



**Università
di Genova**

DIFAR DIPARTIMENTO
DI FARMACIA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA
LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

Berberina e nanoformulazioni: nuove prospettive per la terapia
oncologica.

Candidata

Elisabetta Sattin

Relatore: Prof.ssa Eleonora Russo

Anno accademico 2025-2026

Sommario

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1	7
BERBERINA: ORIGINE, STRUTTURA CHIMICA E PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE	7
1.1 Origine e distribuzione naturale della berberina	7
1.2 Struttura chimica e caratteristiche fisico-chimiche	7
1.3 Metabolismo e principali metaboliti	9
1.4 Proprietà farmacologiche della berberina	9
1.5 Attività antimicrobica	10
1.6 Attività antinfiammatoria e antiossidante	10
1.7 Attività metabolica: effetti antidiabetici e ipolipemizzanti	11
1.8 Potenziale antitumorale	11
CAPITOLO 2	13
FARMACOCINETICA E LIMITI DI BIODISPONIBILITÀ DELLA BERBERINA.....	13
2.1 Assorbimento gastrointestinale della berberina.....	13
2.2 Solubilità e dissoluzione: il primo ostacolo farmacocinetico	14
2.3 Il ruolo della glicoproteina P nell'efflusso della berberina.....	14
2.4 Metabolismo di primo passaggio	15
2.5 Distribuzione sistemica	15
2.6 Eliminazione ed escrezione	16
2.7 Conseguenze cliniche della bassa biodisponibilità	16
CAPITOLO 3	17
STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITÀ DELLA BERBERINA.....	17
3.1 Promotori di permeazione intestinale	17
3.2 Inibizione della glicoproteina P.....	18
3.3 Complessi fosfolipidici e fitosomi.....	18
3.4 Sistemi microparticellari	19
3.5 Sistemi lipidici e auto-microemulsionanti	19
3.6 Il ruolo del microbiota intestinale.....	20
CAPITOLO 4	21
NANOPARTICELLE DI CHITOSANO E NANOFORMULAZIONI INNOVATIVE DELLA BERBERINA.....	21
4.1 Il chitosano come polimero per il drug delivery	21
4.2 Preparazione delle nanoparticelle di chitosano caricate con berberina.....	23
4.3 Caratterizzazione tecnologica delle nanoparticelle	24

4.4 Analisi morfologica, FT-IR e DSC	24
4.5 Solubilità, coefficiente di ripartizione e stabilità gastrointestinale.....	26
4.6 Profilo di rilascio in vitro.....	27
4.7 Stabilità a lungo termine.....	28
4.8 Biodisponibilità in vivo delle nanoparticelle di chitosano	28
4.9 Altre nanoparticelle polimeriche per la berberina.....	29
4.10 Nanoparticelle lipidiche e nanocarrier lipidici strutturati	30
4.11 Liposomi, fitosomi e sistemi fosfolipidici.....	31
4.12 Nanoparticelle metalliche e applicazioni oncologiche.....	31
4.13 Nanostrutture carboniose	32
4.14 Nanoformulazioni multifunzionali e terapia fotodinamica	32
4.15 Considerazioni conclusive sui sistemi nanoparticellari	33
CAPITOLO 5.....	34
ATTIVITÀ ANTITUMORALE DELLA BERBERINA	34
5.1 Effetti sulla proliferazione cellulare	36
5.2 Induzione dell'apoptosi.....	36
5.3 Modulazione dell'autofagia	37
5.4 Effetti antiangiogenici	38
5.5 Effetti antimetastatici e inibizione dell'invasività tumorale.....	39
5.6 Modulazione del microambiente tumorale	39
5.7 Berberina e sensibilità ai trattamenti antitumorali	40
5.8 Limiti dell'impiego della berberina non formulata in oncologia	41
5.9 Considerazioni conclusive sulla berberina come antineoplastico	42
CAPITOLO 6.....	43
BERBERINA E CARCINOMA POLMONARE.....	43
6.1 Caratteristiche biologiche del carcinoma polmonare	44
6.2 Razionale dell'impiego della berberina nel carcinoma polmonare	45
6.3 Effetti antiproliferativi sulle cellule di carcinoma polmonare	45
6.4 Induzione dell'apoptosi nel carcinoma polmonare	46
6.5 Berberina, autofagia e carcinoma polmonare	47
6.6 Inibizione dell'angiogenesi tumorale.....	47
6.7 Effetti antimetastatici nel carcinoma polmonare	48
6.8 Immunomodulazione e microambiente tumorale	49
6.9 Berberina e chemiosensibilità nel carcinoma polmonare.....	49
6.10 Limiti della berberina non formulata nel trattamento del carcinoma polmonare ...	50

6.11 Considerazioni conclusive sull'efficacia nel carcinoma polmonare	50
CAPITOLO 7.....	52
<i>LIMITI ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE DELLE NANOFORMULAZIONI DELLA BERBERINA.....</i>	<i>52</i>
7.1 Limiti intrinseci della berberina	52
7.2 Limiti delle evidenze precliniche.....	53
7.3 Criticità delle nanoformulazioni attualmente disponibili.....	53
7.4 Problematiche legate alla sicurezza	54
7.5 Mancanza di studi clinici su larga scala	54
7.6 Personalizzazione della terapia e medicina di precisione	55
7.7 Sistemi intelligenti e rilascio controllato	55
7.8 Applicazioni future in oncologia	56
7.9 Considerazioni finali	56
<i>CONCLUSIONI</i>	<i>57</i>

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è assistito a un crescente interesse nei confronti dei prodotti naturali come fonte di molecole bioattive per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. Numerosi composti di origine vegetale hanno dimostrato proprietà farmacologiche rilevanti associate a un profilo di sicurezza generalmente favorevole, suscitando l'interesse della comunità scientifica e dell'industria farmaceutica [1]. Tra questi, la berberina (BBR) rappresenta una delle molecole naturali maggiormente studiate grazie alla sua ampia gamma di attività biologiche e farmacologiche.

La berberina è un alcaloide isochinolinico quaternario presente in numerose specie vegetali appartenenti principalmente ai generi *Berberis*, *Coptis* e *Hydrastis*. Da secoli essa viene impiegata nella medicina tradizionale cinese e ayurvedica per il trattamento di differenti patologie, in particolare disturbi gastrointestinali, infezioni e processi infiammatori [2-6]. Le moderne ricerche farmacologiche hanno successivamente confermato il notevole potenziale terapeutico della molecola, evidenziandone attività antimicrobiche, antinfiammatorie, antiossidanti, antidiabetiche, ipolipemizzanti, neuroprotettive e antitumorali [7-9].

L'interesse nei confronti della berberina deriva dalla sua capacità di interagire con numerosi bersagli molecolari coinvolti nella regolazione del metabolismo cellulare, dei processi infiammatori, dello stress ossidativo e della proliferazione cellulare. Diversi studi hanno infatti dimostrato che la BBR è in grado di modulare importanti pathway intracellulari, tra cui AMPK, NF- κ B, PI3K/AKT, MAPK ed altri sistemi di segnalazione coinvolti nella patogenesi di numerose malattie croniche [10,11].

Nonostante le promettenti proprietà farmacologiche, l'applicazione clinica della berberina risulta fortemente limitata dalle sue sfavorevoli caratteristiche farmacocinetiche. La molecola presenta infatti una scarsa solubilità in ambiente acquoso, un ridotto assorbimento intestinale, un esteso metabolismo di primo passaggio e un marcato efflusso mediato dalla glicoproteina P (P-gp), fattori che ne compromettono significativamente la biodisponibilità sistemica [12-16]. Numerosi studi hanno evidenziato che la biodisponibilità orale della berberina è inferiore all'1%, rappresentando uno dei principali ostacoli al suo impiego terapeutico [17].

Per superare tali limitazioni, negli ultimi anni sono state sviluppate diverse strategie finalizzate al miglioramento della biodisponibilità della berberina. Tra queste, particolare attenzione è stata rivolta all'impiego di sistemi innovativi di drug delivery in grado di aumentarne la solubilità, proteggerla dalla degradazione gastrointestinale e favorirne l'assorbimento attraverso le membrane biologiche [18-66]. In questo contesto, le nanotecnologie hanno assunto un ruolo centrale nello sviluppo di nuove formulazioni farmaceutiche.

Le nanoparticelle rappresentano infatti una delle strategie più promettenti per il miglioramento delle caratteristiche biofarmaceutiche della berberina. Grazie alle loro ridotte dimensioni e alle peculiari proprietà fisico-chimiche, questi sistemi consentono di incrementare la stabilità del principio attivo, migliorarne l'assorbimento, aumentarne la biodisponibilità e favorirne il rilascio controllato [67-69]. Tra i diversi materiali impiegati, il chitosano ha suscitato particolare interesse grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità, mucoadesività e capacità di favorire il trasporto di farmaci attraverso le mucose biologiche [70-74].

Parallelamente, la ricerca oncologica ha evidenziato il notevole potenziale della berberina nel trattamento di diverse neoplasie. Numerosi studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che la molecola è in grado di inibire la proliferazione cellulare, indurre apoptosi, modulare i processi autofagici, contrastare l'angiogenesi tumorale e ridurre la capacità invasiva e metastatica delle cellule neoplastiche [75-83]. Tali effetti risultano particolarmente rilevanti nel carcinoma polmonare, una delle principali cause di mortalità oncologica a livello mondiale, caratterizzata da elevata aggressività biologica e frequente sviluppo di resistenza ai trattamenti convenzionali.

L'introduzione delle nanoformulazioni ha ulteriormente ampliato le potenzialità terapeutiche della berberina in ambito oncologico. Nanoparticelle polimeriche, sistemi lipidici, nanostrutture metalliche, liposomi e altri nanocarrier avanzati hanno dimostrato la capacità di migliorare il targeting tumorale, aumentare l'accumulo del farmaco nel microambiente neoplastico e potenziare l'efficacia terapeutica della molecola.

Alla luce di queste considerazioni, il presente elaborato di tesi si propone di analizzare le caratteristiche chimiche e farmacologiche della berberina, approfondirne i limiti farmacocinetici e descrivere le principali strategie sviluppate per migliorarne la biodisponibilità. Particolare attenzione sarà dedicata alle più recenti nanoformulazioni e alle loro applicazioni in ambito oncologico, con specifico riferimento al carcinoma polmonare, evidenziando le prospettive future di impiego di questa promettente molecola naturale.

CAPITOLO 1

BERBERINA: ORIGINE, STRUTTURA CHIMICA E PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE

1.1 Origine e distribuzione naturale della berberina

La berberina (BBR) è un alcaloide isochinolinico quaternario appartenente alla classe degli alcaloidi benzilisoquinolinici. Si tratta di una sostanza naturale ampiamente distribuita nel regno vegetale e presente in numerose specie utilizzate tradizionalmente a scopo medicinale [84-87].

Le principali fonti naturali di berberina appartengono ai generi *Berberis*, *Coptis*, *Hydrastis* e *Phellodendron*. Tra le specie più studiate figurano *Berberis vulgaris* (crespino), *Berberis aristata*, *Hydrastis canadensis* (goldenseal), *Coptis chinensis* e *Berberis aquifolium*. La molecola è localizzata prevalentemente nelle radici, nella corteccia e nei rizomi di queste piante, dove svolge un ruolo protettivo nei confronti di agenti patogeni e stress ambientali.

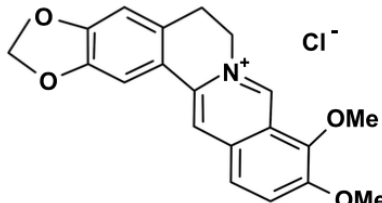
L'impiego terapeutico della berberina risale a diversi secoli fa. Nella medicina tradizionale cinese essa veniva utilizzata principalmente per il trattamento delle infezioni gastrointestinali, delle diarree e delle malattie infiammatorie, mentre nella medicina ayurvedica trovava applicazione nel trattamento di disturbi metabolici e infettivi.

Negli ultimi decenni, l'interesse scientifico nei confronti di questa molecola è cresciuto notevolmente grazie alla scoperta di numerose attività biologiche che ne hanno ampliato il potenziale terapeutico ben oltre gli impieghi tradizionali.

1.2 Struttura chimica e caratteristiche fisico-chimiche

Dal punto di vista strutturale, la berberina è un derivato della 5,6-diidrobenzo[a,g]chinolizina ed è caratterizzata dalla presenza di un sistema policiclico aromatico contenente un atomo di azoto quaternario permanentemente carico positivamente [88].

Tabella 1. Riepilogo del farmaco

Nome droga	Cloruro di Berberina
Numero CAS	633-65-8
Nome chimico	5,6-Diidro-9,10-dimetossibenzo[g]-1,3-benzodiossolo[5,6-a]chinolizinio cloruro
Classe chimica	Alcaloidi benzilisoquinolinici
Peso molecolare	371.81
Formula molecolare	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₄
Azione farmacologica/meccanismo d'azione	Inibizione del meccanismo di riparazione del DNA, inibitore delle MAO, inibitore COX2
Indicazione	Antibatterico, antiprotozario, antidiabetico, anticancro, antidepressivo; utilizzato anche nel trattamento delle malattie cardiovascolari
Aspetto	Polvere cristallina gialla
Punto di fusione	145
pKa	2.47
Solubilità	Scarsamente solubile in metanolo, poco solubile in etanolo e molto poco solubile in acqua
Struttura	 Cloruro di Berberina

Nella pratica farmaceutica la molecola viene generalmente utilizzata sotto forma di sali, principalmente come cloruro di berberina; solfato di berberina e cloridrato di berberina.

Tali forme saline presentano caratteristiche di solubilità superiori rispetto alla molecola libera e risultano pertanto più adatte allo sviluppo di formulazioni farmaceutiche [89].

La berberina si presenta come una polvere cristallina di colore giallo intenso, inodore e dal caratteristico sapore amaro. La presenza di un sistema aromatico planare favorisce l'interazione con diverse biomolecole, tra cui DNA, RNA e proteine intracellulari, contribuendo ai numerosi effetti biologici osservati.

Dal punto di vista della solubilità, la molecola presenta caratteristiche poco favorevoli: è scarsamente solubile in acqua; leggermente solubile in etanolo; moderatamente solubile in metanolo; insolubile in solventi apolari come benzene, etere e cloroformio.

La ridotta solubilità acquosa rappresenta uno dei principali fattori responsabili della bassa biodisponibilità orale della molecola e costituisce uno dei principali limiti al suo impiego clinico.

1.3 Metabolismo e principali metaboliti

Dopo somministrazione orale, la berberina subisce un intenso metabolismo epatico e intestinale. La molecola viene trasformata attraverso reazioni di demetilazione, riduzione e coniugazione che portano alla formazione di diversi metaboliti biologicamente attivi.

I principali metaboliti identificati sono:

- Berberrubina (M1);
- Talifendina (M2);
- Demetilenberberina (M3);
- Iatrorrizina (M4) [90].

Negli ultimi anni è emerso che tali metaboliti non rappresentano semplicemente prodotti di degradazione, ma contribuiscono in maniera significativa alle attività biologiche complessive della berberina.

Ad esempio, la berberrubina e la talifendina hanno mostrato attività antiossidanti e antiproliferative nei confronti di differenti linee cellulari tumorali, mentre la demetilenberberina ha evidenziato proprietà epatoprotettive e antinfiammatorie particolarmente interessanti [91,92]. Questi risultati suggeriscono che gli effetti terapeutici osservati in vivo siano il risultato dell'azione combinata della molecola madre e dei suoi metaboliti.

1.4 Proprietà farmacologiche della berberina

Uno degli aspetti più interessanti della berberina è rappresentato dalla sua attività farmacologica multitarget. Diversamente da molti farmaci convenzionali, che agiscono su un singolo bersaglio molecolare, la BBR è in grado di modulare simultaneamente numerose vie intracellulari coinvolte nella regolazione del metabolismo cellulare, dell'infiammazione, dello stress ossidativo e della proliferazione cellulare.

Questa caratteristica spiega l'ampio spettro delle sue attività terapeutiche che viene riassunto in tabella 2.

Tabella 2. Meccanismo d'azione della berberina per diverse attività

Ruolo della Berberina	Meccanismo d'azione
Antimicrobico	La BBR essendo un substrato di NorA, è in grado di accumularsi nelle cellule batteriche e di legarsi al DNA sia a singolo che a doppio filamento, portando così alla morte batterica per danno al DNA.
Antiinfiammatorio	Inibisce la produzione del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), dell'interleuchina-6 (IL-6) e della proteina chemioattrattiva dei monociti (MCP-1). Inoltre, influenza la produzione di prostaglandina E2 (PGE2) e la formazione di essudato, e riduce l'espressione di COX-2, delle metalloproteinasi della matrice (MMP)-2 e -9 attraverso le vie di segnalazione della protein chinasi attivata da mitogeni (MAPK) e del NF- κ B.
Antitumorale	La BBR si lega specificamente agli oligonucleotidi e stabilizza i triplex di DNA o i G-quadruplex tramite l'inibizione della telomerasi e della topoisomerasi, il che spiega la sua attività antiproliferativa.
Antidiabetico	L'aumento dei trasportatori GLUT4 tramite l'attivazione della protein chinasi attivata da AMP (AMPK), la modulazione del microbiota intestinale e gli effetti antinfiammatori e antiossidanti migliorano la sensibilità all'insulina e la tolleranza al glucosio, mitigando gli effetti dannosi dell'iperglicemia.
Antidepressivo	La BBR influenza la via di segnalazione di L-arginina-NO cGMP, manifestando così la sua attività antidepressiva.
Antiiperlipidemico	La BBR aumenta l'attività trascrizionale del promotore del LDLR attraverso la via JNK e la stabilizzazione del recettore epatico del colesterolo LDL (LDLR) tramite una via dipendente dalla chinasi regolata da segnali extracellulari (ERK). Inoltre, l'influenza sulla 5' AMPK e il blocco della via MAPK/ERK provocano l'inibizione della sintesi lipidica.

