

**Katarina Zemljak**

**Terapijski potencijal huperzina A i njegovih  
derivata u liječenju Alzheimerove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakognozija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Biljane Blažeković.

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Biljani Blažeković na savjetima, razumijevanju i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su mi svojim radom omogućili stjecanje znanja i vještina u stručnom životu.*

*Posebno hvala mojoj obitelji koja me podupirala tijekom cijelog školovanja i omogućila mi osobni i stručni razvoj.*

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Alzheimerova bolest.....	2
1.2. <i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis. – kineska huperzija.....	3
1.3. Huperzin A.....	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	9
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	11
4.1. Pretklinički dokazi o djelovanju huperzina A.....	12
4.2. Klinički dokazi o djelovanju huperzina A.....	16
4.3. Derivati huperzina A i njihova djelotvornost.....	21
4.3.1. ZT-1.....	21
4.3.2. Bis(12) – hupiridon.....	24
4.3.3. Huprin X.....	25
4.4. Nove formulacije huperzina A i njegovih derivata.....	27
4.4.1. Transdermalni sustav huperzina A baziran na mikroemulziji.....	27
4.4.2. Gel za intranazalnu primjenu huperzina A.....	29
4.4.3. Potkožni implantati ZT-1.....	29
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. LITERATURA.....	32
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **1. UVOD**

## 1.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je kronično stanje koje zahtijeva skupu terapiju i predstavlja velik globalni javnozdravstveni problem. Opisao ju je prvi puta 1906. godine njemački psihijatar Alois Alzheimer kao progresivnu neurodegenerativnu bolest koja je karakterizirana kognitivnim oštećenjima, promjenom ponašanja i osobnosti bolesnika te poteškoćama u izvršavanju svakodnevnih aktivnosti. Bolest se obično javlja u srednjoj do starijoj životnoj dobi. Patološke promjene uključuju smanjenje broja neurona i sinapsi, tj. smanjenje sinaptičke gustoće u dubljim slojevima sljepoočne kore, u hipokampalnim regijama te u supstanciji nigri. Najčešći je tip demencije koji se susreće u kliničkoj praksi. Procjene upućuju na porast prevalencije te bolesti nakon 65. godine života, a očekuje se i povećanje broja bolesnika za 3 do 4 puta u narednih 30 godina. Bolest obično dovede do smrti unutar tri do deset godina od postavljanja dijagnoze (Pierce i sur., 2017).

Ekstracelularni senilni plakovi histološki su marker Alzheimerove bolesti u mozgu pacijenata. Glavna komponenta su im proteinski fragmenti  $\beta$ -amiloid ( $A\beta$ ). To su kratki peptidi građeni od 36-43 aminokiseline koji induciraju fosforilaciju  $\tau$  proteina, što dovodi do neurofibrilarnih promjena i, posljedično, stanične smrti (Ha i sur., 2011). Novije spoznaje upućuju na to da je unutarstanično nakupljanje  $A\beta$  tješnje povezano s patogeneom Alzheimerove bolesti od izvanstaničnog. Posljedica je unutarstaničnog stvaranja  $A\beta$  i ulaska izvanstaničnog  $A\beta$  u stanice. Smatra se da se u stanici  $A\beta$  nakuplja u mitohondrijima, te ulazi u interakciju s nekoliko enzima, što dovodi do oštećenja funkcije mitohondrija u vidu snižavanja razine ATP-a, povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva i posljedične pojave oksidativnog stresa te oštećenja neurona (Lei i sur., 2015).  $\beta$ -amiloid peptidi nastaju proteolizom membranski vezanog amiloid prekursor proteina (engl. *amyloid precursor protein*, APP). APP se može uklanjati neamiloidogenim  $\alpha$ -sekretaznim putem i amiloidogenim putem pomoću  $\beta/\gamma$ -sekretaza. Prvim putem nastaju topljivi fragmenti koji se izlučuju u izvanstanični matriks, a pokazali su neurotrofno i neuroprotektivno djelovanje. Drugim putem nastaju netopljivi  $A\beta$ -fragmenti za koje je utvrđeno da potiču apoptozu neurona (Tun i Herzon, 2012).

Iako je prošlo više od stoljeća od kada je otkrivena, danas još uvijek ne postoji lijek koji bi spriječio napredovanje ili učinkovito izliječio Alzheimerovu bolest. Terapija se sastoji od poboljšavanja kognitivnih sposobnosti pacijenta i smanjenja simptoma bolesti da bi se povećala kvaliteta života. U tu se svrhu koriste inhibitori acetilkolinesteraze (AChE) koji sprječavaju hidrolizu acetilkolina u sinaptičkoj pukotini i tako povećavaju njegovu

koncentraciju prethodno smanjenu zbog propadanja kolinergičkih neurona, te tako usporavaju napredovanje bolesti. U tu se skupinu ubrajaju takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin. Učinak su pokazali kod blagog do umjereno teškog oblika bolesti. Pored njih koristi se i memantin koji djeluje kao nekompetitivni antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora i pokazuje simptomatsko poboljšanje kod težih oblika bolesti, bilo kao monoterapija ili u kombinaciji s inhibitorima acetilkolinesteraze. Na hrvatskom i europskom tržištu su danas za liječenje Alzheimerove bolesti dostupni donepezil, rivastigmin i memantin. Međutim, svi ovi lijekovi osim povoljnih učinaka uzrokuju i neželjene nuspojave poput hiperaktivnosti, dijareje, mučnine, povraćanja, nesanice, anoreksije ili oštećenja jetrene funkcije. Tražeći nove lijekove za ovu bolest, znanstvenicima se danas sve češće okreću biljkama kao prepoznatim izvori jedinstvenih molekula, a posebno su zanimljive one s dugom tradicijom primjene u liječenju neuroloških oboljenja (Ha i sur., 2011).

## 1.2. *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. – kineska huperzija

Porodica Lycopodiaceae obuhvaća 17 rodova sa ukupno 475 biljnih vrsta i pripada jednoj od najstarijih skupina kopnenih biljaka – papratnjača. Rod *Huperzia* dobio je naziv prema njemačkom liječniku i botaničaru Johannu Meteru Huperzu (1771.-1816.) koji se bavio proučavanjem razmnožavanja paprati. Kineska huperzija (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.) je vazdazelena višegodišnja zeljasta biljka uspravne ili uzdignute stabljike duge 10-30 mm i promjera 1,5-3,5 mm. Listovi su široki 1,5-4 cm, sjajni, rijetki, pravilno razgranati od osnove, usko eliptični, tanko kožasti i bez dlaka s obje strane. Rubovi listova nepravilno su nazubljeni. Sporofili i trofofili su homomorfni, a bubrežasti žuti sporangiji vidljivi su s obje strane sporofila. Biljka je rasprostranjena po cijeloj Kini, osim dijelova sjeverne i sjeverozapadne Kine, kao i u Rusiji, Indiji, Indoneziji, Japanu, Koreji, Tajlandu, Australiji, Centralnoj Americi itd. Raste u šumama, grmlju i uz puteve, na nadmorskoj visini 300-2700 m.

Kineski naziv ove biljke je *Qian Ceng Ta*, što bi u prijevodu značilo pagoda s tisuću slojeva, a odnosi se na izgled biljke i njene brojne listove, no poznata je i pod nazivom *Jin Bu Huan* (vrjednija od zlata) kojim se označavaju biljke sa snažnim analgetskim djelovanjem. Ova se ljekovita biljka koristi već više od 1000 godina u svim dijelovima. Tradicionalno se primjenjuje u liječenju kontuzija, uganuća, upale, oteklina, shizofrenije i miastenije gravis, a u novije vrijeme i kod trovanja organofosfornim spojevima (Tun i Herzon, 2012; Ma i sur., 2007).

Fitokemijska istraživanja pokazala su da kineska huperzija sadrži 0,2 % *Lycopodium* alkaloida (likodolin, likoklavin, likodin, seratinin, huperzini i dr.), triterpene i polifenolne spojeve. Najvažnija i najistraživanija sastavnica je alkaloid huperzin A (Ma i sur., 2007).

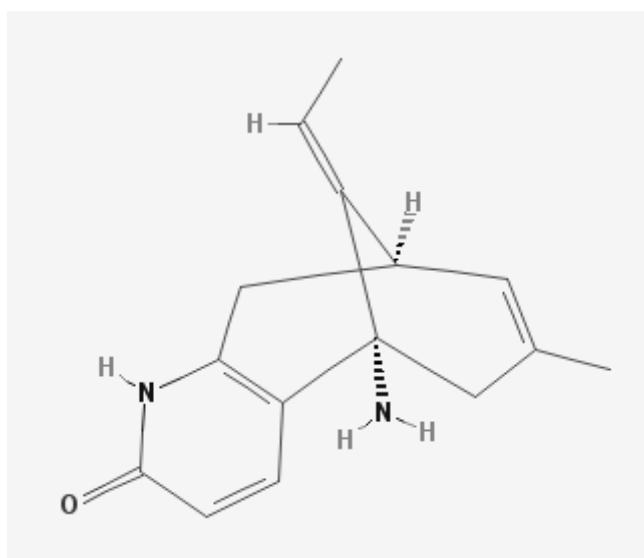


Slika 1. *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.  
(preuzeto s <http://www.ethnoherbalist.com>)

### 1.3. Huperzin A

U potrazi za novim lijekom za liječenje miastenije gravis kineski su znanstvenici početkom 1980-tih proveli probir kineskih biljnih lijekova u koji su bile uključene biljke roda *Lycopodium* koje se tradicionalno koriste kod reumatizma, prehlade, za opuštanje mišića i poticanje cirkulacije. Kemijska istraživanja vrste *Lycopodium serratum* (sin. *Huperzia serrata*) rezultirala su izolacijom nekoliko *Lycopodium* alkaloida, a 1986. godine iz biljke je izoliran huperzin A. Farmakološke studije ubrzo su pokazale da je riječ o snažnom, visoko specifičnom i reverzibilnom inhibitori acetilkolinesteraze te su vrlo brzo objavljeni i prvi pozitivni klinički rezultati dobiveni kod starijih osoba s poremećajem pamćenja. Zbog svog izraženog antikolinesternog djelovanja, huperzin A je krajem 1980-tih privukao značajan interes znanstvenika širom svijeta, potaknuvši ih na istraživanje moguće kemijske sinteze, odnosa strukture i djelovanja te daljnje farmakološke i kliničke studije (Ma i sur., 2007).

