

ЗАПИТ
на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Структурно-функціональні взаємозв'язки, що визначають протипухлинну активність новітніх 9-О-модифікованих похідних берберину

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Науково-дослідні роботи молодих учених НАН України 2021-2022 рр.

4. Назва розділу програми або напряму цільового проєкту

н е м а є

5. Строки виконання роботи

01 січня 2021 р. - 31 грудня 2022 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (фундаментальні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

9. Код та назва наукового напряму (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

2.2.2.3. Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітин тварин і людини

2.2.2.5. Пошук шляхів та засобів подолання резистентності патогенів та злоякісних клітин


2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

10. Науковий керівник роботи

Козак Юлія Сергіївна, к.б.н., молодший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України

телефон: (032)2612287; факс: +38 032 261 2148; e-mail: juliana.kozzak@gmail.com

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Панчук Ростислав Русланович	д.б.н., с.н.с., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: +38 032 261 2287, e-mail: rpanchuk@ukr.net	
Кліщ Микола Васильович	аспірант, ІБК НАН України, тел.: (032)2612287, e-mail: klishch_mv@nas.gov.ua	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

ізохінолінові алкалоїди, 9-О-модифіковані похідні берберину, сангвінарин, злоякісні клітини, біодоступність, антинеопластична дія, активні форми оксигену, трансмембранний потенціал мітохондрій, глутатіон, проапоптотична активність, моделі експериментальних пухлин

14. Резюме

Основною метою сучасної фармакології є пошук та впровадження у медичну практику нових протоколів лікування раку, що забезпечать більшу вибірковість дії у порівнянні з теперішніми хіміотерапевтичними методами. На сьогоднішній день, найбільш перспективними вважаються засоби таргетної хіміотерапії, які розпізнають специфічний фрагмент онкобілка та зв'язуються виключно з ним. Головним недоліком цього підходу є швидкий розвиток стійкості пухлин до таких інноваційних ліків. Тому для підвищення терапевтичного ефекту новітніх таргетних засобів їх доцільно поєднувати з традиційними лікарськими препаратами, які, на жаль, характеризуються численними побічними ефектами. Тому більш цікавою альтернативою таргетним засобам є хімічна модифікація природних сполук, зокрема алкалоїдів, антибіотиків, глікозидів, які володіють бажаною біологічною дією, однак є недостатньо вибірковими.

До таких сполук, зокрема, належать ізохінолінові алкалоїди, родина яких налічує понад 210 представників, що володіють широким спектром біологічної активності (Qing et al, 2017). Одним з найбільш перспективних представників цієї групи речовин є бензофенантридиновий алкалоїд сангвінарин. Він проявляє бактерицидну, протизапальну та протипухлинну активності, які реалізуються шляхом раннього оксидативного стресу, виснаження пулу клітинних тіолів та апоптозу клітин-мішеней (Choi et al, 2008; Debiton et al, 2003; Kim et al, 2008). Недоліком сангвінарину є низька селективність його дії, зумовлена хімічною структурою його молекули, де наявність четвертинного атому азоту призводить до утворення аддуктів з тіол-вмісними сполуками у всіх без виключення клітинах. Однак інші представники цієї родини, зокрема берберин, де четвертинний атом нітрогену знаходиться в іншому положенні молекули, не володіють такою токсичністю щодо нормальних клітин організму. Це пояснює широке використання берберину в якості харчової добавки для профілактики діабету, гіпертонії та гіперхолестеринемії, хоча наразі не має достатніх наукових доказів, які підтвердили б його ефективність у лікуванні цих захворювань. На жаль, власна протипухлинна активність берберину є невисокою, що пояснюється низькою біодоступністю цієї сполуки, і як наслідок перешкоджає його використанню в терапії раку (Xiao et al, 2018). Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є створення структурно модифікованих похідних берберину. У співпраці з колегами з Інституту біології Шандунської академії наук (м. Цзінань) було синтезовано новітні 9-О-заміщені похідні берберину, які відрізняються між собою за кількістю метиленових груп у

ацильному ланцюзі – від 1 до 7. Ці сполуки зберігають задовільну розчинність у водних розчинах, а їхня цитотоксична активність *in vitro*, за нашими попередніми даними, на порядок перевищує таку у берберину, що вказує на доцільність їх подальших досліджень на експериментальних моделях у тварин. В той же час залишаються невідомими механізми, які лежать в основі посиленої протипухлинної активності цих похідних. Також не було вивчено, чи модифікація берберину залишками жирних кислот зберегла його низьку токсичність щодо нормальних клітин організму.

Ключовим завданням даної роботи є вивчити та порівняти між собою цитотоксичну активність сангвінаріну, берберину та його похідних, а також дослідити індуковані цими алкалоїдами механізми клітинної загибелі та роль продукції активних форм кисню, функціонального стану мітохондрій та системи глутатіону у цих процесах. Крім того, буде протестовано терапевтичну ефективність речовин, які виявляться найактивнішими *in vitro*, щодо організму мишей з експериментальними пухлинами.

У роботі буде використано сучасні методи клітинної біології та біохімії, такі як культивування клітин *in vitro*, проточна цитофлуориметрія, світлова і флуоресцентна мікроскопія, визначення вмісту глутатіону у клітинах-мішенях, прививання пухлин лабораторним тваринам (миші), визначення показників пухлинного росту, лікування тварин-пухлиноносіїв, аналіз основних показників гематологічного та біохімічного профілю крові піддослідних тварин з використанням сучасного обладнання (автоматичний гематологічний аналізатор DF51, напівавтоматичний біохімічний аналізатор BS-3000M). Це дозволить зробити висновки, наскільки доцільною є хімічна модифікація похідних берберину для посилення його біологічної дії та чи зберігається при цьому низька токсичність даного алкалоїду для нормальних клітин організму.