1.5 Attività antimicrobica

L'attività antimicrobica rappresenta una delle proprietà più antiche e meglio documentate della berberina. Diversi studi hanno dimostrato che la molecola possiede attività antibatterica nei confronti di numerosi microrganismi patogeni, tra cui: *Escherichia coli*; *Salmonella spp.*; *Shigella spp.*; *Vibrio cholerae*; *Staphylococcus epidermidis* e *Neisseria meningitidis* [93-99].

I meccanismi coinvolti comprendono:

- alterazione della membrana cellulare batterica;
- inibizione della sintesi proteica;
- interferenza con la replicazione del DNA;
- inibizione degli enzimi batterici;
- riduzione dell'attività della sortasi nei batteri Gram-positivi [100,101].

Inoltre, è stata osservata una significativa attività sinergica tra berberina e antibiotici convenzionali, suggerendo possibili applicazioni nel contrasto dell'antibiotico-resistenza [102].

1.6 Attività antinfiammatoria e antiossidante

Numerose evidenze sperimentali indicano che la berberina possiede una marcata attività antinfiammatoria. La molecola è in grado di ridurre la produzione di citochine proinfiammatorie quali: TNF- α ; IL-1 β ; IL-6 e di inibire l'attivazione della via di segnalazione NF- κ B [103,104].

L'inibizione di NF- κ B determina una riduzione dell'espressione di numerosi mediatori dell'infiammazione e contribuisce alla protezione di differenti organi e tessuti dai danni infiammatori cronici.

Parallelamente, la berberina mostra un'importante attività antiossidante grazie alla capacità di:

- neutralizzare specie reattive dell'ossigeno (ROS);
- aumentare l'attività degli enzimi antiossidanti endogeni;
- ridurre i fenomeni di perossidazione lipidica.

Questi effetti risultano particolarmente rilevanti nelle patologie cardiovascolari, metaboliche e neurodegenerative.

1.7 Attività metabolica: effetti antidiabetici e ipolipemizzanti

Uno degli ambiti maggiormente studiati riguarda gli effetti metabolici della berberina.

Numerosi studi clinici e preclinici hanno dimostrato che la molecola esercita un'importante attività ipoglicemizzante attraverso differenti meccanismi:

- attivazione di AMPK;
- aumento dell'espressione di GLUT-4;
- incremento della sensibilità insulinica;
- riduzione della gluconeogenesi epatica;
- miglioramento del metabolismo glucidico [105-112].

Diversi autori hanno osservato che gli effetti della berberina risultano comparabili a quelli della metformina nella riduzione della glicemia e dell'emoglobina glicata (HbA1c).

Parallelamente, la molecola esercita un'importante attività ipolipemizzante mediante:

- riduzione del colesterolo LDL;
- diminuzione dei trigliceridi;
- incremento del colesterolo HDL;
- modulazione della sintesi lipidica epatica [113-119]

Queste proprietà rendono la berberina particolarmente interessante nel trattamento della sindrome metabolica e delle malattie cardiovascolari.

1.8 Potenziale antitumorale

Tra tutte le attività biologiche della berberina, quella antitumorale rappresenta attualmente uno dei settori di ricerca più promettenti.

Numerosi studi hanno dimostrato che la molecola è in grado di:

- inibire la proliferazione cellulare;
- indurre apoptosi;
- modulare l'autofagia;
- contrastare l'angiogenesi;
- ridurre la capacità invasiva delle cellule tumorali;
- limitare la formazione di metastasi.

Tali effetti sono stati osservati in differenti tipologie tumorali, tra cui: il carcinoma mammario; il carcinoma coloretale; il carcinoma epatocellulare; il carcinoma prostatico e il carcinoma polmonare.

Grazie alla sua capacità di interferire con molteplici pathway molecolari coinvolti nella progressione tumorale, la berberina rappresenta oggi uno dei principali fitocomposti candidati allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche integrate in ambito oncologico.

CAPITOLO 2

FARMACOCINETICA E LIMITI DI BIODISPONIBILITÀ DELLA BERBERINA

Nonostante l'ampio spettro di attività biologiche e farmacologiche attribuite alla berberina, la sua applicazione clinica è stata a lungo limitata da caratteristiche farmacocinetiche sfavorevoli che ne compromettono l'efficacia terapeutica. Negli ultimi anni numerosi studi hanno infatti evidenziato come il principale ostacolo all'utilizzo della berberina in ambito clinico non sia rappresentato dalla sua attività farmacologica, bensì dalla sua ridotta biodisponibilità sistemica dopo somministrazione orale.

La biodisponibilità di un farmaco rappresenta la frazione della dose somministrata che raggiunge inalterata la circolazione sistemica e risulta quindi disponibile per esercitare il proprio effetto farmacologico. Nel caso della berberina, tale parametro assume valori estremamente bassi, generalmente inferiori all'1%, nonostante la molecola possieda una documentata attività biologica in numerosi modelli sperimentali.

Questa apparente contraddizione ha stimolato un intenso interesse scientifico volto a comprendere i meccanismi responsabili della scarsa biodisponibilità della molecola e a sviluppare strategie innovative in grado di superare tali limitazioni.

2.1 Assorbimento gastrointestinale della berberina

L'assorbimento intestinale rappresenta il primo e probabilmente il più importante ostacolo farmacocinetico che la berberina deve superare dopo somministrazione orale. Una volta ingerita, la molecola attraversa l'ambiente gastrico e intestinale dove incontra numerose barriere fisiche, chimiche e biologiche che ne limitano l'assorbimento.

La struttura chimica della berberina influenza profondamente il suo comportamento nel tratto gastrointestinale. In condizioni fisiologiche la molecola si presenta prevalentemente sotto forma ionizzata, caratteristica che riduce la sua capacità di attraversare passivamente le membrane biologiche lipidiche. Inoltre, la presenza di una carica positiva permanente favorisce fenomeni di aggregazione molecolare che ne riducono ulteriormente la disponibilità per l'assorbimento intestinale.

Diversi studi hanno dimostrato che la berberina presenta una permeabilità intestinale relativamente bassa. Secondo il sistema di classificazione biofarmaceutica (Biopharmaceutics Classification System, BCS), la molecola può essere considerata un composto caratterizzato da limitata

permeabilità, condizione che contribuisce significativamente alla riduzione dell'assorbimento sistemico.

L'assorbimento della berberina appare inoltre fortemente dipendente dal pH dell'ambiente gastrointestinale. È stato osservato che la molecola presenta una maggiore solubilità a pH prossimi alla neutralità rispetto agli ambienti fortemente acidi. In particolare, la solubilità della berberina a pH 7 risulta circa venti volte superiore rispetto a quella osservata a pH 1,2. Tale comportamento è attribuibile alla minore tendenza all'aggregazione molecolare e alla diversa distribuzione delle forme ioniche della sostanza.

Nonostante queste caratteristiche possano favorire parzialmente la dissoluzione intestinale, l'assorbimento complessivo rimane comunque limitato, suggerendo l'intervento di ulteriori meccanismi responsabili della ridotta biodisponibilità.

2.2 Solubilità e dissoluzione: il primo ostacolo farmacocinetico

La scarsa solubilità acquosa rappresenta uno dei principali fattori limitanti per l'impiego terapeutico della berberina. Numerosi studi hanno evidenziato che la velocità di dissoluzione della molecola nei fluidi biologici è relativamente ridotta, condizione che limita la quantità di farmaco disponibile per l'assorbimento attraverso la mucosa intestinale [120].

La dissoluzione rappresenta una fase fondamentale per l'assorbimento dei farmaci somministrati per via orale. Prima di attraversare le membrane biologiche, infatti, il principio attivo deve essere presente in forma disciolta. Una ridotta velocità di dissoluzione determina inevitabilmente una minore concentrazione del farmaco disponibile per l'assorbimento e, di conseguenza, una riduzione della biodisponibilità.

Nel caso della berberina, la presenza di una struttura altamente aromatica e planare contribuisce a una limitata affinità per l'acqua. La molecola tende inoltre a formare aggregati supramolecolari che riducono ulteriormente la superficie disponibile per la dissoluzione.

Queste caratteristiche spiegano perché, nonostante dosaggi relativamente elevati, solo una minima frazione della dose somministrata riesca effettivamente a raggiungere la circolazione sistemica.

2.3 Il ruolo della glicoproteina P nell'efflusso della berberina

Uno degli aspetti più studiati della farmacocinetica della berberina riguarda il ruolo della glicoproteina P (P-gp), una proteina transmembrana appartenente alla famiglia dei trasportatori ABC (ATP-Binding Cassette).

La P-gp è localizzata principalmente sulla superficie apicale delle cellule epiteliali intestinali e svolge una funzione protettiva nei confronti dell'organismo, espellendo numerose sostanze potenzialmente tossiche verso il lume intestinale. Tuttavia, questa stessa funzione può ridurre significativamente l'assorbimento di diversi farmaci [121].

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che la berberina è un substrato della glicoproteina P. Dopo essere stata assorbita dalle cellule intestinali, una parte consistente della molecola viene rapidamente trasportata nuovamente nel lume intestinale, riducendo drasticamente la quantità disponibile per il passaggio nella circolazione sistemica.

L'importanza di questo meccanismo è stata confermata da studi che hanno utilizzato inibitori della P-gp, come verapamil e ciclosporina A. In presenza di tali sostanze è stato osservato un significativo aumento dell'assorbimento intestinale della berberina, dimostrando il ruolo centrale dell'efflusso mediato da P-gp nella limitazione della biodisponibilità della molecola.

2.4 Metabolismo di primo passaggio

Oltre ai problemi di assorbimento intestinale, la berberina è soggetta a un esteso metabolismo di primo passaggio che contribuisce ulteriormente alla riduzione della sua biodisponibilità.

Il metabolismo di primo passaggio consiste nell'insieme delle trasformazioni metaboliche che il farmaco subisce a livello intestinale ed epatico prima di raggiungere la circolazione sistemica. Nel caso della berberina, tale fenomeno appare particolarmente marcato [122].

Dopo l'assorbimento intestinale, la molecola viene trasportata al fegato attraverso la vena porta, dove subisce numerose reazioni metaboliche catalizzate da enzimi appartenenti principalmente alla famiglia del citocromo P450. Tali reazioni determinano la formazione di diversi metaboliti, alcuni dei quali mantengono una certa attività biologica, mentre altri vengono rapidamente eliminati dall'organismo.

L'elevata efficienza di questi processi metabolici contribuisce a ridurre drasticamente la concentrazione plasmatica della molecola madre e rappresenta uno dei principali fattori responsabili della ridotta esposizione sistemica osservata dopo somministrazione orale.

2.5 Distribuzione sistemica

Nonostante la ridotta concentrazione plasmatica, la berberina presenta una distribuzione tissutale sorprendentemente ampia. Studi farmacocinetici condotti su modelli animali hanno dimostrato che la molecola è in grado di accumularsi in numerosi organi e tessuti, tra cui fegato, reni, polmoni, cuore, cervello, pancreas e tessuto adiposo [123].

Particolarmente interessante è l'elevata concentrazione osservata a livello epatico, che suggerisce un possibile ruolo terapeutico della berberina nelle patologie metaboliche e nelle malattie del fegato.

La distribuzione tissutale appare spesso disaccoppiata dai livelli plasmatici, fenomeno che potrebbe spiegare perché la berberina sia in grado di esercitare effetti farmacologici significativi nonostante le basse concentrazioni rilevabili nel sangue.

2.6 Eliminazione ed escrezione

L'eliminazione della berberina avviene principalmente attraverso la bile e le feci. È stato osservato che circa l'84% della dose somministrata viene escreta per via fecale sotto forma di molecola immodificata o di metaboliti.

L'escrezione urinaria contribuisce in misura minore all'eliminazione complessiva del farmaco, ma rappresenta comunque una via importante per alcuni metaboliti derivanti dal metabolismo epatico. L'intenso ricircolo enteroepatico della molecola contribuisce ulteriormente alla complessità del suo profilo farmacocinetico.

2.7 Conseguenze cliniche della bassa biodisponibilità

Le limitazioni farmacocinetiche descritte hanno importanti conseguenze cliniche. Per ottenere effetti terapeutici significativi sono spesso necessari dosaggi relativamente elevati, che possono aumentare il rischio di effetti indesiderati gastrointestinali.

Inoltre, la notevole variabilità individuale nell'assorbimento e nel metabolismo della molecola può determinare differenze significative nella risposta terapeutica tra pazienti diversi.

Per tali motivi, la semplice somministrazione orale della berberina libera risulta spesso insufficiente per sfruttarne pienamente il potenziale farmacologico. Questa consapevolezza ha spinto la ricerca verso lo sviluppo di sistemi innovativi di drug delivery capaci di migliorare la solubilità, proteggere la molecola dalla degradazione metabolica e favorirne l'assorbimento intestinale.

Le nanotecnologie farmaceutiche rappresentano attualmente una delle strategie più promettenti per superare tali limitazioni e consentire una più efficace applicazione clinica della berberina. I principali approcci sviluppati a questo scopo saranno analizzati nel capitolo successivo.

CAPITOLO 3

STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITÀ DELLA BERBERINA

L'elevato potenziale terapeutico della berberina ha stimolato negli ultimi anni un crescente interesse verso lo sviluppo di strategie in grado di superarne le limitazioni farmacocinetiche. Come discusso nel capitolo precedente, la scarsa biodisponibilità orale rappresenta il principale ostacolo alla traslazione clinica di questa molecola naturale. La ridotta solubilità acquosa, il limitato assorbimento intestinale, l'esteso metabolismo di primo passaggio e l'efflusso mediato dalla glicoproteina P contribuiscono infatti a ridurre drasticamente la quantità di farmaco disponibile a livello sistemico dopo somministrazione orale.

Per affrontare tali problematiche sono state proposte numerose strategie tecnologiche e formulative. L'obiettivo comune di questi approcci consiste nell'aumentare la quantità di principio attivo assorbita, migliorare la sua stabilità nei fluidi biologici e ottimizzare il trasporto attraverso le barriere fisiologiche. I risultati ottenuti negli ultimi anni hanno evidenziato come la biodisponibilità della berberina possa essere incrementata in maniera significativa attraverso l'impiego di sistemi innovativi di drug delivery.

Le principali strategie sviluppate comprendono l'impiego di promotori di permeazione intestinale, inibitori della glicoproteina P, sistemi microparticellari, formulazioni lipidiche, complessi farmaco-fosfolipide, dispersioni solide e, più recentemente, sistemi nanostrutturati avanzati.

3.1 Promotori di permeazione intestinale

Una delle prime strategie adottate per migliorare la biodisponibilità della berberina è stata l'utilizzazione di sostanze in grado di aumentare la permeabilità della mucosa intestinale.

I promotori di permeazione agiscono principalmente modificando temporaneamente la struttura delle giunzioni serrate presenti tra le cellule epiteliali intestinali. In questo modo viene favorito il passaggio paracellulare delle molecole farmacologiche, aumentando la quantità di principio attivo assorbita.

Tra i composti maggiormente studiati emerge il caprato di sodio, un tensioattivo anionico capace di migliorare significativamente il trasporto della berberina attraverso l'epitelio intestinale. Studi sperimentali hanno evidenziato che la presenza di tale sostanza determina un aumento della biodisponibilità orale fino al 28% rispetto alla formulazione convenzionale.

L'effetto del caprato di sodio sembra essere attribuibile sia all'apertura reversibile delle tight junction sia alla formazione di complessi molecolari più facilmente assorbibili. L'interazione tra il promotore di permeazione e la berberina favorisce inoltre una migliore dispersione del principio attivo all'interno del lume intestinale, migliorandone la dissoluzione.

Risultati particolarmente promettenti sono stati ottenuti attraverso la formulazione Huang-Gui Solid Dispersion (HGSD), una dispersione solida amorfa contenente berberina e caprato di sodio. In modelli animali tale formulazione ha determinato un incremento della biodisponibilità di circa 3,8 volte rispetto alle compresse convenzionali di berberina.

3.2 Inibizione della glicoproteina P

Come già discusso, la glicoproteina P rappresenta uno dei principali meccanismi responsabili della ridotta biodisponibilità della berberina. Questa proteina di trasporto espelle attivamente il farmaco dalle cellule intestinali verso il lume gastrointestinale, limitandone l'assorbimento.

Per tale motivo, numerosi studi si sono concentrati sull'utilizzo di sostanze in grado di inibire l'attività della P-gp. L'inibizione di questo sistema di efflusso consente infatti di aumentare significativamente la permanenza intracellulare della berberina e favorirne il passaggio verso la circolazione sistemica.

Tra gli inibitori maggiormente studiati figurano il verapamil, la ciclosporina A, la tetrandrina e la silimarina. Quest'ultima ha suscitato particolare interesse poiché possiede essa stessa attività antiossidanti, epatoprotettive e ipolipemizzanti. La combinazione tra silimarina e berberina ha mostrato un significativo incremento dell'assorbimento intestinale e della biodisponibilità sistemica.

Anche la tetrandrina ha evidenziato risultati incoraggianti. Studi condotti su cellule Caco-2 e modelli animali hanno mostrato un aumento della concentrazione plasmatica massima della berberina e un miglioramento dell'efficacia ipoglicemizzante quando le due molecole vengono somministrate contemporaneamente.

