

Fitokemijske, farmakološke in klinične raziskave izvlečka iz vej bele jelke (*Abies alba*)

Samo Kreft

Zdravilne rastline običajno povežujemo s tradicionalno uporabo in izročilom preteklih generacij. Pa vendar so tudi zdravilne rastline lahko predmet poglobljenih raziskav. V raziskavah lahko dokumentiramo ljudsko uporabo in preverjamo, ali so ljudska dognanja pravilna in izkušnje objektivne. Lahko pa pri raziskavah zdravilnih rastlin tudi raziskujemo povsem nove vrste rastlin, nove načine priprave zdravil in nove namene njihove uporabe. Na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani že vrsto let raziskujemo izvlečke iz bele jelke (*Abies alba*). Bela jelka je edina vrsta jelke, ki raste pri nas in se je, sicer v zelo majhnem obsegu, uporabljala že v ljudski medicini. Večino naših raziskav je tako povsem izvirnih in z njimi odkrivamo nove biološke učinke te rastline.

Po neki logiki raziskovalnih vprašanj, ki nas zanimajo, in raziskovalnih metod, ki jih uporabljamo, bi lahko naše raziskave razdelili v več faz:

- etnofarmakološke in etnobotanične raziskave preučujejo tradicionalno in drugo ljudsko uporabo,
- pri botaničnih raziskavah nas zanima, kako na učinek vplivajo vrsta rastline, rastlinski del in rastišče,
- fitokemijske raziskave ugotavljajo, katere biološko aktivne snovi se nahajajo v rastlini in kakšna je njihova kemijska struktura,
- s farmacevtsko-tehnološkimi raziskavami poskušamo z izbiro primerne topila, temperature in drugih parametrov najti

- najugodnejši postopek priprave izvlečkov,
- farmakološke raziskave ugotavljajo mehanizem bioloških učinkov in jih večinoma opravljamo v laboratorijski steklovini (*in vitro*) ali s poskusnimi živalmi,
- klinične raziskave preučujejo zdravilne učinke in varnost zdravilne rastline na ljudeh.

V resnici pa raziskave ne tečejo tako zaporedoma, temveč so med seboj zelo povezane in odvisne, zato potekajo deloma vzporedno. Dokler ne vemo, kakšne učinke ima rastlina, ne moremo teh učinkov pripisati določeni snovi in iskati te snovi v različnih delih rastline in različnih izvlečkih. V tem članku bom raziskave, ki jih opravljamo z jelko, kljub vsemu predstavil v tem vrstnem redu.

Etnofarmakologija in etnobotanika

S pregledom starih zapisov nismo našli prav veliko navedb o zdravilski uporabi jelke. Če že, so jo uporabljali podobno kot smreko za pridobivanje eteričnega olja in smole. Zanimivo pa je, da so že pred stoletji iz vej te rastline pripravljali pivo (*London Medical Gazette*, 23. septembra 1837). Žal iz starih zapisov ni razvidno, ali je jelka pri tej pripravi piva služila kot (edini) vir ogljikovih hidratov za fermentacijo ali pa je bila dodana le za okus in za preprečevanje kvarjenja piva. O beli jelki je pisal tudi časopis *Jutro* leta 1939, vendar jo je imenoval grebenasta jelka in tudi tam uporabljeno latinsko ime je bilo drugo: *Abies pectinata*.



Botanika

Pri nas - kot rečeno - uspeva ena sama vrsta jelke. Smo pa naše začetne raziskave naredili tudi z nekaterimi drugimi iglavci, kot sta smreka in bor. Prav tako smo primerjali različne dele jelke: les, grče, lubje in različne dele vej (tik ob deblu in malo bolj stran od debla). Po količini in pestrosti vsebovanih antioksidativnih fenolov smo ugotovili, da so veje, in sicer del, ki je najbližje deblu, najobetavnejše za nadaljnje raziskave. Največ

Slika 1: Izrezek iz časopisa Jutro iz leta 1939.