*Lycopodium* alkaloidi su spojevi jedinstvene strukture koju karakterizira prisutnost četiri prstena od kojih jedan može biti otvoren. Huperzini pored dušikovog atoma u jednom od prstenova sadrže još i amino skupinu vezanu za prsten. Javljaju se kao kemijski entiteti sličnih svojstava, ali različite jačine djelovanja. Tako primjerice huperzin A pokazuje deset puta snažnije antikolinesterazno djelovanje nego huperzin B. Huperzin A je seskviterpenski alkaloid empirijske formule  $C_{15}H_{18}N_2O$  i molarne mase 242,32 g/mol. Tvar je optički aktivna, a u biljnom se materijalu pojavljuje isključivo kao (-)-enantiomer. Stabilna je molekula bijelog kristaliničnog izgleda, topljiva u razrijeđenoj kiselini i  $CHCl_3$  (Zangara, 2003). Spoj se dobiva ekstrakcijom iz osušenih nadzemnih dijelova vrste *Huperzia serrata* Thunb. s prinosom od samo 0,0047-0,025%, ovisno o vremenu sakupljanja biljnog materijala i primijenjenoj metodi ekstrakcije (Ha i sur., 2011). Objavljeno je i nekoliko postupaka potpune kemijske sinteze huperzina A u laboratoriju (Ma i sur., 2007).



Slika 2. Kemijska struktura huperzina A  
(preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Znanstveno je utvrđeno da huperzin A selektivno i reverzibilno inhibira acetilkolinesterazu i na taj način pojačava acetilkolinergičku neurotransmisiju u mozgu, što dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija kod pacijenata s demencijom. U istraživanjima je pokazao dugotrajniji učinak, bolji prolaz kroz krvno-moždanu barijeru, veću oralnu bioraspoloživost i manje nuspojave u usporedbi s inhibitorima acetilkolinesteraze koji se danas koriste u liječenju Alzheimerove bolesti (Zangara, 2003). Najveći dio istraživanja proveden je u Kini, gdje je huperzin A od 1994. dostupan kao lijek za Alzheimerovu bolest.



Na tržištu nalazimo tablete i kapsule koje se primjenjuju oralno dva puta dnevno u dozi od 0,2 mg. Unatoč njegovoj širokoj i dugotrajnoj primjeni u Kini, ovaj prirodni nootropik u zapadnim je zemljama još uvijek gotovo nepoznat te ponegdje eventualno dostupan u obliku dodataka prehrani koji sadrže biljni ekstrakt (Yang et al., 2013).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Alzheimerova bolest je kronična progresivna neurodegenerativna bolest koja zbog porasta prevalencije predstavlja veliki javnozdravstveni problem u svijetu. Trenutna terapija svodi se na simptomatsko liječenje kojim se pokušavaju ublažiti pojedini popratni simptomi, no uz nju se također vežu i brojne nuspojave s kojima se pacijenti još teže nose zbog demencije. Budući da lijekovi koji bi mogli prevenirati, usporiti ili izliječiti Alzheimerovu bolest za sada još uvijek ne postoje, znanstvenici se u potrazi za novim lijekovima sve više okreću prirodi i biljnom svijetu, tražeći izvore novih molekula u biljnim vrstama koje se tradicionalno koriste u liječenju neuroloških oboljenja.

Kineska huperzija (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.) je ljekovita biljka koja ima dugu povijest primjene u tradicionalnoj kineskoj medicini, a zahvaljujući suvremenim istraživačkim tehnikama iz nje je izoliran huperzin A, alkaloid s vrlo izraženim farmakološkim djelovanjem i potencijalom za kliničku primjenu u liječenju Alzheimerove bolesti. Stoga je cilj ovog rada bio prikupiti, sistematizirati i prikazati dosadašnje znanstvene spoznaje o pretkliničkim i kliničkim dokazima djelotvornosti huperzina A i njegovih derivata, u svrhu usvajanja novih stručnih znanja iz područja farmakognozije i procjene njihovog terapijskog potencijala.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Istraživanja u okviru ovoga diplomskog rada bila su teorijskog karaktera i uključivala su detaljan pregled stručne i znanstvene literature o huperzinu A, djelatnoj tvari kineske biljne vrste *Huperzia serrata* Thunb. (Huperziaceae). Prikupljeni su podaci o pretkliničkim i kliničkim istraživanjima huperzina A, njegovih sintetskih analoga i hibridnih spojeva te novim formulacijama s tom djelatnom tvari. Pretraživane su dostupne knjige i internetske baze podataka *ScienceDirect*, *AspetJournals*, *PMC*, *PubMed* i *PubChem*. Pri pretraživanju znanstvenih i stručnih članaka u bibliografskim bazama korištene su sljedeće ključne riječi: *Huperzia serrata*, *huperzine A* i *Alzheimer's disease*. Sva dostupna literatura je proučena te su nakon sistematiziranja i obrade prikazani i interpretirani podaci prikupljeni istraživanjem.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Pretklinički dokazi o djelovanju huperzina A

Spojevi koji djeluju kao inhibitori acetilkolinesteraze zbog svoje sposobnosti da inhibiraju enzim, odgode hidrolizu acetilkolina i povise razinu tog neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini mogu pokazati značajan klinički učinak kod oboljelih od Alzheimerove bolesti. Nakon prvih obećavajućih rezultata koji su ukazali da huperzin A selektivno i reverzibilno inhibira acetilkolinesterazu, proveden je niz daljnjih *in vitro* i *in vivo* istraživanja u kojima je inhibitorski učinak huperzina A uspoređivan s drugim već poznatim inhibitorima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze, istraživani su njegov utjecaj na akumulaciju amiloidnih plakova, djelovanje na antioksidativne mehanizme u stanici, neurotoksičnost uzrokovanu glutamatom te Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put.

Studije su pokazale da se huperzin A veže direktno u aktivno mjesto enzima i na taj način sprječava vezanje nativnog supstrata, tj. acetilkolina, čija se koncentracija u sinapsama posljedično povećava. Pretpostavlja se da je za djelovanje odgovoran dio strukture koji čini most od tri ugljikova atoma i da bi antiacetilkolinesterazni učinak bio slabiji kad bi se uklonila dvostruka veza iz tog dijela molekule (Ma i sur., 2007).

Antiacetilkolinesterazna aktivnost huperzina A uspoređena je s učinkom drugih inhibitora acetilkolinesteraze koji se već koriste u terapiji Alzheimerove bolesti te je na temelju koncentracija potrebnih za 50%-tnu inhibiciju tog enzima ( $IC_{50}$ ) utvrđen sljedeći niz djelovanja: donepezil > huperzin > takrin > fizostigmin > galantamin > rivastigmin. Od svih navedenih molekula, huperzin A pokazao je najmanju inhibitorsku aktivnost prema butirilkolinesterazi, zbog čega se smatra znatno selektivnijim inhibitorom od ostalih koji se trenutno koriste u terapiji. Nanomolarni raspon konstanti inhibicije ( $K_i$ ) AChE ovih spojeva ukazuje na njihov visok afinitet prema enzimu. Ipak, u eksperimentalnih životinja korištene su mnogo više peroralne doze takrina i donepezila nego huperzina A, vjerojatno zbog njihove niske bioraspoloživosti ili brzog metabolizma, što dovodi i do izraženijih nuspojava kod primjene tih lijekova u odnosu na huperzin A (Wang i sur., 2006).

Animalna studija u kojoj je uspoređeno djelovanje huperzina A, donepezila i rivastigmina na kortikalne razine acetilkolina i aktivnost acetilkolinesteraze pokazala je da huperzin A osmerostruko snažnije povećava kortikalnu razinu acetilkolina nego donepezil, odnosno dvostruko snažnije nego rivastigmin, uzevši u obzir njihove molarne koncentracije. Veća potentnost huperzina A može se objasniti time što on prvenstveno inhibira tetramernu acetilkolinesterazu koja dominira u mozgu sisavaca, dok ostala dva lijeka inhibiraju

prvenstveno monomerni izooblik enzima. Također, učinak huperzina A bio je dugotrajniji (Liang i Tang, 2004).

Promatrajući nuspojave uzrokovane terapijom takrinom pretpostavljeno je da se one najozbiljnije vjerojatno javljaju uslijed inhibicije butirilkolinesteraze. Iz toga je zaključeno da je kod lijekova za Alzheimerovu bolest koji ciljaju kolinergički sustav poželjan visok butirilkolinesteraza/acetilkolinesteraza IC<sub>50</sub> omjer, što je i uočeno kod huperzina A. Međutim, neka istraživanja pokazuju da bi snažnija inhibicija butirilkolinesteraze mogla biti važna u kasnijim stadijima Alzheimerove bolesti jer bi mogla osigurati bolju zaštitu od nakupljanja A $\beta$  i nastanka senilnih plakova (Ma i Gang, 2004).

U studiji koja se bavila ispitivanjem učinkovitosti huperzina A na skopolaminom-uzrokovan kognitivni deficit u štakora promatran je i utjecaj načina primjene na ishod tretmana. Ustanovljeno je da huperzin A poboljšava radno i referentno pamćenje pokazujući gotovo jednak učinak nakon peroralne i intraperitonealne primjene. Inhibitorski učinak takrina na acetilkolinesterazu u mozgu i serumsku butirilkolinesterazu bio je pak znatno veći nakon intraperitonealne primjene, što potvrđuje njegovu nisku oralnu bioraspoloživost i pojačani metabolizam prvim prolazom kroz jetru. Intraventrikularno primjenjeni huperzin A pokazao se potentnijim od takrina, ali ne i od donepezila. Ovi rezultati upućuju na veću oralnu biodostupnost huperzina A i bolju prolaznost kroz krvno-moždanu barijeru (Wang i Tang, 1998).

Farmakinetička istraživanja pokazuju da peroralno primjenjeni huperzin A ostvaruje najvišu inhibiciju acetilkolinesteraze u cijelom mozgu nakon 60 minuta te da učinak traje 360 minuta od primjene u dozi od 1,5  $\mu$ mol/kg (3,6 mg/kg). U korteksu i serumu maksimum inhibicije dosegnut je nakon 30-60 min, a inhibicija veća od 10% u korteksu održana je tijekom 15-240 minuta. Aktivnost butirilkolinesteraze vratila se na kontrolnu razinu 360 minuta nakon peroralne administracije donepezila i takrina te je u tom vremenu njihov inhibitorski učinak iznosio 20% odnosno 46%. Brzi pad aktivnosti acetilkolinesteraze u eritrocitima i butirilkolinesteraze u serumu nakon primjene huperzina A korelira s kratkotrajnim i većinom perifernim nuspojavama. Kod ponovljene peroralne primjene jednom dnevno tijekom osam ili trideset dana nije uočena promjena u stupnju inhibicije enzima u usporedbi s pojedinačnom dozom, što upućuje na to da se tolerancija na huperzin A ne javlja (Zangara, 2003).

