

## Исследование антифунгальной и фунгицидной активности тысячелистника обыкновенного флоры Армении

А.В. Топчян<sup>1</sup>, М.М. Пашаян<sup>1</sup>, С.М. Бадалян<sup>2</sup>, С.А. Агаларян

<sup>1</sup>Кафедра технологии лекарств и организации фармации ЕРГМУ им. М. Гераци,

<sup>2</sup>Кафедра ботаники биологического факультета ЕГУ

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

**Ключевые слова:** экстракт, тысячелистник, антифунгальная активность, фунгицидная активность, тест-микроспидеты

Грибковые заболевания составляют одну из самых многочисленных групп болезней человека и животных. Наиболее же распространенными недугами, вызываемыми патогенными грибами, являются микозы кожи, ногтей ног и рук. Для их лечения в настоящее время предложено немало эффективных препаратов, которые, однако, могут вызывать индивидуальную непереносимость, имеют противопоказания, побочные явления, высокую коммерческую цену. В то же время известно много видов высших растений, которые обладают антифунгальным действием (черноголовка обыкновенная, чистотел, тмин, девясил высокий, яснотка белая, хвощ полевой, травы ряски малой, одуванчик лекарственный) [6]. Так, на кафедре ботаники университета Ванкувера была изучена антифунгальная активность около 100 растительных экстрактов против 9 видов грибов, 81 из них проявили разной степени антифунгальную активность, а около 30 экстрактов – активность против 4 и более видов грибов. Самую высокую активность проявили экстракты следующих растений: корни *Mahonia aquifolium*, соцветие *Alnus rubra*, надземные части *Artemisia ludoviciana*, *Artemisia tridentata*, *Moness uniflora*, а также корни *Gravilat macrophyllum* [12]. А в Корейском фармацевтическом колледже были выявлены противогрибковые действия эфирных масел *Thymus quinquecostatus* и *T. magnusa* против семи патогенных грибов в минимальных дозах ингибиции – 0.04–0.39 мг/мл и 0.19 – 0.78 мг/мл соответственно [13].

Объектом исследований послужил тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*), обладающий различными фармакологическими свойствами (кровоостанавливающее, противовоспалительное, ранозаживляющее, выраженное антибактериальное и спазмолитическое действие) [1,5].

Тысячелистник обыкновенный – многолетнее травянистое растение, распространенное по всей территории бывшего СССР, а также в Европе, Северной Америке и Азии. В Армении произрастает около 16 его

видов, из которых фармакопейным считается только тысячелистник обыкновенный. Лекарственным сырьем тысячелистника являются трава (*Herba Millefolii*) и цветки (*Flores Millefolii*) [1,5].

Данная работа посвящена изучению антифунгального (АФ) и фунгицидного (ФЦ) действия экстракта тысячелистника обыкновенного и выявлению новых лекарственных средств растительного происхождения, лишенных различных побочных эффектов, при- сущих химическим препаратам [3,7].

### Материал и методы

Тысячелистник обыкновенный был собран в июле 2002 года в Дилижане в фазе цветения и приведен в стандартное состояние (сбор, сушка) [4]. Из сырья тысячелистника обыкновенного был получен спиртовой экстракт (1:1) методом ускоренной дробной мацерации по типу противотока в трех перколяторах с использованием экстрагента – этилового спирта [2]. Из полученного экстракта спирт подвергали испарению ротационным испарителем (типе 350Р) в течение 1,5 часа. Оставшуюся водную часть лиофилизировали.

В качестве тест-микроспидетов были использованы культуры видов *Microsporium gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Stachibotrys chartarum*, *Aspergillus candidus*, выделенные из почв Армении, обладающих различной степенью патогенности [6,7]. Из них виды *M. gypseum*, *T. ajelloi* и *Ch. keratinophilum* являются кератинофильными грибами и могут стать причиной кожных микозов и онихоми- козов [6–8]. Все тест-микроспидеты были получены из коллекции культур кафедры ботаники ЕГУ.

Для оценки АФ активности лиофилизированный экстракт тысячелистника разводили дистиллированной водой и добавляли в конечных концентрациях – 5мг/мл (0,5%), 10мг/мл (1%), 15мг/мл (1,5%), 20мг/мл (2%) и 25мг/мл (2,5%) в питательную среду Сабуро

(глюкоза 20 г, пептон 10 г, агар 20 г на 1 л дистиллированной воды), которую затем инокулировали микромицетами. Чашки инкубировались в термостате при 25°C.

