

Istraživanja ljekovitih i toksičnih biološki aktivnih tvari prirodnog podrijetla u radovima članova Kolegija farmaceutskih znanosti Akademije medicinskih znanosti Hrvatske

Stjepan Pepeljnjak

Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, Hrvatska

Opisan je pregled istraživanja iz znanstvenih područja članova Kolegija farmaceutskih znanosti AMZH-a o ljekovitim biološki aktivnim tvarima ljekovitog bilja, te o toksičnim sekundarnim metabolitima plijesni. Prikazan je spektar antimikrobnosti začinskog bilja i fungicidnosti aromatičnog bilja Hrvatske, te terapijski učinak eteričnog ulja biljke *Pelargonium radula* kao i imunomodulirajuće i antitumorsko djelovanje biljke podlanice *Caucalis platycarpos* L.

Od toksičnih metabolita plijesni, osvrst ukazuje na nalaz i rizike kroničnih otrovanja ljudi i životinja karcinogenim aflatoksinima, kao i doprinos mikotoksinskoj teoriji o utjecaju okratoksina A kao etiološkog čimbenika endemske nefropatije i imunosupresivnosti fumonizina B1. Ujedno je ukazano na 30-godišnji monitoring estrogenih mikotoksina i trihotecena kao i njihovih producenata u žitaricama i hrani u Hrvatskoj.

Spomenuta su istraživanja o utjecaju spora plijesni na razvoj preosjetljivosti, alergije i aspergiloze pluća u ljudi. Istaknut je i nalaz nove vrste plijesni, imenovane *Aspergillus pepii* (Pepeljnjakov aspergil) koja je uvrštena u mikološku taksonomiju kao producent sterigmatocistina.

Ključne riječi: ljekovito bilje; eterična ulja; antimikrobnost; fungicidnost; plijesni; mikotoksini

Adresa za dopisivanje: Stjepan Pepeljnjak
Resnik 1
10 040 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: spep33@yahoo.com

Uvod

Brojna znanstvena istraživanja nedvojbeno su dokazala vrijednost ljekovitog bilja koje se već nekoliko tisućljeća koristi u pučkoj medicini. Veliki broj njih i danas su u uporabi, naročito u prevenciji i liječenju čitavog niza bolesti kao što su diareja, astma, urinarne infekcije, septikemija, tifusna groznica, osteomijelitis, gastroenteritis, apscesi kostiju i kralježnice, otrovanja hranom, kožne bolesti, Reiterov sindrom, bolesti zubnog tkiva i sprječavanje brojnih bakterijskih infekcija. Laboratorijsko ispitivanje medicinske vrijednosti ljekovitog bilja započelo je već 1926. godine, a danas je to glavni putokaz

za otkrivanje korisnih ljekovitih supstancija (1).

Tako su dokazana kemoprotektivna svojstva aromatičnog bilja, njihovo spazmolitičko, antiseptičko, a napose antibiotsko djelovanje, otvorila iznimno široko područje znanstvenih istraživanja u dokazivanju i izdvajanju korisnih molekula u formulaciji novih lijekova i znanstveni pristup u fitoterapiji.

Korisne biološki aktivne tvari prirodnog podrijetla

U razdoblju prvih otkrivanja fenomena laboratorijskog dokazivanja antibioza fokusirana je pozornost znanstvenika na

mikrobne vrste po uzoru na pionirske radove Pasteura i Jouberta 1877. godine dokazivanjem fenomena kako vrsta *Bacillus anthracis* sprječava rast drugih mikroba. Slijedom ove ideje Emmerick i Low 1889. godine dokazuju da i vrsta *Pseudomonas aeruginosa* enzimskim djelovanjem (piocijanaza) ima dobra antimikrobna svojstva.