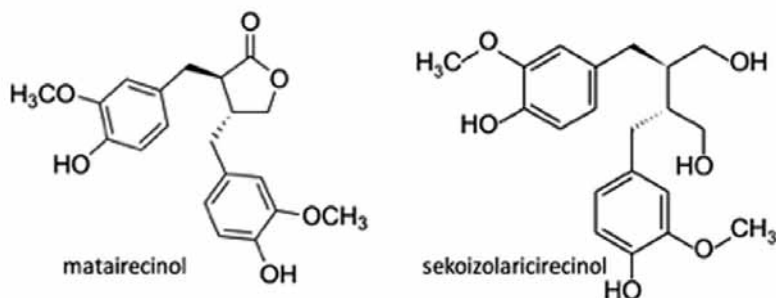
teh snovi je v temnem delu veje, ki se imenuje črnjava. Povsem uporabne in zadostne so veje sveže posekanih jelk, ki jih za druge potrebe posekajo gozdarji v skladu s svojim rednim načrtom.

Fitokemija

Izvleček iz vej bele jelke vsebuje kompleksno mešanico antioksidativnih polifenolov (Tavčar Benkovič, Žigon, Mihailović, Petelinc, Jamnik, Kreft, 2017). Polifenoli so rastlinske snovi z znanimi biološkimi, farmakološkimi in kliničnimi aktivnostmi, ki prispevajo k zdravju ljudi z vrsto učinkov, kot so antioksidativno delovanje, preprečevanje srčno-žilnih bolezni, preprečevanje raka, antidiabetično delovanje in protivnetno delovanje. Glavne tri vrste polifenolov v jelki so lignani, flavonoidi in fenolne kisline. Flavonoidi so iz skupine procianidov, kot sta katehin in epikatehin. Glavne fenolne kisline so protokatekujška, parakumarna in galna kislina. Lignani v tem izvlečku so derivati lariciresinola, predvsem sekoizolari-



Slika 2: Prečni in vzdolžni prerez jelkine veje z lepo razvidno črnjavo. Foto: Tadej Rejc.



Slika 3: Kemijski strukturi dveh najbolj značilnih polifenolov v izvlečku iz vej jelke.

ciresinol (5,5-odstotna vsebnost v izvlečku), sledijo izolariciresinol, hidroksimatairesinol, lariciresinol, matairesinol in pinoresinol. Nekatere take lignane najdemo v lanenih in sezamovih semenih, pa tudi v drugih živilih (Gerstenmeyer, Reimer, Berghofer, Schwartz, Sontag, 2013).

Izvleček poleg polifenolov vsebuje še nekaj vodotopnih lesnih polisaharidov.

Farmacevtska tehnologija

Antioksidativni polifenoli se dokaj učinkovito iz vej izlužijo že z navadno vodo, zato ni treba uporabljati dražjih, eksplozivno nevarnejših in okolju manj prijaznih topil, kot so etanol, eter ali heksan. Treba pa je bilo optimirati temperaturo in čas ekstrakcije, saj pri višji temperaturi in daljšem času poteka že oksidacija in polimerizacija, skratka zmanjšanje učinkovitosti antioksidantov. Zaradi lažjega skladiščenja, boljše obstojno-

sti in ustrežnejšega vgrajevanja v tablete in kapsule vodnemu izvlečku po končani ekstrakciji odparimo vso vodo, da nastane suhi izvleček v obliki prahu. Pridobljena količina izvlečka je dokaj majhna, le okoli štiri odstotke v primerjavi s količino vej. Postopek pridobivanja izvlečka in njegove učinke smo skupaj z našimi partnerji iz industrije tudi patentirali in izvleček poimenovali Belinal. Belinal je dobil ime po Belinu, ki je bil starodavni bog Venetov in Slovenov. Kipce Belina in njemu posvečene oltarje so našli ob izkopavanju na Ljubljanskem gradu, v Celju, na Tolminskem, v Celovcu in na območju Benečije.