Цитована література:

1. Choi WY, Kim GY, Lee WH, Choi YH. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Chemotherapy*. 2008;54(4):279-87. doi: 10.1159/000149719. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18667818.
2. Debiton E, Madelmont JC, Legault J, Barthomeuf C. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003 Jun;51(6):474-82. doi: 10.1007/s00280-003-0609-9. Epub 2003 Apr 17. PMID: 12700925.
3. Kim S, Lee TJ, Leem J, Choi KS, Park JW, Kwon TK. Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):895-907. doi: 10.1002/jcb.21672. PMID: 18189268.
4. Qing Z., Yang P., Tang Q., Cheng P., Liu X., Zheng Y., Liu Y., Zeng J. Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship. *Current Organic Chemistry*. 2017;21(18): 1920-1934
5. Xiao D, Liu Z, Zhang S, Zhou M, He F, Zou M, Peng J, Xie X, Liu Y, Peng D. Berberine Derivatives with Different Pharmacological Activities via Structural Modifications. *Mini Rev Med Chem*. 2018;18(17):1424-1441. doi: 10.2174/1389557517666170321103139. PMID: 28325147.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

З історичної точки зору саме продукти природного походження відігравали вирішальну роль у боротьбі з хворобами людини і були переважним джерелом раних ліків. З розвитком альтернативних технологій виявлення лікарських засобів, таких як раціональний дизайн, комбінаторна хімія та високопродуктивний скринінг, суттєво зросла (до 36%) частка повністю синтетичних ліків, впроваджених на фармацевтичний ринок у 1981-2010 рр. (Xiao et al, 2016). Однак природні сполуки досі залишаються важливим джерелом нових лікарських засобів для сучасної фармакології та медицини. Численні дослідження продемонстрували, що алкалоїди, антибіотики, глікозиди рослин та мікроорганізмів у природному вигляді є поганими лікарськими засобами, оскільки вони характеризуються незадовільною розчинністю у воді, низькою біодоступністю та/або недостатньою вибірковою дією. Зате, на відміну від своїх синтетичних аналогів, саме природні сполуки є ідеальною основою для створення нових лікарських засобів

шляхом їх хімічної модифікації. Тому структурна модифікація сполук природного походження на сьогодні є основним джерелом нових лікарських засобів на світовому фармацевтичному ринку (Das et al, 2012). Особливо важливе місце цей процес займає у галузі розробки протипухлинних засобів, адже 79,8% хіміотерапевтичних препаратів, затверджених у 1981–2010 рр., містять у собі фрагменти природних сполук (Newman, 2012). Зокрема, відомий протипухлинний препарат метотрексат є хімічним похідним фолієвої кислоти, доцетаксел – похідним алкалоїду паклітакселу з кори тиса, а етопозид – модифікацією подофіллотоксину, виділеного з рослин родини барбарисових.

Метою даної роботи є дослідження протипухлинного потенціалу напівсинтетичних похідних відомого ізохінолінового алкалоїду берберину, що міститься у багатьох рослинах (барбарис, чистотіл, китайська золота нитка та ін.). У ході співпраці з вченими з Інституту біології Шандунської академії наук було синтезовано понад 20 різних похідних берберину, що відрізняються між собою довжиною та хімічною природою замісника у 9-О-положенні цього алкалоїду (аліфатичний ланцюг різної довжини, з'єднаний пептидним зв'язком з поліненасиченими жирними кислотами або ж ароматичними структурами). В ході попередньо проведених нами досліджень було показано, що похідні берберину, які містять від 1 до 7 метиленових залишків у жирнокислотному ланцюзі, володіють суттєво вищою цитотоксичною активністю, ніж сам берберин, щодо різних ліній злоякісних клітин людини. Однак молекулярні механізми, що лежать в основі цього явища, наразі залишаються недостатньо вивченими. Також невідомо, чи хімічна модифікація берберину, окрім зростання його цитотоксичної активності *in vitro*, дозволила посилити його селективність дії щодо злоякісних та нормальних тканин в організмі. Тому в ході дослідження також буде вивчено побічні ефекти та терапевтичну дію структурно модифікованих похідних берберину на моделях експериментальних пухлин у мишей.

Результати, отримані в ході виконання проекту, дозволять з'ясувати перспективність стратегії, що ґрунтується на хімічній модифікації природної сполуки з невисокою протипухлинною активністю та незначними побічними ефектами, з метою вибіркового посилення її антинеопластичної дії. Підтвердження нашої робочої гіпотези *in vivo* дозволить впровадити у клінічну практику нову групу лікарських засобів, які можуть бути ефективними при лікуванні певних груп пухлин у людини за відсутності виражених побічних ефектів.

Цитована література:

1. Xiao Z, Morris-Natschke SL, Lee KH. Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates. *Med Res Rev.* 2016;36(1):32-91. doi:10.1002/med.21377
2. Das B, Satyalakshmi G. Natural products based anticancer agents. *Mini-Rev Org Chem.* 2012;9:169–177. <https://doi.org/10.2174/157019312800604706>
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012 Mar 23;75(3):311-35. doi: 10.1021/np200906s. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22316239; PMCID: PMC3721181.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Біологічно-активні засоби природного походження все частіше застосовуються в ролі хіміотерапевтичних агентів (Cragg et al, 2016; Kinghorn et al, 2016). Серед них перспективними кандидатами для вивчення та розробки терапевтично активних похідних є алкалоїди (Lu et al, 2012). Більшість із них володіють бактерицидними, протизапальними, а також протипухлинними властивостями. Окремі з них, наприклад, вінбластин, вінорелбін, вінкрістин та віндезин уже тривалий час використовуються для лікування онкологічних захворювань (Mondal et al, 2019). Іншою великою групою сполук з широким спектром біологічної активності є ізохінолінові алкалоїди, родина яких налічує понад 210 членів (Qing et al, 2017). Одним з найбільш відомих представників цієї групи є бензофенантридиновий алкалоїд сангвінарин, який, окрім протизапальної, антибактеріальної, знеболюючої дії володіє ще й вираженою протипухлинною активністю (Singh et al, 2018). Показано, що сангвінарин проявляє цитотоксичну та цитостатичну дію щодо злоякісних клітин людини різного походження, зокрема клітин епідермоїдної карциноми, промієлоциторного лейкозу, раку передміхурової та підшлункової залози, товстої кишки, молочної залози, кісток, легенів та ін. (Weerasinghe et al, 2001; Matkar et al, 2008; Vrba et al., 2009; Park et al., 2010). Механізми індукції апоптозу за дії сангвінарину включають у себе оксидативний стрес, зниження рівня клітинного глутатіону, деполіаризацію мітохондрій, швидкий запуск каспазного каскаду, що врешті-решт призводять до швидкої загибелі злоякісних клітин (Choi et al, 2008; Debiton et al, 2003; Kim et al, 2008). Додатковою перевагою цього

алкалоїду над іншими ліками є його здатність долати набуту стійкість злоякісних клітин до хіміотерапії, обумовлену зростанням рівня клітинного глутатіону (Debiton et al, 2003). Показано, що низькі дози сангвінаріну сенситизують клітини карциноми людини до дії традиційних протипухлинних препаратів *in vitro*, що робить його перспективним засобом у поліхіміотерапії раку (Sarkhosh-Inanlou et al, 2019). На жаль, супутнім недоліком сангвінаріну є його недостатня вибірковість дії, що призводить до загибелі як пухлинних, так і нормальних клітин організму. Наприклад, введення сангвінаріну дослідним щурам (10 мг/кг) призводило до стрімкої втрати їх маси тіла. Крім того, у тварин було зафіксовано незначне збільшення печінки та набряк черевної порожнини (Singh et al, 2018). Саме цей факт є основною перешкодою для подальшого використання сангвінаріну у медичній практиці, незважаючи на його потужний протипухлинний потенціал.

