

Odabrane biljne droge tradicionalne kineske medicine u prevenciji i liječenju Alzheimerove bolesti

Milić, Celija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:266410>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Celija Milić

**Odabrane biljne droge tradicionalne kineske
medicine u prevenciji i liječenju Alzheimerove
bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za Farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

Srdačno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Sandi Vladimir - Knežević na pruženoj pomoći i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

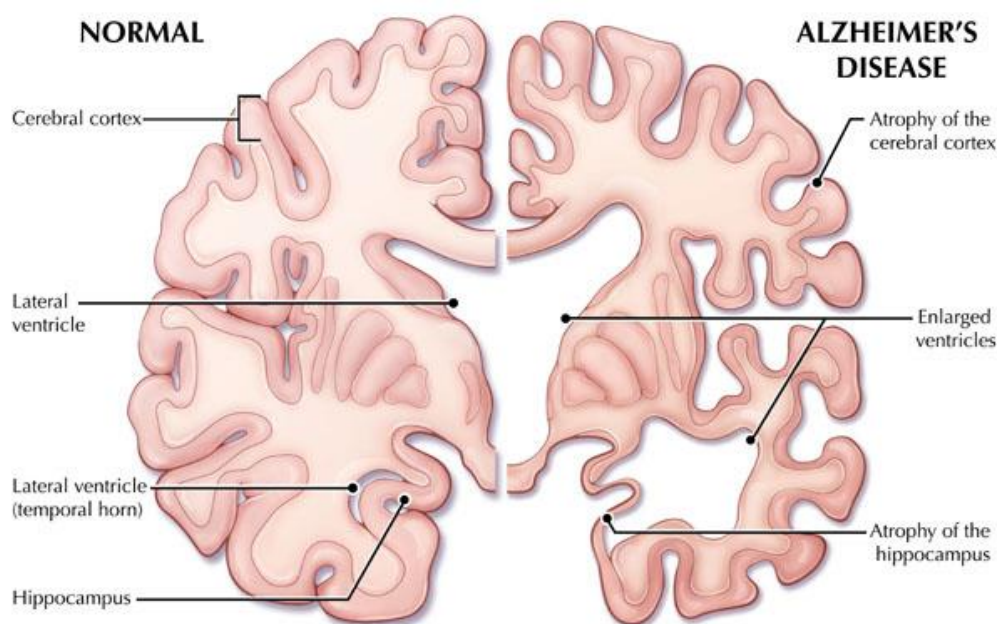
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerova bolest.....	2
1.1.1. Epidemiologija Alzheimerove bolesti	2
1.1.2. Klinička slika Alzheimerove bolesti.....	3
1.1.3. Patogeneza Alzheimerove bolesti.....	3
1.2. Genetika i Alzheimerova bolest	5
1.3. Liječenje Alzheimerove bolesti	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE	9
4. REZULTATI I RASPRAVA	11
4.1. Ginseng radix - ginsengov korijen.....	12
4.1.1. Klinički dokazi o djelovanju ginsengova korijena kod Alzheimerove bolesti	15
4.1.2. Djelovanje ginsengova korijena na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji	18
4.2. Ginkgo folium – ginkov list.....	20
4.2.1. Klinički dokazi o djelovanju ginkova lista kod Alzheimerove bolesti	22
4.2.2. Učinak ginkova lista na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji.....	28
4.3. KINESKA HUPERZIJA	30
4.3.1. Klinički dokazi o djelovanju huperizina A kod Alzheimerove bolesti	33
4.3.2. Djelovanje Huperzina A na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji.....	37
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	43
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	50
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	52

1. UVOD

1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je kronična progresivna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava, a očituje se gubitkom živčanih stanica u moždanoj kori s posljedičnom atrofijom mozga i progresivnom demencijom (slika 1) (Damjanov i sur., 2014).



SLIKA 1. Prikaz atrofije mozga u Alzheimerovoj bolesti

(<http://www.sciencesource.com/>)

1.1.1. Epidemiologija Alzheimerove bolesti

Incidencija i prevalencija Alzheimerove bolesti rastu starenjem. U dobi od 65 godina prevalencija prosječno iznosi 12%, a sa svakih idućih pet godina života dolazi do udvostručenja tog postotka. Rizičan čimbenik za razvoj bolesti jest i pozitivna obiteljska anamneza, što upućuje na genetički uzrok oboljenja. Bolest se češće javlja u žena, a povišene vrijednosti krvnog tlaka, kolesterola i glukoze u krvi, postmenopauzalno uzimanje estrogena/progesterona, moždani udar, traume glave te razni čimbenici iz okoliša (aluminij, živa, virusi) kao i nedovoljna fizička aktivnost također su potencijalni čimbenici rizika razvoja bolesti (Brinar i sur., 2009; Demarin i Tkanjec, 2008).

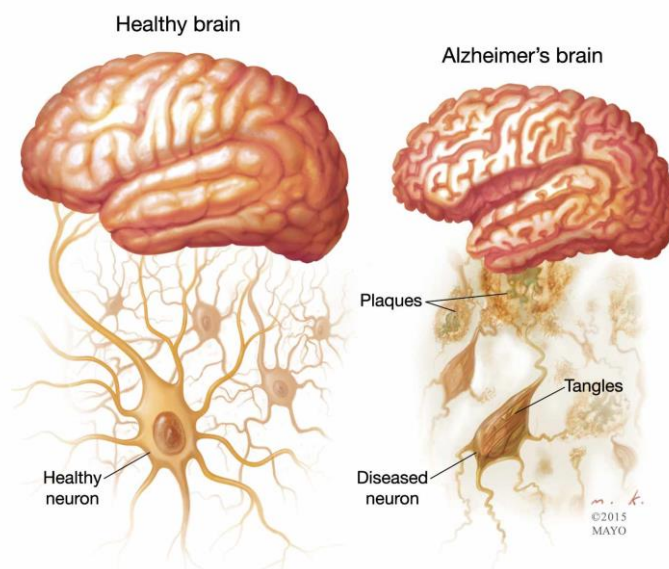
1.1.2. Klinička slika Alzheimerove bolesti

Bolest najčešće započinje blagim gubitkom pamćenja te postupno prelazi u potpunu demenciju. Razvojem bolesti dolazi do gubitka orijentacije u vremenu i prostoru, poremećaja govora i praksije te razvoja deluzije. U kasnijim fazama dolazi do potpunog gubitka socijalnog kontakta, gubitka prosuđivanja i razumijevanja, pojave halucinacija i paranoje, inkontinencije i nepokretnosti. Pacijenti tada zahtijevaju cjelodnevni nadzor te pomoć i kod najjednostavnijih radnji poput oblačenja i hranjenja.

Životni vijek pacijenata je 5-10 godina nakon postavljanja dijagnoze. Smrt nastupa zbog malnutricije, sekundarnih infekcija, plućne embolije ili srčane bolesti (Damjanov i sur., 2014; Gamulin i sur., 2011; Brinar i sur., 2009).

1.1.3. Patogeneza Alzheimerove bolesti

Značajnu ulogu u patogenezi Alzheimerove bolesti imaju tri patološka procesa: amiloidni plakovi (slika 2), inkluzije fosforiliranog tau-proteina te propadanje kolinergičkih neurona i acetilkolin-transferaze. U početnoj fazi bolesti, patološke promjene lokalizirane su u hipokampusu, a u kasnijim fazama pojavljuju se i u ostalim dijelovima kore mozga (Brinar i sur., 2009; Demarin i Tkanjec, 2008).



SLIKA 2. Amiloidni plak i neurofibrilarni čvorovi
(<http://seniorsure.com/>)

Amiloidni plak

U zdravih pojedinaca, topljivi β -amilod nastaje razgradnjom transmembranskog amiloidog prekursorskog proteina (APP) djelovanjem α -sekretaze nakon čega djeluje γ -sekretaza te se nastali netoksični β -amilod ($A\beta_{39}$ peptid) normalno odstranjuje iz mozga. Kod pojedinaca oboljelih od Alzheimerove bolesti, dolazi do razgradnje APP-a pomoću β -sekretaze, a zatim γ -sekretaze, čime dolazi do stvaranja toksičnog i netopljivog oblika β -amiloida ($A\beta_{42}$ peptid) koji tvori izvastanični amiloidni plak.

β -amiloid može se nakupljati i u moždanim arteriolama što uzrokuje amiloidnu angiopatiju, a može dovesti i do razvoja ateroskleroze te češćih intracerebralnih krvarenja. Agregacija abnormalnog β -amiloida dovodi do hiperfosforilacije normalnog tau-proteina, indukcije oksidativnog stresa, upalnih promjena, prekida transmisije i razvoja demencije (Brinar i sur., 2009; Demarin i Tkanjec, 2008).

Inkluzije fosforiliranog tau-proteina

Nakupine fibrilarnog hiperfosforiliranog tau-proteina u neuronima tvore neurofibrilarne čvorove. Pretpostavlja se da tau-protein stabilizira mikrotubule koji povezuju stanične organele i omogućuju intracelularni prijenos tvari. Pretpostavka je također i da do hiperfosforilacije dolazi jer poremećaji β -amiloida dovode do povećanog ulaska kalcija u stanicu. Ukoliko dođe do hiperfosforilacije, onemogućeno je vezanje tau-proteina za mikrotubule čime dolazi do njegovog nakupljanja u citoplazmi te nastanka neurofibrilarnih čvorova (Damjanov i sur., 2014; Brinar i sur., 2009; Demarin i Tkanjec, 2008).

Propadanje kolinergičkih neurona

Za propadanje kolinergičkih neurona, smanjenu razinu acetilkolina i acetilkolin-transferaze (acetilkolin-sintetizirajućeg enzima) u hipokampusu i ostalim dijelovima moždane kore najvjerojatnije je odgovorna degeneracija kolinergičkih neurona Meynertove bazalne jezgre kao glavnog izvora kolinergičke inervacije mozga (Brinar i sur., 2009).

1.2. Genetika i Alzheimerova bolest

Uzrok Alzheimerove bolesti još uvijek nije poznat. Smatra se kako do razvoja bolesti dolazi kompleksnom genskom interakcijom s okolišnim čimbenicima. U oko 5% bolesnika bolest je obiteljska i nasljeđuje se autosomalno dominantno, a prvi simptomi najčešće se javljaju i prije 60. godine života. Ovakav oblik bolesti uzrokovan je različitim genetskim mutacijama, a do danas su utvrđena tri gena čije mutacije dovode do razvoja bolesti: gen za amiloidni prekursorski protein, PSEN1 i PSEN2 (kodiraju za presenilin 1 i presenilin 2; proteine uključene u razgradnju amiloidnog prekursorskog proteina).

Geni PSEN1 i PSEN2 kodiraju za proteine presenilin 1 i presenilin 2 koji predstavljaju podjedinicu γ -sekretaza kompleksa te sudjeluju u posljednjim koracima razgradnje APP-a. U Alzheimerovoj bolesti geni kodiraju mutirane proteine presenilin 1 i 2 što dovodi do stvaranja toksičnog i netopljivog oblika β -amiloida.

Smatra se kako povećan rizik za razvoj Alzheimerove bolesti imaju osobe s mutacijom gena za apolipoprotein E4 (APOE 4; sudjeluje u klirensu β -amiloida) te osobe s trisomijom 21 (Downov sindrom) ukoliko prežive 40. godinu života (Brinar i sur., 2009; Demarin i Tkanjec, 2008).

1.3. Liječenje Alzheimerove bolesti

U liječenju Alzheimerove bolesti koriste se inhibitori acetilkolinesteraze i antagonisti NMDA-receptora koji usporavaju napredak bolesti u razdoblju od oko 6 do 12 mjeseci (Li i sur., 2008).

Temelj korištenja inhibitora acetilkolinesterze u liječenju ove bolesti jest pretpostavka da sprječavanjem razgradnje acetilkolina dolazi do povećane kolinergičke transmisije (Brinar i sur., 2009). Prvi lijek za kojeg je dokazan benefit u bolesnika s Alzheimerovom bolesti jest dugodjelujući inhibitor acetilkolinesteraze takrin koji je radi hepatotoksičnog učinka zamijenjen novijim lijekovima s jednakim mehanizmom djelovanja. Novijoj generaciji inhibitora acetilkolinesteraze pripadaju donepezil, rivastigmin i galantamin. Iako postoje značajni podaci o njihovoj djelotvornosti, klinička djelotvornost privremena je i skromna. Nuspojave uključuju mučninu i povraćanje, probavne tegobe te ostale periferne kolinomimetičke učinke (Katzung i sur., 2012).

Antagonisti NMDA (N-metil-D-aspartat) receptora blokiraju glutamatni receptor, čime se tkivo štiti od toksičnosti ekscitacijskih aminokiselina koje dovode do smrti neurona (Demarin i Tkanjec, 2008). Ovoj skupini lijekova pripada memantin koji djeluje kao nekompetitivni inhibitor glutamatnih receptora. Za razliku od acetilkolinesteraznih inhibitora, memantin se bolje podnosi i manje je toksičan, ali je također lijek skromne učinkovitosti (Katzung i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Alzheimerova bolest je teško neurodegenerativno oboljenje te ujedno i najčešća demencija starije životne dobi. S obzirom na ograničenu količinu lijekova dostupnih u terapiji, općenito njihovu slabu učinkovitost te simptomatsko liječenje bez trajnog poboljšanja tijeka bolesti, javlja se potreba za pronalaskom i razvojem novih aktivnih tvari koje bi napokon zaustavile progresiju ove teške demencije. Limitirana učinkovitost sintetiziranih lijekova, unatoč velikom napretku u razumijevanju patologije Alzheimerove bolesti, ukazuje na potrebu ponovnog istraživanja tradicionalnih biljnih lijekova s pozitivnim djelovanjem na kognitivne funkcije. Valja napomenuti kako su dva lijeka u uporabi, galantamin i rivastigmin, upravo biljnog porijekla. Sintetski galantamin odgovara istoimenom alkaloidu prvotno izoliranom iz biljke *Galanthus nivalis* L., dok je rivastigmin sintetski derivat fiziostigmina izoliranog iz biljne vrste *Physostigma venenosum* Balf. (Pong i sur., 2015).