Wang i suradnici (2001) ispitali su utjecaj huperzina A na neurodegeneraciju uzrokovanu nakupljanjem A $\beta$  u obliku plakova u mozgu pomoću Morrisovog testa. Štakori su podijeljeni u tri skupine od kojih je jedna tijekom 12 dana dobivala intracerebroventrikularne infuzije



A $\beta$ <sub>1-40</sub> u kombinaciji s 0,1 ili 0,2 mg/kg huperzina A, druga samo A $\beta$ <sub>1-40</sub>, dok je treća skupina služila kao kontrolna i dobivala samo vehikulum. Životinje koje nisu dobivale huperzin A brže su odlazile na platformu u vodenom labirintu i prestajale prikupljati prostorne informacije u odnosu na one koje su ga primale zajedno s A $\beta$ <sub>1-40</sub>. U mozgu žrtvovanih životinja tretiranih huperzinom A pronađeno je značajno manje patoloških promjena i amiloidnih depozita (Wang i sur., 2001).

Neuroprotektivno djelovanje huperzina A ispitano je *in vivo* na modelu glutamatom-uzrokovane neurotoksičnosti. Nakon tretiranja stanica malog mozga iz embrija štakora 100  $\mu$ M glutamatom utvrđena je stanična smrt 55% neurona u kulturi. Izlaganje stanica 100 nM huperzinu A prije tretmana glutamatom smanjilo je stopu smrtnosti stanica na 30%. Rezultati su povezani sa smanjenjem utoka kalcijevih iona u stanicu kod izlaganja stanica huperzinu A (Tun i Herzon, 2012).

Postoje dokazi da je toksičnost A $\beta$  posredovana stvaranjem vodikovog peroksida. Zamijećeno je da huperzin A sprječava oksidativna oštećenja neurona uzrokovana vodikovim peroksidom povećavanjem aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima kao što su glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza (Xiao i sur., 1999).

Wang i suradnici (2011) istražili su utjecaj huperzina A na Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put budući da se on smatra važnim za neuronalni razvoj i očuvanje živčanog sustava. Novija saznanja upućuju na njegovu uključenost u neurodegenerativne bolesti, pogotovo one vezane uz aktivnost acetilkolinesteraze i A $\beta$  posredovanu neurotoksičnost. Dvije ključne molekule u tom putu su kinaza glikogen-sintaze-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) i  $\beta$ -katenin. Kako amiloidni peptidi ciljaju Wnt put, povećava se aktivacija GSK-3 $\beta$  i posljedično fosforilacija  $\tau$  proteina. GSK-3 $\beta$  regulira nastajanje A $\beta$ , a njega inaktivira protein-kinaza C (PKC). Istraživanje je pokazalo da se nakon četveromjesečnog izlaganja huperzinu A broj A $\beta$  imunoreaktivnih neuritičkih plakova u korteksu i hipokampusu miševa smanjio ovisno o dozi huperzina A. Kao negativna kontrola služili su miševi koji su dobivali samo vehikulum. Usto je praćena razina topljivog A $\beta$  i nađeno je da su A $\beta$ <sub>1-40</sub> i A $\beta$ <sub>1-42</sub> bili sniženi. Razina APP mRNA nije bila značajno promijenjena, ali je povećana ekspresija disintegrina i metalopeptidaze 10 (ADAM10), enzima zaduženih za uklanjanje APP-a. Nađene su povišene razine sAPP $\alpha$  i snižene razine sAPP $\beta$ , što ukazuje na povećanu aktivnost  $\alpha$ -sekretaze nakon izlaganja miševa huperzinu A. Razine GSK-3 $\beta$  i GSK-3 $\alpha$  nisu bile promijenjene, ali su bile povišene razine njihovih fosforiliranih oblika, tj. zapažena je inaktivacija tih proteina ovisna o dozi huperzina A. Imunofluorescencijom je detektiran  $\beta$ -katenin u neuronima mozga miševa. Nakon izlaganja huperzinu A imunofluorescencija je pokazivala znatno povećanu gustoću  $\beta$ -katenina te

smanjenu gustoću fosforiliranog  $\beta$ -katenina, što upućuje na stabilizaciju razine  $\beta$ -katenina u mozgu miševa. Slični rezultati dobiveni su i *in vitro*. Nakon izlaganja miševa kalfostinu C, inhibitoru protein kinaze C (PKC), značajno su smanjene razine metalopeptidaze 10. Međutim, nakon tretmana huperzinom A, razina ADAM10 proteina (engl. *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) vraćena je na prijašnju, pokazujući da huperzin A oporavlja aktivnost neamiloidogenog procesiranja APP-a *in vitro* uzrokovanu izlaganjem inhibitorima PKC-a i Wnt signalnog puta. Jednaki rezultati zamijećeni su i u *in vitro* testovima (Wang i sur., 2011).

U novije vrijeme istraživana je utjecaj terapije huperzinom A na nakupljanje unutarstaničnog  $A\beta$  i oporavak oštećene mitohondrijske funkcije u neuronima. Promatrana je prvenstveno razina  $A\beta_{1-42}$  jer ti oligomeri lakše formiraju agregate nego  $A\beta_{1-40}$  i imaju veći udio u amiloidnim plakovima. Praćenjem apsorbancije pri specifičnim uvjetima određena je metabolička aktivnost stanica u kulturi, tj. razina sukcinat-dehidrogenaze koja je sastavni dio ciklusa limunske kiseline. Nakon izlaganja  $A\beta$  oligomerima apsorbancija se značajno smanjila, što odgovara pretpostavki da ti oligomeri oštećuju metaboličke funkcije stanice. Međutim, nakon izlaganja stanica primarnih kortikalnih neurona huperzinu A, apsorbancija se vratila na prvotne vrijednosti. Hipoteza ulaska izvanstaničnog  $A\beta$  u stanicu provjerena je praćenjem akumulacije sintetskih oligomera iz ekstracelularnih prostora u kulturi i otkriveno je da je akumulacija ovisila o vremenu kontakta i dozi te je korelirala s preživljavanjem stanica. Dodatkom huperzina A smanjila se količina unutarstaničnog  $A\beta$  i povećala stopa preživljavanja stanica pokazujući da bi neuroprotektivno djelovanje huperzina A moglo biti povezano sa sposobnošću smanjenja razine  $A\beta$  u stanicama. Mikroskopski je utvrđeno da je frakcija liziranih stanica sadržavala oko 78% ukupne količine unutarstaničnog  $A\beta$ . U stanicama je bila znatno snižena razina ATP-a, povećana razina reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), a membranski potencijal smanjen za 20% u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatkom huperzina A kulturi stanica je obnovljena prvotna razina ATP-a, značajno smanjena razina ROS-a i popravljeno oštećenje membranskog potencijala za 10%. Svi su ovi učinci odgovarali padu koncentracije unutarstaničnog  $A\beta$ . Najčešće su teorije potencijalne blokade nakupljanja unutarstaničnog  $A\beta$  sprječavanjem unosa izvanstaničnog  $A\beta$  ili poticanjem razgradnje onog nastalog u stanicama. U ovom istraživanju nije uočen utjecaj huperzina A na puteve degradacije  $A\beta$  pa se smatra da to nije mehanizam smanjenja akumulacije u stanicama, no točan mehanizam tek treba otkriti (Lei i sur., 2015).

## 4.2. Klinički dokazi o djelovanju huperzina A

Huperzin A zadovoljava kriterije za potencijalni novi lijek za simptomatsko liječenje Alzheimerove bolesti. Specifičan je inhibitor acetilkolinesteraze, selektivniji za acetilkolinesterazu u mozgu nego onu perifernu (smanjene periferne kolinergičke nuspojave), s dugim trajanjem djelovanja, ima visoku biodostupnost nakon oralne primjene te pokazuje jaču ili istovjetnu inhibiciju acetilkolinesteraze u odnosu na trenutno propisivane lijekove. Nadalje, djelotvoran je protiv glutamatom-potaknute neuronske smrti. Njegova je klinička procjena sada u IV fazi kliničkih ispitivanja (Zangara, 2003).

Cheng i suradnici objavili su 1986. rezultate jedne od prvih kliničkih studija huperzina A i jedino poznato istraživanje huperzina A za miasteniju gravis pokazalo je poboljšanje slabosti mišića kod 128 pacijenata. Svi su pacijenti prije početka studije intramuskularno primili prostigmin kako bi se stabilizirali njihovi uvjeti. 59 bolesnika svakodnevno je primalo 0,4 mg huperzina A, dok je kontrolna skupina primala svaki drugi dan 0,5 mg neostigmina i u međuvremenu 0,4 mg huperzina A. Trajanje učinka bilo je 7 h, 3 h više od onog neostigmina. Sekundarni učinci bili su uglavnom kolinergični i, s izuzetkom mučnine, bili su značajno blaži nego kod neostigmina (Zangara, 2003).

U randomiziranoj, dvostruko slijepoj kliničkoj studiji promatran je utjecaj huperzina A na pamćenje, kognitivne funkcije i ponašanje pacijenata s dijagnosticiranom Alzheimerovom bolešću. Od ukupno 103 pacijenta uključena u pokus, 50 njih primalo je 0,2 mg huperzina A (4 tablete) dva puta dnevno dok su ostali ispitanici dobivala po 4 tablete placeba kroz 8 tjedana. Svu ostalu terapiju prekinuli su tjedan dana prije početka istraživanja. Stanje im je procjenjivano pomoću različitih testova procjene: testa minimalne mentalne procjene (engl. mini-mental state examination, MMSE), procjene svakodnevnih životnih aktivnosti (engl. activities of daily living, ADL), Wechslerovog testa pamćenja (engl. Wechsler memory scale, WMS) i Hamiltonove skale za depresiju (Hamilton depression scale, HDS), ali i mjerenjem vitalnih parametara te biokemijskom analizom krvi i urina. Kod 58% pacijenata (29/50) koji su dobivali huperzin A utvrđeno je značajno poboljšanje pamćenja, kognitivnih funkcija i ponašanja. Učinak huperzina A bio je bolji od placeba (38%, 19/53). Poboljšanje u odnosu na placebo skupinu bilo je vidljivo i nakon 8 tjedana. Na MMSE skali huperzin A pokazao je poboljšanje za 2,98 bodova, a hepatotoksični takrin koji je usporedno ispitivan za 2,0 boda. Bliski srodnici prijavili su subjektivne rezultate koji ukazuju na poboljšanje pamćenja i govora kod pacijenata na terapiji huperzinom A. Nuspojave su većinom bile blage kolinergičke i usporedive s onima u placebo skupini. Uključivale su dijareju, anoreksiju,

hiperaktivnost, mučninu i povraćanje. Laboratorijski testovi nisu pokazivali promjene, a od klinički značajnih promjena vitalnih funkcija uočena je samo bradikardija (prosječna srčana frekvencija pala je sa 72 na 47 udaraca/min) (Xu i sur., 1995).