Naročiti interes za sekundarne metabolite plijesni pokrenuo je Alexandar Fleming 1928. godine (Nobelova nagrada 1945.), koji je slučajnim otkrićem djelovanja plijesni *Penicillium notatum* na kolonije gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* omogućio istraživačima Chainu, Floreyu i drugima (1938.-1940.) izolaciju široko primjenjivanog antibiotika penicilina. Osim ovog značajnog iskoraka u liječenju različitih zaraznih bolesti, motivirani su brojni kemičari, biokemičari i mikrobiolozi da u različitim vrstama mikroba, bilju i njihovim produktima traže potencijalno korisne supstancije od kojih je veliki broj i danas u uporabi u lijekovima i biljnim pripravcima (2).

U ovom području otvara se mogućnost daljnjeg širenja formulacije novih lijekova, posebice antibiotika, zbog globalne alarmantne neučinkovitosti postojećih i razvoja sve veće multiple rezistencije mikroba. Zbog toga je do danas otkriveno više tisuća prirodnih, ali i sintetskih tvari s antimikrobnim djelovanjem. Razvidno je da nalaz antimikrobnih tvari u prirodi nije novost. Ova činjenica omogućuje i prirodnu selekciju otpornih vrsta mikroba na prirodno-aktivne tvari što je posljedica tisućljetnog međusobnog susretanja u prirodi.

No, ono što sve više obezvrjeđuje postojeće antibiotike je način njihove nekritične primjene u humanoj i veterinarskoj medicini, ali i u nedopuštenoj primjeni antibiotika kao probiotika u intenzivnoj animalnoj proizvodnji ili kao konzervansa.

Profil naših istraživanja biološki aktivnih tvari iz ljekovitog bilja

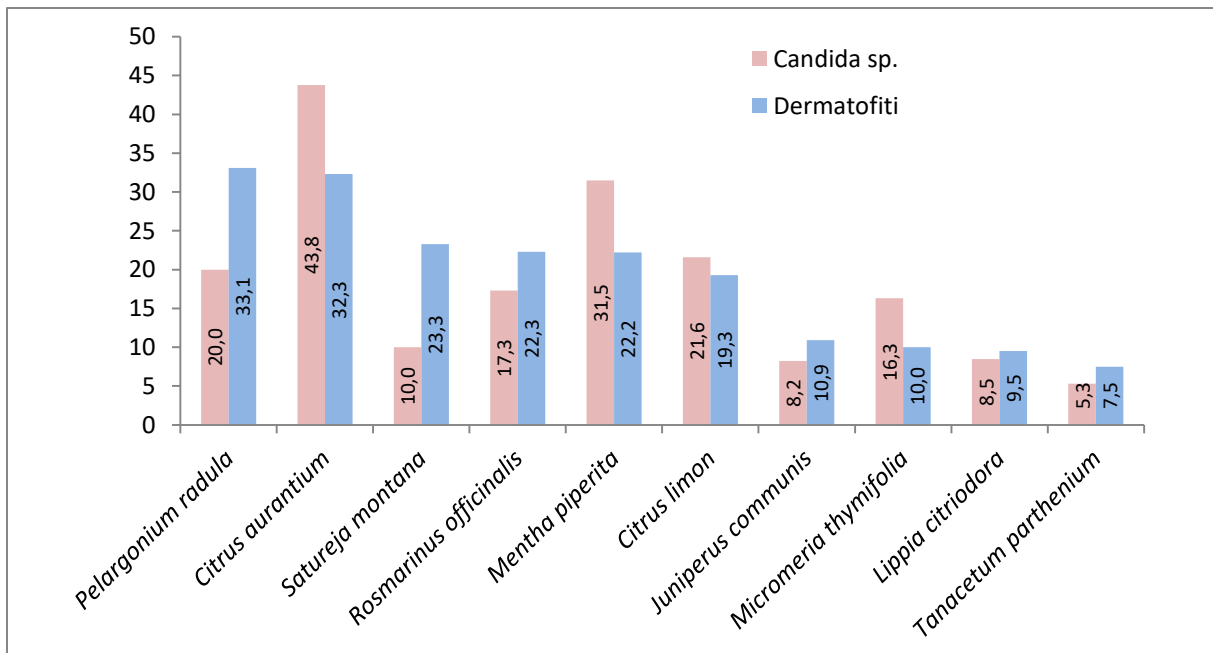
U proteklih četiri desetljeća na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu realizirana su brojna istraživanja odabranog aromatičnog domaćeg bilja višestrukim dokazivanjem strukture, sastava, antimikrobnog, antifungalnog te drugih farmakoloških učinaka biljnih, mikrobnih i sintetskih tvari (preko 400 radova i 3000 citata).

