

МОДУЛЯЦІЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ БЕРБЕРИНУ ШЛЯХОМ ЙОГО ІММОБІЛІЗАЦІЇ НА РІЗНИХ ПОЛІМЕРНИХ НАНОНОСІЯХ

Н. СКОРОХІД¹, Р. ПАНЧУК¹, О. ЗАЙЧЕНКО², Н. МІТІНА²,
WANG LIZHEN³, LIU KESHUN³, JIN MENG³, М. КЛІЩ¹, Р. СТОЙКА^{1*}

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів, Україна, вул. Драгоманова 14/16, Львів, 79005, Україна

² Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна, вул. С. Бандери, 12, Львів, 79013, Україна

³ Інститут біології, Технологічний університет Цілу (Шаньдунська Академія наук), Східна дорога Цзинші 28789, Цзінань 250103, провінція Шаньдун, Китайська Народна Республіка; Інженерний науково-дослідний центр моделей риб-зебр для вивчення захворювань людини і скринінгу ліків провінції Шаньдун, Східна дорога Цзинші 28789, Ji'nan 250103, провінція Шаньдун, Китайська Народна Республіка

E-mail: n.skorokhyd@gmail.com, rpanchuk@ukr.net, alzaich@i.ua, nmitina10@gmail.com, wlzh1106@126.com, liukechun2000@163.com, mjin1985@hotmail.com, mykola.klishch1707@gmail.com, stoika.rostyslav@gmail.com *

Автор для кореспонденції – Р. Стойка, e-mail: stoika.rostyslav@gmail.com

Берберин є ізохіноліновим алкалоїдом, отриманим із різних лікарських рослин, зокрема *Berberis spp.*, *Coptis spp.*, *Hydrastis spp.* (Imanshahidi and Hosseinzadeh 2008). Його широко застосовують в медицині та фармації для профілактики захворювань і лікування. Однак, незважаючи на виражені фармакологічні властивості берберину, існують певні обмеження щодо його терапевтичного застосування. Полімерні наночастинки можуть бути ефективною платформою для подолання цих обмежень. У даному дослідженні вперше отримані стабільні водні комплекси берберину з використанням трьох типів полімерних носіїв. Для їх синтезу використано полімер-аналогові перетворення та ко-полімеризацію ПЕГ-метакрилату (PEG-MA) (Riabtseva et al., 2016). Такий підхід дозволив контролювати структурні та молекулярно-масові характеристики нових наноконструкцій берберину, їх здатність до утворення міцел та колоїдно-хімічні властивості, що впливають на біосумісність отриманих концентратів. В роботі проведено порівняльне дослідження *in vitro* цитотоксичної активності комплексів берберину на 3-ох різних розгалужених полімерних носіях: 1) *poly(VEP-co-GMA)-graft-mPEG*; 2) *poly(VEP-co-GMA)-graft-pEtOX*; 3) *poly(PEGMA-co-DMM)*. Дослідження життєздатності клітин *in vitro* продемонструвало, що використані наноконструкції берберину на полімерних носіях виявляють більш високу токсичність щодо пухлинних клітин, ніж берберин у вільній формі. Ступінь зниження життєздатності клітин під впливом наноконструкцій берберину (PC-PEG-Berb, PC-pEtOX-Berb, PC-PEGMA-Berb) залежить від типу полімерного носія. У той же час, нативні полімерні носії (PC-PEG, PC-pEtOX, PC-PEGMA) у вільній формі не викликають значного зниження життєздатності клітин у концентраціях, необхідних для доставки 50 мкМ берберину, що свід-

чить про їхню біосумісність. Отримані результати вказують на перспективність використання комплексів берберину з полімерними наноконструкціями у протипухлинній хіміотерапії.

Ключові слова: берберин, полімерні наноконструкції, протипухлинна активність, редокс-статус, індукція апоптозу.

Вступ. Біологічно активні сполуки природного походження дедалі частіше застосовують як хіміотерапевтичні агенти (Cragg and Pezzuto, 2016; Kinghorn et al., 2016). Перспективними кандидатами для розробки терапевтично активних речовин є алкалоїди, більшість із них проявляють бактерицидні, протизапальні та протипухлинні властивості (Lu et al., 2012). Окремі представники цієї групи (вінбластин, вінорелбін, вінкрестин та віндезин) уже тривалий час використовують для лікування онкологічних хворих (Mondal et al., 2019).

Значну увагу як потенційного джерела новітніх протипухлинних засобів привертають до себе ізохінолінові алкалоїди, родина яких налічує понад 210 представників (Zhi-Xing et al., 2017). Одним із найвідоміших з них є бензофенантридиновий алкалоїд сангвінарин, що володіє потужною протипухлинною активністю поряд із протизапальними, антибактеріальними та знеболювальними властивостями (Singh and Sharma, 2018). Однак значним недоліком сангвінарину є його низька вибірковість дії, що, попри значний терапевтичний потенціал, є головною перешкодою для його подальшого використання в медицині (Singh and Sharma, 2018).

Саме тому більш доцільною є стратегія вибіркового посилення протипухлинної дії іншого представника ізохінолінових алкалоїдів –

берберину, який демонструє широкий спектр фармакологічних властивостей і при цьому не проявляє значних побічних ефектів (Liu et al., 2016; Liu et al., 2019; Nie et al., 2024). Берберин демонструє широкий спектр біологічної активності, зокрема антиоксидантну (Luo and Fan, 2011), протимікробну (Yi et al., 2007), протипухлинну (Sun et al., 2009), протизапальну (Kuo et al., 2004) та противірусну (Hayashi et al., 2007).

Попри широке використання берберину як біологічно активної добавки, він володіє суттєвим недоліком, а саме низькою біодоступністю, зумовлену його поганою розчинністю у воді та низьким вмістом у плазмі крові (менше 1 %) при пероральному вживанні (Cui et al., 2018). Крім поганої розчинності у воді та біологічних рідинах, недостатнім є всмоктування берберину у шлунково-кишковому тракті, а також швидкий метаболізм і виведення з організму (Chen et al., 2011; Liu et al., 2016; Spinozzi et al., 2014). Сукупність цих факторів значно обмежує біодоступність берберину.

Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є використання спеціалізованих систем доставки ліків різної природи, які б збільшили біодоступність берберину, а отже — і його терапевтичну активність *in vivo* (Javed Iqbal et al., 2020; Marques et al., 2023). Питання підбору найбільш ефективного носія для направленої доставки берберину до клітин-мішеней залишається відкритим. Наразі невідомо, які саме параметри носія (розгалуженість бічних ланцюгів, розміри міцели, молекулярна маса) є критичними для забезпечення максимальної водорозчинності берберину, а також його стабільності у водних розчинах та підвищення ефективності біологічної дії.

У роботі нами було використано три типи гребенеподібних амфіфільних полімерних носіїв із молекулярною масою, що дозволяє їм утримувати в своєму складі гідрофобні сполуки і слугувати «контейнерами» для їх доставки в організмі. Для збільшення біодеградельності цих полімерів до них було приєднано гетероатомні бічні ланцюги поліетиленгліколю (PEG), поліетилноксазоліну (pEtOx) або ж ПЕГ-метакрилату (PEGMA). Цілями даної роботи було встановити, який з використаних нами носіїв є оптимальним для іммобілізації

берберину і запропонувати нові підходи для збільшення селективності біологічної дії алкалоїдів ізохінолінової групи.

Матеріали і методи. Синтез полімерних носіїв. Для синтезу гребенеподібних полімерних носіїв (ПН) використовували дві синтетичні стратегії: 1) прищеплення монометилового ефіру ПЕГ (мПЕГ) або поліетилноксазоліну (pEtOx) до епоксид-вмісного полімеру (grafting to) (Kobylynska et al., 2018) і 2) (ко)полімеризація макромерів ПЕГ-метакрилату (grafting through) (Paiuk et al., 2018).

