

# Klorheksidin İnsan Diş Eti Fibroblast Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi Üzerindeki Etkilerinin *In Vitro* Değerlendirilmesi

## *In Vitro* Evaluation of Effects of Chlorhexidine on Human Gingival Fibroblasts Cell Viability and Cytotoxicity

Gözdem BAYRAKTAR , Ayşe Mine YILMAZ GÖLER , Hafize ÖZTÜRK ÖZENER 

### ÖZ

**Amaç:** Bu *in vitro* çalışmada, % 0,2'lik klorheksidin (CHX) solüsyonunun, insan dişeti fibroblast (HGF) hücre canlılığı ve sitotoksitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışma 30 saniye ve 2 dakikalık zaman aralıklarında, nötr pH değerindeki % 0,2'lik CHX solüsyonu ve hücre olarak ATCC'den ticari olarak temin edilen *HGF-1 (CRL-2014)* hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi. CHX'in HGF üzerindeki hücre canlılığı etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile ve sitotoksik etkileri laktat dehidrogenaz (LDH) testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak *two way ANOVA* testiyle istatistiksel olarak analiz edildi ( $p<0,05$ ).

**Bulgular:** MTT testi sonuçlarına göre, %0,2 CHX solüsyonunun zamanla hücre canlılığını azalttığı görüldü ( $p<0,0001$ ). LDH testi sonuçlarına göre ise % 0,2 CHX'in sitotoksik etkinliğinin kontrol grubuna kıyasla arttığı ( $p<0,0001$ ) ancak zaman içinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği ( $p>0,05$ ) gözlemlendi.

**Sonuç:** Bu *in vitro* çalışmanın sınırları dahilinde, % 0,2 CHX solüsyonu, 30 sn ve 2 dk'lık kısa maruz kalma sürelerinde, HGF hücre canlılığını azalttı ve HGF üzerinde sitotoksik etki gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** klorheksidin, fibroblast, *in vitro*, sitotoksitesite, hücre canlılık testleri

### ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the effects of a 0.2 % chlorhexidine (CHX) solution on human gingival fibroblasts' (HGF) cell viability and cytotoxicity *in vitro*.

**Materials and Methods:** This study was performed at 30-second and 2-minute time intervals using a 0.2 % CHX solution at neutral pH and *HGF-1 (CRL-2014)* cell lines commercially available from ATCC. Cell viability effects of CHX on HGF were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test, and cytotoxic effects were determined using the lactate dehydrogenase (LDH) test. Results were statistically analyzed by calculating means and standard deviations using the *two-way ANOVA* test ( $p<0.05$ ).

**Results:** According to the MTT test results, it was observed that the 0.2 % CHX solution decreased cell viability over time ( $p<0.0001$ ). According to the LDH test results, the cytotoxic efficacy of 0.2 % CHX was higher compared to the control group ( $p<0.0001$ ), but did not show a statistically significant difference over time ( $p>0.05$ ).

**Conclusions:** Within the limits of this *in vitro* study, 0.2 % CHX solution reduced HGF cell viability and showed cytotoxic activity on HGF during short exposure times of 30 sec and 2 min.

**Keywords:** chlorhexidine, fibroblasts, *in vitro*, cytotoxicity, cell viability assays

### GİRİŞ

Antimikrobisidler, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ajanlardır. Çeşitli aktif maddeler içeren antimikrobiyal ajanlar diş hekimliğinde, özellikle periodontolojide, supragingival plak ve dişeti iltihabını kontrol etmek amacıyla sıklıkla önerilmektedir (Muller ve ark., 2017; Coelho ve ark., 2020). Diş çekimi ve implant yerleştirme dahil olmak üzere oral ve periodontal cerrahilerin öncesi ve sonrasında, protezlere bağlı gelişen ağız kuruluğu veya kandida enfeksiyonu varlığında, hiperplazi, mukozit varlığında, bakteriyemi veya oral enfeksiyon riski olan hastalarda koruyucu ve tedavi

Hafize Öztürk Özener (✉)  
Dr. Öğr. Üyesi, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.  
hafize.ozturk@marmara.edu.tr

Gözdem Bayraktar  
Dt., Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Ayşe Mine Yılmaz Göler  
Öğ. Gör., Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Submitted / Gönderilme: 29.12.2022 Accepted/Kabul: 08.03.2023

edici ajan olarak kullanılmaktadır (Drisko, 2001; Petersilka ve ark., 2002; Quirynen ve ark., 2002; Muller ve ark., 2017; Coelho ve ark., 2020).

