دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم شماره ۶، صفحه ۱۲۶۹ - ۱۲۶۲ (بهمن و اسفند ۱۳۹۴)

ISMJ 2016; 18(6): 1262-1269

ارزیابی اثر کشندگی روغن درخت چای (Melaleuca alternifolia) بر لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

مرادعلی فولادوند [۱]، سلیمان خرمی [۲]، بهروز نعیمی [۱*]

[۱] گروه میکروب و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
[۲] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۶/۶- پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۲)

چکیده

زمینه: لیشمانیوز بیماری انگلی منتقله از طریق گونه‌هایی از پشه خاکی به نام فلبوتوموس می‌باشد و از اکثر نقاط جهان گزارش می‌شود. تخمین زده می‌شود که شیوع جهانی آن حدود ۱۲ میلیون نفر و بروز سالیانه آن ۵۰۰ هزار نفر باشد. داروهای مورد استفاده در درمان این بیماری عمدتاً کم اثر، سمی و دارای عوارض جانبی زیاد می‌باشند. بر اساس نتایج برخی مطالعات عصاره درخت چای (**Melaleuca alternifolia**) که مایعی زرد رنگ و با بوی تند می‌باشد دارای اثرات ضد میکراگانیسمی از جمله ضد باکتریائی و ضدقارچی است، لذا ما در این مطالعه اثر ضد لیشمانیائی آن مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: روغن درخت چای از شرکت داروسازی دکتر جهانگیری خریداری و غلظت‌های مختلف آن (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ۱۰۰،۲۰۰،۴۰۰،۸۰۰) در حلال **TSB** به حجم ۱ میلی‌لیتر در لوله آزمایش تهیه گردید، سپس به هر لوله ۹ میلی‌لیتر محیط کشت **RPMI-1640** و تعداد ۱×۱۰۶ پروماستیگوت زنده نیز اضافه گردید به طوری‌که حجم نهایی به ۱۰ میلی‌لیتر رسید، این لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۳ درجه انکوبه شده و تعداد انگل‌ها در هر لوله تا ۶ ساعت اول هر یک ساعت یکبار و بعد از آن هر ۲۴ ساعت یکبار با لام نئوبار شمارش گردیدند.

یافته‌ها: دوز کشنده روغن درخت چای با ۵۰ درصد کشندگی برای پروماستیگوت‌های لیشمانیا (**IC50**) معادل میلی لیتر/میلی‌گرم۳۳۷ بود در حالی‌که غلظت میلی‌لیتر/میلی‌گرم ۸۰۰ از این عصاره توانست موجب مرگ ۹۵ درصد از انگل‌ها در مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شود و غلظت‌های پایین‌تر آن فعالیت ضد لیشمانیائی وابسته به دوز نشان دادند. گلوکانتیم به عنوان داروی کنترل مثبت غلظت میلی‌لیتر/ میلی‌گرم ۳۰۰ موجب مرگ تمام پروماستیگوت‌ها گردید در حالی‌که تعداد پروماستیگوت در لوله‌های کنترل منفی در طول مدت انکوباسیون افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: اثر ضد لیشمانیائی عصاره روغن درخت چای با IC_{50} معادل میلی‌لیتر/میلی‌گرم ۸۰۰ و ۹۵ درصد کشندگی با غلظت میلی‌لیتر/میلی‌گرم ۸۰۰ امیدوارکننده است و آنالیز مواد تشکیل دهنده و ارزیابی اثر ضد لیشمانیائی آن به‌خصوص در حیوان آزمایشگاهی پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: لیشمانیا ماژور، روغن درخت چای، پروماستیگوت، **Melaleuca alternifolia**

* بوشهر، گروه میکروب و انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

Email: b.naeimi1350@gmail.com

مقدمه

بیماری لیشمانیازیس از اکثر نقاط جهان گزارش می‌شود و در نواحی مختلفی شیوع دارد. این بیماری از طریق گونه‌هایی از پشه خاکی به نام فلبوتوموس منتقل می‌شود، جوندگان و پستانداران کوچک و سگ‌سانان مخازن متداول آن و انسان مهم‌ترین مخزن آن است. تظاهرات بالینی متنوع آن به گونه لیشمانیا و پاسخ ایمنی میزبان وابسته است و به سه فرم لیشمانیوز جلدی، جلدی- مخاطی و احشایی دیده می‌شود.