Questi risultati hanno confermato l'importanza della glicoproteina P come bersaglio terapeutico per l'ottimizzazione delle formulazioni contenenti berberina.

3.3 Complessi fosfolipidici e fitosomi

Una strategia particolarmente efficace per migliorare le proprietà biofarmaceutiche della berberina consiste nella formazione di complessi con fosfolipidi.

I fosfolipidi sono molecole anfifiliche costituite da una porzione idrofila e una lipofila. Grazie a questa caratteristica possono interagire con farmaci scarsamente assorbibili, migliorandone il trasporto attraverso le membrane biologiche.

Nel caso della berberina, la formazione di complessi con fosfatidilcolina ha determinato un significativo aumento della liposolubilità della molecola, favorendone l'assorbimento intestinale.

I fitosomi rappresentano una particolare categoria di complessi farmaco-fosfolipide in cui il principio attivo viene incorporato all'interno di strutture organizzate capaci di migliorarne la stabilità e la biodisponibilità. Diversi studi hanno dimostrato che i fitosomi di berberina sono in grado di aumentare significativamente sia la concentrazione plasmatica sia l'efficacia farmacologica del composto.

L'aumentata affinità per le membrane cellulari rappresenta uno dei principali vantaggi di questi sistemi e spiega il miglioramento dell'assorbimento osservato nei modelli sperimentali.

3.4 Sistemi microparticellari

Parallelamente ai complessi fosfolipidici, sono stati sviluppati diversi sistemi microparticellari finalizzati a migliorare il profilo farmacocinetico della berberina.

Le microsfere polimeriche rappresentano una delle tecnologie più studiate. Questi sistemi consentono l'incapsulamento del principio attivo all'interno di matrici biodegradabili che ne modulano il rilascio nel tempo.

Microsfere di alginato e gelatina rivestite con chitosano hanno mostrato un miglioramento significativo della biodisponibilità orale della berberina grazie all'aumento della permanenza del farmaco a livello della mucosa intestinale.

Le proprietà bioadesive di tali formulazioni consentono infatti un contatto più prolungato con la superficie assorbente dell'intestino, aumentando le probabilità di assorbimento del principio attivo.

I sistemi microparticellari hanno inoltre dimostrato la capacità di proteggere la berberina dalla degradazione precoce, contribuendo a migliorarne la stabilità durante il transito gastrointestinale.

3.5 Sistemi lipidici e auto-microemulsionanti

Le formulazioni lipidiche rappresentano un altro approccio particolarmente promettente.

I sistemi auto-microemulsionanti (SMEDDS) sono costituiti da miscele di oli, tensioattivi e co-tensioattivi che, una volta a contatto con l'ambiente acquoso gastrointestinale, formano spontaneamente microemulsioni stabili.

Queste strutture aumentano notevolmente la superficie di contatto tra il farmaco e l'ambiente biologico, favorendo la dissoluzione e il successivo assorbimento.

Nel caso della berberina, diverse formulazioni SMEDDS hanno mostrato incrementi significativi dei parametri farmacocinetici. In particolare, sono stati osservati aumenti del valore di C_{max} e dell'area sotto la curva (AUC), accompagnati da una biodisponibilità relativa fino a 2,4 volte superiore rispetto alle formulazioni convenzionali.

La capacità di questi sistemi di favorire il trasporto transcellulare e paracellulare rende tale tecnologia particolarmente interessante per la somministrazione orale di molecole scarsamente assorbibili.

3.6 Il ruolo del microbiota intestinale

Negli ultimi anni è emerso un nuovo aspetto particolarmente interessante della farmacocinetica della berberina: il ruolo svolto dal microbiota intestinale.

La comunità microbica residente nel tratto gastrointestinale partecipa attivamente al metabolismo di numerosi farmaci e può influenzarne significativamente l'assorbimento e l'efficacia terapeutica. Nel caso della berberina, alcuni batteri intestinali sono in grado di convertirla in diidroberberina (dhBBR), una forma metabolica caratterizzata da una capacità di assorbimento intestinale significativamente superiore rispetto alla molecola originale.

Una volta assorbita, la diidroberberina viene rapidamente riossidata a berberina all'interno dei tessuti, contribuendo ad aumentare la disponibilità sistemica del farmaco. Questo meccanismo rappresenta uno dei più recenti esempi di interazione positiva tra microbiota e farmaco.

L'insieme delle strategie sviluppate negli ultimi anni ha dimostrato che le limitazioni farmacocinetiche della berberina possono essere superate attraverso approcci formulativi mirati. I risultati ottenuti con promotori di permeazione, inibitori della glicoproteina P, sistemi lipidici, complessi fosfolipidici e sistemi microparticellari hanno evidenziato incrementi significativi della biodisponibilità orale.

Tuttavia, nonostante i progressi ottenuti, molti di questi sistemi presentano ancora limiti legati alla stabilità, alla capacità di caricamento del farmaco e alla riproducibilità industriale. Per tale motivo, l'attenzione della ricerca si è progressivamente spostata verso le nanotecnologie farmaceutiche, considerate oggi il più promettente strumento per ottimizzare la somministrazione della berberina. Le principali nanoformulazioni sviluppate per questa molecola saranno approfondite nel capitolo successivo.

CAPITOLO 4

NANOPARTICELLE DI CHITOSANO E NANOFORMULAZIONI INNOVATIVE DELLA BERBERINA

Lo sviluppo di sistemi nanostrutturati per la veicolazione della berberina rappresenta uno degli ambiti più promettenti della ricerca farmaceutico-tecnologica applicata a questa molecola. Come discusso nei capitoli precedenti, la berberina possiede un ampio spettro di attività biologiche, ma la sua applicazione clinica è fortemente limitata dalla scarsa solubilità acquosa, dalla bassa permeabilità intestinale, dall'efflusso mediato dalla glicoproteina P e dal marcato metabolismo di primo passaggio.

In tale contesto, le nanotecnologie farmaceutiche offrono strumenti particolarmente efficaci per migliorare il profilo biofarmaceutico della molecola. I sistemi nanoparticellari consentono infatti di proteggere il principio attivo dalla degradazione, aumentarne la stabilità, modularne il rilascio, favorirne l'interazione con le membrane biologiche e migliorarne la biodisponibilità sistemica. Inoltre, grazie alle loro dimensioni comprese generalmente tra 1 e 1000 nm, le nanoparticelle possiedono un elevato rapporto superficie/volume, che permette un'interazione più efficiente con i tessuti biologici e con le superfici mucosali.

Tra i diversi sistemi studiati per la veicolazione della berberina, le nanoparticelle polimeriche a base di chitosano occupano una posizione di particolare rilievo. Il chitosano è infatti un polimero naturale, biocompatibile, biodegradabile e dotato di proprietà mucoadesive, caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto alla formulazione di sistemi destinati alla somministrazione orale. La sua carica positiva consente inoltre l'interazione con le mucine e con le superfici cellulari cariche negativamente, favorendo la permanenza del sistema nanoparticellare a livello della mucosa gastrointestinale e aumentando il tempo disponibile per l'assorbimento del farmaco.

4.1 Il chitosano come polimero per il drug delivery

Il chitosano è un polisaccaride naturale ottenuto dalla deacetilazione della chitina, componente strutturale presente nell'esoscheletro dei crostacei e nella parete cellulare di alcuni funghi. Dal punto di vista chimico, è costituito principalmente da unità di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina legate mediante legami β -(1 $\rightarrow$ 4). La presenza di gruppi amminici liberi conferisce al polimero una carica positiva in ambiente acido, caratteristica che ne determina molte delle proprietà tecnologiche e biologiche.

La natura policationica del chitosano consente la formazione di complessi polielettrolitici con polianioni, come il tripolifosfato di sodio (TPP). Questa proprietà è alla base della tecnica di gelificazione ionotropica, una delle metodiche più utilizzate per la preparazione di nanoparticelle di chitosano. Tale processo avviene in condizioni acquose, a temperatura ambiente e senza l'impiego di solventi organici tossici, rappresentando quindi un approccio semplice, rapido e relativamente sicuro per la produzione di sistemi nanoparticellari [124].

Dal punto di vista farmaceutico, il chitosano presenta numerosi vantaggi. È biocompatibile e biodegradabile, possiede una bassa tossicità, mostra proprietà antimicrobiche intrinseche e può favorire l'assorbimento dei farmaci attraverso le mucose biologiche. La sua capacità mucoadesiva è particolarmente importante per la somministrazione orale, poiché consente di prolungare il tempo di contatto tra la formulazione e l'epitelio intestinale. Questo aspetto risulta fondamentale per molecole come la berberina, il cui assorbimento è limitato e dipende fortemente dal tempo di permanenza a livello della superficie assorbente.

Un ulteriore vantaggio del chitosano è rappresentato dalla capacità di modulare transitoriamente l'apertura delle giunzioni serrate tra le cellule epiteliali intestinali. Questo effetto può favorire il trasporto paracellulare di molecole scarsamente permeabili, contribuendo al miglioramento della biodisponibilità orale. Inoltre, l'interazione tra chitosano e glicoproteine presenti sulla superficie delle cellule epiteliali può facilitare l'adesione della formulazione alla mucosa e favorire l'assorbimento del principio attivo.

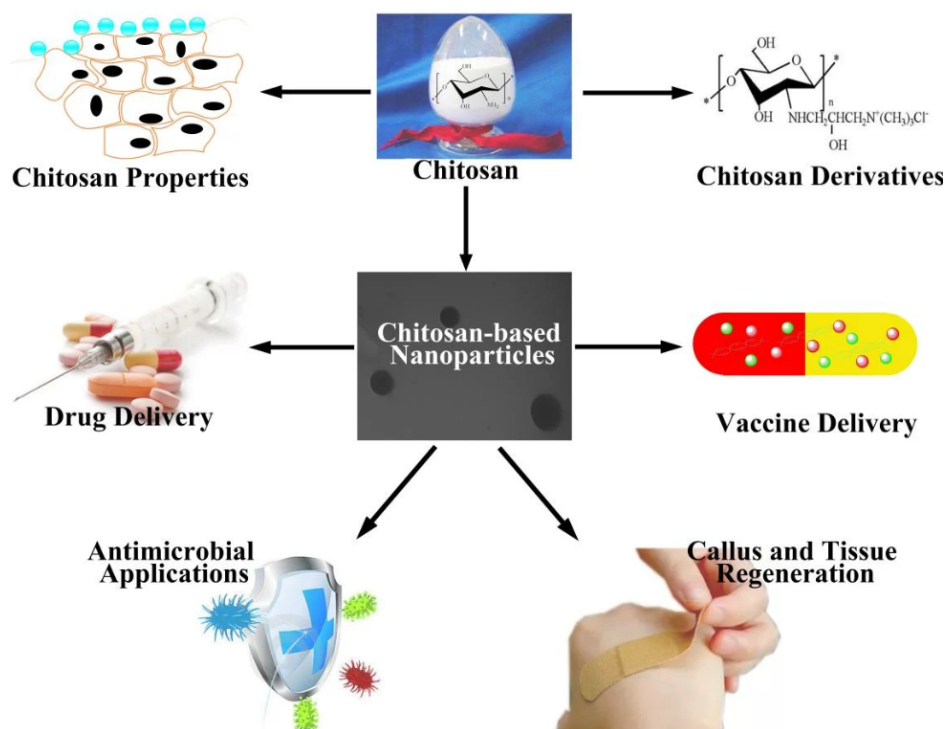


Figura 1 Esempi di applicazione di nanoparticelle di chitosano [125].

4.2 Preparazione delle nanoparticelle di chitosano caricate con berberina

Le nanoparticelle di chitosano caricate con berberina possono essere preparate mediante gelificazione ionotropica, una tecnica basata sull'interazione elettrostatica tra il chitosano, carico positivamente, e un agente reticolante anionico, generalmente il tripolifosfato di sodio. Questa metodica è ampiamente impiegata nella tecnologia farmaceutica perché consente di ottenere particelle di dimensioni nanometriche in condizioni operative relativamente blande.

Nello studio riportato dall'articolo 2, il chitosano è stato disciolto in una soluzione di acido acetico al 2% v/v, regolando il pH a 4,7. Questo valore di pH è particolarmente importante perché consente la protonazione dei gruppi amminici del chitosano, rendendo il polimero carico positivamente e quindi in grado di interagire efficacemente con gli anioni del TPP [126-128]. La berberina è stata invece disciolta in metanolo e aggiunta alla soluzione di chitosano, mantenendo il sistema sotto agitazione. Successivamente, la soluzione di TPP è stata introdotta goccia a goccia, determinando la formazione spontanea delle nanoparticelle (figura 2).

Il controllo del pH rappresenta un parametro critico nella preparazione di questi sistemi. Il chitosano possiede infatti un pKa di circa 6,5 e il suo grado di protonazione dipende fortemente dal pH della soluzione. Quando il pH aumenta e si avvicina a valori neutri o basici, il numero di gruppi amminici protonati diminuisce e la capacità del polimero di interagire con il TPP si riduce. Questo può compromettere la formazione delle nanoparticelle e alterarne le caratteristiche dimensionali e di stabilità.

Dopo la formazione, le nanoparticelle vengono generalmente purificate mediante centrifugazione, congelate e successivamente liofilizzate per migliorarne la conservabilità. La liofilizzazione permette di ottenere una polvere secca più stabile rispetto alla sospensione acquosa, riducendo il rischio di aggregazione, degradazione o crescita particellare durante la conservazione.

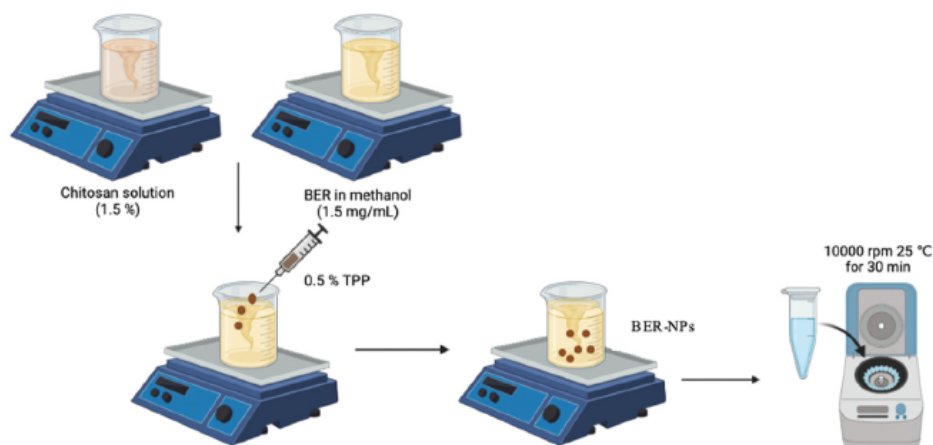


Figura 2 Rappresentazione schematica della preparazione di nanoparticelle Berberina-Chitosano

4.3 Caratterizzazione tecnologica delle nanoparticelle

La caratterizzazione delle nanoparticelle rappresenta una fase essenziale per valutarne la qualità, la stabilità e il potenziale impiego farmaceutico. I principali parametri considerati sono la dimensione particellare, l'indice di polidispersione, il potenziale zeta, l'efficienza di incapsulamento, la morfologia, lo stato fisico del farmaco e il profilo di rilascio.

Nello studio di *A. Gungor Ak et al.*, le nanoparticelle di chitosano caricate con berberina hanno mostrato una dimensione media di 406 ± 25 nm, un indice di polidispersione pari a $0,462 \pm 0,105$ e un potenziale zeta di $+41,6 \pm 0,8$ mV. L'efficienza di incapsulamento è risultata pari al $31,5 \pm 0,4\%$.

La dimensione particellare rappresenta un parametro fondamentale perché influenza il comportamento biologico del sistema. Particelle di dimensioni nanometriche possono interagire più efficacemente con le superfici mucosali e presentano un'elevata area superficiale disponibile per lo scambio con l'ambiente biologico. Rispetto a sistemi microparticellari precedentemente descritti, caratterizzati da dimensioni comprese tra 1 e 10 μm , le nanoparticelle di chitosano offrono quindi un vantaggio significativo in termini di potenziale assorbimento e interazione con l'epitelio intestinale [129].

Il potenziale zeta positivo è attribuibile alla presenza dei gruppi amminici protonati del chitosano sulla superficie delle particelle. Questo parametro è particolarmente importante poiché fornisce informazioni sulla stabilità colloidale del sistema e sulla sua capacità di interagire con le superfici biologiche. Un potenziale zeta positivo relativamente elevato indica una buona repulsione elettrostatica tra le particelle, riducendo la tendenza all'aggregazione. Inoltre, la carica positiva favorisce l'interazione con le mucine e con le membrane cellulari, generalmente caratterizzate da carica negativa.

L'efficienza di incapsulamento del 31,5% indica che una quota significativa della berberina è stata incorporata all'interno della matrice nanoparticellare. Sebbene tale valore non sia estremamente elevato, risulta comunque superiore a quello riportato in alcuni studi precedenti su sistemi a base di chitosano. Questo dato suggerisce che le condizioni formulative adottate, in particolare il rapporto tra chitosano, berberina e TPP, siano state adeguate alla formazione di un sistema stabile e funzionale.

4.4 Analisi morfologica, FT-IR e DSC

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) ha evidenziato che le nanoparticelle di berberina e chitosano presentano una morfologia sferica e una distribuzione relativamente omogenea. Questo

dato è importante perché la forma delle particelle può influenzare il comportamento biologico del sistema, la stabilità colloidale e il profilo di rilascio del farmaco.