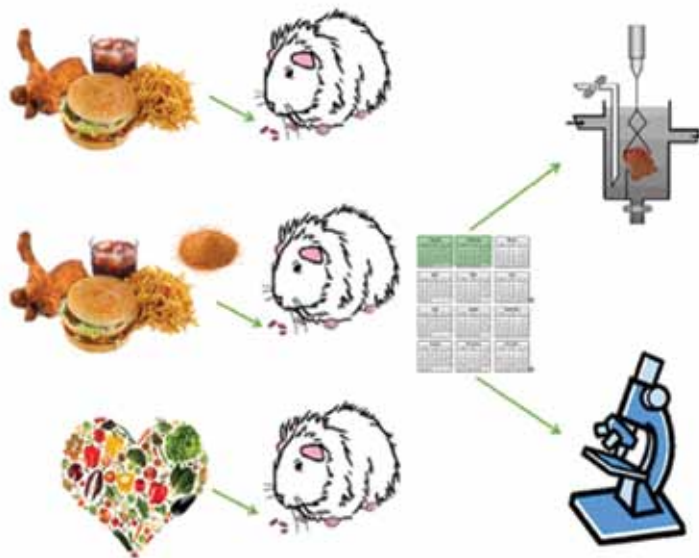
Farmakologija

Vodni izvleček iz vej jelke je pokazal dobre rezultate v različnih testih antioksidativnega učinka v epruveti (*in vitro*) in je primerljiv ali boljši od izvlečka zelenega čaja. Ugotovili smo tudi, da se pri umetnem ustvajanju (simulaciji) razmer, kot so v prebavilih, večina polifenolnih snovi ohrani, prav tako pa se ohrani njihova antoksidativna aktivnost (Tavčar Benković, Žigon, Mihailović, Petelinc, Jamnik, Kreft, 2017).



Slika 4: Posušeni z vodnim izluženjem pridobljeni izvleček iz vej bele jelke, imenovan Belinal.
Foto: Tadej Rejc.

Slika 5: Shema poteka raziskave, v kateri so bile tri skupine buder dva meseca hranjene s tremi različnim dietami (od zgoraj: aterogeno dieto, aterogeno dieto + izvlečkom vej jelke, neaterogeno dieto). Po treh mesecih so bile narejene funkcionalne (prožnost in krčenje) ter morfološke raziskave (prisotnost ateroskleroze).



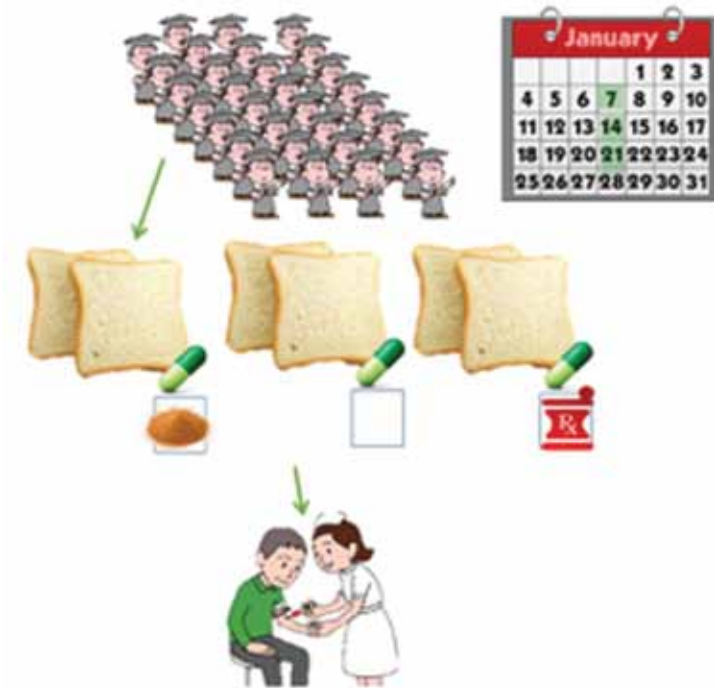
Te snovi so sposobne prehajanja skozi membrano evkariontske celice. To smo ugotovili z merjenjem antioksidativne aktivnosti v notranjosti celice, ko smo izvleček dodali v rastno gojišče ob celice. V nadaljnjih raziskavah je izvleček uspešno zaščitil podganjo srčno mišico pred poškodbami zaradi ishemije (Drevenšek, Lunder, Tavčar Benkovič, Štrukelj, Kreft, 2016). Ishemija je zaustavitev krvnega pretoka, kar se zgodi pri srčni kapi. Stopnjo poškodovanosti celic srčne mišice smo merili tako, da smo v fiziološki raztopini okoli srca ugotavljali prisotnost proteinov, ki se sicer nahajajo v notranjosti celic. Pojavljanje teh proteinov zunaj celic je znak poškodb celične membrane. Poleg tega smo opazili, da je bilo pri srcih, zaščiteneh z izvlečkom jelke, po prestani ishemiji tudi manj nepravilnega utripanja (aritmij) kot pri srcih, ki so bili prav tako izpostavljeni ishemiji, vendar brez zaščite z jelko. V naslednji raziskavi smo pri budrah, ki so dva meseca uživale izvleček vej jelke, dodan k hrani, ugotovili bistveno manj aterosklerotičnih sprememb in manjšo izgubo funkcionalnosti arterij v primerjavi z budrami z enako aterogeno hrano brez izvlečka (Drevenšek,

Lunder, Tavčar Benkovič, Mikelj, Štrukelj, Kreft, 2015). Aterogena dieta pomeni, da smo budre namerno hranili z nezdravo hrano s precej holesterola in nasičenih maščobnih kislin. Za dodatno primerjavo je bila tretja skupina buder hranjena z zdravo (neaterogeno) hrano in stanje žil je bilo pri tej še boljše.

Če s področja srca in ožilja preidemo na področje sladkorne bolezni, je zanimiva raziskava, pri kateri smo v epruveti merili aktivnost encimov alfa amilaza in beta glukozidaza. To sta encima, ki škrob iz hrane razgradita do osnovnih gradbenih enot, to je do glukoze, in s tem omogočita, da ta sladkor preide v kri. Izvleček iz vej jelke je močno zaviral delovanje teh dveh encimov (Lunder, Roškar, Hošek, Štrukelj, 2018), kar je koristno pri sladkorni bolezni, saj se tako upočasni prehod glukoze v kri. Nekateri zaviralci teh dveh encimov (na primer akarboza) so že v rutinski uporabi kot zdravila proti sladkorni bolezni.

Klinične raziskave

Antidiabetično delovanje (delovanje proti

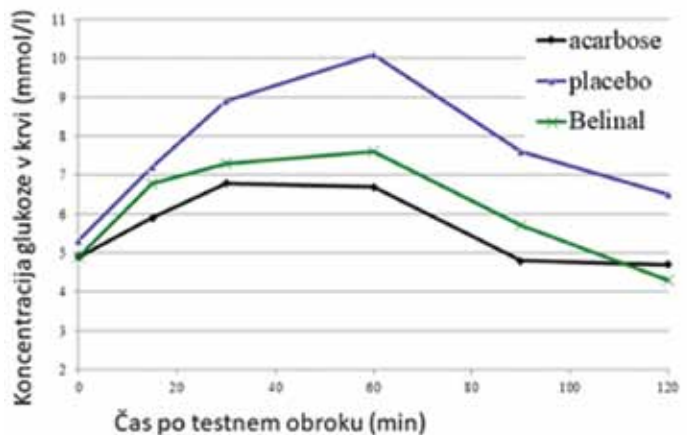


Slika 6: Shema raziskave, v kateri je 31 prostovoljcev (študentov medicine iz Maribora) zaužilo testni obrok s kapsulo preizkušane snovi, nato pa smo jim jemali vzorce krvi za meritve sladkorja in inzulina.

sladkorni bolezni), ki smo ga ugotovili s farmakološko raziskavo, se je potrdilo tudi pri klinični raziskavi (Debeljak, Ferk, Čokolič, Zavrtnik, Tavčar Benkovič, Kreft, in sod., 2016). Cilj te študije je bil preizkus izvlečka iz vej jelke na zmanjšanje koncentracije glukoze v krvi po zaužitju standardnega testnega obroka. 31 zdravih udeležencev je zaužilo testni obrok, ki je bil 100 gramov belega kruha. To so v enotedenskem razmiku zaužili trikrat, pri tem pa so hkrati zaužili še kapsulo, za katero niso vedeli, kaj vsebuje (raziskava

je bila zaradi objektivnosti dvojno slepa). V kapsuli je bil izvleček iz vej jelke ali placebo ali akarboza (znano antidiabetično zdravilo). V različnih časih po obroku smo prostovoljcem jemali kri in v njej izmerili koncentracijo glukoze in inzulina. Koncentracije glukoze v krvi po obroku (izražena kot površina pod krivuljo na sliki 7) je bila ob dodajanju izvlečka jelke v primerjavi s skupino 35 odstotkov nižja. Zdravilo akarboza je znižala to koncentracijo le še nekoliko več (za 43 odstotkov). Tudi koncentracije inzulina v krvi prostovoljcev

Slika 7: Koncentracija glukoze po testnem obroku je bila v primerjavi s placebom bistveno nižja, če je bil obroku dodan izvleček iz vej jelke (na sliki označen kot Belinal).



z jelko so bile bistveno nižje kot pri kontrolni skupini.

V zvezi z uravnavanjem sladkorja v krvi je v zaključni fazi še ena klinična raziskava, ki poteka na bolnikih s sladkorno boleznijo.

Cilj druge raziskave, ki je bila narejena v okviru magistrske naloge na Institutu za kozmetiko (Tavčar, 2016), pa je bil ugotoviti učinke izvlečka vej bele jelke na kožo pri površinski uporabi. Deset prostovoljk, starih od 45 do 65 let, je 12 tednov dvakrat dnevno uporabljalo kremo z dvema odstotkoma tega izvlečka na eni polovici obraza ter kremo brez izvlečka (placebo) na drugi polovici obraza. Stanje kože smo spremljali z meritvami vlažnosti kože, barijerne funkcije, gostote dermisa, prožnosti kože ter gubavosti. Pri večini meritev je prišlo do izboljšanja v primerjavi s placebo.

Predstavil sem najbolj zanimive raziskave, narejenih je bilo še nekaj raziskav v zvezi z regeneracijo športnikov, vplivom na človeške možganske žile in podobno.

Zaključek

Sodelavci Fakultete za farmacijo smo veseli, da te raziskave nimajo le akademskega namena, ampak nam je uspelo navezati dober stik z industrijo, ki tako iz jelkinih vej, ki bi sicer šle v odpad, naredijo izdelke z visoko dodano vrednostjo in jih celo izvažajo v mnoge države sveta, tudi na Kitajsko.

Slika 8: Nekaj izdelkov, ki vsebujejo na Fakulteti za farmacijo razviti izvleček iz vej bele jelke.



Literatura:

Debeljak, J., Ferk, P., Čokolič, M., Zavrtnik, A., Tavčar Benkovič, E., Kreft, S., in sod., 2016:

Randomised, double blind, cross-over, placebo and active controlled human pharmacodynamic study on the influence of silver fir wood extract (Belinal) on post-prandial glycaemic response. Pharmazie, 71 (10).

Drevenšek, G., Lunder, M., Tavčar Benkovič, E., Mikelj, A., Štrukelj, B., Kreft, S., 2015: *Silver fir (Abies alba) trunk extract protects Guinea pig arteries from impaired functional responses and morphology due to an atherogenic diet. Phytomedicine, 22 (9).*

Drevenšek, G., Lunder, M., Tavčar Benkovič, E., Štrukelj, B., Kreft, S., 2016: *Cardioprotective effects of silver fir (Abies alba) extract in ischemic-reperfused isolated rat hearts. Food & Nutrition Research, 60 (1).*

Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Bergbofer, E., Schwartz, H., Sontag, G., 2013: *Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. Food Chemistry (internetni vir), 138 (2–3): 1847–1855. Dostopno na: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612018614>.*

London Medical Gazette, 23. septembra 1837, str. 935. (Internetni vir.) Dostopno na: <https://books.google.si/books?id=TPQaAQAAMAAJ>.

Lunder, M., Roškar, I., Hošek, J., Štrukelj, B., 2018: *Silver Fir (Abies alba) Extracts Inhibit Enzymes Involved in Blood Glucose Management and Protect against Oxidative Stress in High Glucose Environment. Plant Foods for Human Nutrition (internetni vir). Dostopno na: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-018-0698-6>.*

Tavčar, N., 2016: *S placebo kontrolirana študija vpliva kreme z ekstraktom lesa bele jelke (Abies alba Mill.) na kožo. Magistrska naloga. VIST – Visoka šola za storitve v Ljubljani, Oddelek za kozmetiko.*

Tavčar Benkovič, E., Žigon, D., Mihailović, V., Petelinc, T., Jamnik, P., Kreft, S., 2017:

Identification, in vitro and in vivo Antioxidant Activity, and Gastrointestinal Stability of Lignans from Silver Fir (Abies alba) Wood Extract. Journal of Wood Chemistry and Technology, 37 (6).