Рост культур фиксировался на 5, 7, 9, 12-е сутки. При этом описывали характер роста колоний (диаметр, цвет, текстура, пигментация мицелия и реверзума), вычисляли процентную ингибицию по сравнению с контролем. Микроморфологию грибов изучали под световым микроскопом МБС-9. Отмечали наличие или отсутствие конидиогенеза. Повторность

опыта трехкратная.

## Результаты и обсуждение

В ходе опыта изучалось действие экстракта на рост различных грибов на агаризованной среде Сабуро (табл.1, рис.1). Эффективность различных концентраций экстракта оценивали по измерению диаметра роста колоний грибов.

Таблица 1

Скорость роста тест-микромрицетов при различных концентрациях экстракта тысячелистника

Концен-трация, %	<i>M. gypseum</i>				<i>T. ajelloi</i>				<i>Ch. keratinophilum</i>				<i>S. chartarum</i>				<i>A. candidus</i>			
	Диаметр колоний, мм																			
	5-е сут.	7-е сут.	9-е сут.	12-е сут.	5-е сут.	7-е сут.	9-е сут.	12-е сут.	5-е сут.	7-е сут.	9-е сут.	12-е сут.	5-е сут.	7-е сут.	9-е сут.	12-е сут.	5-е сут.	7-е сут.	9-е сут.	12-е сут.
Контроль	17	27	36	56	10	17	23	31	10	14	17	36	12	17	23	32	13	18	25	29
0,5	11	17	26	38	4	8	10	16	7	10	16	26	10	12	16	24	10	14	16	25
1	8	16	25	35	-	2	3	10	4	9	10	18	6	10	14	20	13	15	20	24
1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5	7	2	4	8	12	10	15	20	22
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	3	4	8	10	12	14
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	3	8	10	12	13

Степень ингибиции 0,5% экстракта на рост исследуемых грибов по отношению к контролю можно представить в следующем порядке: *T. ajelloi* (48%) > *M. gypseum* (32%) > *Ch. keratinophilum* (28%) > *S. chartarum* (25%) > *A. candidus* (14%) (табл.2). Изменения в макро- и микроморфологии грибов не наблюдались.

В случае 1% экстракта отмечалось изменение в макроморфологии тест-микромрицетов в зависимости от скорости роста. Так, у *M. gypseum* диаметр роста отставал на 35 мм (в контрольном варианте на 56 мм, табл.1), колония на среде с экстрактом была более плотная, ограниченная, с зеленой пигментацией на реверзуме (рис. 2,а). У *T. ajelloi* диаметр роста достигал 10мм, в контроле – 31мм (рис. 2,б). Колония у *Ch. keratinophilum* по сравнению с контролем была приплюснутой и с более гладкими краями (рис. 2,в). В случае с *S. chartarum* наблюдалась сильная темно-коричневая пигментация, диффундирующая в агар (рис. 2,г). Колония у *A. candidus* по сравнению с кон-

тролем складчатая, более плотная, на обороте чашки пигментированная (рис. 2,д). Степень АФ активности 1% экстракта в отношении тест-микромрицетов представляется в следующем порядке: *T. ajelloi* (68%) > *Ch. keratinophilum* (50%) > *M. gypseum* (37,5%) = *S. chartarum* (37,5%) > *A. candidus* (18%) (табл. 2).

В среде с 1,5% экстрактом тысячелистника наблюдалось фунгицидное действие (полное подавление роста) в отношении *M. gypseum* и *T. ajelloi* (рис. 2а,б). В отношении 3 остальных тест-микромрицетов. экстракт обладал выраженной АФ активностью, что представляется в следующем порядке: *Ch. keratinophilum* (81%) > *S. chartarum* (62,5%) > *A. candidus* (25%) (табл.2). Более того, микроскопический анализ выявил подавление конидиогенеза у видов *T. ajelloi*. У *A. candidus* не описаны нарушения конидиогенеза, колония более плотная и складчатая. В случаях *S. chartarum* и *Ch. keratinophilum* конидиогенез был слабо выраженным.