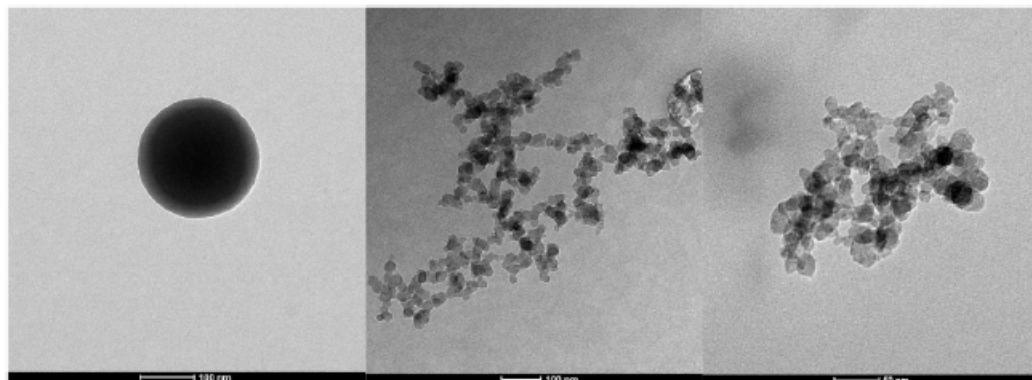


Figura 3 Immagine al TEM di nanoparticelle BBR-CHI

La berberina libera, al contrario, è nota per presentare una struttura cristallina irregolare di tipo prismatico, caratterizzata da un'ampia distribuzione dimensionale. La trasformazione in sistema nanoparticellare modifica quindi profondamente lo stato fisico e morfologico della molecola, contribuendo potenzialmente al miglioramento delle sue proprietà biofarmaceutiche [130].

L'analisi FT-IR è stata utilizzata per valutare eventuali interazioni tra berberina, chitosano e TPP. Nello spettro della berberina libera sono stati identificati picchi caratteristici intorno a 1036, 1105, 1269, 1362, 1388, 1504 e 1598 cm^{-1} [131-133]. Tali segnali non risultano chiaramente visibili nello spettro delle nanoparticelle, nel quale prevalgono invece i picchi attribuibili al chitosano. Questo risultato suggerisce che la berberina sia stata effettivamente incorporata all'interno della matrice polimerica e non semplicemente adsorbita sulla superficie delle particelle [134].

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) ha fornito ulteriori informazioni sullo stato fisico della berberina nella formulazione. La berberina libera mostra un picco endotermico di fusione a circa 191,71 °C. Nel termogramma delle nanoparticelle tale picco scompare, indicando che il farmaco è presente nella matrice polimerica in forma amorfa o molecolarmente dispersa. Questo aspetto è particolarmente rilevante perché la conversione da forma cristallina a forma amorfa può favorire la dissoluzione e migliorare la disponibilità del principio attivo.

L'assenza di segnali riconducibili a incompatibilità tra i componenti conferma inoltre la compatibilità tra berberina, chitosano e TPP, sostenendo la stabilità tecnologica della formulazione [135].

4.5 Solubilità, coefficiente di ripartizione e stabilità gastrointestinale

La solubilità e il coefficiente di ripartizione sono parametri fondamentali per prevedere il comportamento di un farmaco somministrato per via orale. La berberina libera presenta una solubilità limitata, che varia in funzione del pH e della temperatura. Nello studio dell'articolo 2, la solubilità della berberina è risultata maggiore nel tampone fosfato a pH 6,8 rispetto all'acqua e aumentava con l'incremento della temperatura.

La dissoluzione della berberina dalla formulazione nanoparticellare è risultata inferiore rispetto alla solubilità della molecola libera, suggerendo che il farmaco fosse trattenuto all'interno della matrice polimerica e rilasciato gradualmente. Questo comportamento è coerente con l'obiettivo tecnologico della formulazione, che non è semplicemente quello di aumentare la dissoluzione immediata, ma di proteggere il farmaco e modularne il rilascio nel tempo.

Il coefficiente di ripartizione delle nanoparticelle è risultato superiore rispetto a quello della berberina libera. Questo dato suggerisce che il rivestimento con chitosano possa migliorare l'equilibrio idrofilo-lipofilo del sistema, favorendo l'interazione con le membrane biologiche. Poiché l'assorbimento intestinale richiede il superamento di barriere lipidiche, un miglioramento del coefficiente di ripartizione può contribuire in modo significativo all'aumento della biodisponibilità.

La stabilità nei fluidi gastrointestinali simulati rappresenta un altro aspetto cruciale. Dopo somministrazione orale, una formulazione deve resistere all'ambiente acido dello stomaco, alla presenza di enzimi digestivi e alle condizioni del fluido intestinale. Nello studio dell'articolo 2, le nanoparticelle di chitosano hanno mostrato la capacità di preservare la stabilità della berberina sia nel fluido gastrico simulato sia nel fluido intestinale simulato. In particolare, il chitosano sembra svolgere un effetto protettivo nei confronti della molecola, probabilmente grazie alla formazione di una matrice polimerica capace di schermare il principio attivo dalle condizioni degradative del tratto gastrointestinale [136,137].

Questo risultato è particolarmente importante perché la degradazione gastrointestinale rappresenta uno dei fattori che limitano l'efficacia dei farmaci somministrati per via orale. La capacità delle nanoparticelle di migliorare la stabilità della berberina può quindi contribuire direttamente all'aumento della quota di farmaco disponibile per l'assorbimento.

4.6 Profilo di rilascio in vitro

Il profilo di rilascio della berberina dalle nanoparticelle di chitosano è stato valutato mediante utilizzo di membrana da dialisi in tampone fosfato a pH 6,8. I risultati hanno evidenziato un rilascio bifasico, caratterizzato da una fase iniziale rapida seguita da una fase più lenta e controllata.

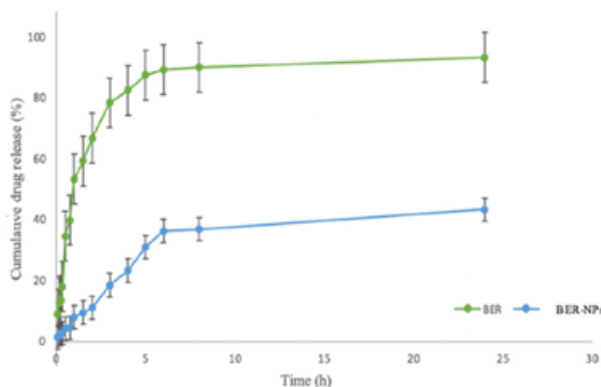


Figura 4 Profili di rilascio della berberina e della berberina incapsulata in NPs-CHI.

Il rilascio iniziale, noto come “burst release”, è verosimilmente attribuibile alla quota di berberina adsorbita o localizzata in prossimità della superficie delle nanoparticelle. Questa frazione viene rapidamente liberata a contatto con il mezzo di dissoluzione. Successivamente, il rilascio prosegue in modo più graduale, probabilmente per diffusione del farmaco dalla matrice polimerica verso l’ambiente esterno.

Questo tipo di profilo può risultare vantaggioso dal punto di vista terapeutico. La fase iniziale consente infatti di raggiungere rapidamente una concentrazione efficace di farmaco, mentre la fase successiva garantisce un rilascio prolungato che può mantenere l’effetto terapeutico nel tempo. Rispetto alla berberina libera, che tende a dissolversi e a essere eliminata rapidamente, il sistema nanoparticellare consente quindi una modulazione più controllata della disponibilità del principio attivo.

Risultati simili sono stati riportati anche da Zhou et al., che hanno osservato un rilascio più lento della berberina da microparticelle di chitosano rispetto al farmaco libero. Dopo 24 ore, la berberina libera mostrava un rilascio di circa il 95,7%, mentre le microparticelle rilasciavano circa il 36,8% del farmaco. Tali dati confermano la capacità dei sistemi a base di chitosano di modulare il rilascio della berberina.

4.7 Stabilità a lungo termine

La stabilità a lungo termine rappresenta un requisito essenziale per qualsiasi forma farmaceutica destinata allo sviluppo clinico e industriale. Una formulazione deve mantenere nel tempo le proprie caratteristiche fisico-chimiche, tra cui dimensione particellare, indice di polidispersione, potenziale zeta ed efficienza di incapsulamento.

Nello studio dell'articolo 2, le nanoparticelle liofilizzate sono state conservate per sei mesi a due diverse condizioni: $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con umidità relativa del $60\% \pm 5\%$. I risultati hanno indicato che la conservazione a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ consente di mantenere più efficacemente la stabilità colloidale e strutturale delle nanoparticelle.

In queste condizioni non sono state osservate variazioni significative dell'indice di polidispersione e dell'efficienza di incapsulamento, suggerendo che la formulazione mantiene una struttura omogenea e stabile fino a sei mesi. Questo risultato è particolarmente rilevante perché dimostra la possibilità di ottenere una formulazione solida liofilizzata conservabile, requisito fondamentale per un eventuale sviluppo farmaceutico futuro.

4.8 Biodisponibilità in vivo delle nanoparticelle di chitosano

La valutazione in vivo rappresenta il passaggio più importante per confermare l'efficacia tecnologica di una formulazione. Sempre nello studio precedentemente citato, la berberina libera e le nanoparticelle di berberina e chitosano sono state somministrate per via orale a ratti alla dose di 50 mg/kg. Successivamente sono stati determinati i parametri farmacocinetici principali, tra cui concentrazione plasmatica massima ($C_{\max}$), tempo per raggiungere la concentrazione massima ($t_{\max}$) e area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC).

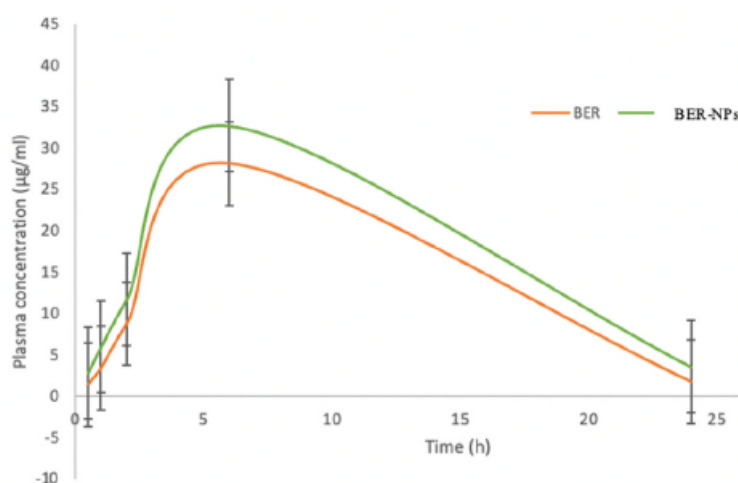


Figura 5 Curve di concentrazione plasmatica di berberina e berberina incapsulata in NPs-CHI.

I risultati hanno mostrato che le nanoparticelle aumentano in modo significativo la concentrazione plasmatica massima della berberina rispetto alla molecola libera. La biodisponibilità relativa della formulazione nanoparticellare è risultata pari al 122,06%. Questo incremento può essere attribuito a diversi fattori concomitanti.

In primo luogo, la riduzione delle dimensioni particellari aumenta la superficie specifica del sistema, favorendo l'interazione con la mucosa intestinale. In secondo luogo, la carica positiva del chitosano favorisce l'adesione alle superfici mucosali e prolunga il tempo di contatto con l'epitelio intestinale. In terzo luogo, la matrice polimerica protegge la berberina dalle condizioni degradative del tratto gastrointestinale. Infine, il chitosano può favorire l'apertura transitoria delle giunzioni serrate, aumentando il trasporto paracellulare della molecola.

Questi risultati confermano che le nanoparticelle di chitosano rappresentano una strategia efficace per migliorare la biodisponibilità orale della berberina.

4.9 Altre nanoparticelle polimeriche per la berberina

Oltre al chitosano, altri polimeri naturali e sintetici sono stati studiati per la preparazione di nanoparticelle caricate con berberina. Tra i materiali più utilizzati figurano PLGA, PEG, alginato, gelatina, albumina e sistemi ibridi polimero-lipide. In figura... vengono riportati diversi sistemi nanostrutturati in cui è stata incapsulata la berberina e ne sono state saggiate le sue caratteristiche e proprietà terapeutiche, come riportato nei paragrafi sottostanti.

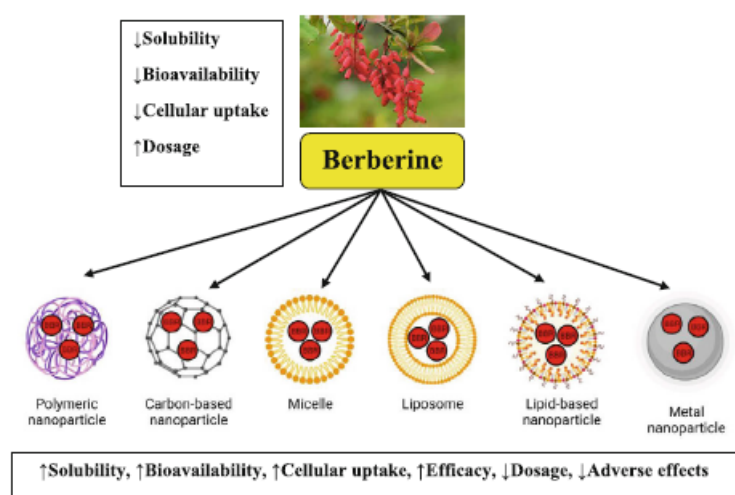


Figura 6 Formulazione della berberina in differenti nanoparticelle

Le nanoparticelle PLGA sono particolarmente interessanti per la loro biocompatibilità, biodegradabilità e approvazione per numerose applicazioni farmaceutiche. Nei sistemi ibridi

polimero-lipide, il PLGA può costituire il nucleo idrofobico della nanoparticella, mentre fosfolipidi e PEG formano lo strato superficiale. Questa architettura consente di combinare la capacità di caricamento dei sistemi polimerici con la biocompatibilità e la fluidità dei sistemi lipidici.

Nel caso della berberina, sono state sviluppate nanoparticelle ibride PEG-lipide-PLGA caricate con il complesso berberina-fosfatidilcolina di soia. Tali sistemi hanno mostrato una dimensione media di circa 149,6 nm, una struttura core-shell ben definita e un'efficienza di incapsulamento dell'89%, significativamente superiore rispetto a formulazioni prive del complesso fosfolipidico. Gli studi farmacocinetici hanno evidenziato un incremento della biodisponibilità orale relativa di circa il 343% rispetto alla berberina libera. Questo risultato dimostra come la combinazione tra complessazione fosfolipidica e nanoparticelle polimero-lipidiche possa rappresentare un approccio particolarmente efficace per superare le limitazioni biofarmaceutiche della molecola.

4.10 Nanoparticelle lipidiche e nanocarrier lipidici strutturati

I sistemi lipidici nanostrutturati rappresentano un'altra importante categoria di formulazioni innovative per la berberina. Tra questi, i nanostructured lipid carriers (NLCs) sono sistemi costituiti da una miscela di lipidi solidi e liquidi. Rispetto alle nanoparticelle lipidiche solide tradizionali, gli NLCs presentano una matrice lipidica meno ordinata, che consente un maggiore caricamento del farmaco e riduce il rischio di espulsione del principio attivo durante la conservazione.

Nel caso della berberina, sono stati sviluppati NLCs rivestiti con selenio per migliorare la stabilità gastrointestinale, la biodisponibilità orale e l'effetto ipoglicemizzante. Questi sistemi, denominati Se-NLCs, sono stati preparati mediante dispersione e omogeneizzazione a caldo, seguite da riduzione in situ del selenio sulla superficie delle particelle.

Le nanoparticelle ottenute presentavano una dimensione media di circa 160 nm e un'efficienza di incapsulamento pari al 90%. Rispetto alla soluzione di berberina, i Se-NLCs hanno determinato un incremento della biodisponibilità orale di circa 6,63 volte e un effetto ipoglicemizzante superiore rispetto sia alla berberina libera sia agli NLCs non rivestiti.

Questi risultati indicano che i nanocarrier lipidici strutturati rappresentano una piattaforma particolarmente promettente per la somministrazione orale della berberina, soprattutto quando associati a strategie di funzionalizzazione superficiale.

4.11 Liposomi, fitosomi e sistemi fosfolipidici

I liposomi e i fitosomi rappresentano sistemi di delivery basati su fosfolipidi, particolarmente indicati per molecole caratterizzate da scarsa solubilità e limitata permeabilità.

I liposomi sono vescicole sferiche costituite da uno o più doppi strati fosfolipidici, capaci di incorporare sia sostanze idrofile sia lipofile. Nel caso della berberina, i liposomi consentono di migliorare la stabilità della molecola, favorirne il trasporto cellulare e aumentarne l'accumulo in specifici tessuti o compartimenti biologici.

I fitosomi, invece, sono complessi molecolari tra fitocomposti e fosfolipidi. Diversamente dai liposomi, nei fitosomi il principio attivo non è semplicemente intrappolato all'interno di una vescicola, ma forma un complesso stabile con la componente fosfolipidica. Questo migliora la lipofilia apparente della molecola e ne favorisce l'assorbimento attraverso le membrane biologiche.

Nel caso della berberina, la formazione di complessi con fosfatidilcolina ha permesso di aumentare la biodisponibilità orale e di migliorare l'efficacia terapeutica. Inoltre, l'associazione tra complessi fosfolipidici e nanoparticelle polimeriche ha consentito di ottenere sistemi ibridi capaci di combinare elevata capacità di caricamento, protezione del farmaco e rilascio controllato.

