

# Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry

## Chlorheksydyna – mechanizm działania i zastosowanie w stomatologii

Monika Łukomska-Szymańska, Jerzy Sokołowski, Barbara Łapińska

Zakład Stomatologii Ogólnej, Katedra Stomatologii Odtwórczej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska  
Department of General Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Medical University of Lodz, Poland  
Head: prof. J. Sokołowski

### Abstract

**Introduction.** Chlorhexidine (CHX) is considered the most effective and safe antimicrobial agent used in dentistry. **Aim of the study.** To present chlorhexidine's mechanism of action and summarize its therapeutic use in dentistry. **Conclusions.** Chlorhexidine is used mainly in salt forms: diacetate, digluconate and dihydrochloride. Chlorhexidine shows activity against Gram positive and Gram negative bacteria, both aerobic and facultative anaerobic, as well as against viruses, yeasts and fungi. CHX lowers the amount of *S. mutans* in saliva and dental plaque, and also shows stronger bactericidal activity against *E. faecalis* in dentinal tubules than calcium hydroxide. CHX can be chemisorbed on the surface of dental hydroxyapatite or can react, as ion, producing insoluble compounds with phosphate ions that are present in dental plaque, saliva and hydroxyapatite. Afterwards, chlorhexidine can be released, without influencing bonding between enamel and dentine to resin composite filling material. CHX exhibits low harmfulness and basically no toxic activity. Chlorhexidine and its derivatives (mainly digluconate), as solutions, are used in endodontic, periodontic and implantoprosthodontic procedures. CHX is also used as a disinfectant before placing a filling in the dental cavity as well as a component of adhesive systems and resin-based restorative materials. Given its wide spectrum of antimicrobial activity, chlorhexidine is still an important focus in research on new materials and restoration techniques used in reconstructive dentistry.

### Streszczenie

**Wstęp.** Chlorheksydyna (CHX) jest uważana za jeden z najbardziej skutecznych i bezpiecznych związków o działaniu przeciwbakteryjnym, stosowanych w stomatologii. **Cel pracy.** W pracy przedstawiono mechanizm działania chlorheksydyny oraz możliwości jej zastosowania w stomatologii. **Podsumowanie.** Chlorheksydyna występuje najczęściej w postaci soli: dioctanu, diglukonianu i dichlorowodoru. Wykazuje ona działanie wobec bakterii Gram dodatnich, bakterii Gram ujemnych, tlenowych i względnie beztlenowych, jak również wobec wirusów, drożdży i grzybów. CHX obniża poziom *S. mutans* w ślinie i płytce nazębnej oraz działa bójczo na bakterie *E. faecalis* znajdujące się w kanałkach zębiny skutoczniej niż wodorotlenek wapnia. CHX może zostać chemisorbowana na powierzchni hydroksyapatytu zęba lub może reagować jako jon, tworząc nierozpuszczalne związki z jonami fosforanowymi, które są zawarte w płytce nazębnej, ślinie i hydroksyapatycie. Następnie może być uwalniana, nie wpływając na połączenie szkliwa i zębiny z materiałem kompozytowym. CHX charakteryzuje się niewielką szkodliwością i zasadniczo brakiem działania toksycznego. Chlorheksydyna i jej pochodne (głównie glukonian) w postaci roztworów mają zastosowanie jako płukanki antyseptyczne w leczeniu endodontycznym, periodontologicznym oraz implantoprotetycznym. Jest również stosowana jako środek do dezynfekcji ubytku przed jego wypełnieniem oraz jako składnik systemów wiążących oraz materiałów wypełniających na bazie żywicy. Ze względu na szerokie spektrum działania

### KEYWORDS:

chlorhexidine, antimicrobial activity, disinfection

### HASŁA INDEKSOWE:

chlorheksydyna, działanie przeciwdrobnoustrojowe, dezynfekcja

Control of bacterial infections is an extremely important element of successful dental treatment. This applies both to oral surgery and periodontics, endodontics, implantoprosthodontics as well as restorative/conservative dentistry. For this purpose, disinfectants with a broad spectrum of antimicrobial activity are used.

### ***Disinfectants used in dentistry and their mechanism of action***

The compounds with the antimicrobial activity namely active ingredients of disinfectant preparations can – in principle – be included in various groups: aldehydes, alcohols, oxidizing compounds, quaternary ammonium compounds and biguanides – surfactants – phenols and acids.

These agents may have both bactericidal and bacteriostatic activity. Their bacteriostatic effect is usually due to the inhibition of the metabolic pathway which, after the removal of the chemical, returns to the initial state. In turn, the bactericidal action results from the irreversible and irreparable damage to the structure or function of cells. A given compound may exhibit both types of activity. To a large extent, it depends on the type of substance, its concentration, stability, but also on the species and strain against which this substance works. The role of the environment – pH, temperature, exposure time and the presence of other chemical compounds – should also be emphasized.

### ***Structure and physical properties of chlorhexidine***

Chlorhexidine (CHX)  $[-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}]_2$ , a guanidine derivative, was first synthesized in England in 1950 at Imperial Chemical Industries (now AkzoNobel). Its systematic name is 1,1'-hexamethylene-bis-[5-(p-chlorophenyl)biguanide]. The chlorhexidine molecule is composed of two symmetrically placed 4-chlorophenol rings and two guanidine

*przeciwdrobnoustrojowego, chlorheksydyna ciągle jest ważnym punktem badań nad nowymi materiałami i technikami stosowanymi w stomatologii odtwórczej.*

Kontrola zakażenia bakteryjnego jest niezmiernie ważnym elementem udanego leczenia stomatologicznego. Dotyczy to zarówno zabiegów z zakresu chirurgii stomatologicznej, periodontologii, endodoncji, implantoprotetyki, jak i stomatologii odtwórczej/zachowawczej. W tym celu stosowane są środki odkażające wykazujące szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego.