Матеріали для синтезу ПН: мономери гліциділметакрилат (ГМА) («Merck», США), N-вініл-2-піролідон (NBP) (Sigma-Aldrich) і діметилмалеїнат (ДММ) (Acros) очищали перегонкою в вакуумі. Макромер поліетиленгліколь метиловий етер метакрилат (ПЕГМА, $M_n = 475$ Да), монометиловий етер поліетиленгліколю (мПЕГ, $M_n = 550$ Да), азобісізо-бутіронітрил (АІБН), етилетиат трифториду бору («Merck», США) використовувалися без додаткового очищення. Всі розчинники були отримані від Хімлаборреактив («Київ», Україна) і використовували після додаткового очищення (Proskauer et al., 1955). Пероксидний мономер 5-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексен-3-ін (ВЕР) був синтезований за відомою методикою (Voronov et al., 1996). Поліетилноксазолін (pEtOx) із молекулярною масою 2000 Да був отриманий за допомогою методу РОП-полімеризації мономеру 2-етил-2-оксазоліну (Sigma-Aldrich) за відомою методикою (Dworak et al., 2014).

Синтез полімерних носіїв:

1) Гребенеподібний кополімер *полі(ВЕР-ГМА)-графт-мПЕГ(РС-PEG) та полі(ВЕР-ГМА)-графт-pEtOx (РС-pEtOx)* синтезували в дві стадії. Спочатку методом радикальної кополімеризації мономерів ВЕР (0,41 г, 2,2 ммоль) і ДМА (7,72 г, 54,4 ммоль) в діоксані (7,9 мл) був отриманий епоксидовмісний полімер, ініціатором радикало-утворювання був АІБН (0,129 г, 0,8 ммоль), полімеризацію проводили при 343 К до досягнення максимальної конверсії 65 %. Отриманий полімер очищали переосадженням (Dietrich et al., 2013). Після цього ко-полімер використовували як основу для одержання ПЕГ-вмісного та поліоксазо-

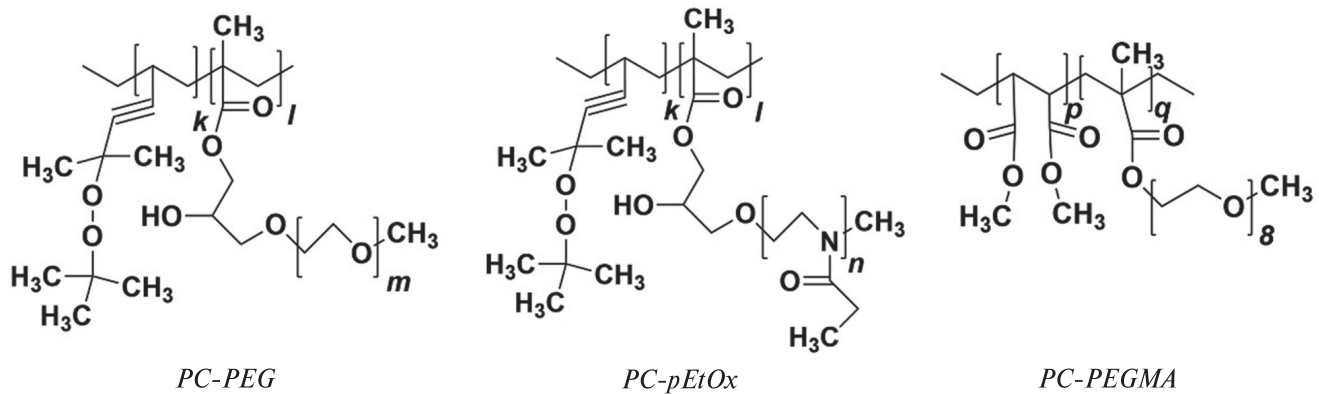


Рис. 1. Структура полімерних наноносіїв полі(ВЕР-ГМА)-графт-мПЕГ (PC-PEG), полі(ВЕР-ГМА)-графт-пЕтОх (PC-pEtOx) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ)

Склад, молекулярно-масові характеристики полімерних носіїв (ПН) та результати дослідження розмірів міцелоподібних структур за допомогою методів ДРС

Полімерний носій	Склад полімерних носіїв, % мол					Молекулярна маса полімерних носіїв, кДа	Розмір міцелярних структур (метод ДРС) (нм)
	ВЕР-ланки	ГМА-графт-мПЕГ ланки	ГМА-графт-пЕтОкс-ланки	ПЕГМА-ланки	ДММ-ланки		
PC-mPEG	1,9	98	—	—	—	165	52,0 ± 28,0
PC-pEtOx	1,0	—	99,0	—	—	350	180 ± 33,0
PC-PEGMA	—	—	—	87,0	13,0	47,0	150 ± 40

лінвмісного гребенеподібних кополімерів. Синтез PC-PEG проводили наступним чином: до 20 мл розчину полімеру (ВЕР-ко-ГМА) (1,0 г) в діоксані додавали етилтират трифториду бору (0,027 мл, 0,19 ммоль), а потім краплями додавали 15 мл розчину мПЕГ (2,5 г, 4,35 ммоль) в діоксані і перемішували впродовж 3 год при 313К. Синтез PC-pEtOx здійснювали за аналогічною методикою щодо прищеплення ланок ПЕГ: поліетилоразолін перед проведенням синтезу сушили під вакуумом при 313К 24 год, потім до 20 мл розчину пол(ВЕР-ко-ГМА) (1,0 г) в хлористому метилени додавали етилтират трифториду бору (0,013 мл, 0,08 ммоль), а потім додавали 15 мл розчину пЕеОх (6,5 г, 3,25 ммоль) в хлористому метилени і перемішували впродовж 3 год при 313К Незв'язаний мПЕГ пЕтОх видаляли діалізом, використовуючи для цього діалізні мішки з розміром пор MWCO 6–8 кДа («Merck», США) і потім сушили при кімнатній температурі в вакуумі. Структура полімеру і його склад

представлені на рис. 1. Структуру отриманих ко-полімерів підтверджували, використовуючи метод ЯМР спектроскопії та аналіз на функціональні групи.

2) Гребенеподібний полі(ПЕГМА-ко-ДММ) синтезували в діоксані, використовуючи методом радикальної ко-полімеризації ПЕГ-вмісного макромеру та ДММ, полімеризацію ініціювали АІБН за присутності ІПБ, як регулятора довжини полімерного ланцюга. Для синтезу полі(ПЕГМА-ко-ДММ) готували суміш ПЕГМА (3,8 мл, 8,0 ммоль) і ДММ (0,13 мл, 0,9 ммоль), до отриманої суміші додавали АІБН (0,1 г, 0,61 ммоль) в діоксані. Синтез проводили при 333 К, до конверсії мономерів 65 % (Dietrich et al., 2013). Отриману суміш багаторазово переосаждували в гексані. Синтезовані полімери очищали від макромерів дробним осадженням і сушили в вакуумі до постійної ваги (Francuskiewicz, 2013). Структура полімерів та їх склад представлені на рис. 1 і в таблиця.

