

# Korijen mongolskog kozlinca u suvremenoj fitofarmaciji

---

Jurelinac, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:746356>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

# **DIPLOMSKI RAD**

ANA JURELINAC

Zagreb, 2020.

**Ana Jurelinac**

**Korijen mongolskog kozlinca u suvremenoj  
fitofarmaciji**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na stručnom vodstvu i vrijednim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.*

## POPIS KRATICA

- $\alpha$ -SMA** –  $\alpha$ -aktin glatke muskulature (engl. *alpha smooth muscle actin*)  
**AGE** – završni produkti glikozilacije (engl. *advanced glycation end products*)  
**AI** – injekcija mongolskog kozlinca (engl. *Astragalus injection*)  
**ALT** – alanin-aminotransferaza  
**AMPK** – protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom (engl. *5'-AMP-activated protein kinase*)  
**APS** – polisaharidi mongolskog kozlinca  
**AQP2** – akvaporin 2  
**ARB** – blokatori angiotenzinskih receptora  
**ARE** – antioksidacijski element odgovora (engl. *antioxidant responsive element*)  
**ASK1** – apoptoza regulirajuća signalna kinaza 1 (engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*)  
**ATP** – adenzin trifosfat  
**BAX** – X protein udružen s BCL-2 (engl. *BCL-2-associated X protein*)  
**BCL-2** – protein limfoma B-limfocita 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)  
**BMDC** – dendritične stanice izolirane iz koštane srži (engl. *bone marrow derived dendritic cells*)  
**cAMP** – ciklički adenzin monofosfat  
**CCL3** – kemokinski ligand 3 s C-C motivom (engl. *chemokine (C-C motif) ligand 3*)  
**CCR3** – C-C kemokinski receptor 3  
**CD** – stanični biljeg (engl. *cluster of differentiation*)  
**cGMP** – ciklički gvanozin monofosfat  
**CIRI** – cerebralna ishemijsko-reperfuzijska ozljeda  
**CK** – kreatin kinaza  
**CK-MB** – MB izoenzim kreatin kinaze  
**cTnI** – srčani troponin I  
**CVB3** – Coxsackievirus B3  
**CXCL1** – kemokinski ligand 1 s C-X-C motivom (engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*)  
**DER** – omjer droge i ekstrakta (engl. *drug extract ratio*)  
**ERK1/2** – kinaza regulirana ekstracelularnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)  
**FMDV** – virus bolesti šaka, stopala i usta (engl. *foot-and-mouth disease virus*)  
**GABA** –  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina  
**GFR** – brzina glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*)  
**GM-CSF** – faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)  
**GrB** – granzim B  
**GSH-Px** – glutation peroksidaza  
**GVH reakcija** – reakcija transplantata protiv primatelja (engl. *graft-versus-host*)  
**HbeAg** – hepatitis B e antigen  
**HbsAg** – hepatitis B površinski antigen  
**HBV** – virus hepatitisa B  
**HO-1** – hem oksigenaza 1  
**HUVEC** – endotelne stanice pupčane vrpce čovjeka (engl. *human umbilical vein endothelial cells*)  
**ICAM-1** – međustanična adhezijska molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*)  
**IFN** – interferon  
**Ig** – imunoglobulin  
**IL** – interleukin

**iNOS** – inducibilna izoforma sintaze dušikova (II) oksida  
**JNK** – c-Jun N-terminalna kinaza  
**KPS** – vrijednost na Karnofsky skali (engl. *Karnofsky performance score*)  
**LAK stanice** – limfokinom aktivirane stanice ubojice (engl. *lymphokine-activated killer cells*)  
**LDH** – laktat-dehidrogenaza  
**LPS** – lipopolisaharid  
**MAC** – kompleks koji napada membranu (engl. *membrane attack complex*)  
**MAPK** – protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinase*)  
**MDA** – malondialdehid  
**miR** – gen za mikroRNA  
**MMP** – matriksna metaloproteinaza  
**MPO** – mijeloperoksidaza  
**mTOR** – ciljna molekula rapamicina (sirolimusa) u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*)  
**NF- $\kappa$ B** – nuklearni faktor  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)  
**NFAT4** – nuklearni faktor aktiviranih T-limfocita 4 (engl. *nuclear factor of activated T-cells 4*)  
**NK stanice** – stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)  
**NO** – dušikov (II) oksid  
**Nrf2** – faktor 2 srodan nuklearnom eritroidnom faktoru 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)  
**NSCLC** – karcinom pluća ne-malih stanica (engl. *non-small-cell lung carcinoma*)  
**OCT-1** – klon osteokalcin-T antigen stanica (engl. *osteocalcin-T antigen clone-1*)  
**PI3K** – fosfoinozimid 3-kinaza (engl. *phosphoinositide 3-kinase*)  
**PKC** – protein kinaza C  
**QOL** – kvaliteta života (engl. *quality of life*)  
**rIL-2** – rekombinantni interleukin 2  
**ROR $\gamma$ t** – retinoičnoj kiselini srodan receptor siročić  $\gamma$ t (engl. *retinoic acid-related orphan receptor gamma t*)  
**ROS** – kemijski reaktivni spojevi kisika (engl. *reactive oxygen species*)  
**sFasL** – topljivi Fas ligand (engl. *soluble Fas ligand*)  
**SLE** – sistemski eritemski lupus  
**SOD** – superoksid dismutaza  
**TCM** – tradicionalna kineska medicina  
**TGF- $\beta$**  – transformirajući faktor rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor beta*)  
**Th** – pomagački T-limfociti  
**TIA** – tranzitorna ishemijska ataka  
**TNF** – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)  
**Treg** – regulatorni T-limfociti  
**TSLP** – timusni stromalni limfopoetin (engl. *thymic stromal lymphopoietin*)  
**TSS** – ukupna ocjena simptoma (engl. *total symptom score*)  
**URTI** – infekcija gornjih dišnih putova (engl. *upper respiratory tract infection*)  
**USDA** – Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Department of Agriculture*)  
**VEGF** – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)  
**VMC** – virusni miokarditis

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Botanički podaci o vrsti <i>Astragalus mongholicus</i> Bunge (Fabaceae).....	1
1.2. Primjena mongolskog kozlinca tijekom povijesti.....	4
1.3. Fitokemijski sastav korijena mongolskog kozlinca.....	6
1.3.1. Triterpenski saponini.....	6
1.3.2. Flavonoidi.....	7
1.3.3. Polisaharidi.....	8
1.3.4. Ostale sastavnice.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	12
4.1. Neklinička ispitivanja korijena mongolskog kozlinca.....	12
4.1.1. Protuupalni učinci.....	12
4.1.2. Antioksidacijska svojstva.....	14
4.1.3. Imunomodulirajući učinci.....	15
4.1.4. Protutumorski učinci.....	17
4.1.5. Ostali učinci.....	19
4.2. Rezultati kliničkih studija.....	22
4.2.1. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju karcinoma.....	22
4.2.2. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju kronične bolesti bubrega.....	24
4.2.3. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju virusnog miokarditisa.....	26
4.2.4. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju kroničnog virusnog hepatitisa.....	27
4.2.5. Ostala klinička istraživanja.....	28
4.3. Doziranje pripravaka s mongolskim kozlincem.....	32
4.4. Potencijalne interakcije mongolskog kozlinca s lijekovima.....	32
4.5. Neželjeni učinci pripravaka korijena mongolskog kozlinca.....	33
4.6. Toksičnost.....	33
4.7. Fitopreparati s korijenom mongolskog kozlinca u hrvatskim ljekarnama.....	35
4.8. Monografija droge u Europskoj farmakopeji.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	51
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Korijen mongolskog kozlinca (*Astragali mongholicus radix*) ljekovita je biljna droga (Slika 1) koja potječe iz tradicionalne kineske medicine, a dobiva se od dvaju varijeteta biljne vrste *Astragalus mongholicus* Bunge iz porodice Fabaceae - *A. mongholicus* var. *mongholicus* (sin. *A. membranaceus* Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao) i *A. mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) Podlech (sin. *A. membranaceus* Bunge) (Zhu, 1998; EDQM, 2014).



Slika 1. *Astragali mongholicus radix*  
(preuzeto s: [www.sagewomanherbs.com](http://www.sagewomanherbs.com))

### 1.1. Botanički podaci o vrsti *Astragalus mongholicus* Bunge (Fabaceae)

#### Podrijetlo naziva biljke

Latinski naziv roda *Astragalus* proizlazi iz starogrčke riječi *astragalos* koja znači "vratni kralježak, kuglasti zglobovi gležnja, igraće kocke napravljene od gležanjskih kostiju životinja kopitara", što je povezano s izgledom cvjetnih grozdova biljke koji podsjećaju na vratne kralješke, a zveckanje sjemenki u mahunama zvuči poput bacanja kocaka. Ime biljke na engleskom jeziku (*milk vetch*, tj. mliječna grahorica) potječe od nekoć popularnog vjerovanja da kozlinac povećava izlučivanje mlijeka u koza (Foster i Yue, 1992; Wilhelm i Rericha, 2017).



## Morfološka obilježja

Mongolski kozlinac višegodišnja je zeljasta biljka uspravne stabljike koja najčešće naraste 60-150 cm u visinu (Slika 2). Listovi su dugi 20-35 cm, neparno su perasti i sastavljeni od 25-37 liski eliptičnog oblika i duljine 3-6 cm. Liske su cjelovitog ruba, tupog vrha i peraste nervature, a za glavnu os lista su pričvršćene vrlo kratkom peteljkom. Pri bazi lista smješten je par trokutasto ovalnih ili lancetastih palistića šiljastog vrha. Stabljika i listovi prekriveni su sitnim mekim dlačicama bijele boje (McKenna i sur., 2002; WHO, 1999).



Slika 2. *Astragalus mongholicus* Bunge – mongolski kozlinac  
(preuzeto s: <http://www.trajnice.com/sl>)



Slika 3. Cvjetovi mongolskog kozlinca  
(preuzeto s: [www.herb-pharm.com](http://www.herb-pharm.com))



Slika 4. Plodovi mongolskog kozlinca  
(preuzeto s: <https://gailfaithedwards.com>)



Slika 5. Korijen mongolskog kozlinca  
(preuzeto s: <https://herbalhealthreview.com>)

Cvat je grozdast i na čvrstoj uspravnoj cvjetnoj stapci sadrži 10-15 cvjetova žućkasto bijele boje koji cvjetaju u srpnju i kolovozu, a dugi su oko 2 cm (Slika 3). Nepravilan zigomorfan vjenčić sastoji se od pet latica koje tvore cvijet leptirastog oblika, tzv. flos papilionaceus ([www.delta-intkey.com](http://www.delta-intkey.com)). Čaška je cjevasta, glatka i dugačka 5 mm, lapovi su lancetasti i spojeni prema bazi. Cvijet sadrži deset dijadelfnih prašnika sraslih prašničkim nitima i glatki tučak građen od jednog plodničkog lista (Slika 3). Plod je duguljasta ovalna mahuna glatke površine i zašiljenih krajeva koja se otvara pucajući na dva uzdužna šava. U mahunama prikazanim na Slici 4 nalazi se 5-7 tamnosmeđih sjemenki čvrste ljuske i bubrežastog oblika koje podsjećaju na minijaturne sjemenke soje (Morazzoni i Bombardelli, 1994).

Korijen je valjkast, razgranat, dugačak 30-90 cm, promjera 1-3,5 cm. Savitljiv je, tvrd, vlaknast u presjeku i sadrži tanko bočno korijenje. Izvana je prekriven čvrstom naboranom žućkasto smeđom epidermom, a unutrašnji drvenasti dio je žućkasto bijele boje (Slika 5). Ima blago slatkasti okus i slab miris (Foster i Yue, 1992; WHO, 1999).

### **Stanište i rasprostranjenost**

Rod *Astragalus* jedan je od zastupljenijih rodova iz porodice mahunarki (Fabaceae ili Leguminosae) i broji oko 3000 vrsta trajnica, polugrmova i grmova široko rasprostranjenih u područjima s umjereno toplim i suhim klimama. Vrsta *A. mongholicus* uglavnom raste u središnjoj Mongoliji, sjevernoj i sjevernoistočnoj Kini, Koreji, Japanu i nekim drugim područjima u Aziji poput Rusije i Kazahstana. U Kini i Koreji smatra se ljekovitom biljkom te se u tu svrhu i uzgaja. Mongolski kozlinac koji raste na području Unutrašnje Mongolije smatra se istinskim ljekovitim materijalom i poznat je po svojoj visokoj kvaliteti. Budući da postoji velika potražnja za kozlincem i njegovi divlji resursi gotovo su iscrpljeni, za komercijalne svrhe trenutno se uglavnom dobiva umjetnim uzgojem. U Kini se najviše cijeni droga proizvedena u mongolskim regijama Chifeng, Baotou, Ulančabu, Bayannaouer, Alxa Liga i Hohhot (Li i sur., 2017; Wang i sur., 2019). Danas se uzgaja i u područjima izvan Azije, ponajprije u Sjedinjenim Američkim Državama i Njemačkoj (Dong i sur., 2003). Raste na planinskim padinama, osunčanim pašnjacima i livadama te uz putove. Uspijeva na suhom pjeskovitom tlu i ilovači, a pogoduje mu neutralna ili bazična pH vrijednost tla. Budući da ima sposobnost fiksacije dušika iz atmosfere putem simbioze s bakterijama roda *Rhizobium*, preferira tla s niskim sadržajem dušika ([www.herb-pharm.com](http://www.herb-pharm.com)).

## 1.2. Primjena mongolskog kozlinca tijekom povijesti

Sušeni korijen mongolskog kozlinca (Slika 5) u Kini je široko upotrebljavan kao tradicionalni biljni lijek već više od 2000 godina. Jedna je od najznačajnijih i najčešće korištenih biljnih droga u tradicionalnoj kineskoj medicini (TCM). Prva upotreba kozlinca datira još iz vremena dinastije Han i zabilježena je u drevnoj kineskoj medicinskoj knjizi "Shennong Bencaojing" koja je ujedno i prva kineska Materia Medica napisana između 200. i 250. godine, a u doslovnom prijevodu glasi "Klasična Materia Medica Božanstvenog Farmera" (Bensky i sur., 1986; Wang i sur., 2019). Tamo je opisan kao biljna droga sa širokim rasponom ljekovitih učinaka i bez toksičnosti te je svrstan u najvišu klasu biljaka (Ren i sur., 2013). Naziv biljne droge na kineskom glasi "Huang qi" (黃耆) gdje prvi slog "Huang" (黃) znači "žut" i opisuje boju droge. Žuta boja također se pripisuje zemlji, središtu i slezeni koja u TCM-u predstavlja ključni organ za pretvaranje hrane u *qi*, tzv. životnu energiju. Drugi slog "Qi" (耆) znači "superioran" ili "vođa" pa takvo ime sugerira da se smatrala dominantnom drogom s tonificirajućim i adaptogenim učinkom (Ho i Lisowski, 1997). Prema TCM-u kozlinac utječe na meridijane slezene i pluća, stoga je primarno bio indiciran kod simptoma nedostatka vitalne energije slezene kao što su proljev, umor, pojačano znojenje i gubitak apetita te kod respiratornih poremećaja poput dispneje, astme i čestih prehlada (Hsu i sur., 1986). Korijen biljke u zemljama istočne Azije stoljećima je propisivan kod opće slabosti za povećanje ukupne vitalnosti organizma. Koristio se uglavnom u obliku dekokta pripravljenog od osušenog korijena starog 4-7 godina, no korijen bi se ponekad prije pripreme dekokta termički obrađivao prženjem s medom čime bi se dobila droga naziva Zhihuangqi ili Astragali radix praeparata cum melle za koju se smatralo da ima izraženiji učinak na opću iscrpljenost, poremećaje probavnog sustava i plućne funkcije (Auyeung i sur., 2016). Vrsta *A. mongholicus* tradicionalno je važna i u liječenju infekcija mukoznih membrana, osobito urinarnog i respiratornog trakta, a u Kini se koristila i za prevenciju prehlade (Zhu, 1998). Smatralo se da kozlinac posjeduje i kardi tonični učinak, tj. povećava kontrakciju zdravog srčanog tkiva te da smanjuje edeme budući da raspodjeljuje vodu u tijelu. Još se koristio kod slabokrvnosti, krvarenja, prolapsa rektuma i maternice, hepatitisa, kroničnog nefritisa, paralize perifernih živaca, hemiplegije, odnosno disfunkcije polovice tijela te kao antidijabetik (Sinclair, 1998; Li i sur., 2014). U kineskoj narodnoj medicini mast i dekokt kozlinca koristili su se za poticanje cijeljenja čireva i opekлина te stavljali na kronične ulceracije kože (Huang, 1999). Primjenjivao se i kao ekspektorans i sedativ. Redovito se propisivao u kombinaciji s drugim

ljekovitim biljem, ovisno o indikaciji i željenom terapijskom učinku. U kineskom tekstu "Knjiga o medicinskim slučajevima Shi-shana" iz 1531. godine predlaže se kombinacija s ginsengom kao tonik za umor, opću slabost, smanjen apetit i spontano znojenje (Foster i Yue, 1992).

