

Ocena aktywności przeciwgrzybiczej wyciągu wodnego z wierzbownicy drobnokwiatowej (*Epilobium parviflorum* Schreb.) wobec dermatofitów z gatunku *Trichophyton mentagrophytes*

¹Zakład Biologii Środowiskowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Anna Głowacka, prof. nadzw.

²Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Alicja Budak

ESTIMATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE SMALL-FLOWERED WILLOW (*EPILOBIUM PARVIFLORUM* SCHREB.) AQUEOUS EXTRACT AGAINST DERMATOPHYTES FROM SPECIES OF *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

SUMMARY

Despite the small-flowered willow herb's corroborated curative traits, an array of synthetic agents has dislodged it for long from medicine. Albeit research works in the domain of phytochemistry and pharmacognosy that were conducted in the last two decades reconsidered the medicinal properties of *Epilobium parviflorum*. The most active are willow herb aqueous dry extracts which display antibacterial, antifungal, anti-tumour, immune-stimulating, anti-inflammatory and detoxifying activities. The willow herb extracts are applicable to therapy of dermatoses and systemic autoimmune diseases.

The aim of the study was to assess the antifungal *in vitro* activity of different concentrations of *Epilobium parviflorum* aqueous dry extract against *Trichophyton mentagrophytes* strains isolated from nail filings of patients attending the Dermatological Clinic within the Ludwik Rydygier Specialistical Hospital in Krakow, and one original strain ATCC 18748.

The research material were nine *Trichophyton mentagrophytes* strains, including one original strain ATCC 18748 and eight strains isolated from the nail filings. Moreover, there was used the small-flowered willow herb aqueous dry extract which was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO), given the concentrations: 200, 100, 50, 25 and 12.5 mg/ml. In order to assess the antifungal activity of the *Epilobium parviflorum* extract, in the five concentrations, the disc-diffusion method was employed. A measure of the antifungal activity of the small-flowered willow herb aqueous dry extract was its minimal inhibitory concentration (MIC).

Diameters of growth inhibition zones in case of the *Trichophyton mentagrophytes* isolates, exposed to the action of five concentrations of the studied extract, contingently on the concentration amounted to 18-26 mm at the outmost ($21.75 \pm SD = 2.92$ mm on the average), given the concentration 200 mg/ml, and 6-7 mm at the very least ($6.25 \pm SD = 0.46$ mm on the average), given the concentration 12.5 mg/ml. The diameters of growth inhibition zone in case of the *Trichophyton mentagrophytes* demonstration strain ATCC 18748, exposed to the action of five concentrations of willow herb extract, maximally amounted to

22 mm, given the concentration 200 mg/ml, and minimally to 6 mm, given the concentration 12.5 mg/ml. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the *Epilobium parviflorum* extract for the eight investigated *Trichophyton mentagrophytes* isolates came to 9.25 mg/ml.

The corroborated antifungal activity of the *Epilobium parviflorum* aqueous dry extract countenances admitting it to be a potent natural preparation which can be applicable to therapy of ringworm of the foot and scalp.

KEY WORDS: *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* – *EPILOBIUM PARVIFLORUM* – ANTIFUNGAL ACTIVITY – MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION

Wprowadzenie

Pierwsze wzmianki o leczniczych właściwościach wierzbownicy drobnokwiatowej (*Epilobium parviflorum* Schreb.) pochodzą jeszcze z 1880 roku. Mimo uznanych właściwości leczniczych tej rośliny, leki syntetyczne na długie lata wyparły ją z medycyny (1, 2). Przeprowadzone w ostatnim dwudziestolecu badania fitochemiczne i farmakognostyczne w Polsce oraz na świecie, ponownie wykazały właściwości lecznicze *E. parviflorum* (3, 4). Ziele wierzbownicy drobnokwiatowej (*Epilobii herba*) bogate jest w substancje biologicznie czynne, ponieważ zawiera β -sitosterole oraz kwasy: linolenowy, arachidonowy, arachidowy, olejowy, palmitoolejowy, palmitynowy, stearynowy (frakcja lipidowa) oraz mirycetynę, kwercetynę i kemferol (frakcja flawonoidowa). Szczególnie aktywne są wyciągi wodne z wierzbownicy, które wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, immunostymulujące, przeciwzapalne i odtruwające (5-9).