4.12 Nanoparticelle metalliche e applicazioni oncologiche

In ambito oncologico, le nanoparticelle metalliche rappresentano una piattaforma di particolare interesse per la veicolazione della berberina. Sistemi a base di oro, argento, zinco e altri metalli sono stati studiati sia per le loro proprietà intrinseche sia come carrier per farmaci antitumorali.

Le nanoparticelle metalliche presentano caratteristiche uniche, tra cui stabilità, elevata area superficiale, possibilità di funzionalizzazione e proprietà ottiche o fototermiche. Nel caso della berberina, nanoparticelle a base di ossido di zinco sono state utilizzate come carrier per la terapia chemio-fototermica del carcinoma polmonare. Le nanoparticelle BBR-ZnO hanno mostrato una dimensione di circa 234 nm, un potenziale zeta di 18 mV e buona stabilità in vitro. Il trattamento di cellule A549 con tali nanoparticelle ha ridotto la vitalità cellulare, effetto ulteriormente potenziato dall'irradiazione laser [138].

Questi sistemi risultano particolarmente interessanti perché combinano l'azione farmacologica della berberina con le proprietà fisiche del nanomateriale, permettendo approcci terapeutici multimodali. Tuttavia, rispetto ai sistemi polimerici o lipidici, le nanoparticelle metalliche richiedono una valutazione più attenta della sicurezza, della biodistribuzione e della possibile tossicità a lungo termine.

4.13 Nanostrutture carboniose

Le nanostrutture a base di carbonio, come fullerene, nanotubi di carbonio, grafene e carbon dots, sono state studiate per la veicolazione di numerosi farmaci antitumorali. Questi sistemi possiedono elevata area superficiale, capacità di interazione con molecole aromatiche e possibilità di funzionalizzazione chimica.

Nel caso della berberina, sono stati studiati nanocomplessi non covalenti con fullerene C60. La struttura aromatica planare della berberina consente interazioni di tipo π - π con la superficie carboniosa del fullerene, favorendo la formazione di complessi stabili. Tali sistemi hanno mostrato attività citotossica nei confronti di cellule di carcinoma polmonare di Lewis, inducendo apoptosi e riducendo la migrazione cellulare [139].

Le nanostrutture carboniose possono quindi rappresentare un'opzione interessante per la veicolazione della berberina in ambito oncologico, sebbene siano necessari ulteriori studi per chiarirne pienamente il profilo di sicurezza e la traducibilità clinica.

4.14 Nanoformulazioni multifunzionali e terapia fotodinamica

Una delle prospettive più innovative riguarda lo sviluppo di nanoformulazioni multifunzionali in grado di combinare la veicolazione della berberina con altre modalità terapeutiche, come la terapia fotodinamica.

La berberina possiede proprietà fotosensibilizzanti e può contribuire alla generazione di specie reattive dell'ossigeno in seguito a stimolazione luminosa. Questo aspetto è particolarmente rilevante nella terapia fotodinamica, nella quale la produzione di ROS induce danno ossidativo selettivo nelle cellule tumorali [140].

Tuttavia, l'efficacia della terapia fotodinamica è spesso limitata dall'ipossia del microambiente tumorale e dall'aumento di molecole immunosoppressive come IDO1 e PD-L1. Per superare tali ostacoli, sono stati sviluppati liposomi contenenti berberina capaci di ridurre l'ipossia e modulare contemporaneamente l'espressione di IDO1 e PD-L1 [141].

Un esempio particolarmente innovativo è rappresentato dal sistema BBR@IR68-Lip, un liposoma progettato per accumularsi nel microambiente tumorale, migliorare l'ossigenazione locale, ridurre l'espressione di molecole immunosoppressive e aumentare l'infiltrazione delle cellule T nel tumore.

Un'altra piattaforma avanzata è costituita dal sistema AuNC@BBR@Ghost, che combina nanocluster d'oro, berberina e membrane eritrocitarie. In questo sistema, i nanocluster d'oro agiscono come componenti fotoresponsive, la berberina svolge attività antitumorale e le membrane

eritrocitarie contribuiscono al trasporto di ossigeno. Tale approccio consente di superare parzialmente i limiti legati all'ipossia tumorale e di aumentare la morte delle cellule A549 [142].

4.15 Considerazioni conclusive sui sistemi nanoparticellari

Le nanoparticelle di chitosano rappresentano una delle strategie più promettenti per migliorare la biodisponibilità orale della berberina. Grazie alla biocompatibilità, biodegradabilità, mucoadesività e carica positiva del chitosano, questi sistemi sono in grado di proteggere il principio attivo, migliorarne la stabilità gastrointestinale, modularne il rilascio e favorirne l'assorbimento intestinale.

I dati disponibili indicano che le nanoparticelle di chitosano possono aumentare significativamente i parametri farmacocinetici della berberina, con un incremento della biodisponibilità relativa fino al 122,06% rispetto al farmaco libero. Tuttavia, il chitosano rappresenta solo una delle numerose piattaforme nanotecnologiche sviluppate per questa molecola.

Le nanoparticelle polimeriche, i sistemi lipidici, i liposomi, i fitosomi, le nanoparticelle metalliche e le nanostrutture carboniose offrono ulteriori possibilità di ottimizzazione, soprattutto in ambito oncologico. In particolare, le nanoformulazioni multifunzionali aprono prospettive innovative per il trattamento del carcinoma polmonare, consentendo di combinare drug delivery, targeting tumorale, terapia fotodinamica e modulazione del microambiente neoplastico.

Nel complesso, le nanoformulazioni della berberina rappresentano un campo di ricerca in forte espansione e costituiscono una delle strategie più promettenti per trasformare questa molecola naturale da composto di interesse preclinico a potenziale agente terapeutico applicabile in ambito clinico

CAPITOLO 5

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DELLA BERBERINA

Negli ultimi anni la berberina ha suscitato un crescente interesse in ambito oncologico grazie alla sua capacità di interferire con numerosi processi biologici coinvolti nello sviluppo e nella progressione tumorale. Sebbene questa molecola sia tradizionalmente nota per le sue proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie, ipoglicemizzanti e ipolipemizzanti, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che essa possiede anche un significativo potenziale antitumorale. L'interesse nei confronti della berberina come possibile agente antineoplastico deriva soprattutto dalla sua natura multitarget. A differenza di molti farmaci convenzionali, che agiscono prevalentemente su un singolo bersaglio molecolare, la berberina è in grado di modulare simultaneamente diverse vie di segnalazione cellulare coinvolte nella proliferazione, nell'apoptosi, nell'autofagia, nell'angiogenesi, nella metastatizzazione e nella risposta immunitaria antitumorale.

Tabella 1. Attività antitumorale della Berberina contro vari tipi di cancro

Tipi di cancro	Modello	Dose	Attività antitumorale
Cervicale	In vitro	150-250 $\mu\text{mol/L}$	$\downarrow$ Vitalità cellulare, $\uparrow$ Apoptosi, $\downarrow$ Metastasi, $\downarrow$ EMT
Glioblastoma	In vitro In vivo	6.25-200 $\mu\text{mol/L}$ 50 mg/kg	$\downarrow$ Vitalità cellulare, $\uparrow$ Apoptosi, $\downarrow$ Metastasi, $\downarrow$ Angiogenesi, $\downarrow$ Crescita tumorale
Polmone	In vitro In vivo	0-120 μM 200 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, Arresto del ciclo cellulare, $\downarrow$ Riparazione e replicazione del DNA, $\downarrow$ Crescita tumorale, Sopravvivenza
Ovarico	In vitro	5 μM	$\downarrow$ Caratteristiche simil-CSC, $\downarrow$ EMT
Polmone	In vitro	0-20 μM	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, Arresto ciclo cellulare, $\uparrow$ Autofagia
Tiroide	In vitro	10-60 μM	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\uparrow$ Apoptosi, $\downarrow$ Migrazione, Arresto del ciclo cellulare
Seno	In vitro In vivo	100 μM 10 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\downarrow$ Autofagia, Inversione della resistenza alla doxorubicina, $\downarrow$ Crescita tumorale
Polmone	In vitro In vivo	0-80 μM 10 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\downarrow$ Lipogenesi, $\downarrow$ Crescita tumorale
Colorettale	In vitro	10.54 $\mu\text{g/mL}$	$\downarrow$ Crescita cellulare, Arresto del ciclo cellulare, $\downarrow$ RTA, $\downarrow$ Lunghezza relativa dei telomeri
Polmone	In vitro In vivo	30-270 μM 100-400 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\downarrow$ Crescita tumorale
ALL	In vitro In vivo	12.5-100 μM 10 mg/kg	$\downarrow$ Vitalità cellulare, Morte cellulare autofagica, $\uparrow$ Tasso di sopravvivenza, $\downarrow$ Condizione patologica
Polmone	In vitro In vivo	10-80 μM 25 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\uparrow$ Apoptosi, $\uparrow$ Danno al DNA, $\downarrow$ Crescita tumorale
Gastrico	In vitro In vivo	25 μM 5-20 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\uparrow$ Autofagia, $\downarrow$ Crescita tumorale
Glioma	In vitro In vivo	20-80 mg/L 5 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, Arresto del ciclo cellulare, $\downarrow$ Crescita tumorale
Fegato	In vitro In vivo	50-125 μM 20 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\downarrow$ Uptake di glutammina, $\downarrow$ Crescita tumorale
Endometriale	In vitro In vivo	10-160 μM 50 e 100 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, $\downarrow$ Migrazione e invasione, $\downarrow$ Metastasi
Prostata	In vitro	10-75 μM	$\downarrow$ Migrazione e invasione, $\downarrow$ EMT
HCC	In vivo	250 mg/kg	$\downarrow$ Tumorigenesi, $\downarrow$ Lipogenesi, $\downarrow$ Infiammazione, $\downarrow$ Fibrosi, $\downarrow$ Angiogenesi
RCC	In vitro	5-320 μM	$\downarrow$ Vitalità cellulare, $\uparrow$ Autofagia, $\uparrow$ Apoptosi, $\downarrow$ Angiogenesi
Gastrico	In vitro In vivo	10-80 μM 100 mg/kg	$\downarrow$ Proliferazione cellulare, Arresto del ciclo cellulare, $\downarrow$ Migrazione e invasione, $\downarrow$ Crescita tumorale

Questa caratteristica risulta particolarmente rilevante nel contesto oncologico, poiché il tumore è una patologia complessa e dinamica, sostenuta da molteplici alterazioni genetiche, epigenetiche e metaboliche. La capacità della berberina di agire su diversi livelli della biologia tumorale la rende quindi una molecola di grande interesse per lo sviluppo di strategie terapeutiche integrate, soprattutto in associazione con sistemi di drug delivery avanzati e nanoformulazioni.

5.1 Effetti sulla proliferazione cellulare

Uno dei principali meccanismi attraverso cui la berberina esercita la propria attività antitumorale è rappresentato dall'inibizione della proliferazione cellulare. Numerosi studi in vitro hanno dimostrato che la molecola è in grado di ridurre la crescita di diverse linee cellulari tumorali, tra cui cellule di carcinoma mammario, coloretale, epatocellulare, prostatico, vescicale e polmonare. La proliferazione incontrollata rappresenta una delle caratteristiche fondamentali delle cellule tumorali. Essa deriva dall'alterazione dei normali meccanismi che regolano il ciclo cellulare e consente alle cellule neoplastiche di moltiplicarsi in modo autonomo e indipendente dai segnali fisiologici di controllo. La berberina è in grado di interferire con questo processo inducendo arresto del ciclo cellulare in differenti fasi, in particolare nella fase G1, impedendo così la progressione verso la replicazione del DNA e la divisione cellulare.

In diverse linee cellulari tumorali è stato osservato che la berberina riduce l'espressione di proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, come le cicline e le chinasi ciclina-dipendenti, mentre aumenta l'espressione di proteine ad attività inibitoria. Questo determina un rallentamento della crescita tumorale e può predisporre le cellule neoplastiche all'attivazione di processi di morte programmata.

Nel carcinoma polmonare, la berberina ha mostrato attività antiproliferativa nei confronti di linee cellulari come A549 e H1299. In questi modelli sperimentali il trattamento con BBR ha determinato una riduzione della vitalità cellulare, alterazioni morfologiche e diminuzione della capacità migratoria, suggerendo un effetto globale sulla progressione neoplastica.

5.2 Induzione dell'apoptosi

L'apoptosi rappresenta un processo fisiologico di morte cellulare programmata, fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Una delle caratteristiche distintive delle cellule tumorali è la capacità di evadere l'apoptosi, sopravvivendo anche in presenza di danni genetici, stress ossidativo o segnali antiproliferativi. Il ripristino della sensibilità apoptotica rappresenta quindi uno degli obiettivi centrali della terapia antitumorale.

Numerosi studi hanno dimostrato che la berberina è in grado di promuovere l'apoptosi in differenti modelli tumorali. Questo effetto è mediato principalmente dalla modulazione delle proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2, che regolano la permeabilità della membrana mitocondriale e il rilascio di fattori pro-apoptotici.

In particolare, la berberina aumenta l'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bax e Bak e riduce quella di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-xL. Questo squilibrio favorisce la

permeabilizzazione della membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c nel citoplasma e l'attivazione della cascata delle caspasi, con conseguente morte cellulare programmata.

Nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, studi condotti su cellule A549 e H1299 hanno evidenziato che l'effetto pro-apoptotico della berberina può dipendere anche dallo stato funzionale di p53. Le cellule A549, caratterizzate dalla presenza di p53 funzionale, risultano più sensibili all'induzione dell'apoptosi rispetto alle cellule H1299, prive di p53. Questo suggerisce che la berberina possa agire anche attraverso vie p53-dipendenti [143].

Ulteriori evidenze indicano che la berberina può indurre apoptosi attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'aumento controllato dello stress ossidativo all'interno delle cellule tumorali può infatti attivare vie di segnalazione pro-apoptotiche, come l'asse ROS/ASK1/JNK, determinando la depolarizzazione della membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c e l'attivazione della caspasi-3 [144].

Questo meccanismo è particolarmente interessante perché le cellule tumorali presentano spesso livelli basali di stress ossidativo più elevati rispetto alle cellule normali. La berberina potrebbe quindi aumentare ulteriormente tale stress oltre una soglia critica, inducendo selettivamente morte nelle cellule neoplastiche.

5.3 Modulazione dell'autofagia

L'autofagia è un processo cellulare conservato che consente la degradazione e il riciclo di componenti intracellulari danneggiati o non più funzionali. In condizioni fisiologiche, essa contribuisce al mantenimento dell'omeostasi cellulare; nel cancro, tuttavia, il suo ruolo è complesso e dipende dal contesto biologico e dallo stadio della malattia.

Nelle fasi iniziali della tumorigenesi, l'autofagia può esercitare un effetto protettivo, limitando l'accumulo di danni cellulari e prevenendo la trasformazione neoplastica. Al contrario, nei tumori avanzati può favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali in condizioni di stress, come ipossia, carenza di nutrienti o esposizione a farmaci chemioterapici.

La berberina è stata descritta come un modulatore dell'autofagia in diversi modelli tumorali. In alcune condizioni essa promuove l'autofagia associata alla morte cellulare, mentre in altri contesti può interferire con i meccanismi di sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Tale duplice azione rende la modulazione dell'autofagia uno degli aspetti più interessanti, ma anche più complessi, dell'attività antitumorale della berberina.

Nel carcinoma polmonare, è stato osservato che la berberina induce contemporaneamente apoptosi e autofagia nelle cellule A549. Questo effetto è associato all'aumento dell'espressione di Bax,

Beclin-1, LC3-I e LC3-II e alla riduzione di Bcl-2 [145]. Beclin-1 e LC3 rappresentano marcatori fondamentali dell'attivazione autofagica, mentre la modulazione delle proteine Bcl-2 indica un'interazione diretta tra vie apoptotiche e autofagiche.

Un meccanismo particolarmente rilevante riguarda l'aumento dell'espressione di miR-144, microRNA capace di regolare negativamente TIGAR, una proteina coinvolta nel metabolismo glicolitico e nella protezione cellulare dall'apoptosi. Attraverso questo asse molecolare, la berberina può favorire sia la morte apoptotica sia la morte cellulare autofagica.

La capacità della berberina di modulare l'autofagia risulta particolarmente interessante anche nelle terapie combinate. È stato infatti dimostrato che l'associazione tra berberina e icotinib può superare la resistenza a questo farmaco nelle cellule di carcinoma polmonare non a piccole cellule, inducendo apoptosi e morte autofagica. In tale contesto, la degradazione autofagia-mediata del recettore EGFR contribuisce alla riduzione della segnalazione proliferativa e alla maggiore efficacia del trattamento combinato [146].

5.4 Effetti antiangiogenici

L'angiogenesi è il processo attraverso cui si formano nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti. Nel contesto tumorale, essa rappresenta un evento fondamentale per la crescita della massa neoplastica, poiché consente l'apporto di ossigeno e nutrienti e favorisce la rimozione dei prodotti di scarto. Inoltre, la formazione di nuovi vasi facilita la disseminazione metastatica delle cellule tumorali.

Il principale mediatore dell'angiogenesi tumorale è il vascular endothelial growth factor (VEGF), la cui espressione è spesso aumentata nelle cellule neoplastiche, soprattutto in condizioni di ipossia. L'attivazione dell'asse HIF-1 α /VEGF favorisce la sopravvivenza delle cellule tumorali in un microambiente povero di ossigeno e promuove la formazione di nuovi capillari.