Kozlinac se zbog svog slatkastog okusa i sadržaja nutrijenata nerijetko koristio i u prehrani. Ponekad se konzumirao sirov u obliku oguljenog korijena starog do godinu dana, no najčešće se dodavao u juhe, temeljce, variva i rižu te mješavinu začina. Danas se često nalazi u kulinarskim receptima za juhe koje se preporučaju za jačanje imuniteta ([www.emeryherbals.com](http://www.emeryherbals.com)).

*A. mongholicus* uveden je u SAD 1925. godine putem USDA-inog Ureda za uvođenje sjemena i biljaka u suradnji s Botaničkim vrtom u Sankt Peterburgu, no nije se primjenjivao u zapadnoj botaničkoj praksi sve do 1960-ih. Znatnu popularnost na Zapadu stekao je u 80-im godinama prošlog stoljeća, ponajprije zbog svog antioksidacijskog, protuupalnog, antiviralnog i imunostimulirajućeg učinka. Danas se naširoko prodaje kao biljni dodatak prehrani za jačanje imuniteta, prevenciju gripe, prehlade, različitih upalnih stanja i srčanih bolesti te kao pomoć u prilagodbi organizma na stres (Li i sur., 2014). Dokazano je da posjeduje i hepatoprotektivni, diuretski, antiperspirantni i *anti-aging* učinak. Pokazao se efikasnim u adjuvantnoj terapiji nekih karcinoma, a suvremena istraživanja sugeriraju da može djelovati pozitivno na regulaciju dijabetesa i s njim povezanih komorbiditeta, povećati plodnost muškaraca, umanjiti nuspojave kemoterapije te da bi mogao pomoći u kroničnoj terapiji astme i ublažiti simptome osteoporoze ([www.iso.org](http://www.iso.org); Li i sur., 2016).

### 1.3. Fitokemijski sastav korijena mongolskog kozlinca

Korijen mongolskog kozlinca sadrži raznovrsne bioaktivne sastavnice čiji je udio promjenjiv s obzirom na varijetet, geografsku lokaciju, sezonske varijacije i starost biljke. Triterpenske saponine, flavonoidi, polisaharidi, biogeni amini i minerali smatraju se glavnim aktivnim sastojcima (Li i sur., 2017).

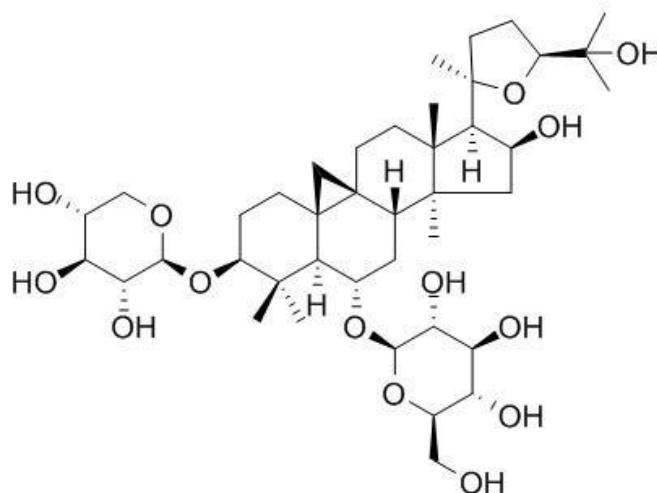
#### 1.3.1. Triterpenske saponine

U kozlinčevu korijenu identificirano je više od 40 različitih triterpenskih saponina uključujući astragalozide I-VIII, acetilastragalozid, izoastragalozide I-III, astramembrangenin, astramembranine I i II, astramembranozid B, cikloastragenol, ciklosieversigenin, sojasaponin I, sojasapogenol B i lupeol, a njihov je sadržaj u rasponu od 0,5 mg/g do 3,5 mg/g biljne droge (Kitagawa i sur., 1983; He i Findlay, 1991). Nadzemni dijelovi biljke i vlaknasto bočno korijenje sadrže veće količine saponina od glavnih korijena, ali tradicionalno se koriste samo glavni korijeni, stoga se pretpostavlja da saponini nisu ključni aktivni sastojci odgovorni za tradicionalno djelovanje poput tonika (Qi i sur., 2008).

Astragalozidi I, II i IV te izoastragalozidi I i II najzastupljeniji su saponini kozlinca čineći više od 80% ukupnih saponina korijena, a po strukturi su triterpenoidi cikloartanskog tipa (Qi i sur., 2006; Yu i sur., 2007). Glavni šećerni ostaci u njima su  $\beta$ -D-glukopiranozil (Glc),  $\beta$ -D-ksilopiranozil (Xyl),  $\alpha$ -L-ramnopiranozil (Rha) i  $\alpha$ -L-arabinopiranozil (Ara), a još se mogu naći i  $\beta$ -D-glukuronopiranozil (GlcA),  $\beta$ -D-fukopiranozil (Fuc),  $\beta$ -D-apiofuranozil (Api) te acetyl (Ac) skupine (Li i sur., 2014).

Astragalozid IV (Slika 6) glavni je spoj koji se koristi kao marker za kontrolu kvalitete biljne droge u Kineskoj i Europskoj farmakopeji, iako je njegov sadržaj u sirovoj biljci relativno nizak. Po strukturi je 3-O- $\beta$ -D-ksilopiranozil-6-O- $\beta$ -D-glukopiranozil-cikloastragenol, tetraciklički triterpenski saponin visoke polarnosti i strukture slične lanolinu (Ren i sur., 2013).

Astragalozidi I i II termički su nestabilni jer se acetili u ksilozi lako uklanjaju zagrijavanjem i tako prelaze u astragalozid IV. Jedan od nedavno otkrivenih saponina nazvan malonilastragalozid I nestabilan je već i pri sobnoj temperaturi (Chu i sur., 2010).

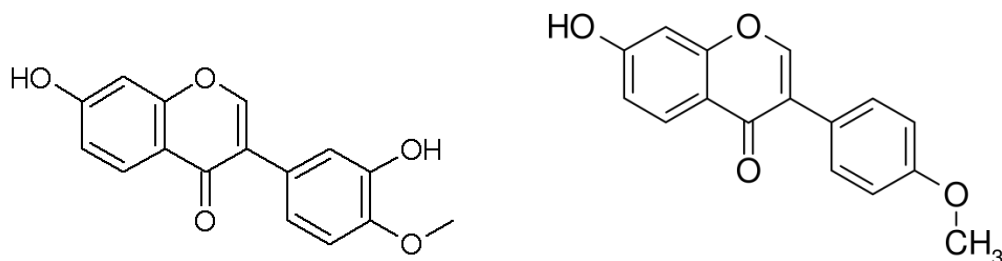


Slika 6. Struktura astragalozida IV  
(preuzeto s: [www.chemfaces.com](http://www.chemfaces.com))

### 1.3.2. Flavonoidi

Iz korijena mongolskog kozlinca izolirani su različiti flavonoidi, a među njima se ističu izoflavoni, izoflavani, pterokarpani, flavononi i kalkoni. Raspon sadržaja ukupnih flavonoida u biljnoj drogi iznosi 0,5-3,0 mg/g (Lin i sur., 2000; Matkowski i sur., 2003). Najbrojniji flavonoidi su izoflavoni kalikozin-7-O- $\beta$ -D-glukozid, kalikozin (Slika 7), kalikozin-7-O- $\beta$ -D-(6''-acetil)-glukozid, kalikozin-7-O- $\beta$ -D-{6''-[(E)-but-2-enoil]}-glukozid, formononetin (Slika 7), formononetin-7-O- $\beta$ -D-glukozid-6''-O-malonat i ononin, a prisutni su još i odoracion, 6''-acetilononin, amopiptanozid A, pratenzein, pratenzein-7-O- $\beta$ -D-glukozid, likoagrozid D, 7,5'-dihidroksi-3'-metoksi-izoflavon-O- $\beta$ -D-glukozid, (R)-3-(5-hidroksi-2,3,4-trimetoksifenil)-kroman-7-ol te (3R,4R)-3-(2-hidroksi-3,4-dimetoksi-fenil)-kroman-4,7-diol-7-O- $\beta$ -D-glukozid. Dominantna komponenta, kalikozin-7-O- $\beta$ -D-glukozid, koristi se kao kemijski marker u analizama kvalitete biljke u propisima Kineske farmakopeje (Auyeung i sur., 2016).

Od ostalih flavonoida u mongolskom kozlincu mogu se naći izoflavani astraizoflavan, izomukronulatol, izomukronulatol-7-O- $\beta$ -glukozid, (3R)-8,2'-dihidroksi-7,4'-dimetoksiizoflavan i pendulon, pterokarpani vestikarpan, astrapterokarpan, astrapterokarpan-glukozid-6''-O-malonat, (-)-metilinisolin, (-)-metilinisolin-3-O- $\beta$ -D-glukozid, (-)-metilinisolin-3-O- $\beta$ -D-(6'-acetil)-glukozid i (-)-metilinisolin-3-O- $\beta$ -D-{6'-[(E)-but-2-enoil]}-glukozid, flavonol kumatakenin, flavonon likviricigenin i kalkon izolikviricigenin (Li i sur., 2014; Song i sur., 2007).



Slika 7. Strukture izoflavona kalikozina i formononetina

(preuzeto s: <https://en.wikipedia.org>)

### 1.3.3. Polisaharidi

Polisaharidi prisutni u korijenu mongolskog kozlinca uključuju astragalane, astraglukane, astraheterosaharide i AMem-P. Astragalan I većinom se sastoji od D-glukoze, D-galaktoze i L-arabinoze uz nešto molekula pentoze, a njegova molekulska masa iznosi oko 36 300 Da. Astragalan II molekulske mase 12 300 Da i astragalan III čija masa iznosi oko 34 600 Da po strukturi su  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-glukozidi. Astraglukani 1 i 3 također su  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-glukozidi, pri čemu omjer  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnih veza u astraglukanu 1 iznosi 5:2. Astraglukan 2 po strukturi je  $\alpha$ -1,4-glukozid netopljiv u vodi. Kiseli astraheterosaharid 1 sastoji se od galakturonske kiseline, glukuronske kiseline, glukoze, ramnoze i arabinoze, a astraheterosaharid 2 od glukoze i arabinoze u omjeru 1:0,15 (Weng i sur., 2003; Khan i Abourashed, 2010). Iz vodenog ekstrakta kozlinčeva korijena izoliran je glikan nazvan AMem-P koji se uglavnom sastoji od molekula D-galakturonske kiseline povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama i L-ramnoze vezane  $\alpha$ -1,2-glikozidnom vezom za galakturonsku kiselinu, a identificirani su i drugi šećeri poput terminalne L-arabinofuranoze vezane  $\alpha$ -1,5-glikozidnom vezom, terminalnih D-galaktoza povezanih  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- i  $\beta$ -1,6-glikozidnim vezama te bočnih ogranaka D-galaktoze i L-ramnoze (Tomoda i sur., 1992).

Istraživanjima su u sastavu polisaharida mongolskog kozlinca otkriveni i fruktoza, manoza, riboza te ksiloza (Chen i sur., 2011; Yao i Wang, 2012).

#### 1.3.4. Ostale sastavnice

Korijen kozlinca sadrži nekoliko biogenih amina od kojih su najznačajniji betain, kolin i  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA). Od preko 20 identificiranih slobodnih aminokiselina, asparagin, glutaminska kiselina, kanavanin, prolin, arginin,  $\beta$ -aminomaslačna kiselina, GABA, asparaginska kiselina i alanin prisutne su u najvišim koncentracijama i ukupno čine 0,50-1,26% biljne droge. Dokazana je prisutnost više od 18 minerala u tragovima među kojima su najzastupljeniji magnezij (1108–1761 ppm), željezo (94–694 ppm), mangan (8–52 ppm), cink (11–23 ppm), rubidij (11–13 ppm), bakar (5–9 ppm), molibden (0,1–10 ppm) i krom (0,3–0,8 ppm), a u većim količinama se mogu naći još i kalcij, kalij i fosfor (Li i Wang, 2005; Khan i Abourashed, 2010). Kozlinac sadrži i sterole ( $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glukozid), lignane (laricirezinol, siringarezinol), masne kiseline, antrakinone, vitamine (A, B kompleks, C), saharozu i kumarin (Auyeung i sur., 2016; Li i sur., 2016).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mongolski kozlinac ima dugu povijest upotrebe u kineskoj tradicionalnoj medicini, no danas se u skladu s aktualnim trendom globalizacije sve češće koristi i u drugim zemljama širom svijeta gdje se pacijenti sve više okreću prirodnim ljekovitim sredstvima u sklopu samoliječenja. Njegova farmakološka svojstva i mogućnosti kliničke primjene nisu detaljno proučavane sve do nedavno, a unatoč sve brojnijim istraživanjima mehanizama djelovanja kozlinčeva korijena i njegovih pojedinih sastavnica, još uvijek je malo relevantnih i na dokazima utemeljenih podataka o učinkovitosti i sigurnosti primjene iz kliničkih studija. Raste i broj fitopreparata korijena mongolskog kozlinca dostupnih na tržištu koji su većinom registrirani kao dodaci prehrani. Njihova proizvodnja nije toliko strogo regulirana kao proizvodnja sintetskih i biljnih lijekova zbog čega je ponekad upitna njihova kvaliteta i učinkovitost. Farmaceuti kao zdravstveni djelatnici koji savjetuju pacijente o odabiru i ispravnom korištenju bezreceptnih lijekova i dodataka prehrani u samoliječenju moraju temeljiti svoje savjetovanje na utvrđenim znanstvenim činjenicama i dokazima kako bi mogli izabrati optimalnu i sigurnu terapiju za svoje pacijente.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti dostupne znanstvene dokaze o opravdanosti kliničke primjene mongolskog kozlinca kao imunomodulirajućeg i protuupalnog sredstva, u liječenju srčanih bolesti, kroničnih bolesti bubrega, dijabetesa, kroničnog hepatitisa i zacjeljivanju rana, a također i prezentirati novije kliničke studije koje ukazuju na potencijal primjene kozlinca u adjuvantnoj terapiji karcinoma, liječenju leukopenije i alergijskog rinitisa. Navedena su i ostala ljekovita svojstva korijena mongolskog kozlinca kao i dodaci prehrani na bazi kozlinca trenutno prisutni u ljekarničkoj praksi.

### 3. MATERIJALI I METODE

Prilikom izrade ovog teorijskog diplomskog rada korišteni su stručni i znanstveni literaturni izvori iz područja farmakognozije koji sadrže informacije o biljnoj vrsti *Astragalus mongholicus* B. Podaci o kemijskom sastavu, učincima i primjeni mongolskog kozlinca te rezultati kliničkih i drugih ispitivanja prikupljeni su pretraživanjem dostupnih stručnih knjiga i relevantnih bibliografskih baza podataka PubMed, Scopus, ScienceDirect i Cochrane Library uz korištenje ključnih riječi: *Astragalus mongholicus*, Astragali radix, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, Huang qi i sl. Analitika biljne droge Astragali radix obrađena je prijevodom monografije iz Europske farmakopeje. Korištene su i informacije s relevantnih mrežnih stranica [www.who.int](http://www.who.int) i [www.iso.org](http://www.iso.org).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Sve veća učestalost primjene korijena mongolskog kozlinca širom svijeta dovela je do potrebe za pojašnjavanjem mehanizama njegova djelovanja i utvrđivanjem mogućnosti kliničke primjene, stoga je dosad proveden znatan broj *in vitro*, *in vivo* i kliničkih istraživanja učinaka mongolskog kozlinca. Iako sve sastavnice potencijalno pridonose farmakološkim učincima biljke, smatra se da su polisaharidi kozlinca ključna komponenta koja je odgovorna za imunomodulirajuće djelovanje, flavonoidi (izoflavoni) su uglavnom odgovorni za antioksidacijske i protuupalne učinke, a protutumorski učinci pripisuju se prvenstveno astragalozidu IV i ostalim triterpenskim saponinima (Auyeung i sur., 2016).

### 4.1. Neklinička ispitivanja korijena mongolskog kozlinca

#### 4.1.1. Protuupalni učinci

Protuupalni učinci mongolskog kozlinca istraženi *in vitro* odnose se na inhibiciju proizvodnje proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  i dr., inhibiciju transkripcije posredovane faktorom NF- $\kappa$ B te supresiju p38 MAPK staničnog signalnog puta. Kalikozin posjeduje izražena protuupalna svojstva i može učinkovito suzbiti alergijsku upalu (Zhang i sur., 2018). Astramembranin I inhibira povećanje propusnosti vaskularne stijenke inducirano serotoninom ili histaminom kada se primijeni štakorima intravenski u dozi od 5 mg/kg ili peroralno u dozi od 50 mg/kg. Oralna primjena astramembranina I uzrokovala je o koncentraciji ovisno smanjenje edema stražnje šape štakora uzrokovanog karagenanom (Tang i Eisenbrand, 1992).