Učinkovitost i sigurnost primjene huperzina A ispitane su multicentričnom, dvostruko slijepom, placebo kontroliranom, randomiziranom studijom na 60 pacijenata koji su tijekom 60 dana dobivali tablete ili kapsule huperzina A i placeba. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine. Jedna je dobivala četiri kapsule koje su sadržavale po 0,05 mg huperzina A i četiri tablete placeba dnevno, a druga četiri tablete s 0,05 mg huperzina A i četiri kapsule placeba. Jednom mjesečno provedeni su laboratorijski testovi i mjerene vitalne funkcije te su korišteni različiti testovi procjene stanja pacijenata (HDS-R, IADL, GBS—SDS, TESS, WMS). Kliničkom procjenom ustanovljeno je značajno poboljšanje (43-70%) stanja obiju skupina ispitanika nakon 60 dana terapije huperzinom A, u odnosu na početno stanje, ali nisu uočene značajne razlike između dvije skupine. Iako je uočeno poboljšanje antioksidativnih parametara u plazmi i eritrocitima, promjene nisu bile značajne u odnosu na zdrave pojedince, što ukazuje na vjerojatnu potrebu za dugotrajnijom terapijom. Razine jetrenih enzimi ALT i AST nisu se povisile tijekom istraživanja. Periferne kolinergičke nuspojave javile su se kod 33% pacijenata na terapiji huperzinom A, ali su se smanjile ili potpuno nestale do kraja istraživanja. Uključivale su blagu do umjerenu mučninu, povraćanje i blagu do umjerenu nesanicu (Xu i sur., 1999).

Među prvim studijama provedenim izvan Kine bila je mala studija provedena 1999. u SAD-u u kojoj je procijenjivana sigurnost i učinkovitost huperzina A na 26 pacijenata s dijagnozom Alzheimerove bolesti bez komplikacija i moguće ili vjerojatne blage do umjerene Alzheimerove bolesti. Uključena su i tri dodatna pacijenta: jedan s multiinfarktnom demencijom, jedan s posttraumatskim gubitkom pamćenja i pacijent s demijelinizacijskom bolesti. Istraživanje je trajalo tri mjeseca, bilo je otvorenog tipa i monocentrično. Pacijenti su nastavili s dotadašnjim terapijama koje su činili takrin, donepezil i preparati ginkga. 25 pacijenata oralno je primalo dva puta dnevno po 50 µg huperzina A, a 4 pacijenta 100 µg. Nakon prvog i drugog mjeseca istraživanja uočeno je o dozi ovisno poboljšanje stanja pacijenata bez ozbiljnih nuspojava, osim kod dva pacijenta koja su zbog nuspojava odustala od sudjelovanja u istraživanju. Učinak opažen nakon trećeg mjeseca bio je podjednak za obje doze. Unatoč malom broju pacijenata, autori su opazili o dozi ovisno poboljšanje s boljim MMSE rezultatima kod više doze i bez ozbiljnih nuspojava (Desilets i sur., 2009).

Na 28 pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti ispitana je djelotvornost terapije huperzinom A u odnosu na placebo. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine, od kojih je jedna

dobivala jednokratno dozu od 0,4 mg huperzina A, druga dva puta dnevno po 0,2 mg huperzina A i treća placebo. Ispitanici su tijekom pokusa nastavili koristiti dotadašnju terapiju. Rezultati su procijenjeni pomoću različitih testova (MMSE, HDS, ADL, WMS i MQ). Uočeno je značajno poboljšanje stanja pacijenata koji su dobivali huperzin A koji su ostvarili bolje rezultate na testovima pamćenja u usporedbi s pacijentima koji su dobivali placebo (Ha i sur., 2011).

U drugo istraživanje uključeno je 100 starijih pacijenata koji su prema WMS skali imali kvocijent pamćenja manji od 100. 17 njih imalo je dijagnosticiranu Alzheimerovu bolest, a ostali druge poremećaje pamćenja. Akutni tretman 0,03 mg huperzina A (i.m.) dvaput dnevno tijekom dva tjedna uspoređen je s terapijom 6 mg dihidroergotoksina. Huperzin A pokazao je pozitivan učinak na pamćenje između 1. i 4. h nakon primjene. Značajne nuspojave nisu uočene (Zangara, 2003).

U multicentričnom, randomiziranom, dvostruko slijepom ispitivanju vrjednovan je huperzin A u liječenju poremećaja pamćenja kod starijih osoba. 56 pacijenata koji su bolovali od multiinfarktne demencije ili Alzheimerove bolesti primali su i.m. tijekom mjesec dana 0,05 mg huperzina A ili placebo dva puta dnevno. Ostala 104 pacijenta koja su imala presenilne ili senilne poremećaje pamćenja dobivala su i.m. 0,03 mg huperzina A ili placebo dva puta na dan kroz dva tjedna. Kod svih ispitanika bolest je dijagnosticirana prije više od 2 godine te su oni prekinuli svu drugu terapiju 7 dana prije početka istraživanja. Kod pacijenata liječenih huperzinom A zabilježeno je značajno povećanje kvocijenta pamćenja, te je uočeno samo nekoliko manjih nuspojava, poput mučnine i vrtoglavice (Zangara, 2003).

2002. godine je u petnaest centara iz pet kineskih gradova provedeno multicentrično, dvostruko slijepo, randomizirano i placebo kontrolirano ispitivanje u kojem su sudjelovala 202 pacijenta stara između 50 i 80 godina s mogućom ili vjerojatnom dijagnozom Alzheimerove bolesti. Tijekom 12 tjedana 100 pacijenata je primalo huperzin A, dok su 102 pacijenta dobivala placebo i uz njih vitamin E. Početna doza huperzina A iznosila je 100 µg dvaput dnevno, uz doručak i večeru u prvom tjednu. Tijekom drugog i trećeg tjedna doza je povećana do 150 µg dvaput dnevno, a do kraja istraživanja do 200 µg dvaput dnevno, ovisno o reakciji pacijenta na terapiju. Placebo skupina primala je jednake doze vitamina E *per os*. Sigurnost je procijenjena provjeravanjem vitalnih funkcija, fizikalnim, neurološkim i laboratorijskim testovima koji su se provodili svakih 6 tjedana. Otkriveno je poboljšanje kognitivnih i nekognitivnih funkcija kod pacijenata na terapiji huperzinom A nakon 6 tjedana, a posebice nakon 12 tjedana. Istraživanje nije imalo posebnu procjenu psihološkog stanja pacijenata, ali se iz korištenih skala mogao uočiti pozitivan utjecaj terapije na depresiju,

deluzije i ponavljajuće aktivnosti. Nakon 12 tjedana terapije utvrđeno je značajno poboljšanje kognitivnih funkcija i kvalitete života u odnosu na placebo skupinu. Rezultate je potvrdilo osoblje koje je brinulo o pacijentima. Budući da je prosječna dob pacijenata iznosila 70 godina, visok postotak pacijenata uzimao je i druge lijekove za različite kronične bolesti. Blage i prolazne nuspojave bile su nesаница i bilateralni edem gležnja u 3% pacijenata, slično kao kod placebo skupine (Zangara, 2003).

Ispitivanje učinkovitosti duže primjene huperzina A proveli su 2002. godine Jiang i suradnici na 33 pacijenta. Ispitanici su tijekom 48 tjedana dobivali dva puta dnevno po 0,15 mg huperzina A. Zabilježeno je značajno poboljšanje kognitivnih funkcija nakon 12, 24 odnosno 48 tjedana primjene (Wang i sur., 2006).

Zhang i suradnici proveli su 2006. godine istraživanje na 120 pacijenata koji su tijekom 18 tjedana svakodnevno primali 0,5 mg huperzina A ili placebo. Rezultati su procijenjeni pomoću *Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognitive Subscale* (ADAS-Cog) skale. U skupini na terapiji huperzinom A uočeno je značajno poboljšanje stanja pacijenata u usporedbi s placebo skupinom. Od nuspojava javili su se prolazna gastrointestinalna disfunkcija i povišena razina jetrenog enzima alanin-aminotransferaze (ALT) (Zhang i sur., 2006).

2007. godine dovršena je druga faza kliničkih istraživanja huperzina A u SAD-u. Multicentrično, prospektivno, randomizirano i dvostruko slijepo ispitivanje s povećanjem doze trajalo je 24 tjedna i uključivalo 210 pacijenata starosti preko 50 godina s dijagnozom blage do umjerene Alzheimerove bolesti. Stanje im je bilo stabilno tri mjeseca prije početka istraživanja. Iz istraživanja su isključeni pacijenti koji su unutar dva mjeseca prije *screeninga* koristili neki inhibitor acetilkolinesteraze, lijekove sa značajnom antikolinergičkom aktivnošću (npr. tricikličke antidepresive), antiparkinsonik ili opioidne analgetike češće od dvaput tjedno unutar 4 tjedna od *screeninga*. Podijeljeni su u tri skupine. Prva skupina je dobivala dvaput dnevno 100 µg huperzina A tijekom prva 2 tjedna, a zatim 200 µg huperzina A dvaput dnevno tijekom ostala 22 tjedna. Druga skupina je tijekom prva 2 tjedna dobivala dvije doze od 100 µg huperzina A, zatim sljedeća dva tjedna dva puta dnevno po 200 µg huperzina A, potom dva tjedna dva puta dnevno po 300 µg huperzina A te posljednjih 18 tjedana svakodnevno dvije doze od 400 µg huperzina A. Treća skupina je primala placebo tijekom 16 tjedana, zatim 4 tjedna dva puta po 100 µg huperzina A, te posljednja 4 tjedna dva puta dnevno po 200 µg huperzina A. U ispitivanju je do kraja sudjelovalo 177 pacijenata, a od 33 ispitanika koja su odustala kod 17 njih razlog su bile nuspojave. U placebo skupini jedan je pacijent preminuo tijekom istraživanja, dok su u grupi s nižim terapijskom režimom

preminula tri pacijenta. U prvoj skupini ispitanika tretiranih dva puta dnevno s 200 µg huperzina A nakon 16 tjedana nisu utvrđena značajna kognitivna poboljšanja prema ADAS-Cog skali, pa su autori zaključili da je ta doza neučinkovita kod Alzheimerove bolesti. Međutim, studija je pokazala da huperzin A primijenjen u višoj dozi (dva puta dnevno 400 µg huperzina A) prema ADAS-Cog i MMSE skalama dovodi do kognitivnih poboljšanja, što upućuje na moguću kratkotrajnu simptomatsku korist huperzina A. Huperzin A je generalno pokazao dobru podnošljivost, čak i kod pacijenata koji su imali teže nuspojave na terapiju drugim inhibitorima acetilkolinesteraze. Najčešći razlog nepodnošljivosti bila je pojava mučnine (Rafii i sur., 2011).

2008. godine objavljen je Cochrane sustavni pregled o huperzinu A koji je uključivao 6 randomiziranih kliničkih ispitivanja na ukupno 454 bolesnika s Alzheimerovom bolešću. Autori su zaključili da huperzin A pokazuje neke blagotvorne učinke kod oboljelih, međutim zbog slabe metodološke kvalitete i male veličine uzorka još uvijek nije bilo dovoljno dokaza za kliničku preporuku (Li i sur., 2008).

