

Izazovi pretkliničkih istraživanja vrsta roda Ehinacea

Perić, Rea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:388071>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
"Biotehnologija i istraživanje lijekova"

Rea Perić

Izazovi pretkliničkih istraživanja vrsta roda *Echinacea*

Završni rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova

Preddiplomski sveučilišni studij

“Biotehnologija i istraživanje lijekova”

Rea Perić

Izazovi pretkliničkih istraživanja vrsta roda *Echinacea*

Završni rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stribor Marković

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima _____ stranica, _____ slika, _____ tablica i _____ literaturnih navoda.

Sažetak/Summary

Biljne vrste roda *Echinacea* bilježe višestoljetnu primjenu u prirodnoj herbalnoj medicini stoga su i danas zanimljive za istraživanja. Posjeduju brojna korisna svojstva koja primarno djeluju na imunološki sustav jedinke kroz takozvane imunomodulatorne učinke koji utječu na brojne stanične puteve i same stanice. Djelovanje se očituje aktivacijom fagocitoze, stimulacijom fibroblasta i pojačanjem respiratorne aktivnosti te djelovanjem stanica kao što su makrofagi, leukociti, limfociti, granulociti, polimorfonuklearni leukociti (PMN) te stanice prirodni ubojice (NK stanice). Ovim putevima dolazi do lučenja brojnih citokina, kemokina i upalnih odnosno protuupalnih medijatora poput NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, adhezijske molekule i COX-2, komplementa C3b. Kako bi sve ovo moglo djelovati postoje i receptori koji prepoznaju te signale i šalju nove, neki od kojih su kanabinoidni receptori tipa 2 (CB2) i brojna obitelj TLR receptora. Uz učinke na imunološki sustav biljne vrste roda *Echinacea* odnosno biljne aktivne tvari takozvane fitokemikalije pronađene u njima posjeduju i protuupalne, psihoaktivne, citotoksične te antioksidativne, antibakterijske, antifungalne i antivirusne učinke. Neke od važnijih fitokemikalija su alkamidi, derivati kavene kiseline, polisaharidi i glikoproteini. Ne bi li se ovi učinci dokazali, korišteni su brojni testovi svojstveni pretkliničkim istraživanjima. *In vitro* istraživanja provedena su na raznim staničnim kulturama poput različitih vrsta mišjih i štakorskih makrofaga i limfocita, dendritičkih stanica, TPH-1 te Jurkat stanicama dok su *in vivo* istraživanja provedena testovima kao što su metoda uklanjanja ugljika ili test induciranja edema šape izazvanog karagenanom. Iako svi ovi testovi pokušavaju biti što točniji problem lipopolisaharidne kontaminacije i dalje stvara lažno pozitivne slike učinaka ove biljke. Stoga treba nastojati otkrivati nove, detaljnije mehanizme kako djelovanja vrsta roda *Echinacea* na organizam tako i same metode detekcije njihove korisnosti u organizmu.

Echinacea species have been used in natural herbal medicine for centuries, so interest for their research stands even up today. They possess numerous useful properties that primarily affect the immune system through so-called immunomodulatory effects through numerous cellular pathways and the cells themselves. These effects are manifested by the activation of phagocytosis, the stimulation of fibroblasts and respiratory burst, and cells such as macrophages, leukocytes, lymphocytes, granulocytes, polymorphonuclear leukocytes (PMN) and natural killer cells (NK cells). These pathways lead to the secretion of numerous cytokines, chemokines and inflammatory or anti-inflammatory mediators such as NF- κ B, TNF- α , IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, adhesion molecules and COX-2, complement C3b. In order for all of this to work, there are receptors that recognize these signals and send new ones, some of which are cannabinoid receptors type 2 (CB2) and a large family of TLR receptors. In addition to the immune-effect of the phytochemicals found in *Echinacea* species also have anti-inflammatory, psychoactive, cytotoxic and antioxidant, antibacterial, antifungal and antiviral effects. Some of the more important phytochemicals are alkamides, caffeic acid derivatives, polysaccharides and glycoproteins. In order to prove these effects, numerous tests characteristic of preclinical research were conducted. In vitro research was conducted on various cell cultures such as different types of mouse and rat macrophages and lymphocytes, dendritic cells, TPH-1 and Jurkat cells, while in vivo research was conducted with tests such as the carbon clearance method or carrageenan induced paw edema. Although all these tests try to be as accurate as possible the problem of lipopolysaccharide contamination still creates false positive images of the effects of this herb. Therefore, efforts should be made to discover new, more detailed mechanisms of the effects of *Echinacea* species on the body, as well as methods of detecting their usefulness in the body.

Ključne riječi/Key words

Echinacea purpurea, *Echinacea angustifolia*, imuno-učinci, pretklinička istraživanja, alkamidi, lipopolisaharidi, kavena kiselina, interleukini, makrofagi

Echinacea purpurea, *Echinacea angustifolia*, immune effects, preclinical research, alkamides, lipopolysaccharides, caffeic acid, interleukins, macrophages

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	SVRHA RADA	4
3.	RAZRADA	4
3.1.	PRETKLINIČKA ISTRAŽIVANJA.....	4
3.2.	IMUNOLOGIJA	5
3.3.	METODE SUŠENJA BILJNE DROGE I METODE DETEKCIJE FITOKEMIKA LIJA.....	8
3.4.	FARMAKOLOGIJA BILJNIH VRSTA RODA <i>ECHINACEA</i>	9
3.4.1.	IMUNOMODULATORNI UČINCI – ALKAMIDI, pretklinika	9
3.4.2.	OSTALI UČINCI	17
3.5.	CITOTOKSIČNA AKTIVNOST	23
3.6.	SIGURNOST BILJNIH PRIPRAVAKA; INTERAKCIJE S LIJEKOVIMA	24
3.6.1.	GENOTOKSIČNOST.....	24
3.6.2.	TOKSIKOLOGIJA, NUSPOJAVE I KONTRAINDIKACIJE	25
3.7.	INDIKACIJE; VRSTE PRIPRAVAKA	27
3.8.	PROBLEM TRANSLACIJSKE MEDICINE.....	42
4.	ZAKLJUČAK.....	43

1. UVOD

Biljne vrste roda *Echinacea* koriste se već stoljećima kao dio prirodne herbalne medicine. Američki domoroci koristili su ih u svrhu liječenja infekcija respiratornog trakta te raznih upalnih stanja poput upale usta i ždrijela, uobičajene prehlade, bronhitisa i drugih bolesti koje su karakterizirane kašljem. (1) Tradicionalno su vrste roda *Echinacea* bile opisivane kao antiinfektivna sredstva te su bile indicirane kod bakterijskih i virusnih infekcija. Pronađeni su podaci o korištenju ovih biljnih vrsta u svrhu liječenja infekcija poput sifilisa, septičnih rana i raznih drugih kožnih stanja koja su uključivala čireve, apscese i druge patološke promjene kože, infekcija donjeg urinarnog trakta te kao „antitoksina“ protiv ugriza zmije i trovanja krvi.(2) Još neke tradicionalne primjene ove biljke bile su tretiranje zubobolje, raznih napadaja, kroničnog artritisa te raka.(3)

Biljni rod *Echinacea* nativan je srednjoj i istočnoj Sjevernoj Americi, a sačinjava ga devet zeljastih cvjetnica iz porodice tratinčica (*Asteraceae*; *Compositae*) od kojih su tri najčešće koriste kao ljekovite vrste: *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *E. angustifolia* DC., i *E. pallida* (Nutt.).(1,4) *E. angustifolia* i *E. pallida* smatrane su različitim varijantama iste vrste no provedbom revizije roda opisane su kao dvije odvojene vrste. Nadalje, postoji mišljenje o naveliko neprikladnom korištenju naziva *E. purpurea* (L.) Moench stoga je predložena taksonomska revizija roda koja uključuje dva podroda i četiri vrste *E. purpurea*, *E. pallida*, *E. atrorubens* i *E. laevigata* u kojoj su između ostalog *E. angustifolia* te *E. pallida* revidirane u *E. pallida* var *angustifolia* (DC.) Cronq i *E. pallida* var *pallida* (Nutt.) Cronq. Prema trenutno prihvaćenoj taksonomiji ipak su zadržani nazivi *Echinacea angustifolia* DC. i *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. (5). Često su korišteni i narodni nazivi za biljne vrste roda *Echinacea* poput: crna četinka, šišarka, blijedo/blijedo-ljubičasta šišarka za *E. pallida*, ljubičasta šišarka za *E. purpurea* i *E. angustifolia* te kanzaška zmijolista za *E. angustifolia*. U medicinske svrhe koriste se svježi ili sušeni podzemni

dijelovi sve tri prethodno nabrojane vrste poput korijena i rizoma te svježi ili sušeni cvjetni vrhovi i svježe prešani sok cvjetnih vrhova *E.pupurea*. Komercijalno dostupni proizvodi koji sadrže *Echinaceu* mogu biti spravljeni od jedne ili više sirovih droga te su dostupni u različitim formama doziranja uključujući tinkture, tablete, čajeve, kapsule i pripravke za parenteralnu upotrebu.(2)

Smatra se kako je glavno djelovanje ovih biljnih vrsta upravo njihov utjecaj na imunološki sustav koji je kompleksna integrirana mreža stanica, tkiva, organa i topivih medijatora načinjena evoluirana za obranu organizma protiv svake strane tvari koja ugrožava integritet organizma. Imunološki sustav posjeduje brojne važne značajke no jedna od ključnih je upravo sposobnost razlikovanja između vlastitoga i stranoga, infektivno od neinfektivnog i opasno od neopasnog.(1) Novijim istraživanjima dolazi se do spoznaje kako je djelovanje biljnih vrsta ovog roda primarno imunomodulatorno uz dosadašnja antivirusna, protugljivična, protuupalna, protumikrobna i antioksidativna svojstva.(1,2) Zaključcima koji svoje korijenje vuku iz drevnih perspektiva zapadnjačke biljne medicine, biljni lijekovi koji utječu na imunološki sustav mogu se klasificirati u tri klase učinka koje posjeduju. Tako postoje imunostimulativni, adaptogeni i ujedinjeni učinci. Imunostimulansi (imunopotencijatori, pojačivači imuniteta) sredstva su koja doprinose aktiviranju nespecifičnih puteva imunosti protiv stranih tvari, primarno zaraznih organizama poput bakterija i virusa te tumorskih stanica. Adaptogene tvari koje doprinose adaptogenim učincima mogu se definirati kao tvari koje povećavaju otpornost tijela na biološke, fizičke i kemijske stresore. Nadalje, temeljem studija došlo se do zaključka kako neki od biljnih ekstrakata utječu na humoralnu (stečenu) imunost, no da ih većina pojačava staničnu (urođenu) imunost.(1,4)

Postoji nekolicina tvari, to jest fitokemikalija, aktivnih komponenti izoliranih iz biljnih vrsta medicinske važnosti u ovom slučaju roda *Echinacea* za koje se smatra da doprinose ovim imunološkim učincima. Najvažnijim fitokemikalijama, koje čine različite klase sekundarnih

metabolita biljke, smatraju se alkamidi, derivati kavene kiseline, polisaharidi i glikoproteini.(1,3,6) Alkamidi ili alkilamidi amidi su masnih kiselina koji se razlikuju po svojoj strukturi, a samim time i funkciji. U strukturi sadrže masnu kiselinu koja može varirati brojem ugljika i nezasićenosti, amidnu skupinu te varijabilnu skupinu. U prirodi se nalaze u preko 100 biljnih vrsta, između ostaloga u biljkama rodova *Echinacea*, *Acmella*, *Spilanthes* i *Heliopsis*. Smatra se da djeluju kao obrana od biljojeda jer prilikom konzumacije biljaka koje ih sadrže dolazi do snažnog osjećaja trnjenja u ustima. Upravo su ovu karakteristiku američki Indijanci koristili kao mjeru visoke kvalitete *Echinacee*. (6,7) Kavena kiselina oralno je raspoloživ polifenol klasificiran kao derivat hidroksicimetne kiseline (HCA) koja nastaje supstitucijom fenilnog prstena cimetne kiseline hidroksi skupinama na položajima 3 i 4. Prisutna je u gotovo svim biljkama, posebice u biljkama kave, gdje je glavna komponenta u njezinom prepoznatljivom mirisu, majčine dušice (timijana), kadulje i masline. Istraživanjima je pronađeno kako potencijalno ima antitumorsko (antineoplastično), antitrombocitno, antioksidativno i protuupalno djelovanje. (8,9) Ova kiselina sekundarni je metabolit u biosintezi lignina –složenog organskog polimera koji sadržava kisik te zajedno sa celulozom čini glavni sastojak drva. Lignin daje krutost staničnoj stijenci biljaka čime pomaže održavanju oblika stanice te pridonosi lakšem podnošenju gravitacijske sile povećavajući im tlačnu čvrstoću. Štiti staničnu stijenu od vode, time olakšavajući transport vode prema gore u tkivima ksilema. Lignin također ima antifungalna svojstva i često se brzo taloži kao odgovor na ozljedu gljivama, štiteći tijelo biljke od difuzije gljivičnih enzima i toksina.(10) Derivati kavene kiseline pronađeni u *Echinacei* su cikorična kiselina, ehinakozid, 1,3-dikafeoilkininska kiselina i klorogenska kiselina. Glavnim fenolnim spojevima u *Echinacea purpurea* smatraju se kaftarna kiselina i cikorična kiselina, dok ehinakozid ima tu ulogu u *E. angustifolia* i *E. pallida*.(11) Polisaharidi su najčešći oblik ugljikohidrata pronađenih u prirodi stoga mogu biti opisani njihovom kemijskom strukturom, koja sadrži monosaharidne jedinice međusobno povezane glikozidnom vezom

ukoliko su one ostaci šećera ili mogu biti kovalentno vezane za druge strukture poput peptida, aminokiselina i lipida.(12) Glikoproteini kao što im i samo ime kaže, spoj su ugljikohidratnog djela to jest šećera i proteina u jednu funkcionalnu cjelinu. Mogu postojati u velikom rasponu omjera sastavnica od 1% ugljikohidratnih dijelova vezanih na polipeptidnu okosnicu do čak 80% ukupne težine spoja. (13,14)

2. SVRHA RADA

Svrha ovog preglednog rada jest uvidjeti učinke biljnih vrsta roda *Echinacea* koji se stoljećima koriste kao lijek na ljudsko zdravlje kroz razne tehnike pretkliničkih istraživanja. Poznat je problem prisustva lipopolisaharidne kontaminacije ove biljne droge stoga je važno dokučiti jačinu njihovog djelovanja na ljudski organizam, koji također posjeduje lipopolisaharide u svom probavnom traktu, iz razloga što brojni testovi koji se provode u sklopu pretkliničkih istraživanja pokazuju prejaku stimulaciju i time lažnu pozitivnost učinka u dodiru čak i s najmanjim količinama lipopolisaharida.