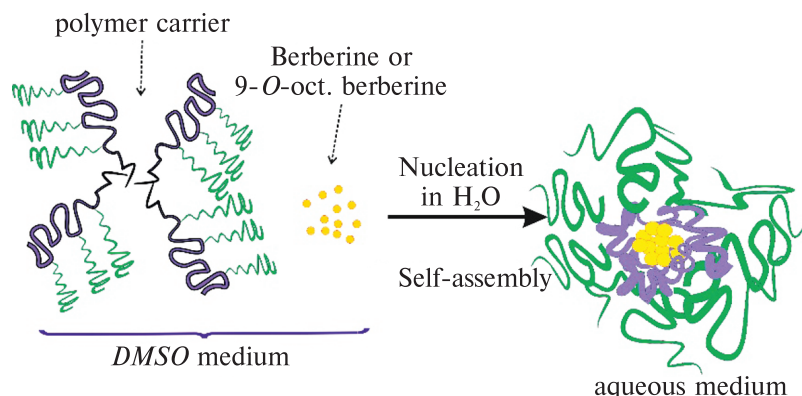


Рис. 2. Схема формування водних систем доставки на основі гребенеподібних полімерних носіїв та алкалоїдів

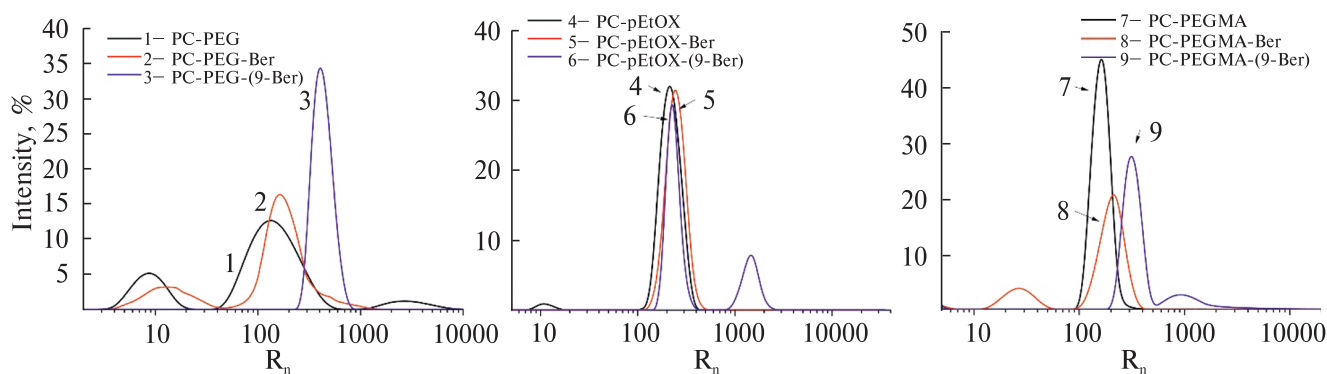


Рис. 3. Гідродинамічні радіуси міцелярних структур(1, 4, 7) утворюваних полімерними носіями та їх комплекси із Берберином (2, 5, 8) і алкіл-берберином (3, 6, 9) ([полімер] = 1 г/100 мл, [Алкалоїд] = 0,03 г/100 мл)

Приготування нанокон'югатів берберину. Для приготування водних розчинів полімерних носіїв (ПН): 0,09 г ПН розчиняли 0,9 мл диметилсульфоксиду (ДМСО). Цей розчин ПН додавали 8,0 мл 0,9%-вого розчину NaCl. Потім розчин перемішували впродовж 0,5 год і обробляли ультразвуком впродовж 10 с. Готували водні системи доставки берберину (Verb) або алкілованого похідного берберину (alcVerb), який був отриманий і охарактеризований раніше (Wang et al., 2020). Суміш сполук на основі Verb або alcVerb і ПН в розчині ДМСО додавали до фізіологічного розчину наступним чином: 0,045 г ПН розчиняли в 0,15 мл ДМСО, а 0,0015 г Verb (або alcVerb). Розчини ПН та Verb (або alcVerb) змішували і додавали до 4,25 мл 0,9%-вого розчину NaCl і обробляли ультразвуком впродовж 10 с. Наявність у структурі гребенеподібних-кополімерів карболанцюгових блоків обумовлює їхню поверхне-

ву активність, здатність утворювати полімерні міцели з відносно високим числом агрегації, причому природа блоків помітно впливає на колоїдно-хімічні характеристики кополімерів. Утворення водних дисперсій алкалоїдів відбувається в результаті їх нуклеації у воду, молекули гребенеподібних полімерних носіїв створюють оболонку, тому можна стверджувати, що гребенеподібні полімерні носії формують міцелярний «контейнер» із молекулами алкалоїду в середині (рис. 2).

Розмір полімерних міцел та полімерних комплексів з алкалоїдами вимірювали за допомогою методу динамічного розсіювання світла (DLS) з використанням DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, Санта-Барбара, Каліфорнія, США). При утворенні міцелярних комплексів спостерігали збільшення розмірів колоїдних структур (рис. 3), що є характерним для систем доставки, які формуються в результаті нук-

леації водонеразчинної субстанції з розчину ДМСО у воду за присутності міцелоутворювального полімерного носія (Finiuk et al., 2022; Kobylinska et al., 2019).

Клітини та їх культивування. У роботі були використані наступні лінії злоякісних клітин: Jurkat (гострий Т-лейкоз людини); B16F10 (меланома миші); НСТ-116 (карцинома прямої кишки людини). Усі клітинні лінії були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня в рамках білатерального українсько-австрійського проекту «Механізми цитотоксичної активності ангуциклінового антибіотика ландоміцину Е щодо пухлинних клітин» (2011–2012).

Клітини вирощували у культуральному середовищі RPMI-1640 («Merck», США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби («Merck», США) і 50 мкг/мл гентаміцину («Merck», США) в CO₂ – інкубаторі Galaxy 170S (Eppendorf, Німеччина) з 5%-вим вмістом CO₂ при 37 °С. Клітини пересівали через кожні 72 год з розрахунку 100 000–200 000 клітин на 1 мл культурального середовища.

Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин. Берберин («Merck», США) розчиняли у ДМСО («Merck», США) для отримання розчину з концентрацією речовини 10 мМ. При додаванні берберину до культури клітин готували його серійні розведення у безсироватковому середовищі з розрахунку, щоб кінцева концентрація ДМСО у культурі клітин становила менше 1 %. Водні розчини берберину на полімерних носіях перед додаванням до клітин додатково розводили у безсироватковому середовищі з розрахунку, щоб діюча концентрація берберину у них відповідала тій же дозі берберину, як у вільній формі.

Клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) у концентрації 500 тис/мл у середовищі RPMI за присутності 10%-вої ембріональної телячої сироватки крові і додавали досліджувані речовини у різних концентраціях. Через 24 год інкубації клітин підраховували їх кількість у гемоцитометричній камері, визначаючи число мертвих клітин після їхнього фарбування 0,1%-

вим розчином Трипанового синього. Цей барвник зафарбовує в синій колір мертві клітини з пошкодженою мембраною, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими.

Визначення впливу берберину та його нанокон'югатів на продукцію активних форм кисню та рівень відновленого глутатіону. Для визначення вмісту різних АФК у клітинах-мішенях за дії досліджуваних сполук використовували флуоресцентний барвник дигідрохлорофлуоресцеїндацетат (DCFDA), специфічний щодо пероксиду водню, та дигідроетидій (DHE), специфічний щодо супероксид-аніонів. Для визначення рівня H₂O₂ перед додаванням досліджуваних сполук проводили пре-інкубацію клітин карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116 та з DCFDA (10 мМ, 30 хв). Після завершення інкубації з препаратами клітини трипсинізували, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином, переносили у пробірки для проточного цитометра FACS Tubes («Becton Dickinson», США) і одразу визначали флуоресценцію зразків на фільтрі 530/30-А проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 («Becton Dickinson», США).

Для визначення рівня O₂⁻ за 30 хв до завершення інкубації з препаратами до клітин лінії НСТ-116 додавали розчин DHE (10 мМ, 30 хв), потім клітини трипсинізували, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином, переносили у пробірки для проточного цитометра FACS Tubes («Becton Dickinson», США) і одразу визначали флуоресценцію зразків на фільтрі 576/25-А проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 («Becton Dickinson», США). У паралельному експерименті обов'язково аналізували аутофлуоресценцію зразків (без додавання барвника).

Для визначення впливу берберину та його нанорозмірних форм на носіях на вміст клітинних тіолів використовували флуоресцентний барвник монохлоробіман (mBCl). До клітин додавали 40 мМ mBCl («Merck», США), і за 30 хв після внесення барвника додавали досліджувані сполуки. Після цього клітини трипсинізували, двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином і переносили у пробірки для проточного цитометра FACS Tubes («Becton Dickinson», США) та визначали флуо-

ресценцію mBCI на askmnhS 450/50-A проточного цитометра BD LSR Fortessa X-20 («Becton Dickinson», США). У паралельному експерименті обов'язково аналізували аутофлуоресценцію зразків (без додавання барвника).