Зважаючи на наведені вище дані, нами було обрано принципово іншу стратегію – а саме посилення протипухлинної дії спорідненої до сангвінаріну природної сполуки, яка не володіє настільки вираженими побічними ефектами. Такою речовиною є ізохіноліновий алкалоїд берберин, який подібно до сангвінаріну має широкий спектр фармакологічних властивостей (Imanshahidi et al, 2008; Abd El-Wahab et al, 2013; Lin et al., 2013), однак нетоксичний для людини навіть у високих концентраціях, що і зумовлює його широке використання в якості харчової добавки для профілактики різних захворювань (Zeng et al, 2003). Проте низька біодоступність берберину обмежує дослідження цього алкалоїду та застосування його у медичній практиці (Xiao et al, 2018; McCarty, 2021; Cai et al, 2021; Yang et al, 2021; Neag et al; 2018). Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є синтез напівсинтетичних похідних берберину, які б володіли вищою біодоступністю, потужнішою протипухлинною дією та не викликали при цьому розвитку важких побічних ефектів у організмі пацієнтів. Загалом, стратегія по хімічній модифікації берберину зводиться до приєднання замісників до C8, C9, C10, C12 та C13 положень його молекули (Jin et al, 2016). Показано, що похідні 13-N-октилберберину мали більш виражену антимікобактеріальну активність (Liu et al, 2012), 9-N-заміщені похідні проявляли антиоксидантну активність і запобігали утворенню агрегатів β -амілоїдного білка (Shan et al, 2008), а 9-O-заміщені похідні берберину демонстрували суттєво вищу цитотоксичну дію щодо злоякісних клітин, ніж природний берберин (Lo et al, 2013).

Грунтуючись на цих літературних даних, нашими партнерами з Інституту біології Шандунської академії наук (м. Цзінань, КНР) було розроблено стратегію хімічної модифікації берберину саме по 9-O-положенні цієї молекули шляхом приєднання до них ланцюгів жирних кислот різної довжини, а також вторинних замісників (ліноленової кислоти, ароматичних груп та ін.). Нашою групою було проведено попередній скринінг 20 різних модифікованих похідних берберину, синтезованих нашими китайськими партнерами, та відкинуто сполуки з надмірно довгим аліфатичним ланцюгом через невисоку цитотоксичну дію та незначну розчинність у полярних розчинниках (ДМСО). Усього нами було відібрано 6 похідних, які відрізняються між собою довжиною жирнокислотного ланцюга у 9-O-положенні берберину (від 1 до 7 метиленових груп) та продемонстрували суттєво вищу протипухлинну активність порівняно з берберином, у попередніх експериментах на культурі злоякісних клітин. Тому завданнями даної роботи буде вивчення структурно-функціональних закономірностей, що лежать в основі протипухлинної дії нових похідних берберину, дослідження механізмів проапоптичної загибелі клітин за дії цих сполук у порівнянні з сангвінаріном та традиційними протипухлинними препаратами (наприклад, доксорубіцин). Успішне вирішення поставлених завдань дозволить обґрунтувати доцільність та перспективність хімічної модифікації берберину та інших ізохінолінових алкалоїдів по 9-O-положенню їх молекули для розробки нових протипухлинних препаратів та їхнього подальшого впровадження у клінічну практику.

Цитована література:

1. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med Princ Pract.* 2016;25 Suppl 2(Suppl 2):41-59. doi: 10.1159/000443404. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26679767; PMCID: PMC5588531
2. Kinghorn AD, DE Blanco EJ, Lucas DM, Rakotondraibe HL, Orjala J, Soejarto DD, Oberlies NH, Pearce CJ, Wani MC, Stockwell BR, Burdette JE, Swanson SM, Fuchs JR, Phelps MA, Xu L, Zhang X, Shen YY. Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer Res.* 2016 Nov;36(11):5623-5637. doi: 10.21873/anticancer.11146. PMID: 27793884; PMCID: PMC5098703.

3. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur J Pharmacol.* 2019 Sep 5;858:172472. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172472. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31228447.
4. Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, Wang YT. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:485042. doi: 10.1155/2012/485042. Epub 2012 Sep 4. PMID: 22988474; PMCID: PMC3440018.
5. Singh N, Sharma B. Toxicological Effects of Berberine and Sanguinarine. *Front Mol Biosci.* 2018;5:21. Published 2018 Mar 19. doi:10.3389/fmolb.2018.00021
6. Weerasinghe P, Hallock S., Liepins A. (2001a). Bax, Bcl-2, and NF-kappaB expression in sanguinarine induced bimodal cell death. *Exp. Mol. Pathol.* 71, 89–98. 10.1006/exmp.2001.2355
7. Matkar S. S., Wrischnik L. A., Hellmann-Blumberg U. (2008). Sanguinarine causes DNA damage and p53-independent cell death in human colon cancer cell lines. *Chem. Biol. Interact.* 172, 63–71. 10.1016/j.cbi.2007.12.006
8. Vrba J., Dolezel P., Vicar J., Ulrichová J. (2009). Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Toxicol. In Vitro* 23, 580–588. 10.1016/j.tiv.2009.01.016
9. Park H., Bergeron E., Senta H., Guillemette K., Beauvais S., Blouin R., et al. . (2010). Sanguinarine induces apoptosis of human osteosarcoma cells through the extrinsic and intrinsic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 446–451. 10.1016/j.bbrc.2010.07.114
10. Choi WY, Kim GY, Lee WH, Choi YH. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Chemotherapy.* 2008;54(4):279-87. doi: 10.1159/000149719. Epub 2008 Jul 31. PMID: 18667818.
11. Debiton E, Madelmont JC, Legault J, Barthomeuf C. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Jun;51(6):474-82. doi: 10.1007/s00280-003-0609-9. Epub 2003 Apr 17. PMID: 12700925.
12. Kim S, Lee TJ, Leem J, Choi KS, Park JW, Kwon TK. Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *J Cell Biochem.* 2008 Jun 1;104(3):895-907. doi: 10.1002/jcb.21672. PMID: 18189268.
13. Imanshahidi M., Hosseinzadeh H. (2008). Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother. Res.* 22, 999–1012. 10.1002/ptr.2399
14. Abd El-Wahab A. E., Ghareeb D. A., Sarhan E. E., Abu Serie M. M., El Demellawy M. A. (2013). In vitro biological assessment of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine: antioxidants, antiacetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects. *BMC Complement. Altern. Med.* 13:218. 10.1186/1472-6882-13-218
15. Lin K., Liu S., Shen Y., Li Q. (2013). Berberine attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation. *Inflammation* 36, 1079–1086. 10.1007/s10753-013-9640-0
16. Xiao D, Liu Z, Zhang S, Zhou M, He F, Zou M, Peng J, Xie X, Liu Y, Peng D. Berberine Derivatives with Different Pharmacological Activities via Structural Modifications. *Mini Rev Med Chem.* 2018;18(17):1424-1441. doi: 10.2174/1389557517666170321103139. PMID: 28325147.
17. Qing Z., Yang P., Tang Q., Cheng P., Liu X., Zheng Y., Liu Y., Zeng J. Isoquinoline Alkaloids and Their Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Activities and Structure-activity Relationship. *Current Organic Chemistry.* 2017;21(18): 1920-1934
18. Zeng XH, Zeng XJ, Li YY. Efficacy and safety of berberine for congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2003 Jul 15;92(2):173-6. doi: 10.1016/s0002-9149(03)00533-2. PMID: 12860219.
19. Cai Y, Xin Q, Lu J, Miao Y, Lin Q, Cong W, Chen K. A New Therapeutic Candidate for Cardiovascular Diseases: Berberine. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 17;12:631100. doi: 10.3389/fphar.2021.631100. PMID: 33815112; PMCID: PMC8010184.
20. Yang H, Shang X, Zhong G, Hong L, Li Z, Zhuang W, Cheng J. Berberine protects human and rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-triggered apoptosis. *Am J Transl Res.* 2021 Feb 15;13(2):659-671. PMID: 33594316; PMCID: PMC7868847.
21. Neag MA, Mocan A, Echeverría J, et al. Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders. *Front Pharmacol.* 2018;9:557. Published 2018 Aug 21. doi:10.3389/fphar.2018.00557
22. McCarty MF. Nutraceutical, Dietary, and Lifestyle Options for Prevention and Treatment of Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 24;22(7):3321. doi:

- 10.3390/ijms22073321. PMID: 33805039; PMCID: PMC8037104.
23. Sarkhosh-Inanlou, R, Molaparast, M, Mohammadzadeh, A, Shafiei-Irannejad, V. Sanguinarine enhances cisplatin sensitivity via glutathione depletion in cisplatin-resistant ovarian cancer (A2780) cells. *Chem Biol Drug Des.* 2019; 95: 215– 223.
 24. Jin Y, Khadka DB, Cho WJ. Pharmacological effects of berberine and its derivatives: a patent update. *Expert Opin Ther Pat.* 2016;26:229–43.
 25. Liu YX, Xiao CL, Wang YX, Li YH, Yang YH, Li YB, et al. Synthesis, structure-activity relationship and in vitro anti-mycobacterial evaluation of 13-n-octylberberine derivatives. *Eur J Med Chem.* 2012;52:151–8.
 26. Lo CY, Hsu LC, Chen MS, Lin YJ, Chen LG, Kuo CD, Wu JY. Synthesis and anticancer activity of a novel series of 9-O-substituted berberine derivatives: a lipophilic substitute role. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Jan 1;23(1):305-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.10.098. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23182088.
 27. Shan WJ, Huang L, Zhou Q, Meng FC, Li XS. Synthesis, biological evaluation of 9-N-substituted berberine derivatives as multi-functional agents of antioxidant, inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and amyloid- β aggregation. *Eur J Med Chem.* 2011 Dec;46(12):5885-93. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.09.051. Epub 2011 Oct 5. PMID: 22019228.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Керівник проекту, м.н.с., к.б.н. Козак Ю.С. у 2019 році захистила дисертацію «Механізми дії антиоксидантів у модуляції терапевтичного ефекту протипухлинних препаратів на моделях експериментальних пухлин у миші» за спеціальністю 03.00.04 – біохімія та на підставі рішення Атестаційної колегії здобула науковий ступінь кандидата біологічних наук. Наукові інтереси Козак Ю. С. пов'язані з дослідженням нових перспективних схем лікування раку, застосування яких дозволить збільшити терапевтичну ефективність хіміотерапевтичних сполук та зменшити індукований ними розвиток важких побічних ефектів у організмі онкохворих.

За час своєї науково-дослідницької роботи Козак Ю.С. була відповідальним виконавцем державних, відомчих, договірних, програмно-цільових конкурсних тематик НАН України. У 2017 році вона виграла грант стипендіальної програми імені Леонарда Ейлера, у рамках якої пройшла стажування в лабораторії проф. Маттіаса Еппле (Університет Дуйсбург-Ессен, Німеччина). У 2019 році в рамках українсько-австрійського білатерального проекту № М/104-2019 вона проводила спільні наукові дослідження на базі Інституту ракових досліджень при Медичному університеті м. Відня (Австрія).

Козак Юлія зайняла 1-ше місце у конкурсі на кращу стендову доповідь молодих вчених на XI-й Парнасівській конференції (Форум молодих учених) «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (Київ, 2018 рік) та 2-ге місце за кращу усну доповідь на конференції молодих вчених Інституту біології клітини НАН України (Львів, 2019 рік). З листопада 2020 року вона отримує стипендію НАН України для молодих вчених. Цього ж року Козак Ю.С. стала лауреатом премії Львівської обласної держадміністрації для працівників наукових установ та закладів вищої освіти. За результатами науково-дослідної роботи Козак Ю.С. опубліковано 6 статей (4 у наукометричних базах даних Scopus та Web of Science Core Collection, 2 – у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України), а також 19 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій, в яких вона брала участь. Сумарний імпаکت-фактор опублікованих статей за звітний період (IF) = 6,37. Індекс Гірша (h-індекс) = 3.

