



UNIVERSITÀ DI PISA

DIP. NEUROBIOLOGIA, PSICHIATRIA, FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

FACOLTÀ DI FARMACIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA MEDICA E FARMACOLOGIA**

**VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITA'  
ANTITUMORALE DI ESTRATTI LIPOFILI, LORO  
FRAZIONI E COMPOSTI PURI DERIVANTI DALLE TRE  
SPECIE MEDICINALI DI *ECHINACEA***

**TESI DI DOTTORATO DI**

**ANDREA CHICCA**

DOCENTI TUTORI:

CHIAR.MA PROF.SSA PAOLA NIERI

CHIAR.MA PROF.SSA MARIA CRISTINA BRESCHI

DIRETTORE DEL CORSO DI DOTTORATO

CHIAR.MO PROF. MARIO DEL TACCA

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	1
I. Composti di origine vegetale utilizzati nella terapia antitumorale .....	1
I.I Alcaloidi della <i>Vinca</i> .....	2
I.II Le podofillotossine .....	3
I.III Derivati del <i>Colchicum Autumnale</i> .....	4
I.IV Le camptotecine .....	4
I.V I taxani .....	5
II. Specie medicinali di <i>Echinacea</i> .....	7
II.I Storia dell'utilizzo a scopo medicamentoso delle specie di <i>Echinacea</i> .....	8
II.II Composizione chimica delle specie medicinali di <i>Echinacea</i> .....	8
II.III Attività farmacologiche e utilizzo fitoterapico delle specie di <i>Echinacea</i> ...	15
II.IIIa Proprietà immunomodulatoria .....	16
II.IIIb Azione anti-infiammatoria .....	21
II.IIIc Azione cicatrizzante .....	24
II.III d Azione antibatterica e fungicida .....	15
II.IIIe Azione antivirale .....	21
II.III f Azione antiossidante .....	26
II.III g Azione antitumorale .....	15
III. Utilizzo terapeutico delle preparazioni a base di <i>Echinacea</i> .....	30
V. Potenziali effetti indesiderati e controindicazioni associati all'utilizzo dei preparati a base di <i>Echinacea</i> .....	32
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	36
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	38
I. Composti naturali .....	38
II. Farmaci e composti commerciali .....	38
III. Estrazione ed isolamento dei composti puri .....	38
IV. Linee cellulari .....	38
V. Analisi della vitalità cellulare .....	40
VI. Valutazione dell'attività caspasi .....	41
VII. Analisi della frammentazione internucleosomica del DNA .....	43
VIII. Analisi computazionale dei singoli acetilenici derivanti da <i>E. pallida</i> .....	43
IX. Preparazione dei campioni di <i>E. pallida</i> per il saggio di diffusione	

attraverso il monostrato cellulare Caco-2 .....	44
X. Diffusione attraverso il monostrato cellulare di Caco-2.....	44
XI. Analisi del ciclo cellulare .....	46
XII. Misurazione del flusso intracellulare del Ca <sup>++</sup> .....	47
XIII. Analisi statistica dei dati.....	47
XI. Analisi del ciclo cellulare .....	46
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	48
I. Attività antiproliferativa degli estratti esanici delle tre specie medicinali di Echinacea .....	48
II. Analisi del meccanismo di morte cellulare associato all'effetto citotossico dell'estratto esanico di <i>E. pallida</i> .....	51
III. Valutazione dell'effetto citotossico di frazioni a polarità crescente derivanti dall'estratto lipofilo di <i>E. pallida</i> .....	54
IV. Attività citotossica dei composti poliacetilenici e polienici di <i>E. pallida</i> ....	55
V. Analisi dei parametri SASA ( <i>Solvent- Accessible Surface Area</i> ).....	57
VI. Valutazione della potenziale biodisponibilità orale degli acetileni presenti nell'estratto di <i>E. pallida</i> .....	60
VII. Indagine dell'effetto citotossico del composto $\gamma$ e dei potenziali meccanismi ad esso associati.....	63
VII.I. Valutazione del meccanismo di morte cellulare associato al trattamento con il composto $\gamma$ .....	63
VII.II. Effetto citotossico del composto $\gamma$ su diverse linee cellulari .....	64
VII.III Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare dopo trattamento con il composto $\gamma$ .....	65
VIII. Attività cannabinomimetica dell'estratto esanico di <i>E. pallida</i> sul recettore CB2.....	67
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	71

## INDICE DELLE FIGURE

Fig. 1 Fiore della <i>Vinca</i> .....	2
Fig. 2 Fiore del <i>Podophyllum peltatum</i> .....	3
Fig. 3 Fiori del <i>Colchicum Autumnale</i> .....	4
Fig. 4 Pianta di <i>Camptotheca acuminata</i> .....	5
Fig. 5 Albero di <i>Taxus brevifolia</i> .....	6
Fig. 6 Fiore delle specie medicinali di <i>Echinacea</i> .....	7
Fig. 7 Struttura della cinarina .....	9
Fig. 8 Struttura dell'echinacoside .....	10
Fig. 9 Struttura dell'acido cicorico .....	11
Fig. 10 Struttura dell'acido caftarico .....	11
Fig. 11 Struttura del gruppo amidico .....	13
Fig. 12 Struttura dell'isobutilamide dell'acido dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoico..	14
Fig. 13 Struttura dell'isobutilamide dell'acido dodeca-2E,4E,8Z,10E-tetraenoico..	14
Fig. 14 Struttura degli acetileni di <i>E. pallida</i> .....	39
Fig. 15 Linee cellulari .....	41
Fig. 16 Bioconversione del WST-1.....	41
Fig. 17 Saggio immunoenzimatico per la frammentazione nucleosimca del DNA..	43
Fig. 18 Modello sperimentale per il saggio di diffusione attraverso il monostrato di cellule Caco-2 .....	46
Fig. 19 Riduzione della vitalità cellulare di MIA PaCa-2 dopo trattamento con gli estratti di <i>Echinacea</i> .....	48
Fig. 20 Riduzione della vitalità cellulare di COLO320 dopo trattamento con gli estratti di <i>Echinacea</i> .....	48
Fig. 21 Valutazione del meccanismo di morte cellulare di MIA PaCa-2 dopo trattamento con l'estratto di <i>Echinacea pallida</i> .....	52
Fig. 22 Valutazione del meccanismo di morte cellulare di COLO320 dopo trattamento con l'estratto di <i>Echinacea pallida</i> .....	53
Fig. 23 Strutture tridimensionali acetileni derivanti da <i>Echinacea pallida</i> .....	58
Fig. 24 Cinetica della diffusione degli acetileni derivanti di <i>Echinacea pallida</i> attraverso il monostrato cellulare di Caco-2 .....	61

Fig. 25 Valutazione del meccanismo di morte cellulare di MIA PaCa-2 e COLO320 dopo trattamento con il composto $\gamma$ .....	64
Fig. 26 Flusso del $\text{Ca}^{++}$ intracellulare dopo stimolazione cellulare con estratto di <i>Echinacea pallida</i> .....	70

## INDICE DELLE TABELLE

Tab. I IC <sub>50</sub> degli estratti delle specie medicinali di <i>Echinacea</i> sulle linee cellulari MIA PaCa-2 e COLO320 .....	50
Tab. II Effetto antiproliferativo delle frazioni derivanti dall'estratti di <i>E. pallida</i> ...	55
Tab.III IC <sub>50</sub> degli acetileni isolati dell'estratto di <i>E. pallida</i> .....	56
Tab.IV Parametri SASA calcolati per gli acetileni isolati da <i>E. pallida</i> .....	59
Tab. V Permenabilità apparente (P <sub>app</sub> ) degli acetileni calcolata dal saggio di diffusione attraverso il monostrato cellulare di Caco-2 .....	62
Tab.VI IC <sub>50</sub> calcolato per il composto $\gamma$ su diverse linee cellulari tumorali.....	64
TabVIIAnalisi del ciclo cellulare dopo trattamento con il composto $\gamma$ .....	65

# INTRODUZIONE

## I. Composti di origine vegetale utilizzati nella terapia antitumorale

Le piante hanno una lunga storia nel trattamento antitumorale [Hartwell WB, 1982] svolgendo un ruolo significativo come sorgente diretta o indiretta di farmaci. Più del 60% dei farmaci antineoplastici infatti, hanno origine naturale, derivando da piante, organismi marini e microrganismi [Cragg GM and Newman DJ, 2005; Newman DJ *et al.*, 2003].

Il successo della ricerca di agenti antitumorali da organismi vegetali è iniziata a metà del XX secolo con la scoperta degli alcaloidi della *Vinca* e l'isolamento delle podofillotossine. In seguito a queste evidenze, il National Cancer Institute (NCI) ha avviato nei primi anni '60 un intenso programma di raccolta e screening di piante, focalizzando l'attenzione su quelle provenienti dalle zone temperate del pianeta. La realizzazione di questo programma ha permesso di individuare molti nuovi composti ad alto potenziale citotossico, fra cui le camptotecine e i taxani. Tale ricerca si è conclusa negli anni '90, portando diverse nuove molecole in fase clinica di studio e molte altre in fase pre-clinica avanzata [Cragg GM and Newman DJ, 2005]. Questo successo è legato all'incredibile biodiversità presente nel regno vegetale che ha dimostrato e continua a dimostrare di essere una preziosa fonte di nuovi farmaci in campo antitumorale ma non solo [Balandrin MF *et al.*, 1993; Farnsworth NR, 1990; Cragg GM and Newman DJ, 1999]. Di seguito è stata riportata una breve rassegna di alcune tra le principali piante medicinali da cui sono derivati importanti farmaci utilizzati nella terapia antitumorale, andando dal più antico *Colchicum autumnale* al *Podophyllum peltatum*, dalla *Camptotheca acuminata* e *Catharanthus roseus* al *Chelidonium majus* e al *Taxus baccata* e *brevifolia*.

## I.I Alcaloidi della *Vinca*

Gli alcaloidi della *Vinca* sono composti azotati di origine completamente naturale o semisintetica, estratti dalla specie *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*), un'erba della famiglia delle Apocinaceae, eretta, di 35-80 cm di altezza (Fig. 1)[Katzung BG, 2003].



**Fig. 1:** fiore della *Vinca*

La droga è costituita dall'intera pianta, da cui sono stati isolati una novantina di alcaloidi di cui solo alcuni si sono dimostrati efficaci come antineoplastici. Di questi, quelli più noti ed utilizzati, vinblastina, vincristina e vindesina, si trovano in percentuale assai bassa nella pianta (0,0002%) e trovano impiego nel trattamento di leucemie acute, leucemie mieloidi croniche, linfomi Hodgkin e non- Hodgkin e alcuni tumori solidi (per esempio tumore della mammella, del testicolo e del polmone). In particolare, la vinorelbina, un alcaloide semisintetico della *Vinca*, viene utilizzata per il trattamento del carcinoma mammario avanzato [Bruni A, 1999; Rowinsky EK and Donehower RC, 1995].

Il principale meccanismo con cui queste molecole esplicano l'azione citotossica è dato dalla interazione con la tubulina, determinando un'alterazione della funzione dei microtubuli, costituenti essenziali del citoscheletro, da cui dipende la formazione del fuso mitotico. Il risultato di questa azione è l'arresto mitotico in metafase, la disgregazione del fuso mitotico ed una alterazione dei processi di segregazione dei cromosomi [Jordan MA *et al.*, 1991]. Gli



alcaloidi della Vinca sono in grado di esplicare anche altre azioni a livello cellulare, in particolare l'inibizione della sintesi proteica e degli acidi nucleici, l'alterazione del metabolismo lipidico e dei lipidi di membrana, l'incremento dei livelli di cAMP [Beck WT, 1984].

## **I.II Podofillotossine**

Le podofillotossine, sono composti derivanti principalmente dal *Podophyllum peltatum* (*Podofillo* o *mandragola*), una pianta erbacea perenne della famiglia delle Berberidaceae (Fig. 2).



**Fig. 2:** fiore del *Podophyllum peltatum*

La podofillotossina è estratta dalla radice e, con i suoi derivati semisintetici etoposide e teniposide, rappresenta un farmaco attivo contro una varietà di linfomi (tra cui il linfoma di Hodgkin) e contro il cancro del testicolo, il cancro del polmone (in particolare a piccole cellule) e la leucemia acuta.

Il loro meccanismo d'azione consiste nel bloccare le cellule nell'ultima parte della fase S e in G<sub>2</sub> della mitosi, inibendo la topoisomerasi II e, quindi, bloccando la sintesi del DNA [Katzung BG, 2003].

### **I.III Derivati del *Colchicum autumnale***

Il *Colchicum autumnale* è una piccola pianta erbacea della famiglia delle Liliaceae molto comune in Italia, con fiori di colore lilla-rosa (Fig. 3)



**Fig. 3:** fiori di *Colchicum autumnale*

Di questa pianta vengono utilizzati il bulbo, i semi ed i fiori che contengono amido, zucchero, gomma, resina e due alcaloidi: colchicina e colchiceina; la prima è cristallizzabile, insolubile in acqua e viene impiegata in dosi molto piccole (0.5-1 mg) data la sua elevata tossicità. La colchiceina, invece, non trova applicazioni importanti [Bruni A,1999].

Tra i principi attivi contenuti nel *Colchicum autumnale* ci sono anche la demecolcina e il colchicoside.

Come per i derivati della *Vinca*, questi alcaloidi rappresentano “veleni del fuso mitotico” usati nella terapia di leucemie e linfomi.

### **I.IV Camptotecine**

La *Camptoteca acuminata* (Fig. 4) è un albero della famiglia delle Nyssaceae, originaria di Cina e Tibet.



**Fig. 4:** pianta di *Camptotheca acuminata*

La camptotecina è un alcaloide naturale estratto da tale pianta, la cui principale attività citotossica dipende dall'interazione con l'enzima topoisomerasi I, che è responsabile della riduzione della tensione torsionale nel DNA superavvolto.

Derivati di questa molecola come il topotecano e l'irinotecano (pro-farmaco) sono stati recentemente sperimentati con buoni risultati nel trattamento di neoplasie ovariche metastatizzate, comprese quelle resistenti al cisplatino, del carcinoma del colon e del retto, compresi quelli non responsivi al 5-Fluorouracile e del carcinoma del polmone e del pancreas [Katzung BG, 2003].

Le camptotecine si legano e stabilizzano il legame tra topoisomerasi I e DNA, consentendo il taglio dell'acido nucleico da parte della topoisomerasi, ma inibendo la successiva richiusura dell'elica e determinando l'accumulo di filamenti singoli di DNA e conseguente morte cellulare [Hsiang Y *et al.*, 1985].

### **I.V Taxani**

I componenti di questa classe sono alcaloidi di origine naturale come il paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), che viene estratto dalla corteccia del *Taxus brevifolia* (Fig. 5), o derivati semisintetici come docetaxel, largamente utilizzati nella terapia antitumorale. Il loro meccanismo d'azione si basa sulla capacità di interferire con la formazione dei microtubuli, agendo su target

molecolari differenti rispetto agli altri composti naturali come le podofillotossine, la colchicina e gli alcaloidi della *Vinca*. In particolare, il paclitaxel e suoi derivati si legano al microfilamento determinandone una stabilizzazione prolungata con conseguente alterazione della formazione del fuso mitotico [Jordan MA *et al.*, 1993].



**Fig. 5:** albero di *Taxus brevifolia*

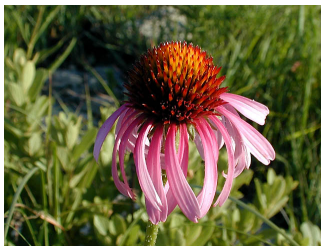
I taxani sono utilizzati nella terapia di neoplasie ovariche, della mammella, del polmone, della vescica e della prostata; è stato inoltre dimostrato che il docetaxel ha una più ampia attività radiosensibilizzante rispetto al paclitaxel [Katzung BG, 2003].

## II. Specie medicinali di *Echinacea*

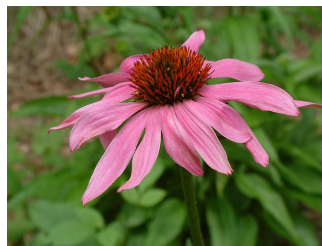
L'*Echinacea* è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Asteraceae (Compositae); nota anche come “purple coneflower”, rappresenta una delle piante medicinali più popolari [Bruni A, 1999; Barnes J *et al.*, 2005]. Formulazioni a base di *Echinacea* sono tra i preparati fitoterapici “best-selling” a livello mondiale [Barnes J *et al.*, 2005] e impiegati tradizionalmente per la loro capacità di stimolare il sistema immunitario, per l'attività antinfiammatoria e per quella antivirale [Duff Sloley B *et al.*, 2001].

Al genere appartengono dieci specie originarie del Nord America [Laasonen M *et al.*, 2002]: *E. purpurea* (Purple Coneflower); *E. pallida* (Pale–Purple Coneflower); *E. angustifolia* (Narrow-Leaved Coneflower); *E. atrorubens*; *E. tennesseensis*; *E. paradoxa*; *E. simulata*; *E. gloriosa*; *E. levigata*, anche se, in letteratura, si trovano spesso riportate nove specie di *Echinacea* [Bruni A, 1999], in quanto la specie *tennesseensis* è indicata come una varietà di *E. angustifolia* per la forte somiglianza morfologica [Binns SE *et al.*, 2002]

In ambito terapeutico vengono utilizzati soltanto gli estratti di 3 specie, l'*E. pallida*, *angustifolia* e *purpurea* (Fig. 6) [Percival SS, 2000].



*E. angustifolia*



*E. purpurea*



*E. pallida*

**Fig. 6:** Fiori delle specie medicinali di *Echinacea*

## **II.I Storia dell'utilizzo a scopo medicamentoso delle specie di *Echinacea***

L'*Echinacea* è stata usata a lungo dalle popolazioni native del Nord America come rimedio per curare morsi di serpenti, punture di insetti, ferite infette, foruncoli, eczemi, infiammazioni ghiandolari, infezioni del tratto respiratorio superiore, come sedativo di svariate patologie come mal di stomaco, ulcere buccali, mal di denti e mal di gola. Nei primi anni del XIX secolo, l'*Echinacea* divenne popolare anche in ambito medico per la cura di infezioni ed infiammazioni, in particolare negli Stati Uniti d'America. Il riconoscimento delle proprietà farmacologiche iniziò nella seconda metà del 1800, quando fu segnalata una miracolosa cura, denominata "Meyer's Blood Purifer", costituita da *E. angustifolia*. Agli inizi del XX secolo, l'*Echinacea* acquisì maggiore importanza in quanto fu ampiamente utilizzata da un movimento di medici noti come "Elettici" la cui pratica medicinale si basava principalmente sull'uso terapeutico di piante, al fine di trattare prevalentemente alcune infezioni batteriche croniche, la sifilide ed una varietà di disturbi a carico dei reni e del tratto urinario. Nel 1916 le radici di *E. angustifolia* e *pallida* vennero catalogate come droghe officinali e furono introdotte all'interno del Formulario Nazionale degli USA, dove permase fino al 1950. In seguito, con l'avvento della farmacologia di sintesi, negli Stati Uniti, l'*Echinacea* perse popolarità come medicinale, tuttavia, il suo impiego continuò in Germania dove la pianta fu per la prima volta analizzata e testata per scopi omeopatici [Blumenthal M, 1998]. Attualmente, l'utilizzo delle tre specie di *Echinacea* è ampio e diffuso; in Germania, più di 300 preparazioni farmaceutiche contengono le tre specie di *Echinacea*, spesso presenti in associazione tra loro o in associazione con altre sostanze, sotto forma di estratti, pomate o tinture.

## **II.II Composizione chimica delle specie medicinali di *Echinacea***

Per molto tempo solo la radice di *Echinacea* è stata impiegata come droga, mentre,

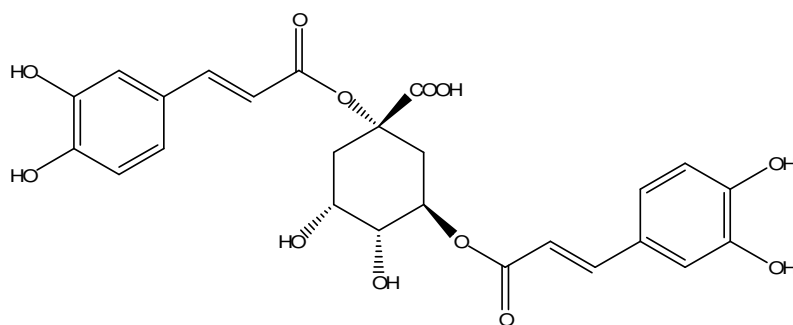
successivamente, sono state individuate molecole attive anche in altre parti della pianta, quali foglie, rizomi, fiori e semi.

Finora, le tre specie di *Echinacea* (*E. purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*) sono state utilizzate in terapia indistintamente, mentre, solo recentemente, alcuni studi hanno riconosciuto l'importanza di identificare e caratterizzare i costituenti biologicamente attivi nelle diverse specie [Melchart D *et al.*, 1998]. In particolare, lo studio della composizione chimica ha messo in evidenza notevoli differenze nella distribuzione dei principi attivi [Barnes J *et al.*, 2005].

Sono state individuate tre classi principali di composti chimici [Bone K, 1997]:

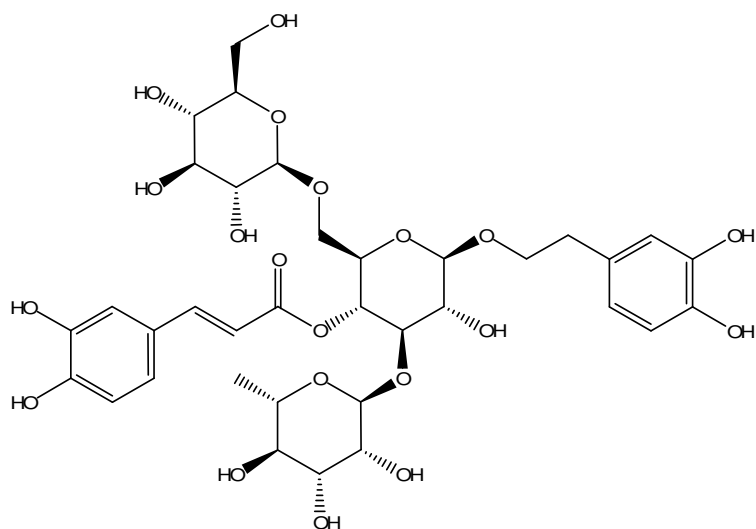
- Frazione polifenolica
- Frazione polisaccaridica
- Frazione lipofila

La frazione polifenolica è costituita da composti a media polarità, ben solubili in alcool, tra i quali prevalgono derivati caffeoilchinici, come la cinarina (Fig. 7) e i glicosidifenilpropanoidi.