Najnoviji sustavni pregled i meta analiza provedena s ciljem procjene povoljnog i štetnog učinka huperzina A u liječenju Alzheimerove bolesti uključivala je 20 randomiziranih kliničkih studija. Zanimljivo je da su sve analizirane studije provedene u Kini, osim jedne koja je bila provedena u SAD-u, te da su sve objavljene u cijelosti, 18 na kineskom te samo dvije na engleskom jeziku. Studije su uključivale 1823 bolesnika s Alzheimerovom bolešću, stara između 50 i 85 godina. Duljine trajanja terapije vrlo se razlikovala među studijama, iznoseći od 8 do 36 tjedana, s prosječnim trajanjem 14,7 tjedana. Huperzin A je u ispitivanjima primjenjivan u različitim dozama, od 0,2 mg do 0,8 mg dnevno, a prosječna dnevna doza iznosila je oko 0,37 mg. U polovici ispitivanja uspoređivan je huperzin A s placeboom, no u nekima je rađena usporedba s netretiranim ispitanicima, ili onima tretiranim konvencionalnom terapijom ili pak u odnosu na psihoterapiju ili tradicionalno liječenje. Analiza je pokazala da je opća metodološka kvaliteta većine ispitivanja bila umjerena ili loša. Studije u kojima je učinak uspoređivan s placeboom favoriziraju huperzin A izvješćujući o poboljšanju kognitivnih funkcija mjerenih MMSE, HDS i WMS skalama, svakodnevnih životnih aktivnosti mjerenih prema ADL te globalne kliničke procjene na temelju kliničke skale za rangiranje demencije. Nuspojave su praćene u samo 12 ispitivanja, i uglavnom su bile blage te uključivale mučninu, anoreksiju, vrtoglavicu, razdražljivost, povraćanje, zatvor, nesanicu, žeđ, znojenje, pospanost, bradikardiju, abdominalnu bol, hiperaktivnost, nazalnu opstrukciju, dijareju i edem. Iako u niti jednom od uključenih ispitivanja nisu prijavljene ozbiljne nuspojave povezane s huperzinom A, ne možemo donijeti čvrsti zaključak o

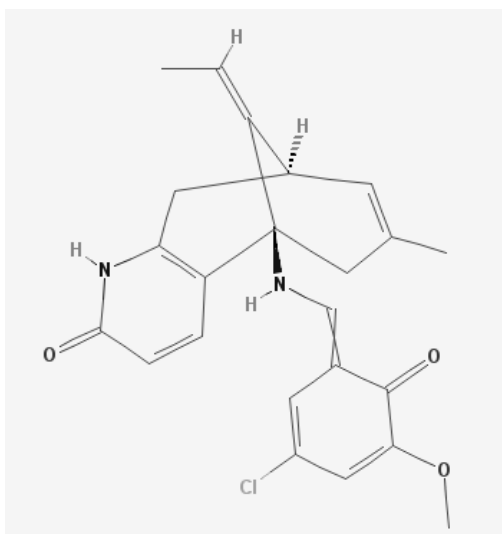
sigurnosti huperzina A, budući da sedam studija nije pružilo podatke o sigurnosti. Trajanje liječenja u većini studija bilo je 8 tjedana ili 12 tjedana pa bi potencijalni korisni ili štetni učinak huperzina A za liječenje AD mogli nastati samo zbog simptomatskih promjena i kratkog trajanja liječenja. Budući da većina bolesnika s Alzheimerovom bolesti zahtijeva cjeloživotno liječenje, dugoročna sigurnost liječenja i dalje je važno pitanje te bi se daljnje studije trebale usredotočiti na praćenje i prijavljivanje nuspojava i dugotrajnu sigurnost dizajniranjem duljeg trajanja liječenja i dugoročnim praćenjem (Yang i sur., 2013).

### 4.3. Derivati huperzina A i njihova djelotvornost

Uzevši u obzir mali udio huperzina A u biljnom materijalu, poteškoće pri pokušajima laboratorijske sinteze i problem intelektualnog vlasništva, danas se pokušavaju razviti novi derivati tog spoja koji bi omogućili razvoj novog lijeka za liječenje Alzheimerove bolesti. Kemijskim se modifikacijama nastoje postići bolji klinički učinci, stvoriti molekule s boljim profilom nuspojava i omogućiti optimalna primjena i doziranje lijeka.

#### 4.3.1. ZT-1

Molekula ZT-1, poznata i pod nazivom shiperin, jedan je od novih razvijenih analoga huperzina A. Spoj nastao kondenzacijom huperzina A s 5-kloro-*o*-vanilinom djeluje kao snažan inhibitor acetilkolinesteraze te pokazuje bolji sigurnosni profil od većine drugih sintetskih derivata. Budući da je u prvim istraživanjima pokazao jaču sposobnost inhibicije i veću selektivnost za acetilkolinesterazu nego huperzin A, izabran je kao kandidat za prvu fazu kliničkih istraživanja.



Slika 3. Struktura polusintetskog spoja ZT-1 (preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



U kliničkoj studiji sudjelovalo je 58 zdravih mladih muškaraca starosti od 22 do 25 godina. Prije početka istraživanja ispitanici su obavili sistematske preglede, elektrokardiogram i laboratorijske testove da bi se utvrdilo da ne boluju od kardiovaskularnih, hepatičkih, renalnih, pulmonalnih, neuroloških, gastrointestinalnih ili hematoloških bolesti. Dva tjedna prije i tijekom istraživanja nisu uzimali nikakve druge lijekove. Podijeljeni su nasumično u tri skupine: 40 je sudjelovalo u ispitivanju podnošljivosti molekule, 9 je primilo pojedinačne doze ZT-1 i 9 je primilo više doza.

Tablica 1. Doziranje ZT-1 po skupinama pacijenta tijekom tri perioda

<i>Skupina</i>	<i>1. period</i>	<i>2. period</i>	<i>3. period</i>
A	0,5 mg	1,0 mg	0,75 mg
B	0,75 mg	1,0 mg	0,5 mg
C	1,0 mg	0,5 mg	0,75 mg

Prvi dio istraživanja obuhvaćao je 9 pojedinaca koji su primili po tri različite monodoze ZT-1 u razmaku od tjedan dana. Podijeljeni su u tri skupine po tri pojedinca, a doze su iznosile 0,5 mg, 0,75 mg i 1,0 mg. Ispitanici su uzimali lijek uz 2 dL vode, nakon prethodne 10-satne apstinencije od hrane. Unos tekućine bio je dopušten nakon 2 h, a hrane nakon 4 h. Konzumacija alkohola, intenzivna fizička aktivnost i pušenje bili su zabranjeni tijekom istraživanja. Ispitivanjem farmakokinetike molekule uočeno je da je plazmatska koncentracija ZT-1 bila ispod granice kvantifikacije LC/MS metodom 30 minuta nakon primjene, što upućuje na brzu razgradnju spoja do huperzina A čiji su farmakokinetički parametri zbog toga jedini uključeni u rezultate, pa je ZT-1 proglašen prolijekom. Vrijeme potrebno za dostizanje maksimalne koncentracije u plazmi za ZT-1 iznosilo 0,76-0,82 sata, 30-40% doze izlučeno je urinom kao huperzin A, a renalni klirens iznosio je otprilike 37-65 mL/min.

Drugi dio farmakokinetičkih istraživanja proveden je na 9 pojedinaca koji su tijekom 8 uzastopnih dana jednokratno primali 0,75 mg ZT-1. Ravnotežno stanje u krvnoj plazmi postignuto je unutar dva dana od početka terapije. Ostali farmakokinetički parametri upućivali su na umjerenu akumulaciju spoja u organizmu, a tolerancija nije uočena.

U trećem dijelu studije sudjelovalo je 40 ispitanika na kojima je ispitana podnošljivost molekule. Nasumično su podijeljeni u pet skupina koje su dobile različite pojedinačne doze molekule ZT-1. U svakoj skupini 6 je ispitanika primalo ZT-1 u dozi 0,50, 0,75, 1,00, 1,25 ili 1,50 mg, a dvoje je dobilo placebo. Sigurnost i podnošljivost spoja klinički su vrjednovane

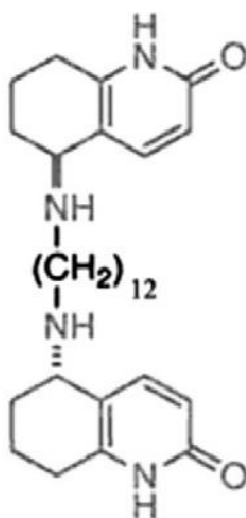
fizičkim pregledom pacijenata, provjeravanjem vitalnih znakova, elektrokardiogramom i laboratorijskim testovima. EKG i laboratorijski testovi provedeni su 2 i 48 sata nakon primanja lijeka. Neželjeni učinci nadzirali su se tijekom cijelog istraživanja te su svi zabilježeni i procijenjeni prema intenzitetu (blagi, umjereni ili teški), prema trajanju, ozbiljnosti, ishodu te povezanosti s ispitivanom tvari. Neželjeni učinci smatrani su ozbiljnima u slučaju smrtnog ishoda ili razvoja po život opasne bolesti koja dovodi do nepokretnosti, hospitalizacije ili zahtijeva medicinsku intervenciju da bi se spriječilo trajno oštećenje. Laboratorijski testovi nisu ukazivali na neželjene učinke, a na EKG-u je uočeno 45 kliničkih promjena, no nijedna od njih nije bila ozbiljna. Uglavnom se radilo o sinusnoj bradikardiji i to kod skupina koje su dobivale doze od 1,25 i 1,50 mg ZT-1. Simptomi bi nestali 2 sata nakon primanja doze bez ikakve dodatne terapije. Samo je jedan od ispitanika u ovoj skupini razvio umjereno tešku nuspojavu u vidu mučnine i povraćanja 24 sata nakon prve doze, no i ona je nestala bez dodatne medicinske intervencije te je ispitanik sudjelovao u istraživanju do kraja. Učinkovitost terapije pokazala se proporcionalno ovisnom o dozi (Jia i sur., 2013).