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio prikupiti podatke o fitokemijskom sastavu, mehanizmu djelovanja i učinkovitosti odabranih biljnih droga tradicionalne kineske medicine u prevenciji i liječenju Alzheimerove demencije. U radu su obrađeni dostupni podaci o ginsengu, ginku i kineskoj huperziji.

3. MATERIJALI I METODE

Za pisanje ovog diplomskog rada korištena je znanstvena i stručna literatura vezana uz potencijalnu primjenu biljnih vrsta *Panax Ginseng* C. A. Meyer, *Ginkgo biloba* L. i *Huperzia serrata* (Thunb ex. Murray) Trev. u prevenciji i liječenju Alzheimerove bolesti. Literaturni izvori bili su različiti, od dostupnih knjiga iz područja farmakognozije i fitofarmacije preko relevantnih znanstvenih članaka i internetskih stranica. Korišteni znanstveni članci pronađeni su pretraživanjem baza podataka kao to su PubMed, Wiley Interscience, Lexicomp online i ScienceDirect u čijem su pretraživanju korištene riječi poput Alzheimer's disease, acetylcholinesterase inhibitors, Traditional chinese medicine, cognition, *Panax ginseng*, *Huperzia serrata*, Huperzine A, *Ginkgo biloba* i dr. Od značaja su se pokazale internetske stranice poput European Medicines Agency (EMA) i World Health Organization (WHO).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ginseng radix - ginsengov korijen

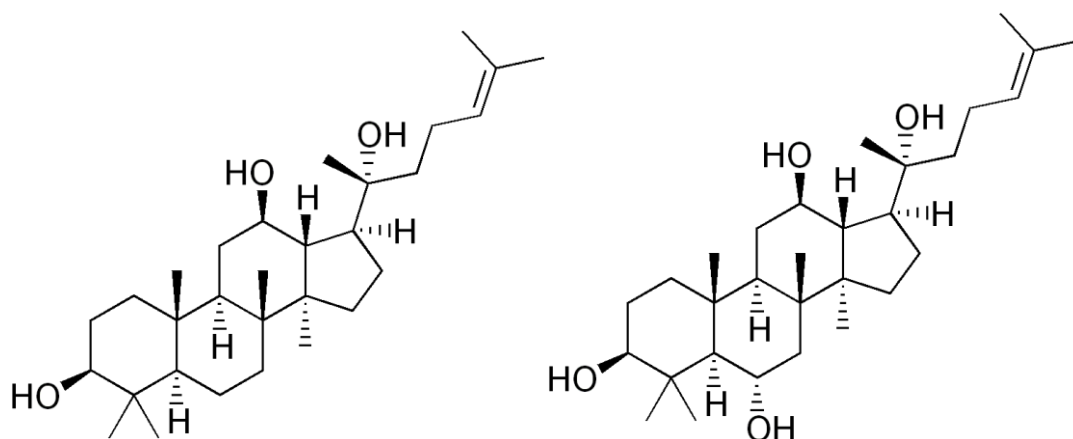
Definicija droge: Cijeli ili rezani osušeni korijen (slika 3), bijeli ginseng, te obrađen vodenom parom, zatim osušen, crveni ginseng, vrste *Panax ginseng* C. A. Meyer (*Araliaceae*). Osušena droga sadrži više od 0,40% ginsenosida Rg₁ i Rb₁ (EMA, 2013).



SLIKA 3. Osušeni ginsengov korijen (Barnes, 2007)

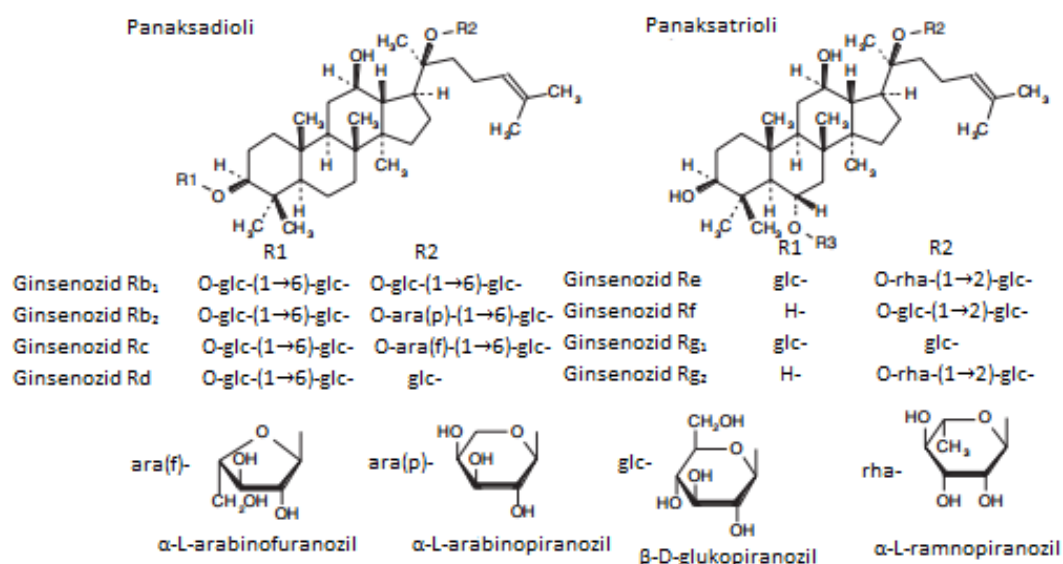
Fitokemijski sastav

Droga sadrži 2-3% triterpenskih saponina (ginsenosida, panaksozida) čija je nomenklatura povezana s R_f vrijednostima dobivenih tankoslojnom kromatografijom (R_a, R_b, R_c, itd.). Pri tome od R_a do R_f dolazi do pada polarnosti, što je u korelaciji sa stupnjem glikozilacije. Podjela ginsenosida u skupine temelji se na razlikama kemijske strukture aglikonskog dijela molekule. Dvije najveće skupine čine derivati 20(S)-protopanaksadiola te derivati 20(S)-protopanaksatriola (slika 4). Međusobno se razlikuju po položaju i sastavu šećernih lanaca. U diol-derivatima do povezivanja šećernih lanaca dolazi preko hidroksilne skupine na C3 i/ili C20 dok u triol-derivata do povezivanja dolazi na C6 i/ili C20 (EMA, 2013). Od šećera su dokazane glukoza, arabinoza, ksiloza i ramnoza (Kuštrak, 2005).



SLIKA 4. Strukturni prikaz 20(S)-protopanaksadiola i 20(S)-protopanaksatriola
(<http://www.ginsenosides.org/en/home/>)

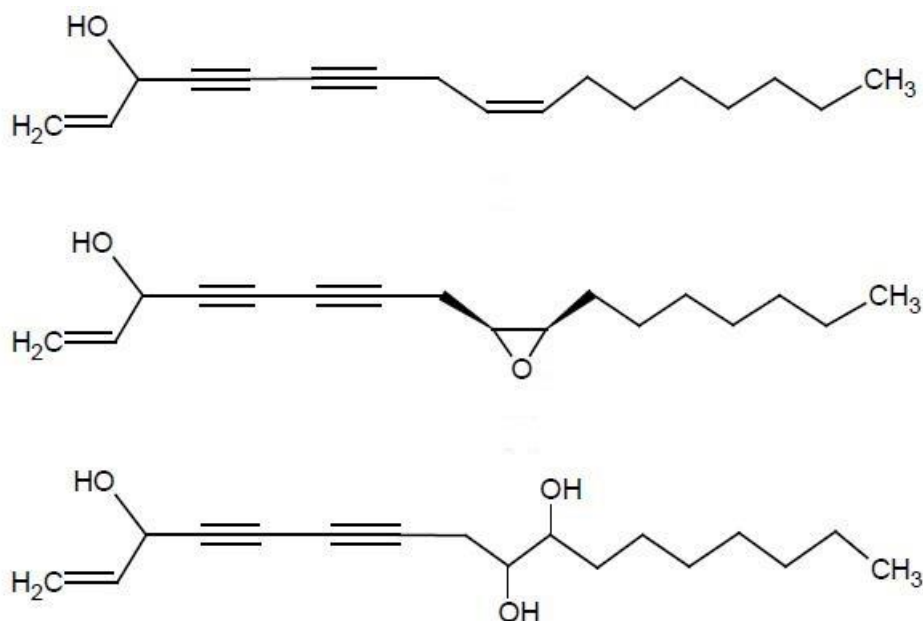
Primjeri ginsenozida iz PPD skupine jesu Rb₁, Rb₂, Rc i Rd, a derivati protopanaksatriola su ginsenozidi Re, Rf, Rg₁ i Rg₂ (slika 5). Najzastupljeniji među njima su Rb₁, Rb₂ i Rg₁ (EMEA, 2013).



SLIKA 5. Strukturni prikaz ginsenozida (WHO, 1999)

Osim ginsenzida, droga sadrži i polisaharide, panaksani A-U (peptidski glikani) i ginsenani, čija je struktura za sada slabo poznata.

Izolirani su i poliacetileni: panaksinol (falkalinor), panaksidiol i panaksitriol. Udio panaksinola varira od 0,002% do 0,086%, a udio panaksidiola od 0,001% do 0,2% (slika 6).



SLIKA 6. Strukturni prikaz panaksinola, panaksidiola i pakansitriola (EMEA, 2013)

Eterično ulje sadržano je u količini od samo 0,05%. Ginsengov korijen sadrži i fenolske supstancije, trigliceride, masne kiseline, aminokiseline, peptide, pektine, sterole, bjelančevine, vitamine (B1, B2, B12 i C) i minerale (EMEA, 2013; Kuštrak, 2005).

Djelovanje i uporaba

Kliničkim ispitivanjima dokazano je da ginsengov korijen dovodi do povećanja broja staničnih komponenti imunskog sustava te na taj način poboljšava njegovo djelovanje. Osim toga, uzrokuje i povećanje broja crvenih krvnih stanica i hemoglobina. Također posjeduje pozitivan učinak na kardiovaskularni sustav, kognitivne funkcije, erektilnu disfunkciju i oba tipa šećerne bolesti, pomaže u prevenciji tumora te poboljšava kvalitetu života (EMEA, 2013; Barnes, 2007; WHO, 1999). Droga je i poznati adaptogen, pomaže u prilagodbi tijela na stres, umor, glad i promjene temperature, a ustanovljen je i sedativni učinak (Chevallier, 2001). Dokazano je opće tonizirajuće i centralnostimulirajuće djelovanje, pa ga se smatra psihotonikom. Pripravci s korijenom ginsenga povećavaju produktivnosti i koncentraciju, a smanjuju staračku depresiju (Kuštrak, 2005).

4.1.1. Klinički dokazi o djelovanju ginsengova korijena kod Alzheimerove bolesti

Ginseng je jedan od najstarijih lijekova istočne Azije, ponajprije Koreje i Kine gdje se, prema nekim podacima, rabi već oko 5000 godina. Godine 221. prije Krista vjerovalo se da je ginseng biljka besmrtnosti, a još i danas se općenito smatra da pridonosi dugovječnosti (Kuštrak, 2005). Noviji dokazi ukazuju na to da njegovom primjenom dolazi do poboljšanja kognitivnih sposobnosti ljudi i životinja (Kennedy i sur., 2001).

Djelovanje ginsengova korijena na poboljšanje kognitivnih funkcija

Djelovanje biljne vrste Panax ginseng na kognitivne sposobnosti starijih osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti: Otvoreno kliničko ispitivanje provedeno u Južnoj Koreji od lipnja 2004. do listopada 2005. godine potvrdilo je pozitivno djelovanje droge na kognitivne sposobnosti osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti. U ispitivanju je sudjelovalo 97 pacijenata u dobi od 47 do 83 godine. Pacijenti su nasumično podijeljeni u dvije skupine. Prva je obuhvaćala je 58 volontera (38 ženskog, a 20 muškog spola) prosječne dobi od 67 godina koji su tijekom 12 tjedana svakodnevno tretirani korijenom bijelog ginsenga u obliku praška (4,5 g/dan, ukupan sadržaj ginsenosida 8,19%), dok je u drugoj, kontrolnoj skupini bilo 39 pacijenata (24 ženskog, 15 muškog spola) srednje dobi od 66 godina.

Evaluacija kognitivnih funkcija praćena je pomoću testova MMSE (*Mini Mental State Examination*) i ADAS (*Alzheimer's Disease Assessment Scale*) provedenim na samom početku te 4, 12 i 24 tjedna nakon početka studije. MMSE test obuhvaća nekoliko jednostavnih pitanja s ciljem procjene sposobnosti kao što su memorija, jezik i pažnja. ADAS ljestvica sastoji se od dviju podljestvica – kognitivne i nekognitivne. Kognitivna podljestvica sastavljena je od 11 točaka s ciljem procjene kognitivnih funkcija, a nekognitivna podljestvica sadrži 10 točaka kojima se procjenjuje ponašanje pojedinca.

Studija je pokazala da tijekom 12 tjedana tretmana ginsengom dolazi do poboljšanja rezultata dobivenih MMSE i ADAS-cog testovima, dok se rezultati ADAS-noncog testiranja nisu značajno razlikovali od rezultata dobivenih za kontrolnu skupinu ispitanika. Ponavljanjem MMSE i ADAS testova 12 tjedana nakon prestanka tretmana, pokazano je da poboljšani rezultati ispitivane skupine padaju na vrijednosti jednake onima dobivenima u testiranju kontrolne skupine. Osim učinkovitosti, ginseng se pokazao siguran za primjenu. Tijekom ispitivanja prijavljene su nuspojave poput vrtoglavice, dijareje, mučnine i glavobolje.

Međutim, navedene nuspojave bile su prolazne i blage te slične incidencije kao i nuspojave zamijećene u kontrolnoj skupini ispitanika (Lee i sur., 2008).