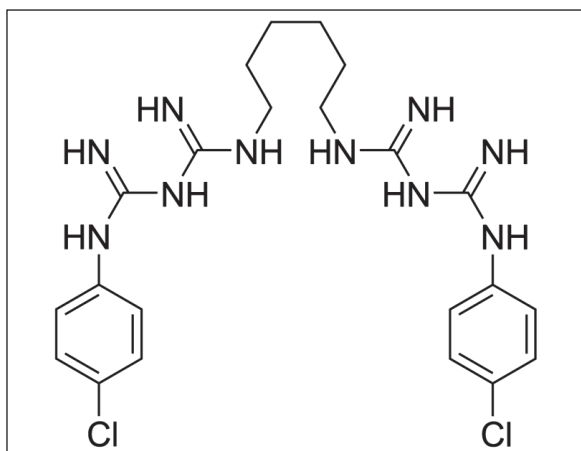
### ***Związki dezynfekcyjne w stomatologii i mechanizm ich działania***

Związki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej występujące jako substancje czynne preparatów odkażających możemy zasadniczo zaliczyć do różnych grup: aldehydów, alkoholi, związków utleniających, czwartorzędowych związków amoniowych czy biguanidyn – związków powierzchniowo czynnych – fenoli i kwasów.

Związki te mogą wykazywać zarówno działanie bakteriobójcze, jak i bakteriostatyczne. Działanie bakteriostatyczne wynika zwykle z zahamowania szlaku metabolicznego, który po usunięciu środka chemicznego powraca do stanu wyjściowego. Z kolei działanie bakteriobójcze wynika z nieodwracalnego i niemożliwego do naprawienia uszkodzenia struktury lub funkcji komórki. Dany związek może wykazywać oba typy działania. W dużej mierze jest to uzależnione od rodzaju związku, jego stężenia, stabilności, ale także gatunku czy szczepu, na który ten związek działa. Na podkreślenie zasługuje również rola otoczenia – pH, temperatury, czasu ekspozycji czy obecności innych związków chemicznych.

### ***Budowa i właściwości fizyczne chlorheksydyny***

Chlorheksydyna (CHX)  $[-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHC}(=\text{NH})\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}]_2$ , pochodna guanidyny, po raz pierwszy zsyntetyzowana została w Anglii w roku 1950 w firmie Imperial Chemical Industries (obecnie AkzoNobel). Nazwa systematyczna to 1,1'-heksametyleno-bis-[5-(p-chlorofenylo)bigu-



**Fig. 1. Chlorhexidine**  
Chlorheksydyna – wzór strukturalny.

groups centrally joined by the hexamethylene chain (Figure 1).<sup>1</sup>

The CHX cationic molecule owes its activity to single chlorine atoms attached to both phenol rings. It is a strong base, practically insoluble in water (0.008% w/v at 20°C), while the solubility in water of salts formed as a result of the reaction with acids is very diverse. Chlorhexidine most often occurs in the form of salts: diacetate, digluconate and dihydrochloride. In publications and the colloquial language, the names of chlorhexidine salts are simplified to: hydrochloride, acetate and chlorhexidine gluconate. Chlorhexidine also takes the form of a different salt – phosphonate.

Chlorhexidine gluconate (CHG) is the CHX compound most commonly used in disinfecting preparations. Its solid form was not possible to obtain; it is produced as 20% aqueous solution – higher concentrations are too viscous for application.<sup>1</sup> It is almost colourless or light yellow liquid. This substance is soluble in water, with not more than three parts of ethanol (70%) and not more than five parts of ethanol (96%).

Chlorhexidine acetate (CHA) is white or almost white microcrystalline powder. The substance is quite sparingly soluble in water (up to 1.9% at 20°C) and sparingly soluble in glycerol and propylene glycol, it is soluble in ethanol (96%). Chlorhexidine in the form of solution or powder

amid]. Cząsteczka chlorheksydyny jest zbudowana z dwóch symetrycznie umieszczonych 4-chlorofenolowych pierścieni i dwóch guanidynowych grup centralnie połączonych łańcuchem heksametylenowym (Fig. 1).<sup>1</sup>

Kationowa cząsteczka CHX swoją aktywność zawdzięcza pojedynczym atomom chloru przy obu pierścieniach fenolowych. Jest silną zasadą, praktycznie nierozpuszczalną w wodzie (0,008% w/v w 20°C), natomiast rozpuszczalność w wodzie soli powstałych w wyniku reakcji z kwasami jest bardzo różna. Chlorheksydyna występuje najczęściej w postaci soli: dioctanu, diglukonianu i dichlorowodoru. W publikacjach, a także w języku potocznym, nazwy soli chlorheksydyny są uproszczone do: chlorowodorek, octan czy glukonian chlorheksydyny. Chlorheksydyna występuje również w postaci innej soli – fosfonianu.

Glukonian chlorheksydyny (CHG) jest związkiem CHX najczęściej stosowanym w preparatach dezynfekcyjnych. Nie udało się go otrzymać w postaci stałej, produkowany jest jako 20-procentowy roztwór wodny – wyższe stężenia są zbyt lepkie, aby móc je stosować.<sup>1</sup> Jest prawie bezbarwną lub jasnożółtą cieczą. Substancja ta jest rozpuszczalna w wodzie, nie więcej niż z 3 częściami etanolu (70%) i nie więcej niż z 5 częściami etanolu (96%).

Octan chlorheksydyny (CHA) jest białym lub prawie białym mikrokrystalicznym proszkiem. Substancja jest dość trudno rozpuszczalna w wodzie (do 1,9% w 20°C) oraz trudno rozpuszczalna w glicerolu i glikolu propylenowym, jest natomiast rozpuszczalna w etanolu (96%). Chlorheksydyna w postaci roztworu lub proszku zwykle jest bez zapachu, jedynie preparaty zawierające octan mogą mieć zapach kwasu octowego. W preparatach dostępnych gorzki smak roztworów jest maskowany substancjami pomocniczymi.<sup>1</sup>

Chlorowodorek chlorheksydyny jest białym lub prawie białym krystalicznym proszkiem o niskiej rozpuszczalności (0,06%). Rozpuszczalność tego związku można poprawić poprzez dodatek odpowiednich środków powierzchniowo czynnych. Sole chlorheksydyny są łatwo rozpuszczalne w alkoholu etylowym i izopropylowym.

is usually odourless, only preparations containing acetate may have the odour of acetic acid. In oral preparations, the bitter taste of the solutions is concealed by excipients.<sup>1</sup>

Chlorhexidine hydrochloride is white or almost white crystalline powder with low solubility (0.06%). The solubility of this compound can be improved by the addition of suitable surfactants. Chlorhexidine salts are readily soluble in ethyl and isopropyl alcohol.