3. RAZRADA

3.1. PRETKLINIČKA ISTRAŽIVANJA

Tijekom procesa razvoja lijeka bilo iz biljne droge bilo sintetičkog važno je proći nekoliko koraka provjere. Prvi korak jest pronalazak i razvoj spoja od interesa. Kada ovaj spoj zadovoljava određene kriterije moguće je preći na drugi korak procesa – pretklinička istraživanja. Ovo je izrazito važan korak u kojem istraživači moraju saznati imali taj spoj potencijala izazvati toksičnost organizmu na koji se primjenjuje, to jest može li mu nanijeti neke ozbiljne štetne učinke. Postoje dva tipa pretkliničkih istraživanja: *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* način istraživanja doslovno možemo prevesti „u staklu“ jer se provodi na kulturama eukariotskih, prokariotskih i arhejskih stanica, izoliranih tkiva ili organoida koje se drže u staklenim ili plastičnim posudama. S druge strane *in vivo* način istraživanja provodi se u živućim organizmima, a najčešće u nekoliko vrsta glodavaca i ne-glodavaca, vinskoj mušici i jednoj vrsti ribe (*Danio rerio*). Ovakva

istraživanja moraju slijediti stroge propise glede toga kako se sama studija provodi - moraju postojati detaljni pisani protokoli te izvještaji, osoblja koje ju provodi, ustanova u kojima se smije provoditi i opreme kojom se provodi. Uobičajeno, ova istraživanja ne zahvaćaju velik broj eksperimentalnih subjekata niti se dugo provode, najčešće od nekoliko dana do nekoliko mjeseci, izuzev kroničnih toksikoloških studija, pošto se provode na staničnim kulturama ili životinjama. Njihov cilj jest pružanje vrlo detaljnih informacija o mehanizmu djelovanja u nekoj bolesti te aktivnosti i predikciji doziranja, nivoa toksičnosti, odnosno toksičnim učincima zabilježenim u *in vitro* i *in vivo* uvjetima koji se mogu translirati u ljude. Nakon pretkliničkih istraživanja koja daju odgovore na osnovna pitanja oko sigurnosti lijeka, no ne mogu pružiti uvid u to kako će lijek djelovati u ljudskom tijelu, istraživači preispituju svoje pronalaskе te odlučuju treba li lijek preći u klinički dio istraživanja. Ovaj treći korak provodi se na ljudima tijekom niza godina u nekoliko svojih faza, najčešće četiri, koje obuhvaćaju grupu ispitanika od nekoliko zdravih dobrovoljaca do nekoliko tisuća osoba sa bolešću to jest stanjem od interesa. Cilj ovih faza jest odrediti sigurnost i doziranje, učinkovitost i nuspojave te ukupnu dugoročnu sigurnost lijeka.(15)

3.2. IMUNOLOGIJA

Imunologija je kao grana biomedicinskih, to jest mikrobioloških znanosti proizašla iz nekoliko ranijih otkrića poput pionirskog rada Edwarda Jennera koji je polako, ali sigurno vodio cijepljenju u modernom smislu te riječi. (16,17) Ova znanost, kao što joj samo ime kaže, bavi se proučavanjem imunološkog sustava to jest imuniteta odnosno cjelokupne otpornosti organizma na djelovanje stranih tvari, takozvanih antigena.(18) Imunološki sustav (IS), predmet proučavanja imunologije, učinkovita je integrirana mreža staničnih elemenata, malih organskih molekula te bioloških molekula, tkivnih struktura, organa te procesa razvijenih za očuvanje integriteta organizma od infekcije okolnim mikroorganizmima (virusi, bakterije, gljivice i drugi paraziti), a njegovo pravilno

funkcioniranje i ravnoteža ključni su kako bi se izbjegla pojava velikog broja poremećaja odnosno patoloških stanja, kao i razvoja tumora.(1,18) Dokle god je funkcija imunološkog sustava u granicama normale svaka imunološka komponenta ima jedinstvenu ulogu, a kada se strana tvar prepozna, imunološki sustav reagira na predvidljiv način kako bi je uklonio. Imunološki sustav uključuje puno tipova stanica, tkiva i organa koje možemo podijeliti na primarne i sekundarne. U primarnim limfoidnim organima, koštanoj srži i timusu, imunološke stanice se proizvode i sazrijevaju; dok u sekundarnim limfoidnim organima, limfnim čvorovima, slezeni, krajnicima i Peyеровим pločama u tankom crijevu, imunološke stanice cirkuliraju i borave tijekom svog života. Uz ove komponente mogu se nadodati i krvožilni sustav, limfoidno tkivo povezano sa sluznicom (MALT) i limfni sustav. Fagocitne stanice, koje uključuju monocite, makrofage i neutrofile, najbrojnije su stanice IS-a. Te su stanice sposobne fagocitirati i probaviti patogene i strane molekule. Limfociti, druge najzastupljenije stanice IS-a, važni su u normalnom imunološkom odgovoru na infekcije i tumore, ali i u posredovanju u odbacivanju transplantata i autoimunosti. Mogu se razlikovati u dvije različite vrste, nazvane T- i B-stanice. Sve imunološke stanice nastaju iz uobičajenih hematopoetskih matičnih stanica (HSC) u koštanoj srži nakon hematopoeze. Tijekom aktivacije imunološkog odgovora, limfociti eksponencijalno proliferiraju i diferenciraju se: B-stanice se pretvaraju u plazma stanice, svojevrsne tvornice antitijela koje otpuštaju tisuće antitijela u krvotok, dok se T-stanice diferenciraju u različite podskupine različite specijalizacije. Također postoje i mijeloične imunološke stanice, efektorske stanice te regulacijske stanice. (1,16,19) Djelovanje imunološkog sustava, to jest imunološke odgovore može se podijeliti na urođeni imunitet i stečeni (adaptivni) imunitet. Urođeni imunitet prva je linija obrane te uključuje nespecifične mehanizme - odgovori su isti za sve potencijalne patogene, bez obzira na to koliko različiti bili. Urođeni imunitet uključuje fizičke barijere poput kože i sline, te stanice kao što su makrofagi, neutrofili, bazofili i mastociti, sustav komplementa i različite

klase receptora koje koriste urođene stanice, kao što su toll-like receptori (TLR). Ovi receptori su članovi obitelji receptora za prepoznavanje obrazaca (PPP) i sposobni su detektirati očuvane molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP), kao što su komponente stanične stijenke bakterija i gljivica (tj. lipopolisaharidi, bakterijski lipopeptidi i β -glukani. Iako uz neke iznimke, TLR-ovi i drugi PPP-ovi dopuštaju urođenim stanicama da razlikuju sebe od ne-sebe, ali im nedostaje sposobnost razlikovanja patogenih molekula od nepatogenih mikroorganizama. Jednu iznimku predstavlja TLR5 za koji se čini da može različito odgovoriti na flageline patogenih i nepatogenih bakterija. (1) Ove komponente spremne su u bilo kojem trenutku i štite organizam prvih nekoliko dana infekcije, one pružaju prvu liniju obrane. Prva linija obrane nema sposobnost dugoročnog pamćenja i uske specifičnosti. U nekim slučajevima to je dovoljno za uklanjanje patogena, no u drugim slučajevima prva obrana postaje nadvladana i potrebno je uključivanje druge linije obrane. Tada nastupa adaptivni imunitet koji uključuje stjecanje sjećanja na infekcije koje su se dogodile tako da slijedeći put kada dođe do infekcije može pokrenuti pojačani odgovor specifičan za patogen (antigen) ili stranu tvar. Adaptivni imunitet uključuje antitijela koja općenito ciljaju strane patogene koji slobodno lutaju krvotokom. Također uključene su T stanice, dugovječni limfociti koji imaju sposobnost pamćenja i njihovi visokospecijalizirani receptori, koje su usmjerene posebno prema patogenima koji su kolonizirali stanice i mogu izravno ubiti zaražene stanice ili pomoći u kontroli odgovora protutijela.(1,16) Urođeni i adaptivni sustavi nisu strogo odvojeni, već blisko surađuju. Urođeni sustav prepoznaje infekciju i "upozorava" adaptivni sustav kroz prezentaciju antigena, koja se događa zahvaljujući proteinima glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC). Urođene stanice otpuštaju i druge kemijske signale, poput citokina i kemokina, kako bi u potpunosti aktivirale adaptivni sustav. Važno je da specijalizirani B i T limfociti, poznati kao regulatorne stanice, upravljaju i zaustavljaju imunološki

odgovor nakon što je uvreda otklonjena, čime se izbjegava pretjerani odgovor imunološkog sustava.(1)

3.3. METODE SUŠENJA BILJNE DROGE I METODE DETEKCIJE FITOKEMIKALIJA

Tijekom dosadašnjih istraživanja najčešće se spominju četiri načina sušenja biljnih droga nakon žetve. Biljke su ubrane tijekom druge godine rasta te su korijenje i nadzemni dijelovi bili pomno oprani nakon čega su podvrgnuti jednom od četiri načina sušenja. Prvi način sušenja provodio se na način da su dijelovi biljaka stavljeni u smeđe papirnate vrećice i raspoređeni na stolove unutar staklenika s odgovarajućom cirkulacijom zraka tijekom 2 tjedna (dnevna temperatura okoline kretala se između 35 i 43°C). Drugi način sušenja provodio se u dva dijela prvo su dijelovi biljke ostavljeni vani u zasjenjenom području u blizini polja za uzgoj na 24 sata te su zatim prebačeni na sušenje u struji zraka na 10 dana, održavanu na 40°C. Za treći način sušenja biljni dijelovi su odmah prebačeni na sušenje u struji zraka na 10 dana održavanu na 40°C. Četvrti način sušenja proveden je neposrednim zamrzavanjem biljnih dijelova koji su potom liofilizirani slijedećih 5 dana.(20) Provedena istraživanja koja su uspoređivala učinke biljne droge s obzirom na način njezina sušenja zamijetila su da ne postoji bitna razlika učinaka koja bi korelirala s vrstom tretmana kojem je biljna droga bila podvrgnuta nakon žetve. (21) Neki od načina provođenja analiza kako bi se detektirala prisutnost određenih tvari u biljnoj drogi navedeni su u Tablici 1. (3)

FITOKEMIKALIJA	GLAVNA METODA DETEKCIJE	POPATNE METODE DETEKCIJE
alkamidi	HPLC reverzne faze	UV spektrofotometrija, kulometrijsko-elektrokemijska, masena spektrometrija s ionizacijom u elektrospreju (elektrosprej+ ionizacijska masena spektrometrija (EIMS))

derivati kavene kiseline	HPLC reverzne faze ili kapilarna elektroforeza (CE) s fotodiodnim nizom (FDA) UV spektrofotometrijskom detekcijom	
fenolne kiseline	elektrokinetička kromatografija micelarne benzojeve kiseline (MEKC)	

