

Výzkumy mechanismu působení oleje z *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree - čajový strom)

C.F. Carson¹ & T.V. Riley^{1,2}

¹Katedra mikrobiologie, Západoaustralská Univerzita, ²Západoaustralské centrum pro patologii a lékařský výzkum, Lékařské centrum královny Alžběty II, Nedlands, Západní Austrálie, 6009

Úvod

Olej z *Melaleuca alternifolia* (olej Tea Tree) má široké spektrum antimikrobiálního působení a je používán v řadě zevně působících léčivých produktů. (Carson & Riley, 1993). Přes jeho všeobecnou dostupnost a použití zůstává mechanismus působení neznámý. Lipofilní podstata oleje Tea Tree vedla k názorům, že působí na buněčnou membránu bakterií a hub. Tato studie zkoumá účinek oleje Tea Tree a některých jeho hlavních složek na buněčné membrány *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*.

Materiály a metody

Bakteriální izoláty

Organismy *Escherichia coli* NCTC 10418, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 a *Candida albicans* ATCC 10231 byly získány z katedry mikrobiologie, Západoaustralská univerzita.

Olej z *Melaleuca alternifolia* a jednotlivé složky

Olej z *Melaleuca alternifolia* byl poskytnut společností Australian Plantations s.r.o., Wyrallah, NSW, Austrálie. Tento vzorek splňoval současnou mezinárodní normu (ISO 4730) v tom, že hladina terpinen-4-olu byla 37,1% a hladina 1,8-cineolu byla 3,2%. Jednotlivé testované složky byly 1,8-cineol, linalool, terpinen-4-ol a α -terpineol (Společnost Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA).

Příprava mikrobiálních suspenzí

Čerstvé kultury testovaného organismu byly připraveny na krevním agaru a použity k naočkování 50ml Mueller-Hintonovy živné půdy, která byla inkubována při 35°C po 18 hodin s protřepáváním. Organismy byly dvakrát propláchnuty fosforečnanovým puřovým fyziologickým roztokem (PBS) a opětně suspendovány v dostatečném množství PBS doplněném o polysorbát 80 (0,001% v/v) (PBS/Tw), aby bylo dosaženo závěrečné koncentrace přibližně 10^9 cfu/ml pro bakterie a 10^8 cfu/ml pro *Candida*, jak bylo potvrzeno realizovatelnými propočty.

Optická hustota upravovaných buněčných suspenzí

Objemy 9ml mikrobiální suspenze byly umístěny do skleněných lahví a upraveny olejem Tea Tree, α -terpineolem a terpinen-4-olem při minimální inhibiční koncentraci (MIC) a 2×MIC. Při závěrečné koncentraci 0,02% byl zahrnut EDTA v testech s *E. coli*. V 0, 30, 60, 90 a 120 minutě byly všechny suspenze důkladně promíchány, 0,1ml odebrán a rozpuštěn v PBS/Tw. Všechny vzorky byly rozpuštěny 1 ku 100 v PBS/Tw kromě testů s bakteriemi a terpinen-4-olem, které byly rozpouštěny 1 ku 10. Odpovídající srovnávací vzorky testovací směsi v

PBS/Tw byly připraveny a použity k určení optické hustoty (OD) ($\lambda=620\text{nm}$) každého vzorku.

Pronikání 260nm-absorpčního materiálu z upravovaných suspenzí *S. aureus*

Buňky *S. aureus* byly připraveny a upraveny jako předchozí, kromě toho že 15ml suspenze bylo upraveno α -terpineolem, linaloolem a terpinen-4-olem při 1/10×MIC, 1/2×MIC a MIC. 1,8-cineol byl též testován při 2×MIC. V 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 300 a 360 min byla použita injekční stříkačka a jehla k odebrání 1ml vzorku, který byl okamžitě profiltrován přes 0,22 μm membránový filtr. Filtrát byl odebrán a jeho OD₂₆₀ změřeno oproti srovnávacím vzorkům připraveným z filtrátu testovací směsi.

Výsledky

Optická hustota upravovaných buněčných suspenzí

Olej Tea Tree snížil optickou hustotu suspenzí *E. coli* pouze, pokud jde o α -terpineol (viz obrázky 1-2). Terpinen-4-ol nesnížil OD₆₂₀ žádného z testovaných organismů.