Wyciągi z wierzbownicy zalecane są w przypadku chorób skórnych (łuszczyca, trądzik, wypryski, dermatozy, pokrzywka, łojotok, łojotokowe zapalenie skóry, figówka, ropne zapalenie mieszków włosowych,

łupież tłusty, dermatoza okołoustna) i chorób autoimmunologicznych układowych. Stosowane są także w przeroście i stanach zapalnych gruczołu krokowego, kamicy moczowej, zapaleniach układu moczowego i płciowego zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Wyciągi z wierzbownicy znalazły również zastosowanie w leczeniu chorób wywołanych nadmiarem androgenów, w zaburzeniach miesiączkowania, upławach, przy bólach i zawrotach głowy, nerwobólach, bezsenności, moczeniu nocnym, wyczerpaniu nerwowym, trudno gojących się ranach, chorobach alergicznych i łysieniu androgenowym (10-12).

Cel pracy

Celem pracy była ocena *in vitro* aktywności przeciwgrzybiczej różnych stężeń suchego wodnego wyciągu z ziela wierzbownicy drobnokwiatowej wobec szczepów grzybów z gatunku *Trichophyton mentagrophytes* wyizolowanych od pacjentów chorych na grzybicę paznokci.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło dziewięć szczepów *T. mentagrophytes*, w tym jeden szczep wzorcowy ATCC 18748 i osiem szczepów klinicznych wyizolowanych z opłatków paznokci pacjentów leczonych w Poradni Dermatologicznej Szpitala Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera w Krakowie. Do badań wykorzystano suchy wodny wyciąg z ziela wierzbownicy (*Epilobium aquaesiccum*), wyprodukowany przez Phytopharm Klęka S.A. w 2011 r., z którego sporządzono roztwory w dimetylosulfotlenku (DMSO) o stężeniach: 200, 100, 50, 25 i 12,5 mg/ml.

Wyizolowane szczepy *T. mentagrophytes* wysiewano na stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem aktidionu i po 7-10-dniowej inkubacji w temperaturze 27°C przygotowywano zawiesinę w 0,85% roztworze NaCl o gęstości 0,5 w skali *McFarlanda*.

Do oceny aktywności przeciwgrzybiczej pięciu rozcieńczeń suchego wyciągu z ziela wierzbownicy zastosowano metodę dyfuzyjno-krążkową. Przygotowane zawiesiny badanych szczepów w ilości 100 µl wysiewano na stałe podłoże *Sabourauda* z aktidionem, a następnie nakładano przygotowane krążki bibułowe, które zawierały po 15 µl odpowiednich stężeń roztworów suchego wyciągu z wierzbownicy. Hodowle inkubowano w temperaturze 27°C przez 7-10 dni, a następnie mierzono średnicę strefy zahamowania wzrostu grzyba wokół każdego krążka w mm, przyjmując średni pomiar z dwóch prostopadłych do siebie średnic.

Minimalne stężenie hamujące MIC (w mg/ml) obliczono z krzywej wzrostu prostoliniowego wykre-

ślonej w układzie półlogarytmicznym, odkładając na osi odciętych logarytmy wartości stężeń roztworów z wierzbownicy (200, 100, 50, 25 i 12,5 mg/ml), a na osi rzędnych średnicę pola zahamowania wzrostu grzyba wokół krążka. Miarą przeciwwgrzybiczego działania roztworu wierzbownicy było ich najmniejsze stężenie hamujące MIC (*minimal inhibitory concentration*) obliczone wg wzoru Kadłubowskiego (13) z poprawką Głowackiej:

$$\log \text{MIC} = \overline{\log C_1} + \frac{\overline{\log C_2} - \overline{\log C_1}}{\overline{N_2} - \overline{N_1}} (6 - \overline{N_1}),$$

gdzie:

$\overline{N_1}, \overline{N_2}$ – średnie arytmetyczne dwóch grup średnic stref zahamowania wzrostu, średnica krążka 6 mm,

$\overline{\log C_1}, \overline{\log C_2}$ – średnie arytmetyczne logarytmów dwóch grup stężeń używanego preparatu.

