture media, and divided into 96-well microtiter plates. They were incubated with the test concentrations for 30 minutes. To evaluate the effect of the agents on cell proliferation, following the mouthwash challenge cells were washed with culture media and incubated with media supplemented with [<sup>3</sup>H]-thymidine (50-100,000 CPM per plate). Cells were incubated overnight, washed, and lysed in 0.1% sodium dodecyl sulfate, a detergent that breaks up the cell membrane, and the radioactivity was measured in a scintillation counter. All assays were performed in triplicate.

A lactate dehydrogenase assay‡ was performed using the kit manufacturer's instructions for the measurement of the cytotoxic potential of soluble substances by analysis of cytoplasmic enzyme activity released by damaged cells. Lactate dehydrogenase (LDH) is rapidly released into the cell supernatant upon damage of the plasma membrane. A cell concentration of 10<sup>5</sup> cells/ml in the culture media was used in all assays, which employed the 96-well plate format. LDH activity is determined by a coupled reaction whereby nitrotriazolium blue salt (NBT) is reduced to formazan dye and the resultant color is quantitated by reading absorbance at 500 nm. The sensitivity range of this kit is between 3.91 mU/ml and 62.5 mU/ml. All assays were in triplicate.

A multiple-group analysis of variance was used to detect differences between treatment groups. Significance was established at P<0.05.

\* CloSYS II, Rowpar Pharmaceuticals, Inc., Scottsdale, AZ 85260.

† Periogard, Colgate Oral Pharmaceuticals, Inc., Canton, MA 02021.

‡ Roche Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Roche Applied Science, Indianapolis, IN 46250

**Results**

In the tritiated thymidine uptake assays,  $\text{ClO}_2$  caused significant cell death at 0.1 and 0.05%, but at lesser concentrations, cell death was not significantly increased over that in controls. All CHX concentrations caused significant cell death of all cell types tested ( $P < .05$ ). At all CHX concentrations except 0.003%, there was total cell death, and at that concentration, cell death was significantly increased over that in unchallenged controls ( $P < 0.05$ ). These results were consistent for all three cell lines – HGF, periodontal ligament, and osteoblasts.

LDH release from HGF was not different from that in controls at any concentration of  $\text{ClO}_2$ . CHX at 0.12 to 0.015% showed significantly more LDH release than  $\text{ClO}_2$  or controls ( $P < .05$ ). For the periodontal ligament cell line,  $\text{ClO}_2$  at all concentrations did not show any significant increase in LDH release over controls, however, CHX at 0.12 to 0.03% had significantly more LDH release than  $\text{ClO}_2$  and controls ( $P < 0.5$ ). Osteoblasts did not show any significant increase in LDH after challenge by  $\text{ClO}_2$ . CHX at 0.12 to 0.015% showed significantly more LDH release by osteoblasts than  $\text{ClO}_2$  and controls ( $P < .05$ ).

**Discussion**

Chlorine dioxide as a buffer-stabilized mouthwash had a minimal effect on HGF, periodontal ligament cells, and osteoblasts. Only at the highest concentrations did  $\text{ClO}_2$  have an effect on cell proliferation, and there was no significant effect on LDH release in any cells at any concentrations. The buffer-stabilized  $\text{ClO}_2$  mouthwash is active against volatile sulfur compounds, making it a good choice for halitosis<sup>30,31</sup> and possibly in periodontal therapy. While little research has been done with this formulation, its antibacterial activity and low toxicity suggest it would be an effective postsurgical lavage.

Chlorhexidine mouthwashes are currently popular as adjuncts to oral hygiene and plaque control. CHX antimicrobial activity in vitro is the disruption of bacterial cell membranes and precipitation of their cytoplasm.<sup>32</sup> Its virucidal effect is through inactivation of DNA polymerase.<sup>33</sup> CHX binds carbonyl, sulfate, and phosphate groups, and so may impede bacterial adsorption.<sup>34</sup> The in vivo activity of CHX is seen as clumped bacterial cytoplasm; but what might it do to cells of the host?