**Fig. 7:** Struttura della cinarina (*acido 1,3-dicaffeoil-chinico*)

Tra i glicosidi fenilpropanoidi, l'echinacoside (Fig. 8), responsabile dell'attività antibatterica, è uno specifico marcatore, per cui definisce nella droga il titolo commerciale [Bruni A, 1999].



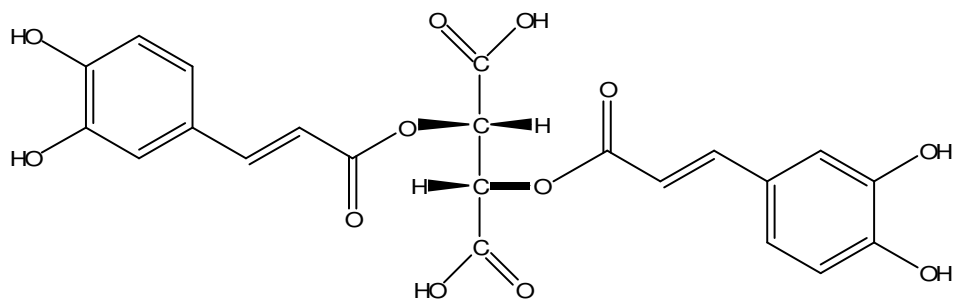
**Fig. 8:** Struttura dell'echinacoside

Originariamente, l'echinacoside è stato isolato dalle radici dell'*E. angustifolia* [Stoll A *et al.*, 1997], ma in seguito è stato trovato anche nelle foglie e nelle radici dell'*E. pallida* [Bauer R and Wagner H, 1996]. L'echinacoside costituisce la principale molecola di natura idrofila presente in *E. angustifolia* con livelli che variano tra lo 0.3%-1.3%; in *E. pallida* si riscontra con un contenuto in percentuale compreso tra lo 0.4 e l'1.7% [Perry NB *et al.*, 2001].

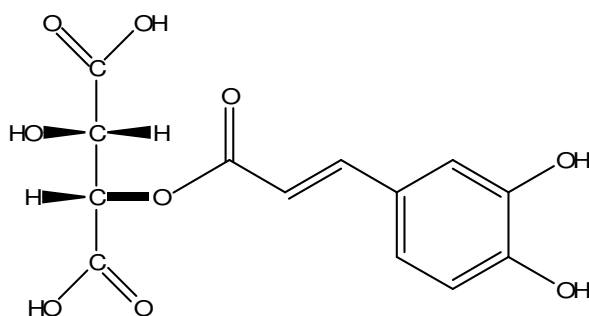
La cinarina è stata isolata esclusivamente nelle radici di *E. angustifolia*, per cui la presenza o assenza di tale sostanza consente di discriminare con certezza tra radici di *E. angustifolia* e radici di *E. pallida* [Bauer R and Wagner H, 1991].

I principali composti fenolici dell'*Echinacea purpurea* sono l'acido cicorico (Fig. 9) e l'acido caftarico o acido caffeoiltartarico (Fig. 10), presenti nelle radici e nella parte apicale della pianta.





**Fig. 9:** Struttura dell'acido cicorico (*acido 2,3-dicaffeoil-tartarico*)



**Fig. 10:** Struttura dell'acido caftarico (*acido 2-O-caffeoil-tartarico*)

I livelli di acido cicorico e di acido caftarico sono variabili a seconda del periodo di crescita [Perry NB *et al.*, 2001].

Il rapporto tra il livello di questi due composti differisce notevolmente tra radici e parti aeree e potrebbe quindi aiutare nella distinzione degli estratti di radice di *E. purpurea* dagli estratti della parte superiore della stessa pianta, sebbene la composizione in alchilamidi sia un metodo più discriminante per distinguere le parti della pianta [Perry NB *et al.*, 1997].

L'acido cicorico possiede proprietà che potrebbero contribuire all'azione immunostimolante, a differenza dell'echinacoside che sembra non avere rilevanza sul sistema immunitario [Bauer R, 1999].

La frazione polisaccaridica è la parte polare dei principi attivi; essa è costituita da polisaccaridi ad elevato peso molecolare (eteroxilani, arabinogalattani, fruttani, xiloglucani),

responsabili dell'attività immunostimolante dell'*Echinacea*.

Sono stati isolati dalle parti aeree di *E. purpurea* due polisaccaridi con proprietà immunostimolanti, definiti PSI e PSII. Il composto PSI è un 4-O-metilglucoronarabinoxilano, costituito principalmente dall'acido 4-O-metilglucuronico e dagli zuccheri arabinosio, xilosio e glucosio. Il composto PSII è un arabinoramnogalattano, formato essenzialmente dagli zuccheri arabinosio, ramnosio e galattosio, oltre che da acido glucuronico.

Un polimero costituito da xiloglucano, xilosio e glucosio è stato isolato dalle foglie e dallo stelo di *E. purpurea* [Stuppner H *et al.*, 1991]. Sono state isolate, inoltre, alcune glicoproteine, composte da polisaccaridi legati a proteine [Bauer R and Wagner H, 1991].

Un'altra molecola polisaccaridica importante per la sua azione farmacologica è l'echinacina B, riscontrata solo nell'*Echinacea purpurea*.

In generale, i polisaccaridi rappresentano i metaboliti primari di una pianta, in quanto sono essenziali per i processi vitali; essi, infatti, formano importanti elementi strutturali come la parete cellulare e rappresentano una riserva di carboidrati. Tuttavia, i livelli di polisaccaridi ritrovati nelle preparazioni di *Echinacea* non sono così elevati se confrontati con i funghi o con altri accumulatori di polisaccaridi, come le specie di *Althaea officinalis* e *Aloe*. Si ritiene possibile, quindi, che i polisaccaridi dell'*Echinacea* possiedano una qualche potente azione farmacologica sul sistema immunitario [Bauer R and Wagner H, 1991; Speroni E *et al.*, 2002; Gonda R *et al.*, 1993; Shimizi N *et al.*, 1989].

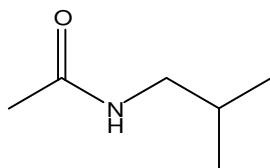
La porzione lipofila delle specie di *Echinacea* contiene, oltre ai componenti tipici degli oli essenziali [Bruni A, 1999], numerosi acetileni e alchilamidi [Bone K, 1997].

La presenza degli acetileni (poliacetileni e polieni) è tipica della famiglia delle Asteraceae e i livelli più alti di questi composti sono registrati nelle radici; in particolare, per il genere

*Echinacea*, la specie *pallida* è quella che mostra il maggior contenuto in alcuni poliacetileni, quali chetoalcheni e chetoalchini, assenti nelle altre due specie di interesse commerciale [Pellati F *et al.*, 2007]. Queste sostanze impartiscono alla radice di *E. pallida* un particolare sapore di terra, che ne rende facile l'identificazione organolettica.

Le alchilamidi non sono costituenti comuni delle piante; la maggior parte di queste molecole, in particolare le isobutilamidi, sono state isolate dalle parti aeree e dalle radici di *E. angustifolia* e *purpurea*.

Le alchilamidi sono formate da acidi carbossilici altamente insaturi, legati ad amine, più comunemente isobutilamine o 2-metilbutilamine (Fig. 11).



**Fig. 11:** Struttura del gruppo amidico

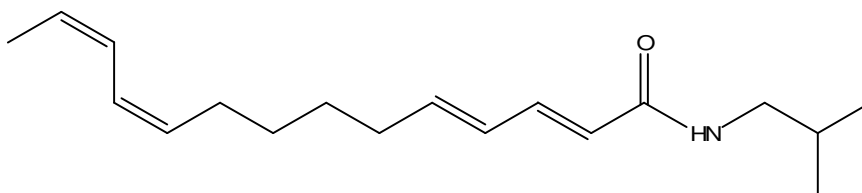
È possibile che il legame amidico possa subire una rottura dando origine ad acidi carbossilici ed amine. È stato osservato che la molecola attiva di questi composti è proprio l'acido carbossilico.

Un altro fattore di instabilità per i poliacetileni e le alchilamidi è rappresentato dall'ossidazione, a causa dell'alto grado di insaturazione. È preferibile, quindi, conservare la droga di *Echinacea* per un limitato lasso di tempo [Bauer R and Wagner H, 1991].

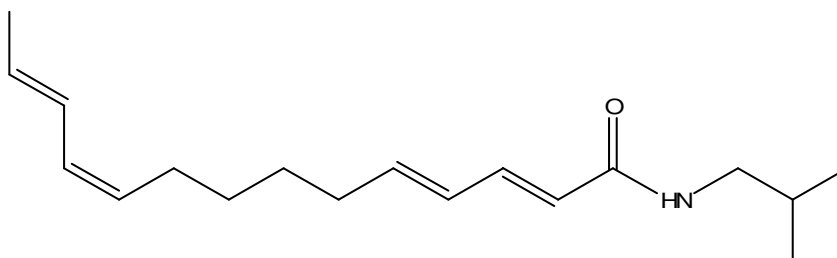
I caratteristici profili fitochimici della porzione lipofila delle tre specie commerciali di *Echinacea* sono stati determinati e quantificati sottoponendo i relativi estratti alcolici alla tecnica di HPLC a fase inversa, consentendo una buona caratterizzazione tassonomica. Si è evidenziato, infatti, che la maggior parte delle alchilamidi presenti in *E. purpurea* sono

composti del tipo 2,4-dieni; le radici di *E. angustifolia* sono caratterizzate dalla presenza di alchilamidi monoeni e tetraeni e in *E. pallida* i composti principali sono poliieni e poliini, mentre sono praticamente assenti i derivati alchilamidici [Barnes J *et al.*, 2005; Pellati F *et al.*, 2007].

Le alchilamidi principalmente rappresentate sono derivati isobutilamidici dell'acido dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoico (Fig. 12) e del corrispettivo isomero 10E (Fig. 13).



**Fig. 12:** Struttura dell'isobutilamide dell'acido dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoico



**Fig. 13:** Struttura dell'isobutilamide dell'acido dodeca-2E,4E,8Z,10E-tetraenoico

Negli ultimi anni, la ricerca scientifica sull'*Echinacea* si è concentrata particolarmente sulla frazione lipofila, in particolare per la presenza dei derivati alchilamidici che hanno dimostrato di agire da agonisti sui recettori per i cannabinoidi di tipo 2 (CB2) con una potenza maggiore rispetto agli endocannabinoidi come l'anandamide e il 2-arachidonoilglicerolo [Raduner S *et al.*, 2006]. Studi farmacocinetici hanno evidenziato una buona biodisponibilità orale sia in modelli *in vitro* che *in vivo* per questa classe di composti [Matthias A *et al.*, 2004; Matthias A. *et al.*, 2005]. Questi dati hanno messo in evidenza il ruolo di questa classe di composti nell'effetto immunomodulatorio dei preparati fitoterapici a base di *Echinacea*, oltre ai derivati polisaccaridici e ai composti polifenolici [Raduner S *et al.*, 2006].

In conclusione, la varietà di distribuzione dei principi attivi risulta un elemento distintivo e caratterizzante nella tre specie di *Echinacea*, sottolineando ancora di più la necessità di identificarle in maniera precisa. Il riconoscimento morfologico è sicuramente quello più utilizzato, ma presenta alcune difficoltà dovute alla elevata somiglianza delle specie. Negli ultimi anni sono state proposte altre tecniche, più specifiche e precise, che permettono di identificare le specie di *Echinacea*, tra cui tecniche genetiche. In particolare, nel nostro laboratorio, è stata messa appunto una metodologia che ha permesso di identificare dei markers specie specifici per le tre specie, basandosi su tecniche di amplificazione genetica (RAPD-PCR e SCAR-PCR) [Nieri P *et al.*, 2003; Adinolfi B *et al.*, 2007]. Queste metodologie possono svolgere anche un ruolo di primaria importanza nel riconoscere la presenza di agenti adulteranti nelle preparazioni fitoterapiche, come il *Parthenium integrifolium* nel caso di preparazioni di *Echinacea* [Bauer R and Wagner H, 1987; Bradley PR, 1992; Percival SS, 2000].

### **II.III Attività farmacologiche e utilizzo fitoterapico delle specie di *Echinacea***

L'*E. angustifolia*, *pallida* e *purpurea* sono le uniche specie impiegate in terapia. Per ciascuna di esse si presumono specifiche proprietà medicinali, tuttavia, la notevole somiglianza morfologica ne ha reso difficile l'identificazione e per questo motivo, fino ad oggi, sono state usate indifferentemente per gli stessi scopi terapeutici. La composizione in principi attivi di ciascuna specie è simile, ma con importanti variazioni nella composizione quali- e quantitativa, conseguenti anche alla localizzazione geografica, allo stadio di sviluppo della pianta, al periodo di raccolta e alle condizioni di crescita. Si registra, inoltre, una differenza nel contenuto in principi attivi tra le diverse parti della pianta, ad esempio tra la parte aerea e le radici. Queste ultime, infatti, contengono una quantità maggiore di composti lipofili (in particolare composti acetilenici) oli volatili e alcaloidi pirrolizidinici, come la tussilagine e la isotussilagine, rispetto alla parte superiore della pianta, più ricca di derivati dell'acido caffeico

e polisaccaridi complessi [Barnes J *et al.*, 2005].

Sebbene siano stati identificati molti composti attivi dell'*Echinacea*, il loro meccanismo d'azione, la loro biodisponibilità, la loro potenza e il loro sinergismo non sono ancora completamente noti, anche se negli ultimi anni si è avuta una delucidazione maggiore del meccanismo molecolare e del target cellulare di alcuni principi attivi presenti negli estratti di *Echinacea*, in particolare dei derivati alchilamidici [Gertsch J *et al.*, 2004; Raduner S *et al.*, 2006; Gertsch J, 2008].

È necessario, quindi, identificare chiaramente le tre specie di *Echinacea* per garantirne un migliore e corretto uso terapeutico.

Le attività farmacologiche e gli usi in ambito fitoterapico delle tre specie medicinali di *Echinacea* sono i seguenti:

### **II.III.a Proprietà immunomodulatoria**

Per molti anni è stata ascrivita alla preparazione a base di *Echinacea* una chiara azione immunostimolante basata prevalentemente su dati ottenuti *in vitro* che riportavano una incrementata attività fagocitaria dei macrofagi [Goel V *et al.*, 2002], natural killer [Gan XH *et al.*, 2003] e dei linfociti, oltre che alla produzione di citochine ed interleuchine pro-infiammatorie da parte di monociti e macrofagi [Rininger JA *et al.*, 2000; Hwang SA *et al.*, 2004]. Molte di queste osservazioni sono state ottenute con preparazioni in cui la potenziale contaminazione dall' endotossina lipopolisaccaridica (LPS) non è stata determinata preventivamente e quindi potrebbe aver contribuito alla fluttuazione dei dati mostrati nei vari studi [Hwang SA *et al.*, 2004].

Inoltre, risultati ottenuti *in vivo* su ratti e in prove cliniche sono altamente variabili [Schoneberger D, 1992; Melchart D *et al.*, 1998] e spesso in contrapposizione tra loro. Uno dei motivi di questa discrepanza potrebbe essere dovuto alla mancata standardizzazione in

termini di principi attivi negli estratti di *Echinacea*, dal tipo materiale vegetale di partenza, dal protocollo di estrazione, ed altri fattori che spesso non hanno permesso di poter confrontare i risultati ottenuti nei differenti trials clinici [Gertsch J *et al.*, 2004].

In una serie di studi condotti su topi, è stata dimostrata l'attività immunostimolante utilizzando polisaccaridi purificati da colture cellulari di *Echinacea*; cellule immunitarie in coltura o l'animale *in vivo* sono stati esposti a tali composti, tramite iniezione intraperitoneale: ciò ha permesso di evidenziare una spiccata azione stimolante dovuta ad un aumento della fagocitosi e della chemiotassi dei macrofagi [Luettig B *et al.*, 1989; Stimpel M *et al.*, 1984] e dell'azione ossidante dei neutrofili [Wagner H *et al.*, 1984; Graisbauer M *et al.*, 1990].

L'attività immunostimolante dell'*Echinacea*, e in particolare della sua frazione polisaccaridica, è stata confermata *in vivo* in uno studio condotto in ratti immunodeficienti; in particolare, dopo somministrazione di ciclofosfamide (CP) o ciclosporina (CsA), si è osservato un aumento dell'attivazione dei macrofagi peritoneali isolati dagli animali. I macrofagi trattati con i polisaccaridi aumentano la produzione di TNF-alfa e, dopo trattamento con CP, si assiste ad una diminuzione dei leucociti nel sangue periferico, mentre i polisaccaridi determinano un precoce aumento della presenza dei granulociti neutrofili (rispetto ai controlli) [Steinmuller C *et al.*, 1993]. Un recente lavoro pubblicato su *eCAM* evidenzia l'effetto immunostimolante dei polisaccaridi, in particolare degli arabinogalattani che, in seguito alla stimolazione diretta di monociti e macrofagi, determina l'aumento di produzione dei natural killer [Miller SC, 2005]. Tutto questo anche se l'assorbimento di queste molecole dopo assunzione per via orale rimane tuttora incerta [Gertsch J, 2008].

Infine, dopo somministrazione *in vivo* di un estratto etanologico di *Echinacea*, si sono registrati risultati analoghi a quelli sopra citati per l'aumento dell'attività fagocitaria, metabolica e battericida da parte dei macrofagi peritoneali [Bukovsky M *et al.*, 1993], con maggiore produzione di TNF-alfa e delle interleuchine IL-1, IL-6 ed IL-10 [Burger RA *et al.*, 1979],

oltre ad una dimostrata capacità di eliminare cellule tumorali (cellule WEHI 164) e cellule infettate dal parassita *Leishmania enriettii* o da *Candida albicans* [Binns SE *et al.*, 2002a; Roesler J *et al.*, 1991].

In uno studio *in vivo* condotto da South e coll. [South EH and Exon JH, 2001], invece, oltre a non essere osservati evidenti effetti immunostimolanti da parte di prodotti medicinali a base di *Echinacea*, si è registrato un effetto immunosoppressivo in alcune condizioni, con una diminuzione del numero di anticorpi nelle femmine di ratto se trattate con la preparazione commerciale di *Echinacea* alla dose di 250 mg/kg per due settimane.

Un recente studio *in vivo* è stato condotto per testare, in relazione alla dose, gli effetti immunomodulatori di un estratto di *Echinacea* contenente acido cicorico, polisaccaridi e alchilamidi a varia concentrazione. I dati ottenuti suggeriscono che preparazioni a base di *Echinacea* contenenti concentrazioni ottimali di acido cicorico, polisaccaridi e alchilamidi sono potenzialmente efficaci nello stimolare *in vivo* la risposta immunitaria non specifica in ratti normali [Goel V *et al.*, 2002].

Data la presenza di diversi principi attivi contenuti nelle specie di *Echinacea*, al fine di caratterizzare le molecole responsabili dell'attività immunostimolante, gli estratti alcolici di *E. purpurea*, *pallida* ed *angustifolia* sono stati studiati in topo nel test *in vivo* di clearance del carbonio; secondo gli autori di tale studio, il principio attivo responsabile dell'attività immunostimolante sembra risiedere nella frazione lipofila piuttosto che nella frazione polare [Miller SC, 2005; Bauer R *et al.*, 1998], mentre secondo altri, i polisaccaridi ad alto peso molecolare, come gli arabinogalattani [Luettig B *et al.*, 1989], che stimolano la popolazione macrofagica a produrre TNF-alfa, IL-1 ed Interferone-beta2, favoriscono la mobilità spontanea dei granulociti polimorfo-nucleati.

Negli ultimi anni, studi più approfonditi hanno dimostrato che la porzione lipofila degli



estratti di *Echinacea*, in particolare le alchilamidi, è coinvolta con meccanismi molecolari specifici, nel processo di immunomodulazione attribuito all'*Echinacea* stessa. Gerstch e colleghi hanno dimostrato che le isobutilamidi, presenti in elevata quantità nelle radici e parti aeree delle specie *E. purpurea* e *E. angustifolia* e in prodotti commerciali standardizzati, come l'Echinaforce<sup>®</sup>, sono in grado di agire da agonisti recettoriali sui recettori CB2 (recettori per i cannabinoidi di tipo 2), con una potenza e selettività maggiori degli endocannabinoidi anandamide e 2-arachidonoilglicerolo [Gertsch J *et al.*, 2004; Raduner S *et al.*, 2006]. Tale interazione recettoriale avviene a concentrazioni nell'ordine nanomolare e quindi in concentrazioni raggiunte *in vivo* nell'uomo dopo somministrazione orale [Matthias A *et al.*, 2005]. L'attivazione dei recettori CB2 sui monociti determina l'attivazione di c-Jun-N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor kB (NF-kB), che determina una sovraespressione dell'mRNA per il TNF-alfa. L'espressione proteica di TNF-alfa indotta da LPS su macrofagi/monociti isolati viene invece inibita da parte delle alchilamidi, evidenziando una diversa sfumatura di attività [Gertsch J *et al.*, 2004]. La localizzazione dei recettori CB2 prevalentemente sulle cellule del sistema immunitario mette in forte correlazione il ruolo dei preparati a base di *Echinacea* con la loro attività immunomodulatoria; proprio in seguito a queste interazioni molecolari gli endocannabinoidi possono svolgere un ruolo sia di stimolazione che di inibizione sul sistema immunitario in seguito alla modulazione del pattern di espressione delle citochine [Klein TW *et al.*, 2003; Croxford JL and Yamamura T, 2005] ed anche in base alla concentrazione del ligando, sottolineando comunque che tale modulazione necessita ancora di essere investigata più approfonditamente [Croxford JL and Yamamura T, 2005].

Inoltre, sono già stati condotti anche studi clinici che hanno fornito importanti informazioni sull'efficacia, sul dosaggio e sulla biodisponibilità dei preparati sull'uomo [Matthias A *et al.*, 2005]. Gli studi clinici sono stati eseguiti sia su leucociti umani isolati e poi trattati con

estratti di *Echinacea* (metodo *ex vivo*), sia somministrando direttamente al soggetto l'estratto di *Echinacea* ed isolando successivamente i leucociti per misurarne una specifica funzione. È stato evidenziato, in tal modo, un incremento dell'azione chemiotattica dei neutrofili e della loro attività battericida contro *Staphylococcus*, oltre che un aumento della produzione del TNF, delle IL-6 e IL-1. La somministrazione endovenosa dell'estratto di *Echinacea* ha permesso, inoltre, di osservare una diminuzione del numero dei neutrofili nel sangue periferico, effetto che gli autori hanno interpretato come un aumento dell'adesione delle cellule all'endotelio. Questa caduta è seguita da una leucocitosi dovuta ad un aumento del numero dei neutrofili e, in misura minore, dei monociti. La presenza di cellule staminali ed alcune forme giovanili della serie mielocitica indica una migrazione di cellule dal midollo osseo verso il sangue periferico. Si riscontra anche un aumento della proteina C reattiva e ciò è probabilmente dovuto ad una stimolazione dei monociti e dei macrofagi a produrre IL-6 [Roesler J *et al.*, 1991].