Średnice obszaru zahamowania wzrostu grzybów z gatunku *T. mentagrophytes* opisywano za pomocą wartości średniej, błędu standardowego, odchylenia standardowego, przedziału ufności dla średniej oraz wartości minimalnej i maksymalnej cechy. Przedział ufności ustalono na poziomie 95%.

Wyniki

Średnice stref zahamowania wzrostu szczepów *T. mentagrophytes* poddanych działaniu pięciu stężeń roztworu wyciągu wodnego z wierzbownicy drobnokwiatowej wynosiły maksymalnie 18-26 mm (średnio $21,75 \pm \text{SD} = 2,92$ mm) przy stężeniu 200 mg/ml, a minimalnie 6-7 mm (średnio $6,25 \pm \text{SD} = 0,46$ mm) przy stężeniu 12,5 mg/ml.

Średnice stref zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego *T. mentagrophytes* (ATCC 18748), poddanego działaniu pięciu stężeń roztworu wyciągu z wierzbownicy drobnokwiatowej, wynosiły maksymalnie 22 mm, przy stężeniu 200 mg/ml oraz minimalnie 6 mm, przy stężeniu 12,5 mg/ml.

Minimalne stężenie hamujące (MIC) roztworu wyciągu wodnego z wierzbownicy drobnokwiatowej dla ośmiu badanych szczepów *T. mentagrophytes* wyizolowanych od pacjentów wynosiło średnio 9,25 mg/ml (tab. 1).

Obliczenia statystyczne stref zahamowania wzrostu (mm) dla ośmiu szczepów *T. mentagrophytes* wyizolowanych od pacjentów pod wpływem różnych stężeń roztworu wyciągu wodnego z wierzbownicy drobnokwiatowej przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1. Strefy zahamowania wzrostu (mm) *Trichophyton mentagrophytes* pod wpływem różnych stężeń wyciągu wodnego z wierzbownicy (mg/ml) dla szczepu wzorcowego i 8 szczepów wyizolowanych od pacjentów.

Lp.	Gatunek	Nr szczepu	Materiał kliniczny	Stężenie roztworu wierzbownicy (mg/ml)				
				200	100	50	25	12,5
				Strefa zahamowania wzrostu (mm)				
1.	<i>T. mentagrophytes</i>	ATCC 18748	szczep wzorcowy	22	16	11	8	6
2.	<i>T. mentagrophytes</i>	2/07	opiłki paznokci	26	20	12	9	7
3.	<i>T. mentagrophytes</i>	167/07	opiłki paznokci	26	20	12	9	6
4.	<i>T. mentagrophytes</i>	11/09	opiłki paznokci	22	16	10	8	6
5.	<i>T. mentagrophytes</i>	190/10	opiłki paznokci	22	15	8	7	6
6.	<i>T. mentagrophytes</i>	86/07	opiłki paznokci	20	16	13	8	6
7.	<i>T. mentagrophytes</i>	1/07	opiłki paznokci	20	16	8	6	6
8.	<i>T. mentagrophytes</i>	8/07	opiłki paznokci	20	14	10	7	6
9.	<i>T. mentagrophytes</i>	149/07	opiłki paznokci	18	16	13	9	7

Tabela 2. Obliczenia statystyczne stref zahamowania wzrostu (mm) dla 8 szczepów *Trichophyton mentagrophytes* wyizolowanych od pacjentów pod wpływem różnych stężeń roztworu wyciągu wodnego z wierzbownicy (mg/ml).