Також до складу даного колективу входять аспірант 1 року навчання Кліщ М.В., та д.б.н, с.н.с. Панчук Р.Р. Наукові інтереси д.б.н. Панчука Р.Р. включають в себе дослідження молекулярних механізмів дії новітніх протипухлинних препаратів та їх здатності долати резистентність злоякісних клітин до хіміотерапії, а також використання новітніх систем адресної доставки ліків для підвищення їх терапевтичного потенціалу та зниження побічних ефектів *in vivo*. За останні 10 років д.б.н. Панчуком Р.Р. було налагоджено тісну співпрацю з рядом зарубіжних наукових груп з Німеччини (м. Вюрцбург, проф. Роберт Люксенхофер), Австрії (м. Відень, проф. Вальтер Бергер), Чехії (м. Прага, проф. Даніель Горак) та Іспанії (м. Мадрид, проф. Ана Рамос), результатом чого стали численні спільні публікації у престижних наукових виданнях. Це дало йому змогу достроково, у віці 24 років, захистити кандидатську дисертацію за спеціальністю цитологія, клітинна біологія, гістологія (2008 р.), а у 34 роки – докторську дисертацію за цією ж спеціальністю (2017 р.). Усього за свою наукову кар'єру д.б.н. Панчуком Р.Р. з 2004 по 2020 рр. було опубліковано 50 статей у рецензованих виданнях, з них 22 – у

міжнародних журналах, 2 патенти на винахід України, 1 заявка на патент США, 3 розділи у вітчизняних монографіях та 83 тези доповідей у збірниках конференцій.

У 2015 році д.б.н. Панчук Р.Р. став лауреатом Премії Президента України для молодих вчених за цикл наукових праць «Розробка та біо-тестування нових сполук з противірусною та протипухлинною активністю», а у 2020 році колективу виконавців, до якого входив д.б.н. Панчук Р.Р., присуджено Державну премію України в галузі науки і техніки за роботу «Інноваційні нанобіотехнології для ранньої діагностики і хіміотерапії патологічних станів» згідно Указу Президента України № 608/2020 від 30 грудня 2020 року.

Кліщ М.В. – аспірант першого року навчання Інституту біології клітини НАН України. У 2019 році він здобув ступінь магістра у Львівському національному університеті ім. Івана Франка за спеціальністю «Біологія» (освітня програма «Біохімія»). У цьому ж році Кліщ М.В. у рамках наукової співпраці пройшов короточасне стажування на базі Центру інноваційних досліджень у природничих і медичних науках Жешувського університету. Також у 2019 році він зайняв 3-тє місце за кращу усну доповідь на Міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» у секції «Молекулярна та клітинна біологія». У 2018 році Кліщ М.В. виступав з доповіддю на міжнародній науковій конференції RECOOP 9th Annual Project Review Meeting (Братислава, Словаччина). Ще будучи студентом здобув диплом II ступеня на II етапі Всеукраїнської студентської олімпіади з біології (2016 рік) та бронзову медаль на 25-ій Міжнародній біологічній олімпіаді (Балі, Індонезія, 2014 рік).

Науковометричні показники виконавців проекту:

- 1) К.б.н, м.н.с. Козак Ю.С. – індекс Хірша=3 (згідно бази даних Scopus), сумарний імпаکت-фактор публікацій за 2020-2015 рр. – 6,37
- 2) Д.б.н.,с.н.с. Панчук Р.Р. – індекс Хірша=11 (згідно бази даних Scopus), сумарний імпакт-фактор публікацій за 2020-2015 рр. – 62,8

Основні публікації виконавців проекту за останні 5 років:

1. Świątek M., **Panchuk R.**, Skorokhyd N., Černoch P., Finiuk N., Klyuchivska O., Hrubý M., Molčan M., Berger W., Trousil J., Stoika R., Horák D. Magnetic Temperature-Sensitive Solid-Lipid Particles for Targeting and Killing Tumor Cells. *Front Chem.* 2020. V.8, Art. No. 205 (IF=3,693).
2. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, **Panchuk R**, Riabtseva A, Mitina N, Zaichenko A, Lesyk R, Zimenkovsky B, Stoika R, Vari SG. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Res Lett.* 2019. V.23, No14 (1). P. 140. (IF=3,581)
3. Bilobrov V., Sokolova V., Prylutska S., **Panchuk R.**, Litsis O., Osetskiy V., Evstigneev M., Prylutskiy Yu., Epple M., Ritter U., Rohr J. A Novel Nanoconjugate of Landomycin A with C₆₀ Fullerene for Cancer Targeted Therapy: *In Vitro* Studies. *Cellular and Molecular Bioengineering.* 2019. V.12, Is. 1. P.41-51 (IF=1,72)
4. Finiuk N., Klyuchivska O., Ivasechko I., Hreniukh V., Ostapiuk Y., Shalai Y., **Panchuk R.**, Matyichuk V., Obushak M, Stoika R, Babsky A. Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anticancer Drugs.* 2019. V.30, Is. 1. P. 27-37 (IF=2,26)
5. Plichta Z., **Kozak Y.**, **Panchuk R.**, Sokolova V., Epple M., Kobylinska L., Jendelová P., Horák D. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells. *Beilstein J Nanotechnol.* 2018. V 25, No 9. P. 2533-2545. (IF=2,612)
6. **Kozak Yu. S.**, **Panchuk R. R.**, Skorokhyd N. R., Lehka L. V., Stoika R. S. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice. *The Ukrainian Biochemical Journal.* 2018. Vol. 90, No 2. P. 46–54.
7. **Kozak Yu. S.**, **Panchuk R. R.**, Skorokhyd N. R., Semenovich D. S., Moiseenok A. G, Stoika R. S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine differentially affect doxorubicin's action on glutathione system in human leukemia cells varying in their resistance to chemotherapy in vitro. *Studia Biologica.* 2018. Vol. 12, No 2. P. 13–24.
8. **Panchuk R.R.**, Skorokhyd N.R., **Kozak Y.S.**, Lehka L.V., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-pantethine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. *Croat Med J.* 2017.V. 58, No. 2. P. 171-184 (IF=1,247).
9. Kobylinska L.I., Klyuchivska O.Y., Grytsyna I.I., Finiuk N., **Panchuk R.R.**, Starykovich M.O., Lehka L., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Differential pro-apoptotic effects of

- synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. *Croat Med J.* 2017. V. 58, No. 2. P. 150-159. (IF=1,247).
10. **Panchuk R.R.**, Lehka L.V., Terenzi A., Matselyukh B.P., Rohr J., Jha A.K., Downey T., Kril' I.Y., Herbacek I., van Schonhoven S., Heffeter P., Stoika R.S., Berger W. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radic Biol Med.* 2017. V. 106. P. 134-147. (IF=6,17).
 11. Prylutska S., **Panchuk R.**, Gołuński G., Skivka L., Prylutsky Yu., Hurmach V., Skorokhyd N., Borowik A., Woziwodzka A., Piosik J., Kyzyma O., Garamus V., Bulavin L., Evstigneev M., Buchelnikov A., Stoika R., Berger W., Ritter U., Scharff P. C₆₀ Fullerene enhances anticancer activity of cisplatin *in vitro* and *in vivo* and facilitates circumvention of drug resistance in tumor cells. *Nano Research.* 2017. V. 10, No. 2. P. 652-671 (IF=8,183).
 12. **Panchuk R.R.**, Skorokhyd N.R., **Kozak Yu.S.**, Lehka L.V., Chumak V.V., Omelyanchik S.N., Gurinovich V.A., Moiseenok A.G., Stoika R.S. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease negative side effects of doxorubicin in NK/Ly lymphoma-bearing mice. *Croat Med J.* 2016. V. 57, No. 2. P. 180-192. (IF=1,247).
 13. Kobylynska L.I., Boiko N.M., **Panchuk R.R.**, Grytsyna I.I., Klyuchivska O.Yu., Biletska L.P., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.Z., Stoika R.S. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidone derivatives: cytotoxicity toward rat glioma C6 *in vitro* and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. *Croat Med J.* 2016. V. 57, No. 2. P. 151-163. (IF=1,247).
 14. Lehka L. V., **Panchuk R. R.**, Skorokhyd N. R., **Kozak Y.S.**, Rohr J., Stoika R. R. Study of inhibition of B16F10 melanoma growth in mice by landomycin A in comparison to doxorubicin. *Studia Biologica.* 2016. Vol. 10, No 1. P. 5–16.
 15. Prylutska S.V., Skivka L.M., Didenko G.V., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Potebnya G.P., **Panchuk R.R.**, Stoika R.S., Ritter U., Scharff P. Complex of C₆₀ fullerene with doxorubicin as a promising agent in antitumor therapy. *Nanoscale Research Letters.* 2015. V. 10. (IF=3,581).
 16. **Panchuk R.R.**, Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutsky Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of C₆₀ fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment *in vitro* and *in vivo*. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. V. 11, No.7. P. 1139-1152. (IF=4,483).
 17. Seršen S, Kljun J, Kryeziu K, **Panchuk R**, Alte B, Körner W, Heffeter P, Berger W, Turel I. Structure-Related Mode-of-Action Differences of Anticancer Organoruthenium Complexes with β -Diketonates. *J Med Chem.* 2015. V. 58, No. 9. P. 3984-3996. (IF=6,205).
 18. Berdyshev A.G., Kosiakova H.V., Onopchenko O.V., **Panchuk R.R.**, Stoika R.S., Hula N.M.N- Stearoylethanolamine suppresses the pro-inflammatory cytokines production by inhibition of NF- κ B translocation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015. V. 121 (Pt A). P. 91-96. (IF=2,283).

15.4. Структура досліджень.

Даний проект складатиметься з 2-х основних етапів

1. Порівняти цитотоксичну активність сангвінарину, берберину та його похідних щодо псевдонормальних та злоякісних клітин ссавців, встановити взаємозв'язок між антинеопластичною активністю цих сполук та їх структурними модифікаціями, а також дослідити шляхи індукції клітинної загибелі за дії згаданих вище алкалоїдів.

2. Вивчити вплив сангвінарину, берберину та його структурно модифікованих похідних на продукцію активних форм кисню, функціональний стан мітохондрій та системи глутатіону в злоякісних клітинах, а також встановити взаємозв'язок цих процесів з індукцією клітинної загибелі. Дослідити терапевтичний ефект досліджуваних алкалоїдів щодо організму мишей з експериментальними пухлинами (тривалість життя, зміни розміру пухлин, та значення ключових показників гематологічного та біохімічного профілю крові тварин-пухлиноносіїв).

В ході виконання I етапу проекту буде проаналізовано цитотоксичну активність сангвінарину, берберину та його похідних щодо різних за своїм походженням, морфологією, чутливістю до лікарських засобів псевдонормальних та злоякісних клітин ссавців. Також буде встановлено взаємозв'язок між антинеопластичною активністю цих сполук та їх структурними модифікаціями. Невід'ємною частиною цього етапу роботи є дослідження здатності сангвінарину, берберину та його до 9-O-модифікованих похідних індукувати апоптоз у злоякісних клітинах-мішенях з використанням методів подвійного фарбування клітин FITC-міченим анексином V/пропідію йодидом і фарбування ядерного хроматину барвником DAPI

(4',6-діаміно-2-фенілндо́л). Виконання даного етапу роботи дасть можливість встановити структурно-функціональні закономірності, що визначають цитотоксичну та проапоптотичну активність досліджуваних алкалоїдів.

Метою наступного етапу роботи є проаналізувати продукцію активних форм кисню, зміни трансмембранного потенціалу мітохондрій та функціонування системи глутатіону в злоскісних клітинах за дії сангвінаріну, берберину та його структурно модифікованих похідних. Для цього буде використано метод проточної цитофлуориметрії із застосуванням флуоресцентних барвників, специфічних до пероксиду водню (DCFDA), супероксид-аніонів (DHE), мембранного потенціалу мітохондрій (JC-1), відновленого глутатіону (монохлоробіман) та ін. Буде встановлено зв'язок між довжиною ацильного ланцюга хімічно-модифікованих похідних берберину, швидкістю їхнього накопичення у клітинах-мішенях (за аутофлуоресценцією цих сполук) та їхнім впливом на зазначені вище процеси. Для верифікації отриманих даних буде використано специфічні модулятори активних форм кисню різної природи – піруват натрію (скевенджер пероксиду водню), маннітол (скевенджер гідроксил-радикалів), супероксиддисмутаза, диметилтіосечовина та інші. Для встановлення взаємозв'язку між продукцією АФО та функціональним станом мітохондрій ці показники буде визначено у часозалежному діапазоні (1, 3, 6, 12, 24 години). Таким чином, успішне виконання цього етапу дозволить встановити механізми, які не просто задіяні в індукції клітинної загибелі за дії досліджуваних алкалоїдів, але й визначають їх протипухлинну активність.