Визначення апоптозу. Для оцінювання загибелі клітини їх фарбували APC-кон'югованим анексином V та пропідію йодидом (PI) за допомогою набору для виявлення апоптозу (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США) як описано в інструкції виробника. Після інкубації клітин з досліджуваними препаратами (24 год) клітини центрифугували при 1200 об/хв, двічі промивали забуференим фізіологічним розчином (PBS) та інкубували впродовж 15 хв у буфері для зв'язування анексину V (BD Biosciences, Франклін-Лейкс, Нью-Джерсі, США), що містив 1/50 об'єму кон'югованого з APC розчину Аннексину V та PI (50 мкг/мл). Опісля зразки розводили вдвічі відповідним об'ємом буфера для зв'язування анексину V (BD Pharmingen, США) і негайно проводили вимірювання, використовуючи фільтри 670/14 нм (APC) і 575/26 нм (PI) проточного цитофлуориметра BD LSR Fortessa (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, США). Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Cell Quest Pro (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, США).

Статистична обробка результатів. Досліди проводили у 3-ох паралелях у кожному варіанті. Статистичну обробку отриманих даних проводили в програмі GraphPad Prism 8.0 («GraphPad Software», США) із використанням двостороннього дисперсійного аналізу. Статистична значущість була встановлена на рівні $P \leq 0.05$.

Результати і обговорення. Оскільки синтез полімерних носіїв для доставки берберину детально висвітлено в розділі «Матеріали і методи дослідження», ми розпочнемо аналіз отриманих в роботі результатів із характеристики цитотоксичної активності берберину та його нанокон'югатів, іммобілізованих на полімерних носіях різної структури, зокрема їх впливу на різні типи злоякісних клітин – Т-лейкозу людини (лінія Jurkat), меланоми миші (лінія B16F10) і карциноми прямої кишки людини (лінія HCT-116). Найвищу чутливість як до берберину, так і до полімерних носіїв продемонстрували лейкозні клітини. Так у кон-

центрації 50 мкМ і берберин, і носії PC-PEG, PC-PEGMA, PC-pEtOx пригнічували на 40 % ріст клітин Т-лейкозу людини (лінія Jurkat) (рис. 4). Відповідно, ефект від іммобілізації берберину на цих носіях був практично відсутній – через досить високу токсичність самих носіїв. На відміну від цього, клітини меланоми B16F10 та карциноми HCT-116 були нечутливими до носіїв у вільній формі – навіть у найвищій їхній концентрації, яка була еквівалентна дозі носія, необхідної для доставки 50 мкМ берберину (рис. 5). В той же час спостерігали виражений синергічний ефект від іммобілізації берберину на носії PC-PEGMA щодо обидвох клітинних ліній, що призвело до посилення дії берберину на 30–40 % залежно від концентрації та клітинної лінії. Таким чином, іммобілізація берберину на гребенеподібному полімерному носії PC-PEGMA не лише забезпечує підвищену водорозчинність цього алкалоїда, але й посилює його протипухлинну дію *in vitro*.

Для з'ясування, якими можуть бути механізми посилення біологічної дії берберину за його іммобілізації на полімерних носіях, досліджено вплив цього алкалоїда та його нанокон'югатів на носіях (24 год інкубації) на флуктуації рівнів активних форм кисню та відновленого глутатіону у клітинах карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116.

Виявлено, що усі досліджувані носії (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) практично не впливають на базальний рівень глутатіону та продукцію супероксид-аніонів у клітинах-мішенях, тоді як аналіз змін пероксиду водню показав 2-кратне зростання рівня останнього за дії носія PC-PEGMA. Тим не менше, така власна про-оксидантна активність даного носія ніяк не проявилася при вивченні дії його кон'югату з берберином. Зокрема, у дозі 25 мкМ берберин призводив до 2-кратного зростання рівня пероксиду водню та пропорційного (на 30 %) зниження рівня відновленого глутатіону, проте нами не виявлено різниці в індукції цих показників за дії нанокон'югатів берберину. У вищій концентрації (50 мкМ) берберин призводив до ще більшого (у понад 4 рази) зростання рівня H_2O_2 – за рахунок практично повного пригнічення продукції супероксид-аніонів (див. рис. 5). При

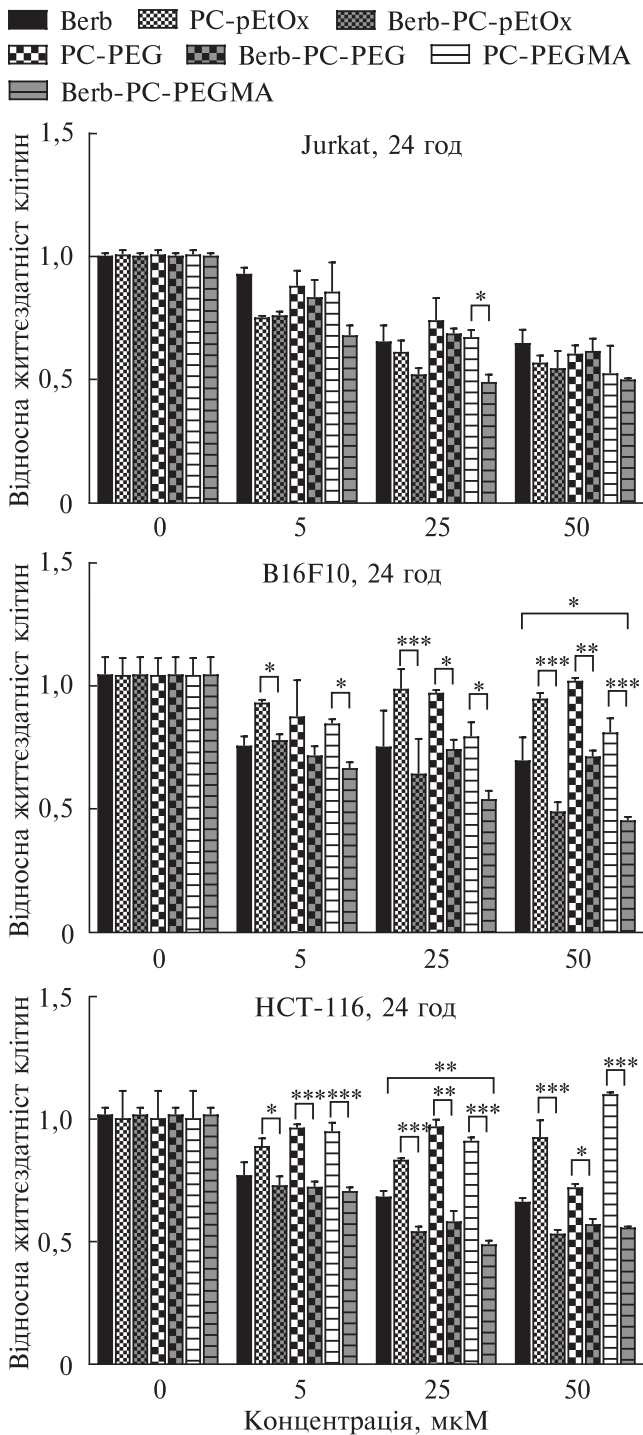


Рис. 4. Порівняння цитотоксичної активності берберину та його кон'югатів з різними полімерними носіями *in vitro* щодо клітин лейкозу, меланоми та карциноми. Забарвлення Трипановим синім, 24 год інкубації. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

цьому спостерігали деяке зростання рівня відновленого глутатіону, що може бути природ-

ною реакцією клітин на зовнішнє джерело оксидативного стресу, тоді як іммобілізація берберину на усіх досліджуваних носіях призводила до зниження цього показника нижче, ніж у контролі.

Аналогічний ефект спостерігали й щодо продукції H_2O_2 — лише носій PC-pEtOx ніяк не впливав на цей показник, тоді як і PC-PEG, і PC-PEGMA призводили до суттєвого (на 30 % для PC-PEG та 40 % для PC-PEGMA) зниження пероксиду водню, індукованого берберином у високій концентрації (50 мкМ). Причиною цього може бути або власна антиоксидантна дія носія, або ж більш сповільнене та рівномірне проникнення берберину у клітини-мішені шляхом його контрольованого вивільнення зі складу носія. Динаміка цього процесу є принципово відмінною від дії сполуки у вільній формі, яка при розчиненні у ДМСО дуже швидко проникає через плазматичну мембрану і запускає значні зміни у вмісті внутрішньоклітинних метаболітів.