Tablica 1. Metode detekcije aktivnih tvari biljaka

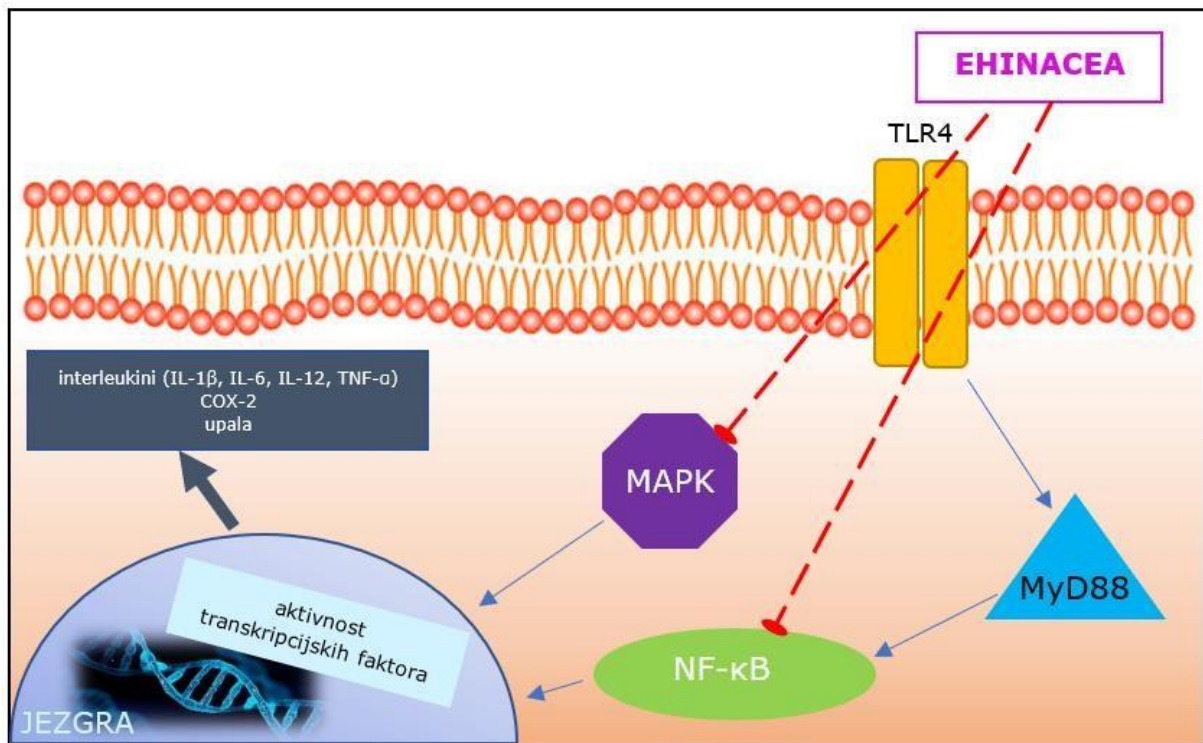
3.4. FARMAKOLOGIJA BILJNIH VRSTA RODA *ECHINACEA*

3.4.1. IMUNOMODULATRONI UČINCI – ALKAMIDI, pretklinika

Brojne tvari prisutne u vrstama roda *Echinacea* prikazuju različita djelovanja na organizam. Tako je dokazano da neke od njih mogu utjecati na imunološki sustav te izmjenom standardnih puteva prijenosa signala pomoći u borbi sa infekcijama bilo utišavanjem upalnog procesa ili pojačavanjem protuupalnog. Jedan od načina jest imunostimulirajuće djelovanje putem više mehanizama: aktivacijom fagocitoze, stimulacijom fibroblasta i pojačanjem respiratorne aktivnosti takozvani respiratory burst koja rezultira povećanjem pokretljivosti leukocita. Generalno imunološka stimulacija ne pokazuje antigensku vezu sa specifičnim patogenima pa je takvo djelovanje nespecifično, posredovano stanicama poput makrofaga, leukocita, granulocita, polimorfonuklearnih leukocita (PMN) i stanicama prirodnim ubojicama (NK stanice). Prema tome čini se da efekti stanično-posredovane imunosti primarno pokazuju imunomodulatorne učinke korištenih preparata *Echinacee*. (3,4)

Provedeno je mnogo pretkliničkih istraživanja bilo *in vitro* ili *in vivo* tipa koja su također poduprla ove tvrdnje. Stotzem et al. 1992. koristeći liofilizirani istisnuti sok *Echinacee purpuree* u koncentraciji do 5,0 mg/ml tretirali su suspenziju leukocita što je rezultiralo izazivanjem porasta fagocitoznih granulocita te je došlo do značajne dozno ovisne stimulacije indeksa fagocitoze. No, primjenom najveće testirane doze od 12,5 mg/ml došlo je do smanjenja broj fagocitoznih granulocita i indeks fagocitoze, što je moguće uzrokovano citotoksičnim učinkom. Bauer et al. 1989. *in vivo* istraživanjem provedenim na izoliranim peritonealnim makrofagima

miševa i makrofagima izolirane perfuzirane jetre štakora nakon intraperitonealne injekcije i/ili *per os* primjene (i.p. i/ili p.o.) iscijeđenog soka *Echinacee purpuree* primijetili su značajnu stimulaciju njihove fagocitoze. Osim cijedeđenog soka biljke postoje i brojni drugi pripravci poput sirove frakcije biljke. Tako su Tamta i sur. odredili doprinos bakterijskih lipopolisaharida i bakterijskih lipoproteina Braun tipa ukupnoj aktivnost jačanja imuniteta pulveriziranog korijena i nadzemnih dijelova *Echinacee purpuree* i *Echinacee angustifoliae*. Ispitavši učinke ovakve vrste biljne droge na dvije stanične linije monocita odnosno makrofaga uočene su značajne varijacije u njihovoj aktivnosti. Međutim, tretmanom lipoprotein lipazom koja razgrađuje lipoproteine i polimiksinom B koji razgrađuje lipopolisaharide većina tih aktivnosti je poništena. U sličnom istraživanju ukupno bakterijsko opterećenje uzoraka korijena i biljke *Echinacea purpurea* određeno je kvantificiranjem temeljenim na PCR-u. Razlike ukopnog bakterijskog opterećenja različitih uzoraka *Echinacee* te razlike sadržaja bakterijskih lipopolisaharida unutar ekstrakata ovog biljnog materijala bile su u snažnoj korelaciji s aktivnošću u vidu aktivacije NF- κ B u THP-1 stanicama. NF- κ B čimbenik je nuklearne transkripcije koji potiče ekspresiju nekih gena poput ključnih čimbenika upale kao što su TNF- α , IL-1, kemokini, adhezijske molekule i COX-2.(3) Randolph i sur. proučavali su utjecaj različitih pripravaka *Echinacee* uključujući ekstrakt biljke *Echinacea purpurea* (250 μ g/ml) na regulaciju ekspresije ljudskih imunoloških pomoću THP-1 stanica. Mjereći nastale količine komplementarne mRNA kvantitativnim PCR-om proučavali su ekspresiju gena interleukina-1 α , interleukina-1 β , TNF- α , intracelularne adhezijske molekule, interleukina-8 i interleukina-10 čime je zaključeno kako je ona povećana i do 10 puta u THP-1 stanicama tretiranim *Echinaceom*. Starija studija u kojoj je ELISA metodom praćena proizvodnja citokina nastalih iz normalnih ljudskih makrofaga periferne krvi prilikom *in vitro* stimulacije komercijalno dostupnim pripravcima *Echinacee purpuree* pokazala je slične rezultate.(Slika 1.) (21)



Slika 1. Shematski prikaz glavnih molekularnih putova povezanih s upalnim i imunomodulatornim aktivnostima moduliranim Echinaceom. Isprekidana crvena linija označava inhibiciju puta. TLR-4: Toll-like Receptor-4; MyD88: mijeloidna diferencijacija primarni odgovor 88; NF- κ B: Nuklearni faktor kapa B; MAPK: mitogen-aktivirana protein kinaza; COX-2: ciklooksigenaza-2; IL: interleukin; TNF: faktor nekroze tumora

In vivo istraživanje fagocitoze makrofaga metodom uklanjanja ugljika takozvanim carbon clearance testom jedna je od nužnih metoda za procjenu imunomodulatornih učinaka lijekova i fitokemikalija na retikuloendotelni sustav (RES) – difuzni sustav sačinjen od fagocitnih stanica. Nakon što RES prepozna prisutnost štetnih tvari u krvotoku uklanja ih putem fagocitoze. Taj proces uključuje "opsonizaciju" stranih čestica protutijelima i komplementom C3b što rezultira njihovim uklanjanjem iz krvi. Testne životinje podijele se u nekoliko odgovarajućih skupina. „Toksična“ kontrolna skupina tretira se ciklofosfamidom (30 mg/kg, i. p.), dok se ostalim skupinama administriraju ispitni spojevi. Nakon šest dana svim skupinama ubrizgano je 0,1 ml suspenzije

karbonske tinte kroz repnu venu neposredno nakon čega je sakupljen prvi uzorak krvi, petnaeste minute po ubrizgavanju sakupljen je drugi uzorak krvi. Uzorci krvi (25 μ l) liziraju se s 2 ml 0,1% natrijeva karbonata, nakon čega slijedi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije na 675 nm kako bi se odredila optička gustoća. Brzina uklanjanja ugljika, nazvana fagocitnim indeksom (K), izračunava se pomoću slijedeće jednadžbe $K = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$, gdje OD_1 predstavlja optičku gustoću u vremenu $t_1 = 0$ min nakon uzorkovanja krvi iz vene mišjeg repa dok OD_2 predstavlja optičku gustoću u vremenu $t_2 = 15$ min nakon uzorkovanja krvi iz vene mišjeg repa. Shodno ranije spomenutim informacijama brzo uklanjanje čestica ugljika povezano je s povećanjem fagocitotske aktivnosti. (24) Ovakav test u svome radu koristili su Bauer i sur. gdje je mjerena učinkovitost etanolnog ekstrakta biljke *Echinacea purpurea* nakon p.o. primjene na miševima u dozi od 1,7 mg ekstrakta/kg tri puta dnevno tijekom dva dana. Zamijećen je porast fagocitnog indeksa u odnosu na kontrolu. (21) Nadalje još jedno provedeno pretkliničko istraživanje pokazalo je imunomodulatorne učinke *Echinacee* u vidu aktivacije fagocitičkih leukocita i NK stanica, makrofaga te promjena u broju i aktivnosti T- i B-staničnih leukocita.(4)

Neke od brojnih fitokemikalija prisutnih u složenom kemijskom sastavu nadzemnih dijelova i korijenu biljaka roda *Echinacea* za koje je dokazano da posjeduju imunomodulatorna, to jest imunostimulirajuća i protuupalna svojstva su: alkamidi, ketoalkeni, derivati kavene kiseline, polisaharidi i glikoproteini. Međutim, istraživanjima je zaključeno kako se alkamidi posebno ističu svojim imunomodulatornim svojstvima među ovim brojnim fitokemikalijama. Pokazalo se da mogu djelovati na kanabinoidne receptore tipa 2 (CB2), što se smatra mogućim mehanizmom njihovih imunomodulatornih svojstava. Utvrđeno je kako stimulacija alkamidima utječe na kanabinoidni receptor CB2 koji pak utječe na pojačanje regulaciju TNF- α mRNA. (21) Mogući molekularni mehanizam tog djelovanja mogao bi biti povećanje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP), p38 mitogenom aktivirane proteinske kinaze (p38/MAPK) i signalizacije c-Jun N-terminalne

kinaze (JNK), kao i pojačivač nuklearnog faktora kapa-lakog lanca aktivirajući transkripcijski faktor 2/cAMP odgovorni element vezujući protein 1 (ATF-2/CREB-1) u primarnim ljudskim monocitima i makrofagima.(3) S druge strane drugo istraživanje pokazalo je kako N-alkamidi iz korijena i tinkture biljke induciraju sinergijsko djelovanje na CB2 i u konačnici dovode do imunomodulatornih učinaka uključujući stimulaciju interleukina-10 (IL-10) i inhibiciju čimbenika nekroze tumora (TNF- α) *in vitro*. Ovime se poteže pitanje opravdanosti „starog“ naziva imunostimulatora koje tradicionalno implicira sredstvo koje jača, potiče ili stvara imunološki odgovor, uobičajeno povećavanjem aktivnosti određenih imunoloških stanica ili citokina. No, ukoliko određeno sredstvo povećava razine IL-10, citokina koji posjeduje pretežno imunosupresivne učinke i smanjuje razine TNF- α pro-upalnog citokina, postaje sve opravdanije koristiti naziv imunomodulatora iz razloga što ni jedno sredstvo nema isključivo stimulativne odnosno supresivne učinke već oni sinergistički djeluju ne bi li izliječili organizam, to jest spriječili tijek upale. Povećanje razine IL-10 može doprinijeti smanjenju (kroničnih) upalnih odgovora čineći tako pozitivan učinak na smanjenje dugotrajnih upalnih procesa ili autoimunih bolesti. Nadalje može doprinijeti toleranciji organizma na strano što može imati i pozitivne i negativne učinke. Pozitivna strana bila bi promocija imunološke tolerancije prilikom transplantacija čime bi se smanjila stopa odbacivanja ili prilikom liječenja alergijskih bolesti u kojima je tijelo preaktivno na određene inače ne štetne tvari. Negativni učinak bio bi imunosupresija organizma, odnosno može doći do propuštanja to jest „sljepoće“ na patogene tvari i organizme jer dugotrajnim povećanjem IL-10 opada sposobnost tijela u borbi protiv infekcija budući da smanjuje aktivnost pro-upalnih citokina i imunoloških stanica. Zbog ne uzrokovanja potrebne upale dolazi do povećanog rizika od infekcija te smrtnih ishoda domaćina. (22)Alkamidi također mogu inhibirati enzime ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2) i 5-lipoksigenazu (F-LO), uzrokujući inhibiciju NK stanica i protuupalnu aktivnost. Zaključak o povećanju fagocitoze podupro je carbon clearance test proveden nakon administracije pročišćene nepolarne