### **Interactions of chlorhexidine with other compounds**

Diethyl alcohol enhances the antibacterial properties of CHX, which can be inhibited by some compounds containing inorganic anions (chlorides, sulphates, phosphates, carbonates and nitrates) found in hard tap water and many pharmaceutical preparations (e.g. binding systems, composite materials), as well as in hard dental tissues. They cause the precipitation of chlorhexidine in the form of insoluble salts, reducing the amount of active compound. Also, the combination of chlorhexidine solution with sodium hypochlorite brings a permanent change in the colour of the solution and the precipitation of flocculent sediment and precipitate – parachloroaniline (PCA).<sup>2-7</sup> The addition of sodium hypochlorite at the concentration of 0.023–6% to 2% CHX solution causes the irreversible change of the colour of the solution from dark brown to light yellow; the precipitation is observed already at the NaOCl concentration of 0.19%.<sup>2</sup> The resulting flocculant precipitate consists mainly of magnesium, iron and calcium ions.<sup>3</sup> Parachloroaniline is a product of chlorhexidine hydrolysis, and due to the spontaneous hydrolysis of CHX under the influence of temperature and light it can also be formed without the participation of NaOCl.<sup>8</sup> It is stated that parachloroaniline and its breakdown product (*1-chloro-4-nitrobenzene*) may have toxic and carcinogenic activity.<sup>8-10</sup> Also, the addition of EDTA to the CHX solution may cause the precipitation of pink precipitates.<sup>11</sup> Organic anions, such as natural soaps or synthetic detergents, are also incompatible with chlorhexidine, which is a cation. In addition,

### **Interakcje chlorheksydyny z innymi związkami**

Alkohol dietylowy wzmacnia właściwości przeciwbakteryjne CHX. Mogą być one hamowane przez niektóre związki zawierające nieorganiczne aniony (chlorki, siarczany, fosforany, węglany i azotany), które występują w twardej wodzie wodociągowej i wielu preparatach farmaceutycznych (np. systemach wiążących, materiałach kompozytowych), a także w tkankach twardych zęba. Powodują one wytrącenie chlorheksydyny w postaci nierozpuszczalnych soli, zmniejszając ilość aktywnego związku. Również połączenie roztworu chlorheksydyny z podchlorynem sodu powoduje trwałą zmianę barwy roztworu oraz wytrącenie kłaczkowatego osadu i precypitatu – parachloroaniliny (PCA).<sup>2-7</sup> Dodatek podchlorynu sodu w stężeniu 0,023 – 6% do 2% roztworu CHX powoduje nieodwracalną zmianę barwy roztworu od ciemnobrązowej do jasnożółtej, a już przy 0,19% stężeniu NaOCl obserwuje się wytrącenie z roztworu precypitatu.<sup>2</sup> Powstały kłaczkowaty osad składa się głównie z jonów magnezu, żelaza i wapnia.<sup>3</sup> Parachloroanilina jest produktem hydrolizy chlorheksydyny i może powstawać również bez udziału NaOCl, na skutek spontanicznej hydrolizy CHX pod wpływem działania temperatury i światła.<sup>8</sup> Podaje się, że parachloroanilina i jej produkt rozpadu (*1-chloro-4-nitrobenzen*) mogą wykazywać działanie toksyczne i karcinogenne.<sup>8-10</sup> Również dodatek EDTA do roztworu CHX może powodować wytrącanie się różowych precypitatu.<sup>11</sup> Organiczne aniony, takie jak naturalne mydła czy syntetyczne detergenty, są również niekompatybilne z chlorheksydyną, która jest kationem. Ponadto alginiany, karboksyletyloceluloza, tragakant i nierozpuszczalne proszki dezaktywują chlorheksydynę poprzez absorpcję. Większość niejonowych surfaktantów zmniejsza również znacząco właściwości przeciwbakteryjne chlorheksydyny.

### **Wpływ pH na aktywność chlorheksydyny**

Chlorheksydyna jest umiarkowanie powierzchniowo czynna i tworzy micela w roztworach. Roztwory wodne są najbardziej stabilne przy pH równym 5 do 8. Działanie chlorheksydyny jest



alginates, carboxylethylcellulose, tragacanth and insoluble powders deactivate chlorhexidine by absorption. Most of non-ionic surfactants also significantly reduce the antibacterial activity of chlorhexidine.

### ***The effect of pH on the chlorhexidine activity***

Chlorhexidine is a moderate surfactant and forms a micelle in solutions. Aqueous solutions are most stable at pH of 5 to 8. The effect of chlorhexidine depends on pH – its most preferred range is 5.5–7, which is equal to the pH of the human body. In this pH range, the antibacterial properties of chlorhexidine vary depending on the microorganism and the buffer used.

### ***The antimicrobial activity of chlorhexidine***

Chlorhexidine has a strong and rapid antimicrobial and antifungal activity. The biocidal activity of chlorhexidine is mainly directed against the vegetative forms of Gram-positive bacteria, while it is less active against Gram-negative bacteria – therefore much higher concentrations are required to fight these *microorganisms*. The action of chlorhexidine towards aerobic and anaerobic bacteria is diverse. It does not show the bactericidal activity against tuberculosis bacilli. It is inactive against spores of bacteria at room temperature, but works at elevated temperatures.

Chlorhexidine destroys both DNA and RNA viruses. The infectivity of lipophilic viruses (e.g. herpes virus, HIV, influenza virus, cytomegalovirus) is inactivated by chlorhexidine. Chlorhexidine, like other antiseptics, does not show significant virucidal activity against small uncoated viruses (enteroviruses, polio viruses, papillomaviruses).<sup>12</sup>

Chlorhexidine acts against yeasts and dermatophytes. Their sensitivity to both inhibitory growth and lethal concentrations is similar to the sensitivity of bacterial vegetative cells. The growth of fungi (including *C. albicans*) is stopped by low concentrations, but as with other biocides, the fungostatic effect depends on the strain.<sup>13</sup> Chlorhexidine acts more effectively against *C. albicans* than nystatin and amphotericin B.<sup>14</sup> Chlorhexidine causes damage to the cell wall by binding to a glucan fragment, inhibiting the

zależne od pH – jego najkorzystniejszy zakres wynosi 5,5-7, co odpowiada wartości pH organizmu ludzkiego. W tym zakresie pH, właściwości przeciwbakteryjne chlorheksydyny będą różne w zależności od mikroorganizmu i zastosowanego buforu.