تخمین زده می‌شود که شیوع جهانی لیشمانیوزها حدود ۱۲ میلیون نفر و بروز سالیانه آن ۵۰۰ هزار نفر باشد(۵ و ۶). شکل پوستی این بیماری در کشور ما سالک نامیده می‌شود، گرچه در زمینه درمان این بیماری تحقیقات وسیع دارویی انجام گرفته است اما عوارض جانبی زیاد برخی از داروهای موجود مانع از کاربرد وسیع آن‌ها گردیده است، تکرار تزریق آمفوتریسین باعث اسکلروز ورید و مسدود شدن رگ، نارسایی حاد کلیوی، پلی نروپاتی و نیز دپرسیون مغز استخوان و کم خونی می‌شود (۷ و ۸). در مراکز درمانی کشور مان از آمپول‌های گلوکانتیم به‌صورت تزریق موضعی و عضلانی استفاده می‌شود که علاوه بر درد ناشی از تزریق باعث عوارضی از قبیل تهوع، استفراغ، آسیب کلیوی و کبدی، میوکاردیت و پلی‌نوریت در برخی از بیماران می‌شود لذا نیاز شدیدی در خصوص شناسائی و بررسی ترکیبات داروئی جدید برای درمان مؤثر لیشمانیوز احساس می‌شود. این مطالعه به همین منظور و با هدف بررسی تأثیر عصاره روغن چای بر روی لیشمانیا ماژور طراحی شده است.

مواد مشتق از گیاهان امروزه به صورت گسترده‌ای در مقابله با عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیش از ۷۰ سال است که روغن درخت چای به عنوان یک داروی گیاهی در اشکال مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). روغن درخت چای در اوایل قرن ۲۰ در استرالیا به عنوان یک ضدعفونی کننده در پزشکی مورد استفاده قرار گرفت. اولین مورد استفاده از روغن درخت چای در سال ۱۹۲۰ در جراحی و دندانپزشکی بود. اثرات درمانی این گیاه در زخم‌ها، باعث شد که در جنگ جهانی دوم از این گیاه برای درمان جراحات پوستی استفاده شود (۲ و ۳)، همچنین از این روغن در درمان ضایعات پوستی از قبیل جوش، ترک‌های موجود در سطح پوست، خشکی پوست، رفع التهابات پوستی و بیماری‌های قارچی پوست و ناخن استفاده می‌شود (۹). مطالعات نشان می‌دهند که روغن درخت چای برای درمان آکنه، شوره سر و تبخال نتایجی مشابه یا بهتر از درمان‌های مرسوم داشته است و در اغلب موارد عوارض جانبی کمتری نیز داشته است. مطالعات اندکی نیز در مورد استفاده موفقیت‌آمیز از روغن درخت چای به صورت محصولات گیاهی در درمان عفونت‌های غشای مخاطی شامل تریکوموناس واژینالیس و باکتری‌های دهانی و کاندیدیازیس دهانی وجود دارد (۴).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی- کاربردی روغن درخت چای از شرکت داروسازی دکتر جهانگیری که وارد کننده این روغن بوده و از همین محصول برای تولید محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده می کنند خریداری گردید. پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور سویه استاندارد ایران از یک بیمار مبتلا به سالک نوع روستایی در دانشگاه اصفهان نمونه‌برداری شده سپس در محیط کشت RPMI-1640 در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد حاوی

۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و استرپتومایسین کشت داده شد. سپس پروماستیگوت‌ها در معرض غلظت‌های مختلف روغن درخت چای قرار گرفته و اثر کشندگی آن‌ها بر انگل بررسی شد. درصد پروماستگوت‌های کشته شده در مقایسه با میزان رشد انگل در گروه کنترل سنجیده شد. IC ۵۰ به عنوان غلظتی از روغن که باعث کشته شدن ۵۰ درصد پروماستیگوت‌ها پس از ۲۴ ساعت می‌شود تعریف و از فرمول زیر محاسبه گردید (۱۰).