CHX has adversely affected different cultures of cells found in periodontal tissues. CHX applied to root surfaces decreased HGF attachment.<sup>35</sup> CHX at 0.001% inhibits [<sup>3</sup>H]-leucine incorporation into protein by HGF<sup>36</sup> and has caused [<sup>51</sup>Cr] release from HGF, foreskin fibroblasts, and HeLa cells.<sup>37</sup> CHX at 2.0% caused hamster cheek pouch epithelial hyperkeratosis, some hyperchromasia, and rete extensions.<sup>38</sup> CHX affected lipid order packing in buccal epithelial cell membranes.<sup>39</sup> CHX at 0.1 mM was lethal to human skin epithelial cells.<sup>40</sup> CHX at 0.02% was toxic to HeLa cells in culture.<sup>41</sup> At 1 mM, CHX lysed human red blood cells.<sup>42</sup> At 0.02%, CHX caused polymorphonuclear leukocyte (PMN) cell damage and inhibited the PMN cell's chemotactic response to fMLP.<sup>43</sup> CHX at 0.2% impeded in vitro migration of PMN.<sup>44</sup> Macrophages have shown cytotoxicity by trypan blue uptake at 0.005% CHX.<sup>45</sup>

CHX has affected hamster cheek pouch microcirculation, causing stasis.<sup>46</sup> CHX at 0.02 and 0.12% has reduced the rupture strength of rat skin wounds.<sup>47</sup> CHX used postsurgically on open wounds of the palate inhibited wound closure, resulting in more granulation tissue, a lack of epithelial closure, and a detrimental effect on bone.<sup>48</sup> CHX injected into cellulose sponges implanted subcutaneously in the backs of rats caused an increase in hyaluronic acid, but a delay in collagen formation.<sup>49</sup> When open skin wounds in dogs were lavaged with CHX or lactated Ringers' solution as a control for 24 days, clinically and histologically there were no reported differences.<sup>50</sup> CHX at 0.05% in lactated Ringers' solution was used as a lavage for tarsocrural joints in six horses and caused lameness, effusion, edema, soreness, bloody synovial fluid, synovial ulceration, inflammation, and an increase in macrophage and PMNs that was not resolved in 8 days.<sup>51</sup> Using 0.0005% CHX and EDTA in a Tris buffer as a lavage for tarsocrural joints in horses caused lameness, joint effusion, and bloody synovial fluid that were cleared in 8 days.<sup>52</sup>

Our study confirms the foregoing reports that CHX is toxic to human cells pertinent to periodontal wound healing and includes cultured bone cells not explicitly tested before. There are clinical reports of CHX mouthrinses used postsurgically in humans<sup>53,54</sup> and dogs<sup>55</sup> for control of plaque that describe good results. However, in cases of regenerative procedures where CHX might wick into subgingival areas wherein CHX could destroy the friable new granulations from the periodontal ligament or bone, there could be a risk. One might consider not using CHX until a new epithelial attachment seal has formed. That is usually at 6 to 7 days of healing in a periodontal flap surgery; but after a guided tissue regeneration procedure, there may be no seal until the barrier is removed.



Stabilized chlorine dioxide could be safer on cells during periodontal wound healing.  $\text{ClO}_2$  contains no alcohol, as does CHX, which may be why CHX sometimes causes oral mucosal lesions.<sup>56</sup>  $\text{ClO}_2$  does not cause staining of teeth, restorations, or soft tissues, as does CHX.<sup>57</sup>  $\text{ClO}_2$  does not cause calculus formation as reported for CHX.  $\text{ClO}_2$  has not been reported to affect taste or to cause allergic reactions, which have been associated with CHX.<sup>58,59</sup> Unlike with CHX,<sup>60</sup>  $\text{ClO}_2$  free radical ions do not allow resistant species to develop. Stabilized chlorine dioxide mouthrinse is less toxic than chlorhexidine to human gingival fibroblasts, periodontal ligament cells, and an osteoblast cell line in vitro. In vitro tests on cell monolayers may not be fully applicable to therapy, so the clinical significance of the findings remains to be explored.

