

## THE MOUTHWASH CONTAINING CHLORHEXIDINE AND CHLORINE DIOXIDE: AN IN VITRO STUDY

Thao Tran Thi Phuong\*, Tham Dang Thi, Tram Huynh To, Linh Tran Dieu, Dat Tran Thanh

*Faculty of Odonto-Stomatology, Hong Bang International University -  
215 Dien Bien Phu, Ward 2, Binh Thanh Dist, Ho Chi Minh City, Vietnam*

Received: 02/01/2025

Revised: 23/01/2025; Accepted: 25/04/2025

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of the mouthwash containing chlorhexidine and chlorine dioxide on human gingival fibroblasts.

**Subject and method:** The impact of mouthwash containing both chlorhexidine (concentrations from 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, and 0.2%) and chlorine dioxide (0.05 and 0.1%) on human gingival fibroblasts after 24 hours of contact was assessed using the colorimetric assay MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], in accordance with ISO10993-5:2009.

**Results:** After 24 hours of contact, the mouthwash containing chlorhexidine and chlorine dioxide showed toxicity grades 3 and 4 to the human gingival fibroblast.

**Conclusion:** The mouthwash containing chlorhexidine and chlorine dioxide was toxic to human gingival fibroblasts after 24 hours of exposure.

**Keywords:** Chlorhexidine, chlorine dioxide, human gingival fibroblast, mouthwash.

---

\*Corresponding author

**Email:** thaottp@hiu.vn **Phone:** (+84) 916703579 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66i3.2539**



# NƯỚC SÚC MIỆNG CHỨA CHLORHEXIDINE VÀ CHLORINE DIOXIDE: NGHIÊN CỨU IN VITRO

Trần Thị Phương Thảo\*, Đặng Thị Thắm, Huỳnh Tố Trâm, Trần Diệu Linh, Trần Thành Đạt

Khoa Răng Hàm Mặt, Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng - 215 Điện Biên Phủ, P. 2, Q. Bình Thạnh, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài: 02/01/2025

Chỉnh sửa ngày: 23/01/2025; Ngày duyệt đăng: 25/04/2025

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Đánh giá tác động của nước súc miệng chứa chlorhexidine và chlorine dioxide lên nguyên bào sợi nướu người.

**Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đánh giá tác động của nước súc miệng chứa đồng thời chlorhexidine (nồng độ từ 0,01; 0,02, 0,05; 0,1; 0,2%) và chlorine dioxide (0,05; 0,1%) lên nguyên bào sợi nướu người sau 24 giờ tiếp xúc thông qua thử nghiệm MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] theo tiêu chuẩn ISO10993 - 5:2009.

**Kết quả:** Mức độ độc tính của nước súc miệng chứa chlorhexidine và chlorine dioxide đối với nguyên bào sợi nướu người sau thời gian tiếp xúc là 24 giờ là mức độ 3 và 4.

**Kết luận:** Dung dịch phối trộn CHX và CDO gây độc cho nguyên bào sợi nướu sau thời gian tiếp xúc 24 giờ.

**Từ khóa:** Chlorhexidine, chlorine dioxide, nguyên bào sợi nướu người, nước súc miệng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều bệnh lý trong khoang miệng có nguyên nhân do sự có mặt của vi khuẩn và độc tố của chúng. Chiến lược điều trị hiện nay bao gồm việc làm sạch cơ học, loại bỏ mảng bám vi khuẩn và bổ sung các hoạt chất kháng khuẩn để kéo dài hiệu quả điều trị và ức chế sự tái nhiễm vi khuẩn. Từ lâu, chlorhexidine đã được cho là tiêu chuẩn vàng trong khả năng kháng khuẩn và được sử dụng rộng rãi trong nha khoa. Tuy nhiên, các tác dụng phụ đi kèm khi sử dụng dài hạn hoạt chất này cũng được báo cáo trong y văn. Nồng độ chlorhexidine càng cao, tác dụng của nó càng đáng kể. Do đó, việc duy trì nồng độ chlorhexidine thấp bằng cách kết hợp nó với một số hoạt chất khác đã được ứng dụng trong một số sản phẩm nha khoa để duy trì tính kháng khuẩn của chlorhexidine và giảm bớt các tác dụng phụ [1].

