

Влияние геля с маслом чайного дерева на зубной налет и хронический гингивит

S. Soukoulis,* R. Hirsch*

* Стоматологическая школа при университете Аделаиды.

Аннотация

Обоснование: В этом клиническом исследовании выполнялась оценка эффектов применяемого местно геля с маслом чайного дерева (МЧД) в отношении зубного налета и хронического гингивита.

Методы: В данном двойном слепом лонгитюдном, не перекрестном исследовании принимали участие 49 человек без других медицинских нарушений, (24 мужчины и 25 женщин) в возрасте от 18 до 60 лет, которые не курили и страдали тяжелым хроническим гингивитом. Участников случайным образом разделили (рандомизацией) на три группы, одна из которых лечилась гелем с МЧД (2,5%), другая – гелем с хлоргексидином (ХГД) (0,2%) и третья – плацебо. Исследуемые средства наносились зубной щеткой два раза в день. Терапевтические эффекты оценивались через четыре и восемь недель исследования при помощи десневого индекса (GI), индекса кровоточивости сосочков (PBI) и индекса зубного налета (PSS).

Результаты: Побочные реакции на все виды исследуемых гелей отсутствовали. Данные были разделены по подмножествам зубов (передние и жевательные) и зубным поверхностям (щечные и язычные). В группе МЧД было установлено достоверное снижение оценок PBI и GI. Однако оценки зубного налета показали, что МЧД не только не уменьшало отложения налета, но и способствовало его усилению в последние недели исследуемого периода.

Вывод: Хотя для более определенных выводов нужны дальнейшие исследования, результаты этой работы показали, что противовоспалительные свойства геля с МЧД, наносимого местно на воспаленные ткани десны, позволяют использовать его в качестве полезного нетоксичного средства, дополняющего химиотерапию периодонта.

Ключевые слова: эфирное масло, зубной налет, хронический гингивит.

(Принято к публикации 1 марта 2004.)

ПРЕДИСЛОВИЕ

Масло чайного дерева (МЧД) получают из бумажнокорового дерева семейства миртовых (Myrtaceae). Обычно используются два рода - лептоспермум (*Leptospermum*) и мелалеука (*Melaleuca*). Аборигены Австралии использовали получаемые из этих деревьев лекарственные вещества, включая и МЧД, на протяжении нескольких десятков тысячелетий. Эти растительные препараты применялись внутренне и наружно для ослабления боли и укрепления здоровья.¹ МЧД аборигены использовали для лечения ссадин, порезов, простуды и гриппа. Сегодня МЧД во всем мире применяют в составе косметики, медицинских и стоматологических средств (так называемые «натуральные» зубные пасты). Вместе с тем, в литературе очень мало публикаций о влиянии МЧД на периодонт, и такие средства не проходили строгих процедур оценки, установленных федеральными органами для обычных медицинских средств.

Основными активными ингредиентами МЧД являются 1,8-цинеол и терпинен-4-ол. Кроме того, масло содержит множество других компонентов с пока еще не изученными биологическими свойствами. Эти компоненты также обнаруживаются и в других широко применяемых эфирных маслах, в частности в эвкалиптовом и фенхельном масле. 1,8-цинеол обладает противовоспалительными свойствами,²⁻⁴ и это вещество проникает через человеческую кожу.⁵ Терпинен-4-ол оказывает сходные противовоспалительные действия^{6,7}, но дополнительно обладает бактерицидной активностью.⁸⁻¹²

Несмотря на совершенно другие механизмы действия, диапазон противомикробной активности МЧД примерно такой же, как и у хлоргексидина (ХГД).^{9,12-18} Оба эти вещества проявляют бактерицидные, противовирусные и противогрибковые свойства. Поэтому МЧД представляется многообещающим средством для лечения хронического гингивита и периодонтита, которые, как известно, имеют бактериальный и воспалительный компоненты.

