

Imunomodulacijski učinak vrsta roda Echinacea

Škrlec, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:390969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



Nikolina Škrlec

**Imunomodulacijski učinak vrsta roda
Echinacea**

DIPLOMSKI RAD

Predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

Zahvaljujem Svemogućem Bogu koji je stvorio u meni želju za studijem farmacije, a zatim providio snagu za završetak. Zahvaljujem svojoj obitelji koja je bila uz mene i vjerovala u moj uspjeh kao i prijateljima koji su bili tu.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada, kao i zanimljivim predavanjima zbog kojih sam zaveljela Farmakologiju.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	4
1.1.	EHINACEA SP.....	4
1.2.	KEMIJSKE SASTAVNICE ECHINACEE SP.....	5
1.3.	KLINIČKA PRIMJENA.....	7
1.4.	KVALITETA BILJNIH DROGA.....	8
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3.	MATERIJALI I METODE.....	11
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	12
4.1.	FARMAKOLOGIJA IMUNOMODULACIJSKOG UČINKA.....	12
4.1.1.	DJELOVANJE NA MAKROFAGE.....	12
4.1.2.	DJELOVANJE NA T LIMFOCITE.....	15
4.1.3.	DJELOVANJE NA CITOKINE.....	17
4.1.4.	DJELOVANJE NA DENDRITIČNE STANICE.....	20
4.2.	BIORASPOLOŽIVOST.....	22
4.3.	METABOLIZAM, INTERAKCIJE I NUSPOJAVE.....	22
4.4.	BILJNI LIJEKOVI DOSTUPNI U HRVATSKOJ.....	24
5.	ZAKLJUČCI.....	28
6.	LITERATURA.....	29
7.	SAŽETAK/SUMMARY.....	33

1. UVOD

1.1. ECHINACEA SP.

Kratka povijest upotrebe

Tri vrste roda Echinacea (Slika 1) koristile su se stoljećima kao narodni lijek među američkim Indijancima. To su Echinacea purpurea (L.) Moench, Echinacea angustifolia McGregor i Echinacea pallida (Nutt.) Nutt. Rod Echinacea pripada obitelji glavočika – Asteraceae.

(Britton, N.L., A. Brown, 1913.)



Slika 1. Echinacea purpurea (preuzeto s: <http://plants.usda.gov>)

Gotovo svi američki Indijanci koristili su je za mnoštvo indikacija među kojima su upala grla i desni, kašalj, zubobolja, razni upalni procesi, sepsa, probavni problemi, ugriz zmije i dr. (McKenna i sur., 2002.).

Nakon dolaska u Europu, u službenu europsku medicinu uveo ju je H.C.F. Meyer, njemački liječnik, koji ju je uvrstio u svoj preparat poznat kao „Meyerov čistač krvi“ 1870. godine. Preparat je sadržavao i druge ljekovite biljke i bio poznat kao preparat koji liječi sve što je privuklo pažnju drugih liječnika i Echinacea je postala jedna od najpopularnijih i

najistraživanijih biljaka u medicini. Do 1991. objavljeno je preko 200 istraživanja kemizma, farmakološkog učinka i kliničke primjene ove biljke. (McKenna, 2002.)

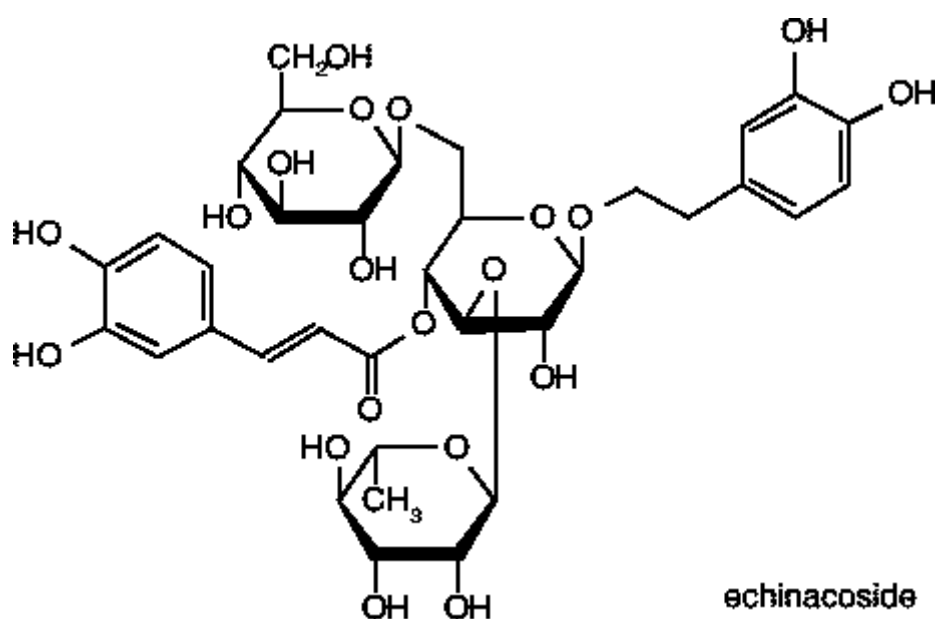
Nakon uspjeha Meyerovog „čistača krvi“, farmaceutska kuća Lloyd Brothers of Cincinnati upotrijebila je Echinaceu 1885. u nekoliko preparata kojima je osnovna namjena bila liječenje infekcija. Do 1930.-tih i uspona sulfonmida u liječenju infekcija, ljekoviti pripravci Echinacee bili najpopularniji proizvodi te farmaceutske kuće. (Tyler, 1999.)

Danas se najviše koristi kao imunostimulator i u sprječavanju i liječenju prehlade i gripe, a istraživanja su se usmjerila prema otkrivanju mehanizma djelovanja pojedinih sastavnica, pri čemu su najveću pozornost privukli alkilamidi.

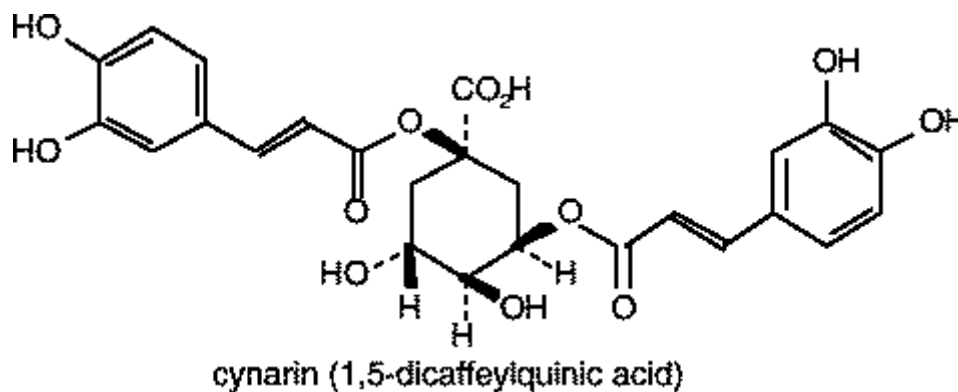
1.2. KEMIJSKE SASTAVNICE ECHINACEE SP.

Kao i kod svih biljnih droga, i kod Echinacee sp. postoje brojne kemijske komponente koje doprinose djelovanju. Udio kemijskih sastavnica razlikuje se ovisno o vrsti, biljnom organu, starosti biljke i uvjetima uzgoja. Spomenut ću sedam najvažnijih skupina djelatnih sastavnica koje su najčešća meta istraživanja ove biljke.

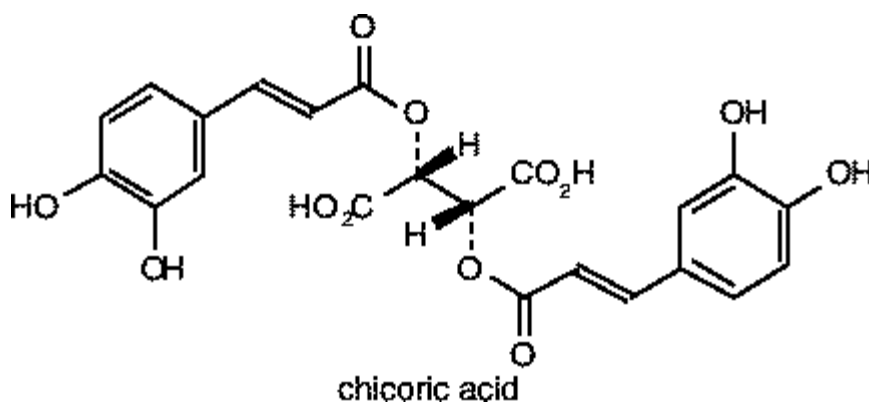
Derivati kavene kiseline: ehinakozid (Slika 2), verbaskoid, des-ramnozilverbaskozid, 6-O-kafeolehinakozid, cinarin (Slika 3), cikorijska kiselina (Slika 4) i drugi.



Slika 2. Ehinakozid (preuzeto s: <http://apps.who.int>)



Slika 3. Cinarin (preuzeto s: <http://apps.who.int>)



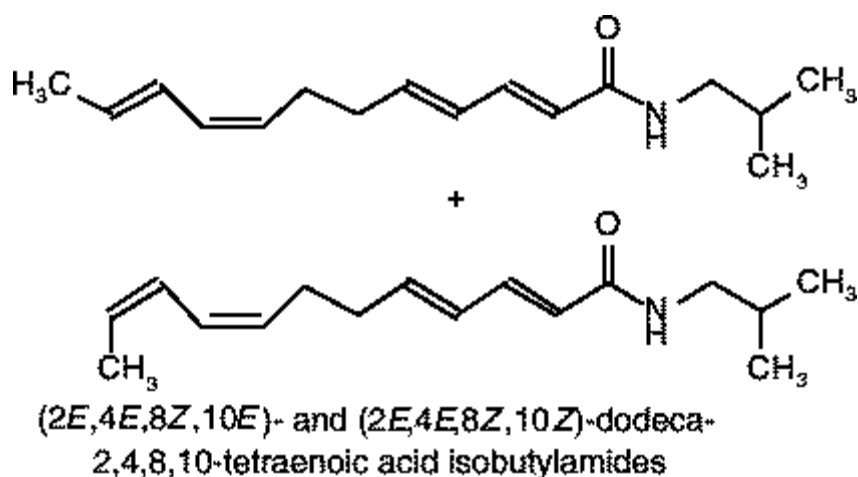
Slika 4. Cikorijska kiselina (preuzeto s: <http://apps.who.int>)

Flavonoidi: rutozid (najvažniji), luteolin, kemferol, kvercetin, kvercetaletin, apigenin i izoramnetin.