Stężenie roztworu wierzbownicy (mg/ml)	Parametry statystyczne stref zahamowania wzrostu (mm)						
	Średnia	Odchylenie standardowe	Błąd standardowy	Przedział ufności 95%	Minimum	Maksimum	
Lp.							
1.	200,00	21,75	2,92	1,03	19,31 – 24,19	18	26
2.	100,00	16,63	2,20	0,78	14,79 – 18,46	14	20
3.	50,00	10,75	2,05	0,73	9,03 – 12,47	8	13
4.	25,00	7,88	1,13	0,40	6,93 – 8,82	6	9
5.	12,50	6,25	0,46	0,16	5,86 – 6,64	6	7

Omówienie

Wierzbownica jest rośliną zielną, należąca do rodziny wiesiołkowatych. Rodzaj wierzbownica obejmuje szereg gatunków, nie wszystkie jednak wykazują działanie lecznicze. Do gatunków leczniczych należy, m.in. wierzbownica drobnokwiatowa (*E. parviflorum*), która najczęściej wykorzystywana jest w medycynie ludowej. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie środowisk naukowych, co zaowocowało rozpoczęciem

badń nad jej wykorzystaniem w terapii na szeroką skalę (5- 9).

Ducrey i wsp. (1) badali wpływ wyciągu z wierzbownicy (rodzaj: *Epilobium*, rodzina: *Onagraceae* – *Oenotheraceae*) na aktywność dwóch enzymów – 5- α -reduktazy i aromatazy – mających istotne znaczenie w etiologii łagodnego rozrostu stercza. Posługując się technikami laboratoryjnymi, autorzy pracy zidentyfikowali dwa wielopierścieniowe związki chemiczne z grupy elagotanin, wchodzące w skład wyciągu z

wierzbownicy, tj. oenoteinę A i oenoteinę B, które hamowały aktywność 5- α -reduktazy i aromatazy.

Badania nad wpływem różnych wyciągów z wierzbownicy drobnokwiatowej (*E. parviflorum*) na aktywność 5- α -reduktazy przeprowadzili również Lesuisse i wsp. (2). Do badań użyto specjalnie przygotowanych homogenatów z gruczołu krokowego mężczyzn z rozpoznaniem łagodnym rozrostem stercza. Do oceny wpływu badanych wyciągów z zieleń wierzbownicy drobnokwiatowej na aktywność 5- α -reduktazy autorzy wykorzystali metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*high-performance liquid chromatography*, HPLC). Badacze wykazali, że najsilniejszym wpływem hamującym na 5- α -reduktazę charakteryzowały się wyciągi wodne z zieleń wierzbownicy. Potwierdzili oni tym samym, że znany od 130 lat wśród ludowych medyków naturalny środek – wyciąg z zieleń wierzbownicy drobnokwiatowej – wykazuje wysoką wartość terapeutyczną. Substancją, która według obserwacji autorów wykazywała największą aktywność inhibującą wobec 5- α -reduktazy, była wielopierścieniowa tanina – oenoteina B (substancja, której właściwości przeciwirusowe i przeciwnowotworowe udowodniono już we wcześniejszych latach).

Vitalone i wsp. (9) przeprowadzili badania *in vitro* dotyczące przeciwdrobnoustrojowego działania wyciągów alkoholowych z wierzbownicy. Do badań wykorzystano takie gatunki, jak *E. angustifolium*, *E. hirsutum*, *E. palustre*, *E. tetragonum* i *E. rosmarinifolium*. W badaniach wykorzystano bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne oraz grzyby drożdżoidalne z rodzaju *Saccharomyces*. Wszystkie użyte w badaniu suche wyciągi charakteryzowały się działaniem przeciwdrobnoustrojowym w zakresie stężeń od 10 do 650 $\mu\text{g/ml}$. Najszerze spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego wobec badanych szczepów bakterii i grzybów drożdżoidalnych wykazywały wyciągi z zieleń wierzbownicy *E. angustifolium* i *E. rosmarinifolium*.