Задачей данного исследования было изучение в неконтролируемых условиях лечебного эффекта геля с МЧД, наносимого два раза в день на воспаленные участки десны, и оценка количества зубного налета у испытуемых с нелеченным ранее периодонтом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Это исследование получило разрешение комитета по этике исследований на людях Аделаидского университета. Все участники предоставили подписанные формы информированного согласия на участие в исследовании. Для участия отбирались не страдающие курением лица мужского и женского пола в возрасте от 18 до 60 лет с зубным налетом и гингивитом средней или серьезной тяжести (оценка GI 2-3 не менее одного зуба в каждом квадранте). Необходимыми условиями участия в исследовании было наличие не менее 20

собственных зубов, отсутствие диабета, заболеваний почек и печени, ревматоидного артрита, беременности и лактации, а также известной аллергии на МЧД и предшествующего лечения периодонта в последние шесть месяцев. Среди прочих критериев исключения были: прием стероидов, нестероидных противовоспалительных средств, дилантина или антибиотиков длительностью более семи дней в последние шесть месяцев, а также стоматологическая антибиотикотерапия.

Исследование проводилось по двойной, слепой, лонгитюдной, не перекрестной схеме с тремя группами участников. Одна группа, экспериментальная, применяла МЧД (гель с 2,5% МЧД). Вторая группа положительного контроля лечилась ХГД (гель с 0,2% хлоргексидина, Периогард/Periogard, Колгейт, шт. Новый Южный Уэльс, Австралия) и третья группа отрицательного контроля использовала плацебо (гель по виду и запаху идентичен активным препаратам, но без МЧД). Продолжительность исследования составляла восемь недель с оценкой в контрольные моменты через 0, 4 и 8 недель лечения. Оценка выполнялась при помощи десневого индекса (GI),¹⁹ индекса сосочкового кровотечения (PBI) и оценки поверхностного зубного налета (PSS). Система оценки зубного налета (PSS) представляла собой модификацию индекса зубного налета Турески (Turesky),²⁰ определяемого нанесением на зуб проявляющего раствора с эритрозином 1% (масс./вес.) (Дисклогель/Disclogel, Колгейт, шт. Новый Южный Уэльс, Австралия).

Таблица 1. Распределение участников по возрасту и полу

Группа	Женщин	Мужчин	n	Средний возраст	Стандартное отклонение	95% ДИ LB	95% ДИ HB	Минимальный возраст	Максимальный возраст
Плацебо	7	8	15	46.53	7.90	42.16	50.91	32	61
ХГД	10	8	18	44.89	11.62	39.11	50.67	26	63
МЧД	7	9	16	45.50	8.84	40.79	50.21	30	62
Всего	24	25	49	45.59	9.53	42.85	48.33	26	63

ДИ = доверительный интервал.

Во время первого визита всех участников исследования инструктировали наносить гель по всей длине щетины предоставляемой зубной щетки. Также участникам раздавались двухстраничные буклеты с подробными инструкциями о нанесении геля. Гелем следовало пользоваться как зубной пастой, т.е. два раза в день требовался контакт не менее двух минут с прилегающими к зубу тканями десны. На протяжении 30 минут после нанесения геля запрещалось полоскать рот, есть и пить. Кроме того, участников просили на протяжении всего периода исследования не пользоваться патентованными зубными пастами, ополаскивателями рта или другими чистящими средствами. Участникам случайным образом назначался один из трех гелей. Ни участники, ни исследователи до окончания исследования не знали состава геля.

Для определения субъективной погрешности, вносимой исследователями, было выполнено дополнительное обследование пятерых участников в возрасте от 26 до 63 лет с измерением GI, PBI и PSS четырех участков вокруг каждого зуба (один день между исследованиями). В дальнейшем применялись аналогичные процедуры обследования.

Анализ данных

Статистические анализы данных выполнялись при помощи компьютерного программного обеспечения (SPSS, версия 10.05, Чикаго, США). Статистические отличия средних значений исследуемых групп определялись при помощи критериев дисперсионного анализа. Статистически достоверные вариации средних значений каждой группы определялись при помощи критерия Шеффе. Достоверность изменений в каждой группе между периодами времени 0-4, 4-8 и 0-8 недель устанавливалась при помощи парных *t*-критериев. Данные каждого отдельного субъекта суммировались, усреднялись и взвешивались в зависимости от количества исследованных зубов этого испытуемого.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Профиль исследуемой популяции

Для исследования было отобрано пятьдесят восемь человек. Из них девять не закончили исследование и их данные в конечных анализах не использовались. Среди оставшихся 49 участников было 25 мужчин и 24 женщины. В таблице 1 представлено распределение этих участников по возрасту и полу, которое показывает отсутствие статистически достоверных отличий между группами (критерий хи-квадрат Пирсона соответственно $p=0.772$ и $p=0.889$).