Для перевірки цієї гіпотези нами у паралельному експерименті було досліджено зміни у аутофлуоресценції берберину на усіх довжинах хвилі (450 нм, 530 нм, 576 нм), яка за даними літератури є маркером його накопичення у клітинах-мішенях. За дії носія PC-PEG зафіксовано зниження аутофлуоресценції берберину у клітинах лінії HCT-116 на 25 % (на фільтрі проточного цитометра 530 нм) та на 31 % (на фільтрі проточного цитометра 576 нм), що позитивно корелює зі зниженням продукції пероксиду на 32 % за дії комплексу Berb-PC-PEG (рис. 5). Аналогічні результати отримані для носія PC-PEGMA, а саме зниження аутофлуоресценції на каналі 530 нм на 22 % і на каналі 576 нм — на 25 %, що позитивно корелювало зі зниженням продукції H_2O_2 на 38 % (рис. 5). Отже, сповільнення індукції оксидативного стресу у злоякісних клітинах за дії берберину на носіях, функціоналізованих ПЕГ та ПЕГ-МА, зумовлене більш плавним і повільним вивільненням даного алкалоїда з його полімерного комплексу, що може мати важливе значення *in vivo*, де тривалість перебування цієї біологічно активної речовини у кровоносному руслі є критично важливим фактором для забезпечення її терапевтичної активності.

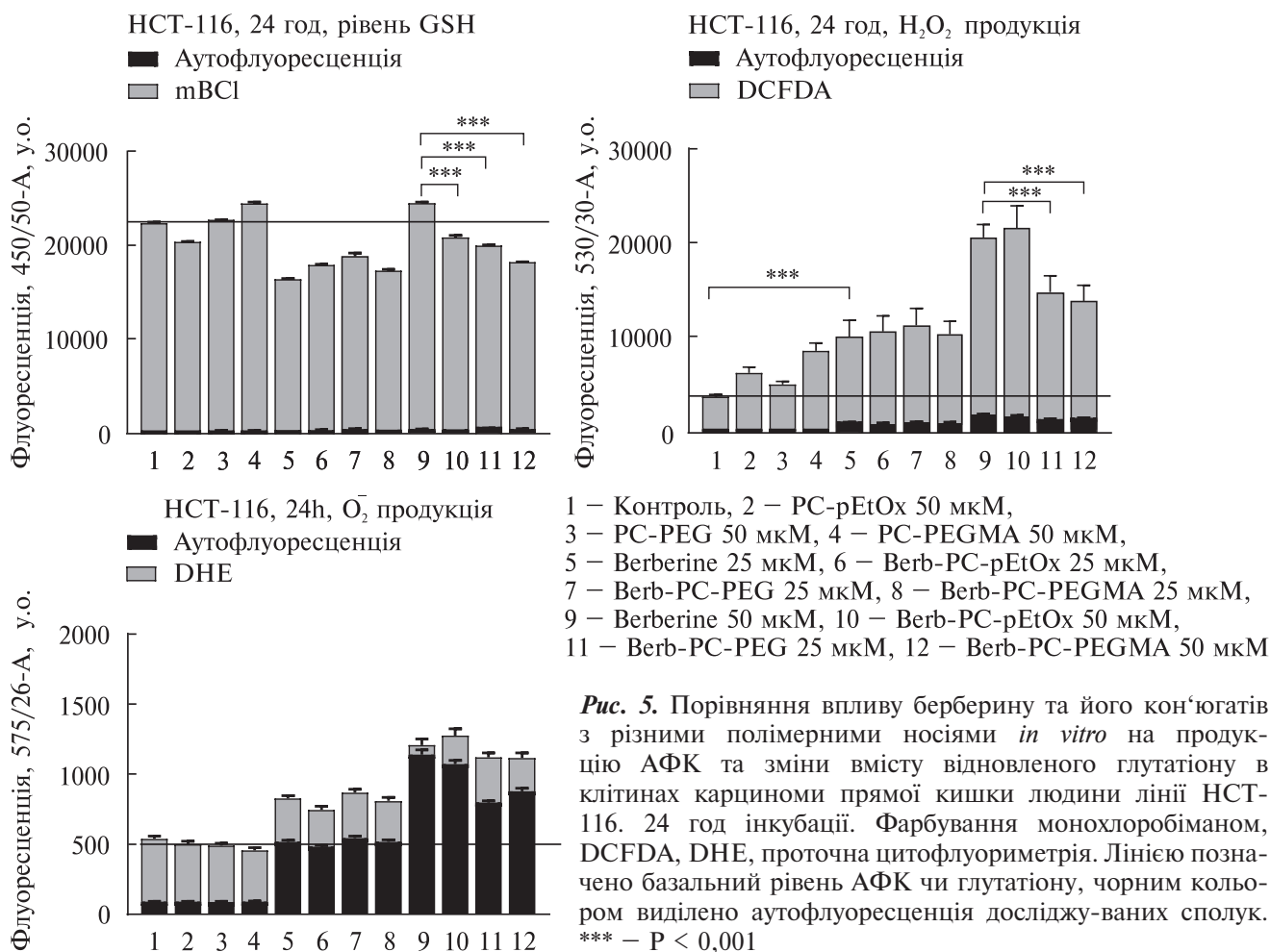


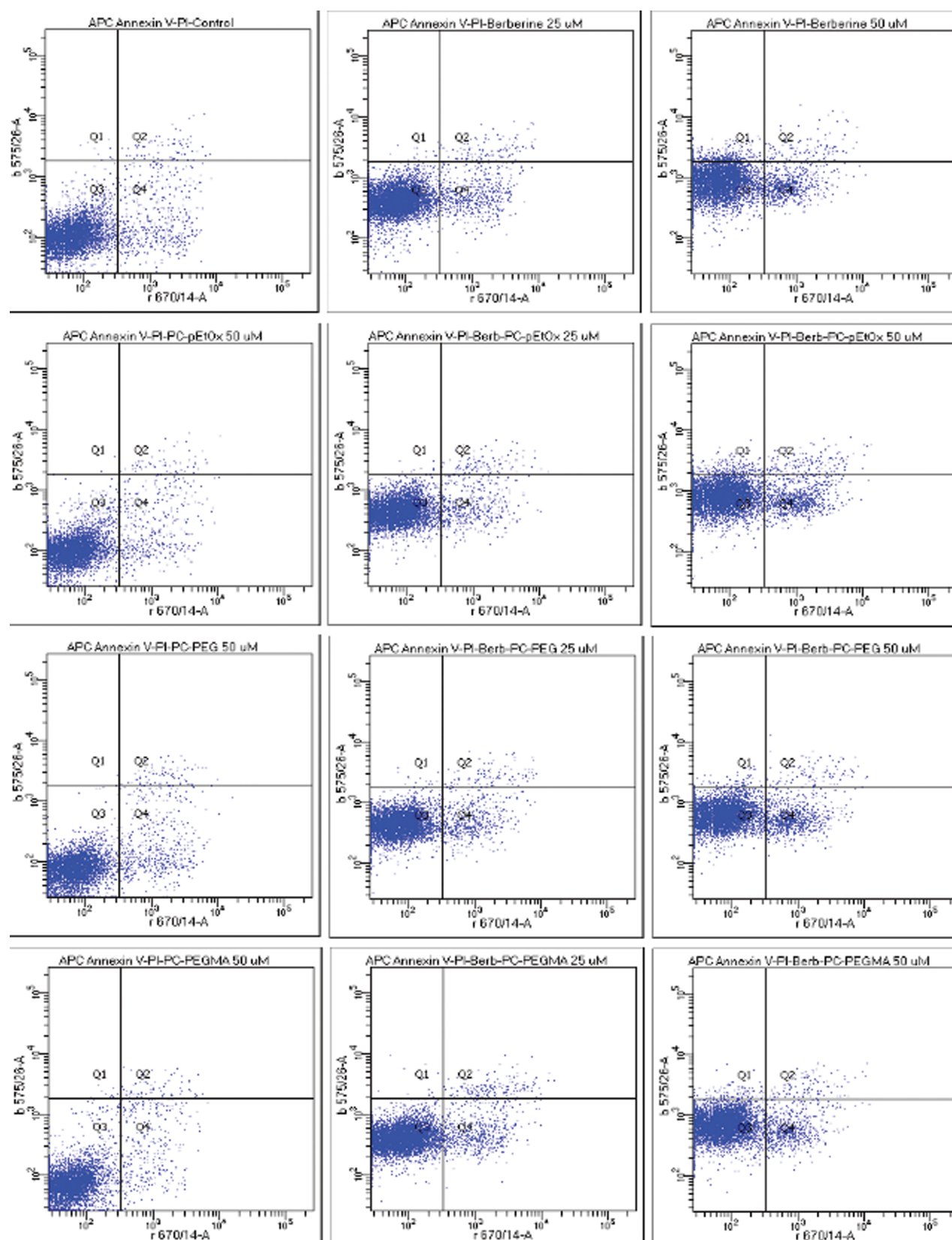
Рис. 5. Порівняння впливу берберину та його кон'югатів з різними полімерними носіями *in vitro* на продукцію АФК та зміни вмісту відновленого глутатіону в клітинах карциноми прямої кишки людини лінії НСТ-116. 24 год інкубації. Фарбування монохлоробіманом, DCFDA, DHE, проточна цитофлуориметрія. Лінією позначено базальний рівень АФК чи глутатіону, чорним кольором виділено аутофлуоресценція досліджу-ваних сполук. *** – $P < 0,001$