Saponini izoastragalozid II i astragalozidi I, II i IV uspješno su inhibirali produkciju dušikova (II) oksida (NO) u mišjim makrofagima RAW264.7 koji su prethodno stimulirani lipopolisaharidom (LPS). Polisaharidi mongolskog kozlinca (APS) pokazuju izrazitu protuupalnu aktivnost na animalnim modelima s induciranim artritismom. Jedna studija pokazala je da APS potiču apoptozu stanica RSC-364 (sinovijalne stanice slične fibroblastima) prethodno stimuliranih s IL-1 $\beta$  smanjujući ekspresiju apoptotskog regulatornog proteina BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), povećavajući ekspresiju proapoptotskog proteina BAX (engl. *BCL-2-associated X protein*) i potičući aktivnost kaspaze-3. Istovremeno su učinkovito smanjili proizvodnju proupalnih citokina IL-6 i TNF- $\alpha$ , a zaustavili su i aktivaciju PI3K/Akt/mTOR signalnog puta (Dasgupta, 2019). U drugoj studiji APS su učinkovito smanjili upalnu reakciju izazvanu palmitatom u stanicama RAW264.7 putem aktivacije

enzima AMPK (protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom). Također su pokazali protuupalno djelovanje u *in vitro* studiji na Caco-2 staničnoj liniji tretiranoj bakterijskim LPS endotoksinom. Ustanovljeno je da jedan od protuupalnih mehanizama APS može biti inhibicija adhezije upalnih stanica na endotel krvnih žila smanjivanjem ekspresije CD34 na površini endotelne stanice. Uočeno je da APS mogu značajno smanjiti razinu NO u serumu i reducirati kroničnu upalu uzrokovanu poremećajem metabolizma NO. U dozi od 200 mg/kg, APS mogu pridonijeti liječenju kolitisa izazvanog 2,4,6-trinitrobenzensulfonskom kiselinom u štakora smanjivanjem ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  i povećavanjem ekspresije transkripcijskog faktora NFAT4 (Wang i sur., 2019).

Astragalozid IV je smanjio progresiju upale dišnih putova, reakcije preosjetljivosti i remodeliranje dišnih putova na mišjem modelu astme. Otkriveno je da smanjuje ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i drugih proupalnih citokina tako što sprječava fosforilaciju I $\kappa$ B $\alpha$  i smanjuje translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru čime dolazi do inhibicije NF- $\kappa$ B signalnog puta. Također je znatno smanjio adheziju neutrofila na stanice endotela i daljnju infiltraciju tkiva putem smanjenja ekspresije CD11b/CD18 i ICAM-1 na površini epitelne stanice nakon cerebralne ishemijsko-reperfuzijske ozljede (CIRI), a smanjio je i razinu mijeloperoksidaze (MPO) u mozgu. Na *in vivo* modelu miševa s atopijskim dermatitisom uzrokovanim 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom ekstrakt kozlinčeva korijena (100 mg/kg) reducirao je kožne lezije smanjivši razinu TNF- $\alpha$  i ekspresiju Th2 citokina IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, a djelovao je snažnije od prednizona primijenjenog u dozi 3 mg/kg (Li i sur., 2014). Ekstrakt biljke inhibirao je lučenje citokina izazvano glikotoksinima AGE (engl. *advanced glycation end products*) i na taj način smanjio upalu posredovanu makrofagima, što ukazuje na potencijal primjene kozlinca u prevenciji dijabetesa i njegovih makrovaskularnih komplikacija (Auyeung i sur., 2016; Li i sur., 2016).

Astragalozid IV sprječava apoptozu stanica miokarda, što ukazuje na njegov potencijal u liječenju miokarditisa i prevenciji zatajenja srca. *In vitro* studijom na endotelne stanice pupčane vrpce čovjeka (HUVEC) pokazano je da astragalozid IV sprječava staničnu apoptozu i upalne reakcije uzrokovane hiperglikemijom tako što inhibira aktivaciju JNK signalnog puta. Može potaknuti staničnu proliferaciju, smanjiti apoptozu i razinu ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u HUVEC, a također snižava i ekspresiju c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), apoptoza regulirajuće signalne kinaze 1 (ASK1), citokroma c, kaspaze-9 i kaspaze-3 te smanjuje relativni udio BAX naprema BCL-2. Takvi rezultati sugeriraju da astragalozid IV može inhibirati proces endotelne disfunkcije u dijabetičkim makrovaskularnim komplikacijama (You i sur., 2019).

#### 4.1.2. Antioksidacijska svojstva

Spojevi izolirani iz vrste *A. membranaceus* var. *mongholicus* sposobni su smanjiti oštećenja membrana izazvanih slobodnim radikalima inhibicijom lipidne peroksidacije i potenciranjem učinaka endogenih enzimskih antioksidansa. Formononetin, kalikozin i kalikozin-7-O- $\beta$ -D-glukozid mogu neutralizirati slobodne radikale 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila *in vitro*. Kalikozin je pokazao najsnažniju antioksidacijsku aktivnost u ispitivanju sa slobodnim radikalima, ali i na staničnom modelu. Otkriveno je da formononetin i kalikozin značajno reduciraju oštećenje stanica uzrokovano slobodnim radikalima proizvedenim djelovanjem ksantin oksidaze. U jednoj studiji izoflavoni i saponini kozlinca značajno su inhibirali peroksidaciju lipida stanične membrane izazvanu superoksidom, vodikovim peroksidom i UV zračenjem, a polisaharidi su pokazali znatno manji zaštitni učinak (Toda i Shirataki, 1999). Flavonoidi smanjuju ozljedu uzrokovanu glutamatom u neuronima PC12 i u znatnoj mjeri povećavaju aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) i glutation peroksidaze (GSH-Px) (Yu i sur., 2005). Saponini pozitivno utječu na rad srca tako što inhibiraju stvaranje peroksida u miokardu. Astragalozid IV može spriječiti aktivaciju perisinusoidnih stanica jetre uključenih u patofiziologiju jetrene fibroze inhibicijom oksidativnog stresa i pridružene p38 MAPK aktivacije (Auyeung i sur., 2016; Li i sur., 2014).

Zaštitni učinci astragalozida IV povezani s antioksidacijskim djelovanjem kod CIRI identificirani su na mišjem modelu tranzitorne ishemijske atake (TIA), a autori studije ukazuju na moguću primjenu u liječenju apopleksije mozga (Ren i sur., 2013). Demonstrirano je da astragalozid IV (3 mL/kg i 20-40 mg/kg) potiče uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) tako što pojačava djelovanje endogenih antioksidansa. Njegova primjena može smanjiti razinu malondialdehida (MDA) i povećati razinu GSH-Px i SOD. Smanjuje oštećenje izazvano oksidacijskim stresom uslijed CIRI, pri čemu je potencijalni mehanizam povezan s aktivacijom Nrf2/ARE/HO-1 signalnog puta, promicanjem stvaranja i translokacije Nrf2 te pojačavanjem ekspresije hem oksigenaze 1, enzima koji igra ključnu ulogu u prevenciji upale stijenke krvnih žila. U istraživanju učinka na kardiotoksičnost uslijed primjene doksorubicina, otkriveno je da astragalozid IV primijenjen u dozi od 30  $\mu$ g/mL regulira MAPK i ekspresiju gena nizvodno u MAPK signalnom putu, znatno smanjuje stvaranje ROS i razinu LDH, CK-MB i citokroma c te povećava razinu ATP-a, sukcinat dehidrogenaze i aktivnost ATP sintaze. *In vivo* je dokazano da polisaharidi vrste *A. membranaceus* u koncentracijama 200 i 300 mg/kg/dan povećavaju aktivnost katalaze, SOD i GSH-Px pokazujući tako antioksidativni učinak usporediv onom vitamina E u dozi od 100 mg/kg/dan (Li i sur., 2012; Li i sur., 2016).

### 4.1.3. Imunomodulirajući učinci

Rezultati prekliničkih ispitivanja upućuju na povoljno djelovanje korijena mongolskog kozlinca i njegovih sastavnica na imunosti sustav. Djelovanje se većinom temelji na stimulaciji aktivnosti stanica imunosti sustava i regulaciji sekrecije citokina pomagačkih T-limfocita i ekspresije gena uključenih u imunosti odgovor. Polisaharidi izolirani iz vodenog ekstrakta korijena pokazali su širok spektar imunostimulirajućih učinaka na miševe nakon intraperitonealne primjene. Povećali su težinu i broj stanica mišje slezene i odgovor slezene na ovčje crvene krvne stanice te stimulirali fagocitnu aktivnost peritonealnih makrofaga. Povećan je i broj aktiviranih makrofaga u slezeni proučavanih životinja. Nakon što je polisaharidna frakcija primijenjena intravenski ili intragastrično, čak i u većim dozama, fagocitna funkcija peritonealnih makrofaga nije se značajno promijenila (Fang i sur., 1982). Dokazano je da APS poboljšavaju funkciju limfocita B i T, makrofaga i dendritičnih stanica. Studija na miševima zaraženim bakterijom *Aeromonas hydrophila* pokazala je da APS pojačavaju aktivnost neutrofila i povećavaju omjer  $CD4^+/CD8^+$  T-limfocita. Na eksperimentalnom modelu štakora s kolitisom uzrokovanim trinitrobenzen sulfonskom kiselinom otkriveno je da APS reguliraju ekspresiju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i NFATc4 te da prema tome mogu znatno doprinijeti liječenju kolitisa (Zeng i sur., 2019). Rezultati istraživanja učinka APS na imuni odgovor u adjuvantnom neživom cjepivu protiv hepatitisa B sugeriraju da APS djeluju kao snažan adjuvans u cjepivu i da mogu poboljšati i humoralni i stanični imuni odgovor aktivacijom signalnog puta Toll-like receptora 4 te inhibirati ekspresiju transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Li i sur., 2014). *In vitro* studija na BMDC stanicama (engl. *bone marrow derived dendritic cells*) pokazala je da proteinska frakcija kozlinca može značajno povećati proliferaciju limfocita slezene, peritonealnih makrofaga i dendritičnih stanica. Ispitivani proteini pospješili su fagocitozu i potaknuli peritonealne makrofage na izlučivanje imunomodulacijskih faktora (IL-6, TNF- $\alpha$ , NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a povećali su i ekspresiju proupalnih citokina (IL-6, IL-12, p40, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ ) i kemokina (CXCL1, CCL3) u BMDC (Huang i sur., 2019). Otkriveno je da APS mogu aktivirati proliferaciju stanica i povećati proizvodnju citokina u B-limfocitima i makrofagima miševa te da su sposobni stimulirati makrofage na ekspresiju iNOS gena putem aktivacije transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B (Lee i Jeon, 2005). AMem-P pojačava aktivnost retikuloendotelnog sustava. Uočeno je da APS u koncentraciji od 300  $\mu$ g/mL mogu značajno povećati razinu NO, IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u humanim monocitima THP-1. Liječenje miševa s APS u dozi od 400 mg/kg nakon ligacije cekuma dovelo je do povećanja populacije pomagačkih T-limfocita (Th) i

postotka Th17 stanica u krvi. Prema tome, APS bi mogli djelovati na imunosupresiju u polimikrobnoj sepsi. Proporcionalno primijenjenoj dozi (5, 10 i 20 mg/kg), APS mogu značajno povisiti titar specifičnih protutijela za FMDV virus (virus bolesti šaka, stopala i usta), povećati proliferaciju limfocita slezene i ekspresiju IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 i IL-10 (Wang i sur., 2019).

Novija studija pokazala je da saponini izolirani iz korijena vrste *A. membranaceus* mogu *in vitro* i *in vivo* potaknuti mitozu limfocita mišje slezene. Uočeno je da mogu inducirati i proliferaciju osiromašene populacije T-limfocita, no na B-limfocite nemaju gotovo nikakav učinak. Također induciraju stanične i humoralne imunodne odgovore i značajno povećavaju titre antitijela IgG1 i IgG2b specifičnih za ovalbumin u serumu miševa. Studije mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi pacijenata s miastenijom gravis pokazale su da saponini mogu značajno smanjiti titar protutijela za nikotinske receptore acetilkolina. Taj je rezultat pružio odgovor na pitanje zašto su saponini kozlinca bili učinkoviti u liječenju autoimunih poremećaja. U ispitivanju *in vivo* učinaka saponina na proupalne citokine miševa soja Swiss albino starih 6-8 tjedana primijećeno je da astragalozid VII posjeduje snažne imunoregulacijske učinke bez stimulacije proupalnih citokina, međutim, u uvjetima *in vitro* nije bilo značajnijeg utjecaja na stanične mete uključene u upalni proces. Astramembranin I primijenjen i.v. u dozi od 10 mg/kg izazvao je nakupljanje cAMP-a u zečevoj plazmi. Povećanje cAMP-a počelo je nakon 30 minuta i doseglo je maksimum oko 0,5-4 sati nakon jednokratne injekcije. Saponin je utjecao na biosintezu DNA u djelomično hepatektomiziranim miševima. Astragalozid IV povećava proliferaciju limfocita B i T, lučenje IL-1 i proizvodnju antitijela *in vitro* i *in vivo* (Zhang i sur., 1984; Auyeung i sur., 2016).

Ekstrakt mongolskog kozlinca u stanicama kokoši zaraženih bakterijom *Eimeria tenella* značajno je povećao razinu IgG i proliferaciju stanica slezene sa specifičnim antigenom protiv bakterije. Zaključeno je da suplementacija ekstraktom pojačava humoralni i stanični imuni odgovor u kokoši zaraženih s *E. tenella* (Guo i sur., 2004). U jednoj *in vitro* studiji proliferacija mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi i proizvodnja IgM i citokina stimulirana je ekstraktom kozlinčeva korijena. Otkriveno je da Astragali radix potiče mišje makrofage na stvaranje IL-6 i TNF (Sinclair, 1998).

Istraživanjem u kojem je sudjelovalo 28 pacijenata sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE) ispostavilo se da pacijenti sa SLE imaju zamjetno nižu aktivnost NK stanica (stanica prirodnih ubojica) u odnosu na kontrolnu skupinu. Preinkubacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi ispitanika s pripravkom korijena mongolskog kozlinca stimulirala je citotoksičnu aktivnost NK stanica i u bolesnika sa SLE-om i u zdravih pojedinaca iz kontrolne

skupine. Korijen vrste *A. membranaceus* obnovio je aktivnost NK stanica inhibiranu steroidima i potaknuo produkciju IL-2 i IFN- $\alpha$ . Također može obnoviti narušenu funkciju T-limfocita u pacijenata s karcinomom. T-limfociti izolirani iz 10 pacijenata s rakom pokazali su subnormalne *graft-versus-host* (GVH) reakcije u usporedbi s 10 zdravih pojedinaca iz kontrolne skupine kod kojih su se redovito javile normalne GVH reakcije. Kada su stanice pacijenata s karcinomom tretirane drogom *Astragali radix ex vivo*, GVH reakcija je obnovljena u 9 od 10 uzoraka. U nekim je uzorcima imunološka reakcija čak premašila onu u uzorcima kontrolne skupine. U sličnoj studiji GVH reakcija u uzorcima krvi 13 pacijenata s karcinomom, zaključeno je da tretiranje mononuklearnih stanica s ekstraktima i pojedinim sastavnicama korijena kozlinca može korigirati imunosupresiju koja je primijećena u limfocitima ovih bolesnika (Block i Mead, 2003).

#### 4.1.4. Protutumorski učinci

Mongolski kozlinac posjeduje i antitumorska svojstva demonstrirana na stanicama karcinoma kolona, hepatocelularnog karcinoma i drugim tumorskim stanicama čovjeka. Protutumorski učinak vjerojatno je povezan s aktivacijom antitumorskih mehanizama imunskog sustava čovjeka. Rezultati provedenih pretkliničkih istraživanja pokazuju da *Astragali radix* inhibira proliferaciju stanica raka dojke smanjujući fosforilaciju protein kinaze B, inducira apoptozu i interferira sa staničnim ciklusom tumorskih stanica (Zhou i sur., 2009). Ekstrakt korijena inhibira rast stanica karcinoma kolona *in vitro*, a inhibicija rasta tumorskih stanica zabilježena je i u *in vivo* studijama. Incidencija karcinoma mokraćnog mjehura izazvanog N-butil-N'-butanolnitrozoaminom bila je značajno niža u miševa liječenih korijenom mongolskog kozlinca u usporedbi s netretiranim miševima u kontrolnoj skupini. Hepatokarcinogeneza je također spriječena u štakora liječenih vodenim ekstraktom kozlinca, sa vidno smanjenim brojem i površinom fokalnih jetrenih lezija (Auyeung i sur., 2016).

Djelovanje astragalozida IV na smanjenje proliferacije HepG2 stanica (humani hepatocelularni karcinom) povezano je sa utišavanjem ekspresije onkogene Vav3.1, a njegov učinak ovisi o primijenjenoj dozi i vremenu. Astragalozid IV je u velikoj mjeri potisnuo migraciju i invaziju A549 stanica adenokarcinoma redukcijom ekspresije E-kadherina, integrina  $\beta 1$  i MMP-a, blokadom PKC- $\alpha$ -ERK1/2-NF- $\kappa$ B signalnog puta, inhibicijom aktivnosti Treg stanica i povećanjem aktivnosti citotoksičnih T-limfocita. Pokazalo se da može pojačati imunski odgovor u suzbijanju raka pluća *in vivo*. Ukupni astragalozidi inhibiraju proliferaciju stanica želučanog karcinoma MKN-74, a injekcija astragalozida IV



može inhibirati proliferaciju stanica karcinoma dojke. Eksperimentalni podaci pokazali su da kalikozin i ukupni flavonoidi mogu inhibirati proliferaciju K562 stanica (Li i sur., 2016).