Eterična ulja čije su najčešće komponente borneol, bornil acetat, pentadeka-8-en-2-on, germacen D, kariofilen, kariofilen epoksid i palmitinska kiselina.

Poliacetileni: trideka-1-en-3,5,7,9,10-pentain i pontika-epoksid.

Alkilamidi: ehinacein (dodeka-(2E,6Z,8E,10E)-tetraenska kiselina, Slika 5) je prvi otkriveni alkilamid, a nakon njega je Bauer otkrio brojne druge. Alkilamidi su se pokazali najzaslužnijima za djelovanje Echinaceae na imunološki sustav.



Slika 5. Izobutilamidi (2E, 4E, 8Z, 10E) – i (2E, 4E, 8Z, 10Z) – dodeka – 2,4,8,10 – tetraenske kiseline (preuzeto s: <http://apps.who.int>)

Alkaloidi: betain, glicil betain, tusilagin i izotusilagin.

Polisaharidi: dvama polisaharidima se pripisuje imunostimulacijski učinak – 4-O-metil-glukuronoarabinoksilan i arabinoramnogalaktan.

Uz ove glavne komponente, vrste roda *Echinacea* sadrže i šećere, fitosterole, n-alkane i anorganske komponente (kalij, magnezij, željezo (III), aluminijske sulfate, karbonate, kloride i salicilate), seskviterpenske estere (ehinadiol-, ehinaksantol- i dihidroksinardol-cinamat), sitosterol, miristinsku i linolensku kiselinu te cijanidinske glikozide. (McKenna, 2002.)

1.3. KLINIČKA PRIMJENA

Danas se *Echinacea* sp. najviše koristi za prevenciju i liječenje prehlade i gripe. Meta analiza koja uključuje šest placebo kontroliranih kliničkih istraživanja i 2458 ispitanika pokazala je da etanolni ekstrakt *Echinacee* sp. smanjuje rizik ponavljajućih respiratornih infekcija za 50%. Također, broj komplikacija kao što su upala uha, pneumonija i tonzilitis je smanjen uslijed korištenja etanolnih ekstrakta *Echinacee*. (Schapowal A, 2015.)

Echinacea ima primjenu i kod drugih upalnih stanja kao što su upala uha, upala urinarnog trakta te kao pomoćna terapija kod vaginalne infekcije *Candidom albicans*. (www.herbalsafety.utep.edu)

Moguća je i eksterna primjena u obliku masti i koristi se za liječenje kožnih infekcija i zacjeljivanja rana. Istraživanje je pokazalo da je učinak kod kožnih infekcija prisutan zbog inhibicije bakterijskog enzima hijaluronidaze što sprečava bakterijama širenje unutar rane. Hijaluronidazu blokiraju derivati kavene kiseline. Osim sprečavanja širenja infekcije unutar rane, echinacea stimulira fibroblaste na proizvodnju granulacijskog tkiva. (Davis i Cupp, 2000.; Bauer, 1998.)

Istraživala se i primjena Echinacee u sportu za povećanje izdržljivosti i kapaciteta pluća, ali nije potvrđena njena učinkovitost u tom području. (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967264)

Zbog imunomodulacijskog djelovanja, istražuje se i njeno antikancerogeno djelovanje, posebice zbog povećanja aktivnosti makrofaga, a neka su istraživanja pokazala in vitro antikancerogeno djelovanje (Z)-1,8-pentadekadiena iz *E. angustifoliae* i *E. pallide*. (McKenna i sur., 2002.)

Možemo vidjeti da je imunomodulacijsko djelovanje Echinacee, koje je tema ovog rada, u pozadini svih pokazanih kliničkih učinaka ove biljke.

1.4. KVALITETA BILJNIH DROGA

O mjestu i načinu uzgoja biljke, podneblju, godišnjem dobu, dobu dana, dijelu biljke, načinu transporta, načinu skladištenja biljnog materijala, načinu izrade farmaceutskog pripravka kao i načinu skladištenja istog ovisi sadržaj aktivnih komponenata u konačnom proizvodu, a samim time i uspjeh terapije ljekovitim biljnim pripravkom.

Ukoliko se za etanolni ekstrakt, koji je najkorišteniji biljni pripravak ove biljke, koriste nadzemni dijelovi, bitno je da se koriste u svježem stanju jer sadržaj alkilamida, najvažnijih aktivnih komponenata, sušenjem pada na jednu trećinu.

Pri upotrebi korijena biljke, odstupanja nisu toliko izražena. HPLC-ESI-MS metodom utvrđeno je da se korištenjem suhog korijena za izradu etanolnog ekstrakta, sadržaj alkilamida bitno ne mijenja u odnosu na svježi korijen. Mijenja se jedino količina otopljenih čvrstih tvari i ona je viša za 38% pri upotrebi osušenog korijena. (Spelman K., 2009.)

Alkilamidi su najkoncentriraniji u korijenu i cvatu *E. angustifolije*, zatim u stabljikama *E. purpuree*, a *E. pallida* sadrži najmanje alkilamida bitnih za imunomodulacijsko djelovanje.

Najviše alkilamida nađeno je u nadzemnim dijelovima 1,5 godinu stare *E. purpuree*. Također, biljke rasle na Novom Zelandu pokazale su viši sadržaj navedenih aktivnih tvari od onih uzgajanih drugdje u svijetu.

Alkilamidi su termolabilne komponente pa je temperatura prilikom transporta i skladištenja biljne droge izrazito bitna jer smanjenje koncentracije aktivnih komponenata, smanjuje i djelovanje biljnog preparata. (McKenna i sur., 2002.)

Sadržaj cikorija kiseline u korijenu i nadzemnim dijelovima *E. purpuree* viši je ako je ona ubrana ljeti nego ujesen. (McKenna i sur., 2002.)

Postoje novi dokazi koji govore u prilog teoriji da imunostimulacijskom učinku Echinacee značajno doprinose i bakterije koje se nalaze na biljci. Jedno je istraživanje pokazalo snažnu korelaciju između povećanja broja bakterija i, posljedično, bakterijskih lipopolisaharida i povećanja imunostimulacijskog djelovanja biljnog preparata što se očitovalo u povećanoj aktivnosti makrofaga in vitro. (Pugh ND., 2013.)

Iz navedenih podataka vidimo da je kontrola procesa uzgoja biljke, načina izrade i skladištenja biljnog pripravka od esencijalne važnosti za njegovu kvalitetu, a time i učinak.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Echinacea je zbog svog izraženog imunomodulacijskog učinka jedna od najistraživanijih biljaka današnjice. Unatoč brojnim istraživanjima kemizma, mehanizma djelovanja pojedinih sastavnica, malo je relevantnih na dokazima utemeljenih podataka o učinkovitosti i sigurnosti iz kliničkih studija.

Na tržištu je danas dostupno mnoštvo preparata koji sadrže biljne ekstrakte vrsta roda Echinaceae, oni su različite, često i upitne, kvalitete i učinkovitosti. Popularnost Echinaceae kao „biljnog lijeka“ protiv infekcija, karcinoma i sl., sve više raste među populacijom, a time i rizici uslijed nepravilne primjene, interakcija s postojećom terapijom i sl.

Upravo iz navedenih razloga, uloga farmaceuta kao zdravstvenog djelatnika koji je najčešće u prilici savjetovati i educirati pacijente je vrlo važna. Svoje savjetovanje pritom farmaceut mora temeljiti na postojećim znanstvenim dokazima, prije svega zbog sigurnosti pacijenata.

Ciljevi ovog diplomskog rada bili su: prikazati značaj i raširenost korištenja preparata Echinaceae, ukazati na važnost kontrole kvalitete preparata koji se nalaze na tržištu, objasniti mehanizam imunomodulacijskog učinka, metabolizam glavnih komponenata te potencijalne interakcije, nuspojave i kontraindikacije preparata baziranih na ovoj biljci.

3. MATERIJALI I METODE

U ovom teorijskom diplomskom radu korištena je stručna i znanstvena literatura na temu imunomodulacijskog učinka Echinaceae sp. Pregledavane su knjige iz područja botanike, farmakologije, fitofarmacije, kao i članci usko vezani uz temu Echinaceae sp. i njenog imunomodulacijskog učinka. Pretraživane su također i mrežne stranice Svjetske zdravstvene organizacije i Agencije za lijekove i medicinske proizvode, kao i drugi izvori vezani za temu diplomskog rada.

Pretraživanje znanstvenih i stručnih članaka u bibliografskim bazama radilo se prema ključnim riječima: *echinacea*, *immune system*, *alkaloids*, *side effects*, *macrophage*, *cytokine*, *dendritic cells*, *T-lymphocyte*, *cancer*, *anti-inflammatory*, *immunomodulatory*, *sport*.