OD: میانگین جذب نوری

درصد مهار= 1- viability

$$\frac{\text{case OD}}{\text{control OD}} \times 100 = \text{IC50}$$

لیشمانیا ماژور در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر استریل که حاوی محیط کشت RPMI-۱۶۴۰، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و میلی لیتر/میکرو گرم۱۰۰ جنتامایسین و استرپتومایسین بودند کشت داده شد تا به فاز ایستائی رشد برسند. سپس مقدار ۱×۱۰۶ از پروماستیگوت‌های فاز ایستایی لیشمانیا و ۹ میلی لیتر محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ در لوله‌های ۱۵ میلی لیتر ریخته شد، سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف روغن درخت چای (میلی‌لیتر/ میلی‌گرم ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰) را که با استفاده از حلال TSB (trypticase soy broth) تهیه شده بود به لوله مذکور اضافه گردید. این لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، در طول مدت انکوباسیون اثر کشندگی این عصاره با شمارش پروماستسگوت‌های لیشمانیا با استفاده از لام نئوبار مورد ارزیابی قرار گرفت بنحوی که در ساعات ۱، ۳ و ۶ و پس از آن در مقاطع ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته این شمارش ادامه یافت، (برای هر غلظت ۳ بار آزمایش انجام گرفت). از لوله‌ای که فقط حاوی محیط کشت و انگل بود به‌عنوان کنترل منفی و از لوله حاوی محیط کشت، انگل و گلوکانتیم با غلظت میلی لیتر/میلی گرم ۳۰۰ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

یافته‌ها

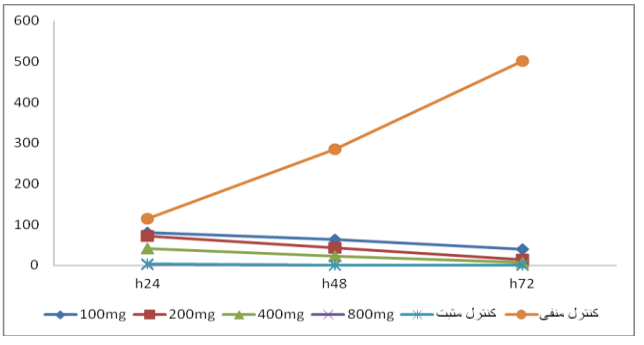
نتایج حاصله نشان داد که روغن درخت چای دارای اثر مهاری بر رشد پروماستیگوت‌های لیشمانیا بوده است و غلظتی که موجب ۵۰ درصد کشندگی این انگل می‌شود (IC_{50}) معادل میلی‌لیتر/ میلی‌گرم ۳۳۷ بوده است. غلظت میلی‌لیتر/ میلی‌گرم ۸۰۰ این عصاره پس از ۲۴ ساعت توانست ۹۵ درصد پروماستیگوت‌های لیشمانیا را از بین ببرد. تمامی پروماستیگوت‌ها در غلظت میلی لیتر/میلی گرم ۳۰۰ گلوکانتیم پس از ۲۴ ساعت کشته شدند و تعداد پروماستیگوت‌ها در گروه کنترل منفی پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سیر فزاینده‌ای داشت (جدول ۱). همچنین اختلاف بسیار معنی‌داری بین تعداد انگل در گروه کنترل منفی و گروه مورد وجود داشت به طوری‌که در گروه کنترل منفی پس از ۷۲ ساعت ۵۰۲۰۰۰۰ انگل وجود داشت و به مرحله over growth رسیده بودند اما در گروه مورد پس از ۷۲ ساعت تقریباً انگل زنده‌ای وجود نداشت. نتایج مربوط به تأثیر این روغن بر انگل لیشمانیا ماژور با استفاده از آزمون Anova و نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA) ویرایش ۱۲ آنالیز گردید. از نظر آماری و در مقایسه با محیط شاهد اثر ضد لیشمانیائی غلظت‌های مورد نظر معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۰۱) (جدول ۲).

جدول ۱) تأثیر غلظت‌های مختلف روغن درخت چای بر روی لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

زمان / نمونه mg/ml	۱ ساعت	۳ ساعت	۶ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۰۰	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	زنده با تحرک کم‌تاژک	مرده
۲۰۰	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	زنده با تحرک کم‌تاژک	مرده
۴۰۰	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	با تحرک بسیار کم	مرده	مرده
۸۰۰	فعال و متحرک	فعال و متحرک	زنده با تحرک کم	مرده	مرده	مرده
کنترل منفی	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	فعال و متحرک	زنده با تحرک کم تاژک
کنترل مثبت	زنده با تحرک کم‌تاژک	مرده	مرده	مرده	مرده	مرده

جدول ۲) میانگین و انحراف معیار تعداد پروماستیگوت‌های زنده در زمان‌های مختلف انکوباسیون