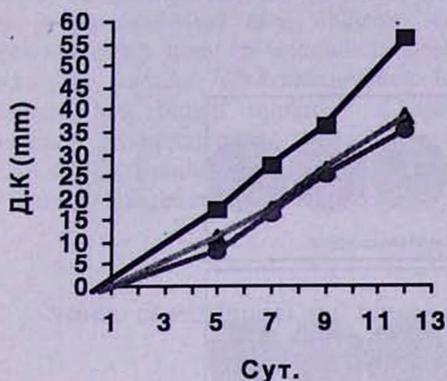
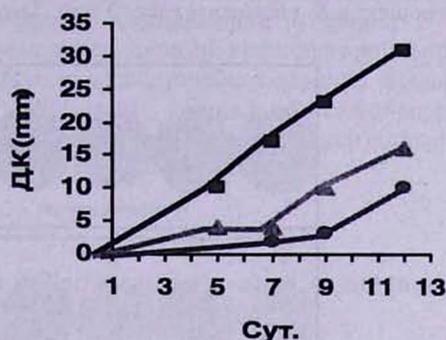
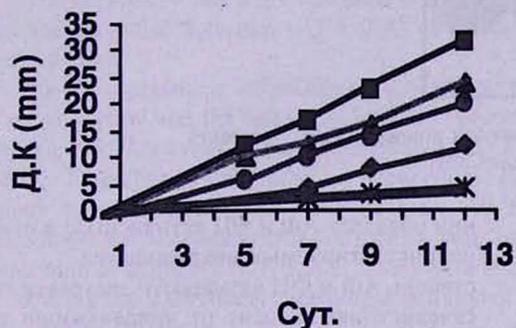
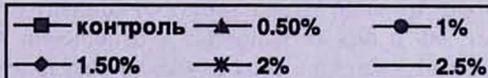
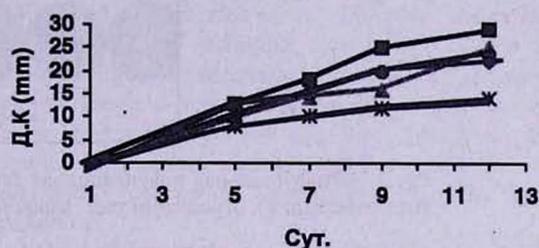
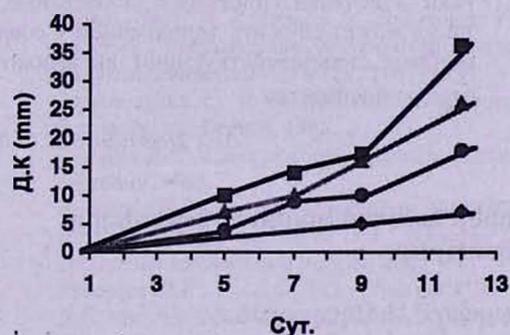
**M.gypseum****T.ajelloi****S.chartarum****A.candidus****Ch.keratinophilum**

Таблица 2

Степень антифунгальной активности экстракта тысячелистника в отношении тест-микросциетов на 12-е сутки роста

Концентрация, %	M.gypseum	T.ajelloi	Ch.keratinophilum	S.chartarum	A.candidus
	Активность экстракта, %				
Контроль	0	0	0	0	0
0.5	32	48	28	25	14
1	37.5	68	50	37.5	18
1.5	100	100	81	62.5	25
2	100	100	95	81	52
2.5	100	100	100	81	56

Рис.1. Динамика роста тест-микросциетов в зависимости от концентрации экстракта тысячелистника, ДК – диаметр колонии

Полное подавление конидиогенеза *S. chartarum* и *Ch. keratinophilum* наблюдалось при 2% содержании экстракта, а при 2,5% – обладал фунгицидным действием на *Ch. keratinophilum* и выраженной АФ активностью в отношении *S. chartarum* (рис. 2 в,г). Таким об-

разом, ФЦ активность, в отношении *M. gypseum* и *T. ajelloi* наблюдалась при воздействии 1,5% экстракта тысячелистника, а в отношении *Ch. keratinophilum* – 2,5%.