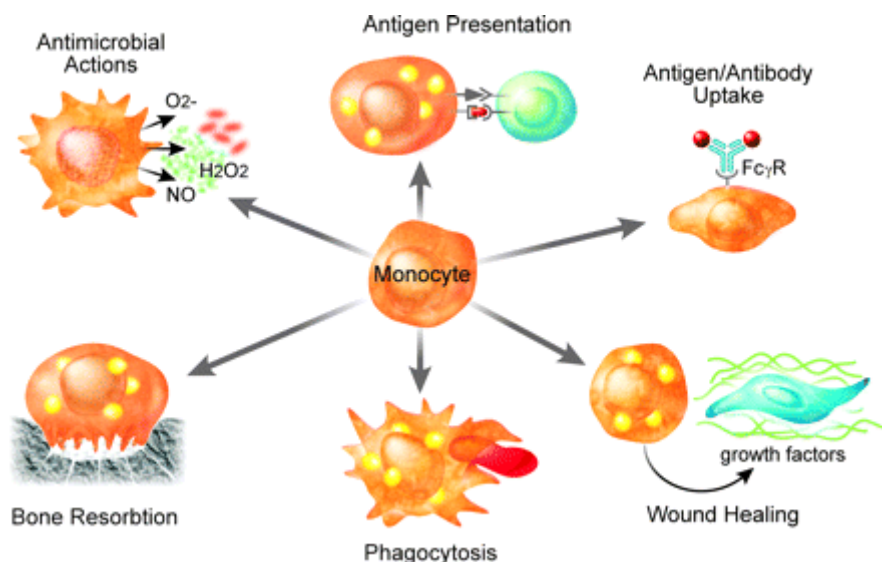
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. FARMAKOLOGIJA IMUNOMODULACIJSKOG UČINKA

Prema literaturnim podacima imunomodulacijsko djelovanje Echinacee je kompleksno i uključuje utjecaj na makrofage, T-limfocite, citokine i dendritične stanice. Za učinak je zaslužno sinergističko djelovanje mnogih komponenata biljke, a novija istraživanja su otkrila mehanizme djelovanja prvenstveno alkilamida na pojedine dijelove imunološkog sustava. (apps.who.int)

4.1.1. DJELOVANJE NA MAKROFAGE

Makrofagi su stanice nespecifičnog imuniteta koje su zadužene za uništavanje bakterija i virusa koji prođu tjelesne barijere (kožu, sluznice) te endogene oštećene ili apoptotičke stanice. Osim čišćenja „uljeza“ iz organizma, makrofagi predočavaju antigene limfocitima T. Uništavanje mikroorganizama i oštećenih stanica odvija se putem fagocitoze. Nemaju razvijene specifične receptore već receptore za opće molekularne obrasce mikroorganizama i opsoninske receptore. Uz predočavanje antigena i fagocitozu, makrofagi izlučuju i različite tvari u okoliš među kojima su najvažniji protuupalni citokini (faktor nekroze tumora - TNF-alfa i interleukini (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12)), kemokini, lipidni metaboliti iz skupine upalnih posrednika (prostaglandini i leukotrieni), koagulacijski čimbenici (protrombin), enzimi (lizozim, elastaze, kolagenaze), reaktivni intermedijeri kisika (H_2O_2 , OH, O_2^-) i dušika (NO, NO_2^-). Makrofagi povezuju specifičnu i nespecifičnu imunost jer predočuju proteinske antigene limfocitima T i izlučuju citokine koji pospješuju aktivaciju limfocita pa su važni u aferentnoj fazi specifične stanične i humoralne imunosti. S druge strane pak, sudjeluju i kao efektorske stanice pri razgradnji unutarstaničnih patogena pod utjecajem citokina koje izlučuju limfociti T. (Andreis i sur., 2010.)



Slika 6. Funkcionalna heterogenost u mirujućim i aktiviranim makrofagima. (preuzeto s: <http://circres.ahajournals.org>)

Makrofagi su prva linija obrane od unutarstaničnih patogena tako što uzrokuju upalni i respiratorni odgovor i pokreću prezentaciju antigena kako bi aktivirali adaptivnu imunost, čiste imuno-komplekse i reguliraju upalni odgovor te potiču zacjeljivanje rana tako što izlučuju faktore rasta. Podvrste tkivnih makrofaga, kao što su osteoklasti i makrofagi slezene postaju visoko specijalizirani na svom mjestu i funkciji.

Istraživanja su ispitivala utjecaj ekstrakata Echinacee, izoliranih alkilamida i fenola na aktivnost makrofaga.

Istraživanje iz 2005. godine koje su proveli Stevenson i suradnici., kao i istraživanje Matthiasa i suradnika iz 2007. godine ispitivali su utjecaj na makrofage praćenjem koncentracije nuklearnog faktora NF κ B, TNF α i NO u lipopolisaharidima aktiviranim makrofagima in vitro. Sve komponente etanolnog ekstrakta Echinacee osim monoenskog alkilamida (AA1) su smanjile koncentraciju NF κ B. Cikorijska kiselina, etanolni ekstrakt i alkilamidna frakcija značajno su smanjili koncentraciju TNF α , a samo je alkilamidna frakcija smanjila koncentraciju NO iz aktiviranih makrofaga. Iako je cikorijska kiselina pokazala određenu razinu aktivnosti na svim ispitivanim pokazateljima aktivnosti makrofaga, njen in vivo učinak nije značajan jer ima vrlo nisku bioraspoloživost – ne apsorbira se. Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajnu ulogu Echinacee kao modulatora aktivnosti makrofaga. (Stevenson LM, 2005.; Matthias A, 2007.)

Godine 2009. LaLone i suradnici proveli su istraživanje u kojem su ispitivali protuupalno djelovanje *E. purpure*, *E. angustifolie*, *E. pallide* i *E. tennesseensis* promatrajući koncentracije izlučenog prostaglandina E2 (PGE2) iz makrofaga aktiviranih lipopolisaharidima. Mjerili su i koncentraciju izlučenog NO i citotoksičnost. HPLC je korišten za razdvajanje sastavnica kako bi se odredilo koja ima najbolji protuupalni učinak. *E. pallida* je pokazala značajnu inhibiciju lučenja PGE2, a GC-MS tehnikom izdvojeni su Bauerovi ketoni 20, 21, 22, 23 i 24, s tim da su 23 i 24 pokazali najznačajnije djelovanje na inhibiciju lučenja PGE2. Kemijskom sintezom dobiveni Bauerovi ketoni 21 i 23 pokazali su inhibiciju lučenja i PGE2 i NO. Iz *E. angustifolie* izolirani su Bauerov keton 23 i Bauerov alkilamid 11. Bauerov keton 23 kemijski sintetiziran i korišten u koncentraciji ekvivalentnoj onoj iz ekstrakta biljke, smanjio je lučenje PGE2 za 83%, dok je Bauerov alkilamid 11 značajno smanjio produkciju i PGE2 i NO. Iz dobivenih rezultata zaključujemo da alkilamidi i ketoni iz *E. angustifolie* i *E. pallide* značajno utječu na aktivnost makrofaga i posjeduju imunomodulacijsko i protuupalno djelovanje. (LaLone CA, 2009.)

Nakon istraživanja 2009., LaLone i suradnici su 2010. napravili novo istraživanje u kojem su istraživali daljnji utjecaj Bauerovog ketona 23 i alkilamida 11 na makrofage, točnije, tražili su ciljne molekule njihovog djelovanja. Otkrili su da je smanjena proizvodnja COX-2 enzima u svim ispitivanim skupinama – lipopolisaharidima aktivirani makrofagi kojima je dodan ekstrakt *E. angustifolie*, fitokemijske frakcije i čisti sintetizirani standardi Bauerovog ketona 23 i Bauerovog alkilamida 11. Iz toga možemo zaključiti da je inhibicija lučenja PGE2 vjerojatno uzrokovana izravnom inhibicijom enzima COX-2 koji katalizira sintezu PGE2 iz arahidonske kiseline. (LaLone CA, 2010.)

Godine 2010. Cech i suradnici ispitivali su protuupalno djelovanje *E. purpuree* na stanice makrofaga inficirane virusom influenze H1N1. Promatrao se učinak na smanjenje produkcije citokina, kemokina i PGE2. Izolirani alkilamidi izobutilamid undeka-2Z,4E-dien-8,10-diinske kiseline, izobutilamid dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenske kiseline, izobutilamid dodeka-2E,4E-dienske kiseline i izobutilamid undeka-2E-en-8,10-diinske kiseline smanjili su produkciju TNF α i PGE2 iz inficiranih stanica. Etanolni ekstrakt pripremljen iz dormantnog korijena pokazao je paletu utjecaja na inficirane stanice – od supresije do stimulacije proizvodnje medijatora upale. Precipitacija ekstrakta uklonila je stimulacijski učinak, ali mnogi dijelovi ekstrakata tada nisu pokazivali niti supresijski učinak. Analiza ekstrakata pokazala je varijacije u sadržaju alkilamida koje nisu bile u značajnoj korelaciji s učinkom. Istraživanje je pokazalo da *E. purpurea* ima potencijal olakšavanja simptoma i liječenja

patologije povezane s influenzom tipa A, ali su potrebna daljnja istraživanja kojima bi se utvrdili postupci za jačanje učinka njenih aliklamida. (Cech NB, 2010.)

4.1.2. DJELOVANJE NA T-LIMFOCITE

Limfociti su najvažnije stanice imunološkog sustava jer su nosioci svih vrsta specifične imunosti. Limfociti T i prirodne stanice ubojice NK stanice nositelji su stanične imunosti. Nadalje, limfocite T razvrstavamo u subpopulacije prema CD – klasifikaciji, odnosno prema limfocitnim biljezima. Postoje CD4+ (pomagački) limfociti i CD8+ (citotoksični) limfociti. Nadalje, CD4+ limfocite dijelimo na T_{reg}, T_H17, T_H1 i T_H2. Subpopulacija limfocita T_H (eng. helper – pomagački) razlikuje se prema vrsti citokin koje luče nakon aktivacije. Citokini pojedine skupine sprečavaju razvoj limfocita druge skupine i tako usmjeravaju imunoreakciju na način koji će najbolje spriječiti zarazu. Limfociti T_H1 luče interferon γ (IFN- γ), interleukin 2 (IL-2) i TNF- β kojima je glavna zadaća razvoj stanične imunosti – aktivacija makrofaga i pomoć u diferencijaciji citotoksičnih limfocita T. Limfociti T_H2 luče IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 koji pomažu diferencijaciju limfocita B i proizvodnju protutijela. Limfociti T_H17 luče IL-17 i IL-22 i dovode do razvoja lokalne upale privlačenjem granulocita na mjesto ulaska uljeza. Regulacijski limfociti T_{reg} sprečavaju imunološki odgovor na vlastite i tuđe antigene djelovanjem na pomagačke T limfocite ili izravno na B limfocite i važni su za održavanje tolerancije, sprečavanje autoimunosti i neželjenih reakcija na tuđe antigene (alergije). Luče imunomodulacijske citokine IL-10 i TGF- β , a za njihov imunosupresijski učinak potreban je IL-2 za kojeg posjeduju receptor (CD25). (Andreis i sur., 2010.)