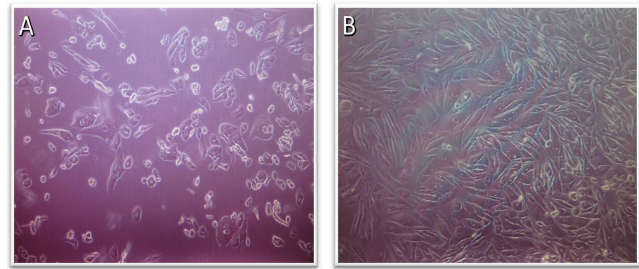
Klorheksidin (CHX), oral kavitede dental plak oluşumunun engellenmesinde, gingivitis ve periodontitiste mekanik periodontal tedaviye yardımcı olarak, çürüğün önlenmesinde, cerrahi operasyonlar sonrası gelişebilecek enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde ve de ağız içindeki diğer enfeksiyonların giderilmesinde kullanılan etkili bir lokal kullanıma uygun antimikrobiyal ajandır (Karpinski ve Szkaradkiewicz, 2015; Figuero ve ark., 2017). Gram pozitiflerde daha etkili olmak üzere gram negatif aerop ve anaerop bakterilere, mantarlara, dermofitlere ve bazı lipofilik virüslere karşı geniş bir antimikrobiyal etkinliğe sahiptir (Hennessey, 1973; Russell, 1990). Dental plak üzerindeki önemli etkisinden dolayı diş hekimliğinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Neely, 2012). CHX'in antiseptik bir ajan olarak etkinliği iyi bilinmesine rağmen, uzun süreli kullanımda yan etki olarak dişlerde, dilde ve ağız içi restorasyonlarda sarı-kahverengi renklenmelere neden olduğu, diş taşı oluşumunu arttırdığı, tat bozukluğuna yol açtığı ve oral mukozada yanma hissi oluşturduğu için kullanımı zordur (Batra ve ark., 2022). Özellikle iyileşme sürecinde dokular üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle kullanımı sorgulanmaktadır. CHX kullanımının doku nekrozu, enflamatuvar reaksiyonlar ve rejenerasyon inhibisyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Coelho ve ark., 2020). CHX'in, etkin bir tedavi amacıyla antiseptik ve antimikrobiyal ajan olarak güvenle kullanılabilmesi için ağız mukozası üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak incelendiği çalışmalara olan ihtiyaç devam etmektedir.

Tüm bilgiler ışığında bu *in vitro* çalışmanın amacı, % 0,2'lik CHX solüsyonuna, 30 sn ve 2 dk'lık süre boyunca maruz bırakılan insan dişeti fibroblastlarında (HGF), CHX'in hücre canlılığı ve sitotoksik etkilerini değerlendirmektir.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneyle, HGF hücreleri için ATCC'den ticari olarak temin edilen *HGF-1* (CRL-2014, ATCC, Manassas, VA, ABD) hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi. HGF hücreleri, 37 °C'de % 1 penisilin/streptomisin, % 1 L-glutamin (CAS No: 56-85-9), % 0,1 amfoterisin B (CAS No: 1397-89-3) ve % 10 fetal sığır serumu (FBS) (CAS No: 9014-81-7, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile takviye edilmiş *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(DMEM) (Biochrom AG, Berlin, Almanya) içinde kültür edilerek üretici talimatları doğrultusunda çoğaltıldı. HGF hücreleri % 70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra (Şekil 1), 2 mL besiyeri/kuyu içeren,  $1,5 \times 10^5$  hücre yoğunluğu/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 sa boyunca 37 °C'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyulara % 0,2'lik CHX (test grubu) (*Chlorhexidin Gluconate*, CAS No: 18472-51-0, Doğa İlaç, İstanbul, Türkiye) veya 2 mL besiyeri (kontrol grubu) eklenerek 30 sn ve 2 dk beklendi. Daha sonra solüsyonlar uzaklaştırıldı.