Slijedeća studija provedena na pacijentima oboljelima od Alzheimerove demencije bila je također otvorenoga tipa. Obuhvaćala je 61 pacijenta u dobi od 50-80 godina, od kojih 37 osoba ženskog i 24 osobe muškog spola. U ispitivanju su korištene kapsule s praškom dobivenim od šestogodišnjeg korijena crvenog ginsenga s ukupnim sadržajem ginsenosida od 8,54% (KRG – *Korean red ginseng*).

Volonteri su nasumično podijeljeni u tri skupine: pripadnici prve skupine (n=15) svakodnevno su konzumirali 4,5 g KRG-a, pripadnici druge skupine (n=15) 9 g KRG-a na dan, a treća skupina (n=31) bila je kontrolna skupina. Svi su pacijenti prethodno bili na terapiji donepezilom (5-10 mg/dan), galantaminom (16-24 mg/dan), memantinom (20 mg/dan) ili rivastigminom (6-12 mg/dan) najmanje pola godine, a terapija je nastavljena i tijekom provođenja studije.

Procjena kognitivnih funkcija vršena je prije te 12 tjedana nakon početka konzumacije KRG-a. Korišteni su ADAS (*Alzheimer's Disease Assessment Scale*) i CDR (*Clinical Dementia Rating*) testovi te korejska verzija MMSE (*Mini Mental State Examination*) testa (K-MMSE). Značajno poboljšanje rezultata ADAS i CDR testiranja u odnosu na kontrolnu skupinu uočeno je u skupini koja je primala visoku dozu droge. Obje ispitivane skupine pokazale su poboljšanje rezultata K-MMSE testiranja, ali ono nije bilo statistički značajno. Podnošljivost droge bila je dobra u obje tretirane skupine te nije bilo značajne razlike u pojavnosti nuspojava između tretirane i kontrolne skupine. Zabilježene nuspojave obuhvaćale su mučninu, dijareju i glavobolju.

Sukladno dobivenim rezultatima, zaključeno je da doza od 9 g KRG-a dnevno dovodi do značajnog poboljšanja kognitivnih funkcija osoba oboljelih od Alzheimerove demencije te može biti dobra adjuvantna terapija (Heo i sur., 2008).

Utjecaj ginsengova korijena na kognitivne sposobnosti zdravih pojedinaca mlađe životne dobi: Znanstvenici Kennedy i Scholey proveli su niz kliničkih ispitivanja s ciljem određivanja učinka ekstrakta ginsenga G155 na kognitivne sposobnosti zdravih mladih volontera. Ekstrakt ginsenga G115 dobiven je ekstrakcijom korijena bijelog ginsenga 40%-tnim etanolom te sadrži 4% ginsenosida (suma ginsenosida Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂) (EMEA, 2013). Sve su provedene studije bile dvostruko slijepe placebo kontrolirane i ukrižene. U svim je

studijama sudjelovalo 20 zdravih volontera koji su tijekom četiri dana trajanja studije (između kojih je slijedilo tjedan dana stanke) konzumirali tri različite doze navedenog ekstrakta ili placebo jednakog izgleda prema nasumično određenom rasporedu.

U provedenim studijama kao mjera kognitivnih sposobnosti korišten je kompjuterizirani test kognitivnih sposobnosti CDR (*Cognitive Drug Research assesment battery*) kojim su praćene sposobnosti pažnje te brzina i kvaliteta sekundarne i radne memorije, dok je za praćenje raspoloženja korištena Bond-Laderova ljestvica. Navedene testove volonteri su prolazili tijekom svakog dana ispitivanja prije te 1, 2,5, 4 i 6 sati nakon konzumacije dnevne doze droge.

Rezultati prve studije, u kojoj su korištene doze 0, 200, 400 i 600 mg G115, pokazali su poboljšanje sekundarne memorije kao posljedicu konzumacije svih doza ekstrakta. Najznačajniji učinak postignut je nakon konzumacije doze od 400 mg. Primjena ekstrakta u dozi od 200 i 600 mg pokazala je negativan učinak na sposobnost pažnje.

U slijedećoj, metodološki istoj studiji korištene su kapsule jednakog izgleda koje su sadržavale 0, 320, 640 ili 960 mg kombinacije ekstrakta ginsenga G115 i ekstrakta ginka GK 501 (standardiziranog sadržaja od 24% flavonoida i 6% terpenskih laktona) u omjeru 100:60. Izolirano poboljšanje sekundarne memorije zapaženo je za dozu od 960 mg, dok je za ostale doze ponovno uočen negativan učinak na sposobnost pažnje.

S ciljem dodatne potvrde pozitivnog djelovanja na sekundarnu memoriju, provedeno je još jedno, također metodološki jednako ispitivanje u kojemu su uspoređene najučinkovitije doze prijašnjih studija, odnosno doza od 400 mg ekstrakta ginsenga, 960 mg kombinacije ekstrakata ginsenga i ginka te 360 mg ekstrakta ginka. Studijom je potvrđeno poboljšanje sekundarne memorije povezano s konzumacijom ekstrakta ginsenga te kombinacije ginseng/ginko, a dobiveni su podaci i o poboljšanju brzine memorije i sposobnosti pažnje nakon konzumacije 400 mg ekstrakta G115 (Kennedy i Scholey, 2003).

U daljnjim studijama promatran je učinak različitih doza ekstrakta G115. Sudionici su konzumirali 0 (placebo), 200, 400 ili 600 mg ekstrakta ginsenga. Prije uzimanja, a zatim 1, 2,5, 4 i 6 sati nakon uzimanja dnevne doze, ispitane su kognitivne funkcije pomoću dvominutnog kompjuteriziranog testa. Ispitanici su, što je moguće brže i točnije, oduzimali vrijednost sedam od zadanog broja te dobivene rezultate unosili pomoću numeričke tipkovnice. Osim serijskog oduzimanja sedmica, provođen je i test serijskog oduzimanja

vrijednosti tri. Ispitivanjem nije uočen nikakav utjecaj konzumacije ekstrakta ginsenga na rezultate testa oduzimanja vrijednosti tri, ali je zato uočeno značajno poboljšanje točnosti prilikom oduzimanja vrijednosti sedam. Najbolji rezultati ponovno su zabilježeni za dozu od 400 mg. Pokazalo se da doza od 200 mg dovodi do smanjenja brzine pri izvođenju postavljenih zadataka (Scholey i Kennedy, 2002).

Djelovanje ekstrakta korijena ginsenga na elektroencefalograf zdravih dobrovoljaca mlađe životne dobi: Godine 2003. provedeno je dvostruko slijepo, placebo kontrolirano, ukriženo kliničko istraživanje u kojemu su ispitivane promjene na elektroencefalografu (EEG) povezane s konzumiranjem ekstrakta ginka i ginsenga. U ispitivanje je bilo uključeno 15 zdravih dobrovoljaca (10 žena i 5 muškaraca) prosječne dobi od 27 godina, a sastojalo se od tri dana testiranja uz sedmodnevnu stanku između svakog od njih. Svakog dana ispitivanja, volonteri bi uzimali određenu kombinaciju od osam kapsula identičnog izgleda. Kapsule su sadržavale placebo, 60 mg ekstrakta ginka (GK501) ili 100 mg ekstrakta ginsenga (G115) i kombinirane su tako da volonteri primaju dozu od 0 mg ekstrakta, 200 mg ekstrakta ginsenga ili 360 mg ekstrakta ginka. Svi volonteri koji su sudjelovali u ispitivanju dobivali su sve tri doze - različita doza u svakom danu ispitivanja. Četiri sata nakon uzimanja potrebne doze, provedeno je mjerenje električke moždane aktivnosti putem EEG-a (Kennedy i sur., 2003).

Rezultati ispitivanja pokazali su kako oba ekstrakta mogu direktno utjecati na električnu moždanu aktivnost (EMEA, 2013), odnosno da akutna primjena ekstrakata dovodi do pozitivne modulacije cerebralne bioelektrične aktivnosti. Nešto povoljniji rezultati zabilježeni su za ekstrakt ginsenga naspram ekstrakta ginka (Kennedy i sur., 2003).

4.1.2. Djelovanje ginsengova korijena na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji

Učinak na amiloidni plak: Neuroprotektivno i neuroregenerativno djelovanje ginsengova korijena uzrokovano je redukcijom amiloidnog plaka te posljedičnom inhibicijom gubitka memorije, što su dokazali Chen i suradnici (2006) analizom utjecaja komercijalno dostupnih pripravaka ginsenozida na akumulaciju A β -peptida u staničnoj kulturi. Sadržaj ginsenozida u pripravcima iznosio je 50 μ M. Promatran je učinak ginsenozida na dvije vrste A β -peptida – A β 40 i A β 42, pri čemu je značajniji učinak pripisan ginsenozidima s učinkom na A β 42 formu peptida s obzirom na to da je takva forma amiloidnog peptida mnogo patogenija.

Rezultati analize pokazali su da panaksadiol te ginsenosidi Rb₁ i Rb₂ reduciraju razinu Aβ-40 bez značajnijeg utjecaja na razinu Aβ42. Ginsenosidi Re, Rg₁ i Rg₃ istaknuli su se djelovanjem na razinu Aβ42, a najviši postotak redukcije u iznosu od 69% pokazan je nakon tretiranja stanične kulture ginsenosidom Rg₃ (tablica 1).

TABLICA 1. Utjecaj nekoliko izoliranih ginsenosida u koncentraciji od 50 μM na akumulaciju Aβ42 i Aβ40 formi amiloidnog peptida u staničnoj kulturi (Chen i sur., 2006)

GINSENOZIDI	REDUKCIJA Aβ42 (%)	REDUKCIJA Aβ40 (%)
Rb₁	0,0 ± 3,6	23,0 ± 7,4
Rb₂	0,5 ± 2,7	19,6 ± 0,3
Re	32,2 ± 3,3	1,4 ± 5,1
Rg₁	19,4 ± 4,0	0,0 ± 1,6
Rg₃	69,3 ± 1,8	26,7 ± 5,8
Panaksadiol	0,0 ± 8,7	27,6 ± 6,30
Panaksatriol	0,0 ± 3,9	0,0 ± 7,9

Isti znanstvenici proveli su ispitivanje utjecaja ginsenosida Re, Rg₁ i Rg₃ na razinu amiloidnog plaka *in vivo*. U ispitivanju su korišteni transgenični miševi oboljeli od Alzheimerove bolesti, a rezultati su pokazali značajno sniženje razine Aβ42 forme amiloidnog plaka nakon jedne oralne konzumacije ginsenosida u dozi od 25 mg/kg. I u ovom se ispitivanju najučinkovitijim pokazao ginsenosid Rg₃ s postotkom redukcije od 31,3 ± 5% (Chen i sur., 2006).

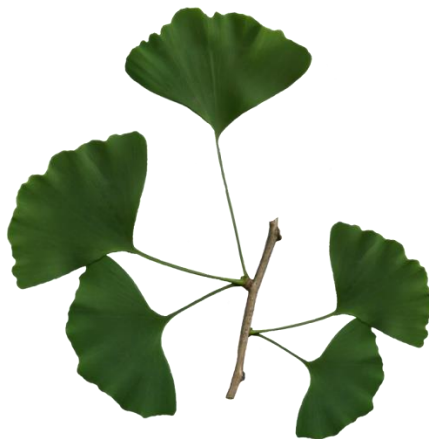
Učinak na kolinergički sustav: Osim pozitivnog utjecaja na redukciju amiloidnog plaka, postoji i nekoliko pretpostavljenih mehanizama djelovanja ginsenosida na kolinergički sustav.

In vitro ispitivanje provedeno 1999. godine na hipokampalnim kriškama mozga miša pokazalo je kako ginsenosid Rb₁ povećava „uptake“ kolina, prekursora acetilkolina, u završecima centralnog kolinergičkog živca te time olakšava otpuštanje acetilkolina (Attele i sur, 1999).

U drugim ispitivanjima, osim ginsenosida Rb₁, učinak na kolinergičke putove u centralnom živčanom sustavu pripisuje se i ginsenosidu Rg₁. Pretpostavlja se da navedeni ginsenosidi povećavaju aktivnost acetilkolin-transferaze i inhibiraju aktivnost acetilkolinesteraze te na taj način poboljšavaju funkciju kolinergičkog sustava (Heo i sur., 2011).

4.2. Ginkgo folium – ginkov list

Definicija droge: Biljna droga sastoji se od cjelovitih ili fragmentiranih, osušenih listova (slike 7-9) vrste *Ginkgo biloba* L. (*Ginkgoaceae*) (EMA, 2014).