U okviru opsežnih istraživanja koje u Europi provodi švicarska tvrtka Debiopharm, provedena je randomizirana, dvostruko slijepa, placebom i aktivno kontrolirana faza 2 ispitivanja. U studiju je bilo uključeno 186 pacijenata s blagom do umjerenom Alzheimerovom bolesti koji su podijeljeni u 4 skupine te su primali višestruke oralne doze bilo placebo, ZT-1 ili donepezila. Dvostruko slijepa faza studije trajala je 12 tjedana i obuhvaćala 4-ero tjedni period titracije i 8 tjedana održavanja terapije. Oralne doze održavanja iznosile su 1,5 ili 2 mg/dan ZT-1 i 10 mg/dan donepezila s mogućnosti prilagodbe doze (smanjenje na 1, odnosno 1,5 odnosno 5 mg/dan). Nakon dvotjedne pauze, ispitanicima je ponuđen nastavak sudjelovanja u 6-mjesečnoj otvorenoj fazi istraživanja. Učinkovitost tretmana ocijenjena je na temelju različitih testova procjene kognitivnih funkcija i svakodnevnih aktivnosti (ADAS-Cog, MMSE, CDR, NPI-Q, IADL), a sigurnost na temelju učestalosti nuspojava, promjena vitalnih znakova, EKG-a i laboratorijskih parametara. Rezultati ove studije pokazali su da je ZT-1 siguran i učinkovit u dozama do 2 mg dnevno u bolesnika s blagom do umjerenom bolesti. Dvostruka slijepa faza sugerira 1,5 mg ZT-1 kao optimalnu dnevnu dozu koja se bolje podnosi nego donepezil, posebno što se tiče gastrointestinalnog sustava. Preliminarni rezultati otvorene faze potvrđuju da ZT-1 smanjuje kognitivne poremećaje u pacijenata tijekom vremena s MMSE stopom odgovora većom od 50% nakon 38 tjedana liječenja. Studija upućuje da bi ZT-1 opravdano mogao biti alternativa postojećim inhibitorima acetilkolinesteraze koji se koriste u liječenju Alzheimerove bolesti

(Tamchès i sur., 2006). U novije vrijeme objavljeni su i preliminarni rezultati randomizirane, dvostruko slijepe studije.

#### 4.3.2. Bis(12)-hupiridon

Bis(12)-hupiridon (B12H) je multifunkcionalni dimer huperzina A. Prvi korak u sintezi ovog spoja predstavlja sinteza hupiridona kojem nedostaje C6-C8 most huperzina A te je od njega potom sintetiziran homodimer povezivanjem monomera dvanaesteročlanim ugljikovim lancem. Sintaza tog spoja mnogo je jednostavnija i ekonomičnija nego ona huperzina A. Pored toga, spoj B12H pokazao je dvostruko snažnije inhibitorno djelovanje na acetilkolinesterazu i šesterostruko snažniji antagonizam NMDA receptora u odnosu na huperzin A, a takođe lako prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Hu i suradnici (2014) istraživali su njegovu sposobnost inhibicije stvaranje A $\beta$  fibrila i smanjenja njihova citotoksičnog djelovanja.



Slika 4. Struktura molekule B12H

(preuzeto s <http://www.chemdrug.com>)

Istraživanje inhibicije formacije A $\beta$ <sub>1-40</sub> fibrila provedeno je praćenjem fluorescencije pri inkubaciji uz tioflavin T čija se fluorescencija pojačava pri vezanju na strukturu amiloidnih fibrila te tako ukazuje na njihovu količinu. Slični rezultati već su dobiveni za mnogo malih molekula sa simetričnom i planarnom strukturom, poput kurkumina. Zbog toga homodimeri poput B12H imaju predispoziciju za ulogu potentnih inhibitora nastajanja A $\beta$  fibrila. Monomerni A $\beta$ <sub>1-40</sub> inkubiran je sa ili bez B12H, huperzina A ili kurkumina (pozitivna

kontrola) tijekom šest dana na 37°C. Utvrđeno je da se razina fluorescencije tioflavina T uz 3 μM B12H smanjila za približno 40%, dok huperzin A nije pokazao značajan inhibitorni učinak na formaciju Aβ<sub>1-40</sub> fibrila pri istoj koncentraciji. Uz 1 μM kurkumin fluorescencija se smanjila upola.

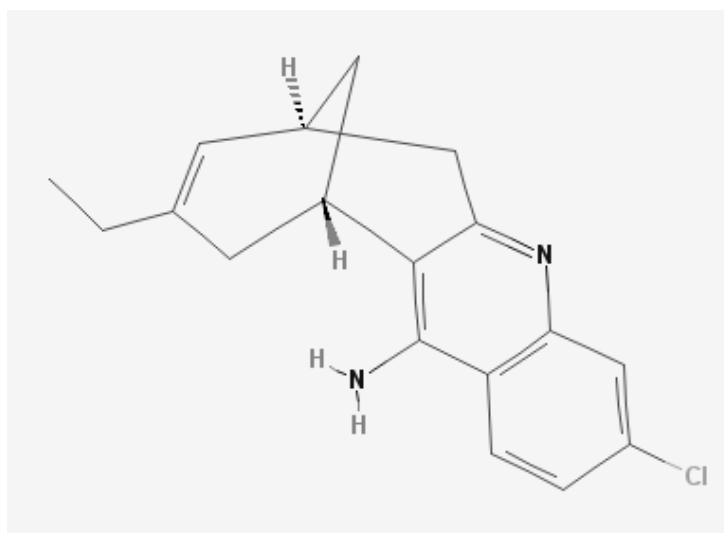
Da bi se ispitaio utjecaj molekule B12H na citotoksičnost Aβ<sub>1-40</sub> fibrila, stanice su prvo inkubirane s Aβ<sub>1-40</sub> fibrilima tijekom 48 sati, nakon čega je zabilježeno značajno smanjenje preživljavanja stanica i povišeno otpuštanje laktat dehidrogenaze. Zatim je provedena inkubacija uz dodatak ispitivanog spoja te je uočeno da su Aβ<sub>1-40</sub> fibrili modificirani pomoću B12H bili manje toksični za stanice, gotovo u jednakoj mjeri kao fibrili modificirani kurkuminom, što je potvrđeno i smanjenim omjerom Bax/Bcl-2 kod stanica inkubiranih s B12H. Potom je proveden Morrisov test s vodenim labirintom *in vivo*. Eksperimentalne životinje su dobivale intracerebroventrikularnu infuziju Aβ<sub>1-40</sub> fibrila, vehikuluma ili Aβ<sub>1-40</sub> fibrila uz B12H tijekom pet dana te je praćeno vrijeme u kojem bi došle na platformu. Kod svih je skupina zabilježena smanjena sposobnost prikupljanja prostornih informacija, ali je učinak bio znatno slabiji u skupini koja je uz Aβ<sub>1-40</sub> fibrile dobivala i B12H, što je uočeno nakon trećeg dana. Životinje koje su bile tretirane B12H spojem plivale su duže od onih koje su dobivale samo Aβ<sub>1-40</sub> fibrile. Nadalje, ustanovljeno je da molekula B12H primjenjena u dnevnoj dozi od 0,4 mg/kg značajno smanjuje opadanje aktivnosti kolin-acetiltransferaze u hipokampusu, ali ne i u korteksu te da smanjuje porast aktivnosti acetilkolinesteraze u hipokampusu i korteksu uzrokovan Aβ<sub>1-40</sub> fibrilima. Zajedno navedeni rezultati upućuju na to da bi B12H mogao smanjiti oštećenja pamćenja i sposobnosti učenja uzrokovana nakupljanjem Aβ<sub>1-40</sub> fibrila (Hu i sur., 2014).

### 4.3.3. Huprin X

Huprin X je hibridni spoj nastao spajanjem molekule huperzina A s takrinom, potentnim lijekom koje se koristi u terapiji Alzheimerove bolesti. Razvijen je s ciljem postizanja veće potentnosti i selektivnosti djelovanja. U dosadašnjim istraživanjima pokazao je najveći dosad zabilježen afinitet prema acetilkolinesterazi, s konstantom inhibicije  $K_i = 26$  pM, što je 180 puta više nego kod huperzina A, 1200 puta više nego kod takrina i 40 puta više nego kod donepezila koji je najselektivniji od svih inhibitora acetilkolinesteraze trenutno korištenih u terapiji. Ujedno djeluje agonistički na muskarinske M<sub>1</sub> i nikotinske receptore.

Na animalnom modelu provedeno je usporedno istraživanje učinkovitosti i pojave nuspojava kod tretmana huperzinom A i huprinom X. Od nuspojava promatrana je pojava

dijareje i tremora čeljusti, no oni nisu opaženi ni u jednoj skupini miševa. Sve su životinje pokazale sličan postotak gubitka tjelesne mase, ali se pretpostavlja da je to zbog intraperitonealne primjene lijekova. Morrisovim testom vodenog labirinta ispitan je utjecaj na pamćenje i učenje. Huprin X je pokazao najjači učinak već treći dan treninga u labirintu, huperzin A četvrti, a kontrolna skupina šesti i sedmi dan. Životinje koje su dobivale huprin X su na kraju zadatka s učenjem prostora (šesti i sedmi dan) bile sposobne riješiti labirint s najvećom točnošću. U probnom istraživanju praćena je sklonost životinja prema kvadrantu u kojem su trenirale. Životinje tretirane samo fiziološkom otopinom nisu bile sposobne razlikovati kvadrant za treninge od drugih kvadranta, dok su one tretirane huprinom X i huperzinom A jasno pokazale preferiranje kvadranta za treninge. Fotodenzitometrijski rezultati pokazali su da je huprin X uzrokovao povećan omjer fosforilirane i nefosforilirane protein-kinaze C  $\alpha$  u korteksu i u hipokampusu, dok je kod primjene huperzina A taj porast bio statistički nebitan. Fosforilacijom protein-kinaze C aktivira se neamiloidogeni put uklanjanja APP-a, preko povećane aktivnosti  $\alpha$ -sekretaza kojom nastaje sAPP $\alpha$  i reducira se sekrecija  $\beta$ -amiloidnih peptida. Oba lijeka dovela su do 20%-tnog povećanja razine metaloproteinaza ADAM10 i TACE, enzima koji djeluju kao  $\alpha$ -sekretaze. Ujedno se nakon dugotrajne primjene huprina X smanjila razina netopljivog  $\beta$ -amiloida. Također je za oba lijeka utvrđen povećan omjer fosforilirane i nefosforilirane glikogen sintaze kinaze 3 beta, što je značajno jer je fosforilani oblik enzima inaktiviran i njegovo povišenje upućuje na moguću redukciju fosforilacije  $\tau$  proteina i njegovo smanjeno vezanje na mikrotubule (Ratia i sur., 2013).