Gần đây, chlorine dioxide được sử dụng như một chất kháng khuẩn mới trong nha khoa với khả năng tiêu diệt vi khuẩn trong thời gian ngắn và ít tác dụng phụ [2]. Các nghiên cứu về khả năng tương tác của chlorhexidine và chlorine dioxide cho thấy hai hoạt chất này không tạo ra kết tủa [3]. Điều này hứa hẹn khả năng kết hợp hai hoạt chất này để gia tăng tác động kháng khuẩn và an toàn cho các mô trong miệng. Do đó, nhằm khảo sát tác động của nước súc miệng chứa chlorhexidine và

chlorine dioxide lên nguyên bào sợi nướu người, vốn là loại tế bào chiếm ưu thế trong mô liên kết và niêm mạc miệng, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu đánh giá độc tính của nước súc miệng phối trộn chlorhexidine và chlorine dioxide ở nhiều nồng độ trên nguyên bào sợi nướu người..

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu *in vitro* có nhóm chứng

**2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Kỹ nghệ mô và Vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 9-12/2024.

### 2.3. Đối tượng nghiên cứu:

Chlorhexidine (CHX) 20% (Bajaj Healthcare Ltd., Ấn Độ) và chlorine dioxide (CDO) (5% Shinwang Chemical Co., Hàn Quốc) được phối trộn thành 6 dung dịch A, B, C, D, E, F, có nồng độ tương ứng trong Bảng 1.

\*Tác giả liên hệ

Email: thaottp@hiu.vn Điện thoại: (+84) 916703579 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66i3.2539>

**Bảng 1. Nồng độ nước súc miệng chứa chlorhexidine và chlorine dioxide trong nghiên cứu**

| Nồng độ | Mẫu A | Mẫu B | Mẫu C | Mẫu D | Mẫu E | Mẫu F |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CHX (%) | 0,01  | 0,02  | 0,05  | 0,1   | 0,1   | 0,2   |
| CDO (%) | 0,05  | 0,05  | 0,05  | 0,05  | 0,1   | 0,1   |

Nguyên bào sợi nướu người (hGF) được nuôi tăng sinh và cấy chuyên, sau đó thu nhận để đánh giá độc tính của nước súc miệng nghiên cứu. Nguồn tế bào được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm kỹ nghệ mô và vật liệu Y sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

#### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

Tế bào sau khi được thu nhận sẽ được nạp vào buồng đếm hồng cầu được đếm dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100 lần để xác định mật độ sau khi nhuộm tế bào với trypan blue (tỉ lệ 1:1). Dịch tế bào với mật độ 105 tế bào/ml sẽ được huyền phù vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng và nuôi tế bào ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> qua đêm.

#### Quy trình thử nghiệm MTT để đánh giá độc tính

Môi trường trong đĩa 96 giếng được loại bỏ. Các dung dịch nước súc miệng chứa CHX và CDO, môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn (chứng âm) và dimethyl sulfoxide (DMSO) 20% (chứng dương) được bổ sung vào các giếng tế bào và tiếp tục nuôi cấy ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 24 giờ.

Sau 24 giờ, hút hết dịch trong các giếng và thay vào đó dung dịch MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Sau 4 giờ, hút hết dung dịch MTT, thay vào đó dung dịch DMSO/Ethanol (tỷ lệ 1:1), huyền phù đều để hòa tan các tinh thể formazan tạo thành dung dịch đồng nhất và đo độ hấp thụ quang học hay mật độ quang (Optical density – OD) ở bước sóng 570nm.

#### Đánh giá kết quả

Hình thái tế bào sau khi ủ trong dung dịch nước súc

miệng có nồng độ CHX và CDO khác nhau và sau khi nhuộm màu được chụp dưới kính hiển vi đảo pha CKX53 (Olympus, Nhật) cùng phần mềm ghi nhận hình ảnh (CellSens) và so sánh với các nhóm chứng.

Đánh giá ảnh hưởng của NSM chứa CHX và CDO sau thử nghiệm MTT dựa theo hướng dẫn ISO 10993, bằng cách phân tích tỉ lệ tăng trưởng tương đối (RGR) được xác định theo công thức [4]:

$$RGR\% = \frac{OD1}{OD2} \times 100\%$$

Với:

OD1: giá trị trung bình của mật độ quang của dung dịch NSM thử nghiệm được đo ở bước sóng 570 nm.; OD2: giá trị trung bình của mật độ quang của môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn được đo ở bước sóng 570 nm.