## Conclusions

## References

1. Sluss JW. *Emergency Surgery*. Philadelphia: Blakiston Sons & Co.; 1917:161.
2. Carrel A, Dehelly G. *The Treatment of Infected Wounds*. New York: P.B. Hoeber; 1917.
3. Lynch E, Sheerin A, Claxson AWD, Atherton MD, et al. Multicomponent spectroscopic investigations of salivary antioxidant consumption by an oral rinse preparation containing the stable free radical species chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ ). *Free Radic Res* 1997;26:209-234.
4. Scatina J, Abdel-Rahman MS, Goldman E. The inhibitory effect of Alcide, an antimicrobial drug, on protein synthesis in *Escherichia coli*. *J Appl Toxicol* 1985;5:388-394.
5. Ratcliff P. Use of an oxidizing agent to destroy amino acids to prevent their use as building blocks for protein. *J Dent Res* 1998;77:1003 (IADR Abstr #2974).
6. Ridenour GM, Ingols RS. Inactivation of poliomyelitis virus by "free" chlorine. *Am J Public Health* 1946;36:639-644.
7. Ridenour GM, Armbruster EH. Bactericidal effect of chlorine dioxide. *J Am Water Works Assoc* 1949;41:537-550.
8. Ridenour GM, Ingols RS, Armbruster EH. Sporicidal properties of chlorine dioxide. *Water and Sewage Works* 1949;96:279-283.
9. Ratcliff PA, Bolin V.  $\text{ClO}_2$ /phosphate germicide vs. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Dent Res* 1992;71(Sp Iss):189 (AADR Abstr#669).
10. Aleta EM, Berg JD. A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *J Am Water Works Assoc* 1986;78:62-72.
11. Lykins BW, Griese MH. Using chlorine dioxide for trihalomethane control. *J Am Water Works Assoc* 1986;78:88-93.
12. Welch JL, Folinazzo JE. Use of chlorine dioxide for cannery sanitation and water conservation. *Food Technol* 1959;13:179-182.
13. Alper N. Microorganism and odor control in pulp and paper manufacture by use of stabilized chlorine dioxide. *TAPPI* 1959;42:148A-149A.
14. Rav-Acha C, Kummel M, Salamon J, Adin A. The effect of chemical oxidants on effluent constituents for drip irrigation. *Water Res* 1995;29:119-129.
15. Wirthlin MR, Marshall GW. Evaluation of ultrasonic scaling unit waterline contamination after use of chlorine dioxide mouthrinse lavage. *J Periodontol* 2001;72:401-410.
16. Wirthlin MR, Marshall GW, Rowland RW. Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. *J Periodontol* 2003;74:1595-1609.
17. Walker JT, Mackerness CW, Mallon D, Makin T, et al. Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. *J Ind Microbiol* 1995;15:384-390.
18. Lubbers JR, Chauhan S, Bianchine JR. Controlled clinical evaluation of chlorine dioxide, chlorite and chlorate in man. *Environ Health Perspect* 1982;46:57-62.
19. Lubbers JR, Bianchine JR. Effects of the acute rising dose administration of chlorine dioxide, chlorate and chlorite to normal healthy adult male volunteers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1984;5(4/5):215-228.
20. Lubbers JR, Chauhan S, Miller JK, Bianchine JR. The effects of chronic administration of chlorine dioxide, chlorite and chlorate to normal healthy adult male volunteers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1984;5(4/5):229-238.
21. Lubbers JR, Chauhan S, Miller JK, Bianchine JR. The effects of chronic administration of chlorite to glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient healthy adult male volunteers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1984;5(4/5):239-24.
22. Michael GE, Miday RK, Bercz JP, Miller RG, et al. Chlorine dioxide water disinfection: A prospective epidemiology study. *Arch Environ Health* 1981;36:20-27.
23. Tuthill RW, Giusti RA, Moore GS, Calabrese EJ. Health effects among newborns after prenatal exposure to  $\text{ClO}_2$ -disinfected drinking water. *Environ Health Perspect* 1982;46:39-45.
24. Kanitz S, Franco Y, Patrone V, Calabellotta M, et al. Association between drinking water disinfection and somatic parameters at birth. *Environ Health Perspect* 1996;104:516-520.
25. Smith RP, Willhite CC. Chlorine dioxide and hemodialysis. *Regul Toxicol Pharmacol* 1990;11:42-62.
26. Yates R, Moran J, Addy M, Mullan PJ, et al. The comparative effect of acidified sodium chlorite and chlorhexidine mouthrinses on plaque regrowth and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1997;24:603-609.
27. Chapek CW, Reed OK, Ratcliff PA. Management of periodontitis with oral-care products. *Compend Contin Educ Dent* 1994;15:740-746.
28. Chapek CW, Reed OK, Ratcliff PA. Reduction of bleeding on probing with oral-care products. *Compend Contin Educ Dent* 1995;16:188-196.
29. Redding WR, Booth LC. Effects of chlorhexidine gluconate and chlorous acid-chlorine dioxide on equine fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *Vet Surg* 1991;20:306-310.
30. Frascella J, Gilbert R, Fernandez P. Odor reduction potential of a chlorine dioxide mouthrinse. *J Clin Dent* 1998;9:39-42.
31. Frascella J, Gilbert RD, Fernandez P, Hendler J. Efficacy of a chlorine dioxide-containing mouthrinse in oral malodor. *Compend Contin Educ Dent* 2000;21:241-254.
32. Beighton D, Decker J, Homer KA. Effects of chlorhexidine on proteolytic and glycosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1991;18:85-89.

33. Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, et al. *In vitro* virucidal effectiveness of a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Dent Res* 1990;69:874-876
34. Rolla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975;54:B57-B62
35. Alley CD, O'Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, et al. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1991;62:434-438
36. Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol* 1992;63:598-602.
37. Goldschmitt P, Cogan R, Taubman S. Cytopathic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 1977;48:212-215
38. Harvey BV, Squier CA, Hall BK. Effects of chlorhexidine on the structure and permeability of hamster cheek pouch mucosa. *J Periodontol* 1984;55:608-614
39. Audus KL, Tavakoli-Saberi MR, Zheng H, Boyce EN. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. *J Dent Res* 1992;71:1298-1303
40. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scand J Dent Res* 1971;79:209-215
41. Spanberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg* 1973;36:856-871
42. Gabler WL, Roberts D, Harold W. The effect of chlorhexidine on blood cells. *J Periodontol Res* 1987;22:150-155
43. Gabler WL, Bullock WW, Creamer HR. The influence of chlorhexidine on superoxide generation by induced human neutrophils. *J Periodontol Res* 1987;22:445-450
44. Watts TLP, Addison I, Johnson B. Effects of chlorhexidine solution on neutrophil locomotion in vitro. *J Dent* 1989;17:287-289
45. Knuutila M, Soderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol Scand* 1981;39:285-289
46. Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Loe H, et al. Effect of local application of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *J Periodontol Res* 1970;5:177-182
47. Mobacken H, Wengstrom C. Interference with healing of rat skin incisions treated with chlorhexidine. *Acta Derm Venereol* 1974;54:29-33
48. Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980;7:443-456
49. Paunio KU, Knuutila M, Mielitynen H. The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. *J Periodontol* 1978;49:92-95
50. Lozier S, Pope F, Berg J. Effects of four preparations of 0.05% chlorhexidine diacetate on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1992;21:107-112
51. Wilson DG, Cooley AJ, MacWilliams PS, Markel MD. Effects of 0.05% chlorhexidine lavage on the tarsocrural joints of horses. *Vet Surg* 1994;23:442-447
52. Klohnen A, Wilson DG, Hendrickson DA, Cooley AS, et al. Effects of potentiated chlorhexidine on bacteria and tarsocrural joints in ponies. *Am J Vet Res* 1996;57:756-761
53. Bakeen GS, Strahan JD. Effects of a 1% chlorhexidine gel during the healing phase after inverse bevel mucogingival flap surgery. *J Clin Periodontol* 1980;7:20-25
54. Newman PS, Addy M. Comparison of hypertonic saline and chlorhexidine mouthrinses after inverse bevel flap procedure. *J Periodontol* 1982;53:315-318
55. Hamp S-E, Rosling B, Lindhe J. Effect of chlorhexidine on gingival wound healing in the dog. A histometric study. *J Clin Periodontol* 1975;2:143-152
56. Floira L, Gjerme P, Rolla G, Waerhaug J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scand J Dent Res* 1971;79:119-125
57. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986;112:863-869
58. Moghadam BK, Drisko CL, Gier RE. Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case Report and review of the literature. *Oral Surg* 1991;71:431-434
59. Yaacob H, Jahil R. An unusual hypersensitivity reaction to chlorhexidine. *J Oral Med* 1986;41:145-146
60. Burdon DW, Whitby H. Contamination of hospital disinfectants with *Pseudomonas* species. *Br Med J* 1967;2(545):153-155