La stimolazione immunitaria osservata *in vitro* e dopo somministrazione parenterale non è stata tuttavia confermata dopo assunzione orale nell'uomo sano, come risulta da uno studio clinico condotto in doppio cieco [Schwarz E *et al.*, 2002]. Uno studio più recente che ha utilizzato preparati commerciali a base di *E. purpurea* e *E. angustifolia* ha invece dimostrato che i composti lipofili, in particolare le alchilamidi, sono assorbite molto rapidamente (misurabili nel sangue già dopo 20 minuti) e i livelli plasmatici sono misurabili fino a 12 ore dopo l'ingestione, mentre i derivati dell'acido caffeico non vengono ritrovati nel plasma, indicando una mancata biodisponibilità dopo somministrazione orale [Matthias A *et al.*, 2005].

In conclusione, l'effetto immunomodulatorio dei preparati a base di *Echinacea* è un'attività molto articolata i cui meccanismi molecolari iniziano solo adesso ad essere delucidati.

### **II.III.b Azione anti-infiammatoria**

Gli estratti di *Echinacea* mostrano una spiccata azione antinfiammatoria. È stato osservato, inoltre, che essi accelerano la formazione del tessuto granulomatoso ed hanno un effetto stimolante sul sistema linfatico, di conseguenza rendono più rapido il recupero del tessuto danneggiato nelle aree colpite da infezioni e/o infiammazioni.

Per la sua attività antinfiammatoria e moderatamente antisettica, l'*Echinacea* viene utilizzata, sia da sola che insieme ad altri fitocomplessi, nel trattamento di condizioni infiammatorie dell'apparato urinario, particolarmente quando un difficoltoso svuotamento della vescica può aumentare il rischio di infezioni delle basse vie urinarie.

I principi attivi responsabili dell'attività antinfiammatoria sembrano essere i composti fenolici come l'echinacoside, l'acido cicorico, la cinarina e l'acido caffeico. Queste molecole sono capaci di inibire la produzione di radicali liberi e la perossidazione lipidica, processi coinvolti nello sviluppo dell'infiammazione [Speroni E *et al.*, 2002], anche se studi farmacocinetici hanno messo in evidenza uno scarso assorbimento dopo somministrazione orale per alcuni di questi composti [Matthias A *et al.*, 2005] che sono anche suscettibili ad una rapida metabolizzazione enzimatica [Meadows DC *et al.*, 2005].

In uno studio *in vivo* condotto su ratti anestetizzati, è stata valutata la capacità dell'echinacoside, nel ridurre la flogosi in seguito ad applicazione topica [Speroni E *et al.*, 2002].

L'azione antinfiammatoria dell'*Echinacea* è stata imputata anche alla frazione polisaccaridica, in particolare agli arabinogalattani, a cui sono stati ricondotti anche parte degli effetti immunostimolanti della pianta [Luetting B *et al.*, 1989; Classen B *et al.*, 2006; Thude S *et al.*, 2006]. L'azione antiflogistica è stata evidenziata anche tramite tests irritativi condotti *in vivo* da Tragni e colleghi, grazie al "Croton oil ear test", dove è stata osservata una

buona riduzione dell'edema e dell'infiltrazione di cellule infiammatorie in particolare dopo il trattamento con frazioni di un estratto acquoso ottenuto dalle radici di *E. angustifolia* contenente polisaccaridi ad alto peso molecolare, i quali sono stati proposti quindi, come i principali responsabili dell'effetto antinfiammatorio osservato [Tragni E *et al.*, 1988]. Anche per i polisaccaridi ad alto peso molecolare, rimane da accertare la loro effettiva biodisponibilità dopo somministrazione orale, infatti non sono presenti dati scientifici rilevanti e convincenti a tal riguardo [Gertsch J, 2008].

Studi più recenti hanno delucidato, almeno in parte, meccanismi e targets molecolari per un'altra importante classe di composti presenti prevalentemente nelle radici delle specie di *Echinacea*, le alchilamidi, le quali sembrano ricoprire un ruolo predominante nelle azioni biologiche riconosciute alla pianta [Gertsch J, 2008]. Un loro potenziale coinvolgimento nell'effetto antinfiammatorio è stato proposto già diversi anni fa in seguito alla osservazione che possono agire come potenziali inibitori delle due isoforme di cicloossigenasi ad oggi riconosciute, COX-I e COX-II e di alcune lipossigenasi [Miller SC, 2005], infatti, estratti di radice delle tre specie medicinali di *Echinacea* hanno mostrato inibire, *in vitro*, l'attività della 5-lipossigenasi con IC<sub>50</sub> nell'ordine di 0.5-1 µg/mL [Binns *et al.*, 2002a] e tale effetto è stato riportato anche per alchilamidi derivanti dalla specie *E. angustifolia* [Muller-Jakic B *et al.*, 1994]. In un altro studio *in vitro*, alchilamidi isolate da radici di *E. purpurea*, hanno dimostrato inibire l'attività enzimatica di COX-I e COX-II con una percentuale tra il 20 e il 50 % rispetto al controllo [Clifford LJ *et al.*, 2002]. Inoltre, l'analisi tramite Western Blot ha dimostrato che il trattamento *in vivo* con un estratto di *E. purpurea* può modulare l'espressione della COX-II indotta dal lipopolisaccaride (LPS) e dall'interferone-γ nei macrofagi peritoneali, suggerendo che l'effetto antinfiammatorio dell'estratto potrebbe essere in parte correlato alla modulazione dell'espressione della COX-II [Raso GM *et al.*, 2002]. Studi più recenti hanno confermato l'inibizione *in vitro* da parte di preparati a base di

*Echinacea* della produzione di prostaglandina E2 da parte dell'isoforma COX-II in macrofagi RAW264.7 murini, seppur con una potenza moderata (nel range micromolare) [Hinz B *et al.*, 2007; LaLone CA *et al.*, 2007]. Uno studio effettuato *in vivo*, utilizzando un preparato commerciale a base di *E. purpurea* (Echinaforce®) in tintura e pastiglie, ha dimostrato un decremento della produzione della citochina pro-infiammatoria IL-8 e del TNF-alfa [Woelkart K *et al.*, 2006].

Gertsch e colleghi hanno recentemente dimostrato che alcune alchilamidi presenti nelle specie di *Echinacea* sono in grado di inibire il rilascio di citochine pro-infiammatorie e TNF-alfa da popolazioni di monociti/macrofagi umani stimolati con LPS sia in colture cellulari che in sangue intero con un valore di IC<sub>50</sub> inferiore a 100 nM [Raduner S *et al.*, 2006], quindi in accordo alle concentrazioni plasmatiche osservate per queste molecole [Matthias A *et al.*, 2005]. Tali alchilamidi sono state riconosciute interagire con diversi targets molecolari, molti dei quali associati al sistema endocannabinoide, come il recettore CB2, l'inibizione dell'enzima FAAH (*fatty acide amide hydrolase*) deputato alla degradazione cellulare dell'anandamide, la modulazione del re-uptake cellulare dell'anandamide. Per questo certe molecole possono essere identificate come cannabinomimetiche che, come gli endocannabinoidi, esibiscono attività immunomodulatoria e antinfiammatoria.

In conclusione, alla luce delle ultime scoperte scientifiche, la principale attività terapeutica dell'*Echinacea* si è spostata da pianta medicinale immunostimolante ad anti-infiammatoria, e i principali responsabili di tale azione sembrano i composti di natura lipofila, in particolare le alchilamidi, che vengono rapidamente assorbite per somministrazione orale e si trovano a concentrazioni plasmatiche bio-attive [Gertsch J, 2008].

### **II.III.c Azione cicatrizzante**

L'impiego storico dell'*Echinacea* in ambito terapeutico è rappresentato dal trattamento locale delle ulcerazioni e di alcune patologie dermatologiche e si basa sulla capacità della pianta di accelerare la rigenerazione tissutale e di ridurre i rischi di infezione. Tali effetti sembrano essere dovuti, oltre che all'attività immunostimolante aspecifica, anche all'inibizione dell'enzima ialuronidasi, (in grado di degradare gli acidi ialuronici che svolgono un ruolo primario nel processo di cicatrizzazione) prodotto da alcuni agenti patogeni per penetrare all'interno dei tessuti [Spignoli G *et al.*, 1999].

L'acido ialuronico riveste un ruolo importante nella fase iniziale della cicatrizzazione e variazioni della sua concentrazione si riflettono sulla proliferazione cellulare e sulla deposizione della matrice cellulare [Chithra P *et al.*, 1998; Speroni E *et al.*, 2002]. Estratti delle radici di *E. angustifolia* ottenuti con solventi a diversa polarità, sono stati testati per l'attività antiialuronidasica e le frazioni etilacetato, butilacetato e cloroformica sono risultate quelle aventi maggiore potere inibitorio nei confronti dell'enzima. Per mezzo dell'analisi con spettroscopia di massa sono stati identificati quattro derivati dell'acido caffeico: acido cicorico, acido caftarico, cinarina, acido clorogenico, tra i quali l'acido cicorico e il caftarico risultano gli inibitori più potenti con una IC<sub>50</sub> di 0.42 e 0.61 mM, rispettivamente, mentre la cinarina e l'acido clorogenico risultano più deboli (1.85 e 2.22 mM, rispettivamente) [Facino RM *et al.*, 1993].

In uno studio *in vivo*, già descritto per l'attività antinfiammatoria, si è analizzata l'azione cicatrizzante dell'estratto di radice dell'*Echinacea pallida* e dell'echinacoside ottenendo risultati positivi già dopo 24 e 72 ore dalla sua applicazione, con una marcata guarigione delle ferite. Anche in questo caso, l'attività cicatrizzante dell'echinacoside è attribuita all'azione antiialuronidasica [Speroni E *et al.*, 2002].

### II.III.d Azione antibatterica e fungicida

L'echinacoside, principale composto polifenolico isolato dalle radici di *E. pallida*, ha mostrato anche attività antibatterica; tale azione risulta particolarmente evidente su *Staphilococcus aureus* e, in misura inferiore, anche su *Escherichia coli* e su *Pseudomonas aeruginosa*.

L'estratto alcolico dell'*E. angustifolia* ha dimostrato *in vitro* un'attività inibente nei confronti del *Trichomonas vaginalis* [Giusti E, 1992].

L'*Echinacea* sembra svolgere la sua azione antibatterica incrementando la risposta immunitaria aspecifica propria dell'organismo, ma anche inibendo l'attività depolimerizzante dell'enzima ialuronidasi e aumentando, di conseguenza, la resistenza della membrana cellulare all'attacco di agenti infettivi [Spignoli G *et al.*, 1999]. Secondo questo meccanismo, l'azione antimicrobica dell'*Echinacea* sembra attribuibile principalmente all'attività dell'echinacoside; anche gli altri principi attivi della pianta, ad esempio i polisaccaridi, tuttavia, potenziano la risposta difensiva in maniera sinergica.

Per quanto riguarda l'attività fungicida dell'*Echinacea*, il ricercatore austriaco R. Bauer ha descritto una notevole efficacia nel trattamento delle micosi vaginali. Un suo studio ha dimostrato, infatti che le pazienti affette da tale patologia e curate con econazolo nitrato mostravano ricadute nel 60.5% dei casi; tale percentuale diminuiva al 16.7% quando veniva utilizzato, insieme all'econazolo, anche un estratto di *Echinacea* [Coeugniet E and Kuhnast R, 1986].

In uno studio *in vivo*, inoltre, è stato descritto un effetto protettivo contro l'infezione da *Candida albicans* in seguito a somministrazione endovenosa di una miscela preparata industrialmente a base di polisaccaridi estratti dall'*E. purpurea* [Lohamann-Matthes ML and Wagner H 1989].

### II.III.e Azione antivirale

L'attività antivirale di differenti preparazioni a base di *Echinacea* è stata descritta tramite studi *in vitro*. In particolare, l'estratto acquoso ed alcolico di *Echinacea* ha mostrato la capacità di rendere resistenti cellule di topo per 24 ore all'infezione da parte dei virus dell'influenza, del vaiolo e dell'*Herpes simplex* [Wacker A and Hilbig W, 1978]. Non è chiaro se questo derivi da una attività virulicida o piuttosto da una aumentata produzione di interferone che impedirebbe la penetrazione del virus nella cellula normale [Spignoli G, *et al.*, 1999]. Un meccanismo indiretto che coinvolge la via della stimolazione di interferone-alfa e interferone-beta è stato rilevato in differenti tests volti ad identificare il virus *Herpes simplex* (HSV-1) e quello influenzale, utilizzando estratti purificati di *E. purpurea*, *E. angustifolia* ed *E. pallida* [Beuscher N *et al.*, 1995].

Studiando l'azione antivirale contro l'HSV-1, si è osservata un'azione diretta ed un effetto indiretto con l'induzione di interferone da parte delle frazioni contenenti glicoproteine delle radici di *E. purpurea* [Bodinet C and Beuscher N, 1991].

Un altro studio ha evidenziato l'azione antivirale contro il virus *Herpes simplex* di tipo 1 da parte degli estratti di radice di otto specie o varietà di *Echinacea* e dell'estratto delle parti aeree dell'*E. pallida* var. *sanguigna* [Binns SE *et al.*, 2002b]. L'attività antivirale più elevata è stata riscontrata per le frazioni estratte con *n*-esano, che contengono composti lipofili, rispetto agli estratti con etilacetato, costituiti dai derivati dell'acido caffeico. Nello stesso studio, tramite una serie di azioni citoprotettive, si è osservato anche l'alto potere antivirale dell'acido cicorico puro; di conseguenza, l'efficacia terapeutica dell'*Echinacea* in alcune malattie virali potrebbe derivare da un concorso di attività. L'acido cicorico svolge, infatti, un'azione protettiva nei confronti del collagene, assicurandone l'integrità dall'azione dei radicali liberi [Facino RM *et al.*, 1995] ed esplica un effetto citotossico, interagendo con il metabolismo del DNA virale [Cheminat A *et al.*, 1988]. Infine, è stata dimostrata la capacità



dello stesso acido cicorico di inibire l'enzima integrasi dell'HIV-I e la replicazione del virus in colture tissutali [Robinson JrWe *et al.*, 1996]. Per quest'ultima azione, l'acido cicorico potrebbe svolgere un potenziale ruolo di supporto contro il virus dell'HIV, infatti la sua replicazione dipende dall'attività di tale enzima che media l'inserzione di una copia di DNA del virus nel genoma della cellula ospite.

Oltre all'acido cicorico, altri composti, quali l'acido 3,5-dicaffeoilchinico, l'acido 1-metossiossalil-3,5-dicaffeoilchinico, sono risultati inibitori dell'enzima virale, rappresentando potenzialmente una nuova classe di agenti antivirali da investigare che potrebbero contribuire a comprendere meglio il meccanismo molecolare dell'integrazione virale [Robinson JrWe *et al.*, 1996; Mc Dougall B *et al.*, 1998].

### **II.III.f Azione antiossidante**

Gli estratti di foglie e radici delle tre specie commerciali di *Echinacea* possiedono attività antiossidante [Hu C and Kitts DD, 2000] e inibiscono il processo di produzione dei radicali liberi e la perossidazione lipidica [Speroni E *et al.*, 2002], grazie ai coniugati dell'acido caffeico, ed ai loro gruppi ossidrilici di natura fenolica [Harborne JB 1986].

Tra i derivati caffeoilchinici, è stato osservato che l'acido cicorico è tre volte più potente dell'acido ascorbico nella rimozione dei radicali liberi, confermando l'idea che i derivati dell'acido caffeico potrebbero contribuire agli effetti farmacologici benefici prevenendo le indesiderate reazioni di ossidazione.

Il saggio di perossidazione lipidica ha indicato che gli estratti di radici e foglie delle tre specie di *Echinacea* possiedono proprietà antiossidanti simili nonostante i loro profili chimici siano ben distinti [Duff Sloley B *et al.*, 2001].

Tra i derivati dell'acido caffeico, l'echinacoside mostra attività dose-dipendente nel ridurre la

formazione del radicale ossidrilico che induce la degradazione del collagene di tipo III, suggerendo un ruolo protettivo del polifenolo contro il danno da radiazione luminosa sulla pelle [Speroni E *et al.*, 2002].

### **II.III.g Azione antitumorale**

La ricerca sulle possibili implicazioni dei preparati a base *Echinacea* in pazienti neoplastici è tuttora in corso, ed ha assunto negli ultimi anni un crescente interesse. E' importante sottolineare che l'*Echinacea* risulta tra i primi tre rimedi utilizzati dai pazienti nell'ambito della Medicina Complementare e Alternativa (CAM), che è stata definita come “un gruppo di diverse pratiche mediche, terapeutiche, di prodotti e rimedi che non sono considerati attualmente facenti parte della medicina convenzionale” [Sparreboom A *et al.*, 2004]. E' stato stimato che circa un terzo della popolazione degli Stati Uniti e un numero sempre crescente in tutti i paesi industrializzati, fa ricorso annualmente a questi rimedi “non convenzionali” e che la maggior parte di essi usa costantemente prodotti fitoterapici senza consultare il medico, con conseguente potenziale interazione con altri regimi terapeutici [Dy GK *et al.*, 2004]. Questa pratica è particolarmente diffusa in pazienti neoplastici e Richardson e colleghi hanno confermato che quasi l'85% di questi ha fatto ricorso alla CAM [Richardson MA *et al.*, 2000] combinandola alla tradizionale terapia antitumorale [Dy GK *et al.*, 2004].

L'*Echinacea* riveste un ruolo di primaria importanza in queste pratiche mediche alternative a causa della sua attività immunomodulatoria e anti-infiammatoria.

Alcuni dati sembrano indicare che l'*Echinacea* contenga dei composti potenzialmente attivi in ambito antitumorale: fra questi, l'echinacina, presente principalmente nell'*E. purpurea*, e un idrocarburo contenuto negli oli essenziali della pianta, che si è mostrato capace di inibire, *in vitro*, il carcinosarcoma di Walker e la leucemia linfocitica [Voaden D and Jacobson M,

1972].

Nei primi anni '90, è stato condotto uno studio clinico somministrando estratti di *E. purpurea* in pazienti affetti da tumore coleretico metastatico avanzato [Lersch C *et al.*, 1992] e in pazienti affetti da cancro epatocellulare non operabile [Lersch C *et al.*, 1990]. In aggiunta all'*Echinacea*, il regime terapeutico prevedeva anche l'utilizzo di ciclofosfamide e timostimolina. È stata documentata una parziale regressione del tumore in un solo paziente con cancro coleretico, mentre in altri sei pazienti il tumore è rimasto stabile. Tuttavia, lo studio non è stato affiancato da un controllo per cui qualsiasi affermazione risulta difficile da asserire [Percival SS, 2000].

Sempre nell'ambito della terapia antitumorale, è stato realizzato anche uno studio per valutare i possibili benefici dell'utilizzo di una frazione di polisaccaridi isolata da *Echinacea purpurea*, nei confronti degli effetti indesiderati della chemioterapia. In quindici pazienti affetti da tumore gastrico avanzato, in corso di una terapia palliativa a base di etoposide, leucoverin e 5-fluorouracile, sono stati somministrati 2 mg della frazione polisaccaridica; i risultati ottenuti hanno suggerito che tale frazione potrebbe essere efficace nel ridurre la leucopenia indotta dalla chemioterapia [Melchart D *et al.*, 2002]. Altri studi, invece, hanno riscontrato un effetto immunosoppressivo causato da un utilizzo a lungo termine di preparazioni a base di *Echinacea* [Coegniet EG and Elek E, 1987], a cui si associa anche una riduzione dei globuli bianchi [Kemp DE and Franco KN, 2002; Dy *et al.*, 2004].

Da queste evidenze risultano necessari ulteriori studi in questo ambito.

### III. Utilizzo terapeutico delle preparazioni a base di *Echinacea*

L'elenco delle indicazioni terapeutiche dell'*Echinacea* cresce di giorno in giorno, sfruttando prevalentemente le proprietà immunomodulatorie e antinfiammatorie della pianta. In particolare, l'utilità delle preparazioni a base di *Echinacea* è stata dimostrata nel trattamento sintomatico del raffreddore comune e delle sindromi influenzali, soprattutto quando la terapia viene assunta all'inizio della sintomatologia [Speroni E *et al.*, 2002]. Recentemente uno studio di meta-analisi ha confermato l'efficacia nel trattamento dell'incidenza e della durata del raffreddore comune [Shah SA *et al.*, 2007]. Un altro utilizzo terapeutico è il trattamento di infezioni a carico nel tratto superiore dell'apparato respiratorio [Woelkart K and Bauer R, 2007; Barnes J *et al.*, 2005], dove, i preparati a base di *Echinacea* sembravano meno efficaci nella prevenzione [Melchart D *et al.*, 1998; Grimm W and Muller HH, 1999], rispetto al controllo della gravità e della durata dei sintomi [Percival SS, 2000].

Studi clinici hanno dimostrato che l'assunzione di *Echinacea* si associa ad un significativo e sostanziale incremento del numero di cellule bianche circolanti, monociti, neutrofili e natural killer. Tale assunzione si associa anche ad una soppressione dell'aumento della produzione di superossidi da parte dei neutrofili [Goel V *et al.*, 2004; Barton R, 2005]. In uno studio *in vivo*, l'estratto idroalcolico, ottenuto da parti fresche di *E. purpurea* (95% di parti aeree e 5% di radici - Echinaforce<sup>®</sup>, Bioforce AG, Svizzera), veniva somministrato sotto forma di compresse per tre volte al giorno per otto giorni consecutivi risultando attivo nel 68% dei casi evidenziando benefici significativi rispetto al placebo [Brinkeborn R, *et al.*, 1998]. In accordo con tali osservazioni, uno studio analogo sull'uso di un preparato a base di *Echinacea* (Echinargard<sup>®</sup>, Nature's Way Utah), ottenuto spremendo la linfa di *E. purpurea*, ha dimostrato che soggetti sottoposti a frequenti raffreddori che assumevano l'estratto ai primi sintomi, avevano un decorso migliore rispetto a quelli che assumevano il placebo. Inoltre,

solo il 40% dei pazienti trattati con l'*Echinacea* recidivavano contro il 60% dei soggetti del gruppo di controllo, evidenziando un effetto protettivo della pianta [Hoheisel O *et al.*, 1997].

In contrasto con queste ricerche, uno studio effettuato in Germania non è riuscito a dimostrare la superiorità, rispetto al placebo, dell'estratto di radici di *Echinacea angustifolia* e *purpurea* nel prevenire il raffreddore [Melchart D *et al.*, 1998]. Allo stesso modo, un altro studio si è concluso con l'evidenza che l'*Echinacea* non è superiore al placebo nel ridurre il grado di infezione da rhinovirus e la sintomatologia influenzale [Turner RB *et al.*, 2000].