RGR được tóm tắt trong Bảng 2 với tỉ lệ RGR<75% được xác định là gây độc cho tế bào [4].

**Bảng 2. Mức độ gây độc tế bào theo tiêu chuẩn ISO 10993-5:2009**

| RGR (%) | Gây độc tế bào |
|---------|----------------|
| 100     | 0              |
| 75-99   | 1              |
| 50-74   | 2              |
| 25-49   | 3              |
| 1-24    | 4              |
| 0       | 5              |

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**Bảng 3. Giá trị mật độ quang tại bước sóng 570nm của các mẫu thử nghiệm**

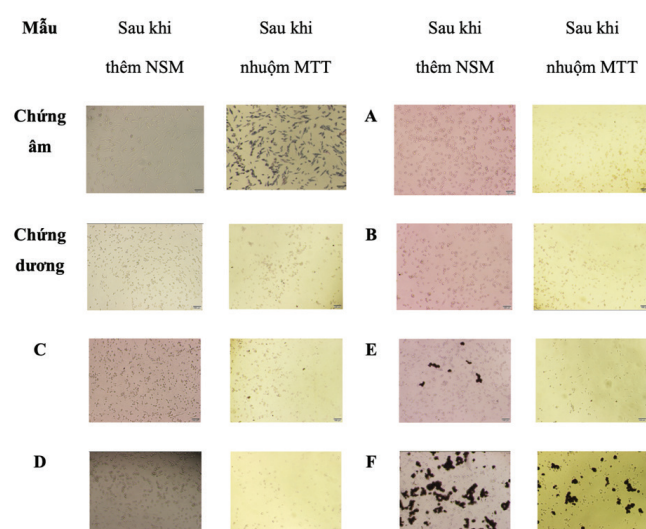
| Mẫu OD | Chứng âm | Chứng dương | Mẫu A | Mẫu B | Mẫu C | Mẫu D | Mẫu E | Mẫu F |
|--------|----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1      | 0,508    | 0,107       | 0,082 | 0,092 | 0,104 | 0,106 | 0,125 | 0,136 |
| 2      | 0,505    | 0,109       | 0,091 | 0,085 | 0,106 | 0,119 | 0,142 | 0,152 |
| 3      | 0,513    | 0,104       | 0,084 | 0,091 | 0,103 | 0,113 | 0,139 | 0,164 |

Bảng 3 cho thấy giá trị OD của các mẫu nước súc miệng gần như tương tự với giá trị OD của chứng dương. Các mẫu D, E, F có giá trị OD cao hơn các mẫu A, B, C nhưng vẫn thấp hơn nhiều so với chứng âm.

**Bảng 4. Trung bình phần trăm hGF sống ở các nồng độ của dung dịch NSM thử nghiệm**

| RGR(%)     | Chứng âm | Chứng dương | Mẫu A | Mẫu B | Mẫu C | Mẫu D | Mẫu E | Mẫu F |
|------------|----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1          | 99       | 21          | 16    | 18    | 20    | 21    | 24    | 27    |
| 2          | 98       | 21          | 18    | 17    | 21    | 23    | 28    | 30    |
| 3          | 100      | 20          | 16    | 18    | 20    | 22    | 27    | 32    |
| Trung bình | 99±1     | 21±1        | 17±1  | 17±1  | 20±1  | 22±1  | 26±2  | 29±3  |
| Độc tính   | 0-1      | 4           | 4     | 4     | 4     | 4     | 3-4   | 3     |

Bảng 4 cho thấy tất cả các mẫu nước súc miệng sau khi ủ 24 giờ đều gây độc cho nguyên bào sợi nướu người, và mức độ độc tính tương đương với chứng dương là DMSO 20%.



**Hình 1. Hình ảnh tế bào sau khi thêm dung dịch NSM và nhuộm màu**

Hình 1 cho thấy sau khi tiếp xúc 24 giờ với nước súc miệng thử nghiệm ở tất cả các nồng độ, nguyên bào sợi nướu giảm số lượng, thay đổi hình dạng và kích thước, tương tự như hình ảnh tế bào ở chứng dương.