Aktivacijski biljezi dolaze na membrani limfocita kao posljedica aktivacije i nagovještaj score proliferacije i diferencijacije limfocita u efektorske stanice. Razlikujemo rane i kasne aktivacijske biljege. Rani se pojavljuju na membrani nekoliko sati nakon aktivacije, a uključuju CD25 (α -lanac receptora za IL-2), receptor za inzulin, CD71 (receptor za transferin) i biljeg CD69. Kasni aktivacijski biljezi su molekule MHC/HLA-II i VLA1-5. (Andreis i sur., 2010.)

Godine 2008. Matthias i suradnici istraživali su utjecaj aliklamida iz *E. purpuree* i *E. angustifoliae* na T limfocite. Promatrana je razina ekspresije NF κ B na Jurkatove stanice (humana linija T-limfocita). Na nestimulirane T-limfocite, *Echinacea* i njene izolirane

komponente nisu pokazale nikakav učinak, tj. razina ekspresije NF κ B je ostala nepromijenjena. U prisutnosti endotoksina (lipopolisaharida), ekspresija NF κ B se smanjila, a njena razina je ponovno podignuta dodatkom cikorijske kiseline, ekstrakta korijena *E. purpuree* i *E. angustifoliae* te alkilamidnom frakcijom obje vrste. U istraživanjima u kojima su stanice aktivirane forbol miristat acetatom, rezultati su bili miješani – cikorijska kiselina i 2,4-dienski alilamid su povećali ekspresiju Nf κ B, a 2-enski alkilamid je smanjio ekspresiju istog. Ekstrakt i alkilamidna frakcija Echinacee nisu pokazali učinak na tako aktivirane stanice. Pošto su dva oblika alkilamida pokazala suprotan učinak, možemo zaključiti kako je važno znati sastav i količinu pojedinog alkilamida i u biljnom farmaceutskom preparatu kako bi mogli prdvidjeti i usmjeriti učinak biljnog lijeka prema željenom učinku. (Matthias A, 2008.)

Spelman i suradnici su 2009. godine istraživali ciljne molekule djelovanja alkilamida iz Echinacee. U prijašnjim istraživanjima, alkilamidi iz Echinacee pokazali su kanabinoidnu aktivnost pa se aktivacija CB2 smatra glavnim mehanizmom imunomodulacije. U ovom se istraživanju pokazalo da undeka-2E-en-8,10-dinoična kiselina nema afinitet prema CB2 receptorima, ali je pokazala afinitet prema PPAR γ (receptor za aktivator proliferacije peroksisoma) receptorima za koje je također poznato da inhibiraju proizvodnju IL-2. To je dokazano dodatkom selektivnog PPAR γ antagonista koji je poništio inhibiciju lučenja IL-2 iz Jurkatovih stanica. Potvrđeno je i da undeka-2E-en-8,10-dinoična kiselina stimulira 3T3-L1 diferencijaciju koja je ovisna o aktivnosti PPAR γ . Ova studija dokazuje da je modulacija lučenja citokina iz T-limfocita uzrokovana polivalentnom aktivnošću pojedinih alkilamida. (Spellman K, 2009.)

Godine 2014. objavljeno je istraživanje u kojem su Fonseca i suradnici ispitivali koje komponente iz slabo kiselog vodenog ekstrakta nadzemnih dijelova *E. purpuree* imaju učinak (i kakav) na Jurkatove stanice aktivirane forbol miristat acetatom i ionomicinom (PMA+I). Mjereno je lučenje IL-2 i IFN γ u stanicama T-limfocita velike i male gustoće. Pokazalo se da ekstrakt sadrži 80% polisaharida, fenolne komponente, ali ne i alkilamide. Ekstrakt je uzrokovao pojačanu produkciju IL-2 ovisnu o dozi u T-limfocitima velike gustoće kao i povećani odgovor IFN γ na stimulaciju PMA+I. Nasuprot tome, u liniji T-limfocita male gustoće, ekstrakt je pokazao supresijski učinak na IFN γ i smanjen broj CD25+ stanica. Zaključujemo da polisaharidne komponente doprinose imunomodulacijskom učinku ovisno o gustoći T-limfocita i dozi. (Fonseca FN, 2014.)

Iste je godine objavljeno još jedno istraživanje koje su proveli Kim i suradnici, a odnosi se na utjecaj ekstrakta korijena E. purpure na regulatorne T limfocite (T_{reg}) in vivo na miševima. Protočnom citometrijom mjerena je količina $CD4+FoxP3+$ i $CD4+CD25+ T_{reg}$ limfocita nakon 3 tjedna primjene ekstrakta. Rezultati su pokazali smanjenu količinu $CD4+FoxP3+$ i $CD4+CD25+ T_{reg}$ limfocita što za posljedicu ima imunostimulacijski učinak. (Kim HR, 2014.)

4.1.3. DJELOVANJE NA CITOKINE

O citokinima

Citokini su niskomolekularni glikoproteini koji posreduju međustaničnu komunikaciju – potiču aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posreduju ili reguliraju imunoreakcije i upalne procese, a mogu djelovati i citotoksično. Djelovanje na ciljne stanice nastupa vezanjem na specifični receptor.

Dijelimo ih povijesno ili prema građi. Povijesno se dijele na interleukine, interferone, citotoksine i čimbenike rasta hematopoeznih stanica. Prema građi receptora ih dijelimo na hematopoetinsku porodicu (tip I receptora), interferonsku porodicu (tip II receptora), porodicu receptora za TNF, porodicu s receptorom poput imunoglobulina i porodicu kemokinskih receptora. Prema funkciji, citokine dijelimo na citokine urođene imunosti ($TNF\alpha$, IL-1, IL-8, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27, $IFN-\alpha$ i β), citokine specifične imunosti (IL-2, IL-4, IL-5, IL-15, IL-17, $IFN\gamma$), imunosupresijske citokine ($TGF\beta$, IL-10) i čimbenike rasta hematopoeznih kolonija (IL-3). (Andreis i sur., 2010.)

U daljnjem tekstu opisat će se funkcije citokina na koje Ehinacea ima učinak kako bi ga bolje razumjeli.

$TNF\alpha$ (čimbenik tumorske nekroze – eng. tumor necrosis factor) je snažan proupalni citokin koji djeluje na endotel krvnih žila i tamo aktivira endotelne stanice u upalnom području povećavajući njihovu adhezijsku sposobnost. To povećava prijanjanje upalnih stanica i njihov prolazak u upaljeno područje. Također, povećava prokoagulacijsko djelovanje endotelnih stanica i drugih prokoagulacijskih čimbenika što uzrokuje lokalno zgrušavanje krvi i mobilizira metabolite. Ova su djelovanja dio procesa kojim se nastoji lokalizirati upala te

usmjeriti dreniranje i obrada štetnog agensa prema regionalnom limfnom čvoru. Osim proupalno, TNF α djeluje i protutumorski. (Andreis i sur., 2010.)

Interleukin-6 smatra se proupalnim citokinom zbog povećanja lučenja proteina akutne faze u jetri što djeluje blago pirogeno. Sva ostala djelovanja su imunostimulacijska, a najvažnije je diferenciranje limfocita B u plazma stanice. Osim toga, potiče rast i diferencijaciju limfocita T i diobu jetrenih stanica.

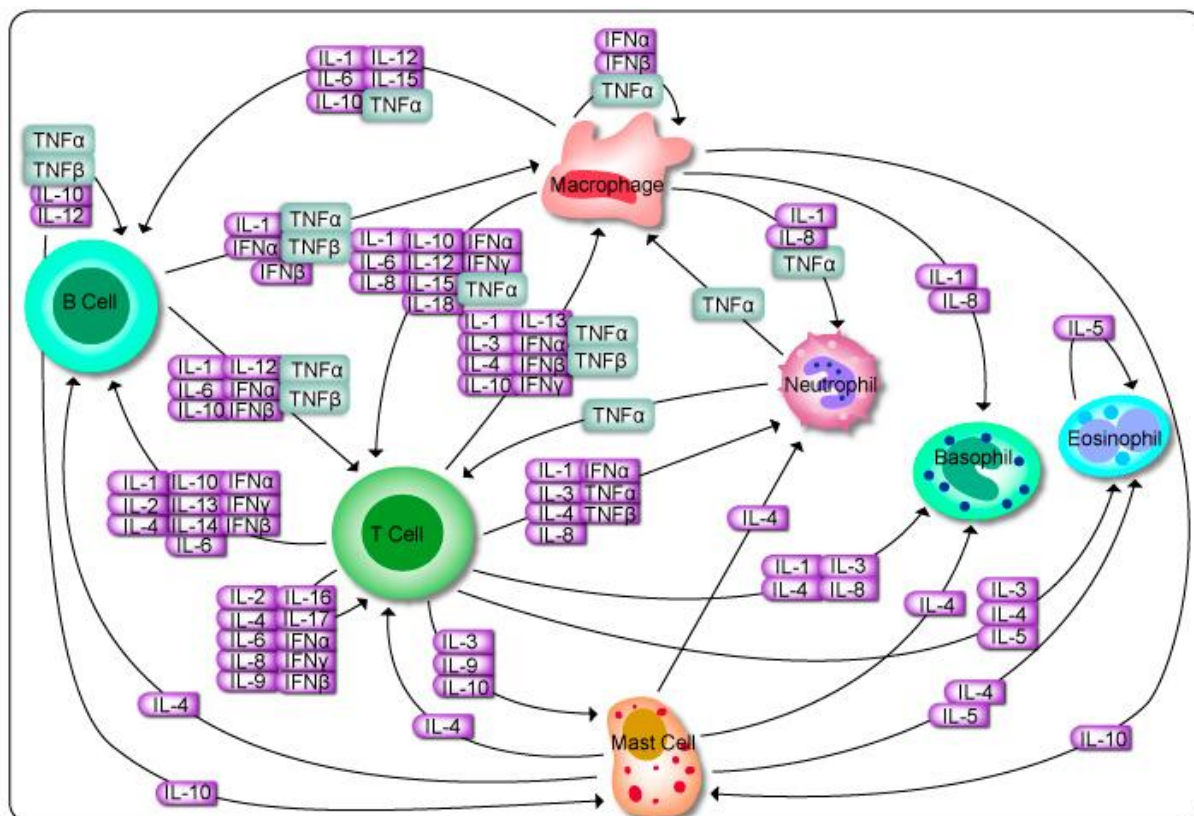
Interleukin-8 je zapravo kemokin koji privlači neutrofile.