Статистический анализ показал приемлемые границы субъективной погрешности, вносимой исследователями.

Побочные реакции ни на один из применяемых гелей не сообщались. Между тремя группами было обнаружено несколько достоверных отличий динамики средних оценок GI, PSS и PBI. После включения в анализ данных всех зубов и поверхностей оказалось, что большинство изменений во всех трех группах произошли в первые четыре недели исследования. После разделения данных по передним/жевательным зубам и щечной/язычной поверхности критерии дисперсионного анализа PBI обнаружили в группе геля с МЧД статистически достоверные отличия средних значений относительно положительных и отрицательных контролей (совокупности данных щечной поверхности и передних зубов). Критерии дисперсионного анализа также применялись для выявления отличий улучшений между группами, т.е. для сравнения минимальных оценок на четвертой и восьмой неделе с полученными

вначале исследования значениями (данные РВІ, GІ и PSS). На рисунках 1 и 2 в графической форме представлены общие результаты РВІ и GІ.

Совокупность данных всех зубов и поверхностей (общий набор данных), совокупность щечной поверхности и совокупности данных передних и жевательных зубов показали наибольшее количество улучшений оценок РВІ в группе МЧД. Все совокупности данных, за исключением одной (совокупность данных передних зубов), были статистически достоверными. Максимальное улучшение оценок РВІ было установлено для данных щечной поверхности. Наибольшее число временных периодов с максимальными улучшениями (9) было в группе МЧД. В группе ХГД было 4 таких периода, а в группе плацебо лишь 1.

Группа ХГД отличалась наибольшим количеством временных периодов с максимальными улучшениями оценки GІ (7), затем по этому критерию шла группа МЧД (6) и замыкала тройку группа плацебо (5). В группе МЧД было максимальное количество участков с улучшением GІ. В общем, отличия между группами были незначительные, о чем свидетельствовало отсутствие статистической достоверности.

Статистически достоверные отличия оценок PSS разных групп отсутствовали. В группе МЧД во все временные периоды постоянно отмечалось наименьшее количество участков с улучшениями. Наиболее выраженные по сравнению с другими группами улучшения PSS были в группе ХГД. Например, в группе ХГД было большее количество временных периодов с максимальными улучшениями (11), чем в группе плацебо (4) или МЧД (1).

Средние изменения в группах

Парные *t*-критерии показали статистически достоверные изменения оценок GІ и РВІ (см. рисунок 1 и 2). Большинство этих достоверных отличий было в группах МЧД и ХГД. Парные *t*-критерии подтвердили, что использование геля с МЧД связано с наиболее выраженными изменениями РВІ во всех совокупностях данных временных периодов 0-4 и 0-8 неделя. Такие изменения были установлены для 10 из 15 временных периодов (пять совокупностей данных трех временных периодов 0-4, 4-8 и 0-8 неделя). За исключением данных язычной поверхности, все эти результаты были статистически достоверными. В группе геля с ХГД было пять временных периодов с максимальными изменениями, но все без статистической достоверности отличий (рис. 1). Для группы ХГД было установлено максимальное изменение GІ в большинстве совокупностей данных (восемь временных периодов) со статистически достоверными результатами для семи периодов. В группе МЧД было шесть временных периодов с максимальными изменениями, и достоверные результаты были получены для пяти из них (рисунок 1).

По PSS достоверные отличия отсутствовали. Вместе с тем, только в группе МЧД наблюдалось увеличение оценки отложений зубного налета в периоды 0-4 и 0-8 неделя. Наибольшее снижение оценки зубного налета в большинстве совокупностей данных было установлено для группы ХГД (7), затем шла группа плацебо (6) и замыкала ряд группа МЧД (1).

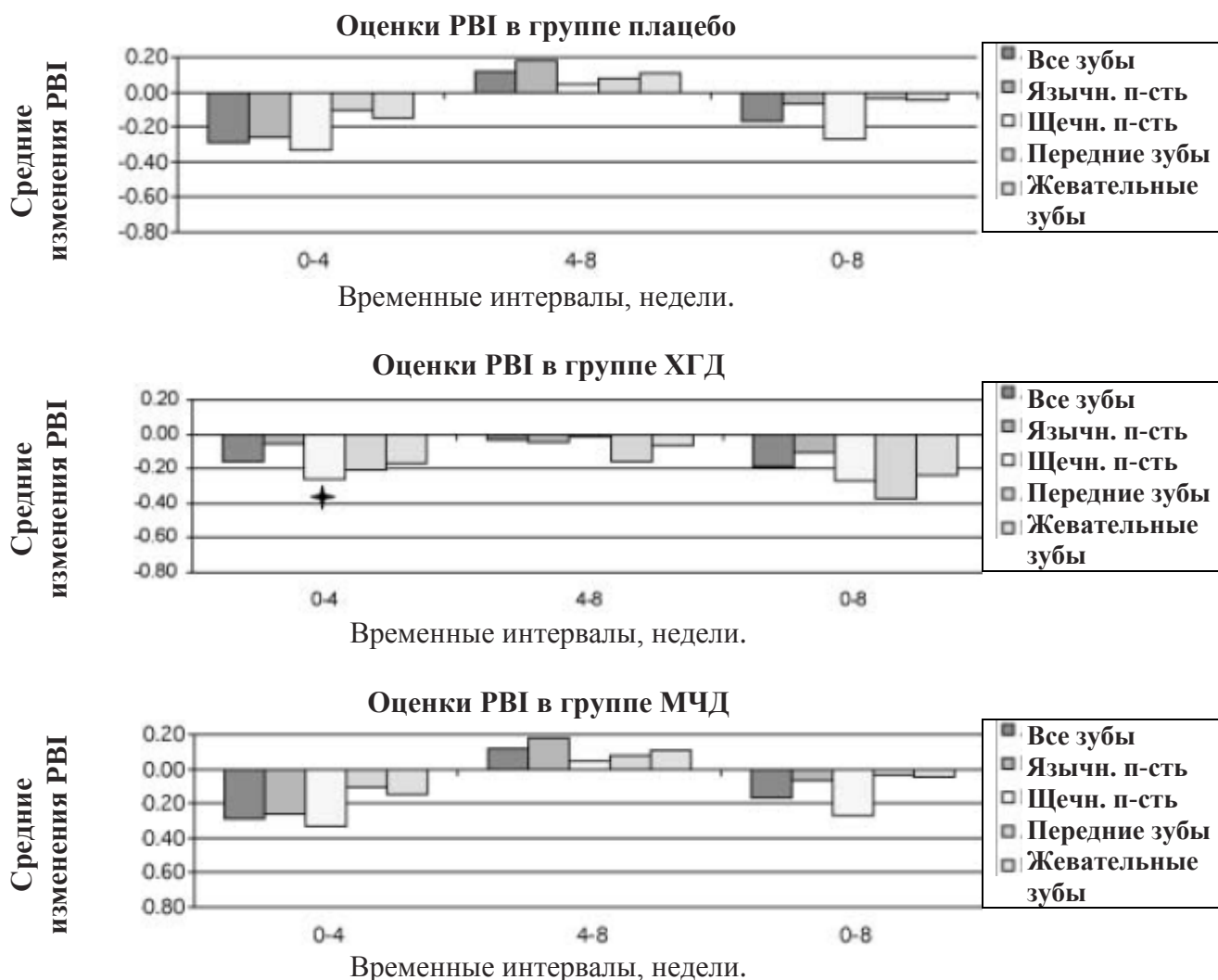


Рисунок 1. Средние изменения RVI в общей совокупностях данных всех зубов, совокупностях данных щечной/язычной поверхности и передних/жевательных зубов.

ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом присущих этой работе ограничений, полученные результаты показали, что гель с МЧД ослабляет воспаление десны эффективнее, чем положительный или отрицательный контроль. Интересно, что улучшение оценки RVI в группе МЧД не сопровождалось снижением оценок образования зубного налета.

Хотя средние благотворные изменения в группе МЧД не превышали одной единицы, этот эффект достигался в нескольких совокупностях данных. Например, полученное для щечных поверхностей среднее значение 0,75 (среднее изменение за период 0-4 неделя) в три раза превышало значение группы ХГД (0,26) и в два раза показатель группы плацебо (0,33). Доверительные интервалы 95% для щечных поверхностей показывали изменение на одну единицу (диапазон 0,49-1,01), что свидетельствовало о клинически выраженных изменениях на щечных поверхностях в группе МЧД.

В группе МЧД наибольшее число участков с улучшениями было обнаружено в следующих совокупностях данных: общая совокупность всех зубов, совокупность жевательных зубов, передних зубов и щечных поверхностей. Для периода 0-4 неделя улучшения во всех совокупностях данных (за исключением передних зубов) были статистически достоверными. Наиболее выраженное улучшение оценок РВІ было получено для щечных поверхностей. Наблюдаемые улучшения РВІ свидетельствовали, что МЧД ослабляло гингивит в большей степени, чем другие исследуемые средства.

Критерии дисперсионного анализа не обнаружили достоверных отличий средних групповых значений и средних изменений, т.е. реакции в зависимости от анализируемой совокупности данных были или примерно одинаковыми, или слабовыраженными. Результаты примерно совпадали с полученными в других исследованиях гелей с ХГД,²¹⁻²³ хотя авторы тех работ сообщали бóльшие изменения, чем наблюдаемые в нашем исследовании. Возможным объяснением этого является тот факт, что к участию в исследовании допускались люди с зубным камнем, который перед исследованием удалялся. Поэтому не исключено, что сообщаемые изменения отражали комбинированный эффект механической чистки и действия геля с ХГД.

Основной вывод нашего исследования в том, что снижение оценок РВІ и GI в группах МЧД и ХГД указывает на клинически выраженный терапевтический эффект даже несмотря на, в общем-то, неудовлетворительную гигиену ротовой полости и наличие у участников на протяжении всего исследования зубного камня и значительного налета под и над десной.