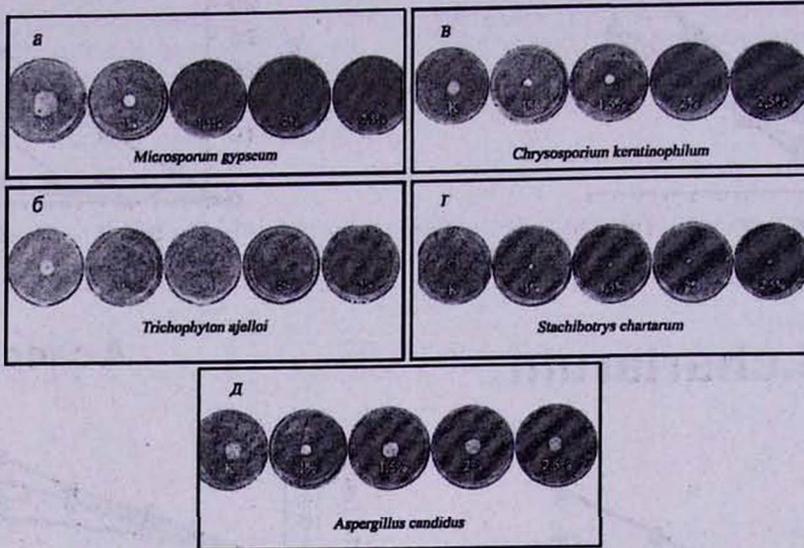


Рис.2. Антифунгальная и фунгицидная активность различных концентраций экстракта тысячелистника в отношении тест-микромикетов на среде Сабуро

Итак, экстракт тысячелистника обыкновенного флоры Армении в зависимости от концентрации обладает АФ и ФЦ активностью в отношении тестируемых микромикетов. Как показали результаты исследований, экстракт тысячелистника обыкновенного был наиболее эффективным в отношении *M. gypseum* и *T. ajelloi*, затем *Ch. keratinophilum* и *S. chartarum*. В протестированных концентрациях менее эффективное воздействие экстракт оказал на *A. candidus*.

На основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что:

- тысячелистник обыкновенный флоры Арме-

нии обладает АФ и ФЦ активностью в отношении тестируемых микромикетов, степень АФ и ФЦ активности экстракта тысячелистника зависит от концентрации самого экстракта,

- тысячелистник обыкновенный флоры Армении вполне эффективно может быть использован как альтернативный метод профилактики и лечения грибковых заболеваний, а также может служить дополнением к современным сильнодействующим антимикотическим препаратам.

Поступила 23.06.05

## Հայաստանի ֆլորայի հազարավերեուկ սովորականի հակասնկային և ֆունգիցիդ ակտիվության ուսումնասիրությունը

Ն.Վ.Թովիջյան, Մ.Մ.Փաշայան, Ս.Մ.Բաղդյան, Ս.Ա. Աղալարյան

Ուսումնասիրվել է Հայաստանի ֆլորայի ներկայացուցիչ՝ հազարատերևուկ սովորականի (*Achillea millefolium*) հակասնկային և ֆունգիցիդ ակտիվությունը, որը մեզ հայտնի է որպես արյունականգ, հակաբորբոքային, սպազմոլիտիկ միջոց: Հակասնկային ակտիվությունը ուսումնասիրելու նպատակով օգտագործվել է հազարատերևուկի լիոֆիլիզացված էքստրակտը: Որպես թեստ-միկրոմիցետներ կիրառվել են

Հայաստանի հողից անջատված ախտածին սնկերի (*Microsporium gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Stachibotrys chartarum*, *Aspergillus candidus*) շտամերը: Հակասնկային ակտիվության գնահատման համար էքստրակտը ավելացվել է Սաբորո սնկային միջավայրի մեջ տարբեր կոնցենտրացիաներով (0,5; 1,1; 5,2; 2,5%):

Փորձի արդյունքում պարզվեց, որ էքստրակտը

ցուցաբերում է հակասնկային և ֆունգիցիդ ակտիվություն թեստ-միկրոմիցետների հանդեպ, որը ավելանում է սննդամիջավայրում էքստրակտի կոնցենտրացիայի բարձրացման հետ մեկտեղ: Հակասնկային էֆեկտը ավելի վառ էր արտահայտված ընդդեմ *M. gypseum*, *T. ajelloi*, *Ch. keratinophilum* և *S. chartarum* սնկերի, իսկ ավելի պակաս՝ *A. candidus*-ի: Էքստրակտը ցուցաբերում էր հակասնկային ակտիվություն 0,5-1% կոնցենտրացիաների դեպքում, իսկ ավելի բարձր կոնցենտրացիաները (2-2,5%) ցուցաբերում