Korištenjem novih biokemijskih metoda (HPLC, GLC, TLC, GS-MS i dr.) dokazane su brojne kemijske tvari i njihovi aktivni principi koji odlikuju kvalitetu i učinkovitost ljekovitog bilja Hrvatske. Primjer testova fungicidnosti odabranog aromatičnog bilja prikazan je na sl. 1.

Dokazano je da genetska svojstva vrste i pedološko mikroklimatski uvjeti odgovarajućeg staništa biljke određuju količinu i strukturu molekule aktivnih supstancija (ugljikohidrati, masti, proteini, nukleinske kiseline, enzimi, vitamini).

Brojnim istraživanjima dokazano je da osnovu ljekovitosti neke biljke općenito, a posebice njihove antimikrobne učinkovitosti, određuju kemijska struktura glikozida, flavonoida, saponina, tanina te eteričnih ulja, uključujući njihove brojne sastavnice (terpeni, geraniol, terpenoidi, timol, karvakrol, fenolpropani, eugenol, cimaldehid, vanilin, ketoni, alicin, izotiocijanati i drugi). Na temelju zapisa o hrvatskoj tradicionalnoj medicini (ljekaruše), pokusima na životinjskim modelima dokazano je antitumorsko djelovanje ekstrakta iz biljne vrste podlanica (*Caucalis platycarpos* L.). Rezultati upućuju da je antitumorski učinak vjerojatno posljedica stimulacije imunološkog sustava domaćina tumora (4).

Učinkovitost antifungalnog djelovanja eteričnog ulja vrste *Pelargonium radula* dokazana je *in vitro*, a zatim je terapijski učinak potvrđen i *in vivo*. Ishod terapije dermatofitije u mačaka prikazan je na sl. 1, 2 i 3.



Sl. 1. Komparativni prikaz fungicidnosti eteričnih ulja odabranog aromatičnog bilja Hrvatske na *Candida* vrste i dermatofite (srednje vrijednosti zone inhibicije rasta mikroba u milimetrima) (3)

Vidljivo je da brojne vrste domaćeg bilja koje se koriste kao začini, imaju izvrsna antimikrobna djelovanja pa su time u svakodnevnoj funkciji očuvanja hrane od kvarenja, ali i očuvanja našeg zdravlja (tablica 1). Ispitano bilje ima relativno širok spektar mikrobicidnosti na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, kao i fungicidnosti na gljivice iz roda *Candida* i plijesni. Očito je da brojne biljke sadrže korisne biološki aktivne tvari na kojima se temelji nekadašnja i današnja fitoterapija.



Sl. 2. 18 dana nakon početka terapije



Sl. 1. Prije početka terapije



Sl. 3. 30 dana nakon početka terapije

Tablica 2. Antimikrobno i antifungalno djelovanje eteričnog ulja (vol %) domaćeg začinskog bilja