Questi risultati contrastanti sono molto probabilmente in relazione al fatto che gli estratti di *Echinacea* non erano stati titolati determinando quindi una elevata variabilità nella composizione quali- e quantitativa delle preparazioni utilizzate e rendendo di fatto molto difficile poter comparare studi diversi. Negli ultimi anni è risultato più evidente che le tre specie medicinali di *Echinacea*, seppur molto simili nella composizione fitochimica, presentano importanti differenze che obbligano ad un uso mirato delle preparazioni fitoterapiche [Gertsch J, 2008].

Sono in corso ulteriori indagini sull'uomo al fine di valutare in maniera più precisa, le applicazioni dei preparati a base *Echinacea* sulla base delle proprietà farmacologiche evidenziate in studi preclinici, *in vitro* ed *in vivo*.

#### **IV. Potenziali e controindicazioni effetti indesiderati associati all'utilizzo dei preparati a base di *Echinacea***

Come riportato dalla Commissione Tedesca E, in genere non si riscontrano effetti collaterali di grave entità associati all'utilizzo di *Echinacea*. Sono stati evidenziati, tuttavia, una caratteristica sensazione di solletico alla gola, la quale può evolvere nella formazione di piaghe, un leggero bruciore alla lingua, e alcuni casi di eritema nodoso [Soon SL and Crawford RI, 2002]. Recentemente, però, alcuni autori e la stessa Commissione Tedesca E hanno indicato una controindicazione al suo utilizzo nelle malattie autoimmuni quali AIDS, leucemia, tubercolosi, sclerosi multipla, malattie del collagene, in seguito all'osservazione che un utilizzo prolungato (maggiore di 8-10 settimane) di preparati a base di *Echinacea* può determinare, in alcuni casi, leucopenia, [Bisset NG, 1994] anche se, non esistono tuttavia prove di questa controindicazione [Bone K, 1997]. Per quanto riguarda l'infezione da HIV, inoltre, si hanno opinioni discordanti, in quanto si è sviluppata una linea di ricerca che vede l'*Echinacea* come fonte potenziale di farmaci contro il virus [Robinson JrWe *et al.*, 1996]. E' stata avanzata un'ulteriore perplessità sull'utilizzo dell'*Echinacea* in relazione alla durata del trattamento terapeutico a base di questa pianta; come accennato sopra, alcune indagini cliniche hanno dimostrato che l'uso prolungato non è dannoso, ad esempio uno studio ha rilevato che l'*Echinacea* è ben tollerata nel trattamento orale a lungo termine, dato che dopo somministrazione per 12 settimane, si sono registrati rari effetti collaterali di natura digestiva [Parnham MJ, 1996]. Altri studi invece, hanno riscontrato che la somministrazione di preparazioni a base di *Echinacea* possa causare, a lungo termine, leucopenia [Kemp DE and Franco KN, 2002; Dy GK *et al.*, 2004]. Tra le controindicazioni sull'uso di *Echinacea*, vi è anche quella relativa ai soggetti che soffrono di reazioni allergiche, in particolare verso la famiglia delle Asteraceae [Bone K, 1997]. A questo proposito, uno studio australiano riferisce

di cinque casi di ipersensibilità: due pazienti con risposte anafilattiche, un terzo colpito da un attacco acuto d'asma dieci minuti dopo la prima assunzione di *Echinacea*, il quarto paziente con ricorrenti episodi d'asma ad ogni somministrazione ed un quinto con rash maculopapillare due giorni dopo il trattamento; altri 26 casi presentavano una risposta Ig-E mediata in seguito all'uso di *Echinacea* [Mullins RJ and Heddle R, 2002]. È consigliabile osservare cautela nell'utilizzo delle preparazioni a base di *Echinacea* anche in gravidanza. Anche a questo proposito esistono fonti discordanti: la Commissione Tedesca E ne sconsiglia l'uso [Bone K, 1997], mentre un recente studio ha dimostrato che l'assunzione di *Echinacea* durante il primo trimestre di gestazione non è associato ad un aumentato rischio di malformazioni per il feto [Gallo M and Koren G, 2001].

## V. Potenziali interazioni tra *Echinacea* e farmaci

I preparati a base di *Echinacea* sono utilizzati prevalentemente per il trattamento del raffreddore comune e dell'influenza e spesso possono essere assunti in concomitanza di altri regimi terapeutici, anche cronici, con i quali possono interagire in modo diretto o indiretto [Barrett BP *et al.*, 2002]. Per questo motivo sono stati effettuati molti studi atti a valutare l'effetto di questa pianta sui principali meccanismi di metabolizzazione, inattivazione ed escrezione dell'organismo. In particolare, ricerche *in vitro*, hanno dimostrato che l'*Echinacea* esercita un modesto effetto inibente sul citocromo P450 (isoforma CYP3A4), suggerendo quindi, una certa cautela nell'impiego simultaneo della pianta con altri farmaci, substrato dello stesso enzima, per la possibile comparsa di interazioni farmacologiche di rilievo clinico [Budzinski JW *et al.*, 2000].

Alcuni autori hanno evidenziato come certi flavonoidi presenti negli estratti di *Echinacea* potrebbero inibire o attivare i citocromi umani e i trasportatori di farmaci, a seconda della loro struttura e delle concentrazioni ematiche raggiunte [Zhou S *et al.*, 2003].

In particolare, è stato dimostrato che quercetina e kampferolo (presenti nell'estratto di *Echinacea*) sono in grado di inibire il trasportatore MPR1 ed incrementare l'espressione del CYP1A1 [Sparreboom A *et al.*, 2004]; la quercetina, inoltre, è in grado di indurre anche l'isoforma CYP3A4 negli epatociti umani [Raucy JL, 2003].

Questi dati sono in accordo con un recente studio che indica come l'assunzione orale di *Echinacea* induca l'attività del CYP3A4 in volontari sani [Sparreboom A *et al.*, 2004].

Oltre a modificare il profilo farmacocinetico di medicinali assunti contestualmente, l'interazione tra preparati a base di *Echinacea* e farmaci sul fegato, può risultare nello sviluppo di epatotossicità come evidenziato, ad esempio, per l'amiodarone [Miller LG, 1998].



Inoltre, l'uso dell'*Echinacea* è sconsigliato in associazione con acetaminofene, infatti, la presenza di derivati alcaloidi pirrolizidinici nella pianta determina una deplezione del glutatione epatico, potenziando l'effetto tossico di tale farmaco [Abebe W, 2002].

Come precedentemente asserito, negli ultimi anni l'interesse per le medicine alternative e complementari (CAM) è cresciuto rapidamente nel mondo industrializzato e l'impiego di tali rimedi, ed in particolare di preparati a base di *Echinacea* è peraltro più comune tra i pazienti oncologici rispetto al resto della popolazione [Dy GK *et al.*, 2004; Di Gianni LM *et al.*, 2002]. Considerando gli effetti esercitati dall'*Echinacea* sul citocromo e poiché molti farmaci antitumorali sono essi stessi substrato del CYP3A4, è ragionevole pensare ad una possibile interazione farmacometabolica con questa classe di farmaci.

L'utilizzo di *Echinacea* è quindi da tenere sotto controllo in corso di trattamento con camptotecine, inibitori delle tirosin-chinasi, del fattore di crescita di derivazione epidermica (EGFR-TK), epipodofillotossine, taxani e alcaloidi della vinca [Sparreboom A *et al.*, 2004].

Come recentemente suggerito da Romiti *et al.*, (2008), una possibile fonte d'interazione dei derivati a base di *Echinacea* con farmaci tradizionali può derivare anche dalla capacità di alcuni principi presenti in estratti lipofili di radice di *Echinacea* di inibire l'attività della P-glicoproteina, un trasportatore multi farmacologico coinvolto in molti processi farmacocinetici [Romiti N *et al.*, 2008].

## **SCOPO DELLA RICERCA:**

L'*Echinacea* è una pianta medicinale tra le più popolari a livello mondiale e i relativi preparati commerciali sono tra i rimedi fitoterapici più venduti nei paesi industrializzati e negli Stati Uniti dove muovono un mercato di circa 32 milioni di dollari annui [Sparreboom A *et al.*, 2004]. L'*Echinacea* è ampiamente utilizzata soprattutto da pazienti oncologici che fanno ricorso alla medicina complementare ed alternativa (CAM), [Dy GK *et al.*, 2004] facendo un uso spesso indiscriminato e senza diretto controllo medico di questi preparati con conseguente rischio di interazione farmacocinetica e/o farmacodinamica con il regime chemioterapico classico [Barnes J *et al.*, 2005].

Recenti studi hanno indicato che le alchilamidi estratte dalle specie *E. angustifolia* e *purpurea* sono in grado di inibire, *in vitro*, l'isoforma II (inducibile) delle cicloossigenasi (COX-II) la 5-lipossigenasi (5-LOX), enzimi questi che svolgono un ruolo chiave nella cascata dell'acido arachidonico portando alla formazione di prostaglandine e leucotrieni, due importanti mediatori del processo infiammatorio [Harris SG *et al.*, 2002; Woelkart K and Bauer R, 2007]. La COX-II sembra rivestire un ruolo centrale nel processo di cancerogenesi, infatti in molti tumori, prevalentemente del colon e del pancreas, è stata dimostrata una sovraespressione di tale enzima (in confronto al tessuto sano) [Ding XZ *et al.*, 2003] che agisce promuovendo l'angiogenesi [Gately S, 2000], stimolando la crescita e l'invasività delle cellule tumorali [Sheng H *et al.*, 2001] e inibendo il processo apoptotico [Aggarwal S *et al.*, 2000]. Inibitori COX-II selettivi come il celecoxib, rofecoxib e l'NS-398 hanno dimostrato in diversi studi, di ridurre, *in vivo*, la crescita della massa tumorale e *in vitro* la proliferazione di cellule tumorali umane [Blumenthal M, 1998; Lohamann-Matthes ML. and Wagner H, 1989; Tseng WW *et al.*, 2002, Subbaramaiah K and Dannenberg AJ, 2003] oltre che di indurre apoptosi con meccanismi COX-II dipendenti e indipendenti [Ding XZ *et al.*, 2003]. Queste

molecole hanno evidenziato, inoltre, la capacità di potenziare l'azione antitumorale di farmaci comunemente utilizzati in terapia antineoplastica come la gemcitabina [El-Rayes B *et al.*, 2004]. Analogamente all'enzima COX-II, le lipossigenasi svolgono un ruolo rilevante nello sviluppo di alcuni tumori umani, quali quello mammario, del colon, della prostata e del pancreas. In particolare, la 5-LOX e la 12-LOX sono espresse in diverse linee cellulari umane di tumore al pancreas, mentre mancano nelle corrispondenti normali. Inibitori selettivi per queste due isoforme enzimatiche sono stati osservati essere in grado di indurre apoptosi e di bloccare la proliferazione cellulare di tumori pancreatici umani [Tong WG *et al.*, 2002].

Alla luce delle evidenze sopra riportate e al fatto che mancano completamente in letteratura scientifica studi volti a verificare l'effetto diretto di estratti di *Echinacea* e dei suoi principali composti bioattivi su linee tumorali umane, scopo del progetto di questo dottorato è stato quello di valutare, su linee cellulari umane tumorali e, per confronto, su non tumorali, l'effetto di estratti di natura lipofila derivanti dalle tre specie medicinali di *Echinacea*, delle loro frazioni arricchite in principi attivi e dei composti isolati e caratterizzati. Sono state, inoltre, indagate le potenziali vie molecolari cellulari alla base dell'effetto osservato. A questo scopo, abbiamo scelto di lavorare su estratti *n*-esani di radice che hanno il più alto contenuto in principi attivi lipofili, i quali sono distribuiti quali- e quantitativamente in maniera differente tra le specie.

# MATERIALI E METODI

## I. Composti naturali

Gli estratti lipofili ottenuti da radici delle tre specie medicinali di *Echinacea*, così come le frazioni e i singoli acetileni sono stati forniti dal Laboratorio di Fitochimica diretto dal Prof. Melegari presso l'Università di Modena e Reggio Emilia. Sono stati solubilizzati in dimetilsolfossido, DMSO (Sigma-Aldrich, Milano) ottenendo soluzioni madre di 150 mg/ml (per estratti e frazioni) e 50 mM (per i composti puri) poi conservate al riparo dalla luce e dall'umidità a bassa temperatura (-20 °C) per un tempo non superiore ad un mese.

## II. Farmaci e composti commerciali

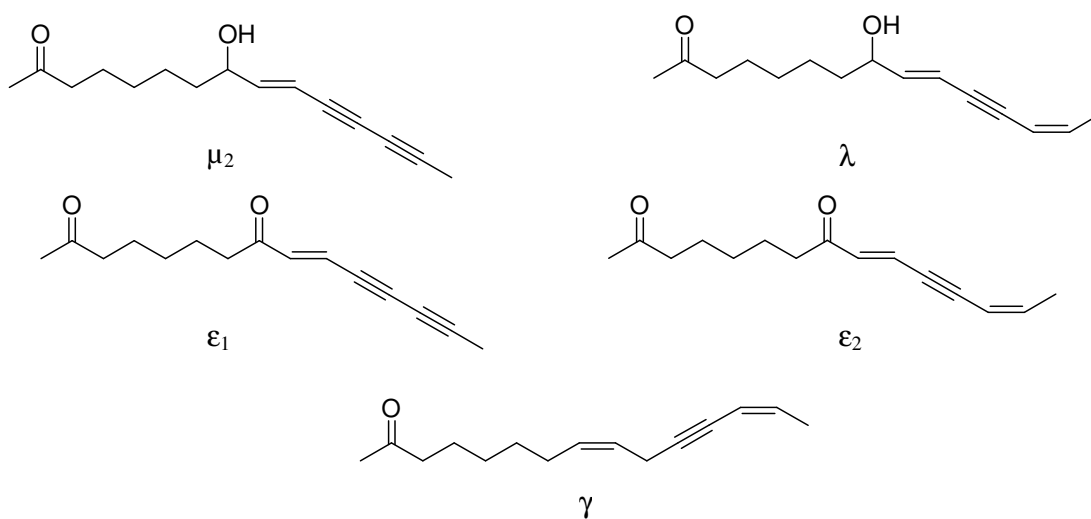
Il 5-Fluorouracile (5-FU) e l'SR144528 sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'Echinacea Premium Liquid<sup>®</sup>, un estratto commerciale a base di *E. purpurea* ed *E. angustifolia*, contenente principalmente alchilamidi, è stato fornito dalla MediHerb Pty Ltd (Warwick, Australia) ed utilizzato come controllo positivo negli studi di biodisponibilità, in quanto studi precedenti avevano mostrato contenere sia composti biodisponibili che non [Matthias *et al.*, 2004].

## III. Estrazione ed isolamento dei composti puri

Le radici essiccate e polverizzate di ciascuna specie di *Echinacea* (circa 10 g) sono state estratte con apparato Soxhlet per 4 ore utilizzando *n*-esano (200 ml) e portate a secco sotto vuoto. La resa di estrazione è stata 0.8% (v/v) per l'*E. pallida*, 0.8% (v/v) per l'*E. angustifolia* e 0.7% (v/v) per l'*E. purpurea*.

Per l'isolamento dei composti puri, le radici essiccate di *E. pallida* (1 kg) sono state estratte in un apparato Soxhlet per 24 ore utilizzando *n*-esano (5.4 l). L'estratto è stato poi evaporato

portando a secco sotto vuoto fino ad ottenere un olio di color giallo (8 g). L'estratto è stato sottoposto a cromatografia su gel di silice ottenendo 155 frazioni, ciascuna delle quali è stata analizzata attraverso TLC e RP-HPLC e raccolte in 10 frazioni in accordo con il loro profilo cromatografico. Da queste frazioni sono stati isolati, mediante cromatografia su gel di silice, i cinque composti acetilenici ( $\mu_2$ ,  $\lambda$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon_1$ , e  $\epsilon_2$ ) (Fig. 14). Le strutture di questi composti sono state determinate sulla base delle tecniche UV, IR, NMR (incluse 1D e 2D NMR come l'  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY, gHSQC-DEPT, gHMBC, NOESY) e la spettroscopia di massa [Pellati F *et al.*, 2006]. I composti purificati sono stati conservati in argon a bassa temperatura ( $-20^\circ\text{C}$ ) protetti da luce e umidità.



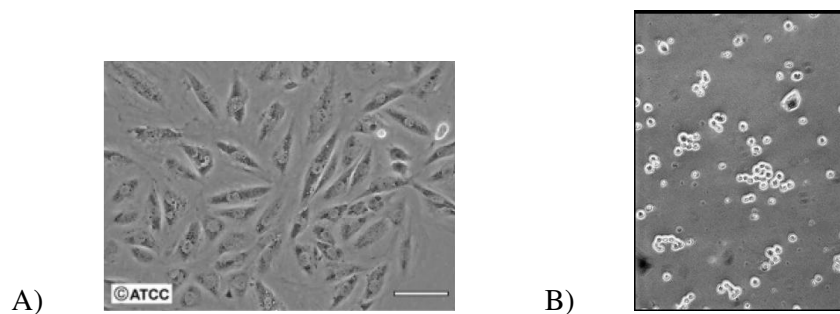
**Fig. 14:** Struttura chimica degli acetileni isolati ed identificati dall'estratto lipofilo di radice di *E. pallida*

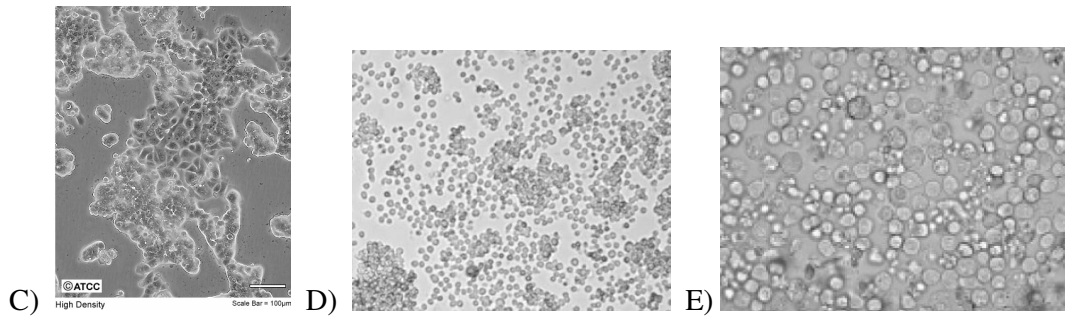
#### IV. Linee cellulari

La linea di adenocarcinoma del pancreas, MIA PaCa-2, (Fig. 15A) (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) è caratterizzata da cellule che crescono adese alla superficie della fiasca assumendo un aspetto stellato e con un tempo di duplicazione di circa 24-36 ore. Le cellule tumorali umane di colon, COLO320 (Fig 15B) (American Type Culture Collection,

Rockville, MA, USA) crescono anch'esse adese alla fiasca, hanno una forma tondeggiante e sono caratterizzate da un tempo di duplicazione di circa 20 ore. La linea di adenocarcinoma mammario MCF-7 (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) (Fig 15C) è caratterizzata da un tempo di duplicazione di 36-48 ore, mentre le linee leucemiche umane Jurkat e HL60 (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA) (Fig 15D-E rispettivamente) crescono in sospensione e sono caratterizzate da un tempo di divisione di circa 24 ore. La linea epiteliale di colon Caco-2 e la linea embrionale di rene HEK-293 sono state anch'esse ottenute dall' American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA.

Le linee MIA PaCa-2, MCF-7 e HEK-293 sono mantenute in coltura con un terreno caratterizzato da DMEM ad alta concentrazione di glucosio, a cui sono stati aggiunti L-glutamina (2 mM), siero fetale bovino al 10%, siero di cavallo al 2,5 %, penicillina (50 IU/ml) e streptomicina (50 µg/ml) (Sigma–Aldrich, Milano, Italy). Il terreno di coltura per le altre linee cellulari (COLO320, Jurkat e HL60, Caco-2) è costituito da RPMI 1640, L-glutamina (2 mM), siero fetale bovino al 10%, penicillina (50 IU/ml) e streptomicina (50 µg/ml) (Sigma–Aldrich, Milano, Italy).

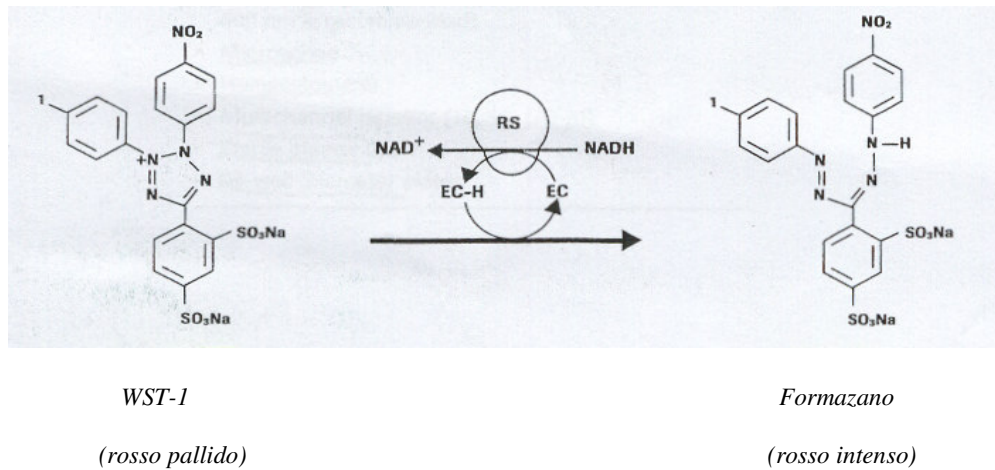




**Fig. 15:** Morfologia delle linee tumorali umane di pancreas MIA PaCa-2 (A), di colon COLO320 (B), mammaria MCF-7 (C), leucemiche Jurkat (D) e HL60 (E).

### V. Analisi della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio colorimetrico (Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche, Mannheim, Germany) dove il reagente principale è un sale di tetrazolio, WST-1, che viene metabolizzato da enzimi mitocondriali in un sale di formazano solubile colorato (Fig.16).



**Fig. 16:** Bioconversione del substrato WST-1 in sale di formazano solubile

Le cellule tumorali sono state trattate con gli estratti, le frazioni o i composti acetilenici nell'intervallo di concentrazione 1-300 µg/ml per i primi due e 0.1 e 100 µM per i composti puri, per 24, 48 e 72 ore di esposizione. Successivamente è stato aggiunto, ad ogni pozzetto, il substrato (WST-1) in rapporto volumetrico 1:10. Dopo 60-120 minuti di incubazione a 37°C in atmosfera controllata, è stata misurata l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 450 nm mediante lettore di micropiastre (Wallac<sup>3</sup>, PerkinElmer, Wellesley, USA).