SLIKA 7. Ljetni listovi ginka (<https://commons.wikimedia.org/>)

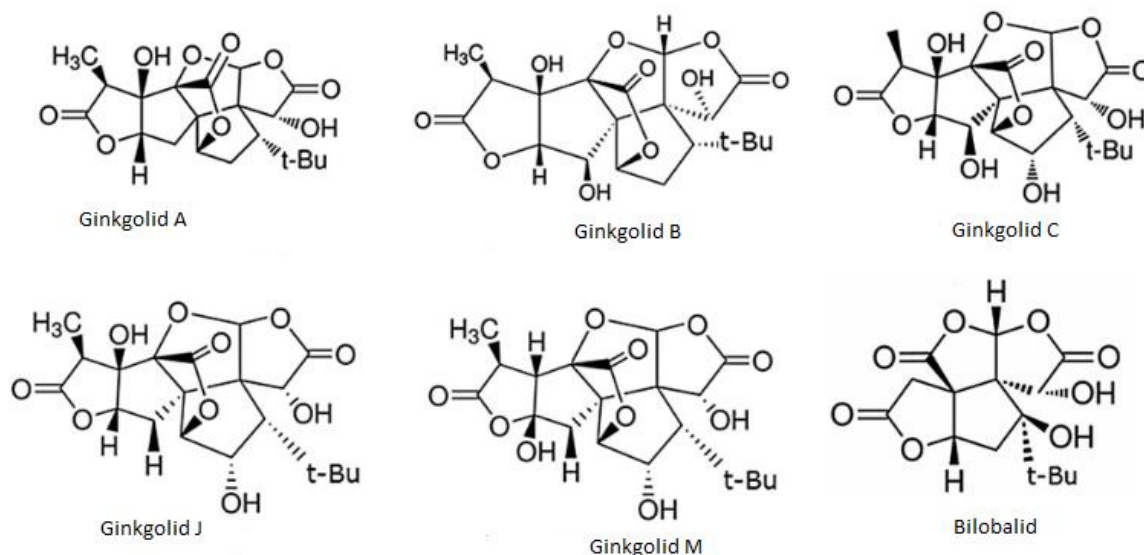


SLIKA 8. Jesenji listovi ginka (<https://www.etsy.com/>)



SLIKA 9. Osušeni listovi ginka (<http://www.pharmawiki.ch/wiki/>)

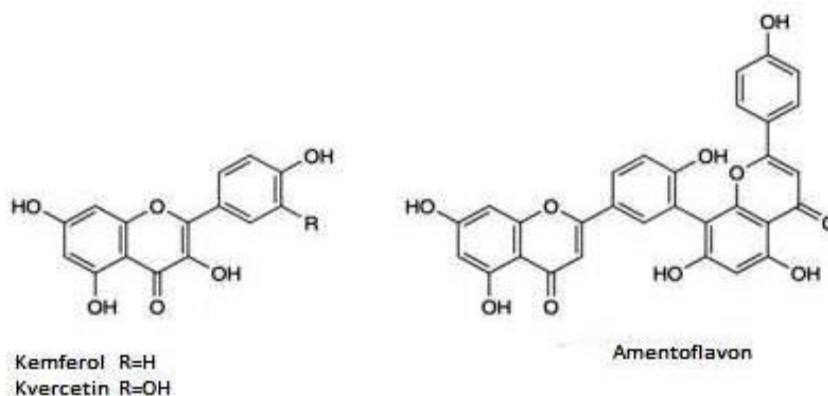
Fitokemijski sastav: Karakteristične sastavnice ove biljne droge jesu jedinstveni diterpenski laktoni naziva ginkgolidi A, B, C, J i M (0,06-0,23%) (slika 10). Osim ginkgolida, listovi ginka sadrže i seskviterpen bilobalid (do 0,26%) prisutan također samo u ginku (EMEA, 2014; WHO, 1999).



SLIKA 10. Kemijske strukture ginkgolida i bilobalida (Sabater-Jara i sur., 2013)

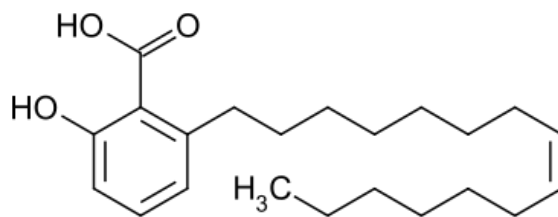
Listovi vrste *Ginkgo biloba* L. sadrže 0,5-1% flavonoida (slika 11):

- flavanoli (katehini)
- flavoni (neglikozidni biflavonoidi - amentoflavon, bilobetin, ginkgetin, izoginkgetin, sciadopitizin i 5'-metoksibilobetin)
- flavonoli (aglikoni te mono-, di- i triglikozidi pretežno kvercetina i kemferola, dok su izoramnetin i mircetin slabije zastupljeni) (EMEA, 2014; Kuštrak, 2005; WHO, 1999).



SLIKA 11. Strukturni prikaz odabranih flavonoida (Barnes, 2007)

Osim terpena i flavonoida, ginkovi listovi sadrže benzojevu i ginkgolnu kiselinu (slika 12), aminokiseline, peptide, voskove, lipide i procijanidine (EMEA, 2014; Barnes, 2007; Kuštrak, 2005).



SLIKA 12. Ginkgolna kiselina (<https://commons.wikimedia.org/>)

Djelovanje i uporaba

List ginka ima blagotvoran učinak na kapilarnu i vensku cirkulaciju. Pozitivno djelovanje na cirkulaciju mozga očituje se poboljšanjem oslabljenih moždanih funkcija i usto nastalih tegoba kao što su vrtoglavica, tinitus, poteškoće s ravnotežom i orijentacijom, otežana koncentracija i oslabljeno pamćenje, nesanica, depresija, anksioznost, zbunjenost i osjećaj straha. Kliničkim studijama pokazano je kako preparati ginka ublažavaju gubitak osjeta, trnce, grčeve, obamrlost i osjećaj hladnoće, a u osoba s poremećajem cirkulacije u nogama utvrđen je i pozitivan učinak na bol (Kuštrak, 2005; Davidson i Connor, 2000).

Zabilježen je i antioksidativan učinak te povoljno djelovanje na seksualnu disfunkciju uzrokovanu SSRI antidepressivima te visinsku bolest (Davidson i Connor, 2000; WHO, 1999).

4.2.1. Klinički dokazi o djelovanju ginkova lista kod Alzheimerove bolesti

Ljekovita svojstva vrste *Ginkgo biloba* L. otkrivena su još prije 5000 godina, a dokumenti koji svjedoče o pozitivnom djelovanju lista ginka na sposobnost memorije starijih osoba potječu iz 2700. godine prije Krista. Biljna vrsta ubrzo postaje dio tradicionalne kineske medicine, ali u zapadne zemlje dolazi tek u 18. stoljeću. Do današnjeg doba, pripravnici ginka dosegli su široku uporabu u svakodnevnom liječenju memorijskih i kognitivnih oštećenja, bez obzira na to je li uzrok povezan s oslabljenim dotokom krvi ili je degenerativne prirode kao u slučaju Alzheimerove bolesti (Davidson i Connor, 2000).

U svim dalje navedenim kliničkim ispitivanjima korišten je suhi ekstrakt ginkova lista EGb 761 (35-67:1). Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je 60%-tni etanol, a ekstrakt sadrži 22,0-27,0% flavonoida, izraženo kao ginkovi flavonski glikozidi, te 5,0-7,0% terpenskih

laktona, pri čemu 2,8-3,4% čine ginkgolidi A, B i C te bilobalid s udjelom 2,6-3,2%. Sadržaj glikolne kiseline manji je od 5 ppm (Napryeyenko i sur., 2009; Yancheva i sur., 2009).

S obzirom na nepovoljan odnos cijene i djelotvornosti acetilkolinesteraznih inhibitora, McCarney i suradnici (2008) odlučili su provesti šestomjesečnu, dvostruko slijepu, randomiziranu, placebo kontroliranu kliničku studiju kako bi ustanovili učinkovitost i sigurnosni profil biljne vrste *Ginkgo biloba* L. u liječenju ranog stadija demencije. U ispitivanju je sudjelovalo 176 volontera starijih od 55 godina s dijagnozom blage do srednje jake demencije, a nasumičnim odabirom podijeljeni su u dvije skupine po 88 ispitanika. Prvoj skupini dodijeljen je tretman suhim ekstraktom ginka EGb 761 u dnevnoj dozi od 120 mg (2x60 mg/dan), dok je druga skupina svakodnevno uzimala placebo. Promjene kognitivnih funkcija praćene su prije samog početka uzimanja dodijeljene terapije te nakon 2, 4 i 6 mjeseci testom ADAS-cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale - cognitive subscale*), dok je kvaliteta svakodnevnog života praćena pomoću testa QOL-AD (*Quality of Life in Alzheimer's Disease*). Studija nije rezultirala dokazima djelotvornosti ekstrakta EGb 761 (120 mg/dan) u liječenju blagog do srednje jakog oblika demencije. Nakon šest mjeseci svakodnevne primjene, nije došlo do značajnih promjena rezultata primjenom ADAS-cog i QOL-AD testa. Tijekom ispitivanja 57 sudionika studije prijavilo je ukupno 63 neželjena učinka, a pojavnost prijavljenih nuspojava bila je približno jednaka u obje ispitivane skupine; neželjeni događaj prijavilo je 29 osoba placebo te 28 osoba ginko skupine. Znanstvenici su zaključili da svakodnevna konzumacija ekstrakta ginka nije djelotvorna u borbi protiv demencije te da je biljna droga potpuno sigurna za primjenu.

Dokazi o djelotvornosti ekstrakta izostali su u još jednoj kliničkoj studiji iz 2005. godine. Naime, studija je uključivala 513 pacijenata (≥ 60 godina starosti) oboljelih od Alzheimerove demencije slabog do srednje jakog tipa, a provedena je na razini 44 različita centra. Ispitivanje je također bilo dvostruko slijepog tipa, randomizirano te placebo kontrolirano. Postojale su tri skupine ispitanika. Prva je dobivala 120 mg, a druga skupina 240 mg ekstrakta EGb 761 dnevno. Treća skupina predstavljala je kontrolnu (placebo) skupinu. Studija je trajala 24 tjedna, a napredak bolesti praćen je pomoću ispitivanja ADAS-cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive subscale*) te ADCS-CGIC (*Alzheimer's Disease Cooperative Study-Clinician's Global Impression of Change*). Na kraju studije nije uočena značajnija razlika između rezultata dobivenih za pojedine ispitivane skupine. Iako je unutar placebo skupine zamijećen blagi pad kognitivnih funkcija, autori su zaključili kako je to smanjenje

ipak bilo premalo da bi se ustvrdilo blagotvorno djelovanje biljnog ekstrakta na funkcije oboljelih od Alzheimerove demencije (EMEA, 2014).

Napryeyenko i suradnici (2009) proveli su dvostruko slijepo, randomizirano, placebo kontrolirano kliničko ispitivanje s ciljem određivanja učinkovitosti i sigurnosti ekstrakta ginka EGb 761 u liječenju Alzheimerove bolesti i vaskularne demencije. U studiji je sudjelovalo 400 pacijenata (≥ 50 godina) iz 18 različitih kliničkih centara, a 218 uključenih volontera patilo je od Alzheimerove demencije te su nasumičnim odabirom podijeljeni u dvije skupine. Prva je obuhvaćala 106 pacijenata koji su tijekom četiri tjedna svakodnevno uzimali ekstrakt EGb 761 u dnevnoj dozi od 240 mg (2x120 mg). Drugu skupinu činilo je 112 volontera koji su kroz isto vremensko razdoblje svakodnevno primali placebo. Djelotvornost EGb 761 u poboljšanju kognitivnih funkcija praćena je testom SKT (*Short Kurtz Test*) provedenim na samom početku studije te nakon 12. i 22. tjedna. Osim SKT ispitivanja, čiji rezultati predstavljaju primarnu mjeru učinkovitosti ekstrakta, provedeni su i testovi procjene neuropsiholoških funkcija te kvalitete svakodnevnog života. Rezultati studije pokazali su značajno poboljšanje kognitivnih i neuropsiholoških funkcija pacijenata tretiranih ekstraktom naspram placebo skupine. Ekstrakt ginka EGb 761 pokazao je povoljnije djelovanje od placeba i u testiranju sposobnosti pacijenata u obavljanju svakodnevnih aktivnosti. Također je pokazana nešto veća incidencija pojavnosti nuspojava unutar placebo skupine. Naime, u EGb 761 skupini uočene su 142 nuspojave u 80 pacijenata (75%), a u placebo skupini čak 230 nuspojava u 96 pacijenata (86%). Nuspojave su uglavnom obuhvaćale glavobolju, vrtoglavicu, dijareju, tinitus, infekcije dišnih putova te povišenje krvnog tlaka. Ozbiljnije nuspojave zabilježene su u dva pacijenta prve te u četiri pacijenta druge skupine, a odnose se na razvoj angine pectoris.

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da ekstrakt vrste *Ginkgo biloba* pokazuje pozitivni učinak u odnosu na placebo kako u poboljšanju kognitivnih i neuropsihijatrijskih funkcija, tako i u sigurnosti primjene.

Još jedno dvostruko slijepo, randomizirano, placebo kontrolirano kliničko ispitivanje s ciljem određivanja efikasnosti ekstrakta EGb 761 u liječenju demencije proveli su Herrschaft i suradnici (2012). Studija je uključivala 410 pacijenata tretiranih u 17 različitih kliničkih centara s područja Rusije, Bjelorusije i Moldavije. U studiju su uključene osobe starije od 50 godina s dijagnozom slabe do srednje jake Alzheimerove bolesti ili vaskularne demencije. Volonteri su pomoću kompjuterskog programa nasumično podijeljeni u dvije skupine. Svaka skupina obuhvaćala je po 205 ispitanika koji su tijekom 24 tjedna jednom dnevno uzimali

propisanu terapiju. Prvoj skupini dodijeljena je terapija ekstraktom listova ginka (240 mg EGb 761), dok su pripadnici druge skupine svakodnevno primali placebo (0 mg EGb 761). Tablete aktivne tvari i placebo bile su potpuno identičnog izgleda. Djelotvornost terapije praćena je SKT (*Syndrom Kurz Test*) testom kognitivnih sposobnosti te NPI (*Neuropsychiatric Inventory*) ispitivanjem učestalosti i ozbiljnosti neuropsihijatrijskih simptoma. Ispitivanja su provedena prije te 12 i 24 tjedna nakon početka studije. Po završetku studije, uočeno je značajno poboljšanje rezultata primjenom obaju testova, čime je dokazana učinkovitost ekstrakta ginka EGb 761 u liječenju demencije.

Incidencija i vrsta nuspojava zabilježenih tijekom trajanja studije nije se značajno razlikovala među ispitivanim skupinama. U prvoj skupini 119 nuspojava prijavio je 91 pacijent (44%), dok je u placebo skupini zabilježeno 126 nuspojava u 82 uključena pacijenta (40%). Neželjeni učinci uglavnom su uključivali glavobolju, vrtoglavicu, virusne infekcije respiratornog trakta, hipertenziju, umor te bolove u gornjem dijelu abdomena. Značajnija razlika pojavnosti zabilježena je samo u slučaju vrtoglavice, čija je incidencija više od tri puta veća među ispitanicima tretiranim placebo. Ozbiljnije nuspojave zabilježene su u tri ispitanika prve skupine te u jednog pripadnika placebo skupine, međutim, pokazano je kako one nisu bile povezane s primjenom aktivne tvari.