Začinska biljka	Glavna sastavnica eteričnog ulja (vol %)	MIK/bakterije		MIK/gljivice *	MIK/plijesni*
		gram-pozitivne*	gram-negativne*		
Komorač	anetol 68–95 % limonen 30–55 %	0,25–1,0 %	0,4–2,6 %	0,25 mg/mL = 0,025 %	0,25 mg/mL = 0,025 %
Lovor	1,8-cineol 30–50 %	5 mg/mL =0,5 %	5 mg/mL = 0,5 %	5 mg/mL = 0,5 %	5–22 mg/mL = 0,5–2,2 %
Ružmarin	cineol 3-89 % kamfor 2-14 % borneol 5-20 %	0,39–12,5 %	0,39–1,56 %	0,09–3,12 %	
Kadulja	tujon 40-60 % cineol 15 % kamfor 10 %	0,05–2,0 %	1,0–6,25 %	0,05–6,25 %	
Lavanda	linalil acetat 30-60 linalool 25-45 %	1,25–6,25 %	0,39–3,125 %	3,12–25 %	
Matičnjak	citral 30 % citronelal 40 %	1,56 %	3,125 %	0,19–2 %	
Bosiljak	linalool 40-50 % eugenol 1-19 % metil kavilkol 3-31 %				0,35–33 %
Ljuta paprika	kapsaicin 80-90 %	0,6– 5 µg/mL = 0,00006– 0,0005 %	2,5–5 µg/mL = 0,00025– 0,0005 %		
Cimet (referentni začini)	cimetni aldehyd 65-75 % trans-cimetna kiselina 5-10 %	0,2 mg/mL =0,02 %	0,2 mg/mL =0,02 %	1,6 /mL =0,16 %	0,6–150 mg/mL =0,06-15 %

*Gram-pozitivne vrste: *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*

*Gram-negativne vrste: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*

*Gljivice: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*

*Plijesni: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium oxysporum*

Toksične biološki aktivne tvari prirodnog podrijetla

U biološki aktivne supstancije, kao što su one iz otrovnog bilja i životinja spadaju i sekundarni metaboliti plijesni, odnosno mikotoksini. Njih tvore brojne toksinogene vrste plijesni koje su ubikvitarno raširene u

prirodi. Oni imaju malu molekularnu masu (ispod 400) tako da ljudi i životinje ne tvore imunosni odgovor, pa su trajno nezaštićeni od otrovanja. No, velik broj vrsta korisni su fermentatori u prirodi i tvore antibiotike, enzime i vitamine. Na sreću, manji broj vrsta su producenti agresivnih mikotoksina koji izazivaju

akutna i kronična otrovanja. Neke vrste plijesni su infektivne i uzrokuju gljivične bolesti, odnosno mikoze, a izazivaju i preosjetljivosti, odnosno alergije u ljudi koje žive u vlažnim stanovima ili dulje vrijeme borave u prostorijama u kojima su spore plijesni, primjerice u prostorijama gdje se prerađuju i skladište žitarice, u drvenoj industriji i dr.

Među više stotina dokazanih i proučenih mikotoksina najznačajniji su mutageni i kancerogeni (aflatoksini, sterigmatocistin, patulin, fumonizin B1 i trihoteceni), estrogeni (zearalenon, zearalenol), citotoksini (trihoteceni A, B, C i D), nefrotoksini (okratoksin, fumonizin, citrinin) te skupina neurotoksina (patulin, fumonizin, stahibotriotoksin) (5).

Istraživanja na području mikotoksikologije, započeta sedamdesetih godina prošlog stoljeća, znatno su pridonijela u prosudbi uloge rezidua mikotoksina u hrani te u afirmaciji hipoteze o mikotoksikološkoj etiologiji endemske nefropatije u nas (6).

No, u razotkrivanju zdravstvenih šteta koje izazivaju mikotoksini danas uočavamo sve veću vezu između mikotoksina i različitih kroničnih bolesti nepoznate etiologije. Istraživanja u ovom području vrlo su propulzivna, pa postoje na tisuće toksikoloških i epidemioloških studija koje ukazuju na realnost ove hipoteze. Dokazano je da veći broj mikotoksina utječe na imunosni odgovor izazivajući imunosupresiju (aflatoksini, okratoksin A, fumonizini, trihoteceni), zatim kancerogene i mutagene procese (prostata, debelo crijevo, jetra, maternica, jajnici), bolesti krvožilnog i lokomotornog sustava (ateroskleroza, giht, multipla skleroza) te neplodnost. Smatra se da mikotoksini imaju određenu ulogu u razvoju Alzheimerove bolesti, endemske nefropatije, vaskulitisa, demencije i dr. (7).