### ***Działanie przeciwdrobnoustrojowe chlorheksydyny***

Chlorheksydyna wykazuje silne i szybkie działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwwgrzybicze. Aktywność biobójcza chlorheksydyny skierowana jest głównie przeciwko wegetatywnym postaciom bakterii Gram-dodatnich, natomiast w przypadku bakterii Gram-ujemnych działa słabiej – konieczne są znacznie wyższe stężenia. W sposób zróżnicowany chlorheksydyna działa na bakterie tlenowe i beztlenowe. Nie wykazuje aktywności bakteriobójczej w stosunku do prątków gruźlicy. Jest nieaktywna wobec form przetrwalnikowych bakterii w temperaturze pokojowej, działa na nie jedynie w podwyższonej temperaturze.

Chlorheksydyna niszczy zarówno wirusy DNA, jak i RNA. Infekcyjność lipofilnych wirusów (np. wirus opryszczki, HIV, wirus grypy, wirus cytomegalii) jest dezaktywowana przez chlorheksydynę. Chlorheksydyna, podobnie jak inne antyseptyki, nie wykazuje znaczącej aktywności wirusobójczej także w stosunku do małych wirusów bezosłonkowych (enterowirusy, wirusy polio, wirusy brodawczaków).<sup>12</sup>

Chlorheksydyna działa na drożdże i dermatofity. Ich wrażliwość zarówno na stężenia hamujące wzrost, jak i bójcze jest zbliżona do wrażliwości komórek wegetatywnych bakterii. Wzrost grzybów (włączając *C. albicans*) jest hamowany przez niskie stężenia, ale działanie fungostatyczne zależy od szczepu, podobnie jak w przypadku innych środków biobójczych.<sup>13</sup> Chlorheksydyna w stosunku do *C. albicans* działa bójczo skuteczniej niż nystatyna i amfoterycyna B.<sup>14</sup> Chlorheksydyna powoduje uszkodzenie ściany komórkowej poprzez wiązanie z fragmentem glukanu, inhibicję replikacji komórek lub uniemożliwianie adhezji blastospor drożdżaków do komórek nabłonka błony śluzowej lub płyty protezy akrylowej.<sup>15</sup>

replication of cells and preventing the adhesion of yeast blastospores to mucosal epithelial cells and acrylic denture plates.<sup>15</sup>

### **The mechanism of chlorhexidine action**

The following steps can be identified in the CHX mechanism of action:

1. Rapid attraction of a cationic chlorhexidine molecule to the surface of a negatively charged bacterial cell.
2. Specific, strong adsorption to phosphate-containing components that form the surface of a bacterial cell.
3. Penetration through the cell wall, most likely as a result of passive diffusion.
4. Attracting towards the cytoplasmic membrane and damage to its integrity.
5. Outflow of low molecular weight cytoplasmic components, such as potassium ions, and inhibition of the activity of some enzymes associated with the cytoplasmic membrane.
6. Cytoplasmic precipitation by forming complexes with phosphorylated compounds, such as adenosine triphosphate (ATP) and nucleic acids.

In the presence of chlorhexidine, the negative surface charge of the bacterial cell is quickly neutralized and inverted. Chlorhexidine works more efficiently against Gram-positive bacteria, because their cell wall has a higher negative charge than that of Gram-negative bacteria, thanks to which the interaction strength is greater.<sup>16</sup> Gram-positive bacteria are inhibited at the concentrations below 10 µg/ml. In practice, the lowest recommended concentration of chlorhexidine is 200 µg/ml. Gram-negative bacteria, on the other hand, show greater variation depending on the strain and species, but the growth of most of them is inhibited in the concentrations below 50 µg/ml. The minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. mutans* does not exceed 1 µg/ml.<sup>17</sup>

The effect of pH on the amount of chlorhexidine absorbed indicates the presence of ionic interactions: minimum absorption at pH=2 and maximum at pH=7. Since chlorhexidine occurs almost exclusively as a cation at both pH values, it seems that the factor responsible for absorption

### **Mechanizm działania chlorheksydyny**

W mechanizmie działania CHX można wyodrębnić następujące etapy:

1. Szybkie przyciąganie kationowej cząsteczki chlorheksydyny do powierzchni ujemnie naładowanej komórki bakteryjnej.
2. Specyficzna, silna adsorpcja do zawierających fosforany składników, które tworzą powierzchnię komórki bakteryjnej.
3. Przeniknięcie przez ścianę komórkową, najprawdopodobniej w wyniku biernej dyfuzji.
4. Przyciąganie w kierunku błony cytoplazmatycznej oraz uszkodzenie jej integralności.
5. Wpływ niskocząsteczkowych składników cytoplazmatycznych, takich jak jony potasu i hamowanie aktywności niektórych enzymów związanych z błoną cytoplazmatyczną.
6. Precypitacja cytoplazmy przez tworzenie kompleksów z ufosforylowanymi związkami, takimi jak adenozynotrifosforan (ATP) i kwasy nukleinowe.

W obecności chlorheksydyny ujemny ładunek powierzchniowy komórki bakteryjnej jest szybko neutralizowany i odwracany. Chlorheksydyna działa skuteczniej w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, ponieważ ich ściana komórkowa ma wyższy ładunek ujemny niż bakterii Gram-ujemnych, dzięki czemu siła interakcji jest większa.<sup>16</sup> Bakterie Gram-dodatnie są hamowane przy stężeniu poniżej 10 µg/ml. W praktyce najniższe zalecane stężenie chlorheksydyny wynosi 200 µg/ml. Z kolei bakterie Gram-ujemne wykazują większe zróżnicowanie w zależności od szczepu i gatunku, ale wzrost większości z nich ulega zahamowaniu w stężeniach poniżej 50 µg/ml. Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla *S. mutans* nie przekracza 1 µg/ml.<sup>17</sup>

Wpływ pH na ilość zaabsorbowanej chlorheksydyny wskazuje na oddziaływania jonowe: minimalna absorpcja przy pH równym 2, a maksymalna przy pH równym 7. Ponieważ chlorheksydyna występuje prawie wyłącznie jako kation przy obu wartościach pH, wydaje się, że czynnikiem decydującym o absorpcji jest dostępność grupy z ładunkiem ujemnym na powierzchni bakterii, których jest więcej przy pH neutralnym lub alka-

is the availability of the negative charge group on the surface of bacteria, which are more numerous at neutral and alkaline pH. At neutral pH, CHX has two positive charges.<sup>18</sup>

Moreover, the size of the positive charge is proportional to the concentration of chlorhexidine, and reaches stable equilibrium within five minutes. The damage of the cytoplasmic membrane of microorganisms is the result of the outflow of low molecular weight components (e.g. potassium ions), which leads to protoplast shrinkage or plasmolysis. This process, taking place in the environment of the sub-lethal concentration of chlorhexidine, causes the loss of even 50% of potassium ions; it can be reversible provided that the compound is removed. The outflow of divalent cations, especially calcium ions, is observed just before or during changes in the cell wall. It is likely that chlorhexidine, by binding to negatively charged peptidoglycan sites, expels metal cations present in the cell wall.