زمان انکوباسیون	تعداد اتگل زنده			P.value
غلظت روغن میلی‌گرم/ میلی‌لیتر	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
۱۰۰	۷۹۵۰۶۶±۲۳۵۶۹	۶۱۴۱۳۳±۲۹۲۷۶	۳۹۶۰۰۰±۲۳۰۹	< ۰/۰۰۱
۲۰۰	۷۲۰۰۰۰±۱۵۲۷۵	۴۲۳۰۰۰±۱۲۸۶۷	۱۳۵۲۶۶±۳۸۶۴	۰/۰۰۱
۴۰۰	۴۰۳۰۰۰±۳۵۱۱	۲۲۱۶۶۷±۱۴۸۱۳	۶۹۹۳۳±۵۲۰	۰/۰۰۱
۸۰۰	۳۴۱۶±۲۴۱۶	۰	۰	۰/۰۰۱
کنترل منفی	۱۱۴۳۳۳۳±۹۷۶۹۵	۲۸۴۶۶۶۷±۷۳۱۰۵	۵۰۲۰۰۰۰±۴۳۵۸۸۸	۰/۰۸۶
کنترل مثبت	۰	۰	۰	۰/۰۰۱



نمودار ۱) اثر غلظت‌های مختلف عصاره درخت چای بر تعداد پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور

جدول ۳) درصد کشندگی غلظت‌های عصاره درخت چای بر لشمانیا ماژور در مقاطع زمانی مختلف

غلظت	درصد پروماستیگوت‌های کشته شده در ساعات مختلف		
میلی‌لیتر/ میلی‌گرم	پس از ۲۴ ساعت	پس از ۴۸ ساعت	پس از ۷۲ ساعت
۱۰۰	٪۲۰/۶۵	٪۳۳/۷۲	٪۶۰
۲۰۰	٪۲۶	٪۵۵/۵۱	٪۸۵/۸۶
۴۰۰	٪۵۹	٪۷۸	٪۹۲/۹۱
۸۰۰	٪۹۵	٪۱۰۰	٪۱۰۰

بحث

سالک یک بیماری مزمن با عامل مولد مشخص، دوره کمون و سیر بالینی متغیر و واکنش‌های بافتی متفاوت و عوارض گوناگون می‌باشد. این بیماری بین انسان و حیوان مشترک بوده وپس از بهبودی مصونیت ایجاد می‌کند. با وجود آنکه مطالعات زیادی جهت درمان این بیماری صورت گرفته، معهذا روز به روز شاهد شیوع بیشتر این بیماری و عدم موفقیت در درمان آن هستیم. لیشمانیوز بیماری وسیع‌الطیف انگلی است که کم و بیش از سراسر جهان گزارش می‌شود. تاکنون واکسن مناسبی جهت پیشگیری از بیماری و همچنین داروی با اثر قابل توجهی برای مهار انگل و نیز روش شیمیایی مناسبی در مبارزه با ناقل آن ارائه نشده است (۱۵-۱۱). داروی آنتی‌موان پنج ظرفیتی، سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) و مگلومین آنتی‌موان (گلوکانتیم) از جمله‌ی درمان‌های اصلی در چند دهه‌ی اخیر بوده‌اند و شکست درمانی روزافزونی از آن‌ها گزارش می‌شود (۱۶ و ۱۷). دکسی کولات آمفوتریسین B مؤثر اما سمی است. به علت وجود عوارض متعدد دارو و شکست درمانی سایر داروها، تلاش برای دستیابی به اشکال دارویی جدید که بتواند ضمن اینکه زخم را سریع‌تر بهبود می‌بخشد و کمترین عوارض جانبی را داشته باشد و پس از بهبودی جوشگاهی بر جای نگذارد ادامه دارد. تاکنون هیچ درمان کاملاً رضایت‌بخشی شناخته نشده است.