Prema teoriji puknutog lanca (u konačnosti sve završava u čovjeku), naša rana istraživanja znatno su pridonijela poznavanju mikotoksikološkog rizika u

nas, kao i razumijevanju toksinopatogeneze pojedinih mikotoksina dokazujući njihov učinak u biološkim pokusima i na staničnim kulturama. Tridesetogodišnji monitoring nalaza mikotoksina i kontaminacije plijesnima u žitaricama, mesu i njihovim proizvodima na području endemske nefropatije i sjeverne Hrvatske nedvojbeno dokazuje visok stupanj toksinogene rizičnosti i utjecaja na zdravlje ljudi i životinja (8).

Mikološka kontaminacija hrane toksinogenim plijesnima neizbježna je, međutim, uočeno je da promjena klime povećava uvjete za rast i biosintezu mikotoksina, posebice aflatoksina, čiji je nalaz prije 30 godina bio neznan.

Battilani i sur. (9) upozoravaju da će se novi klimatski uvjeti odraziti na sigurnost, kvalitetu, trgovinu i ekonomiju kao posljedica stvaranja mikroklimatskih uvjeta pogodnih za širenje toksinogenih vrsta plijesni. Na globalnoj razini već je utvrđena povećana kontaminacija hrane mikotoksinima (aflatoksini, fumonizini, okratoksin i dr.).

Osim toga, dokazan je i nalaz tzv. maskiranih mikotoksina deoksinivalenola (DON) u njegovom modificiranom obliku DON-3-glukozid (DON-36) koji je učestaliji od nalaza DON-a i drugih trihotecena (T2, HT2) te estrogenog zearalenona (10).

Uz mikotoksinske opasnosti za zdravlje ljudi treba uzeti u obzir i spore plijesni koje izazivaju preosjetljivosti i alergije (11, 12.), pneumonije i aspergiloze pluća (13).

Njihove spore česti su kontaminanti vlažnih stanova (*bolesni stanovi*) (14). Među takvim je vrstama iz roda *Aspergillus* i novo otkrivena vrsta uvrštena u mikološku taksonomiju koja filogenetski pripada u sekciju *Versicolores*. Vrsta je dobila naziv u čast prof. dr. S. Pepeljnjaka *Aspergillus pepii* (Pepeljnjakov aspergil), producent kancerogenog mikotoksina sterigmatocistina, sličnog aflatoksinu (15). Prihvaćena je kao nova vrsta u mikološkim asocijacijama te uvrštena u *International*

Mycological Association – MycoBank pod brojem MB817073 i u *Centraal bureau voor Schimmelkultures* (CBS) pod brojem 142028 u Nizozemskoj na Prirodoslovnom Sveučilištu u Szegedu pod brojem SZMC23791 i mikoteci FBF-a pod šifrom MFBF AV 11051 B (16).

Umjesto zaključka

Kontinuirana istraživanja ljekovitih i toksičnih biološki aktivnih tvari prirodnog podrijetla nastavljaju se i danas u mikrobiološkim, farmakološkim, kemijskim i biokemijskim laboratorijima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te su nadalje znanstvene teme djelovanja članova Kolegija za farmaceutske znanosti Akademije medicinskih znanosti Hrvatske.