На завершальному етапі досліджень ми перевірили, наскільки корелюють виявлені нами показники по змінах у редокс-статусі злоякісних клітин за дії нанокон'югатів берберину з індукцією клітинної загибелі. Для цього було використано метод подвійного фарбування клітин APC-міченим анексином V та пропідію йодидом, та після обробки клітин карциноми лінії НСТ-116 різними дозами діючих речовин піддано їх аналізу за допомогою проточної цитофлуориметрії (рис. 6). Виявлено, що у дозі 25 мкМ берберин не впливав на індукцію апоптозу, причому це стосувалося як сполуки у вільній формі, так й іммобілізованої на різних носіях. У концентрації 50 мкМ берберин призводив до індукції як апоптозу (анексин-позитивні клітини), так і некрозу (пропідію йодид-позитивні клітини), тоді як застосування носіїв призводило до зниження

відсотку некротичних клітин при незмінній кількості апоптотичних клітин (рис. 6, б).

Клітинний некроз вважають негативним явищем за дії протипухлинних препаратів. На рівні організму він призводить до маси небажаних побічних ефектів (зокрема, запальні процеси), тому вибіркоче пригнічення некрозу за дії полімерних носіїв є важливою терапевтичною рисою, яка може мати важливу перевагу у доклінічних дослідженнях цих сполук на тваринах, попри відсутність вираженої різниці за дії *in vitro* берберину у вільній формі та іммобілізованого на носіях.

Ідею збільшення водорозчинності берберину з використанням носіїв різного типу вже застосовували раніше, однак останні дослідження у даній галузі не демонструють переконливих результатів. Для цих цілей було запропоновано неорганічні наночастинки на ос-



a

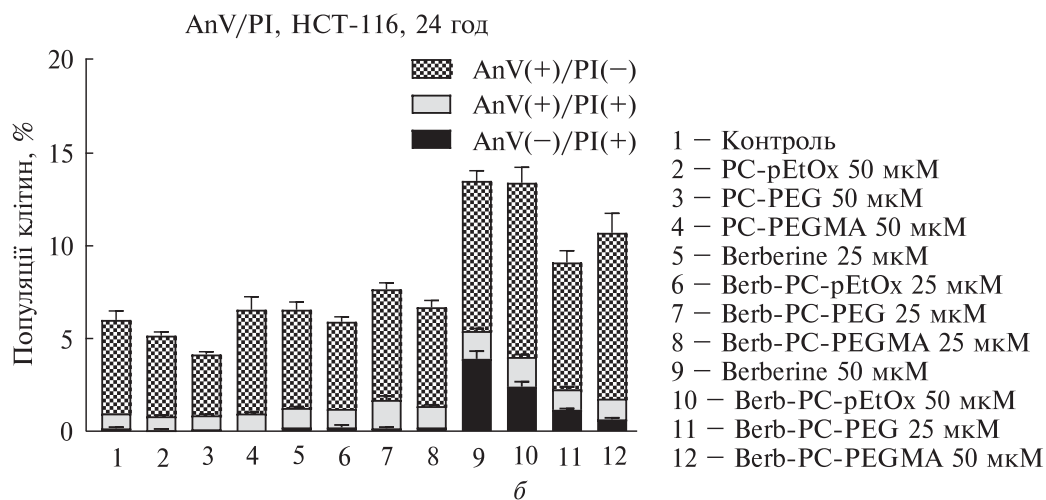


Рис. 6. Порівняння проапоптичної активності берберину та його кон'югатів на різних полімерних носіях щодо клітин карциноми товстої кишки людини лінії HCT-116. Інкубація 24 год, подвійне забарвлення APC-міченим анексином V та пропідію йодидом, проточна цитофлуориметрія. *a* – гістограми розподілу клітинних популяцій. Q1 – AnV(-)/PI(+) – некротичні клітини, Q2 – AnV(+)/PI(-) – ранньо-апоптичні клітини, Q3 – AnV(-)/PI(-) – інтактні клітини, Q4 – AnV(+)/PI(+) – пізно-апоптичні клітини. *б* – кількісний аналіз розподілу клітинних популяцій

нові срібла (Bhanumathi et al., 2017), оксиду заліза (II) (Sreeja and Krishnan Nair, 2018), або тверді ліпідні наночастинки (Guo et al., 2019), однак біосумісність і біодеградабельність цих матеріалів викликають серйозні сумніви. Також було здійснено спроби іммобілізувати берберин на наночастинках із природного біополімеру хітозану і показано індукцію ними апоптозу в клітинах назофарингіальної карциноми *in vitro* (Wang et al., 2018).

Нами для цієї цілі запропоновано використати полімерні носії, які вважають найбільш ефективними засобами для створення міцелярних «контейнерів» лікарських препаратів. Полімерні міцели мають більше ядро, ніж міцели низькомолекулярних поверхнево-активних речовин, що забезпечує вищу здатність солюбілізувати лікарські препарати, порівняно зі звичайними міцелами (Ahmad et al., 2014; Figueiras et al., 2022). Серед полімерів перевагу віддають поліетиленоксидам або полімерам з фрагментами поліетиленоксидів. У водному середовищі ці полімери утворюють стерично стабільні структури, вони піддаються меншій опсонізації і поглинанню макрофагами ретикуло-ендотеліальної системи, що дозволяє міцелам довше циркулювати в крові (Suk et al., 2016). Поліоксазоліни (пОкс) (полі(2-алкіл/арил-2-оксазолін)) або полімери,

що містять ланцюги пОкс, викликають зростаючий інтерес для біомедичного використання (Hoogenboom, 2009). Унікальні властивості Окс, такі як біосумісність і непомітність для імунної системи в організмі визначають їх як важливу альтернативу системам доставки ліків на основі поліетиленгліколю (ПЕГ), який є «золотим стандартом» у біомедичних застосуваннях (Grube et al., 2018).

Однак, на відміну від інших робіт, де застосування полі-2-оксазолінового носія призводило до багатократного збільшення біодоступності паклітакселу (He et al., 2016), у нашому випадку комплекс берберину з носієм аналогічного типу діяв дуже подібно до берберину у вільній формі. Деяке зростання цитотоксичної активності берберину щодо злоякісних клітин було зафіксовано за використання систем доставки, що містили ПЕГ та ПЕГ-МА, однак цей ефект був помірним. Тому необхідне вдосконалення запропонованих систем доставки берберину для забезпечення більшого навантаження препаратом (до 15–20 % від маси носія), що повинно забезпечити більш тривале вивільнення препарату з комплексу з носія всередині клітин-мішеней, а отже може посилити вибірковість його дії щодо злоякісних клітин.