La berberina ha dimostrato di esercitare un'azione antiangiogenica attraverso la downregulation di VEGF e la modulazione della via HIF-1 α /VEGF. Nel carcinoma polmonare, il trattamento con berberina ha ridotto l'espressione di VEGF e MMP-2 nelle cellule A549, ostacolando sia la formazione di nuovi vasi sia la degradazione della matrice extracellulare necessaria alla migrazione cellulare [147].

L'inibizione di MMP-2 è particolarmente rilevante poiché questa metalloproteinasi contribuisce al rimodellamento della matrice extracellulare e alla migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi. Riducendo l'espressione di MMP-2, la berberina può quindi ostacolare contemporaneamente angiogenesi, invasione tumorale e metastatizzazione.

Inoltre, la berberina è in grado di interferire con diverse vie di segnalazione coinvolte nella risposta angiogenica, tra cui NF- κ B/COX-2, PI3K/AKT e Raf/MEK/ERK. La modulazione di questi pathway contribuisce a ridurre la capacità delle cellule tumorali di adattarsi al microambiente ipossico e di sostenere la crescita vascolare [148].

5.5 Effetti antimetastatici e inibizione dell'invasività tumorale

La metastasi rappresenta la principale causa di mortalità nei pazienti oncologici. Si tratta di un processo complesso che richiede una serie di eventi coordinati, tra cui perdita dell'adesione cellulare, acquisizione di un fenotipo migratorio, degradazione della matrice extracellulare, ingresso nel circolo sanguigno, colonizzazione di organi distanti e adattamento al nuovo microambiente.

Uno dei processi fondamentali alla base della metastatizzazione è la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), durante la quale le cellule tumorali perdono caratteristiche epiteliali e acquisiscono proprietà mesenchimali, diventando più mobili, invasive e resistenti ai trattamenti. L'EMT è caratterizzata dalla riduzione dell'espressione di E-caderina e dall'aumento di marcatori come vimentina, Snail, Slug, Twist e ZEB.

La berberina ha mostrato una significativa capacità di inibire l'EMT e la metastatizzazione. In cellule di carcinoma polmonare A549, il trattamento con BBR ha ridotto la motilità e l'invasività cellulare in modo dose- e tempo-dipendente. Tale effetto è stato associato alla riduzione dell'espressione di uPA e MMP-2 e all'aumento dei rispettivi inibitori, come TIMP-2 e PAI [149]. In un altro studio, la berberina ha soppresso l'EMT indotta da TGF- β 1 nelle cellule di carcinoma polmonare. Questo effetto si è manifestato attraverso l'aumento dell'espressione di E-caderina e la riduzione di vimentina, Snail, Slug-1 e MMP-2. Nei modelli murini portatori di tumore A549, la somministrazione di berberina ha determinato una riduzione significativa del volume tumorale, confermando la rilevanza biologica degli effetti osservati in vitro [150].

La berberina sembra quindi agire su più livelli del processo metastatico: riduce la degradazione della matrice extracellulare, limita la migrazione cellulare, contrasta l'acquisizione del fenotipo mesenchimale e interferisce con i segnali pro-invasivi del microambiente tumorale.

5.6 Modulazione del microambiente tumorale

Il microambiente tumorale rappresenta un elemento fondamentale nella progressione neoplastica. Esso è costituito non solo dalle cellule tumorali, ma anche da cellule immunitarie, fibroblasti

associati al cancro, cellule endoteliali, matrice extracellulare, citochine, chemochine, fattori di crescita ed esosomi.

Nel carcinoma polmonare, il microambiente tumorale contribuisce in modo significativo alla crescita della massa neoplastica, alla metastatizzazione e alla resistenza ai trattamenti. La capacità della berberina di modulare il microambiente tumorale rappresenta quindi un aspetto particolarmente rilevante della sua attività antitumorale.

Diversi studi hanno dimostrato che la berberina può influenzare la funzione dei macrofagi associati al tumore. In particolare, è stato osservato che la molecola è in grado di ridurre l'espressione della proteina arginina deiminasi 4 (PADI4) nei macrofagi, contrastando la loro capacità di promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali A549 e la transizione epitelio-mesenchimale [151].

La berberina può inoltre modulare l'immunità antitumorale attraverso la riduzione dell'espressione di PD-L1. Questa molecola rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui le cellule tumorali evadono la risposta immunitaria, legandosi al recettore PD-1 espresso dai linfociti T e inibendone l'attività citotossica. È stato dimostrato che la berberina favorisce la degradazione ubiquitina-dipendente di PD-L1, contribuendo al ripristino della risposta immunitaria antitumorale [152].

Inoltre, la berberina riduce l'attivazione di cellule immunosoppressive, come i linfociti T regolatori e le cellule soppressorie di derivazione mieloide. Questo effetto contribuisce a rendere il microambiente tumorale meno favorevole alla progressione della malattia e più sensibile alla risposta immunitaria.

5.7 Berberina e sensibilità ai trattamenti antitumorali

Un altro aspetto di grande interesse riguarda la capacità della berberina di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali ai trattamenti convenzionali, come chemioterapia, radioterapia e terapie a bersaglio molecolare.

La resistenza ai farmaci antitumorali rappresenta uno dei principali ostacoli al successo terapeutico. Le cellule tumorali possono sviluppare resistenza attraverso numerosi meccanismi, tra cui aumento dell'efflusso dei farmaci, potenziamento dei sistemi di riparazione del DNA, alterazioni del metabolismo cellulare, attivazione di vie di sopravvivenza e modificazioni del microambiente tumorale.

La berberina è stata studiata in combinazione con diversi agenti antitumorali. Nel carcinoma polmonare, l'associazione con doxorubicina ha mostrato effetti particolarmente interessanti. La berberina è infatti in grado di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali alla doxorubicina

attraverso la downregulation della via STAT3, coinvolta nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione e nella resistenza farmacologica [153].

Inoltre, la berberina può modulare la risposta immunitaria indotta dalla doxorubicina. È stato osservato che il trattamento con doxorubicina può favorire la formazione di un microambiente immunosoppressivo, caratterizzato dall'aumento del fenotipo neutrofilo N2 e dalla produzione di citochine di tipo Th2. La berberina, al contrario, contribuisce a mantenere il fenotipo neutrofilo N1, associato a una risposta antitumorale più efficace, e riduce l'immunosoppressione indotta dal trattamento chemioterapico [154].

La berberina ha mostrato effetti sinergici anche con farmaci a bersaglio molecolare, come gefitinib e icotinib. In combinazione con gefitinib, la BBR inibisce la crescita e la motilità cellulare, promuove l'apoptosi e modula l'asse HOTAIR/miR-34a-5p, contribuendo alla riduzione dei marcatori dell'EMT [155]. In associazione con icotinib, invece, la berberina favorisce la degradazione autofagica di EGFR, superando parzialmente la resistenza al trattamento.

5.8 Limiti dell'impiego della berberina non formulata in oncologia

Nonostante il notevole potenziale antitumorale, l'impiego della berberina libera in oncologia presenta importanti limitazioni. La scarsa solubilità acquosa, la bassa biodisponibilità orale, la limitata permeabilità cellulare e l'efflusso mediato dalla glicoproteina P riducono la quantità di farmaco che raggiunge effettivamente il sito tumorale.

Inoltre, per ottenere concentrazioni terapeuticamente efficaci possono essere necessari dosaggi elevati, con conseguente aumento del rischio di effetti indesiderati. È stato riportato che assunzioni elevate o prolungate di berberina possono determinare effetti avversi, tra cui disturbi gastrointestinali e possibili interferenze con l'assorbimento di alcune vitamine.

Queste limitazioni rendono necessario lo sviluppo di formulazioni capaci di migliorare la veicolazione della molecola, aumentarne l'accumulo tumorale e ridurre l'esposizione sistemica non specifica.

In questo contesto, le nanoformulazioni rappresentano una strategia particolarmente promettente. L'incapsulamento della berberina in nanoparticelle polimeriche, lipidiche, metalliche o multifunzionali può infatti migliorarne la stabilità, aumentarne la biodisponibilità, favorirne il targeting tumorale e potenziarne l'efficacia antineoplastica.

5.9 Considerazioni conclusive sulla berberina come antineoplastico

La berberina esercita un'attività antitumorale complessa e multifattoriale. Essa è in grado di interferire con numerosi processi fondamentali della progressione neoplastica, tra cui proliferazione cellulare, evasione dell'apoptosi, autofagia, angiogenesi, invasività, metastatizzazione e immunosoppressione.

La capacità di agire su molteplici bersagli molecolari rende questa molecola particolarmente interessante nel contesto oncologico, soprattutto per tumori caratterizzati da elevata eterogeneità biologica e resistenza ai trattamenti convenzionali, come il carcinoma polmonare.

Tuttavia, le sfavorevoli caratteristiche farmacocinetiche della berberina libera limitano fortemente la sua applicazione clinica. Per questo motivo, l'impiego di sistemi di drug delivery avanzati e nanoformulazioni rappresenta un passaggio essenziale per trasformare il potenziale biologico della molecola in una reale opportunità terapeutica.

Nel capitolo successivo verrà approfondito il ruolo della berberina e delle sue nanoformulazioni nel carcinoma polmonare, con particolare attenzione ai meccanismi molecolari e alle strategie innovative attualmente in fase di studio.

CAPITOLO 6

BERBERINA E CARCINOMA POLMONARE

Il carcinoma polmonare rappresenta una delle principali sfide della moderna oncologia, sia per l'elevata incidenza sia per l'alta mortalità associata alla malattia. A livello globale, esso costituisce il secondo tumore più frequentemente diagnosticato e la prima causa di morte per neoplasia, con oltre 2 milioni di nuovi casi e circa 1,8 milioni di decessi riportati annualmente [156]. Questi dati evidenziano l'impatto clinico e sociale di una patologia che, nonostante i progressi diagnostici e terapeutici, continua a presentare una prognosi spesso sfavorevole.

Dal punto di vista istologico, il carcinoma polmonare viene distinto principalmente in carcinoma polmonare non a piccole cellule, indicato come NSCLC, e carcinoma polmonare a piccole cellule, o SCLC. Il NSCLC rappresenta circa l'85% dei casi, mentre il SCLC costituisce circa il 15% delle diagnosi [157]. All'interno del NSCLC si distinguono ulteriormente l'adenocarcinoma polmonare, il carcinoma squamocellulare e il carcinoma a grandi cellule. Tra questi, l'adenocarcinoma polmonare è il sottotipo più frequente e rappresenta circa il 40% dei tumori polmonari, seguito dal carcinoma squamocellulare, che costituisce circa il 25–30% dei casi [158].

Nonostante l'introduzione di approcci terapeutici avanzati, quali chemioterapia, radioterapia, immunoterapia e terapie a bersaglio molecolare, il carcinoma polmonare continua a essere associato a elevata aggressività biologica, frequente diagnosi in fase avanzata e sviluppo di resistenza ai trattamenti [159]. In questo scenario, la ricerca di nuove molecole capaci di modulare più bersagli cellulari e molecolari rappresenta una prospettiva di grande interesse.

La berberina si inserisce in questo contesto come fitocomposto dotato di proprietà antitumorali multifattoriali. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che essa può interferire con proliferazione cellulare, apoptosi, autofagia, angiogenesi, metastasi, risposta immunitaria e chemiosensibilità delle cellule tumorali. Tali caratteristiche rendono la berberina particolarmente interessante nel carcinoma polmonare, patologia in cui la complessità molecolare e l'elevata eterogeneità tumorale richiedono strategie terapeutiche capaci di agire su più vie biologiche contemporaneamente.

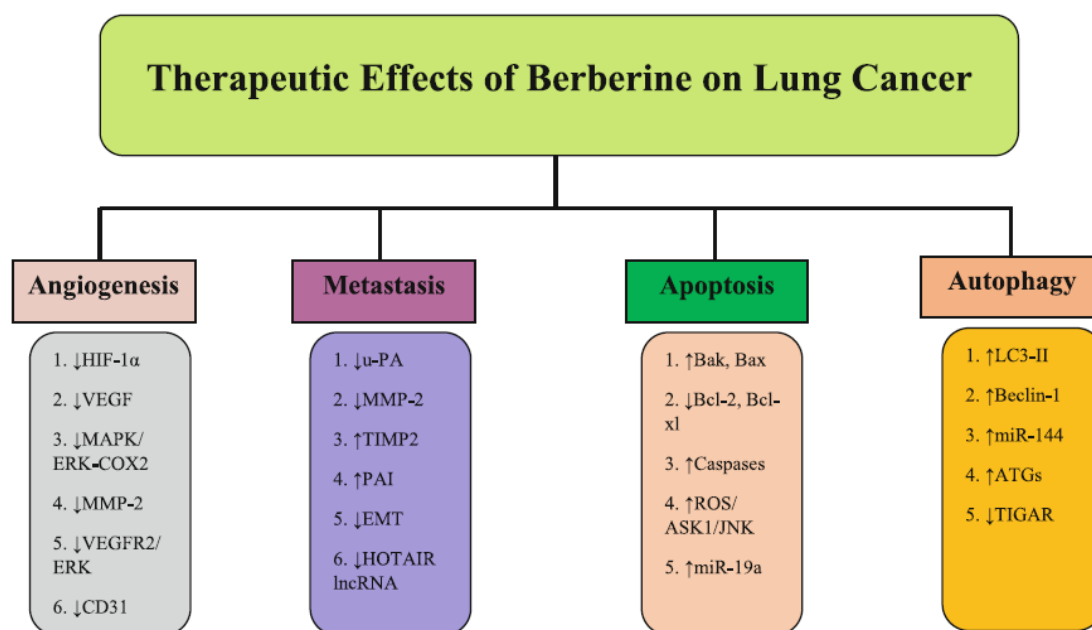


Figura 7 Inhibitory effects of berberine on tumor cells and its molecular and signaling targets. ASK1, apoptosis signal-regulating kinase 1; ATGs, autophagy-related proteins; COX2, cyclooxygenase; EMT, epithelial-mesenchymal transition; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1-alpha; HOTAIR, HOX antisense intergenic RNA; lncRNA, long non-coding RNA; MMP-2, matrix metalloproteinase 2; PAI, plasminogen activator inhibitor; ROS, reactive oxygen species; TIGAR, TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator; TIMP2, tissue inhibitor of metalloproteinase 2; uPA, urokinase-plasminogen activator; VEGF, vascular endothelial growth factor.

6.1 Caratteristiche biologiche del carcinoma polmonare

Il carcinoma polmonare è una patologia estremamente eterogenea. Questa eterogeneità riguarda non solo l'aspetto istologico, ma anche il profilo molecolare, il comportamento biologico e la risposta ai trattamenti. Nei pazienti affetti da NSCLC possono essere presenti alterazioni genetiche a carico di diversi geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nella sopravvivenza, nella migrazione e nella risposta ai farmaci.

Tra le alterazioni molecolari più rilevanti vi sono quelle che interessano EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, RET, NTRK e KRAS. La presenza di tali mutazioni ha modificato profondamente l'approccio terapeutico al carcinoma polmonare, consentendo lo sviluppo di farmaci a bersaglio molecolare. Tuttavia, anche nei pazienti che inizialmente rispondono a tali trattamenti, la comparsa di resistenza acquisita rappresenta un problema clinico frequente.

La biologia del carcinoma polmonare è inoltre fortemente influenzata dal microambiente tumorale, costituito da cellule immunitarie, fibroblasti associati al cancro, cellule endoteliali, matrice extracellulare, citochine e fattori di crescita. Il microambiente tumorale non rappresenta una semplice struttura di supporto, ma partecipa attivamente alla progressione della malattia, alla formazione di metastasi e alla resistenza ai trattamenti [160,161].

In questo contesto, la berberina risulta particolarmente interessante perché non agisce esclusivamente sulla cellula tumorale, ma può modulare anche componenti del microambiente neoplastico, inclusi macrofagi, cellule immunosoppressive, mediatori infiammatori e molecole coinvolte nell'evasione immunitaria.

6.2 Razionale dell'impiego della berberina nel carcinoma polmonare

L'interesse verso la berberina nel carcinoma polmonare deriva dalla sua capacità di interferire con molteplici processi coinvolti nella progressione tumorale. A differenza di molte molecole antitumorali convenzionali, che agiscono su un singolo bersaglio molecolare, la berberina presenta un profilo d'azione multitarget. Questa caratteristica può rappresentare un vantaggio nei tumori complessi ed eterogenei, come il carcinoma polmonare, in cui la progressione della malattia è sostenuta da numerose vie di segnalazione interconnesse.

Studi condotti su linee cellulari di carcinoma polmonare, in particolare A549 e H1299, hanno dimostrato che la berberina è in grado di ridurre la proliferazione cellulare, alterare la morfologia delle cellule tumorali, diminuire la capacità migratoria e indurre morte cellulare programmata. Questi effetti sono associati alla modulazione di pathway molecolari fondamentali, tra cui NF- κ B/COX-2, HIF-1 α /VEGF, PI3K/AKT, Raf/MEK/ERK e ROS/ASK1/JNK.

Il razionale terapeutico della berberina nel carcinoma polmonare si fonda quindi sulla possibilità di agire contemporaneamente su processi diversi ma complementari: bloccare la crescita tumorale, promuovere l'apoptosi, ridurre l'angiogenesi, limitare la metastatizzazione e aumentare la sensibilità delle cellule tumorali ai trattamenti convenzionali.