Leczenie grzybic powierzchniowych wywołanych przez dermatofity jest w zależności od zaawansowania choroby długotrwałe i kosztowne. Stosowanie leczenia skojarzonego, czyli terapii doustnej uzupełnionej preparatami zewnętrznymi, może skrócić czas leczenia. Wysoka aktywność wyciągu wodnego z zieleń

wierzbownicy daje możliwość zastąpienia nim drogich leków do stosowania miejscowego w postaci lakierów do paznokci lub żeli przeciwgrzybiczych. Zieleń wierzbownicy drobnokwiatowej (*E. parviflorum* Schreb.) może zatem posłużyć do przygotowania preparatów do stosowania zewnętrznego (tonik, maść, serum, płyny lecznicze do skóry głowy) (14, 15).

Podsumowanie

Potwierdzona aktywność suchego wodnego wyciągu z zieleń wierzbownicy drobnokwiatowej (*Epilobium parviflorum* Schreb.) na dermatofity z gatunku *Trichophyton mentagrophytes*, pozwala uznać go za skuteczny naturalny preparat, który może mieć zastosowanie w leczeniu grzybicy paznokci i innych grzybic wywołanych przez ten drobnoustrój.

Piśmiennictwo

1. Ducrey B, Marston A, Göhring S i wsp. Inhibition of 5- α -reductase and aromatase by the ellagitannins oenonein A and oenonein B from *Epilobium* species. *Planta Med* 1997; 63:111-4.
2. Lesuisse D, Berjonneau J, Ciot C i wsp. Determination of oenonein B as the active 5-reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *J Nat Prod* 1996; 59:490-2.
3. Nowak R, Krzaczek T. Farmakognostyczne badania zieleń *Epilobium angustifolium* i *Epilobium parviflorum* Schreb. *Herba Pol* 1998; 44(1):5.
4. Nowak R, Krzaczek T. Sterole w zieleń *Epilobium angustifolium* L. *Herba Pol* 1998; 44(4):297.
5. Awad AB, Fink CS. Phytosterol as anticancer dietary components: Evidence and mechanisms of action. *J Nutrit* 2000; 130:2127-30.
6. Dreikorn K. The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *World J Urol* 2002; 19(6):426-35.
7. Vitalone A, Bordi F, Baldazzi C i wsp. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L. *Farmaco* 2001; 56:483-9.
8. Battinelli L, Tita B, Evandri MG i wsp. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Farmaco* 2001; 56:345-8.
9. Vitalone A, McColl J, Thome D i wsp. Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. *Pharmacology* 2003; 69:79-87.
10. Mowszowicz J. *Pospolite rośliny naczyniowe Polski*. Wyd Nauk PWN. Warszawa 1979.
11. Różański H. Wierzbownica i wierzbówka – *Epilobium* L. et *Chamaenerion* Adans (rodzina *Oenotheraceae* sive *potius Onagraceae* – Wiesiołkowate). Właściwości lecznicze, preparaty, zastosowanie, dawkowanie. AM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Poznań 2004-2005.
12. Treben M. Health through god's pharmacy, 3rd ed. Wilhelm Ennsthaler, Steyr 1984.
13. Kadłubowski R. Approximate methods in analysis of dose/response curve. Abstracts of VIIth Intern Congr Chemother. Praha 1971; A-12/28.
14. Nowicki R. Grzybica paznokci – jak usprawnić leczenie. Porady praktyczne nie tylko dla dermatologów. *Przew Lek* 2002; 5:52-8.
15. Szepietowski J, Reich A. Co nowego w diagnostyce i terapii w dermatologii. *Przew Lek* 2007; 2:160-7.

otrzymano/received: 11.06.2013
zaakceptowano/accepted: 10.07.2013

Adres/address:

*dr hab. n. med. Anna Głowacka, prof. nadzw.
Zakład Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź
tel.: +48 (42) 658 58 52, +48 (42) 272 52 01
e-mail: anna.glowacka1@umed.lodz.pl