Dobiveni rezultati pokazali su da je svakodnevna primjena ekstrakta vrste *Ginkgo biloba* EGb 761 učinkovita i sigurna u liječenju kako Alzheimerove, tako i vaskularne demencije (Herrschaft i sur., 2012).

Još jedan dokaz djelotvornosti ekstrakta EGb 761 u liječenju Alzheimerove demencije, odnosno povoljan učinak na kognitivne funkcije i neuropsihijatrijske simptome, pokazali su Ihl i suradnici (2012) dvostruko slijepom, randomiziranom, placebo kontroliranom kliničkom studijom u kojoj su ispitanici kroz 24 tjedna svakodnevno primali 240 mg ekstrakta ili placebo. U ispitivanju su sudjelovala 333 volontera srednje dobi od 65 godina s dijagnozom Alzheimerove bolesti. Skupina s dodijeljenim ekstraktom EGb 761 obuhvaćala je 163, a placebo skupina 170 ispitanika. Promjena kognitivnih, odnosno neuropsihijatrijskih funkcija praćena je testovima SKT (*Syndrom Kurz Test*) i NPI (*Neuropsychiatric Inventory*) provedenim prije početka konzumacije pripravka te 12 i 24 tjedna nakon početka. Skupina s dodijeljenim ekstraktom ginka pokazala je značajno bolje rezultate obaju testova u odnosu na skupinu tretiranu placebo. Sekundarnu mjeru učinkovitosti ekstrakta predstavljali su testovi procjene obavljanja svakodnevnih aktivnosti te kvalitete života koji su također pokazali

superiorne rezultate za ginko. Stopa nuspojava bila je nešto manja u prvoj skupini - ukupno je 105 pacijenata (63%) prijavilo 181 neželjeni učinak, dok je u drugoj skupini zabilježeno 216 nuspojava u 120 uključenih pacijenata (70%). Najčešće nuspojave obuhvaćale su glavobolju, vrtoglavicu, infekcije respiratornog trakta te povišenje krvnog tlaka. Frekvencija njihove pojavnosti bila je slična u obje ispitivane skupine. Analizom dobivenih rezultata, znanstvenici su zaključili kako svakodnevna primjena ekstrakta EGb 761 u dozi od 240 mg poboljšava kognitivne funkcije i neuropsihijatrijske simptome oboljelih od Alzheimerove demencije (Ihl i sur., 2012).

Kliničko ispitivanje djelotvornosti ekstrakta ginka u prevenciji razvoja Alzheimerove bolesti: Dvostruko slijepa, randomizirana, placebo kontrolirana studija provedena je diljem Francuske na starijim osobama u dobi od 70 i više godina koje su se spontano požalile na probleme s pamćenjem djelatnicima primarne zdravstvene zaštite, ali nisu imale dijagnozu Alzheimerove demencije. Sudionici su praćeni 5 godina tijekom kojih su svakodnevno konzumirali 240 mg ekstrakta ginka EGb 761 (n=1406) ili placebo (n=1414) identičnog izgleda. Po završetku studije 61 osoba iz ginko skupine (1,2 slučaja na 100 osoba godišnje) te 73 osobe iz placebo skupine (1,4 slučaja na 100 osoba godišnje) razvile su dijagnozu vjerojatne Alzheimerove bolesti, a i pojavnost neželjenih događaja (smrt, moždani udar i drugi kardiovaskularni događaji) bila je približno jednaka u obje ispitivane skupine. S obzirom na navedeno, zaključak studije glasi kako dugotrajna uporaba ekstrakta ginka ne smanjuje rizik razvoja Alzheimerove demencije u odnosu na placebo (Vellas i sur., 2012).

Usporedba djelotvornosti ekstrakta ginkga EGb 761 i donepezila: Iako mnoge kliničke studije ukazuju na neuroprotektivno djelovanje ekstrakta EGb 761, javila se potreba za usporedbom djelotvornosti ekstrakta u odnosu na drugu generaciju acetilkolinesteraznih inhibitora. Stoga je provedeno dvostruko slijepo, randomizirano, placebo kontrolirano ispitivanje na oboljelima od blagog do srednje jakog oblika Alzheimerove bolesti u dobi od 50-80 godina, u kojemu je uspoređena djelotvornost biljnog ekstrakta s djelotvornošću registriranog lijeka donepezila. Ukupno 76 volontera raspodijeljeno je u tri skupine. Prve dvije obuhvaćale su po 25 ispitanika koji su uzimali 160 mg ekstrakta ginka EGb 761 (prva skupina), odnosno 5 mg donepezila (druga skupina) jedanput dnevno. Posljednju skupinu ispitanika činilo je 26 volontera koji su svakodnevno uzimali tabletu placeba. Promjena kognitivnih funkcija praćena je ispitivanjima MMSE (*Mini Mental State Examination*), SKT (*Syndrom Kurz Test*) i CGI (*Clinical Global Impression*) testovima. Pacijenti su dodijeljeni terapiju uzimali tijekom 24 tjedna, nakon

kojih je u prve dvije skupine ispitanika učeno značajno poboljšanje kognitivnih funkcija s vidljivo poboljšanim rezultatima svih navedenih ispitivanja, dok je u placebo skupini zabilježeno blago pogoršanje. Od ispitivanja je odustalo 5 pripadnika prve (20%) te 4 pripadnika (16%) druge skupine. Razlog odustajanja pacijenata tretiranih donepezilom bile su nuspojave lijeka (dijareja, povraćanje, mučnina i nemir), međutim, niti jedno odustajanje pacijenata iz ginkgo skupine nije bilo povezano s pojavom nuspojava, zbog čega je zaključeno kako biljna droga u odnosu na dotični acetilkolinesterazni inhibitor pokazuje bolju podnošljivost. Osim dobre podnošljivosti i sigurnosti primjene biljnog ekstrakta, rezultati ispitivanja ukazuju također da ne postoji relevantna razlika djelotvornosti između ginkgo ekstrakta i donepezila u liječenju blagog do umjerenog tipa Alzheimerove demencije (Mazza i sur., 2006).

S ciljem usporedbe djelotvornosti ekstrakta ginkga EGb 761 i donepezila, provedeno je još jedno dvostruko slijepo, randomizirano kliničko ispitivanje u kojemu su sudjelovala 4 bolnička centra diljem Bugarske. U studiju je bilo uključeno 96 pacijenata starijih od 50 godina koji su oboljeli od blagog do umjerenog jakog oblika Alzheimerove bolesti. Sudionici su nasumično raspoređeni u tri skupine od kojih je svakoj dodijeljena drugačija terapija u trajanju od 22 tjedna. U prvoj skupini bio je 31 volonter na terapiji ekstraktom EGb 761 (2x120 mg), druga skupina sastojala se od 33 sudionika na terapiji donepezilom (1x5 mg tijekom prva četiri tjedna, a zatim 2x5mg tijekom preostalih 18 tjedana), dok su treću skupinu činila 32 pacijenta na kombiniranoj terapiji, odnosno terapiji ekstraktom EGb 761 i donepezilom u preporučenim dozama. Primijenjeni su testovi procjene kognitivnih sposobnosti: SKT (*Syndrom Kurz Test*), CDT (*Clock-Drawing Test*) te *Verbal Fluency Test*, testovi procjene ponašanja: NPI (*Neuropsychiatric Inventory*), HAMD (*Hamilton Rating Scale for Depression*) te GBS (*Gottfries-Brane-Steen Scale*). Provedena je procjena ukupne gerijatrijske sposobnosti koja uključuje procjenu obavljanja svakodnevnih životnih aktivnosti (ADL), intelektualne sposobnosti i emocionalno stanje. Usporedbom rezultata dobivenih na početku i na kraju studije, uspostavilo se da sve tri ispitivane skupine pokazuju poboljšanje provedenih testiranja bez značajnijih statističkih ili kliničkih razlika među tretiranim skupinama. Ipak, čini se da postoji relativno dosljedna, iako nedovoljno značajna, blaga prednost kombiniranog liječenja, pri čemu niti jedan od pojedinih lijekova ne pokazuje dosljednu prednost nad drugim lijekom. Što se tiče pojavnosti neželjenih učinaka, vidljiva je značajno niža incidencija u prvoj skupini ispitanika (32%) u odnosu na skupinu tretiranu donepezilom (73%) te skupinu na kombiniranoj terapiji (56%). Najčešće zabilježene

nuspojave bile su glavobolja, nesanica, dijareja i umor. U skupini tretiranoj ekstraktom zabilježen je jedan ozbiljniji neželjeni efekt, međutim, povezanost s biljnom drogom nije dokazana.

Temeljem dobivenih rezultata razvijene su tri hipoteze: (1) ne postoji značajna razlika u djelotvornosti biljnog ekstrakta EGb 761 i registriranog lijeka donepezila, (2) kombinirana terapija pokazuje povoljniji učinak u odnosu na monoterapiju biljnim ekstraktom kao i donepezilom, (3) kombinirana terapija ima manju incidenciju nuspojava u odnosu na monoterapiju donepezilom. Iako su obećavajuće, postavljene hipoteze potrebno je potvrditi u daljnjim studijama na većem broju sudionika (Yancheva i sur., 2009).

4.2.2. Učinak ginkova lista na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji

Djelovanje na amiloidni plak: *In vitro* ispitivanjem na hipokampalnim stanicama štakora dokazano je kako ginkov ekstrakt EGb 761 štiti stanice od toksičnog utjecaja A β -amiloida, a postotak staničnog preživljenja raste s povećanjem koncentracije biljnog ekstrakta (Bastianetto i sur., 2000). Daljnjim istraživanjem ustanovljen je protektivni učinak ekstrakta kao rezultat prevencije amiloidogeneze. Naime, *in vitro* studija provedena na hipokampalnim stanicama štakora te *in vivo* na dvomjesečnim laboratorijskim štakorima Sprague-Dawley, pokazala je kako EGb 761 djeluje na metabolizam APP-a (amiloidnog prekursorskog proteina) potičući njegovu razgradnju α -sekretazom, što rezultira nastankom topljivog netoksičnog amiloida. Porast aktivnosti α -sekretaze životinja tretiranih ekstraktom u dozi od 150 mg/kg naspram kontrolne skupine životinja iznosio je čak 85% (Colciaghi i sur., 2004).

S ciljem identifikacije bioaktivnih komponenti ekstrakta EGb 761, Xie i suradnici (2014) izolirali su sedam flavonoida, ginkgolide A, B, C i bilobalid te promatrali njihov inhibitorni učinak na fibrile β -amiloida *in vitro*. Najjačim inhibitorima pokazali su se flavonoidi s kvercetinom kao aglikonskom komponentom, dok su ostali flavonoidi imali jedva primjetan učinak, što ukazuje na povezanost kemijske strukture flavonoida i njihove biološke aktivnosti. U odnosu na flavonoide s kemferolom i izoramnetinom kao aglikonom značajno veći učinak imali su flavonoidi s kvercetinskom komponentom, pa se može zaključiti kako je upravo aglikonski dio odgovoran za antiamiloidni učinak te da aktivnost ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina. Ginkgolidi i bilobalid u ovom ispitivanju nisu pokazali učinak za razliku od *in vitro* ispitivanja na N2 stanicama neuroblastoma u kojemu je ispitivana upravo njihova

djelotvornost te su bilobalid i ginkgolid J istaknute kao glavne djelotvorne sastavnice biljne droge (Luo i sur., 2002).

Neke su studije ukazale na neznatno slabiji učinak pojedinih sastavnica ekstrakta od cjelokupnog ekstrakta EGb 761 u ekvivalentnoj koncentraciji, što upućuje na moguće postojanje dosada nepoznate aktivne sastavnice ili sinergističko djelovanje bioaktivnih sastavnica ekstrakta (Xie i sur., 2014; Luo i sur., 2002). S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako do sada nije u potpunosti razjašnjeno koje su sastavnice odgovorne za antiamiloidno djelovanje ekstrakta EGb 761, što ukazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjima.

4.3. KINESKA HUPERZIJA

Definicija droge: Drogu čini čitava osušena biljka *Huperzia serrata* (Thunb ex. Murray) Trev. (*Huperziaceae*) [sin. *Lycopodium serratum* Thunb ex. Murray] (Leung, 2011; Ma i sur., 2005). Morfološka obilježja biljke vidljiva su na slikama 13 i 14.