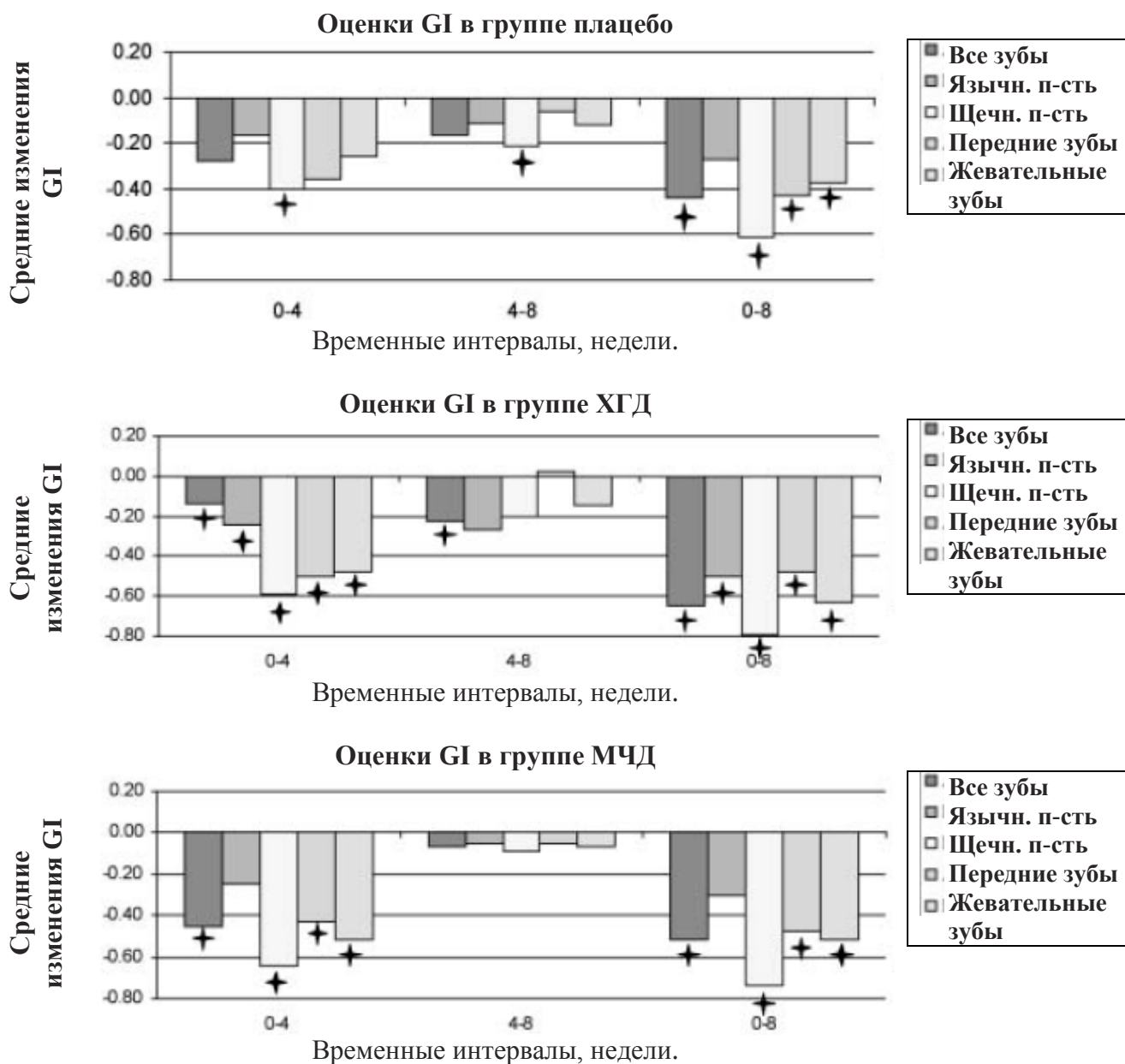


Рисунок 2. Изменения оценок GI в общей совокупности данных всех зубов, в совокупности данных щечной/язычной поверхности и передних/жевательных зубов. (Значком (+) отмечены статистически достоверные отличия внутри групп между временными периодами 0-4, 4-8 и 0-8 неделя).

Пока нет «золотого стандарта» оценки тяжести гингивита, лечебных эффектов различных препаратов и терапевтических методик. Поскольку в исследованиях различных средств гигиены ротовой полости часто применяется GI, мы также его использовали для возможности сравнения с результатами других авторов. Вместе с тем, GI присущи существенные ограничения, которым в соответствующей литературе почему-то уделяется мало внимания. Так, GI имеет меньше оценочных критериев, чем РВІ; следовательно, по сравнению с

PBI он менее информативный и менее чувствительный к слабым изменениям воспаления десны. Также стоит отметить, что GI был выработан на заре развития периодонтологии. В то время считалось, что развитию ВОР предшествует изменение окраски тканей десны, хотя дальнейшие исследования опровергли это предположение.^{24,25} Изменение окраски десны не всегда является индикатором воспаления десневой ткани, поскольку на начальном этапе развития воспалительного поражения ВОР может присутствовать и без внешних изменений окраски. Кроме того, при использовании в качестве индикатора состояния периодонта изменений окраски десны на точность оценки могут влиять такие смешивающие факторы, как слизисто-кожные поражения десны (эрозивный красный плоский лишай, пемфигус и т.д.)