Pripravak korijena vrste *A. mongholicus* pokazao se sposobnim spriječiti ponovni nastanak malignih oboljenja, produljiti preživljavanje i povećati otpornost na imunosupresiju uzrokovanu radioterapijom i antineoplastičnim lijekovima poticanjem makrofaga na stvaranje IL-6 i TNF, zbog čega se smatra potencijalnim korisnim pomoćnim sredstvom u kemoterapiji koje može poboljšati učinkovitost i smanjiti sistemske nuspojave konvencionalnih citostatika (Yoshida i sur., 1997). Kozlinac je u kombinaciji s rekombinantnim IL-2 (rIL-2) sposoban pojačati antikancerogenu aktivnost LAK stanica (limfokinom aktivirane stanice ubojice) generiranih pomoću rIL-2 na mišjem modelu karcinoma bubrega, a smanjuje i teške nuspojave terapije s rIL-2 kao što su akutno zatajenje bubrega, sindrom kapilarnog curenja, infarkt miokarda i edemi. U drugoj studiji na Hs294T staničnoj liniji melanoma rIL-2 u kombinaciji s kozlincem bio je deset puta učinkovitiji od samog rIL-2 (Qi i sur., 2010).

Primijenjeni zasebno, APS nisu pokazali antitumorsko djelovanje u stanicama H22/ADM (mišje stanice hepatocelularnog karcinoma rezistentne na doksorubicin) *in vitro*. Međutim, primijećeno je da APS primijenjeni u koncentraciji 0,8–500 mg/L mogu povećati citotoksičnost određenih citostatika poput ciklofosfamida, doksorubicina, 5-fluorouracila, cisplatina, etopozida i vinkristina, pri čemu je učinak maksimalan pri koncentraciji od 500 mg/L. Zaključeno je da APS smanjuju funkciju efluks pumpe P-glikoproteina i tako povećavaju osjetljivost H22/ADM stanica na kemoterapiju, a mehanizam uključuje smanjenje ekspresije MDR1 gena, a potencijalno i direktnu inhibiciju funkcije P-glikoproteina. Zabilježeno je da je rak mokraćnog mjehura značajno reduciran kod miševa liječenih s 50 mg/mL APS, u usporedbi s kontrolnom skupinom, jer APS mogu poboljšati urođeni imunski odgovor epitelnih stanica mokraćnog mjehura povećavajući ekspresiju Toll-like receptora 4. Također je uočeno da APS smanjuju aktivnost telomeraze i izazivaju apoptozu humanih HL-60 stanica (ljudska stanična linija leukemije), iskazujući tako antitumorsko djelovanje. Ustanovljeno je da APS ne pokazuju izravan antitumorski učinak, već je on postignut poticanjem proizvodnje TNF- $\alpha$  u makrofagima i IFN- $\gamma$  u limfocitima slezene. Uz to, APS mogu inhibirati invaziju stanica raka jetre HepG2 regulacijom provođenja signala u TGF- $\beta$ /Smad signalnom putu (Tian i sur., 2012; Wang i sur., 2019).

#### 4.1.5. Ostali učinci

*A. mongholicus* pokazao je *in vitro* antibakterijsko djelovanje protiv bakterija *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumonia* i *Staphylococcus aureus*. U drugoj studiji ekstrakt korijena primjenjivan kod kokoši zaraženih bakterijom *Mycoplasma gallisepticum* smanjio je broj patogenih bakterija *E. coli* i *Bacteroides spp.*, a povećao broj dobrih bakterija (bifidobakterija, laktobacila) (Guo i sur., 2004).

*In vivo* je dokazan inhibitorni učinak kozlinca na retroviralnu transkriptazu i DNA polimerazu. Polisaharidi kozlinca mogu zaštititi organizam od virusa, u određenoj mjeri inducirati proizvodnju IFN i inhibirati reprodukciju virusa. Također mogu potaknuti CD4<sup>+</sup> T-limfocite na proizvodnju IL-4, IL-2 i IFN- $\gamma$ , što sugerira da APS mogu biti moćan dodatak DNA cjepivu protiv virusa hepatitisa B (HBV). Štoviše, APS mogu značajno povećati otpornost pilića starih 15 dana na virus ptičje gripe H5N1 i spriječiti infekciju svinjskim cirkovirusom smanjenjem oksidacijskog stresa i aktiviranjem signalnog puta NF- $\kappa$ B. U koncentraciji od 30  $\mu$ g/mL mogu inhibirati reprodukciju virusa herpesa, smanjujući tako učestalost tumora (limfoma, Kaposijeva sarkoma) (Wang i sur., 2019).

Proučavan je kardioprotektivni učinak ekstrakta korijena mongolskog kozlinca kod ishemije miokarda i njegov mehanizam djelovanja na signalnu kaskadu uzrokovanu s ROS na različitim modelima štakora. Pretpostavlja se da je kardioprotektivni učinak posljedica zaštite tkiva miokarda i smanjenja serumskih biljega ishemijske ozljede. Zaštitni učinak flavonoida u kardiovaskularnim bolestima pripisuje se snažnom antioksidacijskom djelovanju čime dolazi do poboljšanja profila ateroskleroze. Astragalozid IV smanjuje ozljedu miokarda uzrokovanu oksidacijskim stresom, kao i apoptozu stanica miokarda induciranu doksorubicinom. Na modelu BALB/c miševa s virusnim miokarditisom izazvanim CVB3 pokazalo se da intragastrična primjena 9%-tne otopine astragalozida IV tijekom 7 dana može povećati prevalenciju preživljavanja miševa koji boluju od miokarditisa, inhibirati replikaciju CVB3, kao i smanjiti sintezu kolagena te apoptozu stanica miokarda. Astragalozid IV može zaštititi stanice miokarda štakora od oštećenja uzrokovanih nedostatkom kisika te povećati sadržaj i aktivnost SOD-a u citoplazmi. Nadalje, pospješuje srčanu funkciju kod ishemije miokarda i infarkta miokarda u štakora tako što smanjuje preopterećenje kalcijem uzrokovano ishemijom i hipoksijom vraćajući ravnotežu između slobodnog kalcija i ukupnog kalcija i poboljšavajući aktivnost kalcijevih pumpi u membranama eritrocita (Ren i sur., 2013; Li i sur., 2014).

Kozlinac smanjuje ozljedu podocita Bowmanovih čahura nastalu djelovanjem MAC kompleksa (kompleks koji napada membranu) sustava komplementa. Pokazao se efikasnim u

terapiji eksperimentalno induciranog glomerulonefritisa u štakora, posebice u liječenju proteinurije. Štakori kojima su davane visoke doze droge *Astragali radix* imali su manji stupanj proteinurije i blaže patološke promjene tkiva u odnosu na kontrolnu skupinu. Nekoliko ispitivanja provedeno je na modelima štakora s nefrektomijom, dijabetičkom nefropatijom izazvanom streptozocinom i nefrotskim sindromom izazvanim doksorubicinom. Rezultati potvrđuju da mongolski kozlinac smanjuje proteinuriju i patološku ozljedu. Smanjuje također glomerularnu hiperperfuziju i poboljšava rad bubrega. Ti učinci mogu biti povezani s inaktivacijom slobodnih radikala, inhibicijom sinteze NO i smanjenjem proizvodnje TNF- $\alpha$ . U štakora s nefrotskim sindromom izazvanim doksorubicinom kozlinac ispoljava svoj terapijski učinak na diurezu snižavanjem genske ekspresije vazopresina hipotalamusa, renalnog V2 receptora i akvaporina 2 (AQP2). Dostupni dokazi upućuju na to da kozlinac ima potencijalno korisne učinke u ranim fazama kronične bolesti bubrega (Li i Wang, 2005; Zhang i sur., 2019).

Jedna studija pokazala je da APS mogu djelomično regulirati inzulinsku signalizaciju u skeletnom mišiću otpornom na inzulin, što ih čini potencijalnim inzulinskim senzibilizatorima u liječenju dijabetesa tipa 2. Posjeduju i sposobnost regulacije ekspresije galektina-1 u mišićima miševa sa šećernom bolesti tipa 1. U tretiranju miševa sa šećernom bolesti tipa 2 primjenom astragalozida IV, smanjena je razina glikogen fosforilaze i glukoza-6-fosfataze u jetri, što je dovelo do smanjenja inzulinske rezistencije i smanjenja razine šećera i triglicerida u krvi. Otkriveno je da primjena astragalozida IV može poboljšati stanje kod metaboličkog sindroma izazvanog fruktozom kod štakora povećavanjem razine dušičnih metabolita i cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP), što se očitivalo kao smanjenje krvnog tlaka i poboljšanje inzulinske rezistencije (Ren i sur., 2013).

Astragalozid IV pomogao je u regulaciji astme uzrokovane eozinofilima i ovalbuminom inhibicijom ekspresije C-C kemokinskog receptora 3 (CCR3), ICAM-1,  $\alpha$ -SMA, VEGF, TGF- $\beta$ 1, TSLP i GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), smanjenjem razine TNF- $\alpha$  i povećanjem broja CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg stanica te razine nekih citokina (Li i sur., 2016).

U jednom istraživanju vodeni ekstrakti 18 biljaka testirani su radi utjecaja na pokretljivost spermija. Vrsta *A. mongholicus* jedina je pokazala značajan stimulacijski učinak. Korištenjem otopine kozlinca koncentracije 10 mg/mL, pokretljivost spermija povećana je na 146,6 +/- 22,6% u odnosu na kontrolnu skupinu (Sinclair, 1998).

*In vitro* istraživanja pokazala su da pri ispravnom tlakom centrifugiranja (200-500 o/min), astragalozid IV (50  $\mu$ M) značajno poboljšava osteogenezu i ekspresiju s njom

povezanih proteina u prekursorima osteoblasta OCT-1 (engl. *osteocalcin-T antigen clone-1*), što implicira potencijalnu korist primjene kozlinca u terapiji osteoporoze (Li i sur., 2016). *In vivo* studijom na zečevima otkriveno je da kalikozin-7-O- $\beta$ -D-glukozid djeluje na ublažavanje osteoartritisa jer inhibira aktivnost hijaluronidaze i ekspresiju gena hondrocita MMP-3 i MMP-13 induciranih osteoblastima u osteoartritisu te štiti zglobove smanjujući sadržaj prostaglandina i ukupnih proteina u sinovijalnoj tekućini i reducirajući strukturalne promjene hrskavice (Choi i sur., 2007).

Nekoliko studija ukazalo je na neuroprotektivno djelovanje mongolskog kozlinca. U jednoj *in vivo* studiji ekstrakt korijena vrste *A. membranaceus* uzrokovao je značajan porast preživljenja živčanih stanica i smanjenje procesa apoptoze u živčanom sustavu oštećenom cerebralnom ishemijom (Huang i sur., 2012). Na životinjama je također uočeno poboljšanje sposobnosti učenja i pamćenja nakon primjene ekstrakta kozlinčeva korijena kod deksametazonom izazvanog oštećenja živčanog sustava (Li i sur., 2011b).

U studiji *anti-aging* učinka mongolskog kozlinca zaključeno je da APS mogu produžiti životni vijek miševa, poboljšati aktivnost SOD-a i smanjiti udio malonaldehida u serumu miševa u usporedbi s kontrolnom skupinom, što sugerira da polisaharidi posjeduju učinke protiv starenja. Nekoliko ekstrakata korijena vrste *A. membranaceus* također je značajno povećalo telomeraznu aktivnost u kulturi T-limfocita (Li i sur., 2014).

Na animalnom modelu također je ustanovljeno da astragalozid IV u dozi od 100  $\mu\text{mol/L}$  značajno povećava migraciju keratinocita nakon ozljede i potiče angiogenezu i sintezu kolagena, što ukazuje na opravdanost tradicionalne primjene droge *Astragali radix* u liječenju rana i kožnih bolesti (Chen i sur., 2012).

## 4.2. Rezultati kliničkih studija

### 4.2.1. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju karcinoma

Maligni su tumori pluća među najučestalijim vrstama raka u svijetu i najsmrtonosnijim zloćudnim bolestima. Karcinom pluća ne-malih stanica (NSCLC) najčešća je vrsta i čini 85-90% ukupnog broja slučajeva raka pluća, a njegovi su osnovni histološki podtipovi adenokarcinom, karcinom pločastih stanica i karcinom velikih (nediferenciranih) stanica. Simptomi su nespecifični i uključuju uporan kašalj, osjećaj zaduhe, promuklost, bol u prsima, umor, gubitak tjelesne težine, gubitak apetita i ponekad iskašljavanje krvi, no simptomi se često javljaju tek u kasnijim stadijima bolesti. Glavni pristup liječenju u ranom stadiju raka predstavlja kirurška resekcija, no kod lokalno uznapredovalog NSCLC-a primjenjuje se kemoterapija u kombinaciji s radioterapijom i/ili operacijom. Kemoterapija gotovo uvijek uključuje cisplatin ili karboplatin zbog dobre učinkovitosti, no njihov loš sigurnosni profil često dovodi do odgode ili prekida liječenja (McCulloch i sur., 2006).

Kako bi se istražio utjecaj primjene injekcije mongolskog kozlinca (AI) u kombinaciji s kemoterapijom na kvalitetu života (QOL) pacijenata s uznapredovalim NSCLC-om, 60 pacijenata nasumično je raspoređeno u ispitivanu ( $n = 30$ , liječeni kombinacijom kemoterapije i AI) i kontrolnu skupinu ( $n = 30$ , liječeni isključivo kemoterapijom). U obje skupine primijenjena je kemoterapija MVP (mitomicin C, vinblastin, cisplatin) protokola. Ispitivana skupina primala je još i 60 mL intravenske infuzije kozlinca dnevno. Provedena su 2-3 ciklusa liječenja, pri čemu je svaki ciklus trajao 21-28 dana. Stopa učinkovitosti terapije u ispitivanoj skupini iznosila je 40,0%, a u kontrolnoj skupini 36,7%. Prosječno trajanje remisije u ispitivanoj i kontrolnoj skupini iznosilo je 5,4 mjeseca i 3,3 mjeseca, srednje razdoblje preživljenja 11 mjeseci i 7 mjeseci, a jednogodišnja stopa preživljenja 46,75%, odnosno 30,0%. Sve razlike navedenih indeksa između dviju skupina bile su značajne ( $P < 0,05$ ). Štoviše, klinička stopa poboljšanja i stopa porasta QOL u ispitivanoj skupini bila je 80,4% i 43,3%, a u usporedbi s onima u kontrolnoj skupini (50,0% i 23,3%) razlika je također bila značajna ( $P < 0,01$ ). Ispitivana skupina imala je i nešto veću dvogodišnju i trogodišnju stopu preživljenja te manju incidenciju nuspojava kemoterapije poput leukopenije, trombocitopenije i anemije. Zaključeno je da AI u kombinaciji s kemoterapijom može značajno poboljšati QOL bolesnika s NSCLC-om u poodmakloj fazi (Zou i Liu, 2003).

Pojačan odgovor tumora na kemoterapiju u ispitivanoj skupini zabilježen je i u randomiziranoj kontroliranoj studiji na 96 pacijenata u stadiju III i IV uznapredovalog

NSCLC-a u kojoj je kontrolna skupina liječena MVP (mitomicin C, vindezin, cisplatin) i CAP (ciklofosfamid, doksorubicin, cisplatin) kemoterapijskim protokolima, a ispitivana skupina je, uz kemoterapiju, uzimala i tablete koje su sadržavale korijen mongolskog kozlinca u prašku (Gao i sur., 2001).

U jednoj randomiziranoj studiji sudjelovalo je 60 pacijenata s NSCLC-om koji su liječeni vinorelbinom i cisplatinom s ili bez dodatka 60 mL AI dnevno. Svi pacijenti prošli su dva ciklusa kemoterapije, a injekcija kozlinca primjenjivana je tijekom prvih osam dana oba ciklusa isključivo u ispitivanoj skupini. Rezultati su pokazali veću uspješnost liječenja, manji broj slučajeva leukopenije i kemoterapijom izazvane mučnine i povraćanja u skupini koja je primala AI, a zabilježena je i bolja imunosna funkcija s višom razinom CD4<sup>+</sup> T-limfocita i većim omjerom CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Vrijednosti Karnofsky skale (KPS) kojom se procjenjuje opće tjelesno stanje bolesnika u svih pacijenata iznosile su >60 (Liu i sur., 2007).

Provedena je studija u kojoj je 135 pacijenata s NSCLC-om prosječne dobi 56,5 godina nasumično raspoređeno u dvije skupine od kojih je prva primila dva ciklusa kemoterapije MVP (mitomicin, vinpocetin, cisplatin) protokola i 60 mL AI dnevno, a druga skupina liječena je samo MVP kemoterapijom. Jedan ciklus terapije trajao je 21 dan. Po završetku istraživanja, u prvoj skupini zamijećena je veća osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju, bolja funkcija imunološkog sustava, manja pojavnost leukopenije i trombocitopenije, a prijavljeno je i bolje opće stanje organizma (Cao i sur., 2019).

U još jednoj kontroliranoj studiji, 44 pacijenta oboljelih od NSCLC-a primalo je etopozid, cisplatin i 20 mL AI dnevno u dva ciklusa kemoterapije u trajanju od 21 dana, a 43 pacijenta u kontrolnoj skupini liječeno je samo etopozidom i cisplatinom. Pacijenti su bili starije životne dobi, a prosječna dob iznosila je 67 godina. Na kraju drugog ciklusa zabilježen je bolji odgovor tumora na terapiju, manje nuspojava i veća stopa preživljenja u ispitivanoj skupini (Liu i Lan, 2017).