У подальшій роботі ми також плануємо здійснити дослідження впливу берберину та

його комплексів із полімерними носіями різних типів в експериментах *in vivo*, оскільки відомо, що за дії хімічних чинників, які використовують у терапії, виникають небажані ефекти на клітини гемопоетичної системи з високою проліферативною активністю, що спричинює зміни показників крові (Bielins'ka et al., 2014) і може призводити до розвитку гематологічних ускладнень різного ступеня тяжкості (Byelinska et al., 2015).

Висновки. Нами вперше продемонстровано забезпечення водорозчинності берберину за його іммобілізації на 3-ох різних типах полімерних носіїв з гетероатомними бічними ланцюгами, що гарантують їх біодеградабельність в організмі. Ці носії є малотоксичними для субстрат-залежних злоякісних клітин, а іммобілізація берберину на них призводить до певного зростання його цитотоксичної активності *in vitro*. Цей ефект реалізується завдяки контрольованому і тривалому вивільненню даного алкалоїда з комплексу з носіями, що, у свою чергу, може забезпечувати зниження небажаних побічних ефектів берберину, а саме зменшення кількості некротичних клітин у популяції при збереженні його проапоптотичного потенціалу *in vitro*. Отримані результати вказують на доцільність подальшого вдосконалення запропонованих систем доставки берберину з ухилом на збільшення їх навантаження берберином, що може ще більше посилити його таргетну дію на злоякісні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і хребетних тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

MODULATING THE BIOLOGICAL EFFECT OF BERBERINE VIA ITS IMMOBILIZATION ON DIFFERENT POLYMER NANOCARRIERS

N. Skorokhid, R. Panchuk, O. Zaichenko, N. Mitina, Wang Lizhen, Liu Kechun, Jin Meng, M. Klishch, R. Stoika
Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine,

Drahomanov Str., 14/16, 79005 Lviv, Ukraine
Department of Organic Chemistry, Lviv Polytechnic National University,
S. Bandera Str. 12, 79013 Lviv, Ukraine
Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), 28789 East Jingshi Road, Ji'nan 250103, Shandong Province, People's Republic of China; Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, 28789 East Jingshi Road, Ji'nan 250103, Shandong Province, People's Republic of China

E-mail: n.skorokhyd@gmail.com, rpanchuk@ukr.net, alzaich@i.ua, nmitina10@gmail.com, wlzh1106@126.com, liukechun2000@163.com, mjin1985@hotmail.com, mykola.klishch1707@gmail.com, stoika.rostyslav@gmail.com *

Berberine is an isoquinoline alkaloid obtained from different medicinal herbs, including *Berberis* spp., *Coptis* spp., and *Hydrastis* spp. (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008). It is widely used in medicine and the pharmaceutical industry to prevent and treat diseases. However, despite the prominent pharmacological properties of berberine, there are some limitations to its therapeutic application. Polymer nanoparticles may be an effective platform for overcoming these limitations. This study is the first to obtain stable aqueous complexes of berberine using three types of polymer carriers. Their synthesis involved the use of polymer-analogue transformations and co-polymerization of PEG-methacrylate (PEGMA) (Riabtseva et al., 2016). This approach helped control the structural and molecular mass characteristics of new nanocomposites of berberine and their ability to form micellae and their colloid-chemical properties, affecting the biocompatibility of the obtained composites. The study involved a comparative *in vitro* study of the cytotoxic activity of berberine complexes on three branched polymer carriers: 1) poly(VEP-co-GMA)-graft-mPEG; 2) poly(VEP-co-GMA)-graft-pEtOx; 3) poly(PEGMA-co-DMM). The investigation of cell viability *in vitro* demonstrated that the used berberine nanocomposites on the polymer carriers had higher toxicity regarding the tumor cells than berberine in its free form. The degree of a decrease in cell viability under the effect of berberine nanocomplexes (PC-PEG-Berb, PC-pEtOx-Berb, PC-PEGMA-Berb) depends on the type of the polymer carrier. At the same time, native polymer carriers (PC-PEG, PC-pEtOx, PC-PEGMA) in a free form do not induce a considerable decrease in cell viability in the concentrations, required for the delivery of 50 mcM berberine, which demonstrates their biocompatibility. The results obtained demonstrate promising perspectives of the use of berberine complexes with polymer nanocarriers in antitumor chemotherapy.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Ahmad, Z., Shah, A., Siddiq, M., and Kraatz, H.B., Polymeric micelles as drug delivery vehicles, *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 33, pp. 17028–17038. <https://doi.org/10.1039/C3RA47370H>
- Bielins'ka, I.V., Lynchak, O.V., Rybal'chenko, T.V., and Hurniak, O.M., Hematological effects of the protein kinase inhibitor maleimide derivative in dimethylhydrazin E-induced colorectal carcinogenesis of rats, *Fiziol. Zh.*, 2014, vol. 60, no. 4, pp. 40–49. PMID: 25335233
- Byelinska, I.V., Lynchak, O.V., Tsyvinska, S.M., and Rybalchenko, V.K., Morphofunctional state of blood cells after chronic exposure of the protein kinases inhibitor maleimide derivative, *Fiziol. Zh.*, 2015, vol. 61, no. 4, pp. 1–77. <http://doi:10.15407/fz61.04.071>
- Bhanumathi, R., Vimala, K., Shanthi, K., Thangaraj, R., and Kannan, S., Bioformulation of silver nanoparticles as berberine carrier cum anticancer agent against breast cancer, *New J. Chem.*, 2017, vol. 41, no. 23, pp. 14466–14477. <https://doi.org/10.1039/C7NJ02531A>
- Chen, W., Miao, Y.Q., Fan, D.J., Yang, S.S., Lin, X., Meng, L.K., and Tang, X., Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats, *AAPS PharmSci.Tech.*, 2011, vol. 12, no. 2, pp. 705–711. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9632-z>
- Cragg, G.M., and Pezzuto, J.M., Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents, *Med. Princ. Pract.*, 2016, vol. 25, Suppl 2, pp. 41–59. <https://doi.org/10.1159/000443404>
- Cui, H.X., Hu, Y.N., Li, J.W., Yuan, K., and Guo, Y., Preparation and Evaluation of Antidiabetic Agents of Berberine Organic Acid Salts for Enhancing the Bioavailability, *Molecules*, 2018, vol. 24, no. 1. <https://doi.org/10.3390/molecules24010103>
- Dietrich, B., Harald, C., Matthias, R., and Brigitte, V., Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments. Springer, 2013
- Dworak, A., Trzebicka, B., Kowalczyk, A., Tsvetanov, C., and Rangelov, S., Polyoxazolines – mechanism of synthesis and solution properties, *Polimery*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 88–94. <https://doi.org/10.14314/polimery.2014.088>
- Figueiras, A., Domingues, C., Jarak, I., Santos, A.I., Parra, A., Pais, A., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Kabanov, A., Cabral, H., and Veiga, F., New Advances in Biomedical Application of Polymeric Micelles, *Pharmaceutics*, 2022, vol. 14, no. 8, pp. 1700. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081700>
- Finiuk, N., Klyuchivska, O., Mitina, N., Kuznietsova, H., Volianiuk, K., Zaichenko, A., Rybalchenko, V., and Stoika, R., Antineoplastic Activity of Water-Soluble Form of Novel Kinase Inhibitor 1-(4-Chlorobenzyl)-3-chloro-4-(3-trifluoromethylphenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione immobilized on Polymeric Poly (PEGMA-co-DMM) Carrier, *Scientia Pharmaceutica*, 2022, vol. 90, no. 1, pp. 7. <https://doi.org/10.3390/scipharm90010007>
- Francuskiewicz, F., Polymer fractionation. Springer Science & Business Media, 2013
- Grube, M., Leiske, M.N., Schubert, U.S., and Nischang, I., POx as an Alternative to PEG? A Hydrodynamic and Light Scattering Study, *Macromolecules*, 2018, vol. 51, no. 5, pp. 1905–1916. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.macromol.7b02665>
- Guo, H.H., Feng, C.L., Zhang, W.X., Luo, Z.G., Zhang, H.J., Zhang, T.T., Ma, C., Zhan, Y., Li, R., Wu, S., Abliz, Z., Li, C., Li, X.L., Ma, X.L., Wang, L.L., Zheng, W.S., Han, Y.X., and Jiang, J.D., Liver-target nanotechnology facilitates berberine to ameliorate cardio-metabolic diseases, *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1, pp. 1981. <https://doi.org/10.4330/wjc.v2.i4.71>
- He, Z., Wan, X., Schulz, A., Bludau, H., Dobrovolskaia, M.A., Stern, S.T., Montgomery, S.A., Yuan, H., Li, Z., Alakhova, D., Sokolsky, M., Darr, D.B., Perou, C.M., Jordan, R., Luxenhofer, R., and Kabanov, A.V., A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity, *Biomaterials*, 2016, vol. 101, pp. 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.002>
- Hoogenboom, R., Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications, *Angewandte Chem. Inter. Edit.*, 2009, vol. 48, no. 43, pp. 7978–7994. <https://doi.org/10.1002/anie.200901607>
- Imanshahidi, M., and Hosseinzadeh, H., Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine, *Phytother Res.*, 2008, vol. 22, no. 8, pp. 999–1012. <https://doi.org/10.1002/ptr.2399>
- Javed Iqbal, M., Quispe C., Javed, Z., Sadia, H., Qadri, Q.R., Raza, S., Salehi, B., Cruz-Martins, N., Abdulwanis Mohamed, Z., Sani Jaafaru, M., Abdull Razis, A.F., and Sharifi-Rad, J., Nanotechnology-Based Strategies for Berberine Delivery System in Cancer Treatment: Pulling Strings to Keep Berberine in Power, *Front. Mol. Biosci.*, 2020, vol. 7, pp. 624494. <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.624494>
- Kinghorn, A.D., De Blanco, E.J., Lucas, D.M., Rakontondraibe, H.L., Orjala, J., Soejarto, D.D., Oberlies, N.H., Pearce, C.J., Wani, M.C., Stockwell, B.R., Burdette, J.E., Swanson, S.M., Fuchs, J.R., Phelps, M.A., Xu, L., Zhang, X., and Shen, Y.Y., Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin, *Anticancer Res.*, 2016, vol. 36, no. 11, pp. 5623–5637. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11146>