L'inibizione della vitalità cellulare è stata calcolata come percentuale di assorbanza delle cellule trattate verso i controlli non trattati (solo veicolo) e la concentrazione che determinava il 50% della crescita cellulare (IC<sub>50</sub>) è stata calcolata sulla curva ottenuta dalla regressione non lineare dei dati (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Ogni esperimento è stato replicato almeno tre volte e i valori espressi come medie ± errore standard (S.E.).

## **VI. Valutazione dell'attività caspasi**

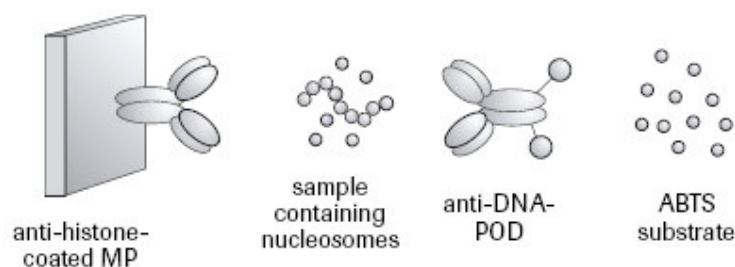
L'attività caspasi è uno dei parametri più comunemente valutati nello studio del processo apoptotico in quanto questi enzimi sono importanti regolatori di questo processo [Bauer R. and Wagner H. 1991]. In accordo con la procedura descritta nel saggio "Apo-ONE Homogeneous Caspasi 3/7 assay" (Promega, Milano), i campioni sono stati trattati con l'estratto di *E. pallida* o i composti acetilenici per 24 ore e, successivamente è stato aggiunto ad ogni pozzetto il substrato specifico per le caspasi 3/7, la rhodamina 110 bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110), in rapporto volumetrico 1:1. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 4 ore e la fluorescenza associata alla liberazione di Rhodamina 110 è stata valutata alla lunghezza d'onda d'eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm (Wallac<sup>3</sup>, PerkinElmer, Wellesley, USA). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e i risultati espressi come media ± S.E.



## VII. Analisi della frammentazione internucleosomica del DNA

La frammentazione internucleosomica del DNA è stata saggiata in accordo al protocollo fornito dal “Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> kit” (Roche, Mannheim, Germany) che permette la misurazione quali- e quantitativa dei nucleosomi (DNA/istoni) mediante un saggio immunoenzimatico di tipo ELISA.

In particolare, si ha un riconoscimento antigene-anticorpo dove l’anticorpo primario, immobilizzato sulla piastra, riconosce in modo specifico le proteine istoniche presenti nei frammenti nucleosomici, mentre l’anticorpo secondario, in grado di esplicare un’attività perossidasi, si lega, in maniera specifica, al filamento di DNA. La rilevazione nucleosomica avviene quindi, aggiungendo 100  $\mu$ l di ABTS [2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazolin-sulfonate)], substrato della perossidasi, che viene così trasformato in un composto colorato la cui quantificazione, avviene spettrofotometricamente alla lunghezza d’onda di 405 nm (Wallac<sup>3</sup>, PerkinElmer, Wellesley, USA) ed è proporzionale alla quantità di frammenti nucleosomici presenti nel campione (Fig. 17). I dati sono stati normalizzati nei confronti di un controllo non trattato (solo veicolo) e i risultati espressi come media  $\pm$  S.E. di tre esperimenti indipendenti.



**Fig. 17:** Schema della misurazione immunoenzimatica dei frammenti nucleosomici di DNA

## VIII. Analisi computazionale dei singoli acetileni derivanti da *E. pallida*

Le strutture molecolari dei composti puri isolati da *E. pallida* sono state ottenute graficamente attraverso il software InsightIII (MSI-Accelrys) (Biosym/MSI, San Diego, CA,1995). La

geometria molecolare è stata ottimizzata attraverso un software di minimizzazione energetica, utilizzando il programma Discover (MSI-Accelrys) (Biosym/MSI, San Diego, CA, 1995), nel quale è stata selezionata la cff91 Force Field .

Allo scopo di simulare le conformazioni plausibili che i composti acetilenici possono assumere in ambiente acquoso, tutti i modelli molecolari sono stati solvatati facendoli circondare da sfere di molecole di acqua con raggio di 18 Å e i composti così idratati sono stati sottoposti a minimizzazione energetica.

Sulle conformazioni ottenute per ciascuna molecola, dopo l'ottimizzazione energetica, sono stati calcolati i parametri del SASA (*Solvent Accessible Surface Area*) utilizzando l'Homology module del programma InsightIII (Biosym/MSI, San Diego, CA, 1995), mentre i pesi molecolari, il volume, il ClogP (*calculated log octanol/water partition coefficient*) sono stati valutati tramite il programma Chem3D Ultra di ChemOffice (Cambridge-Soft Corporation). I due enantiomeri (*R* e *S*) per ciascuna miscela racemica (per i composti  $\mu_2$  e  $\lambda$ ) sono stati analizzati separatamente e le loro proprietà presentate come media tra i due valori.

#### **IX. Preparazione dei campioni di *E. pallida* per il saggio di diffusione attraverso il monostrato cellulare di Caco-2**

Le radici essiccate e polverizzate di *E. pallida* (40 g) sono state estratte in apparato Soxhlet per 4 ore utilizzando *n*-esano (200 ml). Gli estratti così ottenuti sono stati evaporati e portati a secco sotto vuoto fino ad ottenere un olio giallo (400 mg), che è stato conservato sotto argon a basse temperature (-20°C), protetto dalla luce e dall'umidità.

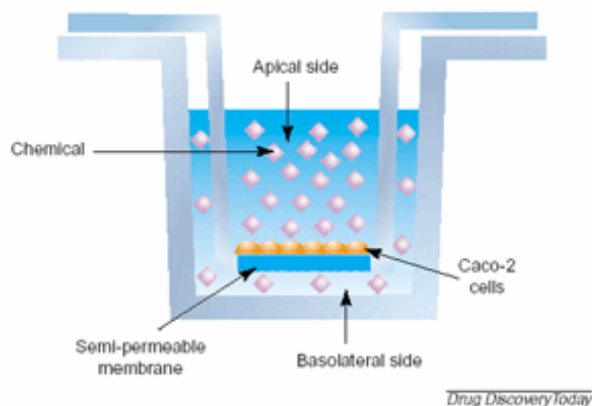
#### **X. Diffusione attraverso il monostrato cellulare di Caco-2**

La resistenza elettrica transepiteliale (*transepithelial electrical resistance* o TEER) del monostrato cellulare è stata valutata utilizzando il sistema Millicell-ERS (Millipore Corp.,

Bedford, MA, USA) prima e dopo l'esperimento di diffusione degli acetileni per controllare la corretta integrità del monostrato stesso.

All'inizio del saggio, 100  $\mu$ l della soluzione HBSS-HEPES (*hanks balanced salt solution-HEPES*) contenente il campione da testare è stata aggiunta alla porzione apicale del monostrato, mentre 600  $\mu$ l di HBSS-HEPES sono stati aggiunti sul versante baso-laterale (Fig.18). La piastra è stata posta su piatto oscillante Heifolf Titramax 1000 a 400 rpm e 37°C per tutta la durata dell'esperimento. Dopo 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 150 minuti, il volume di liquido presente sul versante baso-laterale è stato rimosso e sostituito da HBSS-HEPES fresco. La soluzione apicale è stata analizzata solo alla fine dell'esperimento. Le soluzioni stock sono state fatte in DMSO e successivamente diluite in HEPES buffer fino ad ottenere una concentrazione finale di DMSO nel saggio dello 0.2%.

La concentrazione degli acetileni nel campione è stata determinata utilizzando un sistema di HPLC a gradiente Shimadzu (Shimadzu LC10AT) accoppiato ad uno spettrometro di massa a quattro poli (Shimadzu 2010-EV) operante con ioni positivi e utilizzando un'interfaccia APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*). La fase mobile era costituita da una miscela di acqua (A) e acetonitrile (B), entrambe contenenti lo 0.1% di acido formico. Il gradiente di eluizione utilizzato era formato dal 40% al 100% di B e aggiunto dopo 25 minuti, seguito da un periodo di re-equilibrazione fatto con il 40% di B prima della successiva iniezione. È stata utilizzata una colonna Phenomenex C<sub>18</sub>, 3  $\mu$ m, 100  $\times$  2.00 mm con flusso di solvente di 0.3 ml/min. Il coefficiente apparente di permeabilità ( $P_{app}$ , cm/s) è stato determinato dopo 90 minuti come descritto in letteratura [Matthias *et al.*, 2004]. L'esperimento è stato replicato tre volte e i risultati espressi come media  $\pm$  S.E.



**Fig. 18:** Modello sperimentale utilizzato per lo studio di permeabilità dei composti puri della specie *E. pallida* attraverso il monostrato cellulare di Caco-2.

## XI. Analisi del ciclo cellulare

Per l'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare, le cellule HL60 sono state seminate in piastre da 60 mm e trattate con diverse concentrazioni del composto  $\gamma$  per 96 ore. Successivamente  $1 \times 10^6$  cellule sono state raccolte, centrifugate e lavate in PBS e poi fissate in 2.5 ml di etanolo al 70% e incubate in ghiaccio per 30 min. Le cellule sono state centrifugate e sospese in una soluzione DNA-staining composta da RNase A (100  $\mu\text{g/ml}$ ), 0.05% di Triton-X-100 e ioduro di propidio (5 mg/ml), dove sono state lasciate ad incubare per 40 minuti a 37°C. Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di PBS e i campioni centrifugati ed infine risospesi per l'analisi citofluorimetrica utilizzando un citofluorimetro FACScan equipaggiato con un raggio laser di argon a 488 nm (BD Biosciences). Tutte le misurazioni sono state effettuate utilizzando le stesse coordinate strumentali e sono stati raccolti almeno 10,000 eventi per campione.

## **XII. Misurazione del flusso del Ca<sup>++</sup>**

La linea cellulare HL60 CB2-positiva è stata utilizzata per la misurazione dei flussi del Ca<sup>++</sup>. In particolare,  $1 \times 10^7$  cellule sono state incubate a 37°C per 20 minuti in Hanks' balanced salt solution contenente fluo3/AM ad una concentrazione finale di 4  $\mu$ M e 0.15 mg/ml di Pluronic F-127. Le cellule sono state diluite 1:5 in Hanks' balanced salt solution contenente l' 1% di siero fetale bovino e incubate per 40 min a 37°C. Dopo di che, sono state lavate tre volte con PBS e sospese in 500  $\mu$ l di Ca<sup>2+</sup>-free HEPES-buffered saline, contenente 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM glucosio, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EGTA, 1 g/l di albumina sierica bovina, 10 mM HEPES, a pH 7.4. Prima di effettuare la misurazione, le cellule sono state incubate per 7 minuti a 37°C e successivamente stimulate con l'estratto lipofilo di *E. pallida* oppure veicolo (controllo), in presenza o assenza dell'antagonista CB2 selettivo SR144528 (2  $\mu$ M) e poi analizzate al canale FL1 del citofluorimetro FACScan equipaggiato con un raggio laser di argon a 488 nm (BD Biosciences).

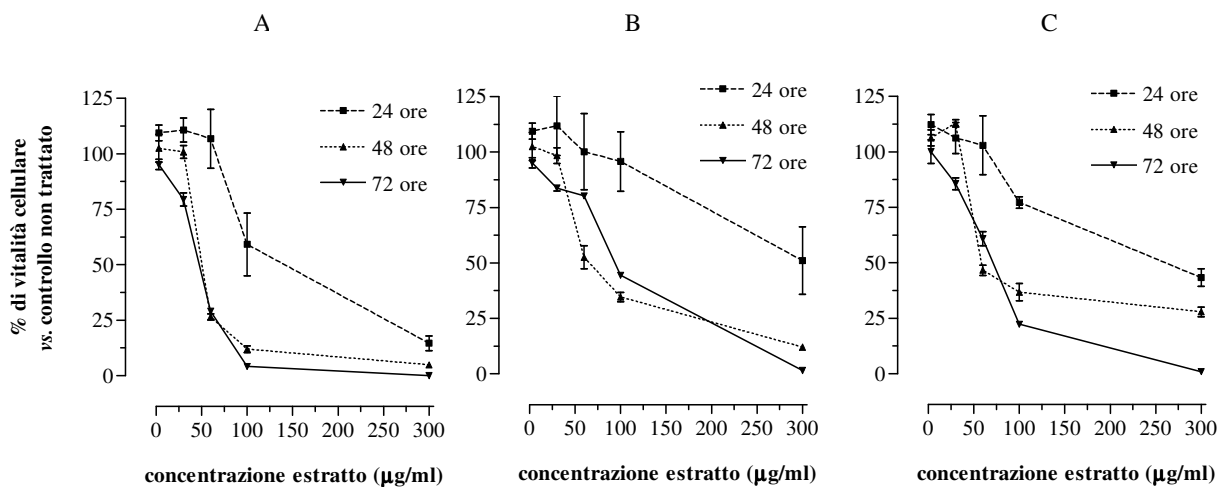
## **XIII. Analisi statistica dei dati**

I dati, ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti, sono presentati come valori medi  $\pm$  errore standard (S.E.). La significatività statistica dei risultati è stata valutata mediante il *t* di Student test oppure l'analisi ad una via della varianza (ANOVA) seguita dal post-test Newman-Keuls per confronti multipli.

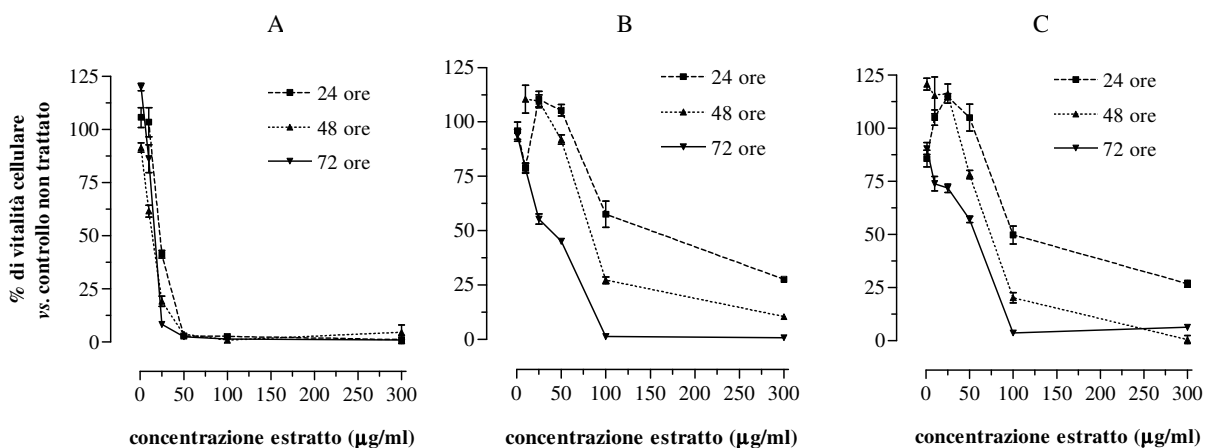
## RISULTATI E DISCUSSIONE

### I. Attività antiproliferativa degli estratti esanici delle tre specie medicinali di *Echinacea*

Gli estratti esanici delle tre specie medicinali di *Echinacea* sono stati testati nel range di concentrazione tra 1 e 300  $\mu\text{g/ml}$  per 24, 48 e 72 ore di esposizione su due linee cellulari tumorali umane, la MIA PaCa-2, di pancreas, e la COLO320, di colon. I risultati hanno mostrato che le tre specie di *Echinacea* sono in grado di bloccare la proliferazione cellulare in modo concentrazione e tempo dipendente su entrambe le linee tumorali (Fig. 19-20). I valori di  $\text{IC}_{50}$  calcolati dalle curve dose-effetto hanno evidenziato un differente profilo antiproliferativo tra le specie; in particolare l' *E. pallida* è risultata essere la più attiva con una maggiore potenza d'azione rispetto a *E. purpurea* ed *E. angustifolia*, che hanno mostrato un andamento tempo e concentrazione dipendente molto simile tra loro (Fig. 19-20, Tabella I) [Chicca A et al, 2007].



**Fig. 19:** Riduzione della vitalità cellulare della linea MIA PaCa-2, dopo trattamento con estratto esanico delle tre specie medicinali di *Echinacea* (*pallida* (A), *purpurea* (B), *angustifolia* (C) nel range di concentrazione 1-300  $\mu\text{g/ml}$  per 24, 48 e 72 ore di esposizione.



**Fig. 20:** Riduzione della vitalità cellulare della linea COLO320, dopo trattamento con estratto esanico delle tre specie medicinali di *Echinacea* (*pallida* (A), *purpurea* (B), *angustifolia* (C) nel range di concentrazione 1-300 µg/ml per 24, 48 e 72 ore di esposizione.

Questa differenza riflette molto bene il diverso profilo fitochimico degli estratti, infatti la radice di *E. pallida* è particolarmente ricca di composti acetilenici [Barnes J *et al.*, 2005; Pellati F *et al.*, 2006; Pellati F *et al.*, 2007], ma manca delle alchilamidi che invece sono costituenti principali delle radici di *E. purpurea* ed *E. angustifolia* [Barnes J *et al.*, 2005]. Diversi studi in letteratura hanno evidenziato che composti acetilenici provenienti da vari organismi vegetali sono in grado di determinare, *in vitro*, un potente effetto citotossico su diverse linee cellulari tumorali umane come le U937 (leucemiche), HeLa (cervice uterina), BCA-1 (mammella) e le SK-MEL-2 (di melanoma) [Kim YS *et al.*, 1989; Matsunaga H *et al.*, 1990; Ito A *et al.*, 2001; Lee YJ *et al.*, 2004; Whelan and Ryan, 2004; Zidorn C *et al.*, 2005; Choi HJ *et al.*, 2006; Park C *et al.*, 2006; Siddiq A and Dembitsky V, 2008]. Inoltre è stato suggerito che queste molecole siano in grado di promuovere il processo apoptotico [Choi HJ *et al.*, 2006; Park C *et al.*, 2006] e potenziare l'azione di farmaci antineoplastici classici come la mitomicina C [Matsunaga H *et al.*, 1994].

I nostri dati sperimentali hanno evidenziato un effetto antiproliferativo tempo-dipendente nel

range 24-72 ore [Fig.19-20, Tabella I].

Echinacea species	IC <sub>50</sub> (µg/ml) ± S.E.					
	MIA PaCa-2			COLO320		
	24 ore	48 ore	72 ore	24 ore	48 ore	72 ore
<i>pallida</i>	> 100	50.6 ± 3.9	46.4 ± 0.9**	20.9 ± 1.5**	10.1 ± 0.4**	10.5 ± 0.7**
<i>purpurea</i>	> 100	66.2 ± 6.6	62.9 ± 2.2	> 100	86.7 ± 0.6	25.3 ± 1.1
<i>angustifolia</i>	> 100	76.0 ± 2.0	82.8 ± 1.5	> 100	72.5 ± 3.4	31.8 ± 2.0

**Tabella I:** IC<sub>50</sub> calcolato dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con gli estratti esanici di radice delle tre specie medicinali di *Echinacea* sulle linee tumorali umane di pancreas MIA PaCa-2 e di colon COLO320 (\*\*p<0.01 *E. pallida* vs *E. angustifolia*, *E. purpurea*; n=9)

Questi risultati hanno anche chiaramente evidenziato una diversa sensibilità delle due linee tumorali al trattamento, infatti le cellule di colon risultano essere più sensibili all'azione antiproliferativa degli estratti come confermano i valori di IC<sub>50</sub> (Tabella I). Tale differenza risulta molto più evidente e significativa per la specie *E. pallida* anche a tempi di esposizione brevi (già dopo a 24 ore (Tabella I)) [Chicca A *et al.*, 2007].

In conclusione, gli estratti lipofili delle specie medicinali di *Echinacea* determinano un effetto antiproliferativo sia tempo che concentrazione dipendente e l'*E. pallida* risulta essere la specie più attiva. Queste esigenze hanno suggerito di proseguire lo studio in due direzioni: da un lato, indagare i meccanismi responsabili dell'effetto antiproliferativo dell'estratto lipofilo di *E. pallida*, con particolare attenzione ad un potenziale coinvolgimento del processo apoptotico; dall'altro procedere all'analisi di frazioni a diversa polarità derivanti dall'estratto esanico di *E. pallida*, arricchite in composti acetilenici fino ad arrivare all'identificazione, isolamento e caratterizzazione dei suoi principi attivi. Questa seconda parte del progetto è



consistita quindi in un frazionamento bio-guidato dell'estratto esanico di *E. pallida* mediante un processo comunemente utilizzato per identificare molecole bio-attive di origine naturale, così come è ben descritto anche nella review di Koehn e Carter recentemente pubblicata su *Nature Drug Discovery* [Kohen FE and Carter GT, 2005].

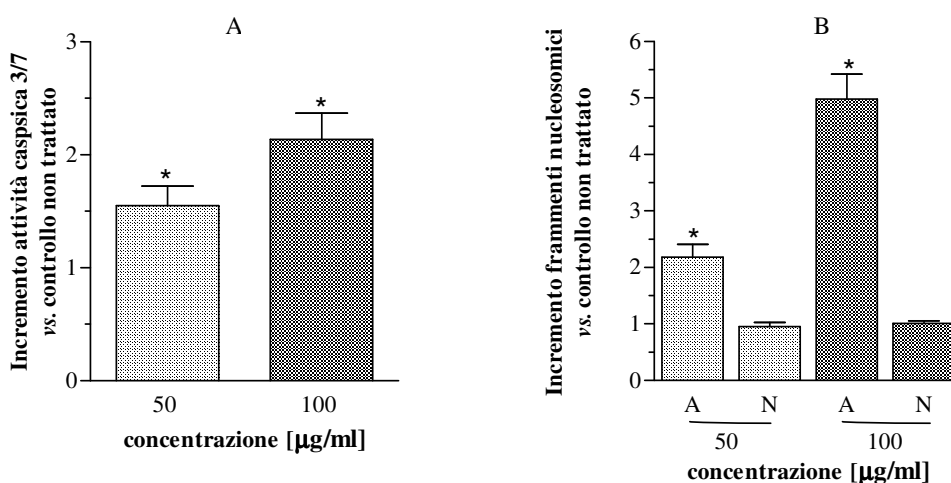
## **II. Analisi del meccanismo di morte cellulare associato all'effetto citotossico dell'estratto esanico di *E. pallida***

La morte cellulare è un processo che può avvenire per due principali meccanismi, la necrosi e l'apoptosi, che possono essere attivati da numerosi di stimoli endogeni ed esogeni. La morte necrotica avviene generalmente in seguito a insulti acuti che alterano in maniera irreparabile i processi vitali cellulari. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, invece svolge un ruolo molto importante a livello fisiologico, in quanto rappresenta un meccanismo centrale di omeostasi tissutale [Igney FH and Krammer PH, 2002], infatti, gli organismi multicellulari eliminano, attraverso l'apoptosi, cellule infettate, danneggiate o superflue e difetti di questo meccanismo di morte possono conferire resistenza cellulare alla chemioterapia e alla radioterapia [Miyashita T and Reed JC, 1993; Korsmeyer SJ, 1992]. In molti tumori, infatti, si osserva una ridotta attività del processo apoptotico che conferisce aggressività e malignità alla massa neoplastica. Diverse strategie terapeutiche anticancro quindi si basano proprio sul ripristinare il pattern molecolare alla base di questo meccanismo di morte cellulare.