#### 4. BÀN LUẬN VÀ KẾT LUẬN

Mặc dù là hoạt chất kháng khuẩn tiêu chuẩn vàng được sử dụng phổ biến trong nha khoa, CHX lại là một hoạt chất có độc tính với các tế bào của cơ thể. Trên thị trường, CHX được sử dụng rộng rãi với các nồng độ 0,06%, 0,12%, 0,2% và thậm chí tới 4% trong các loại nước súc miệng, bàn chải đánh răng, gel, nước rửa tay phẫu thuật nha khoa. Các tác dụng phụ của CHX khi sử dụng kéo dài đã được ghi nhận trong y văn như gây vết ố vàng nâu trên răng, tổn thương mô mềm, thay đổi vị

giác, gây kích ứng miệng. v.v.... Do đó, nỗ lực của nhiều nghiên cứu là tìm ra cách tăng cường tính kháng khuẩn của CHX trong khi hạn chế được độc tính cũng như các tác dụng phụ [1]. Sự kết hợp các hoạt chất khác với CHX đã được nghiên cứu và áp dụng trên thực tế như cetylpyridium chloride, hydrogen peroxide, sodium floride, ion kẽm v.v. .. Các công thức nước súc miệng CHX có nồng độ thấp cũng có thể có hiệu quả trong việc làm sạch mảng bám và giảm thiểu các vấn đề bất lợi [1].

CDO có tác dụng oxy hoá đã được chứng minh có tác dụng trung hoà các hợp chất lưu huỳnh dễ bay hơi gây hôi miệng, đồng thời cũng chứng minh được tính an toàn khi sử dụng lâu dài [2]. Theo Anna H (2019), việc thiếu hụt tương tác hoá học giữa CDO và CHX khẳng định tính vô hại của sản phẩm khi kết hợp [3]. Đặc tính kháng khuẩn của CDO tinh khiết và ứng dụng của nó có thể là một giải pháp thay thế hiệu quả đối với tính độc của CHX, thường được sử dụng rộng rãi dưới dạng nước súc miệng với mức nồng độ từ 0,03% tới 0,1% [2]. Tuy nhiên, hiện cũng chưa có nghiên cứu về việc kết hợp nước súc miệng có đồng thời CHX và CDO đối với bệnh nhân nha khoa nói chung. Nghiên cứu của chúng tôi kết hợp CHX (nồng độ từ 0,01 tới 0,2%) và CDO (0,05 và 0,1%) nhằm khảo sát tác động của nước súc miệng này trên nguyên bào sợi nướu người. Kết quả cho thấy sau 24 giờ ủ với nước súc miệng thử nghiệm, tỉ lệ tăng trưởng tương đối của tế bào này đều thấp, dao động từ 17-29%. Kết quả nghiên cứu của Lessa (2010) cho dung dịch CHX ở các nồng độ 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% và 2% tiếp xúc tế bào giống nguyên bào răng trong 60 giây, 2 giờ, hoặc 60 giây với 24 giờ phục hồi, cho thấy rằng tất cả các nồng độ CHX đều có tác dụng gây độc trực tiếp cao đối với các tế bào [5]. Nghiên cứu của Kohidai Z (2022) cho thấy nồng độ CHX rất thấp (0,0001%; 0,0003%) giúp tăng sinh tế bào, trong khi nồng độ cao hơn gây độc các tế bào tiền thân biểu mô nướu (HGEPP) [6].



Đối với CDO, trong nghiên cứu của Nishikiori (2008), liều gây chết đối với 50% nguyên bào sợi nướu người (LD50) của CDO là 0,16 mM và gây ra sự ngừng chu kỳ tế bào G0/G1. Tuy nhiên, CDO không gây ra hiện tượng chết tế bào theo chương trình đáng kể ở bất kỳ nồng độ thử nghiệm nào [7]. Soares (2012) công bố trong một nghiên cứu thử nghiệm liên quan đến những người sử dụng nước uống chứa CDO và muối chloride rằng không tìm thấy tác dụng phụ nào ở liều cao như 24 mg/l (CDO) và 5 mg/l (muối chloride) [8]. Theo Noszticzus (2013), CDO không gây độc tế bào vì thời gian tiêu diệt vi khuẩn là theo thứ tự mili giây trong dung dịch CDO 300 ppm, thời gian này đủ ngắn để giữ cho CDO không thâm nhập vào các mô sống của sinh vật lớn hơn một cách an toàn [9]. Nghiên cứu của Kohidai Z (2022) cho thấy đối với CDO, tác dụng tăng sinh có lợi tế bào HGEPP được quan sát thấy trên phạm vi nồng độ rộng (0,06–6 ppm) [6].