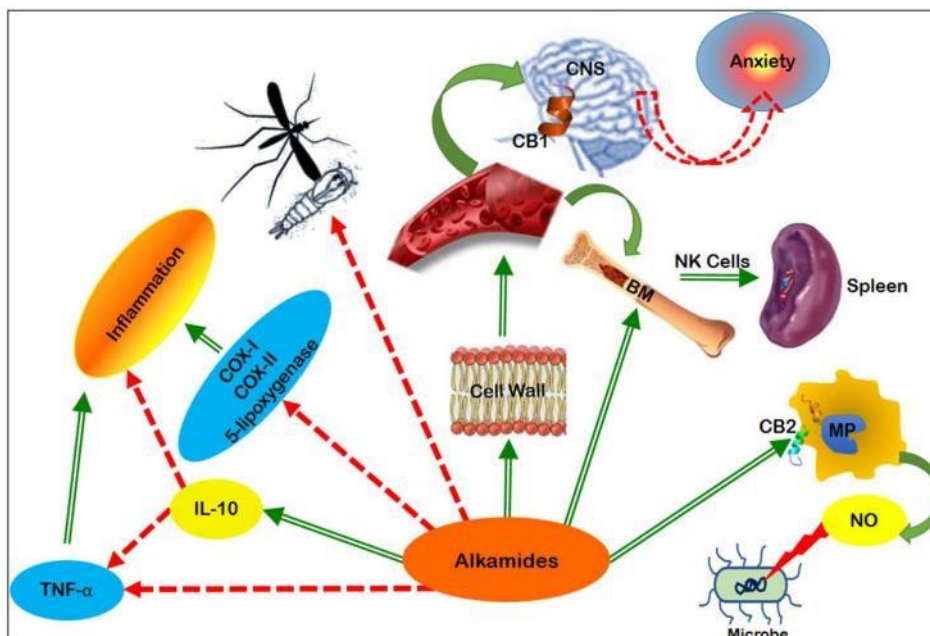
frakcije obogaćene alkamidima, izolirane iz korijena *Echinacea purpurea* i *Echinacea angustifolia* u dozi od 10 ml/kg tri puta dnevno tijekom dva dana koja je sadržavala 1 mg alkamidne frakcije u 30 ml. Nadalje utvrđeno je kako *p.o.* primjena pročišćene alkamidne frakcije pojačava fagocitnu aktivnost i fagocitni indeks plućnih alveolarnih makrofaga štakora. Osim ovih aktivnosti alveolarni makrofagi prikupljeni od štakora tretiranih alkamidom, nakon *in vitro* stimulacije LPS-om, proizveli su više TNF- α i dušikovog oksida u odnosu na kontrolu nego nakon stimulacije bilo kojom drugom aktivnom komponentom. (21) Ispitan je i učinak etanolnog ekstrakta lišća bogatog alkamidima na dendritičke stanice (DC) koji je pokazao da alkamidi mogu smanjiti funkciju DC miševa. Istraživanje učinaka spojeva na ove stanice važno je, budući da one igraju važnu ulogu kako u urođenom tako i u adaptivnom imunitetu.

Uz alkamide imunomodulatorne učinke posjeduju i polisaharidi izolirani iz nadzemnih dijelova i korijena biljke. Daljnjim pročišćavanjem izolata dobiven je pripravak bez proteina nazvan EPS te dva polisaharida PSI, 4-O-metilglukuronarabinoksilan (35 000 D) i PSII, 50 000 D kiseli arabinorhamnogalaktan. (3,21) Ovu tvrdnju moguće je potkrijepiti dokazom kako polisaharidi pospješuju fagocitozu i kemotaksu makrofaga, proizvodnju citokina u granulocitima i makrofagima, mikrocidnu aktivnost i u *in vitro* i *in vivo* uvjetima te proizvodnju i izlučivanje cerebrospinalne tekućine (CSF), uz to povećavaju proizvodnju interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) i makrofagnog TNF- α . No uočeno je kako u *in vitro* uvjetima ti polisaharidi nisu utjecali na proliferaciju T i B stanica ili njihovu proizvodnju citokina. (3,21) *In vitro* istraživanje učinaka kiselog arabinogalaktana (75,000 D) izoliranog iz biljnih stanica uzgojenih u kulturi pokazalo je pojačanu aktivaciju makrofaga i intracelularno ubijanje *Leishmania enriettii*, no koncentracije polisaharida potrebne za postizanje tih učinaka bile su vrlo visoke. S druge strane uviđena je niska aktivnost na proizvodnju nitrita i IL6 u kulturi alveolarnih mišjih makrofaga te na proizvodnju imunoglobulina M (IgM) mišjih limfocita, dok nisu uviđeni nikakvi učinci ovog spoja na proliferaciju

samih mišjih limfocita. (3) U sličnom istraživanju gdje je korišten EPS bile su potrebne koncentracije od 1 mg/ml za postizanje povećanja citotoksičnosti makrofaga te za pedesetpostotno povećanje proizvodnje makrofagnog IL-1 u odnosu na nastale količine postignute korištenjem maksimalnih koncentracija lipopolisaharida iz *Salmonella* (LPS). (21) Nadalje *in vitro* istraživanje na makrofagima pokazalo je kako primjena polisaharida pojačava citotoksičnost protiv WEHI 164 i P815 tumorskih stanica. Učinci vodenog ekstrakta korijena bogatog polisaharidima također su ispitani na dendritičkim stanicama (DC) čime je uočeno da polisaharidi u vodenom ekstraktu mogu aktivirati DC. Znanstvenici su proveli nekoliko različitih *in vivo* studija na miševima gdje su došli do zanimljivih rezultata. U prvoj studiji otkrili su kako polisaharidi dobiveni iz kulture stanica *E. purpurea* mogu pružiti zaštitu protiv *Listeria monocytogenes* i *Candida albicans*, uglavnom preko makrofaga i PMN. Druga studija, provedena je na miševima sa izazvanom imunodeficijencijom primjenom kemoterapeutika ciklofosfamida i imunosupresora ciklosporina A dokazala je kako primjena polisaharida povećava njihovu otpornost na infekcije ovisne o makrofagima i granulocitima poput *L. monocytogenes* i *C. albicans*. Treća studija dokazala je da oralna primjena ekstrakta korijena *E. purpurea* povećava broj NK stanica, leukocita i neutrofilnih granulocita u zdravih, starih te miševa oboljelih od leukemije, kao i broj neutrofila i eozinofila u kunića. Između ostaloga provedeno je i istraživanje korištenjem 0,01 mg/ml EPS primijenjenog intravenozno koje je pokazalo pojačanu fagocitozu. Intravenozno iniciranje izoliranog arabinogalaktana u miševu također je pokazalo pojačanu otpornost protiv sistemskih infekcija s *Listeria monocytogenes* i *Candida albicans* kod normalnih i kod imunokompromitiranih životinja. Oralna primjena frakcije polisaharida iz nadzemnih dijelova *Echinacea purpurea* (125, 1000, 3000 mg/kg/dan, što je mnogo više od preporučene doze za ljude) nije imala učinka na funkciju plućnih makrofaga u normalnih štakora. (3,21) Polisaharidni spojevi prirodno su prisutni kako u ljudskom tako i u mišjem odnosno štakorskom probavnom traktu što dovodi do važnosti samog načina administracije

pripravka prilikom testiranja. Prilikom intravenske administracije lijek, odnosno pripravak ubrizgava se direktno u krvotok čime se zaobilazi prolazak lijeka kroz gastrointestinalni trakt i jetru prije ulaska u sistemsku cirkulaciju, čime se izbjegava efekt prvog prolaska engl. first-pass effect. Prilikom peroralne administracije lijek se mora apsorbirati kroz stijenke želuca i crijeva te proći prvotnu filtraciju u jetri, čime može doći do smanjene bioraspoloživosti lijeka i varijabilne apsorpcije, te tek nakon toga ući u sistemski krvotok. (23)

Rezultati analize korijena i nadzemnih dijelova biljke metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti s detektorom s nizom dioda i masenom spektrometrijom (HPLC-DAD-MS) pokazali su da uvjeti skladištenja i metode ekstrakcije mogu značajno utjecati na sadržaj cikorične kiseline i derivata alkamida. Analizom različitih uzoraka utvrđen je sadržaj alkamida i cikorične kiseline u korijenu i nadzemnim dijelovima *E. purpurea*. Rezultati su pokazali da visokokvalitetan korijen sadrži više od 6 mg/g alkamida, dok je sadržaj cikorične kiseline za korijen i nadzemni dio procijenjen na više od 15 mg/g. Nadzemni dijelovi biljke obično se ne mogu smatrati izvorom alkamida. (Slika 2.) (3)



Slika 2. Shematski prikaz nekih bioloških i farmakoloških aktivnosti alkamida izoliranih iz *E. purpurea*. BM = koštana srž, CB = kanabinoidni

receptor, CNS = središnji živčani sustav, COX = enzim ciklooksigenaza, IL-10 = interleukin-10, MP = makrofag, NK = prirodne stanice ubojice, NO = dušikov oksid, TNF- α = faktor nekroze tumora- α

Ostali spojevi uključujući alkaloidne, amide i flavonoide (kvercetin, kaempferol, izorhamnetin i njihove slobodne fenolne kiseline uključujući p-kumaričnu, p-hidroksibenzojevu i protokatehuinsku kiselinu) također su izolirani i identificirani iz biljke.(3)

3.4.2. OSTALI UČINCI

Uz imunomodulatorne učinke fitokemikalije prisutne u biljnim vrstama roda *Echinacea* posjeduju i protuupalne, psihoaktivne, citotoksične te antioksidativne, antibakterijske, antifungalne i antivirusne učinke. Utjecaji protuupalnih učinaka ispitani su na razne načine. Tako je zamijećeno da je pripravak *Eninacee*, smanjivši količinu citokina, uspješno preokrenuo upalnu reakciju izazvanu bakterijama u kulturi epitelnih stanica. Osim toga, objavljeno je kako etanolni ekstrakti nadzemnih dijelova i korijena biljke posjeduju mogućnost inhibiranja daljnjeg porasta fibroblastima inducirane koncentracije kolagena. Nadalje, učinci fitokemikalija biljnih vrsta roda *Echinacea* procijenjeni su na ekspresiju NF- κ B u Jurkat stanicama (ljudska T-stanična linija) u prisutnosti i odsutnosti stimulacije LPS-om i forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA). U nedostatku stimulansa, ekstrakti korijena u kojima su sadržane pripadajuće fitokemikalije nisu pokazali značajan učinak na ekspresiju NF- κ B. Zapravo, LPS je smanjio ekspresiju NF- κ B, dok je ovaj učinak bio značajno poništen u prisutnosti ekstrakata korijena, cikorične kiseline i frakcija alkamida. Dokazano je da cikorična kiselina i 2,4-dien alkamid značajno povećavaju razine NF- κ B, dok 2-en alkamid uzrokuje značajnu inhibiciju, što ukazuje na značajnu raznolikost u bioaktivnosti ovog biljnog roda. (3) Također je proveden i test induciranja edema šape izazvanog karagenanom. Modeli upale izazvani karagenanom često su korišteni modeli akutne upale, to jest protuupalnih učinaka ispitivanih tvari na pokusnim životinjama iz razloga što su dobro istraženi i pokazuju visok stupanj ponovljivosti. Akutna upala proces je koji uključuje prekomjernu proizvodnju slobodnih radikala,

aktivaciju složenih enzima i otpuštanje nekoliko upalnih i proupalnih medijatora. Tipični znakovi upale uključuju edem, hiperalgeziju i eritem. Karagenan je jaka kemikalija koja djeluje na stimuliranje otpuštanja upalnih i proupalnih medijatora, uključujući bradikinin, histamin, tahikinine, reaktivni kisik i dušikove vrste. Edem šape životinjama se izaziva intraplantarnom ili subplantarnom injekcijom 1% suspenzije lambda karagenana u fiziološkoj otopini pola sata ili sat vremena nakon tretiranja ispitivanim spojem, dok im se u drugu šapu ubrizga ista količina čiste fiziološke otopine kao kontrola. Injekcija karagenana subplantarnu površinu štakorske šape izaziva dvofazni edem. Tijekom rane faze to jest prvih sat vremena po primitku karagenana opaženo je povećano otpuštenje histamina, serotoninina, bradikinina i u manjoj mjeri prostaglandina koje proizvode enzimi ciklooksigenaza (COX), dok je tijekom kasnije faze koja nastupa nakon prvog sata po primitku karagenana zamijećena infiltracija neutrofila i njihovo otpuštanje slobodnih radikala poput dušikovog oksida (NO) i proupalnih citokina kao što su čimbenik nekroze tumora (TNF- α) i interleukin-1 β (IL-1 β) te nastavak proizvodnje prostaglandina. Mjerenjem volumena tretirane šape u različitim vremenskim intervalima nakon izazivanja edema dolazi se do zaključaka o djelotvornosti ispitivanog spoja. U vidu ispitivanja učinaka biljnih vrsta roda Echinacee miševima je davan prah osušenog korijena biljke (30-100 mg/kg) čime je dokazano inhibiranje nastanka edema slično učincima indometacina protuupalnog ne steroidnog lijeka (NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug). Ovaj se učinak može pripisati prisutstvu alkamida u ekstraktu korijena koji inhibiraju COX-1 i u manjoj mjeri COX-2 enzime. Protuupalna svojstva alkamida potvrđuje i *in vitro* istraživanje u modelom sustavu koje je dokazalo inhibicijske učinke nekoliko alkamida u količini od 100 μ g/ml na aktivnosti dva izozima ciklooksigenaze-1 (COX-1) gdje je zamijećena inhibicija u rasponu od 36 do 60% i ciklooksigenaze-2 (COX-2) gdje je zamijećena inhibicija u rasponu od 15 do 46% u odnosu na kontrolu pri pH 7. (3,21,24,25) Nadalje provedeno je *in vitro* ispitivanje djelovanja ekstrakata pet divljih i

tri komercijalno korištene vrste iz roda *Echinacea* na inhibiciju 5-lipoksigenaze kako bi se okarakteriziralo njihovo protuupalno djelovanje. Metodom HPLC detekcije određena je stopa inhibicije enzima 5-lipoksigenaze (5-LOX) puta arahadonske kiseline pomoću izravnog metaboličkog produkta (LTB₄) 5-LOX izvedenog iz stimuliranih bazofilnih stanica štakora. Ekstrakti korijena tri komercijalne vrste *Echinacea* (*Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* var. *angustifolia*, *Echinacea pallida* var. *pallida*) inhibirali su enzim 5-LOX. (21)