In higher CHX concentrations, high molecular weight components – nucleotides – are released. The effects of action become irreversible when losing more than 15% of nucleotides. A degree of damage to the cell wall and the outflow of cytoplasmic components increases with the chlorhexidine concentration, then decreases and it is inhibited due to cytoplasmic precipitation at the concentration of 100-500 mg/l.<sup>1,19</sup> The structure of the cytoplasm then changes and a convexity appears on the cell surface. Chlorhexidine is absorbed at a rate that gradually decreases as the number of sites available on the surface of the bacteria falls. Phosphate and 2-keto-deoxy-caprylic groups in the lipopolysaccharide (region A of the lipid core)<sup>20</sup> and carboxyl groups in the proteins are considered to be binding sites. The adsorption by cell wall glycopeptide is unlikely, because the spheroplast of Gram-negative bacteria absorbs as much chlorhexidine as the entire cell.

The concentration below 100 µg/ml is bacteriostatic, even at the concentration of 1 µg/ml or smaller. As for the bacteriostatic activity, the number of micro-organisms that revive decreases with the increasing concentration and the duration of exposure. Primary changes occur in the semi-

icznym. Przy pH obojętnym CHX ma dwa dodatnie ładunki.<sup>18</sup>

Ponadto wielkość dodatniego ładunku jest proporcjonalna do stężenia chlorheksydyny i osiąga stabilną równowagę w ciągu 5 minut. Uszkodzenie błony cytoplazmatycznej drobnoustrojów jest wynikiem wypływu niskocząsteczkowych składników (np. jonów potasu), co prowadzi do skurczenia się lub plasmolizy protoplastu. Ten proces, zachodzący w środowisku subletalnego stężenia chlorheksydyny, prowadzi do utraty nawet 50% jonów potasowych; może on być odwracalny pod warunkiem usunięcia tego związku. Wypływ dwuwartościowych kationów, zwłaszcza wapniowych, jest obserwowany tuż przed zachodzeniem lub w trakcie zachodzenia zmian w ścianie komórkowej. Prawdopodobnie chlorheksydyna, wiążąc się z ujemnie naładowanymi miejscami peptydoglikanu, wypiera kationy metali obecne w ścianie komórkowej.

W wyższych stężeniach CHX dochodzi do wypływu wysokocząsteczkowych składników – nukleotydów. Skutki działania stają się nieodwracalne przy utracie powyżej 15% nukleotydów. Stopień uszkodzenia ściany komórkowej i wypływu składników cytoplazmatycznych wzrasta wraz ze stężeniem chlorheksydyny, po czym zmniejsza się i przy stężeniu 100-500 mg/l jest zahamowany z powodu precipitacji cytoplazmy.<sup>1,19</sup> Struktura cytoplazmy ulega wtedy zmianie, a na powierzchni komórki pojawia się wypukłość. Chlorheksydyna jest absorbowana w tempie, które stopniowo spada wraz z zmniejszaniem się liczby miejsc dostępnych na powierzchni bakterii. Za miejsca połączenia uważa się grupy fosforanowe i 2-ketodeoksykaprylowe w lipopolisacharydzie (region A rdzenia lipidu)<sup>20</sup> oraz grupy karboksylowe w białkach. Adsorpcja przez glikopeptyd ściany komórkowej jest mało prawdopodobna, ponieważ sferoplast bakterii Gram-ujemnych wchłania tyle chlorheksydyny, ile cała komórka.

Poniżej stężenia 100 µg/ml działa bakteriostatycznie nawet w stężeniu 1 µg/ml lub mniejszym. W zakresie działania bakteriostatycznego liczba mikroorganizmów, które odżyły, zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia oraz czasu ekspozycji. Pierwotne zmiany występują w półprzepuszczal-

permeable cell wall and cause leakage of important cellular structures.

### **Application of chlorhexidine to dentistry**

Chlorhexidine is an antibacterial agent that reduces the level of *S. mutans* in saliva and plaque, but it is not known if this action protects against enamel and dentine demineralisation.<sup>21</sup> This compound also has stronger bactericidal activity against *E. faecalis* bacteria found in the dentinal tubules than calcium hydroxide.<sup>22</sup> Rinsing with 2% CHX for two minutes removes *E. faecalis* from the superficial layers of the dentinal tubules to a depth of 100µm.<sup>23,24</sup>

Chlorhexidine can be chemisorbed on the surface of the tooth hydroxyapatite or can react as an ion forming insoluble compounds with phosphate ions that are contained in the dental plaque, saliva and hydroxyapatite.<sup>25</sup> It can then be released without affecting the connection of enamel and dentine with the composite material.<sup>25</sup> Since CHX binds to a greater extent to demineralised than to mineralized dentine, it can be assumed that the CHX absorption mechanism is different for both types of dentine.<sup>26</sup> Probably, positive CHX charges are electrostatically attracted to negative charges of the trivalent phosphate in the crystalline network<sup>27</sup> of the mineralized dentine hydroxyapatite.<sup>26</sup> In demineralised dentine, CHX can electrostatically bind with negatively charged carboxylic groups of collagen or create hydrogen bonds with carboxylic groups. Both types of bonds are non-specific.<sup>26</sup>

The efficacy of CHX action is attributed to its substantivity.<sup>28</sup> Long-term effects (up to twelve weeks), however, result from the absorption and slow rate of the release of chlorhexidine from dentine hydroxyapatite, saliva, dental plaque, pellicle and mucous membrane.<sup>21</sup> In turn, chlorhexidine used as a rinsing agent during root canal treatment has an antibacterial effect lasting up to seventy-two hours. The CHA substantivity towards dentine tissue depends on the concentration used.<sup>29</sup> At higher concentrations, CHX limits the bacterial growth and penetration into the dentinal tubules.<sup>30</sup> At lower chlorhexidine concentrations, the bacterial metabolism is slowed down by the

nej ścianie komórkowej i powodują wyciek ważnych struktur komórkowych.