L'estratto di *E. pallida* è stato saggiato per valutare il tipo di morte associato all'effetto citotossico osservato. Abbiamo così misurato due parametri importanti coinvolti nel processo apoptotico, l'attività delle caspasi 3/7 e la frammentazione internucleosomica del DNA. Le caspasi sono una famiglia enzimatica che svolge un ruolo chiave sia nelle fasi iniziali che nell'esecuzione dell'apoptosi, quindi una loro iperattività è indice dell'attivazione di questo meccanismo letale. La rottura del DNA in frammenti di 180-200 pb (o multipli) è un'altra

caratteristica peculiare del processo apoptotico, infatti l'endonucleasi endogena agisce rompendo il filamento di DNA in punti specifici, quali i linkers tra un nucleosoma e l'altro, generando così mononucleosomi o oligonucleosomi liberi che si accumulano nel citoplasma dove rimangono alcune ore prima della rottura della membrana citoplasmatica [Duke RC and Coehn JJ, 1986; Terui Y *et al.*, 1995; Bonfoco E, *et al.*, 1995].

I dati sperimentali hanno mostrato che l'estratto di *E. pallida* determina morte cellulare apoptotica in modo concentrazione dipendente dopo 24 ore di esposizione sulle due linee tumorali come confermato da entrambi i parametri misurati (Fig. 21-22).

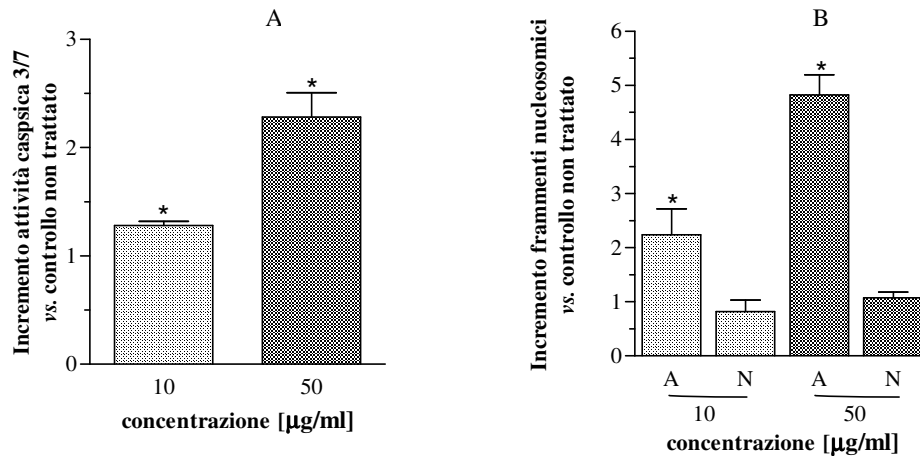


**Fig. 21:** Incremento dell'attività delle caspasi 3 e 7 (A) e della frammentazione nucleosomici del DNA (B), dopo trattamento della linea MIA PaCa-2 con estratto esanico di *E. pallida* alle concentrazioni di 50 e 100 µg/ml per 24 ore di esposizione (legenda: A: apoptosi; N: necrosi).

L'estratto è stato saggiato a due livelli di concentrazione, uno vicino al valore di IC<sub>50</sub> (dopo 72 ore di esposizione) e ad uno superiore, cioè 50 e 100 µg/ml per la linea MIA PaCa-2 e 10 e 50 µg/ml per la COLO320. In entrambi i casi si osserva un incremento significativo sia dell'attività delle caspasi 3/7 sia dell'arricchimento citosolico di frammenti di DNA; tutti e due i parametri sono già significativamente elevati alla concentrazione più bassa ma aumentano notevolmente alla concentrazione maggiore suggerendo quindi un effetto

concentrazione dipendente (Fig. 21-22). Quantitativamente, l'incremento delle caspasi è circa 1,5 e 2,3 volte superiore rispetto al controllo non trattato per la concentrazione più bassa e più alta, rispettivamente, mentre l'arricchimento nucleosomici nel citosol è rispettivamente circa 2 e 5 volte superiore al controllo (Fig. 21-22). Questi risultati sembrano essere particolarmente rilevanti per la linea MIA PaCa-2 tenendo conto della bassa sensibilità di queste cellule al trattamento chemioterapico classico [Yang L *et al.*, 2003].

Abbiamo anche valutato l'arricchimento di frammenti nucleosomici a livello extracellulare (in accordo con il protocollo del kit "Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>", Roche) a cui si associa una precoce rottura della membrana plasmatica e il conseguente rilascio del suo contenuto citosolico all'esterno (marker di morte necrotica). Come riportato nei grafici 21 e 22, in nessuna condizione sperimentale saggiata è stata osservata una differenza significativa rispetto al controllo non trattato.



**Fig. 22:** Incremento dell'attività delle caspasi 3 e 7 (A) e della frammentazione nucleosomici del DNA (B), dopo trattamento della linea MIA PaCa-2 con estratto esanico di *E. pallida* alle concentrazioni di 10 e 50 µg/ml per 24 ore di esposizione (legenda: A: apoptosi; N: necrosi).

In conclusione, l'estratto lipofilo di *E. pallida* esplica il suo effetto citotossico, almeno in parte coinvolgendo il meccanismo di morte cellulare apoptotica in modo concentrazione dipendente e senza un coinvolgimento significativo della necrosi [Chicca A *et al.*, 2007].

### **III. Valutazione dell'effetto citotossico di frazioni a polarità crescente derivanti dall'estratto lipofilo di *E. pallida***

I risultati di citotossicità ottenuti per gli estratti di *Echinacea* hanno chiaramente evidenziato che la specie *E. pallida* esplica il suo effetto con maggior potenza rispetto alle altre due specie, ed è caratterizzato da un valore di IC<sub>50</sub> medio di 28.5 µg/ml sulle due linee tumorali saggiate. Questo valore è in linea con il criterio stabilito dall'American National Cancer Institute (IC<sub>50</sub> inferiore 30 µg/ml) per legittimare l'indagine di un estratto naturale e proseguire nel suo frazionamento bio-guidato fino all'isolamento dei principi attivi [Suffness and Pezzuto, 1990]. Dall'estratto etanico di *E. pallida* sono state così ottenute frazioni a diversa polarità (numerate da 1 a 10 in ordine crescente di polarità) arricchite nei singoli composti puri. Tali frazioni sono state saggiate alle concentrazioni di 3 e 30 µg/ml dopo 72 ore di esposizione. Su entrambe le linee cellulari, alla concentrazione più bassa saggiata, nessuna frazione ha determinato una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare significativamente minore rispetto a controlli non trattati, mentre a 30 µg/ml la maggior parte di esse ha mostrato un effetto antiproliferativo molto rilevante, in alcuni casi superiore al 90-95 % (Tabella II).

Questo risultato conferma che i composti acetilenici presenti nell'estratto di *E. pallida* sono responsabili dell'effetto citotossico evidenziato dall'estratto "in toto" e in base alla differenza di potenza d'azione riportata per le singole frazioni (Tabella II) è ipotizzabile un diverso contributo di questi composti all'effetto antiproliferativo dell'estratto.

Effetto Antiproliferativo			
Frazioni	Acetileni identificati	MIA PaCa-2	COLO320
1	$\alpha + \beta$	n.a.	n.a.
2	$\gamma$	+++	+++
3	$\sigma_1 + \sigma_2 + \gamma$	+++	+++
4	$\epsilon_1$	+++	+++
5	$\epsilon_2$	++	+++
6	$\epsilon_1 + \eta$	+++	+++
7	$\epsilon_2 + \eta$	++	+++
8	$\sigma_2 + \gamma$	+++	+++
9	$\lambda$	+	+++
10	$\lambda + \mu_2$	n.a.	+

Legenda: +++ effetto antiproliferativo > 75%; ++ effetto antiproliferativo > 50%; + effetto antiproliferativo > 25%; n.a.: non attivo

**Tabella II:** Effetto antiproliferativo di frazioni a polarità crescente (30  $\mu\text{g/ml}$ ) derivanti dall'estratto esanico di *E. pallida* sulle linee tumorali umane di pancreas, MIA PaCa-2, e di colon, COLO320, dopo 72 ore di esposizione (n=9).

#### IV. Attività citotossica dei composti poliacetilenici e polienici di *E. pallida*

La parte finale del frazionamento bio-guidato ha portato all'isolamento dei composti puri dall'estratto esanico di *E. pallida*. E' stata valutata l'attività antiproliferativa dei singoli acetileni in un intervallo di concentrazione tra 0.1 e 100  $\mu\text{M}$  per 24, 48 e 72 ore di esposizione. Sono stati saggiati cinque composti (denominati con le lettere greche  $\gamma$ ,  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\lambda$ ,  $\mu_2$ ) identificati e caratterizzati nel Laboratorio di Fitochimica diretto dal Prof. Melegari presso l'Università di Modena e Reggio Emilia [Pellati F *et al.*, 2006]. Quasi tutte le molecole hanno evidenziato un effetto antiproliferativo sia tempo che concentrazione

dipendente, e, anche in questo caso, 72 ore è risultato il tempo di esposizione più efficace.

Come riportato in Tabella III, il composto  $\gamma$  ha mostrato un effetto citotossico significativamente maggiore rispetto agli altri acetileni su entrambe le linee cellulari. Sulla linea pancreatica, i due composti bicarbonilici  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  hanno mostrato una modesta attività antitumorale, mentre il trattamento con i composti  $\lambda$  e  $\mu_2$  ha prodotto una scarsa riduzione delle vitalità cellulare con  $IC_{50}$  superiori a 100  $\mu M$ .

Sulla linea di colon, i composti in esame hanno mostrato un profilo citotossico simile a quello riscontrato su MIA PaCa-2 ad eccezione del composto  $\lambda$  che ha mostrato un  $IC_{50}$  sensibilmente più basso rispetto a quello calcolato sulla linea di pancreas.

Composti acetilenici	$IC_{50}$ ( $\mu M$ ) $\pm$ S.E.		
	MIA PaCa-2 <sup>#</sup>	COLO320	HEK-293
$\gamma$	32.2 $\pm$ 3.9*	2.3 $\pm$ 0.3**	> 100
$\epsilon_1$	63.5 $\pm$ 1.1	22.8 $\pm$ 2.1	> 100
$\epsilon_2$	60.9 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.5	> 100
$\lambda$	> 100	21.8 $\pm$ 1.2	> 100
$\mu_2$	> 100	80.1 $\pm$ 0.2	> 100
5-FU	7.4 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.2	n.c.

Legenda: n.c.: non calcolato.

**Tabella III:**  $IC_{50}$  calcolati dopo 72 ore di esposizione per i composti acetilenici derivanti dall'estratto esanico di *E. pallida* sulle due linee tumorali umane MIA PaCa-2 e colon COLO320 e sulla linea non tumorale HEK-293 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  composto  $\gamma$  vs gli altri acetileni; <sup>#</sup> $p < 0.01$   $IC_{50}$  su MIA PaCa-2 vs  $IC_{50}$  su COLO320; n=9).

La linea di colon è risultata, inoltre, più sensibile al trattamento con i composti puri e, in

particolare, la citotossicità del composto  $\gamma$  è risultata 15 volte inferiore a quello ottenuto sulla linea MIA PaCa-2 (Tabella III). Questa differente sensibilità delle due linee cellulari al trattamento è simile a quella osservata per gli estratti lipofili [Chicca A *et al.*, 2007].

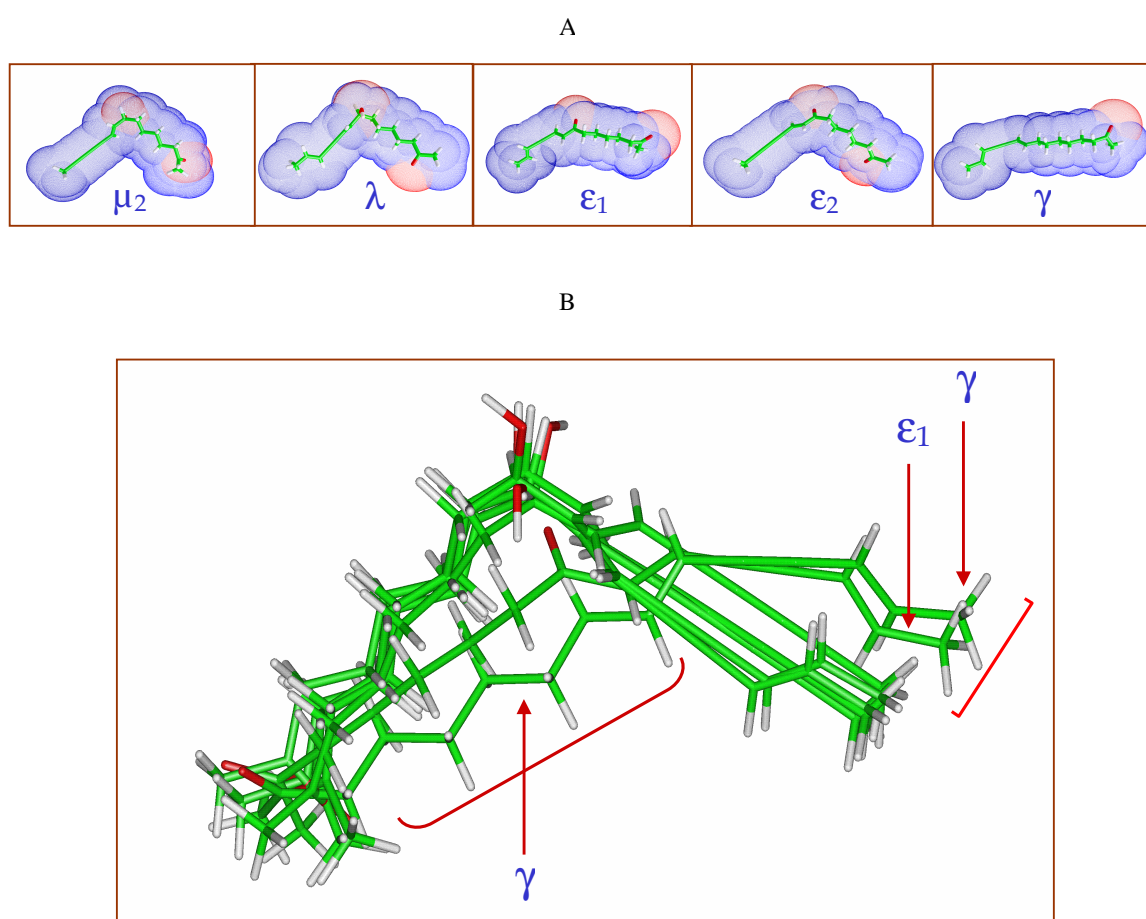
I composti hanno evidenziato inoltre una selettività d'azione verso le cellule tumorali, infatti i risultati ottenuti sulla linea cellulare non tumorale HEK-293 non hanno evidenziato un effetto citotossico significativo (Tabella III) [Chicca A *et al.*, 2008].

Il composto  $\gamma$  è risultato il più interessante della serie anche alla luce del fatto che i valori di  $IC_{50}$  calcolati sono paragonabili a quelli ottenuti sulle stesse linee con il 5-Fluorouracile (5-FU), farmaco utilizzato in terapia prevalentemente contro tumori del colon [Omura K, 2008; Aung KL *et al.*, 2007] e in associazioni chemioterapiche nel trattamento di tumori pancreatici [Oettle H and Neuhaus P, 2007; Lee JJ and Chu E, J 2007].

#### **V. Analisi dei parametri SASA (*Solvent- Accessible Surface Area*)**

I valori di  $IC_{50}$  calcolati sulle due linee tumorali hanno mostrato una differenza significativa nell'effetto citotossico dei diversi acetileni, nonostante la forte analogia strutturale di questi composti (Fig. 14). Al fine di formulare un'ipotesi plausibile di questa differente attività, è stata effettuata una valutazione delle caratteristiche associate alla struttura chimica delle singole molecole, quali la distribuzione spaziale degli atomi e l'accessibilità della molecola ai solventi di natura polare e non polare (un importante indice del bilancio idro-lipofilo della molecola). In collaborazione con la Prof.ssa Bianucci e la Dott.ssa Massarelli, del Dipartimento di Chimica industriale dell'Università di Pisa, è stata effettuata un'analisi computazionale dei composti acetilenici, dove le molecole sono state ottimizzate in mezzo acquoso applicando consecutivamente due algoritmi (*steepest descent* e *conjugate gradient*) di minimizzazione energetica, del programma Discover. Dalle strutture così ottimizzate, e mostrate, si evince la disposizione tridimensionale più probabile e con il più basso contenuto

energetico (Fig. 23A). Inoltre, da una sovrapposizione di tali strutture (Fig. 23B), effettuata tramite appositi software, è stato possibile osservare che i composti  $\mu_2$ ,  $\lambda$  e  $\epsilon_2$  sono completamente sovrapponibili, mentre sia il composto  $\gamma$  che  $\epsilon_1$  si discostano dagli altri nella porzione terminale della catena alchilica e il composto  $\gamma$  presenta anche una disposizione della catena carboniosa che si discosta completamente da tutte le altre molecole, probabilmente in seguito della mancanza del secondo gruppo carbonilico (come  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$ ) o dell'ossidrile (come  $\mu_2$  e  $\lambda$ ) (Fig. 14).



**Fig. 23:** Strutture tridimensionali dei singoli acetileni isolati da *E. pallida* ottimizzate in ambiente acquoso (A). Sovrapposizione delle strutture molecolari dei composti puri (B).

Le singole strutture tridimensionali mostrate in figura 23A sono state sottoposte al calcolo del



SASA e delle sue principali componenti, quella polare e quella non polare i cui valori sono riportati in tabella IV. In particolare, il composto  $\gamma$  presenta la componente polare più bassa e quella non polare più alta rispetto a tutti gli altri acetileni da cui segue il maggiore rapporto non polar/polar. Ciò indica una elevata accessibilità della molecola a solventi non polari e molto poco a quelli idrofili determinando un bilancio idro-lipofilo molto basso, da cui segue che il  $\gamma$  è il composto maggiormente lipofilo tra tutti quelli analizzati.

Acetileni	SASA total( $\text{\AA}^2$ )	Polar-SASA( $\text{\AA}^2$ )	Non Polar-SASA( $\text{\AA}^2$ )	Non polar/polar SASA
$\gamma$	550,8	38,33	512,5	13,38
$\epsilon_1$	561,5	66,54	495,0	7,44
$\epsilon_2$	554,1	66,31	487,8	7,36
$\lambda$	581,3	86,54	494,7	5,72
$\mu_2$	567,6	90,15	477,5	5,30

**Tabella IV:** Valori dei parametri SASA (total, polar; non polar; non polar/polar) calcolati per i singoli acetileni isolati dall'estratto lipofilo di *E. pallida*

Dalla correlazione con la citotossicità dei singoli acetileni (espressa tramite i valori di  $IC_{50}$ ) è emersa una diretta proporzionalità con la componente polare e una inversa proporzionalità con la componente non polare del SASA, da cui è stato possibile ipotizzare che una maggiore lipoficità della molecola determina un incremento del loro effetto citotossico [Chicca A *et al.*, 2008].

## **VI. Valutazione della potenziale biodisponibilità orale degli acetileni presenti nell'estratto di *E. pallida***

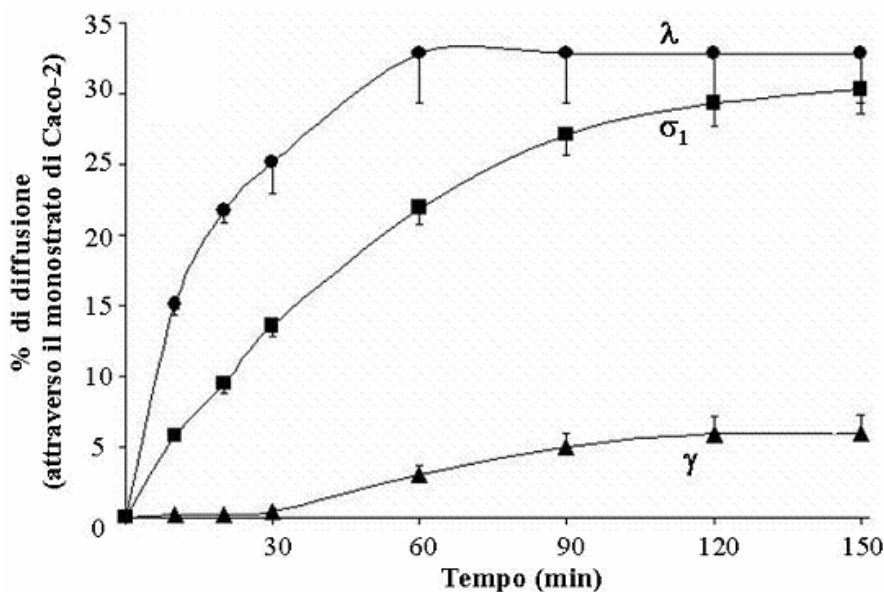
La linea cellulare Caco-2, pur derivando da adenocarcinoma umano di colon, a causa della somiglianza morfologica e funzionale con le cellule epiteliali intestinali [Hidalgo IJ *et al.*, 1989; Hilgers AR *et al.*, 1990; Bohets H *et al.*, 2001] rappresenta uno dei modelli scientificamente riconosciuti e più utilizzati sia dalle industrie farmaceutiche che dalla autorità di controllo come standard per il saggio di screening in grado di predire la permeabilità intestinale di molecole e composti somministrati oralmente nell'uomo; questo perché la permeabilità attraverso il monostrato di Caco-2 si correla molto bene con l'assorbimento *in vivo* nell'uomo [Artursson P *et al.*, 2001; Yamashita S *et al.*, 2000; Artursson P and Karlsson J, 1991].

Visto che un recente studio ha dimostrato la presenza elevata di poliacetileni e polieni in preparati commerciali a base di *E. pallida* [Pellati F *et al.*, 2006] e che in letteratura non ci sono dati farmacocinetici riguardanti gli acetileni dell'*Echinacea*, abbiamo valutato, in collaborazione con la Dott.ssa Matthias della MediHerb Research laboratories (Queensland, Australia), la loro potenziale biodisponibilità orale utilizzando proprio il monostrato di Caco-2 come modello sperimentale.