Psihoaktivni učinci, to jest anksiolitički učinci zamijećeni su, između ostalog, u paleti učinaka koje pokazuju biljne vrste roda *Echinacea*. Istraživanja ovih učinaka, na životinjama, provedena su s nižim dozama od onih koje se primjenjuju u tradicionalnim indikacijama. Zabilježeno je da alkamidi *Echinacee* imaju kanabinomimetska svojstva na kanabinoidne CB1 i CB2 receptore, što se može pripisati njihovoj strukturnoj sličnosti s endogenim ligandom kanabinoidnog receptora anandamidom čiji su učinci posredovani ovim receptorima u mozgu i periferiji. Aktivacija CB1 s endogenim ligandima igra značajnu ulogu u kontroli anksioznosti, dok je CB2 uglavnom uključen u aktivnosti imunološkog sustava. Vrlo male razlike u strukturama alkamida iskazuju značajne razlike u njihovoj aktivnosti na CB receptora, primjerice zamjena izobutilamidne jedinice izobutilamida dodeka-2E,4E,8Z,10Z/E-tetraenske kiseline za 2-metilbutilamidnu jedinicu pretvorila je svojstvo stimulacije G-proteina iz inverznog agonista u djelomični agonist. Biljna tinktura povećala je stimulacijski učinak L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) i pokazala antidepresivno djelovanje u testu depresije izazvane klofelinom kod bijelih štakora. Biljke bogate alkamidima izazivaju paresteziju zbog čega su tradicionalno korištene od strane američkih domorodaca. Kasnije su ih i liječnici primjenjivali kao sialog, antitusik i lijek za zubobolju. (3)

Slijedeći u širokoj paleti učinaka nalazi se antioksidativni učinak fitokemikalija biljnih vrsta roda *Echinacea* posebice cikorične kiseline. Raznim istraživanjima testirane su sposobnosti biljnih ekstrakata u hvatanju slobodnih radikala. Zaključeno je kako sposobnost biljnih

ekstrakata u hvatanju slobodnih radikala korelira s prisutnom količinom cikorične kiseline u ukupnom sadržaju, dok su alkamidi u ovom slučaju bili neaktivni. Iako su neka istraživanja generirala negativne rezultate antioksidativnog djelovanja biljnih ekstrakata, no druga, u kojima su ispitane djelotvornosti ekstrakata korijena biljke, dala su pozitivne rezultate što se može pripisati sadržaju fenola i cikorične kiseline u tom dijelu biljke. Cikorična kiselina pokazala je visoku djelotvornost hvatanja radikala prilikom testiranja sa spojem 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH) usporedivu sa djelotvornošću flavonoida i ružmarinske kiseline. DPPH je stabilni slobodni radikal, koji se sustavno koristi u istraživanjima antioksidativne aktivnosti. U radikalnom obliku duboko je ljubičaste boje koja prelazi u blijedo žutu prilikom susreta sa antioksidativnim spojem. Ta promjena boje može se mjeriti spektrofotometijom što omogućuje kvantifikaciju antioksidativnog kapaciteta istraživanog spoja. Premda alkamidi samostalno nisu pokazali antioksidativno djelovanje, mogu doprinijeti djelovanju cikorične kiseline pomoću dva mehanizma. Posjeduju površinsku aktivnost koja omogućuje cikoričnoj kiselini bolji pristup inhibiciji oksidacije lipida u lipofilnim kapljicama emulzije te pospješuju regeneraciju jednoelektronski oksidirane cikorične kiseline doniranjem alilnog vodika. (3) Osušeni svježe prešani sok cijele biljke *Echinacea purpurea*, davan miševima u dozi od 360 mg/kg svaki drugi dan tijekom 3 tjedna, značajno je povećao aktivnost superoksid dismutaze. (21)

Nadalje, korištenjem ekstrakta *E. purpurea* dokazani njezini antifungalni učinci. Zamijećena je značajna inhibicija rasta dvaju vrsta *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*, no nije zamijećena zona inhibicije primjenom ekstrakta na vrstu *Aspergillus niger*. Također jača antimikrobna svojstva zamijećena su korištenjem ekstrakta dobivenog klasičnom metodom nego onoga dobivenoga ultrazvučno-potpomognutom ekstrakcijom. Sličan pozitivan rezultat dobiven je korištenjem heksanskog ekstrakta korijena biljke, pronađena je prisutnost spojeva izobutilamidai i poliacetilena, u kombinaciji sa UV zračenjem (fototoksičnost) na *S.*

cerevisiae, *C. albicans*, *C. shehata*, *C. kefir*, *C. teatulytica* i *C. tropicalis* te u manjoj mjeri bez korištenja zračenja. Uz to dva alkilamida trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetra i trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentain također su iskazala inhibirajuće učinke prema *Aspergillus niger* i *Candida albicans*. Prilikom ispitivanja u drugoj studiji naglasak je stavljen na istraživanje antibakterijskih svojstava biljke tako su tri patogene bakterije *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* i *Legionella pneumophila* pokazale osjetljivost na preparat kojim su bile tretirane dok su *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (bakterija otporna na vankomicin), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* bile relativno otporne na preparat. *C. albicans* i *Trichoderma viride* također su bile tretirane istim preparatom te su pokazale otpornost na njega iz čega je moguće zaključiti kako vrsta pripravka odnosno način dobivanja te korišten dio biljke uvelike utječu na djelotvornost prema određenim patogenima. (3,21)

Uz dosada navedene aktivnosti *Echinacea purpurea*, odnosno njezin vodeni ekstrakt, pokazao je i antivirusne učinke. Bio je *in vitro* ispitan na oba soja herpesa onom osjetljivom na aciklovir te onom otpornom na aciklovir - *herpes simplex virus 1* (HSV-1) i *herpes simplex virus 2* (HSV-2). Heksanski ekstrakt korijena biljke i cikorična kiselina inhibirali su HSV-1. Nadalje, cikorična kiselina inhibirala je integrazu virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1). Fibroblasti mišjih embrija inkubirani biljnim sokom i alkoholnim ekstraktom korijena bili su otporni na infekciju virusom influence A2, herpesa i vezikularnog stomatitisa 24 sata. Standardni pripravak biljke pokazao je jaku inhibiciju protiv virusa influence i nove pandemije svinjske influence A (S-OIV) (H1N1) u izravnom kontaktu. Štoviše, rezultati testova hemaglutinacije (HA) pokazali su da pripravak inhibira aktivnost HA, odnosno inhibira aktivnost vezanja receptora virusa čime može blokirati ulazak virusa u tretirane stanice. Primjenom polisaharidnog ekstrakta biljke na miševima zaraženim virusom influence A H1N1 uzrokovala je neželjenu pojavu gubitka težine dok je plućni titar virusa bio vrlo sličan u usporedbi s netretiranim

miševima. No, u tretiranih miševa primijećene su niže sistemske i plućne razine kemoatrakta keratinocita (KC) i interleukina 10 (IL-10), te sistemske razine IFN γ , što ukazuje da *E. purpurea* može modulirati kliničke simptome gripe moduliranjem citokina. Na temelju rezultata dviju potonjih studija, čini se da različite komponente biljke imaju korisne učinke na oboljele od gripe putem različitih mehanizama. (3,21)

Orinda i sur. izvijestili su o virusostatičkom učinku prešanog soka *Echinacea purpurea*, pokazalo se kako sok štiti DEAE-Dextran mišje-L-929 stanice od citopatskog učinka virusa encefalomiokarditisa (EMC virus) i virusa vezikularnog stomatitisa (VSV). Ovi učinci kvantitativno su mjereni dvjema metodama: metodom smanjenja plaka u staničnoj kulturi i metodom boje po Finteru. Također, ekstrakt biljke frakcioniran je pomoću TLC te je ispitana virusostatička aktivnost frakcija koja je bila raspoređena na sve frakcije cijelog TLC-a. Zamijećeno je kako se antivirusni učinak ne može se inaktivirati dvosatnim tretmanom na 60 do 80°C. Nadalje, 30% etanolni ekstrakt biljke *Echinacea purpurea* inhibirao je intracelularno razmnožavanje ECHO9 HILL virusa u kulturi stanica bubrega majmuna. Ljudski H1N1 tip IV te visoko patogeni ptičji i svinjski tip virusa inaktivirani su u testovima stanične kulture etanolnim ekstraktom svježe ubrane biljke i korijena. Zamijećeno je kako uspješna inaktivacija odnosno inhibicija replikacije zahtijeva prethodni izravni kontakt ekstrakta i virusa prije infekcije. U studijama sekvencijalnih pasaža u kulturi stanica s virusom H5N1 tretiranih ekstraktom *Echinacea purpurea* nisu se pojavile varijante otporne na ekstrakt, za razliku od oseltamivira, koji je proizveo rezistentne viruse nakon pasaže. Učinkovitost ekstrakta protiv rinovirusa procijenjena je u trodimenzionalnom organotipskom modelu normalnog epitela dišnih putova čovjeka. Pojedinačni replicirani uzorci tkiva, održavani kao umetci u kulturi 3 dana ili 3 tjedna, bili su zaraženi rinovirusom tipa 1A (RV1A), izloženi samo *Echinacea* ekstraktu, kombinaciji obojega ili samo mediju. Nijedan od tretmana nije utjecao na histološki izgled ili cjelovitost tkiva, a svi su održali visoku razinu vitalnosti stanica i očuvanje cilija. Infekcija RV

rezultirala je povećanim inkluzijama mukopolisaharida u vrčastim stanicama, ali je ova značajka poništena tretmanom *Echinacea* ekstraktom. Taj je rezultat potvrđen mjerenjem lučenja mucina, koji je bio stimuliran RV-om, ali poništen *Echinacea* ekstraktom, što sugerira da se proizvodnja sluzi tijekom prehlade može poboljšati korištenjem *Echiance*. Nisu pronađeni dokazi o replikaciji virusa, iako su RV-inficirana tkiva lučila značajne količine proupalnih citokina IL-6 i IL-8 (CXCL8), a ovaj je odgovor također poništen tretmanom *Echinacea* ekstraktom. Wacker & Hilbig pokazali su uporabom mišjih fibroblasta da njihova inkubacija s metanolnim i vodenim ekstraktima korijena *Echinacea purpurea* najmanje 4 sata prije infekcije virusom rezultira otpornošću na infekciju virusom influence A2, herpesa i vezikularnog stomatitisa tijekom 24 sata. Beuscher et al. korištenjem frakcija visoke molekularne težine ($M_r > 10\ 000\ D$) koja sadrži polisaharide i glikoproteine iz korijena *Echinacea purpurea* pokazao je antivirusno djelovanje protiv virusa *Herpes simplex* (HSV) i virusa gripe. Utvrđeno je da ekstrakti 8 taksona roda *Echinacea* imaju antivirusno djelovanje protiv HSV tipa I in vitro kada su izloženi vidljivom i UV-A svjetlu. Ekstrakti korijena s n-heksanom koji sadrže alkene i amide bili su općenito aktivniji od ekstrakata etil acetata koji sadrže kavenu kiselinu. Najjači inhibitori HSV bili su *Echinacea pallida* var. *sanguinea* etanolni ekstrakt sirovog cvata, cikorična kiselina i n-heksan ekstrakt korijena *Echinacea purpurea*. (21)

U ovoj širokoj paleti djelovanja različitih dijelova biljke te pripadnih spojeva pronađeno je kako pročišćeni alkamidi iz *Echinacea purpurea* pokazuju komarcidno djelovanje protiv ličinki *Aedes aegypti*. Posebice oni alkamidi s izobutilamidom ostatkom u odnosu na one s ostatkom 2-metilbutilamida, što sugerira da izobutil igra uloga u svojstvu alkamida protiv komaraca. (3)

3.5. CITOTOKSIČNA AKTIVNOST

Uz sva prethodno navedena djelovanja pronađeno je kako tvari prisutne u vrstama roda *Echinacea* posjeduju i citotoksičnu aktivnost

odnosno posjeduju neku vrstu otrovnosti za stanice, točnije onemogućuju staničnu diobu. Ovakva aktivnost najčešće se spominje u kombinaciji sa stanicama raka kao način za njihovo uništavanje. Tako je zamijećeno kako primjena ekstrakta cvjetova biljke i cikorične kiseline inhibira stanične linije ljudskog raka debelog crijeva Caco-2 i HCT-116 na dozna neovisan način nakon 48 h. Cikorična kiselina smanjila je aktivnost telomerase u HCT-116 staničnoj liniji, što bi se moglo pretpostaviti kao molekularni mehanizam indukcije apoptoze. N-heksanski ekstrakt korijena dobiven iz tri vrste *Echinacea* također je pokazao potencijalno antikancerogeno djelovanje. (3)