Slika 5. Struktura huprina X

(preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

## 4.4. Nove formulacije huperzina A i njegovih derivata

### 4.4.1. Transdermalni sustav huperzina A baziran na mikroemulziji

Najzastupljeniji farmaceutski oblici huperzina A danas na tržištu su oralni oblici poput tableta i kapsula. S obzirom da se huperzin A mora oralno primijeniti barem dva puta dnevno te da je takav način primjene često otežan kod pacijenata koji boluju od različitih oblika demencije, novija su istraživanja usmjerena prema transdermalnim sustavima kao mogućim novim terapijskim oblicima. Transdermalni terapijski sustavi omogućuju izbjegavanje metabolizma lijeka pri prvom prolasku kroz jetru, održavanje njegove relativno stabilne koncentracije u krvnoj plazmi i smanjenje intervala doziranja. Zadnjih godina mnogo pažnje posvećeno je mikroemulzijama koje pokazuju mnogo prednosti pred ostalim ljekovitim oblicima, poput povećane topljivosti lijeka, odgovarajuće termodinamičke stabilnosti i povećane permeabilnosti lijeka kroz tkiva. Ipak, transdermalna primjena mikroemulzija nije sasvim odgovarajuća, prvenstveno zbog nemogućnosti preciznog doziranja lijeka i nepoznatog vremena kontakta s ljekovitom tvari, što se pokušava nadići primjenom transdermalnih naljepaka. U ovdje navedenom sustavu riječ je o kombinaciji huperzina A s ligustrazin-fosfatom (LP). Ligustrazin je alkaloid izoliran iz biljne vrste *Ligusticum striatum* (DC.) koji pokazuje snažno antioksidativno djelovanje, blokira pretjeran utok kalcijevih iona u stanicu i smanjuje agregaciju trombocita. Biljka se u tradicionalnoj kineskoj medicini koristi u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Ovdje su kombinirani u obliku mikroemulzije kako bi se ispitalo sinergističko djelovanje na prevenciju oštećenja kolinergičkog sustava i sprječavanje oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom kod štakora kod kojih je amnezija uzrokovana primjenom skopolamina. Ovaj terapijski sustav inovativan je jer još ne postoji mnogo literaturnih podataka o transdermalnoj primjeni navedenih tvari ili o njihovom sinergističkom anti-amnesticnom djelovanju, a nije potpuno razjašnjena ni njihova farmakodinamika.

Prvo je ispitana permeacija lijeka *in vitro* kroz membranu te kroz kožu. U tu je svrhu korištena abdominalna koža štakora s koje su odstranjene dlake. Naljepci nisu bili autoadhezivni u suhom stanju pa je koža prvo navlažena vodom. Promatrana je permeacija svake tvari posebno kroz kožu te ukupna permeacija ljekovitih tvari iz naljepka kroz membranu. Opaženo je da je protok ljekovitih tvari iz mikroemulzija tijekom 12 sati u svim sustavima bio veći od kontrolnog i da je oslobađanje obje tvari iz sustava povezano s difuzijom. Također je nađeno da se huperzin A oslobađa sporije nego LP jer je lipofilan pa se nalazi većinom u unutarnjoj fazi, a LP se kao hidrofilan spoj nalazi u vanjskoj.

Farmakodinamika je istražena primjenom naljepaka s različitim omjerima huperzina A i ligustrazina. Također su praćene razine acetilkolinesteraze te antioksidativnih parametara (superoksid dismutaze i glutaciona) u mozgu žrtvovanih štakora, kao i iritacija kože u obliku eritema nakon primjene naljepka. Naljepci su bili predviđeni za kliničku primjenu od najmanje tri dana. Kao animalni model korišteni su štakori sa skopolaminom-induciranom amnezijom. Za prvotni probir pokusne životinje su podijeljeni u 8 skupina prema naljepcima s različitim omjerima tvari od kojih je prva skupina dobila naljepak bez huperzina A i LP. Naljepci su aplicirani na abdominalnu regiju svaka tri dana te su svi štakori nakon devet dana primili 1,5 mg/kg skopolamin-klorida i.p. za induciranje amnezije. Kod skupine koje je nakon skopolamina dobila naljepak koji je sadržavao samo huperzin A aktivnost acetilkolinesteraze se znatno smanjila, a aktivnost superoksid dismutaze povećala, dok je razina glutaciona blago promijenjena. Kod štakora koji su primili samo LP aktivnost acetilkolinesteraze se blago promijenila, dok su razine superoksid dismutaze i glutaciona značajno porasle. Kombinacije huperzina A i LP u različitim omjerima pokazale su različite učinke na aktivnosti navedenih enzima, no kod svih je životinja uočena povećana kolinergička aktivnosti i smanjen oksidativni stres uzrokovan slobodnim radikalima.

Istraživanje je nastavljeno na pedeset eksperimentalnih životinja podijeljenih u pet skupina. Prva skupina je dobila naljepke bez ispitivanih tvari. Druga grupa služila je kao pozitivna kontrola i intragastrično je primala otopine huperzina A i LP u fiziološkoj otopini jednom dnevno tijekom devet uzastopnih dana. Ostalim skupinama aplicirani su naljepci s različitim omjerima tvari svakog trećeg dana. Nakon devet dana štakori su primili 1,5 mg/kg skopolamin-hidroklorida i.p. za poticanje amnezije. U svim skupinama osim prve uočena je smanjena aktivnost acetilkolinesteraze te povećane razine superoksid dismutaze i glutaciona, a učinak je bio ovisan o koncentraciji ispitivanih tvari u naljepku. Nadalje, srednje i visoke doze tvari pokazale su gotovo jednako djelovanje na aktivnosti enzima zbog čega su za daljnja istraživanja odabrane srednje doze tvari kako bi se smanjila potencijalna toksičnost.

Testovi iritacije kože nisu pokazali nikakve očite znakove iritacije na koži (Shi i sur., 2011).

#### **4.4.2. Gel za intranazalnu primjenu huperzina A**

Novija istraživanja pokazala su da bi gel za intranazalnu primjenu huperzina A mogao biti prikladan sustav za dostavu tog lijeka do mozga i tako postati dobar izbor kod dugotrajne terapije Alzheimerove bolesti. U usporedbi s intravenskom i peroralnom primjenom lijeka kod kronične bolesti, intranazalna je primjena znatno jednostavnija. Također, na lijek ne utječe apsorpcija u gastrointestinalnom traktu kao ni metabolizam prvog prolaza kroz jetru. Huperzin A može nazalnim putem doći do mozga jer je riječ o lipofilnoj molekuli male molekulske mase (242,32). Istraživanja su pokazala da huperzin A dobru difundira iz gela te prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, te da istovremeno ne uzrokuje nikakva oštećenja nosnog epitela i cilija (Wang i sur., 2011).

#### **4.4.3. Potkožni implantati ZT-1**

Molekulu ZT-1, prolijek huperzina A, potencijalni je novi lijek kojeg švicarska tvrtka Debiopharm razvija pod novim nazivom Debio 9902. U tu je svrhu ZT-1 oblikovan u sporooslobađajuće implantate koji se inseriraju supkutano. Lijek se iz implantata oslobađa do 28 dana te je kod zdravih dobrovoljaca pokazao poboljšani profil nuspojava. Kontinuirano oslobađanje tog potentnog inhibitora acetilkolinesteraze predstavlja terapijsku opciju s mogućom boljom podnošljivošću kroz napredno i kontinuirano oslobađanje djelatne tvari te snažnijom učinkovitosti u odnosu na svakodnevnu primjenu oralnih oblika.

U novije vrijeme provedena je randomizirana, dvostruko slijepa, oralnim donepezilom kontrolirana studija s ciljem ispitivanja sigurnosti i djelotvornosti ponovljenih mjesečnih supkutanih injekcija implantata s kontinuiranim oslobađanjem Debio 9902 u pacijenata s umjernim oblikom Alzheimerove bolesti. Dostupni preliminarni rezultati su vrlo obećavajući te ukazuju na potencijal ovog inovativnog oblika da posluži kao alternativa dostupnim oralnim inhibitorima acetilkolinesteraze koji se trenutno koriste u liječenju Alzheimerove bolesti (Zangara, 2013).



## **5. ZAKLJUČCI**

Huperzin A je alkaloid izoliran iz kineske huperzije (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.), ljekovite biljke s dugom tradicijom primjene u kineskoj medicini. Dosadašnja preklinička i klinička istraživanja potvrđuju da se huperzin A može ubrojiti među najpotentnije inhibitore acetilkolinesteraze te da pokazuje znatno bolja farmakokinetička svojstva poput veće bioraspoloživosti nakon peroralne primjene, boljeg prolaza kroz krvno-moždanu barijeru te manjeg utjecaja prvog prolaza kroz jetru na plazmatsku koncentraciju lijeka u odnosu na druge inhibitore koji se trenutno koriste u terapiji Alzheimerove bolesti. Zbog slabije i kratkotrajnije inhibicije butirilkolinesteraze, također se odlikuje i boljim profilom nuspojava te su kod manjeg broja pacijenata uočene uglavnom samo blage kolinergičke nuspojave (dijareja, mučnina, povraćanje, glavobolja). Također je ustanovljeno da bi huperzin A mogao djelovati na smanjenje nakupljanja amiloidnih plakova preko Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta te posljedično smanjiti njihovu neurotoksičnost kao i neurotoksičnost uzrokovanu glutamatom. U prilog njegovom neuroprotektivnom djelovanju govore i podaci o antioksidativnim svojstvima. Značajan broj kliničkih studija potvrđuju povoljan učinak huperzina A na poboljšanje kognitivnih funkcija i svakodnevnih životnih aktivnosti kod oboljelih od Alzheimerove bolesti. Iako obećavajući, neke od rezultata potrebno je uzeti s oprezom zbog metodoloških nedostataka pojedinih studija.

U novije vrijeme razvijeni su polusintetski i sintetski derivati huperzina A, ZT-1, B12H i huprin X, koji pokazuju još potentnije antiacetilkolinesterazno djelovanje i imaju slabije izražene nuspojave, a duži intervali doziranja pacijentima olakšavaju primjenu i povećavaju adherenciju.

Korak dalje u istraživanjima učinjen je razvijanjem inovativnih parenteralnih formulacija ovih potencijalnih novih lijekova koji pacijentima olakšavaju primjenu, omogućuju prilagodbu intervala doziranja te primjene nižih doza lijekova zaobilaskom prvog prolaza kroz jetru ili formulacijama s prilagođenim otpuštanjem lijeka. Do danas su razvijeni transdermalni naljepak i intranazalni gel huperzina A te potkožni implantat njegovog derivata ZT-1, koji su se pokazali sigurnim za primjenu te znatno pojednostavljuju režim doziranja, što je poželjno kod pacijenata koji boluju od demencije praćene psihološkim poremećajima i otežanim gutanjem.

Iz svega navedenog može se zaključiti da huperzin A i njegov prolijek ZT-1 pokazuju izuzetan terapijski potencijal za primjenu kod Alzheimerove bolesti, jer su učinkoviti i dobro podnošljivi te posjeduju i dodatna neuroprotektivna svojstva. Međutim, potrebna su daljnja, rigoroznija i veća klinička istraživanja koja će pružiti dodatne, čvršće dokaze potrebne da bi neka od ovih molekula postala novi lijek za Alzheimerovu bolest u zapadnim zemljama.