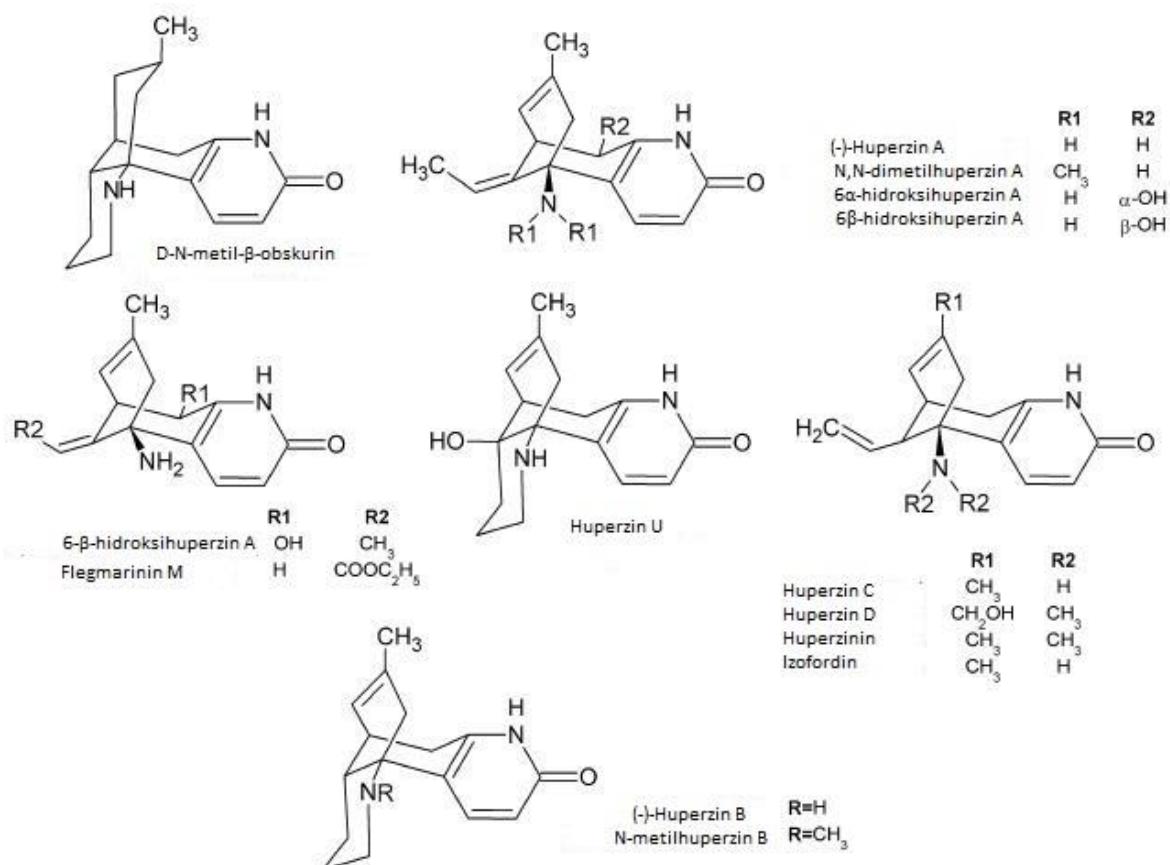
SLIKA 13. Ilustracija vrste *Huperzia serrata* (Thunb ex. Murray) Trev.
(<http://www.plantillustrations.org/>)



SLIKA 14. *Huperzia serrata* (Thunb ex. Murray) Trev. (<http://iloveherbalism.com/>)

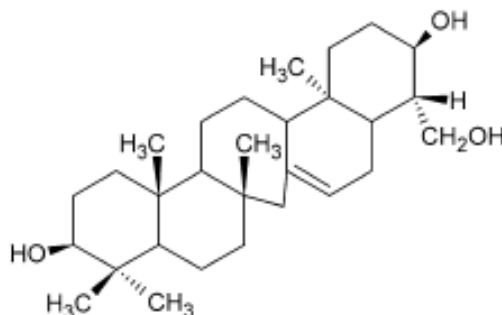
Fitokemijski sastav: Kineska huperzija sadrži mnogobrojne alkaloide (*Lycopodium* alkaloidi) podijeljene u četiri skupine: favcetiminski, likodinski, likopodinski te mješoviti tip alkaloida različitih strukturnih obilježja. Do danas je iz biljke izolirano više od 50 alkaloida među kojima se nalaze huperzini (A-W) te još tridesetak alkaloida različite strukture.

Većina alkaloida koji imaju svojstvo inhibicije acetilkolinesteraze spadaju u likodinsku skupinu (slika 15), a neki od njih su huperzin A (Hup A), huperzin B (Hup B), N-metil-Hup B i huperzinin. Najvažniji i najpotentniji inhibitor enzima od interesa jest huperzin A (Ferreira i sur., 2016; Leung, 2011). Ustanovljeni udio hiperizina A iznosi oko 0,1% suhog biljnog materijala (<https://www.drugs.com/>).



SLIKA 15. Likodinski alkaloidi izolirani iz vrste *Huperzia serrata* (Ferreira i sur., 2014)

Od drugih bioaktivnih sastavnica, u kineskoj huperziji prisutni su triterpeni, flavoni, fenolne kiseline (klorogenska i ferulična) i drugi fenolni spojevi (Ma i sur., 2007).



SLIKA 16. Strukturni prikaz odabranog triterpena (serrat-14-en-3,21,29-triol)
(Ferreira i sur., 2014)

Djelovanje i uporaba: "Qian Ceng Ta", odnosno cjelovita biljna vrsta *Huperzia serrata*, koristi se u tradicionalnoj kineskoj medicini više od 1000 godina (Lenug, 2011). Biljka posjeduje antioksidativno i antiapoptotičko djelovanje (Jaswinder i sur., 2016). Koristi se za ublažavanje boli, liječenje prehlade, raznih ozljeda i otekline te opuštanje mišića i tetiva. Također ima ulogu u liječenju reume, mijastenije gravis, epilepsije i shizofrenije. Pozitivno djeluje na cirkulaciju, a upotrebljava se i kao antidot prilikom trovanja organofosfatima (Leung, 2011; Wu i sur., 2011; <https://www.drugs.com/>).

4.3.1. Klinički dokazi o djelovanju huperizina A kod Alzheimerove bolesti

Ranih 1980-ih godina, kineski znanstvenici krenuli su u potragu za novim bioaktivnim prirodnim tvarima u svrhu otkrivanja lijekova za liječenje mijastenije gravis. S obzirom na tradicionalnu primjenu biljnih vrsta iz porodice *Huperziaceae* u terapiji te bolesti, glavne mete istraživanja bili su *Lycopodium* alkaloidi kao njihove najznačajnije bioaktivne sastavnice. U kliničkim ispitivanjima djelotvornosti biljnih vrsta u liječenju mijastenije gravis pojavile su se kolinergičke nuspojave što je rezultiralo fokusiranjem znanstvenika na utjecaj *Lycopodium* alkaloida na kolinergički sustav.

Godine 1986. iz vrste *Huperzia serrata* izoliran je prvi alkaloid huperzin A, a iste godine započela su i *in vitro* te *in vivo* ispitivanja njegovog farmakološkog djelovanja. Ubrzo nakon otkrivanja anitkolinesterazne aktivnosti, Hup A privukao je pozornost svjetskih znanstvenika kao potencijalna aktivna tvar u liječenju Alzheimerove demencije (Ma i sur., 2007).

Ispitivanje učinka huperzina A na kognitivne funkcije i ponašanje oboljelih od Alzheimerove bolesti: Djelotvornost i sigurnost primjene huperzina A u terapiji pacijenata oboljelih od Alzheimerove demencije procijenjena je kliničkim studijama provedenima u Kini. Zbog jezične barijere, odnosno malog broja literaturnih izvora na engleskom jeziku u kojima su opisane interesne studije, slijedi kratki sažetak najvažnijih podataka iz metodološki najistaknutijih studija.

Neki od testova korištenih za ispitivanje kognitivnih funkcija su: MMSE (*Mini Mental State Examination*), ADAS-cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale–cognitive subscale*) te CDR (*Clinical Dementia Rating*). Za procjenu svakodnevnog funkcioniranja korišten je ADL (*Activities of Daily Living*), a za procjenu ponašanja ADAS-noncog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale – noncognitive subscale*) test (Li i sur., 2008).

Rezultati dvostruko slijepog, randomiziranog, placebo kontroliranog ispitivanja provedenog na razini petnaest kliničkih centara širom Kine, potvrdili su blagotvoran učinak huperzina A (Hup A) na kognitivne funkcije. U ispitivanju su sudjelovala 202 volontera oboljela od blagog ili srednje jakog oblika Alzheimerove demencije. Pacijenti su nasumično podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina je obuhvaćala 100 volontera koji su uzimali dozu od 0,4 mg Hup A dnevno tijekom 12 tjedana trajanja studije, dok su 102 pripadnika druge skupine kroz isto razdoblje dobivali placebo. Svi su ispitanici svakodnevno uzimali vitamin E za koji se

pretpostavlja da ima blagotvoran učinak u liječenju kognitivnih simptoma. Djelotvornost primjene Hup A i placeba praćena je nakon 6 i nakon 12 tjedana trajanja studije testovima MMSE, ADAS-cog, ADAS-noncog i CIBC-plus te ADL ljestvicom. Blage i prolazne nuspojave zabilježene su u 3% bolesnika koji su uzimali Hup A. Dobiveni rezultati ukazali su da Hup A znakovito poboljšava kognitivne funkcije, ponašanje, ADL i raspoloženje pacijenata oboljelih od Alzheimerove demencije. No, valja naglasiti da su svi ispitanici uzimali i vitamin E pa se može pretpostaviti da je pozitivan učinak posljedica sinergističkog djelovanja huperzina A i vitamina E (Ma i sur., 2007; Wang i sur., 2006; Zhang i sur., 2002).

Značajno poboljšanje kognitivnih funkcija praćeno MMSE testom zabilježeno je u još jednom dvostruko slijepom, placebo kontroliranom, randomiziranom ispitivanju provedenom na 28 pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti, prosječne dobi od 78 godina. Ispitivanje je trajalo osam tjedana tijekom kojih je ispitivana skupina svakodnevno uzimala 0,2 mg Hup A dva puta dnevno (0,4 mg dnevno), dok je kontrolna skupina dobivala placebo. Dvije godine kasnije provedena je još jedna, metodološki jednaka studija koja je ponovo pokazala pozitivno djelovanje alkaloida na MMSE rezultate.

Dva od provedenih ispitivanja bila su jednostruko slijepa. Izvršitelji studije nisu znali kome je dodijeljena aktivna supstanca, a kome placebo. U jednoj od tih studija sudjelovalo je 65 pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti, prosječne dobi od 77 godina. Sudionici su nasumično podijeljeni u skupine te su uzimali 0,1 mg Hup A ili placebo tri puta na dan. Osim rezultata MMSE i ADL testova, praćene su i promjene CDR-a. Studijom su ponovno dobiveni povoljni rezultati primjenom MMSE i ADL testova, a zabilježeno je i izuzetno povoljno djelovanje alkaloida na CDR. Druga jednostruko slijepa studija također je bila placebo kontrolirana. Sudjelovalo je 26 ispitanika prosječne dobi od 70 godina. Ispitivanje je trajalo 36 tjedana tijekom kojih su sudionici uzimali placebo ili 0,15 mg Hup A dva puta dnevno (0,3 mg na dan). Praćene su promjene rezultata primjenom testova MMSE i ADL koji ponovno govore u korist huperzina A.

Jedna od provedenih studija bila je otvorenog tipa, a obuhvaćala je 32 ispitanika oboljela od Alzheimerove bolesti u dobi između 46 i 80 godina. Volonteri su nasumično raspodijeljeni u dvije skupine od kojih je prva tretirana kombinacijom huperzina A (dva puta dnevno po 0,2 mg) i rutinske terapije koja uključuje medicinsku njegu, psihološko savjetovanje i rehabilitaciju. Druga skupina imala je samo rutinsku terapiju. Kognitivne funkcije bolesnika praćene su MMSE ispitivanjem. Dobiveni su značajno bolji rezultati u ispitivanoj skupini nakon 12 tjedana koliko je studija trajala (Li i sur., 2008).

Kliničko ispitivanje djelotvornosti huperzina A na oboljele od Alzheimerove demencije provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama: Godine 2011. objavljeni su rezultati kliničke studije provedene u SAD-u. Cilj studije bio je procijeniti sigurnost, toleranciju i učinkovitost Hup A u liječenju blagog do srednje jakog oblika Alzheimerove bolesti. Ispitivanje je bilo dvostruko slijepo, randomizirano te placebo kontrolirano, a ukupno su sudjelovala tri klinička centra te 210 volontera oboljelih od Alzheimerove demencije starija od 50 godina. Pacijenti su nasumično podijeljeni u tri skupine. Skupina A (n=69) uzimala je 0,1 mg Hup A dva puta dnevno tijekom dva tjedna, a nakon toga, 0,2 mg dva puta na dan kroz 22 tjedna. Ispitanici u skupini B (n=68) uzimali su također 0,1 mg dva puta na dan kroz prva dva tjedna studije, iduća dva tjedna dobivali su 0,2 mg dva puta dnevno te im se u sljedeća dva tjedna doza ponovno povisila na 0,3 mg dva puta dnevno. Kroz narednih 18 tjedana studije sudionici ove skupine primali su 0,4 mg Hup A dva puta dnevno. Skupina C (n=73) započela je tretman dobivanjem placeba. Nakon 16 tjedana tretmana bez ispitivane tvari, uslijedila su 4 tjedna uzimanja 100 mg Hup A dva puta dnevno, a zatim 4 tjedna s dozom od 200 mg dva puta na dan (tablica 2).

TABLICA 2. Shema doziranja huperizina A ovisno o skupini i tjednu studije. Doze su izražene u mg i uzimane su dva puta dnevno

SKUPINA	TJEDAN					
	1-2	3-4	5-6	7-16	17-20	21-24
A	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
B	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4
C	0	0	0	0	0,1	0,2

Primarni cilj studije bilo je utvrditi djelotvornost huperzina A u liječenju blage do srednje jake Alzheimerove bolesti. Testiranja sudionika vršena su na samom početku studije te 8, 11, 16, 20 i 24 tjedna nakon početka. Kognitivne sposobnosti procijenjene su temeljem skale ADAS-cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive subscale*) te MMSE (*Mini Mental State Examination*) testa. Rezultati ADAS-cog testa u 16. tjednu studije nisu se značajno razlikovali između skupine A (2x0,2 mg/dan) i placebo skupine (C), što ne govori u prilog učinkovitosti huperizina A. Nasuprot tome, ustanovljeno je njegovo povoljno djelovanje na kognitivne funkcije primjenom obaju testova u skupini B (2x0,4 mg/dan). Podnošljivost huperzina A bila je dobra u svim ispitivanim skupinama. Od studije odustalo je 11% ispitanika radi nemogućnosti tolerancije nuspojava, a kao najčešći problem navedena je mučnina.

Rezultati studije ukazali su na pozitivno i sigurno djelovanje većih doza ispitivanog alkaloida na kognitivne sposobnosti. No, potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se ustanovila njegova učinkovitost i sigurnost tijekom duljeg razdoblja primjene, kao i najveća doza koja bi bila učinkovita, ali i dalje sigurana za uporabu (Rafii i sur., 2011).