3.6. SIGURNOST BILJNIH PRIPRAVAKA; INTERAKCIJE S LIJEKOVIMA

3.6.1. GENOTOKSIČNOST

Kako bi se osigurala sigurnost lijeka za organizam te njegov željeni učinak liječenja bez neželjenih nuspojava provodi se niz različitih testova. Jedan od takvih testova jest provjera mutagenosti, kako se nekada nazivalo tu pojavu, dok je novijim istraživanjima i terminologijom poželjnija riječ genotoksičnost. Nađeno je kako ekstrakt cvijeta *E. purpurea* nije pokazao mutagenost protiv *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 sa ili bez frakcije S9. Ovakav test mutagenosti salmonele poznat i kao Amesov test obično se koristi kao početni probir za procjenu mutagenog potencijala novih kemikalija kako bi mogle biti prihvaćene i registrirane od strane regulatornih agencija. Pomaže u identificiranju tvari koje mogu uzrokovati mutacije u DNA. Mnogi karcinogeni ostaju neaktivni sve do enzimske transformacije u elektrofilnu vrstu koja je sposobna kovalentno se vezati za DNA čime dovodi do mutacije. Upravo zato se metabolička aktivacija smatra kritičnim korakom u mutaciji u čemu najveću zaslugu posjeduje S9 frakcija koja potječe iz stanica jetre i sadrži enzime odgovorne za metaboliziranje kemikalija. S9 frakcija služi kao sustav metaboličke aktivacije, simulirajući kako ljudsko tijelo obrađuje kemikalije. Postoji S9 frakcija dobivena iz jetre štakora prethodno tretiranih s fenobarbitalom (PB)/5,6-benzo flavonom (BF) ili Aroclor 1254

koja je u puno široj upotrebi naspram ljudskih S9 frakcija. Štakorska S9 frakcija korisna je za induciranje aktivnosti enzima koji metabolizira lijek u testovima probira mutagenosti, budući da učinkovito bioaktiviraju promutagene u mutagene. Također njezino dobivanje puno je praktičnije i kontroliranije shodno tome i jeftinije od ljudske verzije. Upravo zbog toga štakorska verzija možda čak i bolje ispunjava dosljednost odgovora ispitivanih tvari u testovima koja je vrlo važna prilikom donošenja regulatornih odluka. Dva spomenuta soja *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 specifični su sojevi koji se korsite u Amesovom testu te TA98, otkriva mutacije pomaka okvira, dok TA100 otkriva mutacije supstitucije para baza. S druge strane ekstrakt cvijeta *E. purpurea* pokazao je dozno ovisnu inhibiciju mutagenosti 2-aminoanteracena, spoja koji nastaje nepotpunim izgaranjem organskih tvari te spada u klasu kancerogena odnosno mutagena, stoga bi mogao biti dobar antimutageni agens. Nadalje, primjenom visokih koncentracija biljke (8 mg/ml) došlo je do smanjenja pokretljivosti spermija te njegovog slabijeg prodiranja u jajne stanice hrčka što se pripisuje denaturaciji DNA sperme, dok ti učinci nisu primijećeni primjenom niskih koncentracija. (3,26)

3.6.2. TOKSIKOLOGIJA, NUSPOJAVE I KONTRAINDIKACIJE

Provedbom ispitivanja toksičnosti različitih pripravaka rodova vrste *Echinacea* na životinjama pokazana je niska općenita toksičnost na organizam. Prilikom studije akutne toksičnosti na ženjkama miša izračunato je da LD50 vrijednost iznosi 2500 mg/kg prilikom intraperitonealne injekcije polisaharidne biljne frakcije. Nadalje u drugim studijama vrijednosti LD50 oralne i intravenske primjene soka biljke procijenjene su na više od 30 g/kg i 10 g/kg u miševa, odnosno 15 g/kg i 5 g/kg u štakora. (3)

U nekoliko kliničkih studija, učestalost nuspojava u skupini koja je primala *Echinaceu* te u kontrolnoj skupini bila je slična i statistički ne značajna, dok su u nekim studijama prijavljeni osip i gastrointestinalni simptomi u skupini koja je primala *Echinaceu*. Neki štetni učinci također

su prijavljeni od strane britanskog Odbora za sigurnost lijekova i Regulatorne agencije za lijekove i zdravstvene proizvode koristeći shemu spontanog prijavljivanja (shema „žutog kartona“). Prijavljeni simptomi uključivali su bol u trbuhu, angioedem, dispneju, mučninu, svrbež, osip, eritem, i urtikariju. (3)

Kontraindikacije primjeni pripravaka *Echinacee* pokazale su brojne progresivne sistemske bolesti poput tuberkuloze, leukemije, te bolesti sličnih leukemiji, poremećaji kolagena, multipla skleroza i brojne druge autoimune bolesti. Neki proizvodi od *Echinacee* također su kontraindicirani kod AIDS-a i HIV infekcija. Ove tvrdnje temelje se na teoriji imunomodulatornog djelovanja *Echinacee*, iako postoji suprotna ideja da ti proizvodi nisu štetni kod pacijenata s autoimunim bolestima. Nema dostupnih kliničkih podataka koji podupiru navedena stajališta, ali se preporučuje izbjegavanje ovih pripravaka kod imunološki uvjetovanih bolesti, stoga pripravke *Echinacee* treba primjenjivati s oprezom ukoliko se koriste istovremeno s imunosupresivima. Učinci nekih pripravaka napravljenih od korijena i biljke *E. purpurea* zajedno s cikoričnom kiselinom testirani su na ljudski enzim citokrom P450 3A4 (CYP3A4) koji metabolizira lijekove. Rezultati su pokazali da pripravci umjereno inhibiraju enzim, dok je cikorična kiselina pokazala slabu inhibicijsku aktivnost. Nalazi istraživanja na zdravim dobrovoljcima nepušačima pokazali su da je lijek iz korijena biljke inhibirao citokrom P450 1A2 (CYP1A2) i intestinalni CYP3A4, ali ne i citokrom P450 2C9 (CYP2C9) ili citokrom P450 2D6 (CYP2D6), dok je inducirao jetrenu aktivnost CYP3A4. Selektivni učinci biljke na aktivnost CYP3A4 mogu se objasniti s nekoliko slijedećih mehanizama: sastojci biljke koji su odgovorni za inhibiciju CYP3A4 nisu sustavno dostupni; sastojci koji su odgovorni za indukciju CYP3A4 mogu se brzo apsorbirati, što dovodi do nedostatka crijevne indukcije CYP3A4; do indukcije CYP3A4 u jetri mogu doći metaboliti biljke ili indukcija CYP3A4 može uključivati tkivne aktivatore na koje utječu sastojci biljke. Osim toga, biljka je inhibirala metabolizam testosterona

pomoću CYP3A4 putem reakcije ovisne o nikotinamid adenin dinukleotid fosfatu (NADPH). (3)

3.7. INDIKACIJE; VRSTE PRIPRAVAKA

Jedan od glavnih problema korištenja biljnih pripravaka jest upravo nedosljednost u količini djelatnih tvari u samim biljkama te time kasnije i u pripravcima koji se od njih spravlja. Drugi problem vezan na prethodni jest problem standardizacije dobivenih pripravaka koji se šalju na tržište sa različitim sastavima i količinama djelatnih tvari upravo kao što je navedeno niže u Tablici 2. Omjeri prikazani u tablici u stupcu „djelatna tvar“ označavaju DER omjer odnosno na engleskom drug extract ratio koji predstavljaju količinu korištenog sirovog biljnog materijala kako bi se proizvela određena količina ekstrakta, na primjer DER 22-65:1 predstavlja da je korišteno od 22 do 65 dijelova biljke kako bi se proizveo jedan dio ekstrakta. (27,28) Kao što je vidljivo iz tablice ovisno o vrsti pripravka, odnosno njezinom načinu dobivanja postoje vrlo velike razlike u omjerima odnosno količini korištene biljke za spravljanje jednog dijela ekstrakta. No, razlike ne postoje samo između različitih vrsti ekstrakata već i kod istog načina ekstrakcije što dovodi do pitanja djelotvorne, a s druge strane ne štetne količine ekstrakta. Tako postoje različiti preparati od raznih otopina do tableta, pastila u kojima je zastupljenost djelatne tvari vrlo šaroliko izražena od miligramske količine po tableti, preko mililitraže ekstrakta po mililitraži otopine do (mili)gramske količine po gramu odnosno miligramu otopine ili drugog oblika preparata. Nadalje kod nekih pripravaka je navedeno kako ih mogu uzimati i najmanja djeca dok se u drugim državama vrlo slični preparati ne preporučaju toj dobnoj skupini. Primjena samih preparata je također vrlo šarolika najvećim djelom zastupljeni su razni preparati za oralnu upotrebu no postoje i masti za topikalnu primjenu. (21)

DRŽAVA	DJELATNA TVAR	INDIKACIJA	FARMACEUTSKI OBLIK	KOLIČINA DJELATNE TVARI na 100g	DOZIRANJE	TRAJANJE KORIŠTENJA
AUSTRIJA	sušeni cijedeni sok svježe biljke (22-65:1) (31.5-53.6:1)	potpomognuto liječenje i profilaksa rekurentnih infekcija dišnih putova	tableta	1 tableta sadrži 100 mg sušenog soka	1 tableta 3-4x dnevno 2-3x dnevno	ne duže od 8 tjedana bez prekida, ako se simptomi ne poboljšaju unutar 10 dana, potrebno je konzultirati liječnika
			pastila	1 pastila sadrži 88,5 mg sušenog soka	1 pastila 4x dnevno 2-3x dnevno 1-2x dnevno	
			otopina	2,34 g	3x dnevno 5 ml 2x dnevno 5ml 3x dnevno 2,5 ml	
			tableta	1 tableta sadrži 100 mg sušenog soka	1 tableta 4x dnevno	
	otopina		80 mg	3x dnevno 2,5 ml		
	otopina		80 mg	3x dnevno 2,5 ml		
	cijedeni sok svježe biljke (1.5-2.5:1) (1.7-2.5:1)					
BELGIJA	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.5-2.5:1) (1.7-2.5:1)	simptomatsko liječenje infekcija gornjih dišnih putova nakon isključenja postojanja teške bolesti	otopina	80 g	2,5 ml popraćeno sa 1,25 ml svakih 2 sata; kasnije 2,5 ml 3x dnevno (maksimalna doza 15 ml/dan) Samo po preporuci liječnika 1 kap/kg tjelesne mase po danu	

BUGARSKA	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31.5-53.6:1)	biljni lijek za bolesti uzrokovane prehladom; pomoć liječenju u slučaju ponavljajućih infekcija dišnog trakta	oralne kapi (otopina)	75,6 ml/100 ml otopine	55 kapi (=2,75ml) 3-4x dnevno 2-4 ml (13-27 kapi 3x dnevno / 10-20 kapi 4x dnevno) 6-8 ml (40-53 kapi 3x dnevno / 30-40 kapi 4x dnevno)	ne duže od 8 tjedana bez prekida
		tradicionalna uporaba kao lijek blagog djelovanja za promicanje zacjeljivanja rana	mast	16g	nanijeti traku masti duljine 1-2 cm 2-3 puta dnevno te je tanko i ravnomjerno rasporediti po koži i/ili oblogu za ranu	ne duže od tjedan dana bez prekida
		potpomognuto liječenje rekurentnih infekcija dišnih putova i urinarnog trakta	oralne kapi (otopina)	80g	2,5 ml 3x dnevno 1,25 ml 3x dnevno 2 ml 3x dnevno	ne duže od 2 tjedana bez prekida
	sušeni cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i>	potpomognuto liječenje rekurentnih infekcija dišnih putova	sirup	2,34g	5 ml 3x dnevno 2,5 ml 3x dnevno 5 ml 2x dnevno	ne duže od 2 tjedana bez prekida
HRVATSKA	sušeni cijeđeni sok	biljni lijek za kratkotrajnu prevenciju i	oralna otopina	-	4 ml 2x dnevno	-
			tablete	-	1 tableta 3-4x dnevno Pod procjenom i nadzorom liječnika	-

	<i>Echinacea purpurea</i> (omjer svježe biljke:suhi cijedeni sok = 30-60:1; omjer sok:suhi istisnuti sok = 18-25:1)	liječenje prehlade				
ČEŠKA REPUBLIKA	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i>	za kratkotrajnu prevenciju i liječenje obične prehlade	kapi – oralna primjena	2,5ml sadrži 2 ml biljnog soka	2,5 ml 3x dnevno	-
	sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (30-60:1) (31.5-53.6:1)		neobložene tablete	1 tableta 80 mg	1 tableta 3-4x dnevno	-
			sirup – oralna primjena	5 ml sadrži 117 mg	5 ml 3x dnevno	-
DANSKA	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (2-2.9:1)	ublažavanje manjih simptoma prehlade	oralne kapi (otopina)	-	2,5 ml 3x dnevno Djeca mlađa od 12 godina nebi trebala koristiti pripravak bez prethodnog savjetovanja s liječnikom	maksimalno 8 tjedana

	sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (33-50:1)		komprimirana pastila	1 komprimirana pastila sadrži 88,5 mg sušenog soka	1 komprimirana pastila 3x dnevno Djeca mlađa od 12 godina nebi trebala koristiti pripravak bez prethodnog savjetovanja s liječnikom	
	etanolni ekstrakt <i>Echinacea purpurea</i>		oralne kapi (otopina)	165 ml ekstrakta korespondira sa 500 mg suhe biljke	10-20 kapi (0,5-1 ml) 2x dnevno Djeca mlađa od 12 godina nebi trebala koristiti pripravak bez prethodnog savjetovanja s liječnikom	
	ekstrakt svježe biljke		oralne kapi (otopina)	1250 mg ekstrakta svježe biljke, odgovara 240 mg osušene biljke	10-20 kapi (1ml cca. 25 kapi) 2-5x dnevno Djeca mlađa od 12 godina nebi trebala koristiti pripravak bez prethodnog savjetovanja s liječnikom	
NJEMAČKA 2008. g	cijedeni sok Echinaceae purpurea	adjuvant kod (čestih) rekurentnih infekcija dišnog sustava i/ili infekcija mokraćnog sustava	85 biljnih lijekova koji sadrže <i>Echinacea purpurea</i> nalazi se na tržištu u različitim oblicima pogodnim za oralnu upotrebu	-	-	-