Крім того, на завершальному етапі досліджень буде проведено оцінку терапевтичної активності найперспективніших (згідно результатів попередніх етапів роботи) 9-О-модифікованих похідних берберину щодо організму мишей з експериментальними пухлинами (лімфоною NK/Ly або меланоною B16). У ході виконання роботи буде вивчено вплив новітніх похідних берберину на тривалість життя та розміри пухлини у піддослідних тварин, а також порівняно їхню ефективність з традиційними протипухлинними препаратами (доксорубіцин). Загальний аналіз крові у мишей буде здійснено за допомогою автоматичного 5-диференційного гематологічного аналізатора DF51 компанії Dymind, а біохімічні показники крові – із використанням напівавтоматичного біохімічного аналізатора BS-3000M. Це дасть змогу дослідити потенційні побічні ефекти зазначених вище сполук не лише на кровотворну систему, але й на життєво важливі органи, зокрема серце, печінку та нирки.

Таким чином отримані результати дадуть змогу встановити цитотоксичну, проапоптотичну, терапевтичну активність сангвінаріну, берберину та його структурно-модифікованих похідних, а також з'ясувати механізми які лежать в основі їх протипухлинної активності. Це дозволить зробити висновки щодо доцільності подальшого більш детального вивчення структурно-модифікованих похідних алкалоїдів, що зробить цей клас сполук на крок ближче до етапу клінічних випробувань.

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Відділ регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України, де працює керівник даного проекту, к.б.н. Козак Ю.С., володіє достатнім досвідом, науковим потенціалом, методичною та технічною базою для успішного виконання проекту. Виконавцями даного проекту мають протягом тривалого часу проводитися дослідження в галузі клітинної та молекулярної біології з метою вивчення механізмів злоскісного переродження клітин тварин і людини та з'ясування принципів дії деяких протипухлинних препаратів та механізмів виникнення стійкості злоскісних клітин до їх дії, що є серйозною проблемою в хіміотерапевтичному лікуванні онкологічних хворих. У відділі є необхідне обладнання для роботи по напрямку проекту – проточний цитофлуориметр BD FACScan, флуоресцентний мікроскоп Zeiss AxioImager A1, три прилади для білкового електрофорезу та Вестерн-блотингу, два CO₂-інкубатори, мікропланшетний рідер для імуноферментативних аналізів (ELISA), біохімічний аналізатор крові Sinnova BS-3000M, гематологічний аналізатор крові Dymind DF51 VET, ламінарні бокси для роботи з клітинними лініями, центрифуги та ін., віварій для експериментів *in vivo*. Тут зберігається колекція клітинних ліній, необхідних для виконання запропонованих досліджень, а також підтримуються лабораторні лінії мишей Balb/C і C57/B16, необхідні для підтримки лімфоми NK/Ly, лейкозу L1210, остеосаркоми K7M2 і меланоми B16 *in vivo*.

16. Техніко-економічне обґрунтування

н е м а є

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input type="checkbox"/> немає аналогів в Україні |
| <input checked="" type="checkbox"/> краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Технологія синтезу хімічно модифікованих 9-О-заміщених похідних ізохінолінового алкалоїду берберину	Фармацевтичні компанії України: ПАТ «Фармак», корпорація «Артеріум», ПАТ «Лекхім»	2-3 млн. грн./рік - за умов виходу на ринки СНД і Східної Європи
Протоколи доклінічних досліджень 9-О-заміщених похідних берберину на моделях експериментальних пухлин у мишей	Вітчизняні фармацевтичні компанії: ПАТ «Фармак», корпорація «Артеріум», ПАТ «Лекхім»	Дані протоколи доклінічних досліджень є незамінним елементом портфоліо щодо синтезу та виробництва 9-О-модифікованих похідних берберину, який буде пропонуватися потенційним інвесторам. Запланований обсяг впровадження новітніх напівсинтетичних похідних берберину на ринку Східної Європи та СНД: 2-3 млн. грн./рік

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

Основним недоліком вітчизняної медицини та фармацевтичної індустрії є практична відсутність власних розробок у хіміотерапії раку. Зокрема, вітчизняні фірми («Фармак», «Артеріум») взагалі не випускають навіть генеричних форм протипухлинних ліків, за виключенням ПАТ «Лекхім» (іринотекан, оксаліплатин). Основним аргументом вітчизняних фармацевтичних компаній у їхньому небажанні випускати протипухлинні препарати є те, що наукові розробки в даній галузі є надмірно дорогими, а вітчизняний ринок лікарських препаратів – недостатньо великий для того, щоб окупити ці розробки в найближчому часі (кілька років). Тим не менше, за умов, коли академічна установа надасть їм протоколи синтезу та проведених доклінічних досліджень новітніх лікарських засобів, та за відповідної підтримки держави (як в 2020 році, цілком неочікувано для всіх, мало місце фінансування розробки вітчизняних вакцин від COVID-19), це може зацікавити навіть вітчизняних виробників фармпродукції. Дана робота в першу чергу має фундаментальне значення, адже дозволить краще зрозуміти, як наявність різнотипних фрагментів у структурі молекули берберину вибірково посилює її протипухлинний потенціал. Це, у свою чергу, буде корисним при використанні певних «будівельних» блоків у направленому дизайні ліків. Тим не менше, попередні дослідження на культурі клітин, зроблених нашою групою, показують суттєве (до 8 разів) посилення цитотоксичної активності цих похідних у порівнянні з берберином, що з великою долею ймовірності вказує на те, що вони

повинні проявляти виражений терапевтичний потенціал і *in vivo*. У випадку, якщо наша робоча гіпотеза підтвердиться, буде доцільним продовжити оптимізацію найактивнішого похідного берберину з метою патентування його структури, підготовки необхідних протоколів його доклінічних досліджень та пошуку потенційного інвестора для впровадження даних сполук у хімічне виробництво.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Вітчизняні фармацевтичні компанії: ПАТ «Фармак», корпорація «Артеріум», ПАТ «Лекхім»	Технологія синтезу хімічно модифікованих 9-О-модифікованих похідних берберину	2-3 млн. грн./рік - для ринку СНД і Східної Європи

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 195,000 тис. грн.

словами: сто дев'яносто п'ять тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2021 р.	2022 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	65,000	130,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (м. Львів)

Наукова рада Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України (м. Київ)

Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Мінченко Олександр Григорович	член-кореспондент НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Рибальченко Володимир Корнійович	д.б.н., проф., завідувач сектору	НДС мембранології і цитології ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Федоренко Віктор Олександрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. І.Франка

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

04.05.2021

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



(підпис)



Андрій СИБРЕНІЙ

М.П.