Şekil 1. İnsan dişeti fibroblast (HGF) hücrelerinin mikroskopik görüntüsü, (A) başlangıç, (B) %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra

HGF hücrelerinde hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (Glentham Life Sciences, İngiltere) testi kullanılarak değerlendirildi. Kuyucuklar fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Wisent, Kanada) ile yıkandı, her birine 132 µL MTT boyama solüsyonu ilave edilerek 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. MTT formazonu açığa çıkarmak için her bir kuyucuğa mevcut hücre ortamı uzaklaştırılarak 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) (CAS No: 67-68-5) ilave edildi. 10 dk sonra, her bir kuyucuktan 200 µL ortam, 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı ve optik dansite (OD) bir plaka okuyucu (Perkin Elmer Enspire multimode, Boston, ABD) kullanılarak 570 nm'de kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak canlılık (%) değerlerine çevrildi:

$$\left[ \frac{(OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{hücesiz}})}{(OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{hücesiz}})} \right] \times 100$$

HGF hücrelerinde sitotoksisiteyi saptamak için nekrozun bir göstergesi olarak hücre dışı laktat dehidrogenaz (LDH) salınımları incelendi. Sitotoksisite testi, ticari bir kitin (CytoScan™, G-Biosciences, MO, ABD) talimatlarına göre gerçekleştirildi. % 0.1 Triton X-100 ile muamele edilen hücreler maksimum LDH salınım aktivitesi olarak

kullanılırken, 10 µL steril, ultra-safsu içinde, işlem görmemiş hücreler spontan LDH salınım aktivitesinin kontrolü olarak kullanıldı. Numune ile tedavi edilen hücrelerden LDH'nin yüzde salınımı LDH'nin maksimum salınımı ile karşılaştırılarak hesaplandı. Absorbans değerleri, bir plaka okuyucu (Perkin Elmer Enspire multimode, Boston, ABD) kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. Sitotoksosite (%) aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\left[ \frac{(\text{LDH Salınım Aktivitesi}_{\text{örnek}} - \text{LDH Salınım Aktivitesi}_{\text{kontrol}})}{(\text{LDH Salınım Aktivitesi}_{\text{maksimum}} - \text{LDH Salınım Aktivitesi}_{\text{kontrol}})} \right] \times 100$$

### İstatistiksel Analizler

Analizler GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Veriler *two-way ANOVA* ve *post-hoc Sidak* testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak ayarlandı.

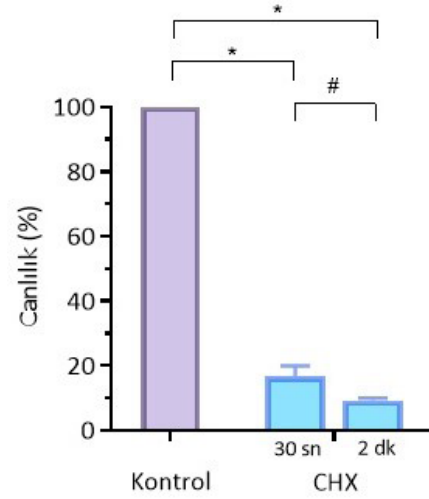
### BULGULAR

MTT testi sonuçlarına göre (Tablo 1, Şekil 2), % 0,2 CHX solüsyonunun, kontrol grubuna kıyasla her iki zaman diliminde de hücre canlılığını azalttığı görüldü ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca, hücre canlılığı zaman içinde istatistiksel olarak daha fazla azalma gösterdi ( $p < 0,0001$ ).