			- sirup, oralna tekućina (cijedeći sok), šumeća tableta, oralna guma, meka kapsula, tableta, filmom obložena tableta, obložena tableta			
		biljni medicinski proizvod koji se tradicionalno koristi kao pomoćno sredstvo blagog djelovanja u cijeljenju rana	mast	16g	-	-
NJEMAČKA 2013. g	sušeni cijedeći sok <i>Echinacea purpurea</i> (38-56:1) (25- 83:1)	kratkotrajna prevencija obične prehlade	obložena tableta	1 tableta sadrži 175 mg sušenog cijedećeg soka	1 tableta 2-3x dnevno	-
		adjuvant pomoćno sredstvo kod (čestih) rekurentnih infekcija dišnog sustava	pastila	1 pastila sadrži 60-120 mg sušenog cijedećeg soka, korespondira	1 pastila 1-3x dnevno 3-4 x dnevno	ne duže od 8 tjedana

		i infekcija mokraćnog sustava		sa 2 ml cijedenog soka		
	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (0.9-1.1:1)		tekućina	80g	1. dan: početna doza 25 kapi, zatim svaka 2 sata 15 kapi (max. 125 kapi dnevno), sljedeći dani: 4-5 puta dnevno 25 kapi 1. dan: početna doza 35-40 kapi, zatim svaka 2 sata 20-25 kapi (maksimalno 200 kapi dnevno), sljedećih dana: 4-5 puta dnevno 35-40 kapi 1. dan: početna doza 50 kapi, zatim svaka 2 sata 30 kapi (max. 250 kapi dnevno), sljedećih dana: 4-5 puta dnevno 50 kapi 1 ml=22 kapi (trajanje primjene)	10 dana (za djecu 4 dana)
	sušeni cijedeni sok cvjetajuće biljke <i>Echinacea purpurea</i> (22-65:1) (31.5-53.6:1)		tableta	1 tableta 100mg	1 tableta 2-3x dnevno 3-4x dnevno	10 dana
			tekućina	3,75g	2 ml (=2 g) 3-4x dnevno 3 ml (= 3 g) 3-4x dnevno	
			pastila	1 pastila sadrži 88,5 mg sušenog	1 pastila 2-3x dnevno 4x dnevno	ne duže od 2 tjedna

				cijedenog soka		
		kratkotrajna prevencija obične prehlade	sok	1,076g	5ml 2-3x dnevno 10 ml 2-3x dnevno 15 ml 2x dnevno (15 ml korespondira sa 3,8 ml cijedenog soka)	10 dana
		adjuvant pomoćno sredstvo kod (čestih) rekurentnih infekcija dišnog sustava	sok	0,828g	5ml 3x dnevno (korespondira sa 0,89 ml cijedenog soka) 7,5 ml 3x dnevno (korespondira sa 1,34 ml cijedenog soka) 10 ml 3x dnevno (korespondira sa 1,78 ml cijedenog soka) 15 ml 3x dnevno (korespondira sa 2,67 ml cijedenog soka)	ne duže od 2 tjedna
			tekućina	2,34 g	2,5 ml 3x dnevno 5 ml 2x dnevno 5 ml 3x dnevno (korespondira sa 2,5 ml cijedenog soka)	
	cijedeni sok cvjetajuće biljke <i>Echinacea purpurea</i>	kratkotrajna prevencija obične prehlade	tekućina	80 g	1,25 ml 3x dnevno 2 ml 3x dnevno 2,5 ml 3x dnevno (korespondira sa 2 ml cijedenog soka)	
			tekućina	100 ml	2 ml 2-3x dnevno	

	(1.7-2.5:1) (1:0.65-0.85)	adjuvant kod (čestih) rekurentnih infekcija dišnog sustava i infekcija mokraćnog sustava	tekućina	80 g	6 ml 1x dnevno ili 4 ml 2x dnevno 5 ml 2x dnevno 1,25 ml 3x dnevno 2 ml 3x dnevno 2,5 ml 3x dnevno (korespondira sa 2 ml cijedenog soka)		
		kožna upotreba kao pomoćno sredstvo blagog djelovanja u cijeljenju rana	mast	16 g	1-2 cm masti 2-3x dnevno		
		MAĐARSKA	cijedeni sok cvjetajuće biljke <i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)	kratkotrajna prevencija i liječenje prehlade	tekućina		80 g
sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31.5-53.6:1)	sirup				5 ml sirupa sadrži 124 g sušenog soka	5 ml 3x dnevno	
pastile	1 pastila sadrži 75,22 mg sušenog soka (odgovara 1,7 ml				<u>1 pastila 4x dnevno</u>		

				cijeđenog soka)		
	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)	tradicionalni biljni lijek za liječenje manjih površinskih rana	mast	1g masti sadrži 160 mg cijeđenog soka	Primijeniti tanak sloj na zahvaćeno područje 2-3x dnevno	
LATVIJA	sušeni cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31-60:1)	kratkotrajna prevencija i liječenje prehlade	tableta	1 tableta sadrži 80 mg sušenog soka	1 tableta 3-4x dnevno kontraindiciran za djecu mlađu od 1 godine ne preporučuje se djeci od 1 do 12 godina	ne duže od 10 dana, ponovna primjena moguća tek nakon 14 ili više dana pauze
	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i>		oralne kapi	1ml kapi sadrži 0,8 ml cijeđenog soka	2,5 ml otopine 3x dnevno kontraindiciran za djecu mlađu od 1 godine ne preporučuje se djeci od 1 do 12 godina	
LITVA	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.5-2.5:1)	biljni lijek za kratkotrajnu prevenciju i liječenje prehlade	oralne kapi	1ml kapi sadrži 0,8 ml cijeđenog soka	2,5 ml otopine 3x dnevno kontraindiciran za djecu mlađu od 1 godine ne preporučuje se djeci od 1 do 12 godina	
				1 ml otopine (20 kapi) sadrži 0,756 ml cijeđenog soka	55 kapi (2,75 ml) 3-4x dnevno kontraindiciran za djecu mlađu od 1 godine ne preporučuje se djeci od 1 do 12 godina	

NIZOZEMSKA	sušeni cijedeni sok nadzemnih dijelova <i>Echinacea purpurea</i> (20-28:1)	tradicionalni lijek za olakšavanje simptoma gripe (influenze)	šumeća tableta	1 šumeća tableta sadrži 176 mg sušenog soka	1-2 šumeće tablete dnevno, otopiti u čaši vode (200 ml), spremljenu otopinu odmah popiti	Ne koristiti ovaj proizvod duže od 10 dana. Ako simptomi potraju duže od 10 dana ili ako se pogoršavaju te u slučaju visoke temperature, potrebno je konzultirati liječnika.
POLJSKA	sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31.5-53.6:1) (22- 65:1)	adjuvantno kod rekurentnih infekcija dišnih puteva	sirup	1g sirupa sadrži 23,4 mg sušenog cijedenog soka	5 ml 3x dnevno 2,5ml 2x dnevno 5 ml 2x dnevno	ne duže od 14 dana
			pastila	1 pastila sadrži 88,5 mg sušenog cijedenog soka	1 pastila 2-3 x dnevno 4x dnevno	
		kratkotrajna prevencija prehlade, liječenje prvih simptoma prehlade	tableta	1 tableta sadrži 100 mg sušenog cijedenog soka	1 tableta 3-4x dnevno	ne duže od 10 dana
	cijedeni sok	kao dodatak kod	oralna tekućina	1g tekućine sadrži 800	2,5 ml 3x dnevno 1,25 ml 3x dnevno	ne duže od 14 dana

	<i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)	rekurentnih infekcija dišnih putova i silaznog urinarnog trakta		mg cijedenog soka	2ml 3x dnevno	
	etanolni ekstrakt <i>Echinacea purpurea</i> (30- 40:1), etanol 23-30% (V/V)	kratkotrajna prevencija prehlade, liječenje prvih simptoma prehlade	filmom obložena tableta	1 filmom obložena tableta sadrži 100 mg ekstrakta	1-2 tablete 3x dnevno	ne duže od 10 dana
		liječenje malih površinskih rana	mast	1 g masti sadrži 50 mg ekstrakta	Kožna primjena Nanijeti 2-3x dnevno	do 7 dana
SLOVENIJA	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.5-2.5:1)	kratkotrajna prevencija i liječenje prehlade	otopina	1 ml otopine sadrži 0,8 ml cijedenog soka	2,5 ml 3x dnevno Nakon konzultacija s liječnikom 1,5 ml 3x dnevno	-
	sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31-60:1) (30-60:1) (18-25:1)		tableta	1 tableta sadrži 80 mg sušenog soka	1 tableta 3-4x dnevno Nakon konzultacija s liječnikom 2x dnevno Nakon konzultacija s liječnikom 3x dnevno	-
			oralna otopina	1 ml otopine sadrži 46,5 ml sušenog soka	4 ml 2x dnevno Nakon konzultacija s liječnikom 2 ml 2x dnevno	-
			tableta	1 tableta sadrži 170	1 tableta 3-4x dnevno ne preporučuje se djeci mlađoj od 12 godina	-

				mg sušenog soka		
ŠPANJOLSKA	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)	liječenje obične prehlade	oralna otopina	-	U prvih 24h tretmana preporučena je inicijalna doza od 2,5 ml popraćena dozom od 1,5 ml svaka 2h do maksimalne doze od 15 ml/dan doza održavanja odgovara 7,5 ml dnevno (2,5 ml 3x dnevno)	7 do 15 dana
ŠVEDSKA	sušeni cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i>	za kratkotrajnu prevenciju i ublažavanje obične prehlade	šumeća tableta	1 šumeća tableta sadrži 176 mg sušenog soka	<u>1. dan 1 tableta svaki drugi sat, kasnije 1 tableta 2-3 puta dnevno</u>	-
			oralna otopina	1 ml otopine sadrži 800 mg sušenog soka	<u>2,5 ml 3x dnevno</u>	-
			oralne kapi	1 ml otopine sadrži 800 mg sušenog soka	<u>2,5 ml 3x dnevno</u>	-
			tableta topiva u ustima	1 tableta 88,5 mg sušenog soka	<u>1 tableta 4-5x dnevno</u>	-
	cijeđeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)	tradicionalni biljni lijek koji se koristi za ranice na usnama i druge male,	mast	1 g masti sadrži 160 mg cijeđenog soka	<u>Nanijeti 2-3x dnevno na zahvaćeno područje</u>	indikacije se temelje isključivo na iskustvu i uporabi tijekom

		površinske rane kao što su pukotine u kutu usta ili na vršcima prstiju.				duljeg vremenskog razdoblja
UJEDINJENO KRALJEVSTVO	sušeni cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (31.5-53.6:1)	tradicionalni biljni lijek koji se koristi za ublažavanje simptoma obične prehlade i infekcije tipa gripe samo na temelju tradicionalne upotrebe	oralna tekućina	5 ml otopine sadrži 0,117 g sušenog soka (ekvivalentno 3,7-6,3 g biljke)	<u>jedna čajna žlica (5 ml) 3x dnevno</u>	ne duže od 10 dana
	cijedeni sok <i>Echinacea purpurea</i> (1.7-2.5:1)		oralna otopina	2,5 ml (2,49 g) otopine sadrži 1,99 g soka (ekvivalentno 3,4 -5 g biljke)	<u>2,5 ml 3x dnevno</u>	
	sušeni cijedeni sok cvjetajuće biljke <i>Echinacea purpurea</i> (38-56:1) (20-28:1)		obložena tableta	1 tableta sadrži 175 mg sušenog soka	<u>1 tableta 3x dnevno</u>	
			meka kapsula	1 meka kapsula sadrži 176 mg sušenog soka (ekvivalentno 3520-4928 mg sviježe	<u>1 ili 2 meke kapsule dnevno</u>	

				cvjetajuće biljke)		
			šumeća tableta	1 šumeća tableta sadrži 176 mg sušenog soka (ekvivalentno 3520-4928 mg svježih cvjetajuće biljke)	<u>1 ili 2 šumeće tablete dnevno</u>	

Tablica 2. Indikacija pripravaka koji sadrže Echinaceu po državama svijeta; DOBNE SKUPINE: **djeca mlađa od 2 godine**; **djeca od 1 do 3 ili 4 godine**; **djeca od 1 do 6 godina**; **djeca od 4 do 10 ili 12 godina**; **djeca od 1 ili 2 do 12 godina**; **djeca od 4 do 5 ili 6 godina**; **djeca od 5 do 9 godina**; **djeca od 6 ili 7 do 11 ili 12 godina**; **djeca starija od 10 godina**; **djeca starija od 12 godina**; **djeca od 10 do 16 godina**; **djeca od 11 do 15 godina**; **djeca starija od 16 godina**; **adolescenti i odrasli ili stariji**; **odrasli**