Науковий керівник роботи

Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.



(підпис)

Юлія КОЗАК

Додаток А
до Запиту на відкриття наукової
(науково-технічної) роботи

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України


_____ Андрій СИБІРНЬКИЙ
(підпис)

« 04 » Травня 20 21 р.
М.П.



ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. академіка-секретаря Відділення біохімії,
фізіології і молекулярної біології НАН України
академік НАН України

_____ Сергій КОМИСАРЕНКО
(підпис)

« _____ » _____ 20 ____ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ

на виконання наукової (науково-технічної) роботи

**«Структурно-функціональні взаємозв'язки, що визначають протипухлинну
активність новітніх 9-О-модифікованих похідних берберину»
Науково-дослідні роботи молодих учених НАН України 2021-2022 рр.**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.2.3. Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітин тварин і людини

2.2.2.5. Пошук шляхів та засобів подолання резистентності патогенів та злоякісних клітин

2.2.4.1. Вивчення механізмів регуляції функціональних систем організму за умов норми і патології

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

6. Мета роботи

Метою роботи є вивчити та порівняти між собою цитотоксичну активність сангвінаруну, берберину та його похідних, а також дослідити індуковані цими алкалоїдами механізми клітинної загибелі та роль продукції активних форм кисню, функціонального стану мітохондрій та системи глутатіону у цих процесах.

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 січня 2021 р. ; закінчення — 31 грудня 2022 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **195,000** тис. грн.
та по роках

2021 р. — 65,000 тис. грн.

2022 р. — 130,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Порівняти цитотоксичну активність сангвінаруну, берберину та його похідних щодо псевдонормальних та злоякісних клітин ссавців, встановити взаємозв'язок між антинеопластичною активністю цих сполук та їх структурними модифікаціями, а також дослідити шляхи індукції клітинної загибелі за дії згаданих вище алкалоїдів.	01 липня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	к.б.н., Ю.С. Козак; к.б.н., Р.Р. Панчук; М.В. Кліщ.

2	Вивчити вплив сангвінарину, берберину та його структурно модифікованих похідних на продукцію активних форм кисню, функціональний стан мітохондрій та системи глутатіону в злоскісних клітинах, а також встановити взаємозв'язок цих процесів з індукцією клітинної загибелі. Дослідити терапевтичний ефект досліджуваних алкалоїдів щодо організму мишей з експериментальними пухлинами (тривалість життя, зміни розміру пухлин, та значення ключових показників гематологічного та біохімічного профілю крові тварин-пухлиноносіїв).	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	к.б.н., Ю.С. Козак; к.б.н., Р.Р. Панчук; М.В. Кліщ.
---	---	---	---

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

У ході виконання проекту буде здійснено оцінку біологічної активності 6 новітніх напівсинтетичних похідних берберину, синтезованих на умовах наукової співпраці в Інституті біології Шандунської академії наук (м. Цзінань, Китай). Цитотоксичну дію цих сполук буде досліджено щодо лейкозних та карциномних клітин людини, та порівняно її з відповідним ефектом досліджуваних речовин щодо ембріональних клітин нирки людини. Для цього будуть використані методи ензиматичної оцінки проліферативної активності сполук (72 години інкубації, фарбування барвником МТТ) та аналізу виживання клітин за екструзією барвника трипанового синього (24 години інкубації). Оцінка впливу даних сполук на продукцію активних форм кисню, функціональний стан мітохондрій та рівень клітинних тіолів буде проводитися методом проточної цитофлуориметрії із використанням специфічних флуоресцентних барвників (DCFDA, DHE, JC-1, монохлоробіман). Терапевтичний ефект досліджуваних сполук на ріст експериментальних пухлин (лімфома NK/Ly, меланома B16) у мишей буде оцінюватися за їхнім впливом на тривалість життя та розміри пухлини у піддослідних тварин. Загальний аналіз крові у тварин буде здійснено за допомогою автоматичного 5-диференційного гематологічного аналізатора DF51 компанії Dymind, а біохімічні показники крові – із використанням напівавтоматичного біохімічного аналізатора BS-3000M.

При виконанні запланованої науково-дослідної роботи дослідники зобов'язуються дотримуватись правил техніки безпеки у хімічних лабораторіях. Дослідження з використанням лабораторних тварин (миші) будуть проведені з дотриманням біоетичних норм, прийнятих в Україні і країнах Європейського Союзу. Під час аналізу отриманих результатів дослідники зобов'язуються проводити статистичну оцінку достовірності різниці або кореляції отриманих числових даних.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

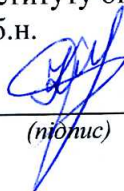
У ході виконання проекту буде встановлено структурно-функціональні закономірності, що визначають цитотоксичну і проапоптичну активність новітніх 9-О-заміщених похідних берберину. Крім того, у часовій динаміці буде досліджено вплив цих сполук на функціональний стан мітохондрій, продукцію активних форм кисню, зміни рівня окисленого та відновленого глутатіону у злоскісних клітинах. Отримані результати будуть верифіковані із використанням специфічних інгібіторів АФО різної природи. Терапевтичну активність та потенційні побічні ефекти структурно модифікованих похідних берберину, які виявилися найактивнішими *in vitro*, буде також вивчено на моделях експериментальних пухлин (лімфома NK/Ly, меланома B16) у мишей. Отримані результати дадуть змогу оцінити ефективність хімічної модифікації берберину для посилення його протипухлинної дії щодо злоскісних клітин та біодоступності.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи

- звіт про виконання наукової роботи, оформленого відповідно до ДСТУ 3008-95 «Документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- публікації у міжнародних реферованих журналах по темі проекту;
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями.

Науковий керівник роботи

Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.



Юлія КОЗАК

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

**«Структурно-функціональні взаємозв'язки, що визначають протипухлинну активність новітніх 9-О-модифікованих похідних берберину»
на 2021 рік**

Термін виконання роботи: початок — 01.01.2021 р., закінчення — 31.12.2022 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	25,800
2	Нарахування на оплату праці	2120	5,676
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	33,320
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	0,204
Разом:			65,000
в т.ч. накладні витрати			2,400
% їх до основної заробітної плати			10,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

(підпис)

М.П.

Андрій СИБІРНИЙ

25255758

М.П. м. ЛЬВІВ • ІННІ

Науковий керівник роботи
Молодший науковий співробітник
Інституту біології клітини НАН України
к.б.н.

(підпис)

Юлія КОЗАК