### **Zastosowanie chlorheksydyny w stomatologii**

Chlorheksydyna jest środkiem przeciwbakteryjnym, który obniża poziom *S. mutans* w ślinie i płytce nazębnej, ale nie wiadomo, czy to działanie chroni przed demineralizacją szkliwa i zębiny.<sup>21</sup> Związek ten działa też bójczo na bakterie *E. faecalis* znajdujące się w kanalikach zębiny skuteczniej niż wodorotlenek wapnia.<sup>22</sup> Płukanie 2% CHX przez 2 minut usuwa *E. faecalis* z powierzchniowych warstw kanalików zębiny na głębokości do 100 µm.<sup>23,24</sup>

Chlorheksydyna może zostać chemisorbowana na powierzchni hydroksyapatytu zęba lub może reagować jako jon, tworząc nierozpuszczalne związki z jonami fosforanowymi, które są zawarte w płytce nazębnej, ślinie i hydroksyapatycie.<sup>25</sup> Następnie może być uwalniana, nie wpływając na połączenie szkliwa i zębiny z materiałem kompozytowym.<sup>25</sup> Ponieważ CHX wiąże się w większym stopniu z zębina zdemineralizowaną niż zmineralizowaną, można przypuszczać, że mechanizm absorpcji CHX jest różny dla obu rodzajów zębiny.<sup>26</sup> Prawdopodobnie dodatnie ładunki CHX są przyciągane elektrostatycznie do ujemnych ładunków trójwartościowego fosforanu w sieci krystalicznej<sup>27</sup> hydroksyapatytu zmineralizowanej zębiny.<sup>26</sup> W przypadku zębiny zdemineralizowanej CHX może wiązać się elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi kolagenu lub wytworzyć wiązania wodorowe z grupami karboksylowymi. Oba typy wiązań są niespecyficzne.<sup>26</sup>

Skuteczność działania CHX przypisywana jest jej substantywności.<sup>28</sup> Długotrwałe działanie (nawet do 12 tygodni) wynika natomiast z absorpcji i wolnego tempa uwalniania chlorheksydyny z hydroksyapatytów zębiny, śliny, płytki nazębnej, błonki nabytej, błony śluzowej.<sup>21</sup> Z kolei chlorheksydyna zastosowana jako środek płuczający podczas leczenia kanałowego działa przeciwbakteryjnie do 72 godzin. Substantywność CHA wobec tkanki zębinowej zależy od zastosowanego stężenia.<sup>29</sup> W wyższych stężeniach CHX ogranicza wzrost bakterii i penetrację w głąb kanalików



inhibition of proteolytic enzymes and glycoside hydrolases.<sup>31</sup>

Chlorhexidine (CHA and CHG) as a synthetic non-specific inhibitor of *matrix metalloproteinases*<sup>32</sup> inhibits MMP-2, MMP-8 and MMP-9 already at very low concentrations of 0.01-0.02%.<sup>26,33-35</sup> Chlorhexidine gluconate applied to the etched dentine inhibits MMPs exposed by orthophosphoric acid. It should be remembered that CHX does not prevent the degradation of polymers.<sup>36</sup>

In addition, in dentistry, chlorhexidine is used as a component of rinses at the concentration of 0.2%, and the concentration of 1–2% is applied in gels for rinsing defects and root canals. Cervitec is an example of a dental preparation containing 1% chlorhexidine acetate and 1% thymol. This varnish directly interacts with hard tissues of the tooth and has a long-lasting antibacterial effect (up to ninety days).<sup>37</sup>

### **Resistance to chlorhexidine**

Chlorhexidine can induce resistance in microorganisms, and this is probably the result of the reduced CHA absorption by resistant cells and changes that occurred in the cellular coat of bacteria.<sup>38</sup> A relationship has been observed between bacterial resistance to CHA and antibiotic resistance – the changes in lipopolysaccharides can play the role in this mechanism. Chlorhexidine acetate as an amphoteric molecule has the ability to bind to many proteins through a chelating mechanism. In this way, it can affect ferritin which is iron storage protein destroying cell protection against free oxygen radicals.<sup>39</sup>

### **Adverse effects of chlorhexidine**

Chlorhexidine salt does not show any irritating effects. This compound is characterized by low harmfulness and essentially no toxic effects. CHX is thought to have an adverse effect on tissues and growth factors which are released from dentine and support regeneration.<sup>40</sup> The most common side effects include contact dermatitis, rarely: hypersensitivity and anaphylaxis, photodermatitis, occupational asthma, rash as a result of interaction with drugs and the permanent hearing loss after the

zębinowych.<sup>30</sup> Przy niższych stężeniach chlorheksydyny zwolnieniu ulega metabolizm bakterii poprzez inhibicję enzymów proteolitycznych i hydrolaz glikozydowych.<sup>31</sup>

Chlorheksydyna (CHA i CHG) jako syntetyczny niespecyficzny inhibitor metaloproteinazy macierzowej<sup>32</sup> hamuje MMP-2, MMP-8 i MMP-9 już w bardzo niskich stężeniach wynoszących 0,01-0,02%.<sup>26,33-35</sup> Glukonian chlorheksydyny zastosowany na wytrawioną zębinę powoduje hamowanie MMPs odsłoniętych przez kwas ortofosforowy. Należy przy tym pamiętać, że CHX nie zapobiega degradacji polimerów.<sup>36</sup>

Ponadto w stomatologii chlorheksydyna stosowana jest jako składnik płukanek w stężeniu 0,2%, w żelach, natomiast w stężeniu 1-2% do płukania ubytku oraz kanałów korzeniowych. Przykładem preparatu stomatologicznego zawierającego 1% octanu chlorheksydyny i 1% tymolu jest Cervitec. Ten lakier bezpośrednio oddziałuje z tkankami twardymi zęba i wykazuje długotrwałe działanie przeciwbakteryjne (aż do 90 dni).<sup>37</sup>