Promatrao se učinak polisaharida vrste *A. membranaceus* na povećanje učinkovitosti i smanjenje toksičnosti kemoterapije u pacijenata s malignim tumorima. U studiji je 120 pacijenata s karcinomom nasumično raspoređeno u ispitivanu i kontrolnu skupinu. Obje su skupine liječene kemoterapijom, ali ispitivanoj skupini je dodatno primijenjivana injekcija APS sporom intravenskom infuzijom (20 mL u 250 mL fiziološke otopine) jednom dnevno tijekom 21 dana (1 ciklus). Takva terapija je zatim ponovljena u iduća četiri uzastopna ciklusa liječenja. U usporedbi s kontrolnom skupinom, ispitivana skupina pokazala je nižu incidenciju leukopenije i trombocitopenije i općenito manje sniženje broja krvnih stanica (P <0,05), popraćeno značajno smanjenim brojem CD8<sup>+</sup> T-limfocita (P <0,05). Razina IgG i IgM je bila

povišena ( $P < 0,05$ ), a KPS vrijednosti bile su veće od onih u kontrolnoj skupini. Razina IgA nije se promijenila ni u jednoj skupini. Zaključeno je da injekcija APS kao dopuna kemoterapiji može spriječiti razvoj tumora, smanjiti štetni učinak kemoterapije, ojačati imunosti sustav i poboljšati kvalitetu života pacijenata (Duan i Wang, 2002).

#### **4.2.2. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju kronične bolesti bubrega**

Kronično zatajenje bubrega može biti posljedica svakog stanja koje uzrokuje bubrežnu disfunkciju dovoljnog trajanja i intenziteta, a manifestira se smanjenjem brzine glomerularne filtracije (GFR) i/ili prisutnošću perzistentne proteinurije, hematurije, hipoalbuminemije i poremećaja ravnoteže elektrolita. Jedan od najčešćih uzroka predstavlja dijabetička nefropatija, a ponekad se javlja i kao posljedica primarnog ili sekundarnog nefrotskog sindroma čije su glavne karakteristike proteinurija ( $>3,5$  g/dan), hipoalbuminemija ( $<2,5$  g/dL), hiperlipidemija i edemi (Litbarg, 2018).

U placebo kontroliranoj studiji na 62 pacijenta s razvijenom dijabetičkom nefropatijom, ispitivana skupina primala je 60 mL AI dnevno tijekom 3-4 tjedna. Svi pacijenti bolovali su od dijabetesa tipa 2 barem šest godina i liječeni su hipoglikemicima, antihipertenzivima i nefarmakološkim mjerama. Prosječna dob ispitanika iznosila je 65,2 godine. Klirens kreatinina u ispitivanoj skupini iznosio je  $89,28 \pm 13,77$  mL/min prije intervencije, a nakon provedenog istraživanja iznosio je  $110,77 \pm 19,58$  mL/min. U kontrolnoj skupini klirens kreatinina porastao je s  $88,16 \pm 15,49$  mL/min na  $98,37 \pm 16,08$  mL/min. Autori su zaključili da korijen mongolskog kozlinca posjeduje protektivne učinke na bubrege, tj. da može smanjiti proteinuriju i popraviti bubrežnu funkciju (Li i sur., 2011a).

Provedena je studija na 89 pacijenata starih 42-71 godinu s dijabetičkom nefropatijom u kojoj je ispitivana skupina tijekom osam tjedana dobivala 20 mL otopine mongolskog kozlinca sporom intravenoznom infuzijom dnevno, uz standardnu terapiju dijabetesa i nefropatije. Ispitivana skupina pokazala je značajno smanjenje serumskog kreatinina (sa  $139,60 \pm 43,90$   $\mu$ mol/L na  $87,86 \pm 14,19$   $\mu$ mol/L) i razine ureje u serumu (s  $20,16 \pm 1,53$  mmol/L prije terapije s AI na  $8,98 \pm 0,50$  mmol/L), dok su u kontrolnoj skupini izmjerene vrijednosti prije ( $19,61 \pm 9,77$   $\mu$ mol/L kreatinina,  $137,30 \pm 44,70$  mmol/L ureje) i poslije provedene studije ( $18,06 \pm 6,91$   $\mu$ mol/L kreatinina,  $133,11 \pm 15,51$  mmol/L ureje) bile gotovo jednake (Ji i sur., 2006).

Randomizirana kontrolirana studija na 60 pacijenata s dijabetičkom nefropatijom usporedila je učinak mongolskog kozlinca u odnosu na blokatore angiotenzinskih receptora

(ARB) na liječenje albuminurije i proteinurije uslijed oštećenja bubrežne funkcije. Pacijenti su raspoređeni u dvije skupine, od kojih je prva primala 40 mL intravenske injekcije kozlinca dnevno tijekom 8 tjedana, a druga je bila liječena losartanom. U ispitivanoj skupini količina ukupnih proteina u 24-satnom urinu iznosila je  $0,39 \pm 0,18$  g u odnosu na  $0,98 \pm 0,27$  g izmjerenih prije intervencije, a količina albumina u urinu smanjila se sa  $145,70 \pm 21,9$  mg/24 sata na  $46,90 \pm 20,50$  mg/24 sata. Vrijednosti su bile vrlo slične u kontrolnoj skupini - količina proteina u 24-satnom urinu smanjila se s  $0,94 \pm 0,30$  g na  $0,42 \pm 0,23$  g, a količina albumina s  $150,30 \pm 23,60$  mg/24 sata na  $49,50 \pm 22,80$  mg/24 sata, na temelju čega je zaključeno da mongolski kozlinac posjeduje sličan protektivni učinak na bubrege kao i ARB (Zhang i sur., 2001).

U kontroliranoj randomiziranoj studiji na 38 pacijenata s primarnim nefrotskim sindromom kontrolna skupina liječena je kortikosteroidom, antikoagulansom i diuretikom, a ispitivana skupina dodatno je dobivala intravenske injekcije mongolskog kozlinca. Pokazalo se da je u ispitivanoj skupini veći broj pacijenata koji su postigli potpunu remisiju u odnosu na kontrolnu skupinu, no nije bilo znatne razlike u broju pacijenata s postignutom parcijalnom remisijom. AI je uzrokovala značajno povećanje serumskog albumina i smanjenje razine kolesterola u krvi u odnosu na lijekove u kontrolnoj skupini, no nije bilo zamjetne razlike u razini triglicerida u krvi (Feng i sur., 2013).

Kontrolirana randomizirana studija na 30-ero djece s primarnim nefrotskim sindromom imala je cilj istražiti utjecaj pripravka mongolskog kozlinca na proteinuriju, hipoalbuminemiju i edeme koji se javljaju kao najčešći simptomi nefrotskog sindroma. Djeca su nasumično raspoređena u dvije skupine - prva je primala prednizon i simptomatsku terapiju, a u drugoj skupini djeca su dodatno uzimala i oralnu otopinu mongolskog kozlinca. U drugoj skupini zabilježena je znatno povećana razina serumskog albumina (prosječno povećanje za 3,26 g/dL), smanjena proteinurija (prosječno smanjenje za 0,59 g/24 sata), a smanjen je i broj dana potrebnih za povlačenje edema, tj. edemi su se u prosjeku povukli pet dana ranije nego u kontrolnoj skupini. Zaključeno je da kozlinac može povećati terapijski učinak prednizona te da ima zaštitni učinak na bubrežnu funkciju (Wang, 2006).

Studijom na 46-ero djece s novonastalim nefrotskim sindromom ili relapsom bolesti ispitan je učinak mongolskog kozlinca na razvoj ponovnog relapsa i pojavnost infekcija kao čestih komplikacija nefrotskog sindroma. Kontrolna skupina primala je prednizon i simptomatsku terapiju, a ispitivana skupina dodatno je peroralno uzimala mongolski kozlinac u obliku granula. Rezultati su pokazali značajno reduciran broj djece kod koje se javio relaps bolesti u naredna tri mjeseca u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, u



ispitivanoj skupini primijećeno je i smanjenje incidencije infekcija (Zhou, 2010).

#### 4.2.3. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju virusnog miokarditisa

Virusni miokarditis (VMC) najčešće je uzrokovan infekcijom enterovirusom Cocksackie B ili adenovirusom. Abnormalno visoka ekspresija miR-146b i miR-155 može biti uključena u razvoj VMC, tj. može dovesti do oštećenja i apoptoze stanica miokarda. Antioksidacijski i protuupalni tretman često se uzima u obzir u liječenju VMC-a. Treg limfociti su imunosne stanice čiju diferencijaciju i sazrijevanje regulira FoxP3 koji može inhibirati aktivaciju raznih stanica imunskog sustava. Njegovim djelovanjem dolazi do supresije pretjeranog imunskog odgovora i smanjuje se potencijalna šteta. Naime, ROR $\gamma$ t (engl. *retinoic acid-related orphan receptor gamma t*) putem lučenja IL-17 potiče CD4<sup>+</sup> T-limfocite na oštećivanje stanica i tkiva (Zhang i sur., 2018).

Provedeno je kliničko ispitivanje na 68-ero djece s VMC-om pri čemu su djeca bila nasumično raspoređena u dvije skupine, ispitivanu AG (peroralno su uzimali 10 mL tekućeg pripravka korijena mongolskog kozlinca (AB) dnevno) i kontrolnu CG skupinu (primali su placebo). Istraživala se homeostaza perifernih Treg stanica. Iz uzoraka krvi izolirane su periferne Treg stanice u kojima su izmjerene razine miR-146b i miR-155, aktivnost Treg stanica i biomarkeri miokarditisa. Slučajevi sinusne tahikardije, preuranjene ventrikularne kontrakcije i supraventrikularne tahikardije bili su značajno smanjeni u AG skupini. Vrijednosti enzima miokarda (srčanih markera) bile su smanjene i indeksi srčane funkcije bili su poboljšani u AG skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom. Vrijeme potrebno za normalizaciju elektrokardiograma, trajanje simptoma i boravak u bolnici bili su kraći u AG skupini. Razine miR-146b i miR-155 bile su više u CG skupini nego u AG skupini. Razine FoxP3, IL-10 i TGF- $\beta$  bile su niže u kontrolnoj nego u AG skupini, dok su razine ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-21, CK-MB (kreatin kinaza-MB), cTnI (srčani troponin I), GrB (granzim B), sFasL (topljivi Fas ligand) i kaspaze-3 bile više u odnosu na AG skupinu. Nadalje, razine ROR $\gamma$ t, IL-17, IL-21, CK-MB, cTnI, GrB, sFasL i kaspaze-3 bile su pozitivno, dok su razine FoxP3, IL-10 i TGF- $\beta$  bile negativno povezane s razinama miR-146b i miR-155. Terapija s AB poboljšala je srčanu funkciju i neravnotežu perifernih Treg stanica u djece s VMC-om smanjujući razinu miR-146b i miR-155. U AG skupini značajno je smanjena serumska aktivnost CK, CK-MB i LDH, a minutni volumen i udarni volumen srca znatno su povećani nakon dvotjednog liječenja, što dodatno upućuje na to da AB poboljšava srčanu funkciju u VMC djece. Rezultati sugeriraju da AB može povećati razinu Treg stanica, a smanjiti razinu

Th17 stanica koje luče IL-17 i IL-21 te učinkovito smanjiti umor, palpitacije, bol u prsima i druge kliničke manifestacije VMC-a u djece. Studija ukazuje na potencijal vrste *A. membranaceus* u liječenju VMC u smislu ublažavanja simptoma i znakova te smanjenja razine srčanih enzima (Zhang i sur., 2018).

Randomizirana klinička studija usporedila je učinkovitost ekstrakta vrste *A. membranaceus* uz suportivno liječenje nasuprot isključivo suportivnom liječenju u terapiji VMC-a u 54 ispitanika. Uočeno je da pacijenti s VMC-om imaju znatno manji broj T-limfocita u perifernoj krvi i manji omjer  $CD4^+/CD8^+$  T-limfocita od zdravih pojedinaca, pa je primarni cilj ispitivanja bio istražiti učinak biljke na podvrste T-limfocita periferne krvi. Pacijenti s VMC-om koji su peroralno uzimali tekući ekstrakt korijena mongolskog kozlinca pokazali su povećan broj  $CD4^+$  T-limfocita i omjer  $CD4^+/CD8^+$  T-limfocita, što ukazuje na pojačan imunski odgovor (Huang i sur., 1995).

U randomiziranoj studiji na 16 pacijenata s VMC-om ispitivao se učinak ekstrakta korijena mongolskog kozlinca na smanjenu aktivnost NK stanica uslijed miokarditisa. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije skupine od kojih je prva primala intramuskularnu injekciju vodenog ekstrakta biljne droge u dozi od 8 g/dnevno tijekom 3-4 mjeseca, a pacijenti iz druge skupine liječeni su konvencionalnom kineskom terapijom VMC-a koja je uključivala glukozu, inzulin, kalijev klorid, vitamin C i/ili koenzim A. Izmjerene vrijednosti aktivnosti NK stanica prije i poslije provedene studije pokazale su da je u prvoj skupini mongolski kozlinac značajno povećao aktivnost NK stanica, dok u drugoj skupini nije bilo velike promjene u tim vrijednostima. Autori su zaključili da kozlinac može poboljšati stanični imunski odgovor koji je narušen u osoba s VMC-om te potaknuti ekspresiju interferona alfa i gama, proteina koji posjeduju antiviralnu aktivnost (Yang i sur., 1990).

#### **4.2.4. Korijen mongolskog kozlinca u liječenju kroničnog virusnog hepatitisa**

Kronični hepatitis je upalna bolest jetre koja traje dulje od šest mjeseci. Uzroci su najčešće virusi hepatitisa B (HBV) i C, autoimuni mehanizmi i lijekovi. Liječenje kroničnog hepatitisa B indicirano je u HBeAg–pozitivnih bolesnika s porastom vrijednosti aminotransferaza. HBeAg je virusni antigen čiji nalaz u serumu upućuje na aktivnu replikaciju HBV-a, tj. infektivnost bolesnika za okolinu. Ciljevi liječenja su odstranjivanje HBV DNA iz seruma i serokonverzija HBeAg u anti-HBe. Gubitak površinskog antigena HBsAg javlja se u tek 10% slučajeva jer nakon razvoja kronične bolesti pacijenti uglavnom postaju trajni nosioci HBs antigena. U terapiji se primjenjuje interferon (obično IFN- $\alpha$ 2b) ili

lamivudin. U bolesnika sa uznapredovalom cirozom, IFN može ubrzati razvoj zatajenja jetre pa je zato kontraindiciran. Ostale kontraindikacije su zatajenje bubrega, imunosupresija, transplantacija solitarnih organa i citopenija (Wang i sur., 2000).

U jednoj kontroliranoj randomiziranoj studiji zabilježen je klinički učinak mongolskog kozlinca u liječenju kroničnog virusnog hepatitisa. Povišene razine serumske ALT normalizirale su se za 1-2 mjeseca, a simptomi su ublaženi. Pacijenti su nakon liječenja imali dobar apetit i osjećali se dobro, bez primijećenih značajnih nuspojava. Povećana je i sposobnost fagocitoze retikuloendotelnih stanica te je pojačan stanični imunosni odgovor (Zhou, 1985).

Drugo randomizirano kliničko ispitivanje u kojem je sudjelovao 101 pacijent s kroničnim hepatitisom proučavalo je antiviralni učinak kozlinca. Pacijenti su bili raspoređeni u tri skupine. Prva je skupina tri puta tjedno tijekom tri mjeseca primala injekcije ekstrakta astragalusa (1 mL) u akupunkturne točke, druga je dobivala intramuskularno 4 mL ekstrakta, dok je treća, kontrolna skupina, primala u akupunkturne točke po 1 mL fiziološke otopine. Studija nije pokazala značajan antiviralni učinak ekstrakta vrste *A. membranaceus* na klirens HBsAg iz seruma ( $P = 0,14$ ), na uklanjanje serumskog HBeAg ni na serokonverziju HBeAg u anti-HBe ( $P = 0,4$ ) u usporedbi s placebo (Peng i sur., 1997).

Provedena je randomizirana kontrolirana studija na 64 pacijenta s kroničnim hepatitisom B u kojoj je ispitivana skupina uzimala oralni pripravak droge Astragali radix, a kontrolna skupina primala je supkutanu injekciju IFN- $\alpha$  tri puta tjedno. Uspoređivao se učinak kozlinca na seroreverziju HBeAg u anti-HBe i uklanjanje antigena iz seruma u odnosu na IFN- $\alpha$ . Nakon tri mjeseca tretmana, HBeAg seroreverzija postignuta je u 27% pacijenata u ispitivanoj skupini te u 39% pacijenata koji su bili u kontrolnoj skupini ( $P < 0,05$ ). HBV DNA marker bio je negativan u 18% pacijenata iz ispitivane skupine, a u kontrolnoj skupini koja se sastojala od 31 ispitanika 12 pacijenata imalo je negativni rezultat (39%). Iako je učinak mongolskog kozlinca bio slabiji, prema procjeni autora on bi se mogao koristiti u terapiji kroničnog hepatitisa u kombinaciji s interferonom ili zasebno u slučajevima kada je primjena interferona kontraindicirana (Wang i sur., 2000).