Interleukin-12 je glavni medijator rane reakcije urođene imunosti na unutarstanične mikroorganizme i ključni poticajni čimbenik stečene imunosti posredovane stanicama prema tim mikrobima. Potiče T limfocite i NK stanice na proizvodnju IFN γ što potiče diferencijaciju stanica T_{H0} u T_{H1}.

Interleukin-2 omogućuje dugotrajan rast stimuliranih T limfocita in vitro pa se nazivao i hormonom rasta limfocita T (TCGF – prema eng. T-cell growth factor). Luče ga aktivirani pomagački limfociti. Ne djeluje na neaktivirane limfocite T jer imaju receptor malog afiniteta za IL-2. Samo limfociti T podraženi antigenom koji sadrže CD25 podjedinicu receptora proliferiraju u prisutnosti IL-2 što je važno za sazrijevanje citotoksičnih limfocita. IL-2 uzrokuje proliferaciju i povećava citotoksičnost NK stanica i manjeg dijela neaktiviranih T limfocita koji ne izražavaju visokoafinitetni receptor. Pri velikim dozama IL-2 djeluju nespecifično citotoksično za mnoge tumorske stanice. Također, IL-2 djeluje kao pomagač u sazrijevanju aktiviranih limfocita B. (Andreis i sur., 2010.)

Interferon γ (IFN γ) luče aktivirani limfociti T i NK stanice, a vjerojatno i makrofagi. On aktivira makrofage, NK stanice, diferencijaciju T_{H0} u T_{H1} i pojačava izražaj molekula MHC-I i MHC-II. Glavni je T_{H1} citokin koji inhibira stvaranje T_{H2} stanica i humoralnu imunost. Potiče i sintezu i povećava afinitet nekih podrazreda IgG koji djeluju kao opsonini ili vežu komplement. Ima snažno antiproliferacijsko djelovanje i pojačava lučenje drugih citokina.

Interleukin 10 je imunosupresijski citokin koji potiskuje funkcije makrofaga i sintezu T_{H1} citokina čime usmjerava imunološki odgovor prema humoralnoj imunosti – T_{H2}. (Andreis i sur., 2010.)



Slika 7. Mreža lučenja i djelovanja citokina. (preuzeto s: www.genecopoeia.com)

Istraživanja

Godine 2011. Ritchie i suradnici proveli su na 30 volontera istraživanje imunomodulacijskog učinka etanolnog ekstrakta E. pururee. Mjerile su se promjene u razini citokina u perifernoj krvi tijekom osmodnevne primjene ekstrakta. Krvni uzorci su stimulirani lipopolisaharidom ili Zymosanom i mjerene su razine citokina. Tretman ekstraktom smanjio je proupalne citokine TNFα i IL-1β do 24%, a povećao razinu protuupalnog IL-10 za 13% u usporedbi s početnim koncentracijama što dokazuje protuupalno djelovanje ekstrakta. Razina kemokina MCP-1 i IL-8 je povećana za 15%. Analiza podgrupa ispitanika sa specifičnim razinama ispitivanih parametara prije tretmana ekstraktom pokazala je sljedeće: kod volontera koji su imali niske razine citokina MPC-1, IL-8, IL-10 i IFN-γ prije tretmana ekstraktom, došlo je do porasta razine ovih parametara za 30-49% dok je razina spomenutih parametara kod ispitanika s višim razinama prije tretmana ostala nepromijenjena. Kod ispitanika koji su prijavili visoku razinu izloženosti stresu i više od dvije prehlade godišnje došlo je do porasta razine IFNγ za više od 50%. Kod ispitanika s niskom razinom kortizola došlo je do smanjenja razine proteina akutne faze IL-1β, IL-6, IL-12 i TNFα nakon tretmana ekstraktom Echinacee. Iako je uzorak relativno mali, temeljem ovog istraživanja možemo zaključiti da etanolni ekstrakt Echinacee

purpuree djeluje imunomodulacijski ovisno o zatečenom imunološkom statusu pacijenta. (Ritchie MR, 2011.)

Godine 2014. Dapas i suradnici proveli su pilot istraživanje u kojem su koristili standardizirani ekstrakt korijena *E. angustifolie* i promatrali njegov učinak na razinu citokina IL-2, IL-6, IL-8 i TNF- α kod 10 zdravih dobrovoljaca. Primjenjivano je 10 mL sirupa koji sadrži 4.7 mg ehinakozida i 8.0 mg polisaharida visoke molekularne mase kroz mjesec dana. Ekspresija citokina proučavana je mjerenjem mRNA i koncentracije proteina u plazmi i limfo-monocitima prije i poslije primjene ekstrakta. U limfo-monocitima zabilježeno je povećanje mRNA za IL-2 i IL-8 i smanjenje mRNA za IL-6 i TNF- α . Učinak je bio najznačajniji nakon 14 dana primjene. Povećanje razine IL-2 i IL-8 i smanjenje razine IL-6 pozitivno je koreliralo s razinom proteina u plazmi. Istraživanje pokazuje značajnu ulogu standardiziranog ekstrakta korijena *Echinacee angustifolie* u kontroli ekspresije citokina i doprinosi dokazima opravdanosti korištenja takvih ekstrakata u kliničkoj praksi. (Dapas B., 2014.)

Fast i suradnici 2015. godine ispitali su mehanizam inhibicije lučenja TNF- α iz ljudskih monocita. Korišten je etanolni ekstrakt korijena *Echinacee purpuree*. Analizom je utvrđena odsutnost polifenola i alkilamida pa se zabilježeni učinci pripisuju prisutnim polisaharidima. Istraživanje je pokazalo da je inhibicija oslobađanja TNF- α posredovana fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K)/Akt signalnim putem budući da je inhibicija PI3K inhibirala protuupalni učinak, odnosno spriječila inhibiciju lučenja TNF- α . Fosforilacija Akt-a i ribosomskog proteina S6 meta PI3K potvrdila je da korišteni etanolni ekstrakt posreduje aktivaciju ovog signalnog puta. Iz navedenog se može zaključiti da ne-alkilamidne/ne-polifenolne komponente iz *Echinacee* mogu doprinijeti protuupalnom djelovanju biljke. (Fast DJ, 2015.)

4.1.4. DJELOVANJE NA DENDRITIČNE STANICE

O dendritičnim stanicama

Dendritične stanice su predočne stanice – izlažu antigen limfocitima T na prepoznavanje. Dendritične stanice imaju duge citoplazmatske izdanke koji nalikuju na dendrite živčanog sustava. Kod čovjeka se nalaze u svim organima i sustavima osim mozga i rožnice te čine finu mrežu za hvatanje uljeza i njihovih antigena. Sve potječu od mijelopoetne prastanice koštane

srži, ali su im daljnji putovi diferencijacije i smještaja u tkivima različiti. Razlikujemo nekoliko podskupina:

- a) Langerhansove stanice – nalaze se prvenstveno u koži,
- b) intersticijske dendritične stanice – nalaze se u intersticijskom prostoru svih tkiva osim mozga,
- c) dendritične stanice podrijetla monocita – jedine koje se razvijaju tijekom upalnog procesa,
- d) plazmocitoidne dendritične stanice,
- e) konvencionalne dendritične stanice.

Zrele dendritične stanice imaju sposobnost predočavanja egzogenih i endogenih antigenskih peptida. Egzogene antigene upijaju pinocitozom posredovanom receptorima pri čemu je važan rceptor za manozu i slični lektinski receptori koji vežu šećerni dio bakterijskih antigena. Dendritične su stanice posebno važne u predočavanju virusnih antigena. Svi virusi lako ulaze u dendritične stanice i služe se genom domaćina za sintezu svojih proteina. Ti se proteini razgrađuju u citoplazmi i predočuju na površini u sklopu MHC/HLA-I molekula. Funkcija dendritičnih stanica ovisi o stupnju njihove zrelosti. Stanice u mirovanju izražavaju mali broj MHC/HLA-II kostimulacijskih molekula koje se pojavljuju u velikom broju na podražaj antigena i citokina iz okoline stanice. Tako se osigurava reakcija na one antigene koji su aktivirali dendritičnu stanicu umjesto na vlastite antigene. (Andreis i sur., 2010.)

Istraživanja

Godine 2010. Yin i suradnici istraživali su učinak butanolnog ekstrakta stabljike i lista Echinaceae purpuree na dendritične stanice miša. Rezultati su pokazali da tretman ekstraktom ne utječe na fenotipsko sazrijevanje dendritičnih stanica. Analizom gena eksprimiranih u dendritičnim stanicama tretiranim ekstraktom 4 ili 12h otkriveno je da je većina reaktivnih gena vezana za pokretljivost i sposobnost adhezije stanice (Cdh10, Itga6, Cdh1, Gja1 i Mmp8), ostalo su geni za kemokine (Cxcl2, Cxcl7) ili signalne molekule (Nr1h3, Pknox1 i Acsc1). Analizom genske ekspresije i povezanih signalnih putova u tretiranim stanicama utvrđeno je da su signalni putovi koji uključuju JNK, PP2C- α , AKT, ERK1/2 ili MAPKAPK glavne mete aktivnih komponenti iz korištenog ekstrakta. Proteonomska analiza pokazala je da je ekspresija metaboličkih, citoskeletnih i NF κ B signalnih proteina regulirana korištenim

ekstraktom. Nadalje, pokazalo se da se tretirane dendritične stanice učinkovitije kreću do perifernog limfnog čvora i tkiva slezene nego dendritične stanice kontrolne grupe. Iz navedenog zaključujemo da korišteni ekstrakt Echinacee purpuree modulira sposobnost pokretanja dendritičnih stanica i povezanu staničnu fiziologiju mišjeg imunološkog sustava. (Yin SY, 2010.)