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های انگلی به زمان‌های باستان برمی‌گردد که از Cinchona succiruba به عنوان داروی ضد مالایا استفاده شده است (۱۸) سان (San) و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر لیشمانیا کشی گیاه آرتمی سنین را بر روی لیشمانیا دونووانی بررسی کرده و متوجه شدند که کاملاً مؤثر است (۱۹). در مطالعه دیگری یوسفی و همکاران تأثیر کشندگی گیاه پکانوم هارمالا و آلکانا تینکتورا را بر لشمانیا ماژور در شرایط invitro انجام دادند و نشان دادند که هر دو عصاره دارای اثر مهاری بر پروماستیگوت‌ها بودند (۲۰). روغن درخت چای نیز دارای استفاده پزشکی بسیاری می‌باشد، گزارشاتی مبنی بر استفاده‌های دارویی از این روغن بر ضد تریکوموناس واژینالیس وجود دارد (۲۱). در فاصله سال‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۸۰ گزارشات معدودی مبنی بر فعالیت ضدمیکروبی روغن درخت چای در دست است (۲۴-۲۲). اما از سال ۱۹۹۰ به بعد گزارشات فراوانی در مورد فعالیت ضد میکروبی TTO مشاهده می‌شود، اگرچه اختلافاتی بین روش کار آن‌ها وجود دارد ولی تقریباً در تمام این گزارشات مؤثر بودن این روغن مورد تأکید بوده است. TTO معمولاً با غلظت ۱ درصد یا کمتر به کار برده می‌شود ولی گاهی بر ضدارگانیسم‌های کامنسالی مانند انتروکوکوس فکالیس و پسودوموناس ائروژینوزا با غلظت ۲ درصد به کار برده شده است (۲۵). اطلاعات نسبتاً جامعی در مورد

خواص ضد قارچی TTO در این اواخر حاصل شده است، مطالعاتی در مورد خاصیت ضد قارچی این روغن با دوزهای معمول بین ۰/۰۳ درصد تا ۰/۱۲ درصد بر ضد کاندیدا آلبیکنس وآسپرژیلوس نیجر نیز صورت گرفته است. (۲۶ و ۲۷). مطالعه اثر روغن درخت چای بر روی سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در ایران برای اولین بار است که انجام شده است اما مطالعه مشابهی که در آمریکای جنوبی انجام شده اثر این روغن بر روی لیشمانیا ماژور و تریپانوزوم بروسه ایی را بررسی کرده است، در این مطالعه اثر کشندگی روغن درخت چای بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور قابل توجه گزارش شده است بنحوی که غلظت‌های کشنده این روغن برای پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور برای سلول‌های HL-۶۰ اثر کشنده نداشته‌اند (۲۸).

در این مطالعه نیز از روغن درخت چای بر روی سویه استاندارد لیشمانیا ماژور در ایران مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که در غلظت‌های نسبتاً قابل قبولی بر روی لیشمانیا ماژور مؤثر است. بیشترین میزان کشندگی این روغن بر علیه لیشمانیا با غلظت میلی لیتر/میلی گرم۸۰۰ دیده شد در حالی که کمترین اثر کشندگی در غلظت میلی لیتر/میلی گرم ۱۰۰ میلی‌گرم مشاهده شد. اختلاف بسیار معنی‌داری بین تعداد انگل در گروه کنترل منفی و گروه مورد وجود داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که روغن درخت چای دارای اثرات ضد لیشمانیایی می‌باشد ولی به تحقیقات بیشتری برای بررسی مواد مؤثره موجود در این عصاره نیاز است.

References:

1.Schnitzler P, Schon K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. Pharmazie 2001; 56: 343-347.
2.Johns MR, Johns JE, Rudolph V. Steam distillation of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil. J Sci Food Agric 1992; 58: 49-53.
3.Penfold AR, Grant R. The Germicidal Values of Some Australian Essential Oils and Their Pure Constituents: Together with Those for Some Essential Oil Isolates and Synthetics: Government Printer; 1926.
4.Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. J Hosp Infec 2004; 56: 283-286.
5.Markell E, John D, Krotoski W, et al. Medical parasitologythed. 8th ed. WB Saunders; 1999: p. 76-80.
6.Aguilar-Torrentera F, Carlier Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to Leishmania major infection. Rev Latinoam Microbiol 2001; 43: 135-142.
7.Torrentera FA, Glaichenhaus N, Laman JD, et al. T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to Leishmania mexicana. Infect immun 2001; 7: 617- 621.
8.Asghari G, Zahabi F, Eskandarian A, et al. Chemical composition and leishmanicidal activity of Pulicaria gnaphalodes essential oil. Res J Pharma (RJP) 2014; 1: 27-33.
9.Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Tea tree oil). J Appl Microbiol 2000; 88: 170–175.
10.Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro. Establishment of test conditions and assessment of hormone stimulated growth and drug induced cytostatic and cytotoxic effects. Prostate 1988; 12: 99-110.