3.8. PROBLEM TRANSLACIJSKE MEDICINE

Ljudski gastrointestinalni trakt domaćin je složenoj i heterogenoj mikrobnjoj zajednici koja ima ključnu ulogu u ljudskom zdravlju. Ta kompleksna crijevna mikrobiota kontrolira razvoj imunološkog sustava tako što određuje sustavni prag za aktivaciju imunološkog sustava. Pokazalo se da glikokonjugati, kao što su lipopolisaharidi, iz crijevnih bakterija mogu uz lokalne izazvati i sistemske proupalne te imunomodulatorne odgovore budući da su jedni od prvih bakterijskih komponenti s kojima se imunološki sustav susreće. Ovaj je fenomen posebno intrigantan s obzirom na zadaću imunološkog sustava za razlikovanje korisnih mikroba od patogenih, čak i ako komenzalne bakterije imaju molekularne uzorke slične onima patogenih dvojnika. Stoga je neupitna važnost kemijske strukture ovih makromolekula u finom podešavanju ove delikatne ravnoteže. Lipopolisaharidi (LPS) površinski glikolipidi proizvod su većine Gram-negativnih bakterija koje ga uz fosfolipide uvrštavaju u svoju vanjsku membranu. LPS se uglavnom sastoji od tri domene lipida A, oligosaharida jezgre i O antigena, ovakva struktura najčešće je prisutna no ovisno o bakteriji mogu postojati male razlike. Glavna funkcija lipopolisaharida u bakterijskom pogledu jest ona strukturna, djeluje kao barijera protiv toksičnih agenasa za bakterije poput antibiotika. (29,30) Humane i mišje stanice na kojima se provode neka od pretkliničkih ispitivanja vrlo su osjetljive na stimulaciju LPS-om. Relativno male količine LPS koji kontaminira uzorak biljnog ekstrakta mogu zbog toga dati potencijalno lažno sliku mehanizma djelovanja. Može li LPS prisutan u ekstraktu biljaka biti odgovoran za farmakološki učinak? Gotovo sigurno ne. LPS je normalno prisutan u mikrobiomu crijeva ljudi, miševa i štakora. Budući da je LPS opasna tvar koja, kad bi se direktno ubrizgala intravenski, može izazvati porast tjelesne temperature i sistemske, čak i po život opasnu imunološku reakciju, evolucijski je razvijen sustav koji sprječava njegov negativan učinak na organizam. Dio LPS-a neće se niti apsorbirati, a ukoliko i dođe do apsorpcije, portalnim krvotokom odlazi u jetru gdje stanice poput Kupferovih stanica vežu i

neutraliziraju LPS bez nastanka aktivacije imunološkog sustava. Imajući na umu da u biljnim ekstraktima postoje tek malene količine LPS-a u odnosu na sadržaj LPS-a u mikrobiomu crijeva, njegovo prisustvo u biljnom ekstraktu ne može objasniti farmakodinamiku *Echinacee*. Iznimna osjetljivost monocitno-makrofagnih linija na LPS, koje se koriste u pretkliničkim istraživanjima, zbog toga može dati lažnu sliku mehanizma djelovanja kao „imunostimulansa“. Doista, kada se iz ekstrakta ukloni LPS, tada on prestaje pokazivati znatniji stimulacijski učinak na makrofagno-monocitne stanične linije. Koji su pretpostavljeni mehanizmi djelovanja relevantni s aspekta translacijske medicine? Nasuprot uvriježenom mišljenju, *Echinacea* nije samo imunostimulans. Alkamidi se vežu za kanabinoidne receptore, a *in vitro*, *in vivo* i u kliničkim istraživanjima ekstrakti *Echinacee* mogu smanjiti pretjeranu upalu praćenu mjerenjem proupalnih citokina i kemokina. Nadalje, ekstrakti *Echinacee* mogu povećati fagocitozu, što se čini kao jedan od plauzibilnih mehanizama, barem na razini lokalne primjene na sluznici. Upravo to su realniji mehanizmi djelovanja od olake ideje imunostimulansa. (3)

4. ZAKLJUČAK

Iako poznati od davnina metodom „pokušaj-pogreška“ i osobnog iskustva pozitivni učinci biljnih vrsta roda *Echinacea* sve detaljnije se ispituju u laboratorijskom okruženju. Međutim provedbom istraživanja dolazi se do nimalo istovjetnih podataka već su oni velikom većinom kontradiktorni. Ove razlike primarno su posljedica nedosljednosti u provedbi samih istraživanja te sugeriraju da usprkos mnogim uspješno završenim eksperimentima na *E. purpurea*, mnoga pitanja ostaju neodgovorena poput toga kako sama biljka i njezini spojevi stimuliraju imunološki sustav, koji su zapravo blagotvorni učinci biljke u ublažavanju simptoma prehlade odnosno infekcija gornjeg respiratornog trakta, urinarnih infekcija, čak i kancerogenih tvorevina. Potežu se i konkretna pitanja poput "Kako biljka različito utječe na NF- κ B, TNF- α i IL-6 u različitim funkcionalnim stanicama?" ili „Kada su ovi učinci korisni u tijelu tijekom

liječnja?". Stoga bi bilo vrlo važno i korisno detaljnije razjasniti ove mehanizme djelovanja korištenjem novih komplementarnih metoda te poboljšati studije fitokemijske standardizacije aktivnih sastojaka iz razloga što nijedna biljka ne posjeduje jednake količine aktivnih tvari što dovodi do kvalitativne i kvantitativne promjene u pripravcima, a time i potencijalne vrijednosti *Echinacee* za jačanje imuniteta. Ova tvrdnja može se povezati sa tvrdnjom da *in vitro* potencijal aktivacije monocita/makrofaga značajno varira primjenom različitih pripravaka *Echinacee* i da je većina ove aktivnosti posljedica bakterijskih lipoproteina i LPS-a. Nadalje, aktivne komponente u ljekovitim biljkama oduvijek su predstavljale važan izvor kliničke terapije budući da nude kemijsku raznolikost koja se često povezuje s multifarmakološkim djelovanjem zbog čega mnogi od tih prirodnih proizvoda, poput *Echinacee*, imaju važnu biološku aktivnost koja se može iskoristiti u farmaceutskoj industriji za otkrivanje i dizajn novih lijekova. Iako postoje dokazi i o terapijskoj neučinkovitosti i učinkovitosti *Echinacee* na imunološki sustav, ovisno o pripremi i dizajnu studije uz njihovu nisku toksičnost i dugu povijest empirijske potpore, upotreba ovih biljaka kao imunostimulansa može imati terapijsku primjenu u okviru integrativne medicine. (1,3,4,20)

Literaturni izvori:

1. Catanzaro M, Corsini E, Rosini M, Racchi M, Lanni C. Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea. Vol. 23, *Molecules*. MDPI AG; 2018.
2. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010 Feb 18;57(8):929–54.
3. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. Vol. 9, *Pharmacognosy Reviews*. Medknow Publications; 2015. p. 63–72.
4. Block KI, Mead MN. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: A review. Vol. 2, *Integrative Cancer Therapies*. SAGE Publications Inc.; 2003. p. 247–67.
5. Plants of the World Online Database [Internet]. [cited 2024 Jul 15]. Available from: https://powo.science.kew.org/results?f=accepted_names&q=Echinacea
6. Woelkart Rudolf Bauer K, Rudolf Bauer U. The Role of Alkamides as an Active Principle of Echinacea. 2006; Available from: <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>
7. E. Johnstone S, M. Laster S. The Structure and Function of Alkamides in Mammalian Systems. In: *Natural Drugs from Plants*. IntechOpen; 2022.
8. pubchem - Caffeic-Acid [Internet]. [cited 2024 Mar 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-Acid>.
9. Sakai E, Farhana F, Yamaguchi Y, Tsukuba T. Potentials of natural antioxidants from plants as antiosteoporotic agents. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2022 Jan 1;72:1–28.
10. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. “lignin”. [Internet]. [cited 2024 Mar 1]. Available from: <https://www.britannica.com/science/lignin>
11. Schieber A, Lopes-Lutz D. Analytical Methods – Functional Foods and Dietary Supplements. In: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier; 2011. p. 487–99.

12. Mohammed ASA, Naveed M, Jost N. Polysaccharides; Classification, Chemical Properties, and Future Perspective Applications in Fields of Pharmacology and Biological Medicine (A Review of Current Applications and Upcoming Potentialities). *J Polym Environ*. 2021 Aug 27;29(8):2359–71.
13. Glycoprotein - The Definitive Guide | Biology Dictionary [Internet]. [cited 2024 Mar 1]. Available from: Glycoprotein - The Definitive Guide | Biology Dictionary
14. Comparative Aspects of Glycoprotein Structure [Internet]. [cited 2024 Mar 1]. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.45.070176.001245>
15. Preclinical Research - koraci [Internet]. [cited 2024 Mar 3]. Available from: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research>
16. Immunology [Internet]. [cited 2024 Mar 3]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/what-immunology>
17. Fenner F. History of Virology: Vertebrate Viruses. In: *Encyclopedia of Virology*. Elsevier; 2008. p. 455–9.
18. Appay V. Immunology and Aging. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier; 2014. p. 664–8.
19. Moini J, Badolato C, Ahangari R. Immunology. In: *Epidemiology of Endocrine Tumors*. Elsevier; 2020. p. 55–82.
20. Tamta H, Pugh ND, Balachandran P, Moraes R, Sumiyanto J, Pasco DS. Variability in in vitro macrophage activation by commercially diverse bulk Echinacea plant material is predominantly due to bacterial lipoproteins and lipopolysaccharides. *J Agric Food Chem*. 2008 Nov 26;56(22):10552–6.
21. Medicines Agency E. Assessment report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., herba recens [Internet]. Available from: www.ema.europa.eu/contact

22. Abul K. Abbas AHLSP. Osnove imunologije - funkcije i poremećaji imunološkog sustava. 5th ed. Ivana Marinović Terzić, editor. Split: Medicinski fakultet; 2017.
23. Ahmed TA. Pharmacokinetics of Drugs Following IV Bolus, IV Infusion, and Oral Administration. In: Basic Pharmacokinetic Concepts and Some Clinical Applications. InTech; 2015.
24. Carrageenan-Induced Paw Edema Model [Internet]. [cited 2024 Mar 11]. Available from: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/carrageenan-induced-paw-edema-model.htm>
25. Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A, Ghorbanzadeh B. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian J Pharmacol*. 2015 May 1;47(3):292–8.
26. Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, et al. Salmonella/human S9 mutagenicity test: A collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis*. 2005 May;20(3):217–28.
27. Drug Extract Ratio 2 [Internet]. [cited 2024 Aug 12]. Available from: Echinaceae purpureae herba - herbal medicinal product | European Medicines Agency (EMA) (europa.eu)
28. Drug Extract Ratio [Internet]. [cited 2024 Aug 12]. Available from: <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/german-english/der>
29. Candelli M, Franza L, Pignataro G, Ojetti V, Covino M, Piccioni A, et al. Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 10;22(12):6242.
30. Di Lorenzo F, De Castro C, Silipo A, Molinaro A. Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiol Rev*. 2019 May 1;43(3):257–72.

Izvori slika

Slika 1. osobno kreirano pomoću „Figure 1.” iz rada 1 (Catanzaro M, Corsini E, Rosini M, Racchi M, Lanni C. Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea. Vol. 23, *Molecules*. MDPI AG; 2018.) i

https://t4.ftcdn.net/jpg/04/32/54/95/360_F_432549543_00la7cd9q7abVoU1YFcp8kQ7NzogXXtm.jpg

<https://cdn.britannica.com/32/234732-050-0E5E77CA/DNA-strands-concept-illustration.jpg>

Slika 2. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. Vol. 9, Pharmacognosy Reviews. Medknow Publications; 2015. p. 63–72.

Izvori tablica

Tablica 1. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. Vol. 9, Pharmacognosy Reviews. Medknow Publications; 2015. p. 63–72

Tablica 2. Medicines Agency E. Assessment report on Echinacea purpurea (L.) Moench., herba recens [Internet]. Available from: www.ema.europa.eu/contact



Rea Perić

Datum rođenja: 14/02/2002 | **Državljanstvo:** hrvatsko | **Telefonski broj:** (+385) 0998779077 (Mobilni telefon) |

E-adresa: peric.rea@gmail.com | **Instagram:** <https://instagram.com/rea.5533?igshid=OGQ5ZDc2ODk2ZA==> |

Facebook: <https://www.facebook.com/rea.peric> | **WhatsApp Messenger:** Rea Perić |

Adresa: Travnik 5, 40000, ČAKOVEC, Hrvatska (Kućna)

RADNO ISKUSTVO

15/08/2022 – 30/09/2022 ČAKOVEC, Hrvatska

ZAMJENA CIJENA ARTIKALA IZ KUNA U EURE TEDI

15/10/2023 – 01/02/2024 Rijeka, Hrvatska

PRODAVAČICA (RAD NA BLAGAJNI, SLAGANJE ROBE NA POLICE, ZAMATANJE POKLONA) MÜLLER

01/07/2024 – 16/08/2024 VARAŽDIN, Hrvatska

ISPOMOĆ U KNJIGOVODSTVENOM SERVISU FISKAL D.O.O

- unošenje podataka u knjigovodstveni program
- slaganje papira koje klijenti donose

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

05/10/2020 – TRENUTAČNO Rijeka, Hrvatska

STUDENTICA Sveučilište u Rijeci - Odjel za Biotehnologiju

01/09/2016 – 17/06/2020 ČAKOVEC, Hrvatska

GIMNAZIJALKA Srednja škola Čakovec - opća gimnazija

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C1	C1	B2	B2	B2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Word Excel PowerPoint) | Internet | Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) | Rad na računaru | Osnovne vještine korištenja kemoinformatičkih programa | PyMol, Chimerra, Avogadro, MarvinSketch, GAMESS-MacMolPlot, VMD Visual Molecular Dynamics

SOCIJALNE VJEŠTINE

Timski rad | Prilagodljivost | Organiziranost | Prilagodljivost novonastalim situacijama | Lakoća rješavanja novih problema i izazova