4.2. BIORASPOLOŽIVOST

Pošto je bioraspoloživost nekog lijeka ključna za njegovo djelovanje in vivo, Matthias i suradnici su 2005. godine istražili bioraspoloživost alkilamida i derivata kavene kiseline iz etanolnih ekstrakata Echinacee. Koristili su Caco-2-monoslojeve i testirali koncentraciju u plazmi kod 12 dobrovoljaca. Dokazano je da derivati kavene kiseline nisu bioraspoloživi jer nisu prolazili kroz Caco-2-monoslojeve niti ih se moglo detektirati u plazmi ispitanika nakon oralne primjene. Zbog toga se njihov utjecaj na imunomodulacijski učinak dokazan in vitro ne može uzeti u obzir u kliničkoj primjeni. Za razliku od njih, alkilamidi su difundirali kroz Caco-2-monoslojeve i pronađeni su plazmi ispitanika 20 minuta nakon oralne primjene tableta proizvedenih od tekućeg etanolnog ekstrakta Echinacee. Zaključeno je kako bi ispravan režim doziranja u kliničkoj primjeni bio jedna tableta tri puta dnevno. Difuzija alkilamida kroz Caco-2-monoslojeve bila je ovisna o njihovoj strukturi i to tako da su saturacija i N-metilacija smanjile difuziju. Dokazano je i da druge sastavnice ne utječu na apsorpciju i bioraspoloživost alkilamida jer je bila ista kod sintetičkih alkilamida i kod onih iz etanolnog ekstrakta. (Matthias A, 2005.)

4.3. METABOLIZAM, INTERAKCIJE I NUSPOJAVE

Zbog popularnosti i česte primjene, bitno je poznavati garkakokinetska svojstva, posebice metabolizam sastavnica unutar preparata Echinacee sp. kako bi se, između ostalog, spriječile interakcije s drugim lijekovima.

U istraživanju provedenom 2010. okarakteriziran je metabolizam glavnog alkilamida iz preparata Echinacee sp. - N-izobutildodeka-2E,4E,8Z,10Z-tetraenamida. Korišteni su rekombinantni ljudski citokromi P450, mikrosomi ljudske jetre i čista sintetizirana molekula alkilamida. Otkriveni su produkti epoksidacije, N-dealkilacije i hidroksilacije u različitim

koncentracijama. Glavne forme enzima odgovornih za metabolizam N-izobutildodeka-2E,4E,8Z,10Z-tetraenamida su CYP1A1, CYP1A2 (oba proizvode isti produkt epoksidacije i N-dealkilacije), CYP2A13 (proizvodi dva epoksida) i CYP2D6 (proizvodi dva epoksida i hidroksilirani metabolit). Još neke forme pokazale su slabiju aktivnost. Koristeći inkubaciju s ljudskim jetrenim mikrosomima i selektivne inhibitore otkriveno je da je CYP2E1 odgovoran za proizvodnju dominantnog produkta hidroksilacije, dok je CYP2C9 primarni izvor epoksida, a CYP1A2 je odgovoran za produkt dealkilacije. (Toselli F, 2010.)

Godine 2007. istraživana je sposobnost preparata Echinacee purpuree da inhibira izoforme enzima citokrom P450(CYP). Ispitivane su izoforme 1A2, 2C19, 2D6 i 3A4. Pokazalo se da ispitivani ekstrakt ima najjači inhibitorni učinak na izoformu CYP3A4, a najslabiji na CYP2D6. Naknadno je ispitivano još devet komercijalnih ekstrakata i pokazalo se da razina inhibicije korelira sa sadržajem alkilamida što je još jedan razlog da preparati budu standardizirani na glavne djelatne komponente. Pošto se alkilamidi smatraju glavnim inhibitorima, ispitivana je sposobnost inhibicije čistih kemijski sintetiziranih alkilamida izobutilamid dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetranoične kiseline i izobutilamid dodeka-2E,4E-dienoične kiseline i pokazalo se da, za razliku od ekstrakata, ne inhibiraju CYP1A2 po čemu možemo zaključiti da inhibiciju ove izoforme uzrokuje neka druga komponenta Echnacee. (Modarai M, 2007.)

Modarai i suradnici su 2010. godine otkrili da preparati Echinaceae slabo inhibiraju neke izoforme citokroma P450. Analizirali su šest komercijalnih tekućih ekstrakata Echinacee i tražili koje su komponente odgovorne za inhibiciju CYP3A4 jer je to izoforma citokroma P450 koja sudjeluje u metabolizmu najvećeg broja lijekova i u prijašnjem istraživanju se pokazalo da Echinacea na nju ima najjači inhibitorni učinak. Rezultati su pokazali da su alkilamidi najzaslužniji za inhibiciju CYP3A4, a od istraživanih alkilamida, kao najjači inhibitor pokazala se dodeka-2 E,4 E,8 Z,10 E/Z-tetraenska kiselina i novootkrivena molekula, molekulske formule $C_{18}H_{36}NO$. Razine izobutilamida undeka-2 E,4 E/ Z-dien-8,10-dinoične kiseline i dodeka-2 E,4 E,8 Z,10 E/Z-tetraenske kiseline korelirale su sa stupnjem inhibicije CYP3A4. Ovi su rezultati važni u praćenju upotrebe ekstrakata Echinacee i njenoj potencijalnoj kombinaciji s drugim lijekovima kako ne bi mijenjala bioraspoloživost ili utjecala na toksičnost lijekova s kojima se koristi zbog sposobnosti da inhibira CYP3A4. (Modarai M, 2010.)

Dvije godine kasnije prijavljen je slučaj interakcije preparata Echinaceae i etopozida. Etopozid je citotoksični inhibitor topoizomerase 2 koji se koristi u liječenju karcinoma pluća i metabolizira se pomoću enzima CYP3A4. Šezdesetjednogodišnji bolesnik s dijagnosticiranim rakom pluća ne-malih stanica započeo je kemoterapiju cisplatinom i etopozidom. Osmog dana terapije hospitaliziran je zbog trombocitopenije. Broj trombocita dosegao je $16 \times 10^3/L$ i bila je potrebna transfuzija. Pri prijemu otkriveno je da koristi preparat Echinaceae i njegova primjena je obustavljena. Nakon primjene nove doze kemoterapeutika bez Echinaceae, broj trombocita popeo se na 44×10^3 i transfuzija više nije bila potrebna. To dovodi do zaključka da se, zbog inhibicije CYP3A4, Echinacea ne smije koristiti s etopozidom, a niti s drugim kemoterapeuticima koji su supstrati navedenog enzima zbog mogućeg povećanja toksičnosti i većeg rizika od nuspojava. (Bossaer JB, 2012.)

Echinacea je kontraindicirana kod multiple skleroze, AIDS-a, zaraze HIV virusom, tuberkuloze, kolagenoze, leukoze i autoimunih poremećaja. Od nuspojava su prijavljene samo alergije kod pacijenata inače alergičnih na biljke iz porodice Asteraceae. Primjena kod trudnica i dojilja se ne preporuča zbog nedostatnih istraživanja. (<http://apps.who.int>)

4.4. DOSTUPNI BILJNI LIJEKOVI

U Hrvatskoj je dostupno šest biljnih lijekova kojima je glavna sastavnica Echinacea. To su:

- A. Vogel Echinaforce forte® tablete koje sadrže suhi ekstrakt tinkture zeleni E. Purpuree i suhi ekstrakt tinkture korijena E. purpuree, a koriste se za pomoć pri liječenju i prevenciji simptoma obične prehlade kao što su kašalj, suzenje očiju, grlobolja, glavobolja te bol u mišićima. Za poboljšanje fizičke otpornosti pri osjetljivosti na običnu prehladu, prehladu popraćenu vrućicom i ponavljajućim infekcijama. (www.halmed.hr)
- A. Vogel Echinaforce junior® tablete za žvakanje koje sadrže suhi ekstrakt tinkture zeleni E. Purpuree i suhi ekstrakt tinkture korijena E. purpuree, a indikacije su i iste kao i kod Echinaforce forte tableta i oralnih kapi. (www.halmed.hr)
- A. Vogel Echinaforce® oralne kapi koje sadrže tinkturu svježe zeleni E. purpuree i tinkturu svježeg korijena E. purpuree. (www.halmed.hr)

- A. Vogel Echinaforce[®] sprej za usnu sluznicu koji sadrži tinkturu svježe zeleni E. purpuree, tinkturu svježeg korijena E. purpuree i tinkturu svježeg lista kadulje (*Salvia officinalis*, L.), a koristi se za simptomatsko liječenje upale u ustima i ždrijelu. (www.halmed.hr)
- Cinnabsin[®] tablete koje sadrže živin(II)-sulfid, D3 trituiran, *Echinacea angustifolia* DC./*Echinacea pallida* Nutt., D1 trituiran, *Hydrastis canadensis* L., D3 trituiran i kalij-dikromat, D3 trituiran, a koriste se za liječenje sinusitisa. Ovaj lijek temelji se na načelima homeopatije. (www.halmed.hr)
- Esberitox[®] tablete koje sadrže korijen *Baptisia tinctoriae*, korijen *Echinacea purpurea* i *Echinacea pallida* i suhi ekstrakt zeleni *Thuja occidentalis*, a indicirane su za jačanje otpornosti organizma i kao pomoćna terapija kod prehlada uzrokovanih virusima. (www.halmed.hr)

Echinaforce[®] proizvodi se koriste u prevenciji i tretmanu gripe i prehlade. Uzimaju se prije obroka, a ne smiju se koristiti dulje od 8 tjedana. kontraindicirani su kod poznate preosjetljivosti na biljke iz porodice Asteraceae ili bilo koju pomoćnu tvar. Ukoliko tijekom primjene dođe do pogoršanja ili se pojavi visoka temperatura koje prije nije bilo, potrebno se javiti liječniku. Zbog ograničenog broja podataka i odsutnosti nekliničkih i kliničkih istraživanja, ne preporuča se uzimanje u trudnoći, kao ni kod djece mlađe od godinu dana. Prijavljene su pojedinačne nuspojave: alergijske reakcije na koži, Stevens-Jonsonov sindrom, angioedem, Quinckeov edem i anafilaktički šok. Kontraindicirani su za upotrebu ukoliko postoji autoimuno oboljenje zbog nastanka nuspojava kao što su encefalitis diseminata, eritema nodozum, imunotrombocitopenija, Evansov i Sjörgenov sindrom s poremećajem tubularne funkcije bubrega. Od poremećaja dišnog sustava, prsišta i sredoprsja, mogu se javiti bronhospazam s opstrukcijom i astma kao posljedice preosjetljivosti. Nakon primjene dulje od osam tjedana, može se pojaviti leukopenija. (www.halmed.hr)