#### **4.2.5. Ostala klinička istraživanja**

U nekoliko studija zabilježen je i klinički učinak mongolskog kozlinca u liječenju zatajenja srca. Jednom randomiziranom kontroliranom studijom u Kini praćena su 62 pacijenta s kongestivnim zatajenjem srca. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije skupine, od

kojih je jedna primala injekcije od 30 mL s mongolskim kozlincom (10 mg biljne droge) dnevno, a druga ekvivalentnu količinu injekcije nitroglicerina. U pacijenata koji su primali kozlinac značajno se popravila srčana funkcija, a u serumu su porasli i markeri poboljšanja funkcija imunskog sustava. Autori studije zaključili su da se s obzirom na povlačenje simptoma i unaprjeđenje imunskog funkcije u pacijenata s kongestivnim zatajenjem srca, kozlinac može koristiti kao pomoćna terapija kod zatajenja srca. U drugoj studiji na 19 pacijenata s kongestivnim zatajenjem srca, pacijenti su tijekom dva tjedna primali otopinu astragalozida IV intravenskom injekcijom. Po završetku istraživanja, 15 pacijenata prijavilo je poboljšanje simptoma povezanih sa zatajenjem srca poput dispneje i palpitacija. Broj otkucaja srca u mirovanju u prosjeku se smanjio s 88,21 +/- 17,19 na 64,55 +/- 13,06 otkucaja/min ( $P < 0,05$ ) (Dasgupta, 2019; Sinclair, 1998).

Ispitivao se i učinak korijena mongolskog kozlinca na liječenje ishemijskih bolesti srca. U kliničkom istraživanju na 92 pacijenta s anginom pectoris, ispitanici su prijavili olakšanje simptoma i manju učestalost napada angine pectoris. Stopa poboljšanja elektrokardiograma iznosila je 82,6%. U drugoj studiji, 20 pacijenata s anginom pectoris dobivalo je pripravak droge Astragali radix tijekom dva tjedna i ishod je procijenjen ultrazvukom srca. Minutni volumen srca porastao je s 5,09 +/- 0,21 L/min na 5,95 +/- 0,18 L/min, a pokazalo se da za razliku od digitalisa, mongolski kozlinac ne uzrokuje inhibiciju Na/K-ATPaze. Kliničkim istraživanjem provedenom na 43 pacijenta koji su pretrpjeli akutni infarkt miokarda ustanovljeno je da primjena korijena mongolskog kozlinca dovodi do jačanja funkcije lijevog ventrikula i smanjenja štetnog djelovanja slobodnih kisikovih radikala te posljedične lipidne peroksidacije (Sinclair, 1998; Chen i sur., 1995).

Učinak korijena mongolskog kozlinca na alergijsku upalu ispitan je u šestotjednoj, dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj kliničkoj studiji na 48 odraslih osoba s umjerenim do teškim simptomima sezonskog alergijskog rinitisa. Pacijenti u ispitivanoj skupini peroralno su uzimali fitopreparat koji sadrži ekstrakt biljke *A. membranaceus* u obliku kapsula. Učinkovitost liječenja procijenjena je srednjom promjenom ocjene simptoma (TSS), kvalitete života (QOL), intenziteta četiri glavna simptoma, razine specifičnih IgE i IgG u serumu, broja eozinofila u nazalnoj mukozi i subjektivnom prosudbom liječnika i pacijenata. Već nakon tri tjedna terapije, u ispitivanoj skupini uočeno je statistički značajno poboljšanje simptoma rinoreje u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,048$ ). Pokazalo se da primjena fitopreparata mongolskog kozlinca, u odnosu na placebo, značajno smanjuje intenzitet rinoreje i drugih

karakterističnih simptoma rinitisa poput kihanja i svrbeža te poboljšava kvalitetu života oboljelih. Za ostale varijable nisu zabilježene statistički značajne razlike između dviju skupina, no u ispitivanoj skupini ipak je došlo do sniženja razine specifičnih IgG, dok je razina IgG u serumu u kontrolnoj skupini neznatno porasla. Liječnici i pacijenti subjektivno su procijenili liječenje kozlincem kao zamjetno djelotvornije od placeba. Studija je ukazala na terapijsku učinkovitost kozlinca u pacijenata sa alergijskim rinitisom, no autori zaključuju kako bi se njegova djelotvornost trebala dodatno testirati u multicentričnim studijama s više uključenih pacijenata (Matkovic i sur., 2010).

Infekcije su jedna od najučestalijih komplikacija kod djece s nefrotskim sindromom, a 8,8-29,27% svih sekundarnih infekcija koje prate nefrotski sindrom čine virusne infekcije gornjih dišnih putova (URTI). Ispitano je može li korijen mongolskog kozlinca smanjiti njihovu pojavnost u randomiziranoj studiji na 92 djece s nefrotskim sindromom. Pacijenti u prvoj skupini liječeni su prednizonom i oralnim granulama droge *Astragali radix* u dozi 7,5-15 g dva puta dnevno, a druga skupina dobivala je samo prednizon u početnoj dozi 1 mg/kg svaki drugi dan. Terapija mongolskim kozlincem trajala je tri mjeseca, a djeca su praćena još osam mjeseci nakon završetka terapije. U prvoj skupini 14 od 45 pacijenata (31,11%) dobilo je neku infekciju od čega je osam slučajeva predstavljalo URTI (17,78%), dok je u kontrolnoj skupini od 47 pacijenata njih 18 zadobilo URTI (38,30%). Broj ukupnih infekcija iznosio je 28 (59,57%). Broj relapsa primarne bolesti također je bio manji u prvoj skupini liječenoj kozlincem. Takvi rezultati pokazuju da granule kozlinčeva korijena mogu učinkovito smanjiti učestalost URTI i drugih infekcija u djece s nefrotskim sindromom u usporedbi s prednizonom (Zou i sur., 2013). U drugom istraživanju provedenom na 1000 ispitanika nakon dvomjesečnog oralnog ili intranazalnog uzimanja vodenog ekstrakta vrste *A. membranaceus* smanjena je učestalost i trajanje prehlada. Zabilježene su znatno više razine IgA i IgG u nazalnom sekretu pacijenata sklonih prehladama (WHO, 1999).

U randomiziranoj kontroliranoj studiji kojom se ispitivao učinak injekcije korijena mongolskog kozlinca na leukopeniju sudjelovalo je 67 pacijenata s leukopenijom uslijed radioterapije, kemoterapije, virusnih infekcija, autoimunih bolesti i dr. Ispitivana skupina svakodnevno je intravenski primala AI (40 mL ekstrakta kozlinčeva korijena u 250 mL 5%-tne otopine glukoze), a kontrolna skupina peroralno je uzimala leukogen ili 1-O-oktadecilglicerol ili je intravenski dobivala nedefinirani energetski pripravak. Nakon 30 dana terapije broj leukocita normalizirao se u 91,43% pacijenata u ispitivanoj skupini, a 62,50% u

kontrolnoj, što upućuje na veću terapijsku učinkovitost AI-a. Prosječni broj leukocita općenito je bio viši u ispitivanoj skupini. Pacijenti iz ispitivane skupine nisu prijavili nikakve nuspojave uslijed terapije kozlincem. Rezultati studije sugeriraju da je mongolski kozlinac siguran za primjenu u ljudi i da ima potencijalnu kliničku vrijednost u liječenju i prevenciji leukopenije (Qin i Lu, 2011).

Zabilježeno je da vodeni ekstrakt korijena vrste *A. membranaceus* ima izražen imunostimulirajući učinak. Kod zdravih pojedinaca koji su uzimali peroralni pripravak korijena mongolskog kozlinca (15,6 g dnevno tijekom 20 dana) značajno su se povećale serumske koncentracije IgM, IgE i cAMP. Otkriveno je da peroralna primjena 8 g pripravka astragalusa dnevno u 14 zdravih pojedinaca tijekom dva mjeseca dovodi do značajno povećane ekspresije interferona u stanicama imunskog sustava u odnosu na kontrolnu skupinu. Dva mjeseca nakon prekida terapije, sposobnost indukcije interferona ostala je značajno veća u ispitivanoj skupini (WHO, 1999; Block i Mead, 2003).

### 4.3. Doziranje pripravaka s mongolskim kozlincem

Korijen mongolskog kozlinca dostupan je u obliku praška, tableta, kapsula, različitih vodenih i etanolnih ekstrakata i usitnjene suhe biljne droge od koje se najčešće izrađuju dekoti. Peroralno se primjenjuje doza od 9-30 g osušenog korijena u obliku dekokta 2-3 puta dnevno, 4,5-8,5 mL/dan tekućeg ekstrakta (DER, engl. *drug extract ratio*, 1:2) ili ekvivalentna količina u obliku tableta ili kapsula (Mills i Bone, 2005).

Preporuča se 2-6 g/dan korijena u prahu, 1,5-5 mL tinkture (DER 1:2 ili 1:3, u 25-35%-tnom etanolu) tri puta dnevno i jedna šalica infuza pripremljenog od 5-30 g biljne droge tri puta dnevno, a u akutnim stanjima može se uzeti do šest šalica infuza dnevno. Preporučene doze općenito se razlikuju ovisno o indikaciji. Primjerice, za ublažavanje simptoma sezonske alergije uzimaju se dvije kapsule s 80 mg suhog ekstrakta svakodnevno tijekom šest tjedana, kod kongestivnog zatajenja srca preporuča se peroralna primjena 2-7,5 g praha mongolskog kozlinca dva puta dnevno, a za regulaciju razine glukoze u krvi savjetuje se dnevna primjena 40-60 g kozlinca pripremljenog u obliku dekokta tijekom najviše četiri mjeseca. Za vanjsku upotrebu, na površinu rane nanosi se 10%-tna mast (Wynn i Fougere, 2006; Auyeung i sur., 2016).

### 4.4. Potencijalne interakcije mongolskog kozlinca s lijekovima

Moguće su interakcije s lijekovima koji suprimiraju imunološki sustav kao što su ciklofosamid, azatioprin, ciklosporin, takrolimus, kortikosteroidi itd. Budući da mongolski kozlinac posjeduje imunostimulirajući učinak, uslijed istovremene primjene može doći do smanjenja učinkovitosti i izostanka terapijskog učinka imunosupresiva. Ne preporuča se ni u kombinaciji s litijem jer kozlinčev korijen djeluje kao diuretik, a poznato je da neki diuretici pokazuju paradoksalni antidiuretski učinak koji može rezultirati zadržavanjem tekućine i litija u organizmu, što posljedično može dovesti do povećanja rizika od toksičnosti litija. Zbog hipotenzivnog učinka kozlinca pacijentima koji uzimaju antihipertenzive predlaže se izbjegavanje upotrebe velikih doza biljne droge, iako nisu primijećene klinički značajne štetne posljedice ove pojačane hipotenzivne aktivnosti. Jedno istraživanje pokazalo je da može djelovati sinergistički s rekombinantnim IFN- $\alpha$ 1, a pojačava i hipoglikemijski učinak antidijabetika. *In vitro* i *in vivo* studijama otkriveno je da se aktivne sastavnice kozlinca metaboliziraju jetrenim mikrosomalnim enzimskim sustavom i da u određenom stupnju djeluje inhibitorno na nekoliko izoforma CYP enzima, međutim, nisu zabilježene klinički

značajne interakcije kozlinca s lijekovima koji su supstrati istih enzima (McKenna i sur., 2002; Block i Mead, 2003).

#### **4.5. Neželjeni učinci pripravaka korijena mongolskog kozlinca**

Nuspojave korijena mongolskog kozlinca vrlo su rijetke i neuobičajene zbog čega se kozlinac općenito smatra sigurnom biljnom drogom koja se dobro podnosi. Zabilježeno je nekoliko slučajeva alergijskih reakcija uslijed njegove primjene. Uslijed peroralne primjene astragalus može uzrokovati osip, svrbež, iritaciju sluznice nosa i bol u želucu. Visoke doze mogu uzrokovati probavne smetnje, proljev, mučninu i povraćanje, vjerojatno zbog izravne iritacije crijevne sluznice. Jedan 70-godišnji pacijent razvio je vrtoglavicu, utrnulost udova, crvenilo lica, stezanje u prsima, mjestimične žuljeve i ljuštenje kože na obje ruke i noge nakon oralne primjene dekokta koji se sastojao od kozlinca i još četiri TCM biljke (formulacija Huangqiguizhiwuwu tang), a simptomi su se postupno povukli nakon prestanka uzimanja dekokta. Istom pacijentu ponovno su se pojavili slični simptomi nakon primjene druge formulacije koja je također sadržavala korijen mongolskog kozlinca. U jednom prikazu slučaja navodi se pojava reverzibilnih cisti na jetri i bubregu u žene koja je mjesec dana uzimala pripravak mongolskog kozlinca (Zhang i sur., 2015).

Kozlinac je kontraindiciran kod akutnih infekcija jer može pojačati upalnu reakciju i produljiti trajanje groznice. Pacijenti s autoimunim bolestima također bi trebali izbjegavati upotrebu mongolskog kozlinca zbog njegova imunostimulirajućeg djelovanja uslijed kojeg može doći do pogoršanja bolesti (McKenna i sur., 2002).

#### **4.6. Toksičnost**

Do sada nije zabilježena pojava trovanja povezanih s primjenom droge *Astragali radix* ili njenih glavnih sastojaka *in vitro* ili *in vivo*. LD<sub>50</sub> suhog ekstrakta biljne droge izmjerena u štakora nakon intraperitonealne primjene ekstrakta iznosila je 40 g/kg tjelesne mase. Visoke doze biljne droge od 100 g/kg davane su štakorima ispiranjem bez primijećenih štetnih učinaka. Uz to, štakorima se primjenjivao ekstrakt korijena intraperitonealnom injekcijom (0,5 g/kg) tijekom jednog mjeseca, što nije uzrokovalo nikakve negativne promjene apetita, ponašanja ni proizvodnje urina i fecesa. U jednoj studiji proučavana je subkronična toksičnost ekstrakta astragalusa, koji se sastojao od polisaharida i saponina, kako bi se procijenio raspon sigurnih doza u kliničkoj primjeni. Rasponi su iznosili 5,70-39,90 g/kg u štakora i 2,85-19,95



g/kg u pasa, što je ekvivalentno dozama uvećanim 70 i 35 puta za ljude. Nisu zamijećeni štetni učinci u miševa nakon oralne primjene kozlinca u dozama do 100 g/kg, što je nekoliko stotina puta veće od učinkovite oralne doze za ljude. U Amesovu testu kozlinčev korijen pokazao je umjereni mutageni potencijal, no on nije ispitan u daljnjim studijama. Nema dovoljno pouzdanih informacija o tome je li kozlinac siguran za upotrebu tijekom trudnoće ili dojenja. No, neka istraživanja na životinjama sugeriraju da kozlinac može biti toksičan za trudnicu i plod, zbog čega se trudnicama ne preporuča korištenje pripravaka mongolskog kozlinca (WHO, 1999; Auyeung i sur., 2016).

#### 4.7. Fitopreparati s korijenom mongolskog kozlinca u hrvatskim ljekarnama

Danas u hrvatskim ljekarnama možemo pronaći nekoliko preparata s mongolskim kozlincem koji su registrirani kao dodaci prehrani. Na hrvatskom tržištu gotovo je nemoguće pronaći pripravak čistog kozlinca u obliku tinkture ili kapsula, već se on najčešće nalazi kao sastavni dio prirodnih proizvoda za jačanje otpornosti organizma u kombinaciji s vitaminima, mineralima i drugim biljnim drogama. Lectranal proizvodi kapsule s 80 i 160 mg ekstrakta korijena kozlinca, a kapsule sadrže još i vitamin C i kalcij. Oktal Pharma u inventaru ima tekući dodatak prehrani za jačanje imuniteta namijenjen odraslima i djeci iznad jedne godine starosti koji osim ekstrakta korijena vrste *A. membranaceus* (450 mg/30 mL) u svom sastavu ima i ekstrakt plodova šipka (*Rosa canina* L.), ekstrakt cvjetova crne bazge (*Sambucus nigra* L.), cink, bakar te vitamine B6 i E. Pharmoval proizvodi kapsule koje sadrže ekstrakt kozlinca u kombinaciji s visokopročišćenim Goldcell® beta-glukanom, astaksantinom, vitaminima C, D, E i B kompleksom, ekstraktom sjemenki grožđa, mineralima (cink, željezo i selen) i koenzimom Q10. Kapsule tvrtke Biobalance, koje se preporučaju za smanjenje umora i iscrpljenosti, uz standardizirani ekstrakt kozlinčeva korijena (minimalno 20% polisaharida) u dozi od 330 mg sadrže i standardizirani ekstrakt (minimalno 2,5% ursolične kiseline) lista svetog bosiljka (*Ocimum sanctum* L.), standardizirani ekstrakt (minimalno 0,8% eleuterozida) korijena sibirskog ginsenga (*Eleutherococcus senticosus* M.), magnezij i vitamine B3, B5, B6 i B12. U nekim ljekarnama može se naći i tekući dodatak prehrani tvrtke NovaDiet u obliku ampula koje sadrže 50 mg ekstrakta korijena kozlinca standardiziranog na polisaharide (minimalno 16%), standardizirane ekstrakte gljiva reishi, tj. ganoderme (*Ganoderma lucidum* P.K.), shiitake (*Lentinula edodes* P.) i maitake (*Grifolia frondosa* G.), beta-glukan i vitamin C. Postoji još nekoliko proizvoda s mongolskim kozlincem trenutno prisutnih na hrvatskom tržištu poput tinkture astragalusa brenda Kernnel premium (vodeno-etanolni ekstrakt korijena kozlinca, 70% V/V), no oni se većinom mogu naći samo u online ljekarnama i specijaliziranim trgovinama s prirodnim proizvodima.