- Kobylinska, L., Ivasechko, I., Skorokhyd, N., Panchuk, R., Riabtseva, A., Mitina, N., Zaichenko, A., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R., and Vari, S.G., Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier, *Nanoscale Res. Letters*, 2019, vol. 14, no. 1, pp. 140. <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7>
- Kobylinska, L., Patereha, I., Finiuk, N., Mitina, N., Riabtseva, A., Kotsyumbas, I., Stoika, R., Zaichenko, A., and Vari, S.G., Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier, *Cancer Nanotechnol.*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 11. <https://doi.org/10.1186/s12645-018-0045-5>
- Liu, C.-S., Zheng, Y.-R., Zhang, Y.-F., and Long, X.-Y., Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability, *Fitoterapia*, 2016, vol. 109, pp. 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.02.001>
- Liu, D., Meng, X., Wu, D., Qiu, Z., and Luo, H., A Natural Isoquinoline Alkaloid With Antitumor Activity: Studies of the Biological Activities of Berberine, *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00009>
- Lu, J.-J., Bao, J.-L., Chen, X.-P., Huang, M., and Wang, Y.-T., Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents, *Evidence-Based Complement, Alternative Med.*, 2012, vol. 2012, no. 1, pp. 485042. <https://doi.org/10.1155/2012/485042>
- Marques, C., Fernandes, M.H., and Lima, S.A.C., Elucidating Berberine's Therapeutic and Photosensitizer Potential through Nanomedicine Tools, *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, no. 9, pp. 2282. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092282>
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A.G., and Bishayee, A., Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives, *Eur. J. Pharmacol.*, 2019, vol. 858, pp. 172472. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>
- Nie, Q., Li, M., Huang, C., Yuan, Y., Liang, Q., Ma, X., Qiu, T., and Li, J., The clinical efficacy and safety of berberine in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis and systematic review, *J. Translat. Med.*, 2024, vol. 22, no. 1, pp. 225. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05011-2>
- Paiuk, O., Mitina, N.Y., Riabtseva, A., Haramus, V., Dolynska, L., Nadashkevych, Z.Y., and Zaichenko, A., Structure and colloidal-chemical characteristics of polymeric surface active substances based on polyethylene glycol-containing macromeres, *Vopr. Khim. Khim. Tekhnol.*, 2018, vol. 6, pp. 63
- Proskauer, E.S., Weissberger, A., Riddick, J.A., and Toops, E.E., Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification. Interscience Publishers, 1955
- Riabtseva, A., Mitina, N., Grytsyna, I., Boiko, N., Garamus, V.M., Stryhanyuk, H., Stoika, R., and Zaichenko, A., Functional micelles formed by branched polymeric surfactants: Synthesis, characteristics, and application as nanoreactors and carriers, *Europ. Polymer. J.*, 2016, vol. 75, pp. 406–422. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.006>
- Singh, N., and Sharma, B., Toxicological Effects of Berberine and Sanguinarine, *Front. Mol. Biosci.*, 2018, vol. 5, pp. 21. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00021>
- Spinazzi, S., Colliva, C., Camborata, C., Roberti, M., Ianni, C., Neri, F., Calvarese, C., Lisotti, A., Mazzella, G., and Roda, A., Berberine and its metabolites: relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects, *J. Nat. Prod.*, 2014, vol. 77, no. 4, pp. 766–772. <https://doi.org/10.1021/np400607k>
- Sreeja, S., and Krishnan Nair, C.K., Tumor control by hypoxia-specific chemotargeting of iron-oxide nanoparticle – Berberine complexes in a mouse model, *Life sciences*, 2018, vol. 195, pp. 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.036>
- Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., and Ensign, L.M., PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2016, vol. 99, Pt A, pp. 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Voronov, S.A., Kiselyov, E.M., Minko, S.S., Budishevskaya, O.G., and Roiter, Y.V., Structure and reactivity of peroxide monomers, *J. Polymer Sci. Part A: Polymer Chemistry*, 1996, vol. 34, no. 12, pp. 2507–2511. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-18\(19960915\)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-18(19960915)34:12<2507::AID-POLA24>3.0.CO;2-B)
- Wang, L., Yang, X., Li, X., Stoika, R., Wang, X., Lin, H., Ma, Y., Wang, R., and Liu, K., Synthesis of hydrophobically modified berberine derivatives with high anticancer activity through modulation of the MAPK pathway, *New J. Chem.*, 2020, vol. 44, no. 33, pp. 14024–14034. <https://doi.org/10.1039/D0NJ01645D>
- Wang, Y., Wen, B., Yu, H., Ding, D., Zhang, J., Zhang, Y., Zhao, L., and Zhang, W., Berberine Hydrochloride-Loaded Chitosan Nanoparticles Effectively Targets and Suppresses Human Nasopharyngeal Carcinoma, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2018, vol. 14, no. 8, pp. 1486–1495. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2596>
- Zhi-Xing, Q., Peng, Y., Qi, T., Pi, C., Xiu-Bin, L., Ya-Jie, Z., Yi-Song, L., and Jian-Guo, Z., Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship, *Curr. Organ. Chem.*, 2017, vol. 21, no. 18, pp. 1920–1934. [doi:http://dx.doi.org/10.2174/1385272821666170207114214](http://dx.doi.org/10.2174/1385272821666170207114214)

Надійшла в редакцію 04.01.2025
Після доопрацювання 15.01.2025
Прийнята до друку 18.05.2025