## **6. LITERATURA**

Desilets AR, Gickas JJ, Dunican KC. Role of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother*, 2009, 43, 514-518.

European public assessment reports, 2017., <http://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 30.8.2017.

Ha GT, Wong RK, Zhang Y. Huperzine A as potential treatment of Alzheimer's disease: An assessment on chemistry, pharmacology and clinical studies. *Chem Biodivers*, 2011, 8, 1189-1204.

Hu S, Wang R, Cui W, Zhang Z, Mak S, Xu D, Choi C, Tsim KW, Carlier PR, Lee M, Han Y. Inhibiting  $\beta$ -amyloid-associated Alzheimer's pathogenesis *in vitro* and *in vivo* by a multifunctional dimeric bis(12)-hupyridone derived from its natural analogue. *J Mol Neurosci*, 2014, 55, 1014-1021.

Huang XT, Qian ZM, Wu KC, Jiang LR, Zhu ZJ, Zhang HY, Yung WH, Ke Y. Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2014, 35 (5), 1045-1054.

Jia JY, Zhao QH, Liu Y, Gui YZ, Liu GY, Zhu DY, Yu C, Hong Z. Phase I study on the pharmacokinetics and tolerance of ZT-1, a prodrug of huperzine A, for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34, 976-982.

Lei Y, Yang L, Ye CY, Qin MY, Yang HY, Jiang HL, Tang XC, Zhang HY. Involvement of intracellular and mitochondrial A $\beta$  in the ameliorative effects of huperzine A against oligomeric A $\beta_{42}$ -induced injury in primary rat neurons. *PLoS ONE*, 2015, 10 (5), e0128366.

Liang YQ, Tang XC. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. *Neurosci Lett*, 2004, 361, 56-59.

Li J, Wu HM, Zhou RL, Liu GJ, Dong BR. Huperzine A for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008, DOI: 10.1002/14651858.

Ma X, Gang DR. The Lycopodium alkaloids. *Nat Prod Rep*, 2004, 21, 752-772.

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

Pierce AL, Bullain SS, Kawas CH. Late-onset Alzheimer disease. *Neurol Clin*, 2017, 35, 283-293.

Rafii MS, Walsh S, Little JT, Behan K, Reynolds B, Ward C, Jin S, Thomas R, Aisen PS. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 2011, 76, 1389-1394.

Ratia M, Gimenez-Llort L, Camps P, Munoz-Torrero D, Perez B, Clos MV, Badia A. Huprine X and huperzine A improve cognition and regulate some neurochemical processes related with Alzheimer's disease in triple transgenic mice (3xTg-AD). *Neurodegenerative Dis*, 2013, 11 (3), 129-140.

Shi J, Cong W, Wang Y, Liu Q, Luo G. Microemulsion-based patch for transdermal delivery of huperzine A and ligutrazine phosphate in treatment of Alzheimer's disease. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 38 (6), 752-761.

Tamchès E, Orgogozo JM, Wilkinson D, Todorova Yancheva S, Gagliano C, Groscurin P, Porchet H, Scalfaro P. ZT-1 for the symptomatic treatment of mild to moderate Alzheimer disease (AD): Preliminary results of a multicenter, randomised, double-blind, placebo and active controlled phase II study. *Alzheimers Dement*, 2006, 2 (3), S625

Tun MKM, Herzon SB. The pharmacology and therapeutic potential of (-)-huperzine A. *J Exp Pharmacol*, 2012, 4, 113-123.

Wang CY, Zheng W, Wang T, Xie JW, Wang SL, Zhao BL, Teng WP, Wang ZY. Huperzine A activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and enhances the nonamyloidogenic pathway in an Alzheimer transgenic mouse model. *Neuropsychopharmacol*, 2011, 36, 1073-1089.

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

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

Wang T, Tang XC. Reversal of scopolamine-induced deficits in radial maze performance by (-)-huperzine A: comparison with E2020 and tacrine. *Eur J Pharmacol*, 1998, 349, 137-142.

Xiao XQ, Yang JW, Tang XC. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neurosci Lett*, 1999, 275, 73-76.

Xu SS, Cai ZY, Qu ZW, Yang RM, Cai YL, Wang GQ, Su XQ, Zhong XS, Cheng RY, Xu WA, Li JX, Feng B. Huperzine A in capsules and tablets for treating patients with Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20, 486-490.

Xu SS, Gao ZX, Weng Z, Du ZM, Xu WA, Yang JS, Zhang ML, Tong ZH, Fang YS, Chai XS, Li SL. Efficacy of tablet huperzine A on memory, cognition, and behavior in Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, 16, 391-395.

Yang G, Wang Y, Tian J, Liu JP. Huperzine A for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS ONE*, 2013, 8 (9), e74916.

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

Zangara A. Huperzine A. U: *Advances in Natural Medicines, Nutraceuticals and Neurocognition*. ured. Stough CKN, Scholey A, urednici, Boca Raton, CRC Press, 2013, str. 323-324.

Zhang HY, Tang XC. Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27 (12), 619-625.

## **7. SAŽETAK / SUMMARY**

Cilj ovog diplomskog rada bio je prikupiti, sistematizirati i prikazati dosadašnje znanstvene spoznaje o pretkliničkim i kliničkim dokazima djelotvornosti huperzina A i njegovih derivata. Huperzin A je alkaloid izoliran iz kineske huperzije (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.), ljekovite biljke s dugom tradicijom primjene u kineskoj medicini. Rezultati dosadašnjih pretkliničkih i kliničkih istraživanja potvrđuju da se može ubrojiti među najpotentnije inhibitore acetilkolinesteraze uz znatno bolja farmakokinetička svojstva i profil nuspojava u odnosu na druge inhibitore koji se trenutno koriste u terapiji Alzheimerove bolesti. Također postoje dokazi o njegovom neuroprotektivnom djelovanju. Noviji derivati huperzina A, posebice molekula ZT-1 koja se smatra prolijekom huperzina A, pokazuju još potentnije antiacetilkolinesterazno djelovanje i slabije izražene nuspojave, a inovativne parenteralne formulacije olakšavaju primjenu ovih potencijalnih novih lijekova kod pacijenata koji boluju od demencije. Iako značajan broj kliničkih ispitivanja potvrđuje povoljan učinak huperzina A na kognitivne funkcije i svakodnevne životne aktivnosti kod oboljelih, potrebna su daljnja, rigoroznija i veća klinička istraživanja koja će pružiti dodatne, dovoljno čvrste dokaze potrebne da bi huperzin A ili njegov derivat postao novi lijek za Alzheimerovu bolest.

The objective of this study was to collect, systematize and provide recent scientific knowledge on preclinical and clinical evidence of the efficacy of huperzine A and its derivatives. Huperzin A is an alkaloid isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis., the Chinese medicinal herb with a long tradition of use in Chinese medicine. The results of available preclinical and clinical studies confirm that it can be counted among the most potent acetylcholinesterase inhibitors with significantly better pharmacokinetic properties and side effects profile compared to other inhibitors currently used in Alzheimer's disease therapy. There is also evidence of its neuroprotective action. Newer derivatives of huperzine A, especially the ZT-1 molecule that is considered a prodrug of huperzine A, showed even more potent antiacetylcholinesterase activity and weaker side effects, and innovative parenteral formulations facilitate the application of these potential new drugs in patients suffering from dementia. Although a significant number of clinical trials confirm the beneficial effect of huperzine A on cognitive functions and daily life activities in patients, further, more rigorous and larger clinical studies are needed to provide additional, sufficiently solid evidence necessary to make huperzine A or its derivative a new drug for Alzheimer's disease.



**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /  
BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmakognoziiju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### TERAPIJSKI POTENCIJAL HUPERZINA A I NJEGOVIH DERIVATA U LIJEČENJU ALZHEIMEROVE BOLESTI

Katarina Zemljak

#### SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je prikupiti, sistematizirati i prikazati dosadašnje znanstvene spoznaje o pretkliničkim i kliničkim dokazima djelotvornosti huperzina A i njegovih derivata. Huperzin A je alkaloid izoliran iz kineske huperzije (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.), ljekovite biljke s dugom tradicijom primjene u kineskoj medicini. Rezultati dosadašnjih pretkliničkih i kliničkih istraživanja potvrđuju da se može ubrojiti među najpotentnije inhibitore acetilkolinesteraze uz znatno bolja farmakokinetička svojstva i profil nuspojava u odnosu na druge inhibitore koji se trenutno koriste u terapiji Alzheimerove bolesti. Također postoje dokazi o njegovom neuroprotektivnom djelovanju. Noviji derivati huperzina A, posebice molekula ZT-1 koja se smatra prolijekom huperzina A, pokazuju još potentnije antiacetilkolinesterazno djelovanje i slabije izražene nuspojave, a inovativne parenteralne formulacije olakšavaju primjenu ovih potencijalnih novih lijekova kod pacijenata koji boluju od demencije. Iako značajan broj kliničkih ispitivanja potvrđuje povoljan učinak huperzina A na kognitivne funkcije i svakodnevne životne aktivnosti kod oboljelih, potrebna su daljnja, rigoroznija i veća klinička istraživanja koja će pružiti dodatne, dovoljno čvrste dokaze potrebne da bi huperzin A ili njegov derivat postao novi lijek za Alzheimerovu bolest.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 5 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: huperzin A, *Huperzia serrata*, Alzheimerova bolest

Mentor: **Doc. dr. sc. Biljana Blažeković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Biljana Blažeković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

**Dr. sc. Željka Vanić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUPERZINE A AND ITS DERIVATIVES IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE**

**Katarina Zemljak**

#### **SUMMARY**

The objective of this study was to collect, systematize and provide recent scientific knowledge on preclinical and clinical evidence of the efficacy of huperzine A and its derivatives. Huperzin A is an alkaloid isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis., the Chinese medicinal herb with a long tradition of use in Chinese medicine. The results of available preclinical and clinical studies confirm that it can be counted among the most potent acetylcholinesterase inhibitors with significantly better pharmacokinetic properties and side effects profile compared to other inhibitors currently used in Alzheimer's disease therapy. There is also evidence of its neuroprotective action. Newer derivatives of huperzine A, especially the ZT-1 molecule that is considered a prodrug of huperzine A, showed even more potent antiacetylcholinesterase activity and weaker side effects, and innovative parenteral formulations facilitate the application of these potential new drugs in patients suffering from dementia. Although a significant number of clinical trials confirm the beneficial effect of huperzine A on cognitive functions and daily life activities in patients, further, more rigorous and larger clinical studies are needed to provide additional, sufficiently solid evidence necessary to make huperzine A or its derivative a new drug for Alzheimer's disease.

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

Thesis includes: 37 pages, 5 figures, 1 table and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: huperzine A, *Huperzia serrata*, Alzheimer's disease

Mentor: **Biljana Blažeković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: September 2017.