Usporedba djelotvornosti memantina u kombinaciji s četiri različita inhibitora acetilkolinesteraze: Klinička studija provedena od listopada 2009. do rujna 2013. godine ispitala je razlike učinkovitosti terapije Alzheimerove bolesti kombinacijom memantina s donepezilom, rivastigminom, galantaminom ili huperzinom A. U studiji je sudjelovalo 100 pacijenata s dijagnozom blage do srednje jake Alzheimerove demencije u dobi od 56-84 godine. Sudjelovala su 53 ispitanika ženskog i 57 ispitanika muškog spola. Ispitivanje je bilo randomizirano i placebo kontrolirano, ali ne postoje podaci o tome je li bilo otvorenog tipa, jednostruko ili dvostruko slijepo. Pacijenti su nasumično raspodijeljeni u pet skupina tako da je svakoj dodijeljeno po 22 volontera. Tijekom 24 tjedna primali su terapiju dodijeljenu prema shemi prikazanoj u tablici 3. Učinak terapije praćen je pomoću testova MMSE (*Mini Mental State Examination*) i ADL (*Activities of Daily Living*) provedenih na samom početku te 12 i 24 tjedna nakon početka konzumacije dodijeljene terapije. S obzirom na rezultate dobivene na početku studije, svih pet ispitivanih skupina pokazalo je značajan napredak u oba testiranja 12 te 24 tjedna nakon izvođenja prvotnih testiranja. No, najučinkovitijom se pokazala upravo kombinacija memantina s huperzinom A – u 12. tjednu nije uočena značajna razlika u rezultatima MMSE testiranja između pojedinih skupina, dok su rezultati u 24. tjednu studije pokazali najsnažniji učinak kombinacije memantina i huperzina A. Najbolje rezultate ADL-a u 12. tjednu ispitivanja ostvarila je kombinacija memantina i donepezila te kombinacija memantina i huperzina A, dok je u 24. tjednu studije jedino kombinacija memantina i huperzina A dovela do značajnog smanjenja rezultata ALD u usporedbi s rezultatima dobivenim u skupini tretiranoj samo memantinom. Zabilježene nuspojave bile su kolinergičke nuspojave slabog intenziteta te nije bilo značajnije razlike u njihovoj pojavnosti među pojedinim skupinama ispitanika. (Shao ZQ, 2015).

TABLICA 3. Režim doziranja pojedinih aktivnih tvari (Shao ZQ, 2015)

AKTIVNA TVAR	TJEDAN				
	1	2	3	4	5-24
Memantin	1x5 mg	2x5 mg	1x10 mg ujutro, 1x5 mg popodne	2x10 mg	2x10 mg
Donepezil	1x5 mg	1x5 mg	1x5 mg	1x5 mg	1x10 mg
Rivastigmin	2x1,5 mg	2x1,5 mg	2x1,5 mg	2x1,5 mg	2 x 3 mg
Galantamin	2x2 mg	2x2 mg	2x4 mg	2x4 mg	2x6 mg
Huperzin a	2x0,1 mg	2x0,1 mg	2x0,1 mg	2x0,1 mg	2x0,1mg
Placebo	2x1 tbl	2x1 tbl	2x1 tbl	2x1 tbl	2x1 tbl

4.3.2. Djelovanje Huperzina A na patološke promjene u Alzheimerovoj demenciji

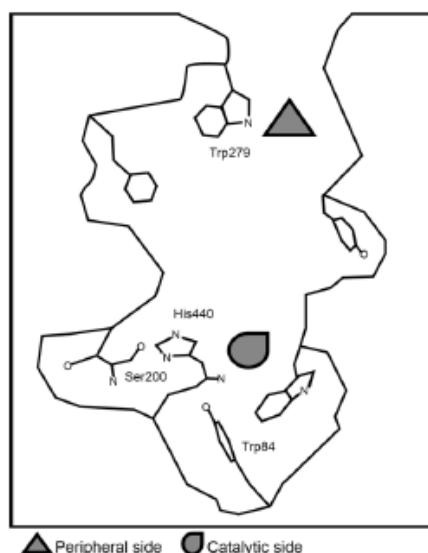
Antikolinesterazno djelovanje: Huperzin A snažan je reverzibilni kompetitivni inhibitor acetilkolinesteraze što je ustanovljeno ubrzo nakon njegova otkrića brojnim *in vivo* ispitivanjima provedenim na štakorima (Pong i sur., 2015; Ferreira i sur., 2014). *In vitro* testiranja pokazala su da je njegova učinkovitost slična ili bolja u usporedbi s inhibitorima odobrenim u liječenju Alzheimerove demencije. Usporedbom dobivenih IC₅₀ vrijednosti (koncentracija tvari potrebna za inhibiciju 50% enzima) uočeno je kako je Hup A potentniji inhibitor acetilkolinesteraze od takrina, galantamina i rivastigmina (tablica 4) (Wang i sur., 2006).

TABLICA 4. *In vitro* inhibitorna aktivnost huperizina A na acetilkolinesterazu u usporedbi s odobrenim inhibitorima acetilkolinesteraze (Wang i sur., 2006)

AKTIVNA TVAR	IC ₅₀ (μM)
Huperzin A	0,082
Takrin	0,093
Donepezil	0,010
Rivastigmin	181,39
Galantamin	1,995

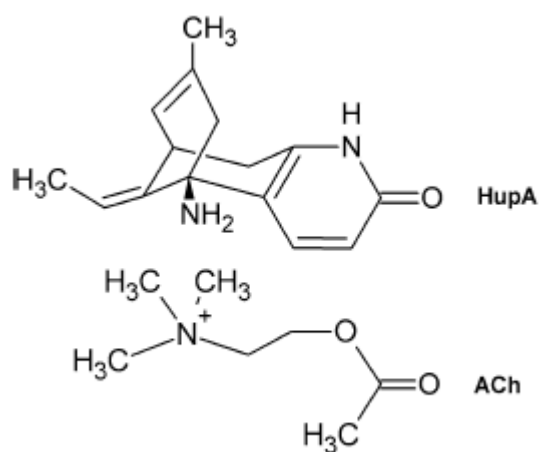
Osim veće selektivnosti za acetilkolinesterazu, Laganieri i suradnici (1991) pokazali su da, za razliku od odobrenih acetilkolinesteraznih inhibitora, dugotrajna primjena huperzina A ne dovodi do razvoja tolerancije i smanjene inhibicije enzima. Ispitivanje je provedeno na štakorima, a približno jednaka učinkovitost inhibicije enzima uočena je nakon jednokratne intraperitonealne primjene 0,5 mg/kg te nakon dugotrajnog uzimanja Hup A (0,5 mg/kg dva puta na dan kroz pet dana). U studiji nije zabilježena promjena aktivnosti acetilkolin-transferaze pa je zaključeno kako huperzin A nema utjecaja na sintezu acetilkolina (Ferreira i sur., 2014).

Rendgenskom kristalografijom kompleksa acetilkolinesteraze iz ribe *Torpedo californica* i huperzina A uočeno je da amino skupina huperzina A ulazi u interakciju s triptofanom 279 na ulazu u samo katalitičko mjesto. Drugo vezno mjesto nalazi se iznad triptofana 84 u unutrašnjosti katalitičkog mjesta (slika 17) (Ferreira i sur., 2014; Zangara, 2003).



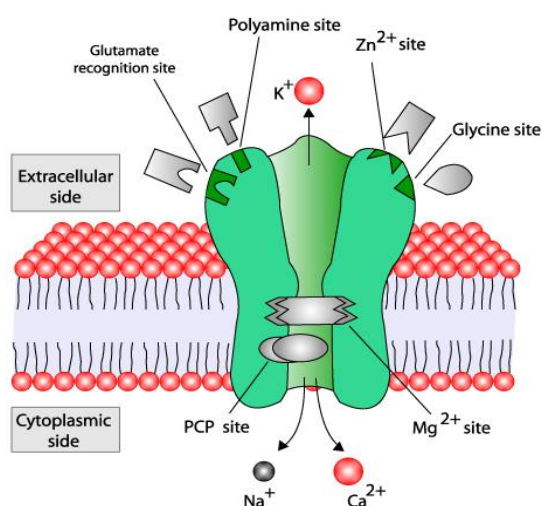
SLIKA 17. Prikaz katalitičkog mjesta acetilkolinesteraze (Ferreira i sur., 2014)

Zanimljivo je da Hup A posjeduje osnovne strukturne značajke acetilkolina. Strukturna sličnost nalazi se između kvarternog dušika, kisika i karbonilne skupine acetilkolina te aminoskupine, dušika iz α -piridonskog prstena i karbonilne skupine huperzina A (slika 18). Čini se da je udaljenost amino skupine i karbonilne skupine huperzina A jednaka udaljenosti kvarternog dušika i karbonilne skupine acetilkolina. Prema tome, aktivnom komponentom smatra se 5-aminometil-2-piridonski dio huperzina A (Ferreira i sur., 2014).



SLIKA 18. Strukturna sličnost acetilkolina i huperzina A (Ferreira i sur., 2014)

Djelovanje na glutamatne (NMDA) receptore: Osim antikolinesternog djelovanja, Hup A pokazuje i antagonističko djelovanje na NMDA receptore čime reducira ekscitotoksično djelovanje glutamata (Pong i sur., 2015). Regulatorna mjesta NDMA receptora sastoje se od mjesta prepoznavanja glutamata, kation-selektivnih ionskih kanala te veznih mjesta za glicin, cink i poliamine (slika 19). Promatranjem učinka huperzina A na svako pojedino vezno mjesto NMDA receptora *in vitro*, pokazano je kako Hup A inhibira djelovanje glutamata nekompetitivno, ulazeći u interakciju s ionskim kanalom receptora. U istom ispitivanju pokazano je i kako dodatak Hup A u staničnu kulturu 45 minuta prije izlaganja stanica djelovanju glutamata povećava postotak preživljavanja stanica s 35% na 85% (Ferreira i sur., 2014; Gordon i sur., 2001).



SLIKA 19. Shematski prikaz NMDA receptora (<http://www.anaesthesiauk.com/>)

Djelovanje na amiloidni plak: U nekoliko ispitivanja pokazan je također i povoljan učinak huperzina A na smanjenje negativnog djelovanja β -amiloida. *In vitro* ispitivanjem provedenim na PC12 stanicama dokazano je da dvosatna preinkubacija stanica s huperzinom A u koncentraciji većoj od 0,01 μ M dovodi do značajno većeg preživljenja stanica nakon njihovog izlaganja β -amiloidu (Xiao i sur., 2000). Neočekivani rezultati prethodne studije potaknuli su znanstvenika Wang i njegove suradnike da ispituju može li huperizin A spriječiti i memorijski deficit izazvan infuzijom β -amiloida *in vivo*. Uslijedila je studija na štakorima koja je potvrdila da huperzin A može smanjiti deficit memorije i oštećenje neurona uzrokovanih intracerebroventrikularnom infuzijom β -amiloida (Wang i sur., 2001).

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu dan je pregled bioaktivnih sastavnica i kliničkih studija odabranih biljnih vrsta tradicionalne kineske medicine s potencijalom primjene u prevenciji i liječenju Alzheimerove bolesti: *Panax Ginseng* C. A. Meyer, *Ginkgo biloba* L. i *Huperzia serrata* (Thunb ex. Murray) Trev.

Kliničke studije učinkovitosti i sigurnosti primjene pripravaka ginsengovog korijena dala su vrlo obećavajuće rezultate, ali metodološki propusti nisu izostali. Studije su obuhvaćale mali broj volontera te su relativno kratko trajale. Nadalje, oba ispitivanja provedena na starijim osobama oboljelim od Alzheimerove demencije bila su otvorenoga tipa zbog čega se ne može isključiti pojava placebo efekta te njegov nepovoljan učinak na dobivene rezultate.

Slični zaključci i problemi dobiveni su i pregledom kliničkih studija huperzina A, alkaloida izoliranog iz vrste *Huperzia serrata*. Za razliku od kliničkih ispitivanja ekstrakata ginsengovog korijena, sve su opisane studije provedene na osobama oboljelim od Alzheimerove demencije. Dobiveni rezultati ukazuju na povoljan učinak ovog alkaloida na kognitivne funkcije, ponašanje i svakodnevno funkcioniranje, međutim, zbog nedostataka u metodologiji još uvijek se ne može podržati rutinsko korištenje huperzina A u liječenju Alzheimerove bolesti. Osim malog broja sudionika, kratkog trajanja studija te nekih studija jednostruko slijepog i otvorenog tipa, problem predstavlja i mjesto provođenja studija. Većina studija napravljena je u Kini zbog čega ne možemo biti sigurni da su zaključci o blagotvornom učinku droge reprezentativni za različite rasne skupine.

Dvije studije u kojima je ekstrakt ginkovog lista ocijenjen kao siguran za primjenu nisu dokazale njegovu učinkovitost u liječenju Alzheimerove bolesti. Nešto novije studije uz potpunu sigurnost primjene ekstrakta pokazuju i pozitivan učinak na poboljšanje kognitivnih i neuropsihijatrijskih funkcija. Za razliku od kliničkih testiranja ginsengovog korijena i huperzina A, studije provedene s ekstraktom ginkovog lista imale su veći broj ispitanika. Nadalje, sva su ispitivanja bila dvostruko slijepa i provedena na osobama oboljelim od Alzheimerove demencije. No, zbog njihovog relativno kratkog trajanja, ne može se donijeti konačan zaključak o učinkovitosti i dugoročnoj sigurnosti ginka u liječenju ove bolesti.

Ginseng, ginko i kineska huperzija predstavljaju potencijalni izvor bioaktivnih tvari za terapiju ove teške demencije, ali potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se u potpunosti razjasnili mehanizmi djelovanja te pružili dodatni klinički dokazi o učinkovitosti i sigurnosti ovih biljnih vrsta tijekom njihove dugotrajne primjene.