էին ֆունգիցիդ ակտիվություն:

Հիմնվելով ստացված արդյունքների վրա, կարելի է եզրակացնել, որ Հայաստանի ֆլորայի հազարատերևուկ սավորականը ցուցաբերում է հակասնկային և ֆունգիցիդ ակտիվություն և կարող է կիրառվել որպես տարբեր սնկային հիվանդությունների բուժման և կանխարգելման այլընտրանքային մեթոդ, ինչպես նաև լինել լավ լրացում ժամանակակից ուժեղ ազդեցության հակասնկային դեղամիջոցներին:

## Study of antifungal and fungicid activities of *Achillea millefolium*(yarrow) of Armenian flora

H.V. Topchyan, M.M. Pashayan, S.M. Badalyan, S.A. Aghalaryan

The subject of investigation was yarrow (*Achillea millefolium*) ordinary of Armenian flora, which has versatile pharmacological properties (styptic, anti-inflammatory, spasmolytic).

The purpose of this work has been to study of antifungal and fungicide activities (AFA, FA) of yarrow of Armenian flora.

For the assessment of antifungal activity we used extract of yarrow and the following strains: *Microsporum gypseu*, *Trichophyton ajello*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Stachibotrys chartarum*, *Aspergillus candidus*, which have different pathogenic degrees. All the test-micromycetes were taken from Armenian soil. Four concentration of extract (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5%) were tested.

During the experiment, antifungal activity of yarrow

increased proportionally to its strength in medium.

So, yarrow of Armenian flora has antifungal and fungicid activities towards test-micromycetes. The observed AFA and FA depended on the strength of the extract. The extract possessed antifungal activity at 0.5-1.5% concentration. Higher concentrations (2, 2.5%) of extract displayed fungicid activity. The results of the experiment have shown that yarrow has the highest effectiveness against *M. gypseum* and *T. ajelloi*, then *Ch. keratinophilum* and *S. chartarum*, and is less effective against *A. candidus*.

On the basis of the obtained results it is confirmed that yarrow of Armenian flora can be successfully used both as an alternative method for prophylaxis and treatment of fungal diseases and also as a good addition to modern

## Литература

1. Гамерман А. Ф., Лекарственные растения, Л., 1990.
2. Грядунова Г. П., Козлова Л. М., Литвинова Т. П. Руководство к практическим занятиям по заводской технологии лекарственных форм, 1986, 163с.
3. Золотницкая С. Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении, т.2, Ереван, 1965.
4. Ивашиш Д. С. Правила сбора и сушки лекарственных растений, 1985.
5. Ковалева Н. Г., Лечение растениями, М., 1982.
6. Коламицев Н. Е., Мальцева О. А., Дмитрук С. Е. Современная микология в России, 2002.
7. Ревазова Л. В., Саакян А. О., Элиазян Г. А., Абрамян Д. Г. Медицинская наука Армении, 2001, т. XLI, 1, с. 113.
8. Kane J., Summerbel R., Sigler L., Krajden S., Land G. Laboratory Handbook of Dermatophytes, Star Publishing Company, Belmont, California, USA, 1997.
9. Kuchwaha R. K., Guarro S. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, Bilbao, Revista Iberoamericana de Micologia, 17, 2000.
10. St-Germain G., Summerbell R. Champignons filamenteux medical. Caracteristiques et identification. Star Publishing Company Belmont, California, USA, 1996.
11. Van Oorschot C. A. N. A revision of Chrysosporium and lied genera, Studies in Mycology, CBS, Baarn, Hollande, 1980, 20.
12. Mc. Cutcheon A. R., Ellis S. M., Hancoc R. E. W., Towers G. H. N. ETHNOPHARMACOL (Ireland), 1994, 44/3.
13. Seungwon Shin, Ji-Hyun Kim Planta med., 2004, 70: