

Kloka gummorna hade rätt – groblad kan läka sår!

MUHAMMAD ZUBAIR, KIMMO RUMPUNEN, CECILIA WIDÉN OCH HILDE NYBOM

Groblad (*Plantago major*) har använts som medicinalväxt i många århundraden i stora delar av världen. 'Gro' är ett fornnordiskt ord för 'läka' och syftar på bladens välkända läkeförmåga. I Sverige brukade forna tiders kloka gummor bandagera sår med blad av groblad. Även senare tiders distriktssjuksköterskor använde sig ibland av denna beprövade metod. Man ansåg att såren läkte både fortare och bättre om de behandlades med groblad.

Ny forskning på SLU-Balsgård visar att både kloka gummor och distriktssjuksköterskor gjorde alldeles rätt. Groblad innehåller nämligen ett stort antal biologiskt aktiva substanser av betydelse för sår läkning, och dessa positiva effekter har nu påvisats i försök med odlade celler av människa och med inducerade sår i öronen från nyslaktade grisar!

Grobladsprojektet startar

En grupp forskare på Balsgård-SLU (växtförädling, odling och biokemi) och Kristianstad högskola (sår läkning) formulerade en projektidé 2005. Målsättningen var att utveckla ett ekologiskt odlingskoncept för groblad, och att selektera fram ett växtmaterial med hög halt av bioaktiva substanser. Detta växtmaterial skulle sedan kunna användas för att framställa ett växtextrakt med god sår läkande förmåga. Till gruppen sällade sig även en stipendiat från Pakistan, Muhammad Zubair, som utförde sitt doktorandarbete på Balsgård där han arbetade med just grobladsprojektet. Den 20:e april 2012 disputerar han på avhandlingen 'Genetic variation, biochemical contents



Figur 1. Groblad med upprättväxande blad. (Foto: Kimmo Rumpunen)

and wound healing activity of *Plantago major*' (<http://pub.epsilon.slu.se/8685/>).

Växtmaterialet

Groblad är mest känt som ett ganska intetsägande men oerhört vanligt ogräs (Fig. 1). Frön av denna art samlades in från ett antal olika lokaler i Sverige. Fröna såddes, och de resulterande fröplantorna odlades i växthus på Balsgård-SLU. Vi såg snabbt att det finns två tydligt urskiljbara former, där den ena har betydligt mer upprätt växande blad än den andra. Dessa plantor har fler blad och mer biomassa. Båda typerna växer dock snabbt, och börjar blomma redan ett par månader efter att de grott. I flera fall isolerade vi enstaka plantor, så att de skulle kunna bilda frö endast genom självbefruktning. När sådana

frön gror, får man ett enhetligt växtmaterial som lämpar sig väl till olika analyser.

I en framtida yrkesproduktion av groblad för medicinsk användning, bör man fokusera på odlingsmetoder som kan ge högkvalitativ råvara och som inte kräver insatser av kemiska växtskyddsmedel (Fig. 2). Vi utvecklade därför ett koncept för ekologisk odling i växthus (Rosenhauer 2007). Olika metoder för tillsättning av växtnäring provades och mängden skördad biomassa mättes. Det visade sig att fenolhalten i bladen sjönk något vid högre gödningsgivor men inte mer än att denna negativa effekt mer än väl uppvägdes av bättre tillväxt och därmed större plantor att skörda (Fig. 3).



Figur 2. Groblad kan odlas ekologiskt i växthus för att få en kontinuerlig produktion och hög kvalitet på råvaran. (Foto: Kimmo Rumpunen)



Figur 3. Groblad kan odlas vid låga kvävenivåer och ändå producera rikligt med biomassa. (Foto: Kimmo Rumpunen)

Genetisk variation

Groblad är en art som i huvudsak förökar sig genom självbefruktnings i naturen. Vi använde DNA markörer (RAPD, random amplified polymorphic DNA) för att undersöka hur mycket genetisk variation det finns mellan plantor på olika växtlokaler, och mellan plantor från olika moderplantor på samma växtlokal (Fig. 4). Precis

som man kunde förmoda, visade det sig att plantor som härstammade från samma växtlokal hade näst intill identiska DNA-profiler medan plantor från olika lokaler skiljde sig tydligt åt (Zubair m.fl. 2012a). Detta innebär att det kommer att bli lätt att föröka ett enhetligt, sortäktat material av groblad i en framtida yrkesproduktion.

Sår och sårhäkning

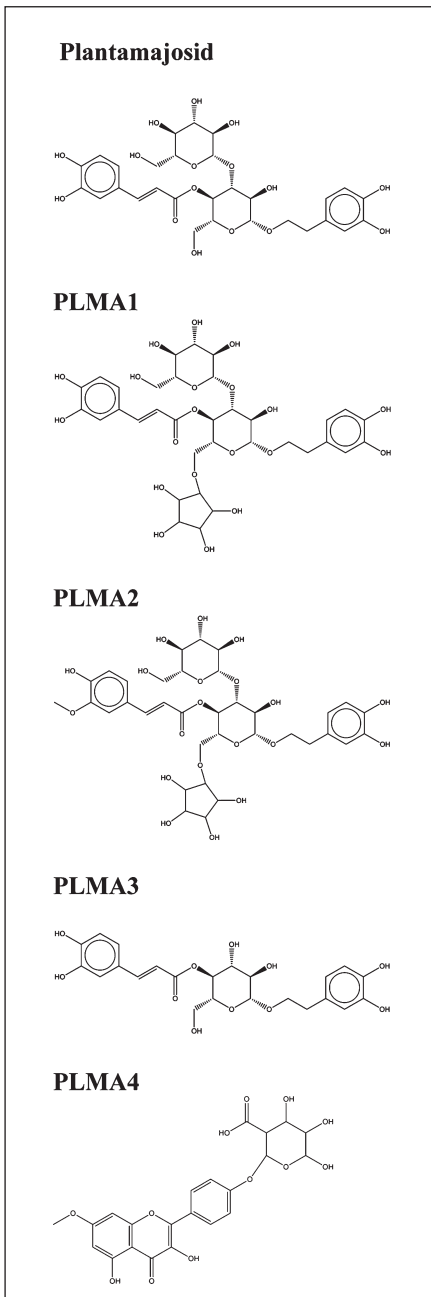
Svårhäkta och smärtsamma sår, t ex bensår, trycksår och fotsår hos diabetiker, utgör ett av sjukvårdens mest tidskrävande och kostnadsdrivande problemområden (Lindholm m.fl. 2005). Dessa sår har också orsakat negativa konsekvenser för de drabbade patienterna; vissa sår är mycket smärtsamma, och kan ta 10 år eller längre för att läka! Det finns idag mer än 200 olika sårforband på den svenska marknaden (Grauers och Lindholm 2011). På senare tid har sårforband med olika biologiskt aktiva substanser ökat mycket i betydelse. Groblad, odlade och skördade enligt väl utprovad metodik, skulle kunna användas för att utveckla ett bioaktivt sårforband.

Kemiskt innehåll

Modern forskning runt om i världen har visat att groblad innehåller ett stort antal biokemiska substanser som kan ha betydelse för sårhäkning, till exempel polysackarider, lipider, kaffeinsyradderivat, flavonoider, iridoida glykosider och terpenoider. Vi valde att undersöka olika fenolämnen eftersom studier på andra växter har visat att just fenolämnen kan ha effekt mot både inflammationer och diverse mikroorganismer.

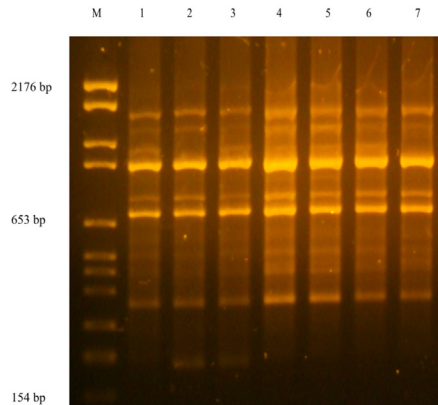
Eftersom olika fenolämnen troligen skiljer sig åt i biokemisk aktivitet, använde vi HPLC (vätskekromatografi) för att identifiera och kvantifiera innehållet av de vanligast förekommande fenolämnena i blad av olika ålder, samt i blomställningar och frön (Zubair m.fl. 2011). Två ämnen hade redan hittats i groblad: plantamajosid och verbascosid. I våra analyser kunde ytterligare fyra ämnen identifieras för första gången (Zubair m.fl. 2012a). Dessa ämnen har nu fått beteckningarna PLMA1 till PLMA4 (Fig. 5).

Vi har även undersökt olika metoder att torka växtens blad, och sedan har innehållet av de olika fenolämnena kvantifierats. Frystorkning gav det

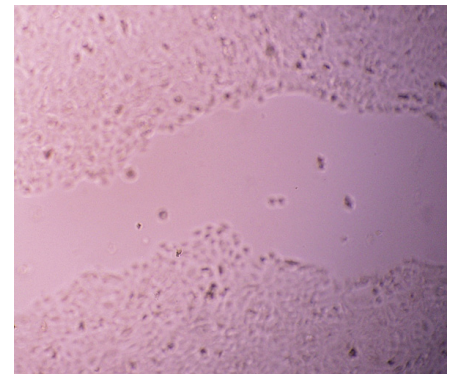


Figur 5. Plantamajosid samt de fyra tidigare okända polyfenolerna (PLMA1–PLMA4) som identifierats i groblad.

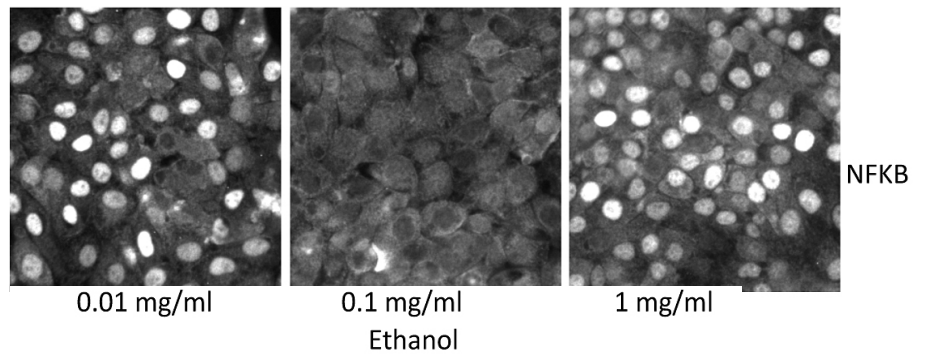
bästa utbytet men en betydligt billigare metod, torkning i 30 °C med vanlig varmluftsugn, gav också ett acceptabelt resultat där innehållet av olika fenoler bevarades i hög utsträckning.



Figur 4. Exempel på DNA-profiler hos groblad framtagna med hjälp av RAPD-markörer. M är en storleksmarkör medan 1–7 är sju identiska plantor (Foto: Muhammad Zubair)



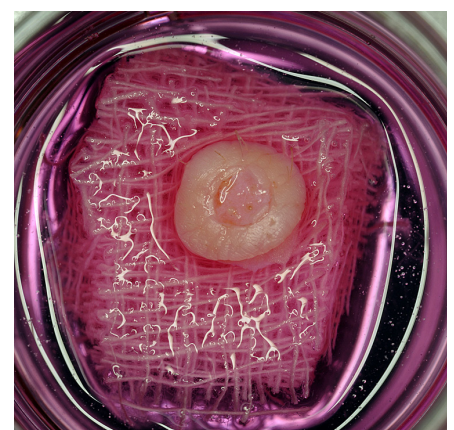
Figur 6. Grobladsextraktets påverkan på celltillväxt ('scratch-assay') testades på munepitelceller som odlades i petriskålar. I detta test gav extraktet 1.0 mg/mL bäst resultat. (Foto: Muhammad Zubair)



Figur 7. Test av antiinflammatoriska egenskaper ('NF-kB-assay') av grobladsextrakt på munepitelceller. I detta test gav 0.1 mg/mL av etanolextraktet bäst resultat. (Foto: Muhammad Zubair)

Försök med odlade celler

Sår läkningsprocessen består av flera olika stadier, vilka i sin tur kan påverkas på olika sätt av tillsatta ämnen. När man behöver jämföra effekten av att tillsätta olika ämnen, använder man helst så kostnadseffektiva metoder som möjligt, och då blir det ofta in vitro-baserade metoder med odlade celler. Vi använde två olika test som båda baserades på ett tunnt skikt av humana munepitelceller. I en 'scratch assay' gjordes en tunn skära i cellskiktet (Fig. 6). Ett grobladsextrakt tillsattes, och sedan dokumenterades man med en kamera hur snabbt skåran drog ihop sig under en 24-timmarsperiod.



Figur 8. Vådnadsbiopsier av grisören som användes för test av sår läkning med grobladsextrakt. I detta test gav extraktet 1.0 mg/mL bäst resultat. (Foto: Johanna Brandner)

I en 'NF- κ B-assay' testades istället den antiinflammatoriska effekten med hjälp av lipopolysackarider (bakterietoxin som kan framkalla inflammation) på samma munepitelceller (Fig. 7). I 'scratch assay'-testen visade det sig att den bästa effekten uppnåddes med grobladsextrakt som hade en koncentration av 1.0 mg/mL torkat bladmaterial medan 'NF- κ B-assay'-testen visade att 0.1 mg/mL gav bäst resultat (Zubair m.fl. 2012c, Zubair m.fl. under tryckning).

Försök med grisöron

För så komplicerade processer som sårsläkning, kan cellodlingar aldrig helt ersätta tillgången till mera komplext uppbyggd vävnad. Nyligen patenterade en forskargrupp i Hamburg ett test som baseras på öronen av nyligen slaktade grisar (Brandner m.fl. 2008). Av dessa öron görs ett antal små vävnadsbiopsier, och i varje biopsi görs ett sår som sedan behandlas med ett potentiellt sårsläkningsextrakt (Fig. 8). Vi har i samarbete med denna forskargrupp fått tillgång till metoden, och tre testomgångar har utförts med extrakten från Balsgård. Bäst resultat gav etanolbaserade extrakt med en koncentration av 1.0 mg/mL torkat bladmaterial (Zubair m.fl. 2012b).

Framtidsutsikter

Det slutliga målet för vår forskning är att vi ska kunna ta fram ett bra växtmaterial och ett kostnadseffektivt odlingskoncept för groblad, som så småningom kan användas för att

framställa ett bioaktivt sårforband. En förutsättning är dock att vi kan utöka våra studier av de olika bioaktiva ämnena i denna växt, och deras olika roller inom sårsläkning. Med denna kunskap kan man sedan optimera såväl växtmaterial som hanteringen av det skördade materialet.

Referenser

- Brandner JM, Zacheja S, Houdek P, Moll I, Lobmann R (2008) Expression of matrix metalloproteinases, cytokines, and connexins in diabetic and nondiabetic human keratinocytes before and after transplantation into an ex vivo wound-healing model. *Diabetes Care* 31: 114–120.
- Grauers M, Lindholm C (2011) Sårbehandling. Gothia.
- Lindholm C, Andersson H, Fossum B, Jörbeck H (2005). Wounds scrutiny in a Swedish hospital: prevalence, nursing care and bacteriology, including MRSA. *J. Wound Care* 14: 313–319.
- Rosenhauer M (2007) Analysis of genetic variation, biomass production and phenols in *Plantago major*. 10 p, enskild kurs, SLU.
- Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Rumpunen K (2011) Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Sci. Horticult.* 128: 523–529.
- Zubair M, Nybom H, Ahnlund M, Rumpunen K (2012a) Detection

of genetic and phytochemical differences between and within populations of *Plantago major* L. (plantain). *Sci. Horticult.* 136: 9–16.

- Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Brandner JM, Rumpunen K (2012b) Promotion of wound healing by *Plantago major* L. leaf extracts – ex vivo experiments confirm experiences from traditional medicine. I: Zubair M 'Genetic Variation, Biochemical Contents and Wound Healing Activity of *Plantago major*'. Doktorsavhandling, SLU, 2012:20.
- Zubair M, Widén C, Renvert S, Rumpunen K (2012c) Anti-inflammatory activity of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells. I: Zubair M 'Genetic Variation, Biochemical Contents and Wound Healing Activity of *Plantago major*'. Doktorsavhandling, SLU, 2012:20.
- Zubair M, Ekholm A, Nybom H, Renvert S, Widén C, Rumpunen K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *J. Ethnopharmacology*, under tryckning.



Muhammad Zubair (Foto: Pia Houdek)

Faktabladet är utarbetat inom
LTJ-fakultetens område för Växtförädling och bioteknik, Balsgård
www.slu.se/balsgard

Projektet är finansierat av Ekhagastiftelsen (www.ekhagastiftelsen.se), SLU Omvärld (www.ltj.slu.se/omvarld) och stipendiemedel från Higher Education Commission of Pakistan (www.hec.gov.pk).

Projektansvarig Hilde Nybom, hilde.nybom@slu.se

<http://epsilon.slu.se>