Literatura

1. Lai PK, Rov J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr Med Chem.* 2004; 47: 234-8.
2. Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kuštrak D. Natural antimycotics from Croatia plants. In: Rai M, Mares D (Eds). *Plant-derived antimycotics, current trends and future prospects.* New York, London, Oxford: The Haworth Press Inc. 2003, 49-79.
3. Pepeljnjak S. Pregled antifungalnog djelovanja eteričnih ulja bilja Hrvatske. U: *Zbornik radova, Znanstveni skup Zdravlje, kultura, priroda.* Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske 2009, 34-9.
4. Fatović-Ferenčić S, Kujundžić N, Pećina M. From the Traditional Recipe to the Modern Remedy: The Antitumoural activity of the small burr parsley (*Caucalis platycarpos*). *Exploring Traditional Medicine.* P.F. McGrath and P. Tout. IAP for Health. 2017; Section 4/18. p. 174-183.
5. Ožegović L, Pepeljnjak S. *Mikotoksikoze.* Zagreb: Školska knjiga, 1995.
6. Pepeljnjak S, Šegvić-Klarić M. „Suspects“ in etiology of endemic neprothopathy: aristolochic acid versus mycotoxins. *Toxins* 2010; 2: 1414-27.
7. Costantini AV, Wieland H, Qvick LI. *Rak dojke napokon nada.* Zagreb: Omega lan, biblioteka Novo zdravlje 2010.
8. Pepeljnjak S, Šegvić M. An overview of mycotoxins and toxigenic fungi in Croatia. U: *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe.* Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 2004, 33-50.
9. Battilani P, Stroka J, Magan N. Foreword: Mycotoxins in a changing world. *World mycotoxin J.* 2016; 9: 647-51.
10. Pierron A, Mimoun S, Murate LS i sur. Intestinal toxicity of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-β-D-glucoside. *Arch Toxicol.* 2016; 90: 2037-46.
11. Šegvić-Klarić M, Varnoi VM, Ljubičić-Čalušić ALj, Macan J. Occupational exposure to airborne fungi in two Croatian sawmills and atopy in exposed workers. *Ann Agricult Environment Med* 2012; 2: 213-19.
12. Eduard W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rew Toxicol* 2009; 39: 799-864.
13. Pepeljnjak S, Slobodnjak Z, Šegvić M, Peraica M, Pavlović M. The ability of fungal isolates from human lung aspergiloma to produce mycotoxins. *Human Experiment Toxicol.* 2004; 23: 15-19.
14. Cvetnić Z, Pepeljnjak S. Indoor airborne moulds. *Periodicum biologorum.* 2001; 103: 55-9.
15. Jakšić-Despot D, Kocsube S, Bencsik O i sur. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycological Progress* 2016; 16: 63-72.
16. Šegvić-Klarić M. Ponos FBF-a – otkriće *Aspergillus pepii*, novoopisane vrste plijesni iz roda *Aspergillus*. *Farmaceutski glasnik.* 2017; 73: 729-731.

Summary

Research on medicinal and toxic bioactive substances of native origin in scientific papers of the Pharmaceutical Sciences College members

Stjepan Pepeljnjak

Croatian Academy of Medical Sciences, Zagreb, Croatia

An overview of the researches from the scientific areas of Collegium of pharmaceutical sciences members on medicinal biologically active herbal medicinal products and on toxic secondary metabolites of moulds is described. The spectrum of antimicrobial activity of herbs (spices) and fungicides of Croatian aromatic herbs, as well as the therapeutic effect of *Pelargonium radula* essential oil and immunomodulatory and antitumor activity of plant *Caucalis platycarpos* L. is presented.

From the toxic mould metabolites, the review points to the findings and risks of chronic poisoning of humans and animals with carcinogenic aflatoxins, as well as the contribution to mycotoxin theory of the effect of ochratoxin A as an etiological factor of endemic nephropathy and immunosuppressiveness of fumonisins B1. It is also pointed out on 30-year monitoring of estrogenic mycotoxins and trichothecenes as well as their producers in cereals and food in Croatia.

Researches on the influence of mould spores on the development of hypersensitivity, allergies and lung aspergillosis in humans has been mentioned. A new species of mould has been accentuate, named *Aspergillus pepii* (Pepeljnjak's aspergil), which was included in the mycological taxonomy as a producer of sterigmatocystin.

Keywords: medicinal plants; essential oils; antimicrobial; fungicidal; moulds; mycotoxins