L'andamento cinetico dell'assorbimento mostrato in Fig. 24 evidenzia un rapido passaggio dei composti  $\lambda$ ,  $\sigma_1$  (già dopo 30 minuti) e  $\gamma$  (dopo 60 minuti) e il raggiungimento del plateau dopo 90 minuti dall'inizio dell'esperimento. La percentuale di diffusione attraverso il monostrato cellulare non è elevata (intorno al 30%) e ciò può essere dovuto a metabolizzazione dei composti, a ritenzione nelle membrane cellulari o sulle plastiche di a causa della loro elevata lipoficità.

In Tabella V è riportata la permeabilità apparente ( $P_{app}$ ), parametro molto importante calcolato alla fase di plateau dell'assorbimento dei composti (90 minuti), strettamente

correlato con la potenziale biodisponibilità orale. I valori di  $P_{app}$  sono tutti ampiamente superiori a  $1 \times 10^{-6}$  cm/s (limite al di sopra del quale viene considerato un assorbimento intestinale quasi completo [Artursson P and Karlsson J, 1991]) indicando un buon assorbimento “*per os*” di alcuni degli acetileni presenti nell’estratto di *E. pallida* tra cui del composto più attivo  $\gamma$  anche in alcuni preparati commerciali [Chicca A *et al.*, 2008].



**Fig. 24:** Cinetica di trasporto degli acetileni dell’estratto esanico di *E. pallida* attraverso il monostrato di Caco-2 per 2.5 ore.

Nonostante ciò, altre indagini dovranno essere svolte al fine di caratterizzare in modo più approfondito il profilo farmacocinetico di queste molecole, che potrebbe risentire intensamente dell’elevata lipoficità e dei problemi di stabilità che li caratterizzano.

Da un lato infatti, l’elevata idrofobicità facilita l’assorbimento intestinale, l’attraversamento dei tessuti e l’ingresso nella cellula, ma dall’altro risulta svantaggiosa per il transito attraverso i liquidi biologici. Tale caratteristica fisica potrebbe creare i presupposti, in ambiente idrofilo, per una aggregazione sovramolecolare degli acetileni a cui potrebbe conseguire una variazione della concentrazione realmente disponibile al sito bersaglio, così

come è stato ampiamente descritto dal gruppo del Dott. Gertsch per alcune alchilamidi presenti nell' *E. purpurea* ed *E. angustifolia* [Raduner S *et al.*, 2007]. Questo fenomeno può influenzare la biodisponibilità orale di queste molecole nell'uomo, ma anche limitarne la sperimentazione *in vitro*; per i composti acetilenici, nelle nostre condizioni sperimentali, è stata quindi valutata preventivamente la capacità di formare aggregati sovramolecolari in relazione alla concentrazione.

Un altro aspetto importante che può alterare le caratteristiche farmacocinetiche così come la sperimentazione *in vitro* di alcuni poliacetileni e polieni, è la loro scarsa stabilità. Questi composti sono infatti fotosensibili e si ossidano facilmente in seguito ad una prolungata esposizione all'aria o all'umidità e se non vengono conservati a basse temperature, specialmente quando si trovano in soluzione.

Acetileni	P apparente ( $\times 10^{-6}$ cm/sec)
$\lambda$	$49.0 \pm 7.4$
$\sigma_1$	$32.7 \pm 3.5$
$\gamma$	$10.1 \pm 3.2$
<b>Acido cicorico</b>	$0.48 \pm 0.11$
<b>Alchilamide (PM 247)</b>	$57.4 \pm 3.2$

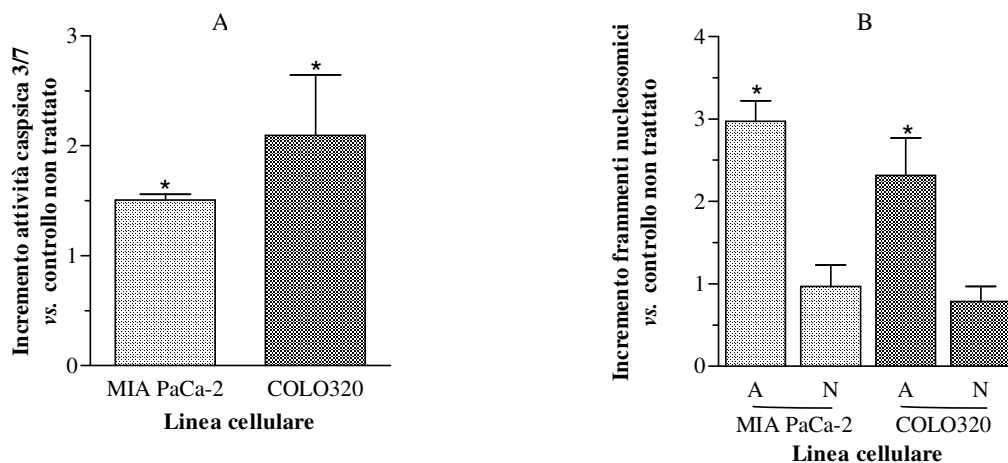
**Tabella V:** Permeabilità degli acetileni attraverso il monostrato di Caco-2 dopo 90 minuti. I composti  $\lambda$ ,  $\sigma_1$  e  $\gamma$  derivano dalla specie *E. pallida*, mentre l'alchilamide a PM 247 e l'acido cicorico dall'*E. angustifolia* e *E. purpurea*, utilizzati come controllo positivo e negativo rispettivamente [Matthias A *et al.*, 2004]

## **VII. Indagine dell'effetto citotossico del composto $\gamma$ e dei potenziali meccanismi ad esso associati**

In seguito ai risultati di citotossicità e di biodisponibilità, il composto  $\gamma$  è risultato il più attivo tra quelli saggiati ed anche uno dei pochi potenzialmente biodisponibili, quindi l'ultima parte dello studio si è concentrata su questa molecola, in particolare per confermarne l'effetto antitumorale ampliando il numero di linee tumorali saggiate, caratterizzarne il meccanismo di morte cellulare e indagare potenziali meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto citotossico.

### **VII.I Valutazione del meccanismo di morte cellulare associato al trattamento con il composto $\gamma$**

Per la valutazione del meccanismo di morte cellulare, sono stati indagati l'attività caspatica e la frammentazione internucleosomica del DNA, già presi in esame per l'estratto lipofilo di *E. pallida*. I dati ottenuti hanno evidenziato che l'apoptosi contribuisce in modo sostanziale all'effetto citotossico del composto  $\gamma$ , senza un coinvolgimento significativo della necrosi. Su entrambe le linee tumorali infatti, si osserva un incremento dei frammenti internucleosomici di DNA presenti nel citoplasma, mentre non si evidenzia alcuna variazione percentuale dei frammenti di DNA extracitosolici. Inoltre, l'incremento significativo dell'attività caspatica 3/7 (circa 1,5-2 volte) rispetto ai controlli non trattati, indica un coinvolgimento di questi enzimi nel meccanismo d'azione del composto in esame (Fig. 25) [Chicca A *et al.*, 2008].



**Fig. 25:** Incremento dell'attività delle caspasi 3 e 7 (A) e della frammentazione nucleosomica del DNA (B), dopo trattamento per 24 ore di esposizione con il composto  $\gamma$  alla concentrazioni di 30 e 5  $\mu\text{M}$  rispettivamente della linea MIA PaCa-2 e COLO320 (legenda: A: apoptosi; N: necrosi).

## VII.II Effetto citotossico del composto $\gamma$ su diverse linee cellulari

I dati ottenuti dimostrano una chiara attività antiproliferativa del composto  $\gamma$  sulle due linee tumorali trattate, MIA PaCa-2 e COLO320, con valori di  $\text{IC}_{50}$  nell'ambito micromolare. Questo composto è stato saggiato nelle stesse condizioni sperimentali su altre linee cellulari umane, in particolare una di tumore mammario, MCF-7 e due linee leucemiche, HL60 e Jurkat. I valori di  $\text{IC}_{50}$  calcolati dalle curve dose-effetto (compresi tra 2 e 20  $\mu\text{M}$ ) e riportati in tabella VI confermano i dati di citotossicità ottenuti sulle linee di pancreas e di colon.

$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ S.E.					
Acetilene	MIA PaCa-2	COLO320	HL60	MCF-7	Jurkat
$\gamma$	32.1 $\pm$ 3.9	2.3 $\pm$ 0.3	21.3 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.6

**Tabella VI:**  $\text{IC}_{50}$  calcolati dopo 72 ore di esposizione con il composto  $\gamma$  sulle linee tumorali umane MIA PaCa-2, COLO320, HL60, MCF-7, Jurkat (n=9).

### VII.III Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare dopo trattamento con il composto $\gamma$

L'analisi citofluorimetrica della distribuzione del ciclo cellulare è stata effettuata utilizzando la linea tumorale HL60 dopo 96 ore di trattamento con il composto  $\gamma$ . Da questa analisi si è evidenziato un significativo spostamento della percentuale di cellule in fase  $G_1$  senza alterazione delle fasi S e  $G_2$ . L'incremento in  $G_1$  è dipendente dalla concentrazione del composto, infatti, come mostrato in tabella VII, questo fenomeno aumenta all'aumentare della concentrazione saggiata. Questo risultato, che andrà confermato anche su altre linee tumorali nelle quali il composto  $\gamma$  induce un effetto citotossico, ci permette comunque di ipotizzare che, almeno parzialmente, il suo meccanismo d'azione sia determinato dall'interazioni con specifici targets cellulari che portano ad un blocco del ciclo in fase  $G_1$ .

% di distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare			
[ $\mu$ M] composto $\gamma$	Fase $G_1$	Fase S	Fase $G_2$
0 (controllo)	69.7 $\pm$ 1.9	12.6 $\pm$ 2.3	12.7 $\pm$ 1.2
20	80.9 $\pm$ 1.3*	9.9 $\pm$ 0.8	5.6 $\pm$ 1.6
40	88.0 $\pm$ 1.1**	7.9 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 1.0

**Tabella VII:** Distribuzione delle cellule HL60 nelle fasi del ciclo cellulare dopo 96 ore di trattamento con il composto  $\gamma$  (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  concentrazione di  $\gamma$  vs controllo).

Diversi studi hanno ipotizzano che il meccanismo molecolare con cui agiscono i composti poliacetilenici sia legato alla formazione a livello intracellulare di carbocationi stabili (per perdita di una molecola di acqua) che agiscono da agenti alchilanti prevalentemente verso

mercapto- e ammino- gruppi proteici o di altre macromolecole [Christensen LP and Brandt K, 2006]. L'effetto citotossico di poliacetileni derivanti da altri organismi vegetali è ben documentato in letteratura. Ad esempio, il falcarinolo e suoi analoghi, presenti prevalentemente nelle Apiaceae, sono in grado di inibire la crescita cellulare di diverse linee tumorali *in vitro* e *in vivo* in tumori umani xenotrapiantati in topo [Bernart MW *et al.*, 1996]. Studi successivi hanno individuato che tale effetto è associato, almeno parzialmente, ad un arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub> [Kuo YC *et al.*, 2002].

In linea con queste evidenze, il panaxydol, un poliacetilene isolato dalla radice del *Panax ginseng*, è in grado di inibire la crescita di diverse linee tumorali umane, tra cui la linea di melanoma SK-MEL-1, in seguito ad un blocco del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub>. In particolare, l'effetto del panaxydol è associato ad una riduzione dose-dipendente dell'attività della Cdk2 (*cyclin dependent kinase 2*), che forma un complesso sia con la ciclina E, che è sintetizzata nella fase tardiva di G<sub>1</sub> e ne stimola il passaggio alla fase S, sia con la ciclina A, che induce la transizione da G<sub>1</sub> a S e l'inizio della sintesi del DNA; inoltre è responsabile dell'incremento di una importante CKI (*cycline kinase inhibitor*), la p27<sup>KIP1</sup>, che, legandosi al complesso ciclina/Cdk in fase G<sub>1</sub>, determina un rallentamento della progressione del ciclo cellulare [Moon J *et al.*, 2000].

Un'altra classe di poliacetileni che inducono un significativo effetto citotossico, sono quelli isolati dalle spugne della specie *Petrosia*, di cui i principali rappresentanti sono il dideoxypetrosynil A e suoi analoghi. Un recente studio ne ha dimostrato la capacità di inibire la proliferazione della linea leucemica U937, capacità che è determinata da un blocco in fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare in maniera concentrazione-dipendente. Tale effetto si esplica tramite una up-regulation della ciclina D1, responsabile della transizione iniziale in G<sub>1</sub> e una down-regulation della ciclina E, responsabile della transizione G<sub>1</sub>-S. In conseguenza a questi eventi, il dideoxypetrosynil A riduce la fosforilazione (e quindi l'inattivazione) della pRB (proteina



retinoblastoma) che rimane fosforilata per un tempo prolungato e quindi non si dissocia dal fattore trascrizionale E2F, determinando di fatto un blocco in G<sub>1</sub>. La pRB inibisce anche la trascrizione della CKI p16, la quale quindi, si trova sovraespressa e induce un blocco in G<sub>1</sub> a cui segue il blocco della proliferazione cellulare [Park C *et al.*, 2006].

Alla luce di queste informazioni, possiamo ipotizzare che il composto  $\gamma$ , essendo particolarmente lipofilo possa penetrare con facilità nella cellula dove può svolgere diverse attività tra cui interagire con diverse macromolecole come le cicline, le Cdk e le CKI determinando un'alterazione del ciclo cellulare.

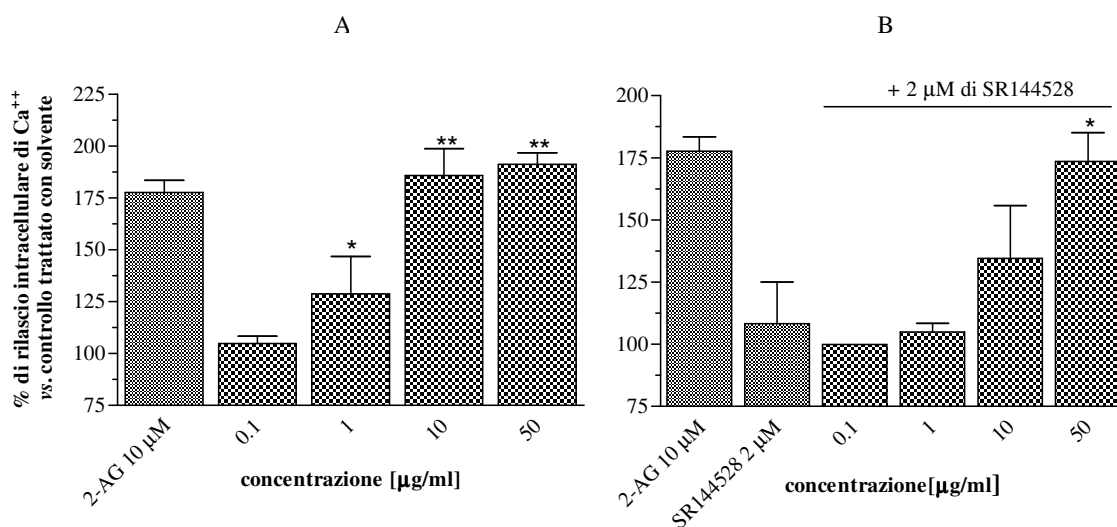
### **VIII. Attività cannabinomimetica dell'estratto esanico di *E. pallida* sul recettore CB2**

Diversi studi recenti hanno evidenziato un ruolo del sistema cannabinoide nel processo di cancerogenesi. Anche se il quadro generale relativo al meccanismo d'azione, risulta ancora contraddittorio, risultati interessanti, ottenuti sia *in vitro* che *in vivo*, mettono in luce la potenziale attività di cannabinoidi naturali e di sintesi come agenti antitumorali. Ciò nonostante, uno dei fattori limitanti per l'utilizzo terapeutico di queste molecole è il potenziale effetto psicotropo, che però in genere si manifesta a concentrazioni più alte di quelle terapeutiche (specie nell'ambito tumorale) e la cui principale responsabilità risiede nell'attivazione del recettore CB1 [Sarfaraz S *et al.*, 2008]. Anche per questo motivo, il sottotipo recettoriale CB2 ha assunto un notevole interesse anche dal punto di vista del potenziale utilizzo nella terapia anticancro. Molti dati sperimentali confermano che, seppur non ancora del tutto chiarito, il CB2 svolge un ruolo rilevante nella proliferazione cellulare a livello neoplastico. Ad esempio, l'attivazione CB2 selettiva su cellule di glioma induce apoptosi stimolando la sintesi *de novo* della ceramide [Sarfaraz S *et al.*, 2006]. Analogamente l'agonista CB2 selettivo JWH-133 è in grado di inibire la proliferazione cellulare e indurre morte apoptotica in cellule di melanoma umano e ridurre la massa di tumori umani

xenotratanti in topi atimici [Blazquez C *et al.*, 2006]. Questo recettore è implicato nel controllo della crescita cellulare anche in altri tumori, come quello pancreatico [Carracedo A *et al.*, 2006], della mammella [Grimaldi C *et al.*, 2006] e nei linfomi [Gustafsson K *et al.*, 2006].

Alla luce di queste ultime indicazioni e al fatto che le alchilamidi isolate dall'*E. purpurea* ed *E. angustifolia* agiscono come agonisti CB2 con una affinità maggiore degli endocannabinoidi anandamide e 2-arachidonilglicerolo [Raduner S *et al.*, 2006], durante un periodo trascorso in Svizzera presso il Laboratorio di Biologia Farmaceutica dell' ETH, (Swiss Federal Institute of Technology – Zurich) diretto dal Prof. KH Altmann, è stata valutata la potenziale azione CB2 agonista dell'estratto esanico di *E. pallida*.

Dai risultati si osserva che, come riportato in figura 26, l'estratto è in grado di determinare un incremento del flusso del  $Ca^{++}$  intracellulare in maniera concentrazione dipendente e con una potenza pari a quella dell'endocannabinoide 2-arachidonilglicerolo (2-AG). Sempre in Fig. 26 è riportata la completa reversione di tale effetto da parte dell'inibitore CB2 selettivo, SR144528 (2  $\mu$ M) per le concentrazioni 1 e 10  $\mu$ g/ml, mentre la liberazione del  $Ca^{++}$  è solo lievemente attenuata alla concentrazione di 50  $\mu$ g /ml di estratto.



**Fig. 26:** Incremento del flusso intracellulare di Ca<sup>++</sup> dopo trattamento con l'estratto di *E. pallida* a diverse concentrazioni, in assenza (A) o presenza (B) dell'inibitore CB2 selettivo SR144528 alla concentrazione di 2 µM. In entrambi i casi il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) è stato utilizzato come controllo positivo.

Lo ione Ca<sup>++</sup> è un secondo messaggero implicato in una moltitudine di vie di trasduzione del segnale, tra cui quella attivata dalla stimolazione del recettore CB2. I nostri dati, quindi, ci permettono di ipotizzare una potenziale interazione dell'estratto di *E. pallida* con tale recettore. Questa ipotesi è ulteriormente suffragata dal risultato ottenuto mediante spiazzamento del radioligando specifico per il recettore CB2 [<sup>3</sup>H]-CP-55,940, da parte dell'estratto di *E. pallida* che alla concentrazione di 20 µg/ml è risultata in grado spiazzare quasi il 90% del [<sup>3</sup>H]-CP-55,940 dal sito recettoriale.

Ulteriori studi sono in corso per confermare l'attività cannabinomimetica dell'estratto sul recettore CB2, e parallelamente verranno saggiati i singoli acetileni presenti nell'estratto stesso con lo scopo di verificare se uno o più di questi composti è responsabile dell'effetto osservato.

Alla luce dei dati presenti in letteratura, dei risultati di citotossicità ottenuti dal frazionamento bio-guidato dell'estratto di *E. pallida*, dai dati preliminari sul recettore CB2 e dal fatto che

tale recettore si trova espresso in una ampia varietà di tessuti tumorali, tra cui il carcinoma mammario [Caffarel MM *et al.*, 2006], del colon [Izzo AA, 2007], del pancreas [Carracedo *et al.*, 2006] nel melanoma [Blazquez C *et al.*, 2006] e nei linfomi [Gustafsson K *et al.*, 2006] un ulteriore ipotetico meccanismo d'azione degli acetileni potrà essere verificato.

## BIBLIOGRAFIA

Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2002, 27: 391-401.

Adinolfi B, Chicca A, Martinotti E, Breschi MC, Nieri P. Sequence characterized amplified region (SCAR) analysis on DNA from the three medicinal *Echinacea* species. *Fitoterapia* 2007, 78(1): 43-45.

Aggarwal S, Taneja N, Lin L, Orringer MB, Rehemtulla A, Beer DG. Indomethacin-induced apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells involves upregulation of Bax and translocation of mitochondrial cytochrome C independent of COX-2 expression. *Neoplasia* 2000, 2(4): 346-356.

Artursson P and Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991,175(3): 880-885.

Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 46(1-3): 27-43.

Aung KL, Smith DB, Neoptolemos JP. Adjuvant therapy for pancreatic cancer. *Expert. Opin. Pharmacother.* 2007, 8(15): 2533-2541.

Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR. Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. In *Human Medicinal Agents from Plants*. Edited by Beck WT. Alkaloids. In *Antitumor drug resistance*. Fox BW, Fox M, editors.. Berlin: Springer-verlag; 1984: 589.

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. *J. Pharm. Pharmacol.*

2005, 57(8): 929-954.

Barton R. Efficacy of echinilin for the common cold. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 41(5): 761-762.

Bauer R and Wagner H. Neue Ergebnisse zur Analytik von *Echinacea* Wurzeln. *Sci. Pharm.*, 1987, 55: 159-161.

Bauer R and Wagner H. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. *Economic Med. Plant Res.* 1991, 5: 253-321.

Bauer R and Wagner H. New results in the analysis of *Echinacea* roots. *Sci. Pharm.* 1996, 55: 159-161.

Bauer R, Jurcic K, Wagner W. Immunologische *in vivo* und *in vitro* untersuchungen mit *Echinacea*-extracten. *Arzeim. Forsch Drug Res.* 1998, 38: 276-278.

Bauer R. Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea* phytopharmaceuticals. In *Immunomodulatory Agents from Plants*, Ed. Wagner H, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland 1999, 41-88.

Barrett BP, Brown RL, Locken K, Maberry R, Bobula J, D'Alessio D. Treatment of the common cold with unrefined *Echinacea*. *Ann. Inter. Med.* 2002, 137: 939-946.

Bernart MW, Cardellina JH 2nd, Balaschak MS, Alexander MR, Shoemaker RH, Boyd MR. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J. Nat. Prod.* 1996, 59(8): 748-753.

Beuscher N, Bodinet C, Willigmann I, Egert D. Immune modulativ properties of root extracts of different *Echinacea* species. *Z. Phytother.* 1995, 16 (3): 157-166.

Binns SE, Baum BR, Arnason JT. A taxonomic revision of the genus *Echinacea* (Heliantheae: Asteraceae). *Systematic Bot.* 2002, 27(3): 610-632.