**Tablo 1.** Solüsyonların MTT ile değerlendirilen hücre canlılığı ve LDH ile ölçülen sitotoksosite değerleri

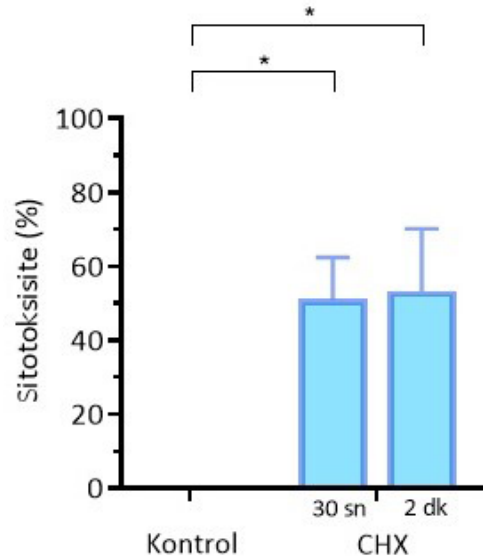
Hücre Canlılığı (MTT)				
Solüsyon	Zaman	Ort ± S.S.	Standart hata	P
Kontrol		100	,00	
CHX (% 0,2)	30 sn	16,72 ± 3,26	1,152	<0,0001*
	2 dk	9,14 ± 0,85#	0,300	<0,0001*
Sitotoksosite (LDH)				
Solüsyon	Zaman	Ort ± S.S.	Standart hata	P
Kontrol		0	,00	
CHX (% 0,2)	30 sn	51,17 ± 11,3	3,982	<0,0001*
	2 dk	53,30 ± 16,9	5,977	<0,0001*

Two-way ANOVA ve post hoc Sidak testi,  $p < 0,05$ , \*kontrol grubuna kıyasla, #30 sn'ye kıyasla  $p < 0,0001$ , S.S.: standart sapma



**Şekil 2.** % 0,2 CHX solüsyonunun HGF hücre canlılığı üzerine etkisi (MTT). *p*-değerleri two way ANOVA ve post hoc Sidak testleri ile belirlendi. \* $p < 0,0001$  gruplar arası, # $p < 0,0001$  grup içi.

LDH testine göre (Tablo 1, Şekil 3), % 0,2 CHX'in sitotoksosite değerleri her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak kontrol grubuna göre daha yüksekti ( $p < 0,0001$ ). % 0,2 CHX'in sitotoksitesi, 30 sn ve 2 dk arasında artış eğiliminde olup anlamlı bir fark göstermedi ( $p = 0,5791$ ).



**Şekil 3.** % 0,2 CHX solüsyonunun HGF üzerine sitotoksik etkisi (LDH). *p*-değerleri two way ANOVA ve post hoc Sidak testleri ile belirlendi. \* $p < 0,0001$

## TARTIŞMA

CHX, ağız boşluğunda en sık kullanılan kemoterapötik antimikrobiyal ajandır (Dadpe ve ark., 2018). Güçlü antimikrobiyal etkinliğine rağmen, doza ve zamana bağlı olarak hücreler üzerinde olumsuz etkileri olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Coelho ve ark., 2020; Batra ve ark., 2022). Bu çalışmada % 0,2 CHX'in, 30 sn ve 2 dk maruz kalma sürelerinde, HGF üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bilgimiz dahilinde çalışmamız, % 0,2 CHX konsantrasyonunun HGF üzerindeki erken dönem hücre canlılığı ve sitotoksik etkilerinin aynı anda incelenerek değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Diş hekimliğinde kullanılan CHX konsantrasyonları % 0,12 ile % 2 arasında değişmektedir; oral antisepsi için % 0,2 oranı kullanılır ve bu konsantrasyon diş eti iltihabı, kandidiyazis ve diş plağına karşı oldukça etkilidir (Sogut, 2013). Bu veriler göz önünde bulundurularak bu çalışmada % 0,2'lik CHX konsantrasyonu kullanılması tercih edilmiştir.