Cinnabsin[®] se temelji na homeopatskim načelima. U akutnim stanjima uzima se po jedna tableta svaka dva sata do najviše 3 tablete za djecu od 2 do 5 godina, 4 tablete od 6 do 11 godina starosti i 6 tableta za starije od 12 godina ili do poboljšanja stanja. U kroničnim stanjima djeca od 2 do 5 godina starosti uzimaju 1 tabletu dnevno, od 6 do 11 godina 1-2 tablete dnevno, a stariji od 12 godina 1-3 tablete dnevno. Kad dođe do poboljšanja

simptoma, potrebno je smanjiti učestalost primjene do nestanka simptoma. Ukoliko se simptomi pogoršaju ili ne dođe do poboljšanja, potrebna je liječnička procjena učinka terapije. Cinnabsin® se ne smije uzimati s hranom, već pola sata prije ili nakon jela se rastopiti u ustima. Ne smije se uzimati dulje od 8 tjedana. Cinnabsin je kontraindiciran kod preosjetljivosti na krom, Echinaceu ili ostale biljke iz porodice Astraceae te kod preosjetljivosti na bilo koju drugu djelatnu ili pomoćnu tvar. Kontraindiciran je i kod progresivnih sistmskih bolesti kao što je tuberkuloza, leukemija ili leukoza, kod autoimunih bolesti, upalnih bolesti vezivnog tkiva (kolagenoza), multiple skleroze, imunodeficijencije (zaraza HIV-om, AIDS), imunosupresije (nakon transplantacije organa, koštane srži, kemoterapija) te kroničnih virusnih bolesti. Ne smije se primjenjivati kod djece mlađe od 2 godine. Ne smije se uzimati uz pušenje i alkohol jer smanjuju njegovo djelovanje. Učestalost nuspojava definirana je kao nepoznata učestalost (ne može se procijeniti iz dostupnih podatak), a nuspojave uključuju mučninu, povraćanje, osip, svrbež, otjecanje lica, omaglicu, hipotenziju i dispneju. U slučaju pojave nuspojava potrebno je prekinuti terapiju. (www.halmed.hr)

Esbetitox® koriste se za jačanje otpornosti organizma i uzimaju se u količini od 3 do 6 tableta 3 puta dnevno za starije od 12 godina, 2 tablete 3 puta dnevno za djecu od 7 do 11 godina uz savjetovanje s liječnikom i 1 do 2 tablete 3 puta dnevno za djecu od 4 do 6 godina uz savjetovanje s liječnikom. Ne preporuča se terapija kod djece mlađe od 4 godine. Terapija se uzima ujutro, u podne i navečer uz dovoljnu količinu tekućine ili se tablete polako otapaju u ustima. Liječenje traje do prestanka simptoma, ali ne dulje od 10 dana. Kontraindicirana je primjena kod preosjetljivosti na bilo koju od djelatnih tvari (korijen divljeg indiga, korijen svijetlocvjetne rudbekije, korijen purpurne rudbekije, tujini vršci grančica s listovima), pomoćnih tvari ili na bilo koju djelatnu tvar biljnih vrsta iz porodice Asteraceae. Esbetitox® tablete ne smiju se koristiti kod progresivnih sistemskih bolesti kao što su tuberkuloza i sarkoidoza, autoimunih bolesti poput kolagenoze, multiple skleroze, imunodeficijentnih bolesti poput AIDS-a i HIV-infekcija, imunosupresije npr. tijekom primjene citostatika ili imunosupresivne terapije npr. nakon transplantacije, kod hematoloških bolesti bijelih krvnih stanica poput leukemije i agranulocitoze. Ako se simptomi bolesti pogoršaju tijekom primjene lijeka ili potraju duže od 10 dana te ako se pojave vrućica, nedostatak zraka ili gnojan/krvav sekret treba se javiti liječniku. Također, zbog rizika od anafilaktičke reakcije, atopični bolesnici se prije primjene trebaju savjetovati s liječnikom. Zbog nedostatka podataka o sigurnosti primjene u trudnoći i

dojenu, potrebno je savjetovanje s liječnikom prije početka primjene lijeka kako bi se procijenio odnos rizika i koristi primjene. U slučaju preosjetljivosti mogu se pojaviti sljedeće nuspojave: mučnina, povraćanje, bol u abdomenu, osip, svrbež, otjecanje lica, omaglica, hipotenzija i dispneja. (www.halmed.hr)

5. ZAKLJUČCI

- Echinacea sp. je biljka koju su stoljećima koristili američki Indijanci u tradicionalnoj medicini za cijeli spektar bolesti koji uključuje upalne procese, liječenje rana, zmijske ugrize i sl.
- Echinacea je biljka iz porodice glavočika (Asteraceae) kojoj je prirodno stanište Sjeverna Amerika, a na tlo i u europsku medicinu je donijeta nakon „otkrića“ novog kontinenta.
- Danas se u kliničkoj primjeni koristi za regulaciju imunološkog odgovora, u sprečavanju upala te sprečavanju i liječenju prehlade i gripe.
- Glavne sastavnice zaslužne za protuupalni i imunomodulacijski učinak su polisaharidi i alkilamidi.
- Najdjelotvornije biljne droge proizvedene od biljaka iz roda Echinacea su zelen Echinacee purpuree i korijen Echinacee anugstifolie te korijen Echinacee pallide.
- U Hrvatskoj je registrirano 6 biljnih lijekova kojima je glavna sastavnica Echinacea sp.
- Imunostimulacijsko djelovanje sastoji se od tri komponente: aktivacije fagocitoze, povećanja respiratorne aktivnosti i povećane mobilnosti leukocita. Protuupalno djelovanje temelji se na smanjenju lučenja proupalnih citokina i povećanju lučenja protuupalnih citokina. Antibakterijsko djelovanje temelji se na inhibiciji bakterijske hijaluronidaze.
- Tijekom posljednjih nekoliko godina istraživanja su otkrila receptore i signalne putove na koje djeluju aktivne komponente iz Echinacee.
- Budući da su alkilamidi iz Echinacee inhibitori enzima CYP3A4 moguće su interakcije s lijekovima koji koriste taj metabolički put.
- Derivati kavene kiseline koji su pokazali in vitro aktivnost, zbog male biodostupnosti nemaju in vivo učinak, dok se alkilamidi apsorbiraju i ispoljavaju svoj učinak in vivo.

6. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija. Sedmo izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, 3-489.
2. Bellar D, Moody KM, Richard NS, Judge LW. Efficacy of a Botanical Supplement with Concentrated Echinacea purpurea for Increasing Aerobic Capacity. ISRN Nutr.2014;149549.
3. Bossaer JB, Odle BL. Probable etoposide interaction with Echinacea. J Diet Suppl. 2012 Jun;9(2):90-5.
4. Cech NB, Kandhi V, Davis JM, Hamilton A, Eads D, Laster SM. Echinacea and its alkylamides: effects on the influenza A-induced secretion of cytokines, chemokines, and PGE₂ from RAW 264.7 macrophage-like cells. Int Immunopharmacol. 2010 Oct;10(10):1268-78.
5. Cinnabsin.
<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-12-13-01.pdf>,
pristupljeno: 10.9.2015.
6. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs
<http://circres.ahajournals.org/content/106/10/1559.figures-only>, pristupljeno: 10.9.2015.
7. Cytokine Network
http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_cytokinePathway.php,
pristupljeno: 17.9.2015
8. Dapas B, Dall'Acqua S, Bulla R, Agostinis C, Perissutti B, Invernizzi S, Grassi G, Voinovich D. Immunomodulation mediated by a herbal syrup containing a standardized Echinacea root extract: a pilot study in healthy human subjects on cytokine gene expression. Phytomedicine. 2014 Sep 25;21(11):1406-10.
9. Echinacea.
<http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/echinacea.pdf>
pristupljeno: 2.9.2015.
10. Echinacea purpurea (L.) Moench.

<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ECPU>

pristupljeno: 15.9.2015.

11. Echinaforce

<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-01-478.pdf>,

pristupljeno: 10.9.2015.

12. Echinaforce forte

<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-01-476.pdf>,

pristupljeno: 10.9.2015.

13. Echinaforce junior

<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-01-477.pdf>,

pristupljeno: 10.9.2015.

14. Esberitox.

<http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-12-02-455.pdf>,

pristupljeno: 10.9.2015.

15. Fast DJ, Balles JA, Scholten JD, Mulder T, Rana J. Echinacea purpurea root extract inhibits TNF release in response to Pam3Csk4 in a phosphatidylinositol-3-kinase dependent manner. Cell Immunol. 2015 Jul 13. pii: S0008-8749(15)30005-8.

16. Fonseca FN, Papanicolaou G, Lin H, Lau CB, Kennelly EJ, Cassileth BR, Cunningham-Rundles S. Echinacea purpurea (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response. Int Immunopharmacol. 2014 Mar;19(1):94-102.

17. Foster S, Tyler VE. Tyler's Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies. Četvrto izdanje. New York, The Haworth Herbal Press, 1999, 143-146

18. Herba Echinaceae Purpureae

<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/16.html>

pristupljeno: 15.9.2015.