Thực tế các chế phẩm chứa CHX đã chứng minh hiệu quả trên lâm sàng và làm tăng tốc độ lành thương, mặc dù thể hiện độc tính cao với tế bào in vitro nhưng CHX vẫn an toàn khi sử dụng trên lâm sàng. Trên thực tế, khoang miệng chứa nhiều lớp tế bào nên khi sử dụng các sản phẩm nha khoa, đặc biệt là nước súc miệng trong môi trường miệng, thì nước súc miệng không tiếp xúc trực tiếp với nguyên bào sợi nướu mà qua biểu mô rồi tới mô liên kết hay được pha loãng bởi dịch nướu. Bên cạnh tổ chức mô nhiều lớp, chất nền ngoại bào, sự có mặt của nước bọt và dịch nướu, đặc điểm khuếch tán và các cơ chế bảo vệ của cơ thể là những yếu tố ảnh hưởng đến tác động của chất kháng khuẩn trong môi trường miệng. Do đó, mặc dù có nhiều ý kiến cho rằng CHX sử dụng thường xuyên trong lâm sàng sẽ dẫn đến phá hủy tế bào nhanh chóng, tuy nhiên, độc tính tế bào in vivo dự kiến sẽ thấp hơn độc tính tế bào in vitro [10]. Với tính chất là nước súc miệng, thời gian tiếp xúc với các tế bào trong khoang miệng thường dao động từ 30 giây tới 3 phút. Vì vậy, cần có thêm những nghiên cứu in vivo cũng như nghiên cứu về thời gian tiếp xúc tế bào để khẳng định thêm về các tác động của nước súc miệng phối trộn CHX và CDO lên các tế bào trong miệng.

## 5. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát tác động của nước súc miệng phối trộn chlorhexidine và chlorine dioxide với các nồng độ khác nhau lên nguyên bào sợi nướu. Kết quả cho thấy việc chứa chlorhexidine trong thành phần vẫn gây ra độc tính với tế bào sau khi tiếp xúc 24 giờ. Cần thêm nhiều nghiên cứu mô phỏng thời gian tiếp xúc thực tế trên lâm sàng và với các loại tế bào khác nhau cần được tiến hành để khẳng định vai trò của CDO lên độc tính của nước súc miệng phối trộn.

## 6. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường đại học quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC18.11.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, et al. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*, 2020, 103: 103497.
- [2] Kerémi B, Márta K, Farkas K, et al. Effects of chlorine dioxide on oral hygiene - A systematic review and meta-analysis. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(25): 3015-3025.
- [3] Anna H, Barnabás P, Zsolt L, Romána Z, Tracking of the degradation process of chlorhexidine digluconate and ethylenediaminetetraacetic acid in the presence of hyper-pure chlorine dioxide in endodontic disinfection. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164:360-364.
- [4] ISO E 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 2009.
- [5] Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, et al. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci* 2010, 18(1): 50-58.
- [6] Kóhidai Z, Takács A, Lajkó E, et al. The effects of mouthwashes in human gingiva epithelial progenitor (HGEPP) cells. *Clin Oral Investig*, 2022, 26(6): 4559-4574.
- [7] Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, et al. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent*, 2008, 36(12): 993-998.
- [8] Soares LG, Guaitolini RL, Weyne Sde C, et al. The effect of a mouth rinse containing chlorine dioxide in the clinical reduction of volatile sulfur compounds. *Gen Dent*, 2012, 61(4): 46-49.
- [9] Noszticzus Z, Wittmann M, Kály-Kullai K, et al. Chlorine dioxide is a size-selective antimicrobial agent. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79157.
- [10] Cabral C. T. and Fernandes M. H. (2007). In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig*, 11(2): 64-155.