6. LITERATURA

AnaesthesiaUK, 2009, <http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100515>, pristupljeno 15.08.2016.

Atelle AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58, 1685-1693.

Barnes J, Anderson LA, Phillipson DJ. Herbal medicines. London, Pharmaceutical Press, 2007, str. 299-312, 325-334.

Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier Y, Quirion R. The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by β -amyloid. *Euro J Neurosci*, 2000, 12, 1882-1890.

Brinar V, Hajšnek S, Malojčić B, Habek M, Klepac N, Lušić I, Zadro I, Žagar M, Petravić D, Bašić S, Jurjević A. Kognitivni poremećaji, akutna konfuzija ili smetena stanja, amnestički sindrom i demencije. U: Neurologija za medicinare. Urednik Anđa Raič, 2009, str. 444-450.

Chen F, Eckman EA, Eckman CB. Reduction in levels of the Alzheimer's amyloid β peptide after oral administration of ginsenosides. *The FASEB J*, 2006, 20, 599-604.

Chevallier A. Encyclopedia of medicinal plants. London, A Dorling Kindersley Book, 2001, str. 120.

Colciaghi F, Borroni B, Zimmermann M, Bellone C, Longhi A, Padovani A, Cattabeni F, Christen Y, DiLuca M. Amyloid precursor protein metabolism is regulated toward alpha-secretase pathway by *Ginkgo biloba* extracts. *Neurobiol Dis*, 2004, 16, 454-460.

Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M. Bolesti živčanog sustava. U: Patologija. Urednik Anđa Raič, Medicinska naklada, 2014, str. 825-827.

Davidson JRT, Connor KM. Ginkgo, fountain of youth and vitality. U: Herbs for the mind. The Guilford Press, 2000, str. 146-191.

Demarin V, Traknjec Z. Demencije. U: Neurologija za stomatologe. Urednik Anđa Raič, Medicinska naklada, 2008, str. 151-158.

Drugs.com, 2009, <https://www.drugs.com/npp/huperzine-a.html>, pristupljeno 13.08.2016.

EMA (European Medicines Agency). Assessment report on *Panax ginseng* C. A. Meyer, radix. European Medicines Agency, London, 2013, 1-123.

EMA (European Medicines Agency). Assessment report on Ginkgo biloba L., folium. European Medicines Agency, London, 2014, 1-116.

Etsy, 2016, <https://www.etsy.com/listing/77655785/ginkgo-leaves-print-ginkgo-leaf>, pristupljeno 24.08.2016.

Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, Falcao A, Alves G. Huperzine A from Huperzia serrata: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. *Phytochem Rev*, 2014, 15, 51-85.

Gamulin S, Marušić M, Kovačić Z i sur. Poremećaji moždanih funkcija. U: Patofiziologija – knjiga prva. Urednik Anđel Raič, Medicinska naklada, 2011, str. 1147.

Ginsenosides, 2010, <http://www.ginsenosides.org/en/classification-of-ginsenosides/>, pristupljeno 10.07.2016.

Gordon R, Nigam SV, Weitz JA, Dave JR, Doctor BP, Ved HS. The NDMA receptor ion channel: a site for binding of huperzine A. *J Appl Toxicol*, 2001, 21, 47-51.

Heo JH, Lee ST, Chu K, Oh MJ, Park HJ, Shim JY, Kim M. An open-label trial of Korean red ginseng as an adjuvant treatment for cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2008, 15, 865-868.

Heo JH, Lee ST, Oh MJ, Park HJ, Shim JY, Chu K, Kim M. Improvement of cognitive deficit in Alzheimer's disease patients by long term treatment with Korean red ginseng. *J Ginseng Res*, 2011, 35, 457-461.

Herrschaft H, Nacu A, Likhachev S, Sholomov I, Hoerr R, Schlaefke S. Ginkgo biloba extract Egb 761® in dementia with neuropsychiatric features: a randomised, placebo-controlled trial to confirm the efficacy and safety of a daily dose of 240 mg. *J Psychiatr Res*, 2012, 46, 716-723.

Ihl R, Tribanek M, Bachinskaya N, for the GOTADAY Study Group. Efficacy and tolerability of a once daily formulation of Ginkgo biloba extract EGb 761® in Alzheimer's disease and vascular dementia: results from a randomised controlled trial. *Pharmacopsych*, 2012, 45:41-46.

Iloveherbalism, 2015, <http://iloveherbalism.com/10-top-herbs-that-improve-your-memory-naturally/>, pristupljeno 13.08.2016.

Jaswinder K, Rajmeet S, Gurinder S, Harpreet K, Jasvir K, Manpreet K, Parminder S, Jaspreet K. A systematic review on *Huperzia serrata*. *Int J Pharmac Phyto Res*, 2016; 8, 1250-1255.

Jeong J. EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol*, 2004, 115, 1490-1505.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Special aspects of geriatric pharmacology. U: Basic and clinical pharmacology. Urednik Michael Weitz, Harriet Lebowitz, The McGraw Hill Medical, 2012, str. 1054-1055.

Kennedy DO, Scholey AB. Ginseng: potential for the enhancement of cognitive performance and mood. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75, 687-700.

Kennedy DO, Scholey AB, Wesnes KA. Modulation of cognition and mood following administration of single doses of Ginkgo biloba, ginseng, and a ginkgo/ginseng combination to healthy young adults. *Physiol Behav*, 2002, 75, 739-751.

Kuštrak D. Farmakognozija – fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – tehnička knjiga, 2005, str. 274-277, 417-424.

Lee ST, Chu K, Sim JY, Heo JH, Kim M. *Panax ginseng* enhances cognitive performance in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2008, 22, 222-226.

Leung PC. Botanical supplements for aging. U: Healthy Aging. Urednik Ping-Chung Leung, Singapur, *World Scientific*, 2011, str. 55-93.

Li J, Wu HM, Zhou RL, Liu GJ, Dong BR. Huperzine A for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database Syst Rev*, 2009, 1:1-30.

Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, Khan I, Netzerw J, Xu H, Butko P. Inhibition of amyloid- β aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 19, 197-202.

Ma X, Tan C, Zhu D, Gang DR, Xiao P. Huperzine A from huperzia species - an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113, 15-34.

Ma X, Tan C, Zhu D, Gang DR. Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of *Huperziaceae* species in China. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 1393-1398.

Mazza M, Capuano A, Bria P, Mazza S. *Ginkgo biloba* and donepezil: a comparison in the treatment of Alzheimer's dementia in a randomized placebo-controlled double-blind study. *Eur J Neurol*, 2006, 13, 981-985.

McCarney R, Fischer P, Iliffe S, Van Hasel R, Griffin M, Van der Meulen J, Warner J. *Ginkgo biloba* for mild to moderate dementia in a community setting: a pragmatic, randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2008, 23, 1222-1230.

Napryeyenko O, Sonnik G, Tartakovsky I. Efficacy and tolerability of *Ginkgo biloba* extract EGb 761® by type of dementia: analyses of a randomised controlled trial. *J Neurol Sci*, 2009, 283, 224-229.

Pharma Wiki, 2015, <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Ginkgo>, pristupljeno 09.08.2016.

Plant illustrations, 2016, http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=47128, pristupljeno 13.08.2016.

Pong YN, Cho T, Or T, Nancy Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 2015, 89, 260-270.

Rafii MS, Walsh S, Little JT, Behan K, Reynolds B, Ward C. A Phase II trial of hupezhine A in mild to moderate Alzheimer's disease. *Neurol*, 2011, 76, 1389-1394.

Sabater-Jara AB, Souliman-Youssef S, Novo-Uzal E, Almagro L, Bleichi-Navarro S, Pedreno MA. Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba*. *Phytochem Rev*, 2013, 12, 191-205.

Scholey AB, Kennedy DO. Acute, dose-dependent cognitive effects of *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng* and their combination in healthy young volunteers: differential interactions with cognitive demand. *Hum Psychopharmacol*, 2002, 17, 35-44.

ScienceSource, 2014, <http://www.sciencesourcemedicalimages.com/blog/2014/3/12/new-blood-test-may-predict-alzheimers-disease>, pristupljeno 05.07.2016.

SeniorSure, 2015, <http://seniorsure.com/the-causes-of-alzheimers/>, pristupljeno 02.07.2016.

Shao SQ. Comparison of the efficacy of four cholinesterase inhibitors in combination with memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8, 2944-2948.

Shi C, Liu J, Wu F, Yew DT. *Ginkgo biloba* extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice. *Int J Mol Sci*, 2010, 11, 107-123.

Vellas B, Coley Nicola, Ousset PJ, Berrut G, Dartigues JF, Dubois B, Grandjean H, Pasquier F, Piette F, Robert P, Touchon J, Garnier P, Mathiex-Fortunet H, Andrieu S. Long-term use of standardised *Ginkgo biloba* extract for the prevention of Alzheimer's disease (GuidAge): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 2012, 11, 851-859.

Wang B, Wang H, Wei Z, Song Y, Zhang L, Chen H. Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *J Neural Transm*, 2009, 116, 457–465.

Wang R, Yan H, Tang X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27, 1–26.

Wang R, Zhang HY, Tang XC. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degradation caused by β -amiloid protein-(1-40) in rat. *Eur J Pharmacol*, 2001, 421, 149-156.

WHO (World Health Organization). WHO monographs on selected medicinal plants, Volume 1, Folium Ginkgo, Radix Ginseng. World Health Organization, Geneva, 1999, 154-183.

WikimediaCommons,2014,

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ginkgo_biloba_scanned_leaves.png, pristupljeno 24.08.2016.

Wikimedia Commons, 2011, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ginkgolic_acid_2.svg, pristupljeno 24.08.2016.

Wikipedia, 2016, https://en.wikipedia.org/wiki/Ferulic_acid, pristupljeno 16.08.2016.

Wu TY, Chen CP, Jinn TR. Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease. *Taiwanese J Obstet Gynecol*, 2011, 50, 131-135.

Xiao Q, Wang R, Tang XC. Huperzine A and tacrine attenuate β -Amyloid peptide-induced oxidative injury. *J Neurosci Res*, 2000, 61, 564-569.

Xie H, Wang JR, Yau LF, Liu Y, Liu L, Han QB, Zhao Z, Jiang ZH. Quantitative analysis of the flavonoid glycoside and terpene trilactones in the extract of *Ginkgo biloba* and evaluation of their inhibitory activity towards fibril formation of β -Amyloid peptide. *Molecules*, 2014, 19, 4466-4478.

Yancheva S, Ihl R, Nikolova G, Panayotov P, Schlaefke S, Hoerr R for the GINDON Study Group. *Ginkgo biloba* extract EGb 761[®], donepezil or both combined in the treatment of Alzheimer's disease with neuropsychiatric features: a randomised, double-blind, exploratory trial. *Aging Ment Health*, 2009, 2, 183-190.

Zangara A, The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75, 675-686.

Zhang Z, Wang X, Chen Q, Shan G. Clinical efficacy and safety of huperzine alpha in treatment of mild to moderate Alzheimer disease, a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Zhonghua yi xue za zhi*, 2002, 82, 941-944.

7. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Ginseng, ginko i kineska huperzija ljekovite su biljke tradicionalne kineske medicine i bogat izvor bioaktivnih sastavnica. Svoju dugotrajnu primjenu, zadržanu do danas, zahvaljuju širokom rasponu indikacija i djelotvornosti u liječenju istih. Još od davnine, smatra se kako ljekoviti pripravci ovih biljaka pozitivno djeluju na kognitivne funkcije što je nedavno potvrđeno i u nekoliko kliničkih ispitivanja. Njihova bi uporaba mogla biti od velikog značaja u prevenciji i liječenju Alzheimerove demencije s obzirom da su registrirani lijekovi slabo djelotvorni i služe samo u simptomatskoj terapiji.

SUMMARY

Asian ginseng, ginkgo and Chinese club moss are plants from Traditional Chinese Medicine and a rich source of bioactive components. Their long-term use, retained until today, thanks to a wide range of indications and effectiveness in the treatment. Since ancient times, it is believed that these drugs have a positive effect on cognitive function as recently confirmed in several clinical trials. Using this drugs could be of great importance in the prevention and treatment of Alzheimer's dementia due to low efficiency and only symptomatic treatment achieved with so far registered drugs.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmakognozijsku
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Odabrane biljne droge tradicionalne kineske medicine u prevenciji i liječenju Alzheimerove bolesti

Celija Milić

SAŽETAK

Ginseng, ginko i kineska huperzija ljekovite su biljke tradicionalne kineske medicine i bogat izvor bioaktivnih sastavnica. Svoju dugotrajnu primjenu, zadržanu do danas, zahvaljuju širokom rasponu indikacija i djelotvornosti u liječenju istih. Još od davnine, smatra se kako ljekoviti pripravci ovih biljaka pozitivno djeluju na kognitivne funkcije što je nedavno potvrđeno i u nekoliko kliničkih ispitivanja. Njihova bi uporaba mogla biti od velikog značaja u prevenciji i liječenju Alzheimerove demencije s obzirom da su registrirani lijekovi slabo djelotvorni i služe samo u simptomatskoj terapiji

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 19 slika i 63 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Huperzia serrata*, tradicionalna kineska medicina

Mentor: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Biljana Blažeković, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Željka Vanić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujna, 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Selected herbal drugs of Traditional Chinese Medicine in the prevention and treatment of Alzheimer's disease

Celija Milić

SUMMARY

Asian ginseng, ginkgo and Chinese club moss are plants from traditional Chinese medicine and a rich source of bioactive components. Their long-term use, retained until today, thanks to a wide range of indications and effectiveness in the treatment. Since ancient times, it is believed that these drugs have a positive effect on cognitive function as recently confirmed in several clinical trials. Using this drugs could be of great importance in the prevention and treatment of Alzheimer's dementia due to low efficiency and only symptomatic treatment achieved with so far registered drugs.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 19 figures and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alzheimer's disease, *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, *Huperzia serrata*, Traditional Chinese Medicine

Mentor: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sanda Vladimir-Knežević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Blažeković, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vanić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2016.