Literatüre bakıldığında, CHX ile yapılan *in vitro* çalışmalarda değerlendirme sürelerinin 15 sn ile 48 sa aralığında (Mima ve ark., 2011; Tirali ve ark., 2013; Voos ve ark., 2014; Castillo ve ark., 2015; Decker ve ark., 2017; Vahabi ve ark., 2019; Etemadi ve ark., 2020; Von Maltzahn ve ark., 2020) ve hatta 72 sa (Koychev ve ark., 2017) ve 96 sa (Bidar ve ark., 2012) sürelerinde olduğu, klinik çalışmalarda ise uygulama sürelerinin 1 dk ağız çalkalama (Becerik ve ark., 2011; Sritrairat ve ark., 2011) veya 5-10 dk subgingival irrigasyon (Kshitish ve Laxman, 2010; Jalaluddin ve ark., 2019; Vitt ve ark., 2020) şeklinde uygulandığı görülmüştür. % 0,2 CHX'in lokal kullanımı amacıyla üretilen ağız gargaraları üreticilerinin kullanım talimatları da CHX'in ağız içerisinde yaklaşık 1 dk süresince çalkalanması doğrultusundadır. Klinik uygulamada, ağız boşluğundaki dokular ve mevcut mikrobiyal patojenlerle temas süresi çoğunlukla kısadır ve hastalar günlük rutinlerinde gargaraları 30 sn ile 1 dk arasında kullanır. Bu nedenle, klinik kullanımı yeterince taklit edebilmek için bu çalışmada 30 sn ve 2 dk kısa maruz kalma süreleri araştırılmıştır.

CHX'in, antimikrobiyal özelliklerine ve ağız içi yaraların tedavisinde yaygın olarak kullanımına rağmen, birçok yazar tarafından *in vitro* olarak dişeti fibroblastları üzerinde güçlü bir toksik etkiye sahip olduğu, düşük CHX konsantrasyonlarının bile dişeti fibroblastlarında ve epitel hücrelerinde protein ve DNA sentezini inhibe ettiği çalışmalarda belirtmiştir (Babich ve ark., 1995; Giannelli ve ark., 2008; Faria ve ark., 2009; Schmidt ve ark., 2016;

Schmidt ve ark., 2018; Sukumaran ve ark., 2020; Babgi ve ark., 2021; Nawrot-Hadzik ve ark., 2021; Utami ve ark., 2022). Araştırmacılar, fibroblastların > % 0,01 CHX'e maruz kalmasının, zamana bağlı olarak hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (Schmidt ve ark., 2016; Sukumaran ve ark., 2020; Nawrot-Hadzik ve ark., 2021). Bu çalışmaya benzer şekilde, Babgi ve ark. (Babgi ve ark., 2021) yaptıkları *in vitro* çalışmada, % 0,2 CHX'e 2 dk maruz kaldıktan sonra HGF canlılığında güçlü bir inhibisyon tespit etmiştir. Çalışmamızın bulgularına bakıldığında, literatürle uyumlu olarak, % 0,2 CHX'in 30 sn ve 2 dk sürelerinde, HGF hücre canlılığını azalttığı görülmüştür.

CHX'in toksisitesini saptamak için ise, HGF hücrelerinde nekroz indüksiyonu (LDH salınımı) araştırılmış, ancak literatürde CHX ile ilgili yeterli sayıda çalışmaya rastlanmamıştır (Giannelli ve ark., 2008; Faria ve ark., 2009; Schmidt ve ark., 2018). Giannelli ve ark. (Giannelli ve ark., 2008) yaptıkları çalışmada, CHX'in % 0,12'lik konsantrasyonda, 1 dk tedaviden sonra fibroblastların nekrozunu % 50'den daha yüksek oranlarla etkilediğini, aynı şekilde Faria ve ark. (Faria ve ark., 2009) da, daha düşük konsantrasyonlarda CHX'in 24 sa uygulama sonrası HGF üzerinde % 80 nekroz gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu gözlemler, % 0,2 CHX ile 30 sn ve 2 dk tedavi sonrası HGF'nin sitotoksitesinde anlamlı bir artış gösteren bizim çalışmamızın bulguları ile uyumludur.