## 4.8. Monografija droge u Europskoj farmakopeji

U 8. izdanje Europske farmakopeje uvrštena je monografija biljne droge *Astragali mongholicus radix* koja opisuje metode identifikacije i kontrole kakvoće kozlinčeva korijena, a njen cjeloviti prijevod naveden je u nastavku (EDQM, 2014).

01/2011:2435

### KORIJEN MONGOLSKOG KOZLINCA

#### *Astragali mongholicus radix*

##### DEFINICIJA

Cijeli, osušeni korijen vrsta *Astragalus mongholicus* var. *mongholicus* Bunge (sin. *Astragalus membranaceus* Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao) i *Astragalus mongholicus* var. *dahuricus* (DC.) Podlech (sin. *Astragalus membranaceus* Bunge), s uklonjenim korjenčićima i klicama, sakupljen u razdoblju od proljeća do jeseni.

*Sadržaj*: najmanje 0,040% astragalozida IV (C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>; M<sub>r</sub> 785) (suha droga).

##### IDENTIFIKACIJA

A. Korijen je cilindričan, često razgranat, relativno zadebljalog gornjeg dijela, dugačak 30-90 cm i promjera 1-3,5 cm. Izvana je blijede žućkasto smeđe ili smeđe boje s nepravilnim uzdužnim naborima ili brazdama. Tvrde je i žilave konzistencije; teško lomljiv, na prijelomu vrlo fibrozna i s malo (kultivirani oblik) ili puno škroba (oblik divljeg podrijetla), žućkasto bijele kore, blijedo žutog drveta sa zrakastim prugama i pukotinama; tamno smeđe centralne zone koja kod starijih korijena može biti reducirana na šupljinu okruženu fragmentima propadajućeg tkiva.

B. Usitni se u prašak (355) (2.9.12). Prašak je žućkasto bijele boje. Promatra se pod mikroskopom koristeći otopinu *kloralhidrata R*. Prašak pokazuje sljedeće značajke: vlakna, u nakupinama ili raštrkana, promjera 8-30 μm, zadebljanih stijenki s uzdužnim brazdama na površini, primarnih stijenki često odvojenih od sekundarnih stijenki, često deformiranih, blago krnjih krajeva ili krajeva nalik resicama; bezbojne ili narančaste žile s gusto raspoređenim obrubljenim jažicama; nekoliko slojeva fragmenata pluta kojima je često pridružen kolenhimski feloderm; ponekad vidljive okrugle, izdužene ili nepravilne sklereide neznatno zadebljanih stijenki. Analizira se pod mikroskopom koristeći 50%-tnu otopinu

*glicerola R*: prašak sadrži mala okrugla ili ovalna škrobna zrnca, najčešće jednostavna ili ponekad udružena u nakupine od 2 ili 3 zrnaca, promjera oko 5 µm.

C. Tankoslojna kromatografija (2.2.27).

*Ispitivana otopina*. Zagrijava se 3 g biljne droge usitnjene u prašak (355) (2.9.12) s 50 mL *metanola R* 50 minuta uz povratno hladilo i filtrira. Filtrat se upari do suha pod sniženim tlakom i ostatak otopi u 1 mL *vode R*. Dobivena otopina nanese se na 6 mL kolonu za ekstrakciju na čvrstoj fazi koja sadržava *oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R* prethodno opran s 3 mL *metanola R* i zatim 3 mL *vode R*. Kolona se ispere s 15 mL *vode R*, a zatim s 15 mL 30%-tne otopine *metanola R*. Eluati se bace. Eluira se s 20 mL *metanola R* i skupi se eluat. Eluat se upari do suha pod sniženim tlakom i ostatak otopi u 2 mL *metanola R*.

*Poredbena otopina*. Otopi se 10.0 mg *daidzina R* i 5.0 mg *daidzeina R* u 5.0 mL *metanola R*.

*Ploča*: TLC *silikagel F<sub>254</sub> ploča R* (2-10 µm).

*Pokretna faza*: *voda R*, *metanol R*, *etil acetat R* (10:13,5:100 V/V/V).

*Nanošenje*: 3 µL u vrpcama veličine 8 mm.

*Razvijanje*: na duljini od 7 cm.

*Sušenje*: na zraku.

*Detekcija A*: promatra se pod ultraljubičastim svjetlom pri 254 nm.

*Rezultat A*: kromatogrami dobiveni za ispitivanu i poredbenu otopinu u donjoj trećini ploče pokazuju slabije osvijetljenu zonu koja na kromatogramu poredbene otopine odgovara daidzinu, a poredbena otopina u gornjoj trećini pokazuje i slabo osvijetljenu zonu daidzeina. Nadalje, druge zone manjeg intenziteta mogu biti prisutne na kromatogramu dobivenom za ispitivanu otopinu.

*Detekcija B*: popraska se otopinom *anisaldehida R* i zagrijava 3 min pri 100 °C. Promatra se pod ultraljubičastim svjetlom pri 366 nm.

*Rezultat B*: kromatogram dobiven za poredbenu otopinu u donjoj trećini pokazuje blijedo plavu zonu daidzina, a u gornjoj trećini blijedo plavu zonu koja odgovara daidzeinu. Na kromatogramu dobivenom za ispitivanu otopinu u donjoj trećini u razini sa zonom daidzina može se vidjeti smeđa zona ispod koje se nalazi još 5 smeđih zona, a vide se još i 3 ljubičaste zone na sredini, gornjoj trećini i pri samom vrhu ploče. Nadalje, druge zone manjeg intenziteta mogu biti prisutne na kromatogramu dobivenom za ispitivanu otopinu.

## ISPITIVANJA

**Strane primjese** (2.8.2): najviše 5%.

**Gubitak sušenjem** (2.2.32): najviše 10,0%, određeno na 1,000 g praška biljne droge (355)

(2.9.12) sušenjem u sušioniku 3 sata na 105 °C.

**Ukupni pepeo** (2.4.16): najviše 5,0%.

**Pepeo netopljiv u klorovodičnoj kiselini** (2.8.1): najviše 1,0%.

## ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Tekućinska kromatografija (2.2.29).

*Ispitivana otopina.* Izvaži se 4,0 g praška biljne droge (355) (2.9.12), prenese u Soxhlet ekstraktor i doda 40 mL *metanola R*. Macerira se preko noći. Ponovo se doda još 40 mL *metanola R*. Zagrijava se uz povratno hladilo 4 sata. Upari se do suha. Ostatak se otopi u 10 mL *vode R*, uz blago zagrijavanje, ako je potrebno. Sadržaj se izmučkava 4 puta sa po 40 mL *butanola R* zasićenog *vodom R*. Butanolni ekstrakti se sjedine i peru dva puta sa po 40 mL *amonijaka R*. Slojevi amonijaka se odbace i butanolni sloj upari do suha. Ostatak se otopi u 5 mL *vode R* i ohladi. Otopina se nanese na kolonu za ekstrakciju na čvrstoj fazi koja sadržava 1 g *oktadecilsilil silikagela za kromatografiju R* prethodno opranog s 5 mL *metanola R* i 5 mL *vode R*. Kolona se ispere s 20 mL *vode R* i 20 mL *etanola (25 postotni V/V) R*. Eluira se s 25 mL *etanola (70 postotni V/V) R*. Eluat se upari do suha. Ostatak se otopi u 5,0 mL *metanola R*.

*Poredbena otopina (a).* Otopi se 10,0 mg *astragalozida IV CRS* u *metanolu R* i razrijedi do 10,0 mL istim otapalom.

*Poredbena otopina (b), (c), (d).* Razrijedi se poredbena otopina (a) tako da se dobiju 3 poredbene otopine *astragalozida IV*, u rasponu koncentracija koje se očekuju u ispitivanoj otopini.

*Poredbena otopina (e).* Otopi se 5,0 mg *ginsenzida Rb1 R* u 5 mL *metanola R* i razrijedi do 10,0 mL s poredbenom otopinom (a).

*Kolona:*

- *dimenzije:* l = 0,25 m, Ø = 3,2 mm;

- *nepokretna faza:* *oktadecilsilil silikagel za kromatografiju R* (3 µm).

- *temperatura:* 25 °C.

*Pokretna faza:*

- *pokretna faza A:* *voda R*;

- *pokretna faza B:* *acetonitril R*;

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (posto V/V)	Pokretna faza B (posto V/V)
0 – 5	90	10
5 – 10	90 → 80	10 → 20
10 – 20	80 → 75	20 → 25
20 – 30	75 → 67	25 → 33
30 – 40	67 → 65	33 → 35
40 – 50	65 → 40	35 → 60
50 – 55	40	60

*Brzina protoka:* 0,5 mL/min.

*Detekcija:* detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku; prikladne su sljedeće postavke; ako detektor ima drukčije podešene parametre, treba ih podesiti tako da zadovoljavaju kriterije prikladnosti sustava:

- *plin nosač:* zrak;
- *brzina protoka:* 1,5 mL/min;
- *temperatura evaporatora:* 50 °C.

*Injektiranje:* 20 µL ispitivane otopine i ispitivane otopine (b), (c), (d) i (e).

*Relativno vrijeme zadržavanja* u odnosu na ginsenzoid Rb1 (vrijeme zadržavanja = oko 33,6 minuta): astragalozid IV = oko 1,05.

*Prikladnost sustava:*

- *razlučivanje:* najmanje 4,0 između pikova astragalozida IV i ginsenzoida Rb1 u kromatogramu poredbene otopine (e).

Napravi se kalibracijska krivulja s logaritamskim vrijednostima koncentracija (mg/mL) poredbenih otopina (b), (c) i (d) (korigirano prema navedenom postotku *astragalozida IV CRS*) na apscisi i logaritmom odgovarajuće površine ispod pika na ordinati.

Izračuna se postotak astragalozida IV koristeći sljedeći izraz:

$$\frac{10^A \times 0,5}{m}$$

$A$  = logaritam koncentracije koja odgovara piku astragalozida IV u kromatogramu ispitivane otopine, određeno iz kalibracijske krivulje;

$m$  = masa biljne droge korištene za pripremu ispitivane otopine, u gramima.

## 5. ZAKLJUČCI

Dosadašnja neklinička i klinička istraživanja pokazuju da primjena korijena mongolskog kozlinca u pojedinim indikacijama ima uporište utemeljeno na znanstvenim dokazima. U provedenim nekliničkim studijama dokazana su protuupalna, antioksidativna, imunomodulacijska i protutumorska svojstva. Terapijski potencijal kozlinca u liječenju karcinoma, kronične bolesti bubrega, virusnog miokarditisa i nekih drugih bolesti poput kroničnog hepatitisa i sezonskog alergijskog rinitisa ustanovljen je u nekoliko kliničkih studija. Polisaharidi, izoflavoni i triterpenski saponini smatraju se glavnim sastavnicama odgovornim za terapijske učinke korijena kozlinca.

Primjena kozlinčeva korijena u pacijenata s karcinomom pluća ne-malih stanica dovela je do povećane osjetljivosti tumorskih stanica na standardnu kemoterapiju, smanjene učestalosti nuspojava poput leukopenije, trombocitopenije, mučnine i povraćanja, produljenja trajanja remisije, povećanja stope preživljenja i kvalitete života. Kozlinac je ojačao i funkciju imunološkog sustava povećavši broj CD4<sup>+</sup> T-limfocita i razinu imunoglobulina.

Dokazano je da korijen kozlinca smanjuje proteinuriju, edeme, razinu kreatinina i ureje u serumu te povećava koncentraciju albumina u krvi kod kroničnog zatajenja bubrega uslijed nefropatije ili nefrotskog sindroma.

Korijen mongolskog kozlinca pokazao se učinkovitim u terapiji virusnog miokarditisa. Smanjio je incidenciju aritmija i drugih simptoma, trajanje simptoma, vrijednosti srčanih markera i prosječno trajanje hospitalizacije, a znatno je poboljšao minutni volumen i udarni volumen srca te pojačao stanični imuni odgovor povećavajući aktivnost NK, Treg i CD4<sup>+</sup> T-stanica i smanjujući broj Th17 stanica.

Pokazalo se da kozlinčev korijen može neznatno potaknuti uklanjanje virusnih antigena HBsAg i HBeAg iz seruma te serokonverziju HBeAg u anti-HBe kod pacijenata s kroničnim hepatitisom B. Novija istraživanja ukazuju na potencijal kozlinca u liječenju sezonskog alergijskog rinitisa, respiratornih infekcija, leukopenije i zatajenja srca.

Postojeće kliničke studije većinom su provedene na malom broju pacijenata, nisu bile dvostruko slijepe niti kontrolirane placebom, zbog čega se općenito smatraju studijama vrlo niske razine kvalitete dokaza. Potrebno je provesti daljnje kvalitetnije kliničke studije koje će pružiti više znanstvenih dokaza o terapijskim učincima korijena mongolskog kozlinca i omogućiti njegovu racionalnu primjenu u ljekarničkoj praksi.

## 6. LITERATURA

Astragalus mongholicus, 2018., <https://www.herb-pharm.com>, pristupljeno 26.5.2020.

Auyeung KK, Han QB, Ko JK. Astragalus membranaceus: A Review of its Protection Against Inflammation and Gastrointestinal Cancers. *Am J Chin Med*, 2016, 44, 1-22.

Bensky D, Gamble A, Kaptchuk T. Chinese Herbal Medicine Materia Medica. Seattle, Eastland Press, 1986, str. 365.

Block KI, Mead MN. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: A review. *Integr Cancer Ther*, 2003, 2, 247-267.

Cao A, He H, Wang Q, Li L, An Y, Zhou X. Evidence of Astragalus injection combined platinum-based chemotherapy in advanced nonsmall cell lung cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 2019, 98, 11.

Chen LX, Liao JZ, Guo WQ. Effects of Astragalus membranaceus on left ventricular function and oxygen free radical in acute myocardial infarction patients and mechanism of its cardiogenic action. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 1995, 15, 141-143.

Chen X, Peng LH, Li N, Li QM, Li P, Fung KP, Leung PC, Gao JQ. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139, 721-727.

Chen YR, Mao XY, Jin WW, Luo HJ, Li T. Study on Astragalus Polysaccharide Structure and Monosaccharide Constituents by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Prog Mod Biomed*, 2011, 1, 4632-4635.

Choi SI, Heo TR, Min BH, Cui JH, Choi BH, Park SR. Alleviation of osteoarthritis by calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (CG) isolated from Astragali radix (AR) in rabbit osteoarthritis (OA) model. *Osteoarthr Cartil*, 2007, 9, 1086-1092.

Chu C, Cai HX, Ren MT, Liu EH, Li B, Qi LW, Li P. Characterization of novel astragaloside



malonates from Radix Astragali by HPLC with ESI quadrupole TOF MS. *J Sep Sci*, 2010, 33, 570-581.

Dasgupta A. Antiinflammatory Herbal Supplements. U: Perspectives in Translational Cell Biology, Translational Inflammation. Actor JK, Smith KC, urednici, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 69-91.

Dong T, Ma X, Clarke C, Song Z, Ji Z, Lo C, Tsim K. Phylogeny of Astragalus in China: Molecular Evidence from the DNA Sequences of 5S rRNA Spacer, ITS, and 18S rRNA. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 6709-6714.

Duan P, Wang ZM. Clinical study on effect of Astragalus in efficacy enhancing and toxicity reducing of chemotherapy in patients of malignant tumor. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2002, 22, 515-517.

EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care). European Pharmacopoeia 8th Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2014, str. 1158-1159.

Fang SD, Chen Y, Xu XY, Ye CQ, Zhai SK, Shen ML. Studies of the active principles of Astragalus mongholicus Bunge. I. Isolation, characterization and biological effect of its polysaccharides. *Org Chem*, 1982, 1, 26-31.

Feng M, Yuan W, Zhang R, Fu P, Wu T. Chinese Herbal Medicine Huangqi Type Formulations for Nephrotic Syndrome. Chichester, John Wiley & Sons, 2013, str. 82-88.

Foster S, Yue C. Herbal Emissaries: Bringing Chinese Herbs to the West. Rochester, Healing Arts Press, 1992, str. 27-33.

Gao CR, Xia HP, Shi JG. Clinical observation of Shenqi pills combined with chemotherapy to treat non-small cell lung cancer. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi*, 2001, 21, 908.

Guo FC, Kwakkel RP, Williams BA, Parmentier HK, Li WK, Yang ZQ, Verstegen MW. Effects of Mushroom and Herb Polysaccharides on Cellular and Humoral Immune Responses of Eimeria tenella-Infected Chickens. *Poult Sci*, 2004, 83, 1124-1132.

Guo FC, Williams BA, Kwakkel RP, Li H, Li X, Luo JY, Li W, Verstegen MW. Effects of Mushroom and Herb Polysaccharides, as Alternatives for an Antibiotic, on the Cecal Microbial Ecosystem in Broiler Chickens. *Poult Sci*, 2004, 83, 175-182.

He ZQ, Findlay J. Constituents of *Astragalus membranaceus*. *J Nat Prod*, 1991, 54, 810-815.

Herb of the Month: *Astragalus*, 2019., <https://www.emeryherbals.com>, pristupljeno 1.6.2020.