19. Kim HR, Oh SK, Lim W, Lee HK, Moon BI, Seoh JY. Immune enhancing effects of Echinacea purpurea root extract by reducing regulatory T cell number and function. *Nat Prod Commun.* 2014 Apr;9(4):511-4.
20. LaLone CA, Rizshsky L, Hammer KD, Wu L, Solco AK, Yum M, Nikolau BJ, Wurtele ES, Murphy PA, Kim M, Birt DF. Endogenous levels of Echinacea alkylamides and ketones are important contributors to the inhibition of prostaglandin E2 and nitric oxide production in cultured macrophages. *J Agric Food Chem.* 2009 Oct 14;57(19):8820-30.
21. Matthias A, Banbury L, Stevenson LM, Bone KM, Leach DN, Lehmann RP. Alkylamides from echinacea modulate induced immune responses in macrophages. *Immunol Invest.* 2007;36(2):117-30.
22. Matthias A, Banbury L, Bone KM, Leach DN, Lehmann RP. Echinacea alkylamides modulate induced immune responses in T-cells. *Fitoterapia.* 2008 Jan;79(1):53-8.
23. Matthias A, Penman KG, Matovic NJ, Bone KM, De Voss JJ, Lehmann RP. Bioavailability of Echinacea constituents: Caco-2 monolayers and pharmacokinetics of the alkylamides and caffeic acid conjugates. *Molecules.* 2005;10(10):1242-51.
24. McKenna D, Jones, K, Hughes K. *Botanical Medicines: The Desk Reference for Major Herbal Supplements.* New York: Haworth Herbal Press, 2002, 224-248.
25. Modarai M, Gertsch J, Suter A, Heinrich M, Kortenkamp A. Cytochrome P450 inhibitory action of Echinacea preparations differs widely and co-varies with alkylamide content. *J Pharm Pharmacol.* 2007 Apr;59(4):567-73.
26. Modarai M, Yang M, Suter A, Kortenkamp A, Heinrich M. Metabolomic profiling of liquid Echinacea medicinal products with in vitro inhibitory effects on cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). *Planta Med.* 2010 Mar;76(4):378-85.
27. Pugh ND, Jackson CR, Pasco DS. Total bacterial load within Echinacea purpurea, determined using a new PCR-based quantification method, is correlated with LPS levels and in vitro macrophage activity. *Planta Med.* 2013 Jan;79(1):9-14
28. Radix Echinaceae
<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/15.html>
 pristupljeno: 16.9.2015.

29. Ritchie MR, Gertsch J, Klein P, Schoop R. Effects of Echinaforce® treatment on ex vivo-stimulated blood cells. *Phytomedicine*. 2011 Jul 15;18(10):826-31.
30. Schapowal A, Klein P, Johnston SL. Echinacea reduces the risk of recurrent respiratory tract infections and complications: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Adv Ther*. 2015 Mar;32(3):187-200.
31. Spelman K, Iiams-Hauser K, Cech NB, Taylor EW, Smirnoff N, Wenner CA. Role for PPARgamma in IL-2 inhibition in T cells by Echinacea-derived undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobutylamide. *Int Immunopharmacol*. 2009 Oct;9(11):1260-4.
32. Spelman K, Wetschler MH, Cech NB. Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry Echinacea purpurea utilizing HPLC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2009 Jul 12; 49(5): 1141–1149.
33. Stevenson LM, Matthias A, Banbury L, Penman KG, Bone KM, Leach DL, Lehmann RP. Modulation of macrophage immune responses by Echinacea. *Molecules*. 2005 Oct 31;10(10):1279-85.
34. Toselli F, Matthias A, Bone KM, Gillam EM, Lehmann RP. Metabolism of the major Echinacea alkylamide N-isobutyldodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenamide by human recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes. *Phytother Res*. 2010 Aug;24(8):1195-201
35. Yin SY, Wang WH, Wang B, Aravindaram K, Hwang PI, Wu HM, Yang NS. Stimulatory effect of Echinacea purpurea extract on the trafficking activity of mouse dendritic cells: revealed by genomic and proteomic analyses. *BMC Genomics*. 2010; 11: 612.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Echinacea je zbog svog izraženog imunomodulacijskog učinka jedna od najistraživanijih biljaka današnjice. Unatoč brojnim istraživanjima kemizma, mehanizma djelovanja pojedinih sastavnica, malo je relevantnih na dokazima-utemeljenih podataka o učinkovitosti i sigurnosti iz kliničkih studija.

Cilj ovog rada bio je istražiti utemeljenost tvrdnji o imunomodulacijskom djelovanju te istražiti mehanizam istog, prikazati metabolizam, nuspojave i interakcije koje mogu nastati prilikom korištenja preparata koji sadrže Echinaceu, prikazati važnost kontrole kvalitete biljnih droga koje se koriste u kliničkoj primjeni. Mehanizam imunomodulacijskog djelovanja temelji se na povećanju fagocitoze, mobilnosti T limfocita i povećane respiratorne aktivnosti. Protuupalno djelovanje bazirano je na povećanju lučenja protuupalnih, a smanjenja lučenja proupalnih citokina. Metabolizam glavnih aktivnih sastavnica odvija se putem citokroma P450, a zbog inhibicijskog djelovanja na CYP3A4 moguće su interakcije s lijekovima koje taj enzim metabolizira.

Terapijski potencijal ove zanimljive biljne vrste temelji se na rezultatima pretkliničkih, ali i sve većeg broja kliničkih studija koje govore u prilog imunomodulacijskog djelovanja. Kako bi se maksimalno iskoristio terapijski potencijal Echinaceae vrsta, a minimalizirao rizik nuspojava i interakcija s drugim lijekovima, potrebno je kontrolirati pripravke koji dolaze na tržište s obzirom na sastav, količinu i kvalitetu sastavnica koje sadrže.

SUMMARY

Because of its expressed immunomodulatory effect Echinacea is one of the most investigated medicinal plants. Despite numerous studies of its chemistry, mechanism of action of main constituents, there is little evidence from clinical studies related to its efficiency and safety.

The main goal of this diploma thesis was to investigate the mechanism of immunomodulatory effect of Echinaceae species. Additionally, aims were to: explain metabolism, describe side effects and interactions which can emerge during usage of preparations which contain Echinacea and to show importance of quality control of herbal medicine used in clinical practice..

The mechanism of immunomodulatory effect is based on increased phagocytosis, increased mobility of the T-lymphocytes and increased respiratory activity. Anti-inflammatory effect is based on up-regulation of anti-inflammatory cytokines and down-regulation of pro-inflammatory cytokines. Metabolism of main active components involves reactions catalyzed by cytochrome P450. Because of its inhibitory effect on CYP3A4, interactions with drugs which are substrates of this enzyme are possible.

Therapeutic potential of this interesting plant is based on results from numerous preclinical and growing number of clinical trials which are going in favor of Echinaceae immunomodulatory effect. To maximize therapeutic potential of Echinacea and to minimize side effects and interactions we need better quality control of available preparations considering quantity, quality and type of constituents.

Imunomodulacijski učinak vrsta roda *Echinacea*

Nikolina Škrlec

SAŽETAK

Echinacea je zbog svog izraženog imunomodulacijskog učinka jedna od najistraživanijih biljaka današnjice. Unatoč brojnim istraživanjima kemizma, mehanizma djelovanja pojedinih sastavnica, malo je relevantnih na dokazima-utemeljenih podataka o učinkovitosti i sigurnosti iz kliničkih studija. Cilj ovog rada bio je istražiti utemeljenost tvrdnji o imunomodulacijskom djelovanju te istražiti mehanizam istog, prikazati metabolizam, nuspojave i interakcije koje mogu nastati prilikom korištenja preparata koji sadrže *Echinaceu*, prikazati važnost kontrole kvalitete biljnih droga koje se koriste u kliničkoj primjeni. Mehanizam imunomodulacijskog djelovanja temelji se na povećanju fagocitoze, mobilnosti T limfocita i povećane respiratorne aktivnosti. Protuupalno djelovanje bazirano je na povećanju lučenja protuupalnih, a smanjenja lučenja proupalnih citokina. Metabolizam glavnih aktivnih sastavnica odvija se putem citokroma P450, a zbog inhibicijskog djelovanja na CYP3A4 moguće su interakcije s lijekovima koje taj enzim metabolizira. Terapijski potencijal ove zanimljive biljne vrste temelji se na rezultatima pretkliničkih, ali i sve većeg broja kliničkih studija koje govore u prilog imunomodulacijskog djelovanja. Kako bi se maksimalno iskoristio terapijski potencijal *Echinaceae* vrsta, a minimalizirao rizik nuspojava i interakcija s drugim lijekovima, potrebno je kontrolirati pripravke koji dolaze na tržište s obzirom na sastav, količinu i kvalitetu sastavnica koje sadrže.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 7 grafičkih prikaza i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *echinacea, immune system, alkyamide, side effects, macrophage, cytokine, dendritic cells, T-lymphocyte, anti-inflammatory, immunomodulatory*

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvandredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Marijana Zovko Končić, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Immunomodulatory effect of Echinaceae species

Nikolina Pokupec

SUMMARY

Because of its expressed immunomodulatory effect Echinacea is one of the most investigated medicinal plants. Despite numerous studies of its chemistry, mechanism of action of main constituents, there is little evidence from clinical studies related to its efficiency and safety. The main goal of this diploma thesis was to investigate the mechanism of immunomodulatory effect of Echinaceae species. Additionally, aims were to: explain metabolism, describe side effects and interactions which can emerge during usage of preparations which contain Echinacea and to show importance of quality control of herbal medicine used in clinical practice. The mechanism of immunomodulatory effect is based on increased phagocytosis, increased mobility of the T-lymphocytes and increased respiratory activity. Anti-inflammatory effect is based on up-regulation of anti-inflammatory cytokines and down-regulation of pro-inflammatory cytokines. Metabolism of main active components involves reactions catalyzed by cytochrome P450. Because of its inhibitory effect on CYP3A4, interactions with drugs which are substrates of this enzyme are possible. Therapeutic potential of this interesting plant is based on results from numerous preclinical and growing number of clinical trials which are going in favor of Echinaceae immunomodulatory effect. To maximize therapeutic potential of Echinacea and to minimize side effects and interactions we need better quality control of available preparations considering quantity, quality and type of constituents.

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

Thesis includes: 34 pages, 7 figures and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *echinacea, immune system, alkylamide, side effects, macrophage, cytokine, dendritic cells, T-lymphocyte, anti-inflammatory, immunomodulatory*

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijana Končić Zovko, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.