Çalışmamızın asıl limitasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksitesinin incelenmesi için kullanılan MTT ve LDH testlerinin sonuçlarının doğruluğunun bir taramalı elektron mikroskobu tarafından desteklenmemesidir. Ayrıca, bu çalışma sadece *in vitro* koşullarda yapıldığından, klinik ortamdaki pek çok değişken faktörün etkisi değerlendirilemediği için sonuçlar sınırlı bir anlam taşıyabilir. Çalışmanın kısıtlı zaman dilimlerini içermesi de bir diğer limitasyon olarak sayılabilir.

## SONUÇ

Bu çalışmanın sınırları dahilinde elde edilen verilerle, % 0,2 CHX solüsyonunun, kısa maruz kalma sürelerinde, zamana bağlı olarak HGF hücre canlılığını yüksek oranda azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bahsi geçen bu toksik etkiler, CHX'in kullanılacağı durumlarda ideal konsantrasyon ve ideal uygulama süresinin belirlenmesinde, göz önünde bulundurulmalıdır.



**Teşekkür**

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TDK-2021-10281 No'lu proje ile desteklenmiştir.

**Çıkar çatışmaları beyanı**

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

**REFERANSLAR**

- Babgi W, Alhajaji M, Al-Mehmadi L, Elbaqli R, Khayat N, Aldahlawi S, Youssef AR. Effect of root conditioning agents hyaluronic acid, EDTA and chlorhexidine on the attachment of human gingival fibroblasts to healthy root surface. *Saudi Dent J.* 2021;33(6): 342-347.
- Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol.* 1995;11(2): 79-88.
- Batra C, Alalshaiikh M, Gregory RL, Windsor LJ, Blanchard SB, Hamada Y. An in vitro comparison of four antibacterial agents with and without nicotine and their effects on human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2022;93(2): e24-e33.
- Becerik S, Turkoglu O, Emingil G, Vural C, Ozdemir G, Atilla G. Antimicrobial effect of adjunctive use of chlorhexidine mouthrinse in untreated gingivitis: a randomized, placebo-controlled study. *APMIS.* 2011;119(6): 364-372.
- Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, Gharechahi M, Mashadi NA. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(4): 466-471.
- Castillo DM, Castillo Y, Delgadillo NA, Neuta Y, Jola J, Calderon JL, Lafaurie GI. Viability and Effects on Bacterial Proteins by Oral Rinses with Hypochlorous Acid as Active Ingredient. *Braz Dent J.* 2015;26(5): 519-524.
- Coelho AS, Laranjo M, Goncalves AC, Paula A, Paulo S, Abrantes AM, Caramelo F, Ferreira MM, Silva MJ, Carrilho E, Botelho MF. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology.* 2020;108(2): 260-270.
- Dadpe MV, Dhore SV, Dahake PT, Kale YJ, Kendre SB, Siddiqui AG. Evaluation of antimicrobial efficacy of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2018;36(4): 357-363.
- Decker EM, Bartha V, Kopunic A, von Ohle C. Antimicrobial efficiency of mouthrinses versus and in combination with different photodynamic therapies on periodontal pathogens in an experimental study. *J Periodontal Res.* 2017;52(2): 162-175.
- Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2001;25: 77-88.
- Ettemadi A, Eftekhari Bayati S, Pourhajibagher M, Chiniforush N. In vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with phycocyanin on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm on SLA titanium discs. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;32: 102062.
- Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;234(2): 256-265.
- Figuero E, Nobrega DF, Garcia-Gargallo M, Tenuta LM, Herrera D, Carvalho JC. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017;44 Suppl 18: S116-S134.
- Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(2): 308-317.
- Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl.* 1973;12: 61-67.
- Jalaluddin M, Jayanti I, Gowdar IM, Roshan R, Varkey RR, Thirutheri A. Antimicrobial Activity of Curcuma longa L. Extract on Periodontal Pathogens. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019;11(Suppl 2): S203-S207.
- Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine—pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(7): 1321-1326.
- Koychev S, Dommisch H, Chen H, Pischon N. Antimicrobial Effects of Mastic Extract Against Oral and Periodontal Pathogens. *J Periodontol.* 2017;88(5): 511-517.
- Kshitish D, Laxman VK. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian J Dent Res.* 2010;21: 341-348.
- Mima EG, Pavarina AC, Vargas Fda S, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole-resistant *Candida albicans*: in vitro study. *Mycoses.* 2011;54(5): e506-512.
- Muller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *Biomed Res Int.* 2017;2017: 4019723.
- Nawrot-Hadzic I, Matkowski A, Pitulaj A, Sterczala B, Olchowcy C, Szewczyk A, Choromanska A. In Vitro Gingival Wound Healing Activity of Extracts from *Reynoutria japonica* Houtt Rhizomes. *Pharmaceutics.* 2021;13(11).
- Neely AL. Essential oil mouthwash (EOMW) may be equivalent to chlorhexidine (CHX) for long-term control of gingival inflammation but CHX appears to perform better than EOMW in plaque control. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3 Suppl): 69-72.
- Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol* 2000. 2002;28: 56-71.

25. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol 2000*. 2002;28: 72-90.
26. Russell AD. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(2): 99-119.
27. Schmidt J, Zyba V, Jung K, Rinke S, Haak R, Mausberg RF, Ziebolz D. Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells – an in vitro study. *Drug Chem Toxicol*. 2016;39(3): 322-330.
28. Schmidt J, Zyba V, Jung K, Rinke S, Haak R, Mausberg RF, Ziebolz D. Effects of octenidine mouth rinse on apoptosis and necrosis of human fibroblasts and epithelial cells – an in vitro study. *Drug Chem Toxicol*. 2018;41(2): 182-187.
29. Sogut MU. Jermisid ajanlardan katyonik deterjanlar. *J Exp Clin Med*. 2013;30: 75-79.
30. Sritairat N, Nukul N, Inthasame P, Sansuk A, Prasirt J, Leewatthanakorn T, Piamsawad U, Dejrudee A, Panichayupakaranant P, Pangsomboon K, Chanowanna N, Hintao J, Teanpaisan R, Chaethong W, Yongstar P, Pruphetkaew N, Chongsuvivatwong V, Nittayananta W. Antifungal activity of lawsone methyl ether in comparison with chlorhexidine. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(1): 90-96.
31. Sukumaran SK, Vadakkekuttical RJ, Kanakath H. Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol*. 2020;24(2): 109-116.
32. Tirali RE, Bodur H, Sipahi B, Sungurtekin E. Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Aust Endod J*. 2013;39(1): 15-18.
33. Utami WS, Anggani HS, Purbianti M. Cytotoxicity effect of orthodontic miniscrew-implant in different types of mouthwash: An in-vitro study. *J Orthod Sci*. 2022;11: 5.
34. Vahabi S, Hakemi-Vala M, Gholami S. In vitro Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of *Lawsonia inermis*, *Malva sylvestris*, and *Boswellia serrata* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Adv Biomed Res*. 2019;8: 22.
35. Vitt A, Babenka A, Bostrom EA, Gustafsson A, Lira Junior R, Slizen V, Sorsa T, Tervahartiala T, Buhlin K. Adjunctive Antiseptic Irrigation of Periodontal Pockets: Effects on Microbial and Cytokine Profiles. *Dent J (Basel)*. 2020;8(4).
36. Von Maltzahn NF, Stumpp NS, Stiesch M. Antibacterial Effect of Cupral((R)) on Oral Biofilms – An In-Vitro Study. *Eur Endod J*. 2020;5(1): 40-45.
37. Voos AC, Kranz S, Tonndorf-Martini S, Voelpel A, Sigusch H, Staudte H, Albrecht V, Sigusch BW. Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers Surg Med*. 2014;46(3): 235-243.