Pronikání 260nm-absorpčního materiálu z upravovaných suspenzí *S. aureus*

Koncentrace α -terpineolu, terpinen-4-olu a linaloolu při a nad 1/2×MIC měly za následek pronikání 260nm-absorpčního materiálu z buněk *S. aureus*. Koncentrace 1,8-cineolu až do 2×MIC nezpůsobily pronikání. Výsledky jsou ukázány na obr. 3-6.

Diskuse

Pokud má být olej Tea Tree přijat jako bezpečný zevně působící antimikrobiální agens, je nutné, aby mechanismus působení byl osvětlen. Protože je olej složen z přibližně 100 jednotlivých komponentů (Brophy a kol., 1989) a o některých z nich je známo, že mají antimikrobiální účinky (Carson & Riley, 1995), je možné, že několik odlišných mechanismů působí zároveň. Aby bylo možné určit mechanismus působení oleje, je nutné prozkoumat jednotlivé složky zvlášť. Lipofilní podstata oleje Tea Tree a jeho jednotlivých složek vedla k názorům, že může ohrožovat integritu mikrobiální buněčné membrány. Velké poškození membrán agentem působícím na membránu může vést až k úplnému rozpouštění buněk (Russel, Morris & Alwood, 1973). Ačkoli *C. albicans*, *E. coli* a *S. aureus* jsou citlivé na terpinen-4-ol (Carson & Riley, 1995), zachování jejich optické hustoty po upravení terpinen-4-olem, naznačuje, prosté rozpouštění buněk není primární mechanismus působení na tyto organismy. Snížení optické hustoty suspenzí *E. coli* po upravení olejem Tea Tree a α -terpineolem naznačuje, že buněčná membrána je terčem pro tyto agens, přinejmenším u *E. coli*.

Spíše než naprosté rozpouštění buněk, změna ve funkci membrány může vést k nekontrolovanému uvolňování vnitrobuněčného materiálu, například nukleotidů, aminokyselin, cukrů a kationtů z buňky (Russel a kol., 1973). V této práci, úprava *S. aureus* linaloolem, terpinen-4-olem a α -terpineolem, při koncentracích na a pod MIC pro *S. aureus*, měla za následek pronikání 260nm-absorpčního materiálu z buněk, u kterých bylo možno předpokládat poškození membrány. Zatímco hladiny linaloolu přítomného v oleji Tea Tree jsou zanedbatelné a jeho vliv je proto sporný, schopnost úpravy terpinen-4-

olem a α -terpineolem vyvolat pronikání 260nm-absorpčního materiálu, pravděpodobně nukleotidů, je značná. Korelace mezi závažným antimikrobiálním působením a propouštěním 260nm-absorpčního materiálu je také pozoruhodná. Navíc, 1,8-cineol, jehož účinek na *S. aureus* je slabý (Carson & Riley, 1995), nevyvolal toto pronikání.

Závěrem, existuje příliš málo důkazů na to, aby bylo možné tvrdit, že olej Tea Tree a některé jeho složky mohou působit na buněčnou membránu vnímavých organismů. Toto vyžaduje další výzkum a potvrzení.

Poděkování

Tato práce byla podporována *Rural Industries Research and Development Corporation* (UWA-24A).

Tato práce byla prezentována na Výroční schůzi Australské Mikrobiologické Společnosti, která se konala 29. září - 3. října 1997 v Adelaide, Jižní Austrálie, Austrálie (fax: 08 9382 8046, e-mail: ccarson@cyllene.uwa.edu.au).

Literatura

Brophy, J. J., Davies, N. V., Southwell, I. A., Stiff, I. A. & Williams, L. R. (1989) "Kontrola kvality pomocí plynové chromatografie pro oleje z *Melaleuca* typu terpinen-4-ol (olej Tea Tree)" *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 37:1330-1335.

Carson, C. F. & Riley, T. V. (1993) "Antimikrobiální působení éterického oleje z *Melaleuca alternifolia*" *Letters in Applied Microbiology* 16: 49-55.

Carson, C. F. & Riley, T. V. (1995) "Antimikrobiální působení hlavních složek éterického oleje z *Melaleuca alternifolia*" *Journal of Applied Bacteriology* 78: 264-269.

Russell, A. D., Morris, A. & Allwood, M. C. (1973) "Metody pro hodnocení poškození bakterií vyvolaného chemickými a fyzikálními činiteli" *Methods in Microbiology* 8: 95-182.