При продлении данного исследования оправдано добавление клинической оценки воспаления десны, которая бы позволила повысить объективность. Это может быть оценка по температуре придесневого кармана²⁶ или же измерение уровня цитокинов (например, ИЛ-1, ИЛ- 6, ИЛ-8).²⁷

Полученная в нашем и в некоторых других исследованиях информация показывает, что мощный *in vitro* бактерицидный эффект МЧД в условиях *in vivo* не транслируется на ослабление образования зубного налета. Отмечались слабые изменения PSS, в том числе и в группе ХГД, но эти изменения не были статистически достоверными. Пока опубликовано лишь два исследования, в которых *in vivo* оценивались эффекты МЧД в отношении бактериальной флоры ротовой полости и образования зубного налета. Наблюдаемая в нашем исследовании реакция PSS в группе МЧД была примерно такой же, как и в других работах исследовавших МЧД в качестве бактерицидного средства для ротовой полости.²⁸ Однако прямое сравнение результатов этих работ невозможно по причине отличий протоколов исследований и применяемых форм МЧД (гель и ополаскиватели рта). Так, ополаскиватели рта с МЧД эффективно снижали численность бактерий в слюне примерно на полчаса. Снижение было примерно такое же, как и после используемого в качестве контроля ХГД, однако через шесть часов после применения МЧД уровни бактерий в слюне возвращались в норму, а бактерицидный эффект ХГД сохранялся.

Аналогичные результаты наблюдались в клиническом испытании ополаскивателя рта с МЧД²⁸. Это исследование проводилось по перекрестному протоколу с перерывом в три дня при участии восьми человек. После четырех дней полного отсутствия гигиены рта на протяжении недели выполнялись ополаскивания простой водой. Следующую неделю применялся ополаскиватель с ХГД и в последнюю неделю ополаскиватель с МЧД. Оценка налета выполнялась по площади и индексу зубного налета, а количество колоний жизнеспособных бактерий подсчитывалось при помощи флуоресценции. Ополаскиватель с МЧД не оказывал влияния на количество и качество наддесневого налета.

Полученные в этом исследовании изменения оценок налета в группе ХГД были статистически недостоверны. Однако, средние изменения в группе ХГД были наибольшими по сравнению с другими группами.

Клинические исследования гелей с ХГД показали совсем другие результаты, хотя клинические действия геля с ХГД в отношении зубного налета сильно зависели от частоты применения, используемой концентрации и предварительной обработки зубов участников вначале исследования, что существенно затрудняет сравнение данных разных исследований.^{21-23,29,30} Согласно представленным результатам большинство терапевтических эффектов проявилось в первый период наблюдения (0-4 неделя). Возможно, это следствие ослабления точности соблюдения участниками предписанной схемы лечения на поздних этапах исследования, или же достижения конечной точки лечебных эффектов, т.е. после достижения плато дальнейшие улучшения клинических параметров просто невозможны.^{21,22} Не исключено, что ограниченные изменения оценок PSS, особенно в группе ХГД, обусловлены неудовлетворительным соблюдением схемы лечения. Косвенным индикатором точности соблюдения предписанного лечения является время, затрачиваемое участниками на нанесение геля на протяжении четырех недель. Вместе с тем, имели место существенные отличия количеств используемого геля. Так, большинство участников сообщили, что количества выданного геля хватило на четыре недели и немного осталось. Но некоторые участники заявляли о достаточно больших остатках геля. Возможно, эти участники ненадлежащим образом соблюдали предписанную схему нанесения средства. В этом исследовании участвовали люди с отложениями зубного налета и с поднаддесневой камнем, что затрудняло эффективную гигиену рта и, возможно, способствовало увеличению зубного налета. Применение проявляющего раствора при значительном зубном камне на зубах не эффективно, поскольку окрашивание происходит независимо от отложений зубного налета, и эта недостоверность вносит погрешность во все групповые измерения.