Ho PY, Lisowski FP. *A Brief History of Chinese Medicine*. Singapur, World Scientific Publishing, 1997, str. 9.

Hsu HY, Chen YP, Shen SJ, Hsu CS, Chen CC, Chang HS. *Oriental Materia Medica: A Concise Guide*. Long Beach, Oriental Healing Arts Institute, 1986, str. 523-524.

Huang H, Luo SH, Huang DC, Cheng SJ, Cao CJ, Chen GT. Immunomodulatory activities of proteins from *Astragalus membranaceus* waste. *J Sci Food Agric*, 2019, 99, 4174-4181.

Huang KC. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. Boca Raton, CRC Press, 1999, str. 387.

Huang XP, Tan H, Chen BY, Deng CQ. *Astragalus* extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis. *Bio Pharm Bull*, 2012, 35, 449-454.

Huang ZQ, Qin NP, Ye W. Effect of *Astragalus membranaceus* on T-lymphocyte subsets in patients with viral myocarditis. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 1995, 15, 328-330.

Ji L, Pan MP, Wang L. Efficacy of *Astragalus* injection for diabetic nephropathy. *Practical Journal of Medicine and Pharmacology*, 2006, 23, 439-440.

Khan IA, Abourashed EA. *Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs and Cosmetics*. Hoboken, John Wiley & Sons, 2010, str. 55-57.

Kitagawa I, Wang HK, Yoshikawa M. Saponin and sapogenol. XXXVII: Chemical

constituents of Astragali Radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (4): Astragalosides VII and VIII. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31, 716-722.

Lee KY, Jeon YJ. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5, 1225-1233.

Liao JZ, Li CY, Huang J, Liu WP, Chen HC, Liao SY, Chen HY, Rui W. Structure Characterization of Honey-Processed *Astragalus* Polysaccharides and Its Anti-Inflammatory Activity in Vitro. *Molecules*, 2018, 1, 168-179.

Li L, Zheng S, Brinckmann JA, Fu J, Zeng R, Huang L, Chen S. Chemical and genetic diversity of *Astragalus mongholicus* grown in different eco-climatic regions. *PloS ONE*, 2017, 12, 9.

Li L, Zheng S, Yang Q, Chen S, Huang L. Distinguishing *Astragalus mongholicus* and Its Planting Soil Samples from Different Regions by ICP-AES. *Molecules*, 2016, 21, 482.

Li M, Wang W, Xue J, Gu Y, Lin S. Meta-analysis of the clinical value of *Astragalus membranaceus* in diabetic nephropathy. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133, 412-419.

Li WZ, Li WP, Zhang W, Yin YY, Sun XX, Zhou SS, Xu XQ, Tao CR. Protective Effect of Extract of *Astragalus* on Learning and Memory Impairments and Neurons Apoptosis Induced by Glucocorticoids in 12-Month Old Male Mice. *Anat Rec*, 2011, 294, 1003-1014.

Li X, Qu L, Dong Y, Han L, Liu E, Fang S, Zhang Y, Wang T. A Review of Recent Research Progress on the *Astragalus* Genus. *Molecules*, 2014, 19, 18850-18880.

Li X, Wang H. Chinese Herbal Medicine in the Treatment of Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12, 276-281.

Li XT, Zhang YK, Kuang HX, Jin FX, Liu DW, Gao MB, Liu Z, Xin XJ. Mitochondrial protection and anti-aging activity of *Astragalus* polysaccharides and their potential mechanism. *Int J Mol Sci*, 2012, 13, 1747-1761.

Lin LZ, He XG, Lindenmaier M, Nolan G, Yang J, Cleary M, Qiu SX, Cordell GA. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *J Chromatogr A*, 2000, 876, 87-95.

Litbarg NO. Chronic Kidney Disease. U: Integrative Medicine. Rakel D, urednik, Philadelphia, Elsevier, 2018, str. 411-415.

Liu DZ, Lan CT. Effects of Astragalus injection in chemotherapy for elderly patients with lung cancer. *Chinese Primary Health Care*, 2017, 31, 76-77.

Liu JB, Li ML, Huang CJ. Astragalus injection combined with NP regimen in 30 patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin J Pract Med*, 2007, 10, 598-599.

Matkovic Z, Zivkovic V, Korica M, Plavec D, Pecanic S, Tudoric N. Efficacy and safety of *Astragalus membranaceus* in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. *Phytother Res*, 2010, 24, 175-181.

Matkowski A, Wozniak D, Lamer-Zarawska E, Oszmianski J, Leszczynska A. Flavonoids and phenol carboxylic acids in the oriental medicinal plant *Astragalus membranaceus* acclimated in Poland. *Z Naturforsch C*, 2003, 58, 602-604.

McCulloch M, See C, Shu XJ, Broffman M, Kramer A, Fan WY, Gao J, Lieb W, Shieh K, Colford JM. Astragalus-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: Meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*, 2006, 24, 419-430.

McKenna DJ, Jones K, Hughes K, Humphrey S. Botanical Medicines: The Desk Reference for Major Herbal Supplements. New York, The Haworth Herbal Press, 2002, str. 1-13.

Mills S, Bone K. The Essential Guide to Herbal Safety. St. Louis, Elsevier, 2005, str. 249-250.

Morazzoni P, Bombardelli E. *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. Milan, Indena, 1994, str. 17-18.

Peng MH, Wang XY, Sun FY, Du XZ, Xiang DP, Wang WS. Observation of therapeutic effect of *Astragalus membranaceus* by acupoint injection for treatment of hepatitis B virus carriers. *Chinese Journal of Chinese Medicine and Pharmacology Information*, 1997, 4, 22-23.

Qi F, Li A, Inagaki Y, Gao J, Li J, Kokudo N, Li XK, Tang W. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio- therapy for cancer. *BioSci Trends*, 2010, 4, 297-307.

Qi LW, Yu QT, Li P, Li SL, Wang YX, Sheng LH, Yi L. Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr A*, 2006, 1134, 162-169.

Qi LW, Yu QT, Yi L, Ren MT, Wen XD, Wang YX, Li P. Simultaneous determination of 15 marker constituents in various *radix Astragali* preparations by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2008, 31, 97-106.

Qin HZ, Lu HY. Huangqi injection for the treatment of leukopenia. *Yi Xue Xin Xi*, 2011, 24, 151.

Ren S, Zhang H, Mu Y, Sun M, Liu P. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33, 413-416.

Shan JJ, Wang Y, Weng YQ, Xie CY, Liu D, Hu ZB. Comparing compositions and immunoactivities of polysaccharide in hair root of *Astragalus membranaceus* and cultivated *A. membranaceus*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2002, 12, 1096-1099.

Sinclair S. Chinese Herbs: A Clinical Review of *Astragalus*, *Ligusticum*, and *Schizandrae*. *Altern Med Rev*, 1998, 3, 338-344.

Song JZ, Mo SF, Yip YK, Qiao CF, Han QB, Xu HX. Development of microwave assisted extraction for the simultaneous determination of isoflavonoids and saponins in *radix astragali* by high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2007, 30, 819-824.

Tang W, Eisenbrand G. Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Berlin, Springer-Verlag, 1992, str. 191-197.

The families of flowering plants: Leguminosae, 2007., <https://www.delta-intkey.com>, pristupljeno 30.5.2020.

Tian QE, Li HD, Yan M, Cai HL, Tan QY, Zhang WY. Effects of Astragalus polysaccharides on P-glycoprotein efflux pump function and protein expression in H22 hepatoma cells in vitro. *BMC Complem Altern M*, 2012, 12, 94.

Toda S, Shirataki Y. Inhibitory effects of Astragali Radix, a crude drug in Oriental medicines, on lipid peroxidation and protein oxidative modification by copper. *J Ethnopharmacol*, 1999, 68, 331–333.

Tomoda M, Shimizu N, Ohara N, Gonda R, Ishii S, Otsuki H. A reticuloendothelial system-activating glycan from the roots of Astragalus membranaceus. *Phytochemistry*, 1992, 31, 63-66.

Traditional Chinese medicine - Astragalus mongholicus root, 2020., <https://www.iso.org>, pristupljeno 2.7.2020.

Wang J, Jia J, Song L, Gong X, Xu J, Yang M, Li M. Extraction, Structure, and Pharmacological Activities of Astragalus Polysaccharides. *Appl Sci*, 2019, 9, 122.

Wang XG, Tang HF, Liu XC, Ren HK. Clinical observations of Astragalus polysaccharid and interferon-alpha-1b in the treatment of chronic hepatitis B. *J Tradit Chin Med*, 2000, 27, 58-59.

Wang Y. Study on the effect of Huangqi injection for children with nephrotic syndrome. *Shiyong Yixue Zazhi*, 2006, 22, 1328-1329.

Weng L, Liu XY, Liu Y. Effect of Astragalus polysaccharide (APS-P) on the proliferation and mobilization of murine hematopoietic stem cells. *Basic Med Sci Clin*, 2003, 6, 306-309.

WHO (World Health Organization). WHO monographs on selected medicinal plants, Volume 1, Radix Astragali. World Health Organization, Geneva, 1999, str. 50-57.

Wilhelm G, Rericha L. Flora of the Chicago Region: A Floristic and Ecological Synthesis. Indianapolis, Indiana Academy of Sciences, 2017, str. 198-201.

Wynn S, Fougere B. Veterinary Herbal Medicine. Oxford, Elsevier, 2006, str. 478-480.

Yang YZ, Jin PY, Guo Q, Wang QD, Li ZS, Ye YC, Shan YF, Zhao HY, Zhu JR, Pu SY. Effect of Astragalus membranaceus on natural killer cell activity and induction of alpha- and gamma- interferon in patients with coxsackie B viral myocarditis. *Chung Hua I Hsheh Tsa Chih*, 1990, 103, 304-307.

Yao D, Wang H. Monosaccharide composition in Radix Astragali polysaccharides by gas chromatography. *Med Plant*, 2012, 3, 36-38.

Yoshida Y, Wang MQ, Liu JN, Shan BE, Yamashita U. Immunomodulating activity of Chinese medicinal herbs and Oldenlandia diffusa in particular. *Int J Immunopharmacol*, 1997, 19, 359-370.

You L, Fang Z, Shen G, Wang Q, He Y, Ye S, Wang L, Hu M, Lin Y, Liu M, Jiang A. Astragaloside IV prevents high glucose- induced cell apoptosis and inflammatory reactions through inhibition of the JNK pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*, 2019, 19, 1603-1612.

Yu D, Duan Y, Bao Y, Wei C, An L. Isoflavonoids from Astragalus mongholicus protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *J Ethnopharmacol*, 2005, 98, 89-94.

Yu QT, Qi LW, Yi P, Li L, Zhao J, Bi Z. Determination of seventeen main flavonoids and saponins in the medicinal plant Huang-qi (Radix astragali) by HPLC-DAD-ELSD. *J Sep Sci*, 2007, 30, 1292-1299.

Zeng P, Li J, Chen Y, Zhang L. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs. U: Progress in Molecular Biology and Translational Science.

Zhang L, urednik, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 423-444.

Zhang H, Ding X, Tai KB, Yu AW. Alternative Medicine and Chinese Herbs and the Kidney. U: Critical Care Nephrology. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA, Ricci Z, urednici, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 1313-1319.

Zhang H, Shi X, Ji JL. The effect of Astragalus injection on proteinuria in diabetic nephropathy. *Henan Journal of Chinese Medicine*, 2001, 16, 36-37.

Zhang HW, Lin ZX, Chan K. Treatments Used in Complementary and Alternative Medicine. U: A worldwide yearly survey of new data in adverse drug reactions. Ray SD, urednik, Amsterdam, Elsevier, 2015, str. 595-601.

Zhang YD, Shen JP, Song J, Wang YL, Shao YN, Li CF, Zhou SH, Li YF, Li DX. Effects of Astragalus saponin 1 on cAMP and cGMP level in plasma and DNA synthesis in regenerating liver. *Acta Pharm Sin*, 1984, 19, 619-621.

Zhang Z, Dai X, Qi J, Ao Y, Yang C, Li Y. Astragalus mongholicus (Fisch.) Bge Improves Peripheral Treg Cell Immunity Imbalance in the Children With Viral Myocarditis by Reducing the Levels of miR-146b and miR-155. *Front Pediatr*, 2018, 6, 139.

Zhou JJ, Kang GG, Zhang Q, Chen HQ, Kang YQ. The effect of Huangqi granules on the serum and urine IFN- $\gamma$ , IL-13, TGF- $\beta$ 1 in the primary nephrotic syndrome patients. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Shenbing Zazhi*, 2010, 11, 242-243.

Zhou QJ. Chinese medicinal herbs in the treatment of viral hepatitis. U: Advances in Chinese Medicinal Materials Research. Chang HM, Yeung HW, Tso WW, Koo A, urednici, Singapur, World Scientific, 1985, str. 215-219.

Zhou RF, Liu PX, Tan M. Effect of Astragalus mongholicus injection on proliferation and apoptosis of hormone sensitive (MCF-7) breast cancer cell lines with physiological dose E2. *Zhong Yao Cai*, 2009, 32, 744-747.

Zhu YP. Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications. Amsterdam,



Harwood academic, 1998, str. 560-564.

Zou C, Su G, Wu Y, Lu F, Mao W, Liu X. Astragalus in the Prevention of Upper Respiratory Tract Infection in Children with Nephrotic Syndrome: Evidence-Based Clinical Practice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 35, 21-30.

Zou YH, Liu XM. Effect of Astragalus injection combined with chemotherapy on quality of life in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin J Integr Med*, 2003, 23, 733-735.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

*Astragalus mongholicus* B. stoljećima se primjenjuje u liječenju hepatitisa, kardiovaskularnih poremećaja, respiratornih infekcija, bubrežnih i kožnih bolesti te služi kao tonik, antidijabetik i diuretik. Polisaharidi, izoflavoni i triterpenski saponini smatraju se glavnim sastavnicama odgovornim za terapijske učinke korijena kozlinca koji se pripisuju njegovu imunomodulacijskom, protuupalnom i antioksidativnom djelovanju. Klinička ispitivanja ukazala su na potencijal primjene kozlinca u terapiji virusnog miokarditisa, ishemijskih bolesti srca, kronične bolesti bubrega, kongestivnog zatajenja srca i kroničnog virusnog hepatitisa. Novijim studijama ispituje se i njegova učinkovitost u liječenju leukopenije, karcinoma pluća, alergijskog rinitisa i prevenciji infekcija.

*Astragalus mongholicus* B. has been used for centuries to treat hepatitis, cardiovascular disorders, respiratory infections, kidney diseases, skin diseases and has been taken as a herbal tonic, antidiabetic and diuretic agent. Polysaccharides, isoflavones and triterpenoid saponins are considered to be the main active ingredients responsible for the therapeutic activity of Astragalus root, which is related to its immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant properties. In conducted clinical trials Astragalus showed potential for treating viral myocarditis, ischemic heart diseases, chronic kidney disease, congestive heart failure and chronic hepatitis. Recent studies have focused on investigating its efficacy in the treatment of leukopenia, lung cancer, allergic rhinitis and prevention of infectious diseases.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziju  
Trg Marka Marulića 20, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KORIJEN MONGOLSKOG KOZLINCA U SUVREMENOJ FITOFARMACIJI

Ana Jurelinac

#### SAŽETAK

*Astragalus mongholicus* B. stoljećima se primjenjuje u liječenju hepatitisa, kardiovaskularnih poremećaja, respiratornih infekcija, bubrežnih i kožnih bolesti te služi kao tonik, antidijabetik i diuretik. Polisaharidi, izoflavoni i triterpenski saponini smatraju se glavnim sastavnicama odgovornim za terapijske učinke korijena kozlinca koji se pripisuju njegovu imunomodulacijskom, protuupalnom i antioksidativnom djelovanju. Klinička ispitivanja ukazala su na potencijal primjene kozlinca u terapiji virusnog miokarditisa, ishemijskih bolesti srca, kronične bolesti bubrega, kongestivnog zatajenja srca i kroničnog virusnog hepatitisa. Novijim studijama ispituje se i njegova učinkovitost u liječenju leukopenije, karcinoma pluća, alergijskog rinitisa i prevenciji infekcija.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 7 grafičkih prikaza i 90 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Korijen mongolskog kozlinca, *Astragalus mongholicus*, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, fitoterapija

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**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Trg Marka Marulića 20, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ASTRAGALUS MONGHOLICUS ROOT IN MODERN PHYTOPHARMACY

**Ana Jurelinac**

#### SUMMARY

*Astragalus mongholicus* B. has been used for centuries to treat hepatitis, cardiovascular disorders, respiratory infections, kidney diseases, skin diseases and has been taken as a herbal tonic, antidiabetic and diuretic agent. Polysaccharides, isoflavones and triterpenoid saponins are considered to be the main active ingredients responsible for the therapeutic activity of Astragalus root, which is related to its immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant properties. In conducted clinical trials Astragalus showed potential for treating viral myocarditis, ischemic heart diseases, chronic kidney disease, congestive heart failure and chronic hepatitis. Recent studies have focused on investigating its efficacy in the treatment of leukopenia, lung cancer, allergic rhinitis and prevention of infectious diseases.

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

Thesis includes: 51 pages, 7 figures and 90 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Astragalus* root, *Astragalus mongholicus*, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, phytotherapy

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.** /Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Renata Jurišić Grubešić, Ph.D.** /Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