### **Oporność wobec chlorheksydyny**

Chlorheksydyna może wywoływać oporność u drobnoustrojów, która prawdopodobnie jest wynikiem zmniejszonej absorpcji CHA przez odporne komórki oraz zmian, które zaszły w osłonie komórkowej bakterii.<sup>38</sup> Zaobserwowano związek między opornością bakterii na CHA a opornością na antybiotyki – w mechanizmie tym mogą odgrywać rolę zmiany w lipopolisacharydach. Octan chlorheksydyny jako cząsteczka amfoteryczna ma zdolność do łączenia się z wieloma białkami poprzez mechanizm chelatujący. W ten sposób może oddziaływać na ferrytynę, białko magazynujące żelazo, powodując niszczenie ochrony komórek przed działaniem wolnych rodników tlenowych.<sup>39</sup>

### **Działania niepożądane chlorheksydyny**

Chlorheksydyna w postaci soli nie wykazuje działania drażniącego. Związek ten charakteryzuje się niewielką szkodliwością i zasadniczo brakiem działania toksycznego. Uważa się, że CHX może mieć niekorzystny wpływ na tkanki i na uwalnianie czynników wzrostu z zębiny, które wspomagają regenerację.<sup>40</sup> Najczęściej występującym

CHX contact with the inner ear. On the other hand, no mutagenic effect was found.

Chlorhexidine, used for a long time in dental treatment, most often causes discoloration of the teeth, tongue and fillings made up of composite and glass-ionic materials, irritations of the mucous membrane and taste disorders, but these symptoms are transient and disappear after the end of therapy.

### ***The use of chlorhexidine in adhesive dentistry***

In connection with the development of dental materials whose aim is to control the bacterial infection within the tooth tissue defect, chlorhexidine is used to disinfect the defect before it is filled and, increasingly, builds binding systems and dental filling materials. It has been proven that the use of chlorhexidine gel (1%) onto the surface of the prepared enamel and dentine may adversely affect the strength of the connection between the latter and the composite material.<sup>41,42</sup> Also, after the use of a single-stage self-etch binding system,<sup>43</sup> disinfection of the defect with 2% CHX results in micro-leakage at the border of the tooth tissue and composite filling material. In contrast, modification of the composition of two-step primer, a self-etching binding system, by adding 1.0 wt.% (or less) of chlorhexidine gluconate, does not adversely affect the strength of its connection with dentine.<sup>44,45</sup> Similarly, the modification of the Total Etch binding system composition by adding 0.2% chlorhexidine diacetate did not change its mechanical and chemical properties.<sup>46</sup> It is stated that the addition of 1.25% chlorhexidine gluconate to the resin-modified glass ionomer material increases antibacterial properties of the material and has no effect on its mechanical strength.<sup>47</sup>

Due to the wide spectrum of the antimicrobial activity, chlorhexidine is still an important element of studies on new materials and techniques used in restorative dentistry.

działaniem niepożądanym jest kontaktowe zapalenie skóry, a rzadko: nadwrażliwość i anafilaksja, fotodermatoza, astma zawodowa, wysypka jako efekt interakcji z lekami oraz trwała utrata słuchu po kontakcie CHX z uchem wewnętrznym. Stwierdzono natomiast brak działania mutagenego.

Chlorheksydyna stosowana przez długi czas w leczeniu stomatologicznym najczęściej powoduje przebarwienia zębów, języka, wypełnień z materiałów kompozytowych oraz gładjonomerowych, podrażnienia błony śluzowej i zaburzenia smaku, jednak objawy te mają charakter przejściowy i ustępują po zakończeniu terapii.

### ***Zastosowanie chlorheksydyny w stomatologii adhezyjnej***

W związku z rozwojem materiałoznawstwa stomatologicznego, którego celem jest kontrola zakażenia bakteryjnego w obrębie ubytku tkanek zęba, chlorheksydyna jest stosowana do dezynfekcji ubytku przed jego wypełnieniem oraz, coraz częściej, jako składnik systemów wiążących czy stomatologicznych materiałów wypełniających. Dowiedziono, że zastosowanie żelu zawierającego chlorheksydynę (1%) na powierzchnię opracowanego szkliwa i zębiny może wpływać niekorzystnie na wytrzymałość połączenia tej ostatniej z materiałem kompozytowym.<sup>41,42</sup> Również dezynfekcja ubytku 2% CHX powoduje powstanie mikroprzecieku na granicy tkanek zęba i kompozytowego materiału wypełniającego, po zastosowaniu jednoetapowego samotrawiącego systemu wiążącego.<sup>43</sup> Natomiast modyfikacja składu primera dwuetapowego, samotrawiącego systemu wiążącego poprzez dodatek 1,0% wag. (lub mniejszy) glukonianu chlorheksydyny nie wpływa negatywnie na wytrzymałość jego połączenia z zębina.<sup>44,45</sup> Podobnie modyfikacja składu systemu wiążącego Total Etch przez dodatek 0,2% dioctanu chlorheksydyny nie zmieniła jego właściwości mechanicznych i chemicznych.<sup>46</sup> Podaje się, że dodatek 1,25% glukonianu chlorheksydyny do materiału gładjonomerowego modyfikowanego żywicą, powoduje wzrost właściwości przeciwbakteryjnych materiału i pozostaje bez wpływu na jego wytrzymałość mechaniczną.<sup>47</sup>

Ze względu na szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, chlorheksydyna ciągle jest ważnym punktem badań nad nowymi materiałami i technikami stosowanymi w stomatologii odtwórczej.