Binns SE, Livesey JF, Arnason JT Baum BR. Phytochemical variation in *Echinacea* from

roots and flowerheads of wild and cultivated populations. *J. Agric. Food Chem.* 2002(a), 50: 3673-3687.

Binns SE, Hudson J, Merali S, Arnason JT. Antiviral activity of Characterized extracts from *Echinacea* spp. (*Heliantheae: Asteraceae*) against *Herpes simplex* virus (HSV-1). *Planta Med.* 2002(b), 68 (9): 780-783.

Bisset NG. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. Wichtl M (ed), German edition, 1994, 182-184.

Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 2006, 20(14): 2633-2635.

Bodinet C and Beuscher N. Antiviral and immunological activity of glycoproteins from *Echinacea purpurea* radix. *Planta Med.* 1991, 57(S2): A33.

Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, Anciaux K, Verboven P, Meuldermans W, Lavrijsen K. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr. Top. Med. Chem.* 2001, 1(5): 367-383.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92(16): 7162-7166.

Bone K. *Echinacea*: what makes it work? *Alt. Med. Rev.* 1997, 2(2): 87-93.

Bradley PR. "*British Herbal Compendium*" vol.1. Bournemouth: British Herbal Medicine Association. 1992.

Brinkeborn R, Shah D, Geissbuhler S, Degenring FH. Echinaforce<sup>®</sup> in the treatment of acute colds. *Schweiz Zschr GansheitsMedizin.* 1998, 10: 26-29.

Bruni A. *Farmacognosia generale e applicata*. Ed. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova,

Copyright 1999, 12: 314-315.

Blumenthal M. (Ed.). The complete German Commission E monographs, therapeutic guide to herbal medicines. *American Botanical Council*, Austin, 1998.

Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT. An in vitro evaluation of human cytochrome P4503A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* 2000, 7: 273-282.

Bukovsky M, Kostalova D, Magnusova R, Vaverkova S. Testing for immunomodulating effects of ethanol-water extracts of above-ground parts of the plants *Echinaceae* (Moench) and *Rubdeckia L.* *Cesk Farm.* 1993, 42: 228-231.

Burger RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. *Echinacea*-induced cytokine production by human macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* 1997, 19: 371-379.

Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res.* 2006, 66(13): 6615-6621.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, Iovanna JL. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 2006, 66(13): 6748-6755.

Cheminat A, Zawatzky R, Becker H, Brouillard R. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structure and biological activity. *Phytochem.* 1988, 27: 2787-2794.

Chicca A, Adinolfi B, Martinotti E, Fogli S, Breschi MC, Pellati F, Benvenuti S, Nieri P. Cytotoxic effects of *Echinacea* root hexanic extracts on human cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 110(1): 148-153.

Chicca A, Pellati F, Adinolfi B, Matthias A, Massarelli I, Benvenuti S, Martinotti E, Bianucci AM, Bone K, Lehmann R, Nieri P. Cytotoxic activity of polyacetylenes and polyenes isolated from roots of *Echinacea pallida*. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 153(5): 879-885.



Chithra P, Sajithal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *J. Ethnopharmacol.* 1998, 59: 179-186.

Choi HJ, Yee SB, Park SE, Im E, Jung JH, Chung HY, Choi YH, Kim ND. Petrotetrayndiol A induces cell cycle arrest and apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells through cytochrome c-mediated activation of caspases. *Cancer Lett.* 2006, 232: 214-225.

Christensen LP, Brandt K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41(3): 683-693.

Classen B, Thude S, Blaschek W, Wack M, Bodinet C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. *Phytomedicine* 2006, 9-10:688-694.

Clifford LJ, Nair MG, Rana J, Dewitt DL. Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Phytomedicine* 2002, 9(3): 249-253.

Coeugniet E and Kuhnast R. Recurrent candidiasis: adjuvant immunotherapy with different formulations of Echinacin<sup>®</sup>. *Therapiewoche* 1986, 36: 3352-3358.

Coeugniet EG and Elek E. Immunomodulation with *Viscum album* and *Echinacea purpurea* extracts. *Onkologie* 1987, 10(3): 27-33.

Cragg GM and Newman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.* 1999, 17: 153-163.

Cragg GM and Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100(1-2): 72-79.

Croxford JL and Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J. Neuroimmunol.* 2005, 166(1-2): 3-18.

Di Gianni LM, Garber JE, Winer EP. Complementary and alternative medicine use among women with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20 suppl 18: 34S-38S.

Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol. Cancer*. 2003, 2: 10.

Duff Sloyer B, Urichuk L, Tywin C, Coutts R, Pang PK, Shan JJ. Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different *Echinacea* species. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001, 53: 849-857.

Duke RC and Cohen JJ. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.* 1986, 5(4): 289-299.

Dy GK, Bekele L, Hanson LJ, Furth A, Mandrekar S, Sloan JA, Adjei AA. Complementary and alternative medicine use by patients enrolled onto phase I clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22(23): 4810-4815. Erratum in: *J. Clin. Oncol.* 2005,23(1): 248.

El-Rayes BF, Ali S, Sarkar FH, Philip PA. Cyclooxygenase-2-dependent and -independent effects of celecoxib in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3(11):1421-1426.

Farnsworth NR. The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba. Found. Symp.* 1990, 154: 2-11.

Facino RM, Carini M, Aldini G, Marinello C., Arlandini E, Frantoi L, Colombo M, Pietta P, Mauri P. Direct characterization of caffeoyl esters with anti-hyaluronidase activity in crude extracts from *Echinacea angustifolia* roots by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Farmaco* 1993, 48: 1447-1461.

Facino RM, Carini M, Aldini G, Saibene L, Pietta P, Mauri P. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med.* 1995, 61: 510-514.

Gallo M and Koren G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on *Echinacea*. *Can. Fam. Physician* 2001, 47: 1727-1728.

Gan XH, Zhang L, Heber D, Bonavida B. Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by *Echinacea* water soluble extracts: recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis. *Int. Immunopharmacol.* 2003, 3(6): 811-824.

Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2000,19(1-2): 19-27.

Gertsch J, Schoop R, Kuenzle U, Suter A. *Echinacea* alkylamides modulate TNF-alpha gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 2004, 577(3): 563-569.

Gertsch J. Immunomodulatory Lipids in Plants: Plant Fatty Acid Amides and the Human Endocannabinoid System. *Planta Med.* 2008, in press

Giusti E. *Echinacea*. In *Botanica, chimica, farmacologia e terapia*. Erboristeria Domani, 1992, 64-67.

Goel V, Chang C, Slama JV, Barton R, Bauer R, Gahler R, Basu TK. *Echinacea* stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats. *Int. Immunopharmacol.* 2002, 2: 381-387.

Goel V, Lovlin R, Chang C, Slama JV, Barton R, Gahler R, Bauer R, Goonewardene L, Basu TK. A proprietary extract from the echinacea plant (*Echinacea purpurea*) enhances systemic immune response during a common cold. *Phytother. Res.* 2005, 19(8): 689-694.

Gonda R, Tomoda M, Ohara N, Takada K. Arabinogalactan core structure and immunological activities of ukorian C, and acidic polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*. *Biol. Pharm. Bull.* 1993, 16(3): 235-238.

Graisbauer M, Scheleich T, Stickl HA, Wilczek I. The effect of *Echinacea purpurea* Moench on phagocytosis in granulocytes measured by chemiluminescence. *Arzneimittelforschung*, 1990, 40: 594-598.

Grimaldi C, Pisanti S, Laezza C, Malfitano AM, Santoro A, Vitale M, Caruso MG, Notarnicola M, Iacuzzo I, Portella G, Di Marzo V, Bifulco M. Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* 2006, 312(4): 363-373.

Grimm W and Muller HH. A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. *Am. J. Med.* 1999, 106: 138-143.

Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J. Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol. Pharmacol.* 2006, (5): 1612-1620.

Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986, 213: 15-24.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002, 23(3): 144-50.

Harwell WB. Unusual presentation of North American blastomycosis. *J. Tenn. Med. Assoc.* 1982, 75(1): 20-21.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989, 96(3): 736-749.

Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 1990, 7(9): 902-910.

Hinz B, Woelkart K, Bauer R. Alkamides from *Echinacea* inhibit cyclooxygenase-2 activity in human neuroglioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 360(2): 441-446.

Hoheisel O, Sandberg M, Bertram S, Bulitta M, Schafer M. Echinagard<sup>®</sup> treatment shortens the course of the common cold: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Clin.*

*Res.* 1997, 9: 262-268.

Hsiang Y, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF RP, Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1985, 260: 14873-14878.

Hu C and Kitts DD. Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48: 1466-1472.

Hwang SA, Dasgupta A, Actor JK. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clin. Chim. Acta.* 2004, 343(1-2): 161-166.

Igney FH and Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71(6): 907-920.

Ito A, Cui B, ChÃ¡vez D, Chai HB, Shin YG, Kawanishi K, Kardono LB, Riswan S, Farnsworth NR, Cordell GA, Pezzuto JM, Kinghorn AD (2001). Cytotoxic polyacetylenes from the twigs of *Ochanostachys amentacea*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64: 246-248.

Izzo AA. The cannabinoid CB(2) receptor: a good friend in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 2007, 19(9): 704-708.

Kim YS, Lee YH, Kim SI. A possible mechanism of polyacetylene membrane cytotoxicity. *Korean J. Toxicol.* 1988, 4: 95-105

Kinghorn AD, Balandrin MF. North Carolina, USA: Oxford University Press USA, 1993: 2-12. [American Chemical Society Symposium Series].

Koehn FE and Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4(3): 206-220.

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992, 80(4): 879-886.

Kuo YC, Lin YL, Huang CP, Shu JW, Tsai WJ. A tumor cell growth inhibitor from

Saposhnikovae divaricata. *Cancer Invest.* 2002, 20(7-8): 955-964.

Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by the vinca alkaloids. *Cancer Res.* 1991, 51: 2212

Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentration. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 9552.

Kemp DE and Franco KN. Possible leukopenia associated with long-term use of *Echinacea*. *J. Am. Board Fam. Pract.* 2002, 15: 417-419.

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu, L, Perkins L, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukocyte Biol.* 2003, 74: 486-496.

Katzung BG. *Farmacologia generale e clinica*. Ed. Piccin Nuova Libreria, S.p.A., Padova, Copyright 2003.

Laasonen M, Harmia-Pulkkinen T, Simard CL, Michiels E, Rasanen M, Vuorela H. Fast identification of *Echinacea purpurea* dried roots using near-infrared ipetroscopy. *Anal. Chem.* 2002, 74: 2493-2499.

LaLone CA, Hammer KD, Wu L, Bae J, Leyva N, Liu Y, Solco AK, Kraus GA, Murphy PA, Wurtele ES, Kim OK, Seo KI, Widrlechner MP, Birt DF. *Echinacea* species and alkamides inhibit prostaglandin E(2) production in RAW264.7 mouse macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55(18): 7314-7322.

Lee JJ and Chu E. An update on treatment advances for the first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Cancer J.* 2007, 13(5): 276-281.

Lee JY, Hwang WI, Lim ST. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 93: 409-415.

Lersch C, Zeuner M, Bauer A, Siebenrock K, Hart R, Wagner F, Fink U, Dancygier H, Classen M. Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular

carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LCDY), *Echinacea purpurea* extracts (Echinacin<sup>®</sup>) and thymostimulin. *Arch. Geschwulstforsch* 1990, 60: 379-383.

Lersch C, Zeuner M, Bauer A, Siemens M, Hart R, Drescher M, Fink U, Dancygier H, Classen M. Nonspecific immunostimulation with low doses of cyclophosphamide (LCDY), thymostimulin and *Echinacea purpurea* extracts (Echinacin<sup>®</sup>) in patients with far advanced colorectal cancers: preliminary results. *Cancer Invest.* 1992, 10: 343-348.

Lohmann-Matthes ML and Wagner H. Macrophage activation by plant polysaccharides. *Z. Phytother.* 1989, 10 (2): 52-59.

Luettig B, Steinmuller C, Gifford GE, Wagner H, Lohmann ML. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 81: 669-675.

Matsunaga H, Katano M, Yamamoto H, Fujito H, Mori M, Takata K. Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38: 3480-3482.

Matsunaga H, Katano M, Saita T, Yamamoto H, Mori M. Potentiation of cytotoxicity of mitomycin C by a polyacetylenic alcohol, panaxytriol. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994, 33:291-297.

Matthias A, Blanchfield JT, Penman KG, Toth I, Lang CS, De Voss JJ, Lehmann RP. Permeability studies of alkylamides and caffeic acid conjugates from *Echinacea* using a Caco-2 cell monolayer model. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2004, 29(1): 7-13.

Matthias A, Addison RS, Penman KG, Dickinson RG, Bone KM, Lehmann RP. *Echinacea* alkalamide disposition and pharmacokinetics in humans after tablet ingestion. *Life Sci.* 2005, 77(16): 2018-2029.

Mc Dougall B, King PJ, Wu BW, Hostomsky Z, Reinecke MG, Robinson WE Jr. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42 (1): 140-

146.

Meadows DC, Mathews TB, North TW, Hadd MJ, Kuo CL, Neamati N, Gervay-Hague J. Synthesis and biological evaluation of geminal disulfones as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2005, 48(14): 4526-4534.

Melchart D, Wattner E, Brandmaier KL, Lerosch R. *Echinacea* root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections. *Arch. Family Med.* 1998, 7: 541-545.

Melchart D, Clemm C, Weber B, Draczynsky T, Worku F, Linde K, Weidenhammer W, Wagner H, Saller R. Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea* herba cell cultures to counteract undesired effects of chemotherapy - A pilot study. *Phytother. Res.* 2002, 16(2): 138-142.

Miller SC. *Echinacea*: a miracle herb against aging and cancer? *eCAM* 2005, 2(3): 309-314.

Miller LG. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interaction. *Arch. Intern. Med.* 1998, 158: 2200-2211.

Miyashita T and Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993, 81(1): 151-157.

Moon J, Yu SJ, Kim HS, Sohn J. Induction of G(1) cell cycle arrest and p27(KIP1) increase by panaxydol isolated from *Panax ginseng*. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 59(9): 1109-1116.

Müller-Jakic B, Breu W, Pröbstle A, Redl K, Greger H, Bauer R. In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med.* 1994, 60(1):37-40.

Mullins RJ and Heddle R. Adverse reactions associated with *Echinacea*: the Australian experience. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002, 88(1): 42-51.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 2003, 66(7): 1022-1037.



Nieri P, Adinolfi B, Morelli I, Breschi MC, Simoni G, Martinotti E. Genetic characterization of the three medicinal *Echinacea* species using RAPD analysis. *Planta Med.* 2003, 69(7): 685-686.

Oettle H and Neuhaus P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer: a critical appraisal. *Drugs.* 2007, 67(16): 2293-2310.

Omura K. Advances in chemotherapy against advanced or metastatic colorectal cancer. *Digestion* 2008, 77 Suppl 1: 13-22.

Park C, Kim GY, Kim GD, Lee WH, Cheong JH, Kim ND, Bae SJ, Jung JH, Choi YH. Suppression of U937 human monocytic leukemia cell growth by dideoxypetrosynol A, a polyacetylene from the sponge *Petrosia* sp., via induction of Cdk inhibitor p16 and down-regulation of pRB phosphorylation. *Oncol. Rep.* 2006, 16: 171-176.

Parnham MJ. Benefit-risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. *Phytomedicine* 1996, 3(1): 95-102.

Pellati F, Calò S, Benvenuti S, Adinolfi B, Nieri P, Melegari M. Isolation and structure elucidation of cytotoxic polyacetylenes and polyenes from *Echinacea pallida*. *Phytochemistry* 2006, 67(13): 1359-1364.

Pellati F, Calò S, Benvenuti S. High-performance liquid chromatography analysis of polyacetylenes and polyenes in *Echinacea pallida* by using a monolithic reversed-phase silica column. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1149(1): 56-65.

Percival SS. Commentary. Use of *Echinacea* in Medicine. *Biochem. Pharmacol.* 2000, 60: 8155-158.

Perry NB, Van Klink JW, Burregg EJ, Parmenter GA. Alkamide levels in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: a rapid analytical method revealing differences among roots, rhizomes, stems, leaves and flowers. *Planta Med.* 1997, 63: 58-62.

Perry NB, Burgess EJ, Glennie VA. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49: 1702-1706.

Raduner S, Majewska A, Chen JZ, Xie XQ, Hamon J, Faller B, Altmann KH, Gertsch J. Alkylamides from *Echinacea* are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J. Biol. Chem.* 2006, 281(20): 14192-14206.

Raduner S, Bisson W, Abagyan R, Altmann KH, Gertsch J. Self-assembling cannabinomimetics: supramolecular structures of N-alkyl amides. *J. Nat. Prod.* 2007, 70(6): 1010-1015.

Raso GM, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002, 54(10): 1379-1383.

Raucy JL. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab. Dispos.* 2003, 31: 533-539.

Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J. Clin. Oncol.*, 2000, (13): 2505-2514.

Rininger JA, Kickner S, Chigurupati P, McLean A, Franck Z. Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* 2000, 68(4): 503-510.

Robinson JrWe, Reinecke ME, Abdel-Malek S, Jia Q, Chow SA. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 6326-6331.

Roesler J, Steinmuller C, Kiderlen A, Emmendorffer A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Application of purified polysaccharides from cell cultures of plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and

*Candida albicans*. *Int. J. Immunopharmacol.* 1991, 13: 27-37.

Romiti N, Pellati F, Nieri P, Benvenuti S, Adinolfi B, Chieli C. P-glycoprotein inhibitory activity of lipophilic constituents of *Echinacea pallida* roots in a human proximal tubular cell line. *Planta Med.* 2008, in press.

Rowinsky EK and Donehower RC. The clinical pharmacology of vincristine and vindesine: does vindesine offer any advantage in clinical use? *Cancer Treat. Rev.* 1995, 215(21): 513.

Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 2006, 281(51): 39480-39491.

Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res.* 2008, 68(2): 339-342.

Schoneberger D. Influence of the immunostimulating effects of the pressed juice of *Echinacea purpurea* on the duration and intensity of the common cold: results of a double-blind clinical trial. *Forum Immunol.*, 1992, 2: 18-22.

Schwarz E, Metzeler J, Diedrich JP, Freudenstein J, Bode C, Bode JC. Oral administration of freshly expressed juice of *Echinacea purpurea* herbs fail to stimulate the nonspecific immune response in healthy young men: results of a double-blind, placebo-controlled crossover study. *J. Immunother.* 2002, 25(5): 413-420.

Shah SA, Sander S, White CM, Rinaldi M, Coleman CI. Evaluation of *echinacea* for the prevention and treatment of the common cold: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2007, (7): 473-480. Erratum in: *Lancet Infect. Dis.* 2007, (9):580.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2001, 276(21): 18075-18081.

Shimizi N, Tomaia M, Gonda R, Kanari M, Takanashi N. The major pectic arabinogalactan having activity on the reticuloendothelial system from the roots and rhizomes of

*Saposhnikovia divaricata*. *Chem. Pharm. Bull.* 1989, 37(5): 1329-1332.

Siddiq A, Dembitsky V. Acetylenic anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008, 8(2):132-70.

Soon SL, Crawford RI. Recurrent erythema nodosum associated with *Echinacea* herbal therapy. *J. Acad. Dermatol.* 2002, 44(2): 298-299.

South EH, Exon JH. Multiple immune functions in rats fed *Echinacea* extracts. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2001, 23(3): 411-421.

Sparreboom A, Cox MC, Acharya MR, Figg WD. Herbal remedies in the United States: potential adverse interactions with anticancer agents. *J. Clin. Oncol.* 2004, (12): 2489-24503.

Speroni E, Covoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra MC. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 79(2): 265-272

Spignoli G, Mercati V, Boncompagni E. *Guida bibliografica ai più noti fitoterapici*. Aboca s.s., Copyright 1999.

Steinmuller C, Roesler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Immunopharmacol.* 1993, 15: 605-614.

Stimpel M, Proksch A, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect. Immun.* 1984, 46: 845-849.

Stoll A, Renz J, Brack A. Isolation and constitution of Echinacoside, a glycoside from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Helv. Chim. Acta.* 1997, 33: 1877-1893.

Stuppner H. *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, 1985. Citato in: Bauer R, Wagner H. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. In: *Economic and Medicinal Plant Research*. Ed. Wagner H, Farnsworth NR, London: Academic Press

Limited, 1991, 5: 253-321.

[Subbaramaiah K. and Dannenberg AJ.](#) Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, 24(2): 96-102.

Suffness M and Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for bioactivity*, 1990, vol. 6. Academic Press, London, pp 71-133.

Terui Y, Furukawa Y, Kikuchi J, Saito M. Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J. Cell. Physiol.* 1995,164(1): 74-84.

Thude S, Classen B, Blaschek W, Barz D, Thude H. Binding studies of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. *Phytomedicine* 2006, 13(6): 425-427.

Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxigenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol. Cancer Ther.* 2002, 1(11): 929-935.

Tragni E, Galli CL, Tubaro A, Del Negro P, Della Loggia R. Anti-inflammatory activity of *E. angustifolia* fraction separated on the basis of molecular weight. *Pharmacol. Res. Commun.* 1988, 20(5): 87-90.

[Tseng WW, Deganutti A, Chen MN, Saxton RE, Liu CD.](#) Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 2002, 6(6): 838-843.

Turner RB, Riker DK, Gangemi JD. Ineffectiveness of *Echinacea* for prevention of experimental rhinovirus colds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44(6): 1708-1709.

Voaden D and Jacobson M. Tumor inhibitors. 3 identification and synthesis of an oncolytic hydrocarbon from American coneflower roots. *J. Med. Chem.* 1972, 15: 619-623.

Wacker A and Hilbig W. Virus inhibition by *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* 1978, 33: 89-102.

Wagner H, Stuppner H, Schafer W, Zenk M. Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochem.* 1988, 27: 119-126.

Whelan LC and Ryan MF . Effects of the polyacetylene capillin on human tumour cell lines. *Anticancer Res.* 2004, 24: 2281-2286.

Woelkart K, Marth E, Suter A, Schoop R, Raggam RB, Koidl C, Kleinhappl B, Bauer R. Bioavailability and pharmacokinetics of *Echinacea purpurea* preparations and their interaction with the immune system. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 44(9): 401-408.

Woelkart K and Bauer R. The role of alkamides as an active principle of *echinacea*. *Planta Med.* 2007, (7): 615-623.

Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, 10(3): 195-204.

Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res.* 2003, 63(20): 6815-6824.

Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A, Paxton JW. Interaction of herbs with cytochrome P450. *Drug Metab. Rev.* 2003, 35: 35-98.

Zidorn C, Johrer K, Ganzera M, Schubert B, Sigmund EM, Mader J, Greil R, Ellmerer EP, Stuppner H. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 2518-2523.