11.Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of Calendula officinalis extracts. Pharmazie 1988; 43: 220-221.
12.Low WL, Martin C, Hill DJ, et al. Antimicrobial efficacy of liposomeencapsulated silver ions and tea tree oil against Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Candida albicans. Lett Appl Microbiol 2013; 57: 33-39.
13.Mickienė R, Bakutis B, Baliukonienė V. Antimicrobial activity of two essential oils. Ann Agric Environ Med 2011; 18: 139-144.
14.Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (Tea tree) oil. J Appl Microbial 2003; 95: 853-860.
15.Grogl M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. Am J Tropic Med Hygiene 1992; 47: 117-119.
16.Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 296-306.
17.Thakur C, Sinha G, Pandey A, et al. Daily versus alternate-day regimen of amphotericin B in the treatment of kala-azar: a randomized comparison. Bull WHO 1994; 72: 930-931.
18.Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products of potential antiparasitic drugs. Studies Natur productio chem 2001; 26: 779-848.
19.Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. J Med Microbiol 2007; 56: 1213-1218.
20.Yousefi R, Ghaffarifar F, Dalimi Asl A. The Effect of Alkanna tincturiaem and Peganum harmala extracts on Leishmania major (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iranian J Parasitol 2009; 4: 40-47.
21.Pena EF. Melaleuca Alternifolia Oil Its Use for Trichomonal Vaginitis and Other Vaginal Infections. Obstet Gynecol 1962; 19: 793-795.
22.Thosar N, Basak S, Rakesh RN, et al. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. Eur J Dent 2013; 7: S71–S77.
23.Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 50–62.
24.Walsh LJ, Longstaff J. The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. Periodontology 1987; 8: 11-15.
25.Low D, Rawal BD, Griffin WJ. Antibacterial action of the essential oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of oil of Eucalyptus citriodora. Planta Med 1974; 26: 184-185.
26.Hammer KA, Carson CF, Riley TV. In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 190-195.
27.Banes-Marshall L, Cawley P, Phillips CA. In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against bacterial and Candida spp. isolates from clinical specimens. Br J biomed sci 2001; 58: 139-145.

ISMJ 2016; 18(6): 1262-1269

Original Article

Evaluation of in vitro leishmanicidal activity of tea tree oil (Melaleuca alternifolia)

MA. Fouladvand [1], S. khorami [2], B. Naeimi [1*]

[1] Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.

[2] Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran.

(Received 28 Agu, 2014 Accepted 22 Apr, 2015)

Abstract

Background: Leishmania is a trypanosomatid protozoan which is transmitted by the female *Phlebotomus* sand fly. Leishmaniasis is prevalent in four continents and is considered to be endemic in 88 countries, 72 of which are developing countries. It is estimated that it's global prevalence and incidence is 12 millions and 500 thousands respectively. The recommended drugs used for the treatment of this disease are mainly ineffective, toxic and exhibit many side effects. Based on some studies,tea tree oil that is a yellow color liquid with spicy odor exhibit antibacterial and antifungal activity, so, we evaluated it's anti-leishmanial effect.

Materials and Methods: Tea tree oil was purchased from Dr Jahangiri pharmaceutical company and it's various concentrations (mg/ml800, mg/ml400, mg/ml200, mg/ml100) were prepared in 1ml volume of TSB solvent in 15ml test tubes, then 9 ml of RPMI-1640 medium and 1×10^6 promastigotes was added to each tube, as a final volume of 10 ml. These tubes were incubated at 23^o c for 72 hours and number of parasites in the first 6 hours once every hour and after that every 24 hours were counted by hemocytometer.

Results: Lethal dose of tea tree oil for 50% of promastigotes (IC_{50}) is 337 mg/ml, while the 800 mg/ml of this extract can killed 95% of the parasites after 24 hours of incubation, and it's lower concentrations of this extract showed dose-dependent leishmanicidal activity. Glucantime as positive control drug at concentration of 300 mg/ml killed all the promastigotes, while the number of promastigotes in negative control tubes was increase during the incubation period.

Conclusion: Anti-Leishmanial activity of tea tree oil with IC_{50} of 337 mg/ml and 95% lethality of 800 mg/ml is promising and further study for analyse the active ingredients of this oil and evaluation of it's anti-leishmanial effect, particularly in laboratory animal is recommended.

Key words: Leishmania major, tea tree oil, TSB, Melaleuca alternifolia

**Address for correspondence*: Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Bushehr University of Medical Sciences,Bushehr, Iran; E-mail: b.naeimi1350@gmail.com