## References

1. *Block SS*: Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
2. *Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A*: Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod* 2007; 33: 966-969.
3. *Marchesan MA, Júnior BP, de Freitas Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C*: Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2007; 103: e103-e105.
4. *Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN*: Determination of 4-Chloroaniline and Its Derivatives Formed in the Interaction of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine by Using Gas Chromatography. *J Endod* 2010; 36: 312-314.
5. *Krishnamurthy K, Sudhakaran S*: Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 2010; 36: 1154-1157.
6. *Thomas JE, Sem DS*: An In Vitro Spectroscopic Analysis to Determine Whether Para-Chloroaniline Is Produced from Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine." *J Endod* 2010; 36: 315-317.
7. *Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC*: Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Root Dentin." *J Endod* 2008; 34: 181-185.
8. *Van der Bijl P, Gelderblom WC, Thiel PG*: On the mutagenicity of parachloroaniline, a breakdown product of chlorhexidine." *J Dent Assoc S Afr* 1984; 39: 535-537.
9. *Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S*: Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year drinking water treatment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016; 76: 63-73.
10. *Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC*: Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 1991; 29: 119-124.
11. *González-López S, Camejo-Aguilar D, Sanchez-Sanchez P, Bolaños-Carmona V*: Effect of CHX on the Decalcifying Effect of 10% Citric Acid, 20% Citric Acid, or 17% EDTA. *J Endod* 2006; 32: 781-784.
12. *Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM*: Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 274-281.
13. *Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M*: Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine." *Arch Oral Biol* 2009; 54: 588-594.
14. *Hamers AD, Shay K, Hahn BL, Sohnle PG*: Use of a microtiter plate assay to detect the rate of killing of adherent *Candida albicans* by antifungal agents. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 1996; 81: pp. 44-49.
15. *Patel MP, Cruchley AT, Coleman DC, Swai H, Braden M, Williams DM*: A polymeric system for the intra-oral delivery of an anti-fungal agent. *Biomaterials*. 2001; 22: 2319-2324.
16. *Malicka B, Ziętek M, Grzebieluch W*: Zastosowanie chlorheksydyny w stomatologii. *Dent Med Probl* 2005; 42: 497-505.
17. *Strużycka I, Hryniewicz W, Skoczyńska A, Wierzbicka M, Rucińska K, Radziejewska M, et al.*: Susceptibility of mutans streptococci to chlorhexidine and other antimicrobial agents." *Nowa Stomatol* 2000; 4: 10-12.
18. *Blackburn RS, Harvey A, Kettle LL, Manian AP, Payne JD, Russell SJ*: Sorption of chlorhexidine on cellulose: mechanism of binding and molecular recognition." *J Phys Chem B* 2007; 111: 8775-8784.

19. McDonnell G, Russell AD: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." Clin Microbiol Rev 1999; 12: 147-179.
20. Tattawasart U, Maillard JY, Furr J, Russell A: Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. Int J Antimicrob Agents 2000; 16: 233-238.
21. van Strijp AJ, Gerardu VA, Buijs MJ, van Loveren C, ten Cate JM: Chlorhexidine efficacy in preventing lesion formation in enamel and dentine: An in situ study. Caries Res 2008; 42: 460-465.
22. Schäfer E, Bössmann K: Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. J Endod 2005; 31: 53-56.
23. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF: "Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro." Endod Dent Traumatol 1993; 9: 243-248.
24. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM: Residual effectiveness of final irrigation regimens on enterococcus faecalis-infected root canals, J Endod 2011; 37: 1121-1123.
25. Misra P, Qi C, Yu S, Shah SH, Cao WQ, Rao MS, et al.: Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation. J Biol Chem 2002 31; 277: 20011-20019.
26. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al.: Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. Dent Mater 2010; 26: 771-778.
27. LeGeros RZ: Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monogr Oral Sci 1991; 15: 1-201.
28. Whelton: The caries-preventive effect of chlorhexidine varnish in children and adolescents: a systematic review. Caries Research 2010; 44: 333-340.
29. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al.: Substantivity of chlorhexidine to human dentin. Dent Mater 2010; 26: 779-785.
30. Lindblad RM, Lassila LV, Salo V, Vallittu PK, Tjäderhane L: Effect of chlorhexidine on initial adhesion of fiber-reinforced post to root canal. J Dent 2010; 38: 796-801.
31. 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.
32. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, et al.: Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. Dent Mater 2010; 26: 571-578.
33. Gendron R, DGrenier D, Sorsa T, Mayrand D: Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol 1999; 6: 437-439.
34. Dabrowska E, Letko M, Roszkowska-Jakimiec W, Letko R, Sadowski J: Effect of chlorhexidine mouthrinse on cathepsin C activity in human saliva. Adv Med Sci 2006; 51 Suppl 1: 96-99.
35. Garcia MB, Carrilho MR, Nör JE, Anauate-Netto C, Anido-Anido A, Amore R, et al.: Chlorhexidine inhibits the proteolytic activity of root and coronal carious dentin in vitro. Caries Res 2009; 43: 92-96.
36. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD: A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. J Dent 2011; 39: 40-47.
37. Haukali G, Poulsen P: Effect of a varnish containing chlorhexidine and thymol (Cervitec??) on approximal caries in 13- to 16-year-old schoolchildren in a low caries area. Caries Res 2003; 37: 185-189.
38. Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD: Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. J Hosp Infect 1999; 42: 219-229.
39. Negrelo Newton AP, Cadena SM, Merlin Rocha ME, Skäre Carnieri EG, Martinelli de Oliveira MB: New data on biological effects of chlorhexidine: Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition. Toxicol Lett 2004; 1, 151: 407-416.
40. Fouad AE: The microbial challenge to pulp regeneration. Adv Dent Res 2011; 23: 285-289.
41. Dalli M, Ercan E, Zorba Y, A°nce B: Effect of 1% chlorhexidine gel on the bonding strength to dentin. J Dent 2010; 5: 8-13.
42. Gürkan S, Bolay S, Kiremitçi A: Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. J Oral Rehabil 1999; 26: 836-840.
43. Singla M, Aggarwal V, Kumar N: Effect of chlorhexidine cavity disinfection on microleakage in cavities restored with composite using a self-etching single bottle adhesive. 2011 J Conserv Dent 2011; 14: 374-377.
44. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L: Effect of chlorhexidine application in a self-



- etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength.” *J Adhes Dent* 2010; 12: 27-31.
45. *Hiraishi N, Yiu CKY, King NM, Tay FR*: Effect of chlorhexidine incorporation into a self-etching primer on dentine bond strength of a luting cement. *J Dent* 2010; 38: 496-502.
46. *Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, et al.*: Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces.” *J Dent* 2014; 42: 39-47.
47. *de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA*: In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent* 2013; 41: 155-163.

Address: 92-213 Łódź, ul. Pomorska 251  
Tel.: +4842 6757461  
e-mail: e-mail: [barbara.lapinska@umed.lodz.pl](mailto:barbara.lapinska@umed.lodz.pl)

Received: 22<sup>nd</sup> December 2016  
Accepted: 23<sup>rd</sup> August 2017