Возможные периодонтальные применения геля с МЧД

Поскольку у участников группы применения МЧД воспаление снижалось без сопутствующего устранения зубного налета, это заставляет предположить противовоспалительный, но не антибактериальный механизм действия. Известны определенные компоненты МЧД, которые в условиях *in vitro* и *in vivo* ослабляли воспаление.^{2,3,6,7} Например, у испытуемых, которые пользовались препаратом Соледум (Soledum®, содержит 1,8-цинеол), отмечалось достоверное снижение производства LBT₄ и PGE₂ в изолированных моноцитах.² 1,8-цинеол также вызывал достоверное торможение производства цитокинов *in vitro* (α -фактор некроза опухоли, ИЛ-1b) LPS-стимулированными моноцитами.³ Аналогичные *in vitro* эффекты в моноцитах демонстрировал и терпинен-4-ол.^{6,7}

Известны липофильные свойства некоторых компонентов МЧД, что

облегчает их диффузию через эпителий.⁵ Таким образом, если МЧД действительно легко всасывается в десневую ткань после местного нанесения, и после попадания в соединительную ткань проявляет там противовоспалительное действие, то это уникальное нетоксичное средство является полезным дополнением существующих схем химиотерапии периодонта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barr A, Chapman J, Smith N, Beveridge M. Traditional bush medicines – An Aboriginal pharmacopoeia. Victoria: Greenhouse Publications, 1988.
2. Juergens UR, Stober M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *Eur J Med Res* 1998;3:407-412.
3. Juergens UR, Stober M, Vetter H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8- cineole) in human blood monocytes in vitro. *Eur J Med Res* 1998;3:508-510.
4. Santos FA, Rao VS. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res* 2000;14:240-244.
5. Williams AC, Barry BW. Terpenes and the lipid-proteinpartitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res* 1991;8:17-24.
6. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res* 2000;49:619-626.
7. Brand C, Ferrante A, Prager RH, et al. The water soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm Res* 2001;50:213-219.
8. Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, Riley TV. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:421- 424.
9. Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 1995;78:264-269.
10. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Med Vet Mycol* 1997;35:375-377.
11. Hammer KA, Carson, CF, Riley TV. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:591-595.
12. May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:639-643.

13. Moran J, Addy M, Newcombe R. A clinical trial to assess the efficacy of sanguinarine-zinc mouthrinse (Veadent) compared with chlorhexidine mouthrinse (Corsodyl). *J Clin Periodontol* 1988;15:612-616.
14. Ostela I, Tenovuo J. Antibacterial activity of dental gels containing combinations of amine fluoride, stannous fluoride, and chlorhexidine against cariogenic bacteria. *Scand J Dent Res* 1990;98:1-7.
15. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:202-208.
16. Cox SD, Gustafson JE, Mann CM, et al. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:355-358.
17. Cox SD, Mann CM, Markham J, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000;88:170-176.
18. Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, Vincent JW. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol* 2000;27:157-161.
19. Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38:610-616.
20. Fischman SL. Current status of indices of plaque. *J Clin Periodontol* 1986;13:371-374.
21. Hoyos DF, Murray JJ, Shaw L. The effect of chlorhexidine gel on plaque and gingivitis in children. *Br Dent J* 1977;142:366-369.
22. Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R. Effect of metronidazole on chronic periodontal disease in subjects using a topically applied chlorhexidine gel. *J Clin Periodontol* 1984;11:53-62.
23. Lie T, Enersen M. Effects of chlorhexidine gel in a group of maintenance-care patients with poor oral hygiene. *J Periodontol* 1986;57:364-369.
24. Meitner SW, Zander HA, Iker HP, Polson AM. Identification of inflamed gingival surfaces. *J Clin Periodontol* 1979;6:93-97.
25. Hirsch RS, Clarke NG, Townsend GC. The effect of locally released oxygen on the development of plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 1981;8:21-28.
26. Wolff LF, Koller NJ, Smith QT, Mathur A, Aeppli D. Subgingival temperature: relation to gingival crevicular fluid enzymes, cytokines, and subgingival plaque micro-organisms. *J Clin Periodontol* 1997;24:900-906.
27. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol* 1998;69:865-871.
28. Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E, Sculean A. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil – a pilot study. *Clin Oral Investig* 2000;4:70-73.

29. Hansen F, Gjermo P, Eriksen HM. The effect of a chlorhexidine containing gel on oral cleanliness and gingival health in young adults. J Clin Periodontol 1975;2:153-159.
30. Lennon MA, Davies RM. A short-term evaluation of a chlorhexidine gel on plaque deposits and gingival status. Pharmacol Ther Dent 1975;2:13-19.