6.3 Effetti antiproliferativi sulle cellule di carcinoma polmonare

La proliferazione incontrollata rappresenta una delle caratteristiche principali delle cellule neoplastiche. Nel carcinoma polmonare, la deregolazione del ciclo cellulare contribuisce alla rapida crescita della massa tumorale e alla progressione della malattia. La berberina ha mostrato una significativa attività antiproliferativa su diverse linee cellulari polmonari, in particolare A549, H1299 e altre cellule di NSCLC.

Fu et al. hanno evidenziato che il trattamento con berberina determina una riduzione della proliferazione nelle cellule A549 e H1299, accompagnata da modificazioni morfologiche compatibili con una perdita della capacità migratoria e invasiva. Le cellule trattate presentano una riduzione del contatto cellula-cellula, una minore formazione di filopodi e una diminuzione della motilità cellulare.

Questi effetti sono stati messi in relazione con l'inibizione di diverse vie di segnalazione intracellulari. In particolare, la berberina riduce l'attività dei pathway PI3K/AKT e Raf/MEK/ERK, entrambi fondamentali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali. L'inibizione di queste vie determina una riduzione dei segnali pro-proliferativi e può favorire l'attivazione di processi di morte cellulare.

Ulteriori studi hanno dimostrato che la berberina può indurre arresto del ciclo cellulare nelle cellule di carcinoma polmonare, impedendo la progressione verso le fasi replicative. Questo effetto contribuisce alla riduzione della crescita tumorale e può aumentare la sensibilità delle cellule neoplastiche ad altri trattamenti antitumorali.

6.4 Induzione dell'apoptosi nel carcinoma polmonare

L'evasione dell'apoptosi è una delle principali caratteristiche delle cellule tumorali. Nel carcinoma polmonare, l'alterazione delle vie apoptotiche contribuisce alla sopravvivenza delle cellule maligne, alla progressione tumorale e alla resistenza ai trattamenti. La berberina ha mostrato una significativa capacità di ripristinare la sensibilità apoptotica delle cellule tumorali polmonari.

Uno studio condotto su cellule NSCLC p53-positive A549 e p53-deficienti H1299 ha dimostrato che la berberina induce apoptosi in modo più marcato nelle cellule A549. Questo risultato suggerisce che la presenza di p53 funzionale possa aumentare la sensibilità delle cellule tumorali all'azione pro-apoptotica della berberina.

A livello molecolare, il trattamento con berberina determina un aumento dell'espressione delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bak e una riduzione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL. Questo squilibrio favorisce la permeabilizzazione della membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c e l'attivazione della cascata delle caspasi, con conseguente morte cellulare programmata.

Chen et al. hanno inoltre evidenziato che la berberina può indurre apoptosi nelle cellule NSCLC attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno. L'aumento dei ROS attiva la via ASK1/JNK, determina depolarizzazione della membrana mitocondriale e promuove il clivaggio della caspasi-3. Questo meccanismo risulta particolarmente rilevante perché le cellule tumorali sono spesso caratterizzate da uno stress ossidativo basale più elevato rispetto alle cellule normali; un ulteriore aumento dei ROS può quindi superare la soglia di tolleranza cellulare e indurre morte selettiva.

Un ulteriore meccanismo coinvolge la regolazione dei microRNA. La berberina è stata infatti associata all'aumento dell'espressione di miR-19a, che può favorire l'apoptosi attraverso la

modulazione dell'asse miR-19a/TF/MAPK [162]. Questi dati indicano che l'attività pro-apoptotica della berberina nel carcinoma polmonare è complessa e coinvolge sia vie mitocondriali sia meccanismi di regolazione post-trascrizionale.

6.5 Berberina, autofagia e carcinoma polmonare

L'autofagia svolge un ruolo controverso nel cancro. In alcuni contesti può rappresentare un meccanismo di sopravvivenza per le cellule tumorali sottoposte a stress metabolico o farmacologico, mentre in altri può contribuire alla morte cellulare. Nel carcinoma polmonare, la modulazione dell'autofagia rappresenta una strategia terapeutica di crescente interesse.

La berberina si è dimostrata capace di modulare i processi autofagici nelle cellule tumorali polmonari. Gao et al. hanno osservato che il trattamento delle cellule A549 con berberina determina un aumento dell'espressione di Beclin-1, LC3-I e LC3-II, marcatori associati all'attivazione dell'autofagia. Parallelamente, la molecola aumenta l'espressione di Bax e riduce quella di Bcl-2, suggerendo una stretta interazione tra autofagia e apoptosi.

Il meccanismo proposto coinvolge miR-144 e TIGAR. La berberina aumenta l'espressione di miR-144, il quale riduce l'espressione di TIGAR, una proteina coinvolta nella regolazione del metabolismo glicolitico e nella protezione cellulare dall'apoptosi e dall'autofagia. Attraverso questo asse, la berberina può favorire la morte delle cellule tumorali A549 sia per via apoptotica sia per via autofagica.

La modulazione dell'autofagia risulta particolarmente rilevante anche nelle terapie combinate. In cellule NSCLC resistenti all'EGFR, l'associazione tra berberina e icotinib ha mostrato effetti antitumorali sinergici. Tale combinazione induce apoptosi e morte cellulare autofagica, promuovendo la degradazione del recettore EGFR attraverso una via mediata dall'autofagia. Questo dato suggerisce che la berberina possa contribuire a superare forme di resistenza farmacologica legate alla persistenza della segnalazione EGFR.

6.6 Inibizione dell'angiogenesi tumorale

L'angiogenesi è indispensabile per la crescita del carcinoma polmonare. Le cellule tumorali, aumentando di numero, necessitano di un apporto costante di ossigeno e nutrienti. Per soddisfare questa esigenza, esse promuovono la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso la produzione di fattori pro-angiogenici, tra cui VEGF.

Nel carcinoma polmonare, l'asse HIF-1 α /VEGF svolge un ruolo centrale. In condizioni di ipossia, HIF-1 α viene stabilizzato e induce l'espressione di geni coinvolti nell'adattamento al

microambiente povero di ossigeno, tra cui VEGF. Questo favorisce la formazione di nuovi vasi e contribuisce alla progressione tumorale [163].

La berberina è in grado di contrastare questo processo. Fu et al. hanno dimostrato che la molecola inibisce la via HIF-1 α /VEGF nelle cellule di carcinoma polmonare, riducendo così la capacità del tumore di promuovere angiogenesi. Anche Li et al. hanno osservato che la berberina cloridrato riduce l'espressione di VEGF e MMP-2 nelle cellule A549.

L'inibizione di MMP-2 è particolarmente importante perché questa metalloproteinasi partecipa alla degradazione della matrice extracellulare, un processo necessario sia per la migrazione delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi sia per l'invasione tumorale. La riduzione simultanea di VEGF e MMP-2 suggerisce quindi che la berberina possa agire non solo sulla vascolarizzazione tumorale, ma anche sulla capacità invasiva delle cellule neoplastiche.

6.7 Effetti antimetastatici nel carcinoma polmonare

La metastatizzazione rappresenta una delle principali cause di morte nei pazienti affetti da carcinoma polmonare. La capacità delle cellule tumorali di invadere i tessuti circostanti, entrare nel circolo ematico e colonizzare organi distanti è strettamente associata alla prognosi sfavorevole della malattia.

La berberina ha mostrato un significativo effetto antimetastatico in diversi modelli di carcinoma polmonare. Peng et al. hanno dimostrato che la molecola riduce vitalità, motilità e invasività delle cellule A549 in modo dose- e tempo-dipendente. Tale effetto è associato alla riduzione dell'espressione di uPA e MMP-2 e all'aumento di TIMP-2 e PAI, molecole che contrastano la degradazione della matrice extracellulare.

Un ulteriore meccanismo riguarda l'inibizione della transizione epitelio-mesenchimale. Qi et al. hanno osservato che la berberina sopprime l'EMT indotta da TGF- β 1 nelle cellule di carcinoma polmonare. In particolare, il trattamento aumenta l'espressione di E-caderina e riduce quella di vimentina, Snail, Slug-1 e MMP-2.

Questi effetti sono stati confermati anche in vivo. Nei modelli murini portatori di tumore A549, la somministrazione intraperitoneale di berberina ha determinato una riduzione significativa del volume tumorale, con effetti più evidenti alla dose di 10 mg/kg.

La capacità della berberina di modulare EMT, metalloproteinasi e segnali pro-invasivi indica che la molecola può interferire con diversi passaggi della cascata metastatica, riducendo la probabilità di disseminazione tumorale.

6.8 Immunomodulazione e microambiente tumorale

Il microambiente tumorale del carcinoma polmonare è caratterizzato da una complessa interazione tra cellule tumorali, cellule immunitarie, fibroblasti, cellule endoteliali e mediatori solubili. Questo ambiente può favorire la progressione della malattia e contribuire all'evasione immunitaria.

La berberina ha mostrato la capacità di modulare diversi componenti del microambiente tumorale. Gu et al. hanno evidenziato che la molecola può regolare la funzione dei macrofagi attraverso la modulazione di PADI4. I macrofagi con aumentata espressione di PADI4 favoriscono la sopravvivenza delle cellule A549 e promuovono EMT; la berberina, riducendo PADI4, contrasta questi effetti e limita la progressione tumorale.

Un altro meccanismo rilevante riguarda PD-L1, molecola coinvolta nell'evasione immunitaria. Le cellule tumorali che esprimono PD-L1 possono inibire l'attività dei linfociti T citotossici attraverso l'interazione con PD-1. È stato dimostrato che la berberina favorisce la degradazione ubiquitina-dipendente di PD-L1 nelle cellule tumorali polmonari, riducendo l'immunosoppressione e favorendo la risposta antitumorale [164].

La berberina può inoltre ridurre l'attivazione di popolazioni immunosoppressive, come linfociti T regolatori e cellule soppressorie di derivazione mieloide. Questo contribuisce a rendere il microambiente tumorale meno favorevole alla progressione neoplastica e più permissivo nei confronti della risposta immunitaria antitumorale.

6.9 Berberina e chemiosensibilità nel carcinoma polmonare

La resistenza ai trattamenti rappresenta uno dei maggiori ostacoli nella terapia del carcinoma polmonare. Anche quando i pazienti rispondono inizialmente alla chemioterapia o alle terapie a bersaglio molecolare, spesso sviluppano resistenza acquisita, con conseguente progressione della malattia.

La berberina ha mostrato la capacità di aumentare la sensibilità delle cellule tumorali polmonari ad alcuni farmaci antitumorali. In particolare, la combinazione con doxorubicina ha evidenziato effetti rilevanti. Zhu et al. hanno dimostrato che la berberina sopprime la proliferazione cellulare, induce apoptosi e inibisce la formazione di sferoidi tumorali attraverso la downregulation di STAT3. Inoltre, la molecola aumenta la sensibilità delle cellule tumorali alla doxorubicina proprio attraverso la soppressione di questa via di segnalazione.

STAT3 è una proteina coinvolta nella sopravvivenza cellulare, nella proliferazione, nell'infiammazione e nella resistenza farmacologica. La sua inibizione può quindi aumentare

l'efficacia della chemioterapia e ridurre la capacità delle cellule tumorali di adattarsi allo stress farmacologico.

Un ulteriore aspetto riguarda la modulazione dei neutrofili. La doxorubicina può favorire un microambiente immunosoppressivo, associato all'aumento del fenotipo neutrofilo N2 e alla produzione di citochine Th2, come TGF- β 1, IL-6 e IL-10. La berberina contribuisce invece a mantenere il fenotipo N1, più favorevole alla risposta antitumorale, e riduce l'immunosoppressione indotta dal trattamento.

La berberina ha mostrato effetti sinergici anche con farmaci a bersaglio molecolare. In combinazione con gefitinib, essa riduce crescita e motilità cellulare, induce apoptosi e modula l'asse HOTAIR/miR-34a-5p, con conseguente riduzione dei marcatori dell'EMT. In associazione con icotinib, invece, la molecola favorisce la degradazione autofagica di EGFR e contribuisce a superare la resistenza al trattamento.

6.10 Limiti della berberina non formulata nel trattamento del carcinoma polmonare

Nonostante i numerosi effetti antitumorali osservati, l'impiego della berberina libera nel carcinoma polmonare presenta limiti importanti. La scarsa solubilità acquosa, la bassa biodisponibilità orale, il ridotto uptake cellulare e l'efflusso mediato dalla glicoproteina P riducono la concentrazione effettiva della molecola nel sito tumorale.

Inoltre, dopo somministrazione endovenosa, la berberina può andare incontro a rapida clearance, formazione di aggregati e distribuzione tissutale disomogenea [165]. Questi aspetti limitano la possibilità di ottenere concentrazioni terapeuticamente efficaci nel microambiente tumorale.

Per superare tali criticità, la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di sistemi nanoparticellari in grado di migliorare la stabilità della molecola, favorirne l'accumulo nel tumore e ridurre gli effetti indesiderati sistemici. Le nanoformulazioni possono infatti aumentare la biodisponibilità, proteggere la berberina dalla degradazione, migliorarne l'uptake cellulare e consentire strategie di targeting tumorale.

6.11 Considerazioni conclusive sull'efficacia nel carcinoma polmonare

La berberina esercita nel carcinoma polmonare un'azione antitumorale ampia e multifattoriale. Essa è in grado di inibire la proliferazione cellulare, indurre apoptosi, modulare l'autofagia, ridurre angiogenesi e metastatizzazione, influenzare il microambiente tumorale e aumentare la sensibilità ai trattamenti convenzionali.

Questi effetti derivano dalla capacità della molecola di modulare numerose vie di segnalazione coinvolte nella progressione tumorale, tra cui HIF-1 α /VEGF, NF- κ B/COX-2, PI3K/AKT, Raf/MEK/ERK, ROS/ASK1/JNK, STAT3, EGFR e PD-L1.

Tuttavia, le caratteristiche farmacocinetiche sfavorevoli della berberina libera ne limitano ancora la traduzione clinica. Per questo motivo, l'impiego di nanoformulazioni rappresenta una prospettiva fondamentale per valorizzare il potenziale terapeutico della molecola nel carcinoma polmonare. Nel capitolo successivo verranno quindi approfondite le principali nanoformulazioni della berberina sviluppate in ambito oncologico, con particolare attenzione ai sistemi polimerici, lipidici, metallici e multifunzionali.

CAPITOLO 7

LIMITI ATTUALI E PROSPETTIVE FUTURE DELLE NANOFORMULAZIONI DELLA BERBERINA

Negli ultimi due decenni la ricerca scientifica ha dimostrato come la berberina possieda un considerevole potenziale terapeutico in numerosi ambiti patologici, inclusi i disordini metabolici, le malattie cardiovascolari, le patologie infiammatorie croniche e il cancro. In particolare, gli studi condotti nel settore oncologico hanno evidenziato la capacità della molecola di modulare simultaneamente molteplici pathway cellulari coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza e nella diffusione delle cellule tumorali.

Nonostante questi risultati incoraggianti, la traslazione clinica della berberina rimane ancora limitata. La maggior parte delle evidenze disponibili deriva infatti da studi in vitro o da sperimentazioni condotte su modelli animali, mentre il numero di studi clinici controllati rimane relativamente ridotto. Sebbene le nanotecnologie abbiano consentito di superare molte delle limitazioni farmacocinetiche della molecola, persistono ancora numerose problematiche che devono essere affrontate prima che le nanoformulazioni della berberina possano essere introdotte stabilmente nella pratica clinica.

L'analisi critica di tali limitazioni risulta fondamentale per comprendere lo stato attuale della ricerca e individuare le future direzioni di sviluppo.

7.1 Limiti intrinseci della berberina

Il primo limite riguarda la stessa molecola di berberina. Nonostante l'ampio spettro di attività biologiche documentate, la sua farmacocinetica continua a rappresentare una delle principali criticità.

La scarsa solubilità acquosa della berberina riduce significativamente la quota disponibile per l'assorbimento intestinale. Parallelamente, la limitata permeabilità attraverso l'epitelio gastrointestinale, l'efflusso mediato dalla glicoproteina P e l'intenso metabolismo di primo passaggio contribuiscono ulteriormente alla riduzione della biodisponibilità sistemica [166,167].

Anche quando vengono utilizzate formulazioni avanzate, il comportamento biologico della molecola può risultare influenzato da variabili fisiologiche difficilmente controllabili, tra cui la composizione del microbiota intestinale, il pH gastrointestinale, la presenza di alimenti, le differenze genetiche individuali e la funzionalità epatica.

Questi fattori possono generare una significativa variabilità interindividuale nella risposta terapeutica, rendendo difficile la definizione di protocolli terapeutici standardizzati.

7.2 Limiti delle evidenze precliniche

Uno dei principali problemi della letteratura scientifica attualmente disponibile riguarda la predominanza di studi preclinici.

La maggior parte dei lavori pubblicati ha infatti utilizzato linee cellulari tumorali o modelli animali. Sebbene questi studi siano fondamentali per comprendere i meccanismi molecolari della berberina, essi non sempre riflettono fedelmente la complessità biologica osservata nei pazienti.

Le linee cellulari utilizzate nei laboratori rappresentano modelli semplificati che non riproducono completamente il microambiente tumorale umano. Analogamente, i modelli murini presentano differenze fisiologiche, immunologiche e metaboliche rispetto all'uomo.

Di conseguenza, risultati estremamente promettenti ottenuti in vitro o in vivo su animali potrebbero non tradursi necessariamente nella stessa efficacia clinica.

Un ulteriore limite riguarda le concentrazioni utilizzate negli studi sperimentali. In molti casi, le dosi di berberina impiegate nei modelli cellulari risultano significativamente superiori a quelle realisticamente raggiungibili nei tessuti umani mediante somministrazione convenzionale.

Questo aspetto evidenzia ulteriormente l'importanza dello sviluppo di sistemi di drug delivery capaci di aumentare la concentrazione del farmaco direttamente nel sito patologico.

7.3 Criticità delle nanoformulazioni attualmente disponibili

Sebbene le nanoformulazioni abbiano migliorato notevolmente le proprietà biofarmaceutiche della berberina, esse presentano ancora diverse criticità tecnologiche.

Uno dei problemi più rilevanti riguarda la riproducibilità della produzione su larga scala. Molte formulazioni sviluppate in laboratorio vengono preparate in piccole quantità mediante metodiche difficilmente trasferibili alla produzione industriale.

Parametri quali dimensione particellare, indice di polidispersione, efficienza di incapsulamento e potenziale zeta possono infatti variare significativamente durante il passaggio dalla scala di laboratorio alla scala industriale.

Un altro limite riguarda la stabilità delle formulazioni. Alcuni sistemi nanoparticellari tendono ad aggregarsi durante la conservazione oppure possono subire modificazioni strutturali che alterano il rilascio del farmaco.

Nel caso delle nanoparticelle lipidiche, ad esempio, possono verificarsi fenomeni di espulsione del principio attivo dalla matrice lipidica nel tempo.

Anche i sistemi liposomiali possono andare incontro a instabilità fisica, perdita del contenuto farmacologico o fusione delle vescicole durante la conservazione.

Questi aspetti rendono necessaria un'attenta ottimizzazione dei processi formulativi e delle condizioni di conservazione.

7.4 Problematiche legate alla sicurezza

La sicurezza rappresenta uno degli aspetti più importanti nello sviluppo di qualsiasi nanomedicina. Sebbene molti materiali utilizzati per la formulazione della berberina, come chitosano, fosfolipidi e PLGA, siano generalmente considerati biocompatibili, l'interazione tra nanoparticelle e organismo umano è estremamente complessa.

Le nanoparticelle possono infatti accumularsi in organi come fegato, milza, polmoni e reni. In alcuni casi, una permanenza prolungata potrebbe determinare effetti tossici ancora non completamente compresi.

Particolare attenzione deve essere rivolta alle nanoparticelle metalliche. Sebbene esse abbiano mostrato risultati promettenti nel trattamento del carcinoma polmonare, il loro impiego solleva interrogativi riguardanti la possibile tossicità a lungo termine, la biodistribuzione e la capacità di accumulo nei tessuti.

Anche le nanostrutture carboniose, come fullerene e nanotubi di carbonio, richiedono ulteriori studi tossicologici prima di poter essere considerate pienamente sicure per l'impiego clinico.

Pertanto, la valutazione della sicurezza rappresenta ancora uno dei principali ostacoli alla diffusione clinica delle nanoformulazioni della berberina.

7.5 Mancanza di studi clinici su larga scala

Uno degli aspetti più critici riguarda la scarsità di studi clinici randomizzati e controllati.

Attualmente, la maggior parte delle evidenze relative alle nanoformulazioni della berberina deriva da studi preclinici o da sperimentazioni cliniche preliminari condotte su un numero limitato di pazienti.

Mancano ancora studi multicentrici di ampia scala capaci di dimostrare in maniera definitiva:

- l'efficacia clinica;
- la sicurezza a lungo termine;
- il dosaggio ottimale;

- le possibili interazioni farmacologiche;
- il reale vantaggio rispetto alle terapie convenzionali.

Senza queste informazioni risulta difficile ottenere l'approvazione regolatoria da parte delle autorità competenti e introdurre tali sistemi nella pratica clinica quotidiana.

7.6 Personalizzazione della terapia e medicina di precisione

Una delle prospettive più interessanti per il futuro riguarda l'integrazione delle nanoformulazioni della berberina con i principi della medicina personalizzata.

L'eterogeneità biologica dei tumori rappresenta una delle principali cause di fallimento terapeutico. Pazienti affetti dalla stessa neoplasia possono infatti presentare profili genetici, metabolici e immunologici profondamente differenti.

Le future piattaforme nanotecnologiche potrebbero essere progettate per adattarsi alle caratteristiche biologiche specifiche di ciascun paziente, migliorando la selettività terapeutica e riducendo gli effetti collaterali.

In questo contesto, lo sviluppo di nanocarrier funzionalizzati con anticorpi, peptidi o ligandi specifici potrebbe consentire il riconoscimento selettivo delle cellule tumorali e il rilascio mirato della berberina direttamente nel tessuto neoplastico.

7.7 Sistemi intelligenti e rilascio controllato

Le moderne nanotecnologie stanno progressivamente evolvendo verso sistemi di rilascio intelligenti, capaci di rispondere a specifici stimoli biologici o fisici.

Tra gli approcci più promettenti vi sono nanoparticelle sensibili:

- al pH;
- alla temperatura;
- agli enzimi;
- alla luce;
- ai campi magnetici.

Nel caso della berberina, tali sistemi potrebbero consentire il rilascio del farmaco esclusivamente all'interno del microambiente tumorale, caratterizzato da condizioni biochimiche differenti rispetto ai tessuti sani.

Questa strategia potrebbe aumentare significativamente l'efficacia terapeutica e ridurre la tossicità sistemica.

Particolarmente interessante risulta l'associazione tra berberina e terapia fotodinamica. Le recenti nanoformulazioni multifunzionali descritte nell'articolo 3 dimostrano come sia possibile combinare il trasporto del farmaco con approcci terapeutici innovativi basati sulla generazione controllata di specie reattive dell'ossigeno.

7.8 Applicazioni future in oncologia

In ambito oncologico, le prospettive future appaiono particolarmente promettenti.

Le evidenze disponibili suggeriscono che la berberina possa essere utilizzata non soltanto come agente antitumorale diretto, ma anche come molecola adiuvante in grado di aumentare l'efficacia di chemioterapia, radioterapia e immunoterapia.

L'integrazione tra berberina e farmaci antitumorali convenzionali potrebbe consentire:

- la riduzione dei dosaggi;
- la diminuzione degli effetti collaterali;
- il superamento di alcuni meccanismi di resistenza;
- il miglioramento della risposta terapeutica complessiva.

Inoltre, la capacità della berberina di modulare il microambiente tumorale e la risposta immunitaria la rende particolarmente interessante nell'era dell'immunoterapia.

La possibilità di associare nanoformulazioni della berberina a inibitori dei checkpoint immunitari rappresenta uno dei filoni di ricerca più promettenti per i prossimi anni.

7.9 Considerazioni finali

Le nanoformulazioni della berberina rappresentano una delle applicazioni più interessanti della moderna tecnologia farmaceutica. I progressi ottenuti negli ultimi anni hanno dimostrato che è possibile superare molte delle limitazioni farmacocinetiche che ne ostacolavano l'impiego clinico. Tuttavia, numerose sfide rimangono ancora aperte. La necessità di migliorare la stabilità delle formulazioni, garantire la sicurezza a lungo termine, sviluppare processi produttivi scalabili e ottenere solide evidenze cliniche rappresenta il principale obiettivo della ricerca futura.

Nonostante tali limitazioni, le prospettive appaiono estremamente incoraggianti. L'integrazione tra nanotecnologie, medicina di precisione e terapie oncologiche avanzate potrebbe trasformare la berberina da semplice composto naturale di interesse farmacologico a vera e propria piattaforma terapeutica innovativa per il trattamento di numerose patologie, con particolare riferimento al carcinoma polmonare.

CONCLUSIONI

La berberina rappresenta uno dei fitocomposti più promettenti attualmente oggetto di studio nel campo della ricerca farmacologica e farmaceutica. L'interesse nei confronti di questa molecola deriva dalla sua capacità di esercitare molteplici attività biologiche e terapeutiche attraverso la modulazione simultanea di numerosi bersagli molecolari coinvolti nei processi fisiopatologici di diverse malattie. Le evidenze scientifiche raccolte nel corso degli ultimi decenni hanno dimostrato che la berberina possiede proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie, antiossidanti, ipoglicemizzanti, ipolipemizzanti e, soprattutto, antitumorali.

Nonostante il notevole potenziale farmacologico, la traslazione clinica della berberina è stata per lungo tempo ostacolata dalle sue sfavorevoli caratteristiche biofarmaceutiche. La ridotta solubilità acquosa, la limitata permeabilità intestinale, l'efflusso mediato dalla glicoproteina P e l'intenso metabolismo di primo passaggio determinano infatti una biodisponibilità orale estremamente bassa, generalmente inferiore all'1%. Questi limiti hanno rappresentato il principale ostacolo all'utilizzo terapeutico della molecola e hanno reso necessario lo sviluppo di strategie innovative finalizzate a migliorarne l'assorbimento e la distribuzione sistemica.

In questo contesto, le nanotecnologie farmaceutiche hanno aperto prospettive particolarmente interessanti. Le diverse strategie di drug delivery sviluppate negli ultimi anni hanno dimostrato che la biodisponibilità della berberina può essere significativamente migliorata attraverso l'impiego di sistemi avanzati capaci di proteggerla dalla degradazione, favorirne il trasporto attraverso le membrane biologiche e aumentarne la permanenza nei tessuti bersaglio. Tra questi, le nanoparticelle polimeriche a base di chitosano hanno assunto un ruolo di primo piano grazie alle loro favorevoli caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità, mucoadesività e capacità di promuovere l'assorbimento intestinale del farmaco.

I risultati ottenuti con le nanoparticelle di chitosano hanno evidenziato un miglioramento significativo delle proprietà biofarmaceutiche della berberina. L'aumento della stabilità gastrointestinale, il miglioramento del coefficiente di ripartizione, la protezione del principio attivo e l'incremento della biodisponibilità confermano il valore di questo approccio tecnologico. Tali risultati dimostrano come la progettazione razionale di sistemi di rilascio possa trasformare una molecola caratterizzata da importanti limitazioni farmacocinetiche in un candidato terapeutico molto più efficace.

Particolarmente rilevante è emerso il ruolo della berberina nel trattamento delle patologie oncologiche. Le evidenze disponibili indicano che questa molecola è in grado di interferire con numerosi processi fondamentali della progressione tumorale. Attraverso la modulazione di pathway coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi, nell'autofagia, nell'angiogenesi,

nella metastatizzazione e nella risposta immunitaria, la berberina esercita un'attività antitumorale complessa e multifattoriale. Questa caratteristica la distingue da molte terapie convenzionali, spesso dirette verso un singolo bersaglio molecolare, e la rende particolarmente interessante nel trattamento di neoplasie caratterizzate da elevata eterogeneità biologica.

Tra i diversi ambiti applicativi, il carcinoma polmonare rappresenta probabilmente uno dei contesti in cui il potenziale della berberina appare più evidente. Le numerose evidenze sperimentali raccolte dimostrano che la molecola è in grado di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali polmonari, promuovere l'apoptosi, inibire l'angiogenesi, contrastare la transizione epitelio-mesenchimale e limitare la capacità metastatica delle cellule neoplastiche. Inoltre, la capacità della berberina di modulare il microambiente tumorale e di aumentare la sensibilità delle cellule ai trattamenti convenzionali suggerisce un possibile ruolo come agente adiuvante nelle strategie terapeutiche integrate.

Un ulteriore aspetto di grande interesse riguarda la capacità della berberina di influenzare la risposta immunitaria antitumorale. La modulazione di PD-L1, l'interferenza con le cellule immunosoppressive e la regolazione di diversi mediatori infiammatori suggeriscono che questa molecola possa contribuire non solo all'inibizione diretta della crescita tumorale, ma anche al ripristino di una risposta immunitaria più efficace contro il tumore. Tali proprietà risultano particolarmente rilevanti nell'attuale panorama oncologico, caratterizzato da una crescente integrazione tra immunoterapia e approcci terapeutici convenzionali.

Nonostante i risultati incoraggianti, è necessario sottolineare che gran parte delle evidenze disponibili deriva ancora da studi preclinici. Sebbene i modelli cellulari e animali abbiano consentito di chiarire molti dei meccanismi d'azione della berberina, la loro trasposizione alla pratica clinica richiede ulteriori approfondimenti. La mancanza di studi clinici multicentrici di ampia scala rappresenta attualmente uno dei principali limiti allo sviluppo terapeutico della molecola e delle sue nanoformulazioni. Sarà pertanto necessario consolidare le evidenze cliniche attraverso sperimentazioni controllate che consentano di definire dosaggi ottimali, profili di sicurezza e reali benefici terapeutici nei pazienti.

Le prospettive future appaiono tuttavia estremamente promettenti. L'evoluzione delle nanotecnologie, l'introduzione di sistemi di rilascio intelligenti e l'integrazione con i principi della medicina personalizzata potrebbero consentire lo sviluppo di piattaforme terapeutiche sempre più selettive ed efficaci. In particolare, l'associazione della berberina con nanocarrier multifunzionali, sistemi di targeting tumorale, immunoterapia e terapia fotodinamica rappresenta uno dei filoni di ricerca più innovativi e potenzialmente rivoluzionari nel panorama della nanomedicina oncologica.

Alla luce delle evidenze analizzate, è possibile concludere che la berberina rappresenta una molecola di straordinario interesse scientifico e farmacologico. Le sue molteplici attività biologiche, unite ai progressi ottenuti nel campo delle nanotecnologie farmaceutiche, suggeriscono che essa possa assumere in futuro un ruolo sempre più rilevante nel trattamento di numerose patologie, in particolare in ambito oncologico. Sebbene siano ancora necessari ulteriori studi per completarne il percorso di sviluppo clinico, la berberina e le sue nanoformulazioni costituiscono oggi uno degli esempi più significativi di come l'integrazione tra prodotti naturali e tecnologie farmaceutiche avanzate possa aprire nuove prospettive per la medicina del futuro.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Patwardhan, B.; Vaidya, A.D.B.; Chorghade, M. Ayurveda and natural products drug discovery. *Curr. Sci.*, **2004**, *86*, 6-25.
- 2) Tillhon, M.; Guamán Ortiz, L.M.; Lombardi, P.; Scovassi, A.I. Berberine: new perspectives for old remedies. *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, *84*(10), 1260-1267.
- 3) Cicero, A.F.; Baggioni, A. Berberine and its role in chronic disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2016**, *928*, 27-45.
- 4) K. Hayashi, K. Minoda, Y. Nagaoka, T. Hayashi, S. Uesato, Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*(6), 1562–1564.
- 5) C.T. Taylor, D.C. Winter, M.M. Skelly, D.P. O'donoghue, G.C. O'sullivan, B. J. Harvey, A.W. Baird, Berberine inhibits ion transport in human colonic epithelia, *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *368*(1), 111–118.
- 6) Y. Jin, D.B. Khadka, W.J. Cho, Pharmacological effects of berberine and its derivatives: a patent update, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*(2), 229–243.
- 7) Battu, S.K.; Repka, M.A.; Maddineni, S.; Chittiboyina, A.G.; Avery, M.A.; Majumdar, S. Physicochemical characterization of berberine chloride: A perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*, **2010**, *11*(3), 1466-1475.
- 8) Bhutada, P.; Mundhada, Y.; Bansod, K.; Dixit, P.; Umathe, S.; Mundhada, D. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. *Epilepsy Behav.*, **2010**, *18*(3), 207-210.
- 9) Kulkarni, S.K.; Dhir, A. Berberine: A plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother. Res.*, **2010**, *24*(3), 317-324.
- 10) Fu, L.; Chen, W.; Guo, W.; Wang, J.; Tian, Y.; Shi, D.; Zhang, X.; Qiu, H.; Xiao, X.; Kang, T.; Huang, W.; Wang, S.; Deng, W. Berberine targets AP-2/hTERT, NF-κB/COX-2, HIF-1α/VEGF and cytochrome-c/caspase signaling to suppress human cancer cell growth. *PLoS One*, **2013**, *8*(7), e69240.
- 11) Hsu, C.-Y., Pallathadka, H., Gupta, J., Ma, H., Al-Shukri, H. H. K., Kareem, A. K., Zwamel, A. H., & Mustafa, Y. F. Berberine and berberine nanoformulations in cancer therapy: Focusing on lung cancer. *Phytotherapy Research*, **2024**, *38*(8), 4336–4350.
- 12) Liu, Y.T.; Hao, H.P.; Xie, H.G.; Lai, L.; Wang, Q.; Liu, C.X.; Wang, G.J. Extensive intestinal first-pass elimination and predominant hepatic distribution of berberine explain its low plasma levels in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **2010**, *38*(10), 1779-1784.

- 13) Chen, W.; Miao, Y.Q.; Fan, D.J.; Yang, S.S.; Lin, X.; Meng, L.K.; Tang, X. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS Pharm-SciTech*, **2011**, 12(2), 705-711.
- 14) W. Chen, Y.Q. Miao, D.J. Fan, S.S. Yang, X. Lin, L.K. Meng, X. Tang, Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats, *AAPS PharmSciTech* **2011**, 12(2), 705–711
- 15) C.S. Liu, Y.R. Zheng, Y.F. Zhang, X.Y. Long, Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability, *Fitoterapia* **2016**, 109, 274–282
- 16) G.Y. Pan, G.J. Wang, X.D. Liu, J.P. Fawcett, Y.Y. Xie, The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption, *J. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 91(4), 193–197
- 17) Chen, W., Miao, Y.-Q., Fan, D.-J., Yang, S.-S., Lin, X., Meng, L.-K., & Tang, X. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech*, **2011**, 12(2), 705–711.
- 18) Liu, C.S.; Zheng, Y.R.; Zhang, Y.F.; Long, X.Y. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. *Fitoterapia*, **2016**, 109, 274-282.
- 19) Spinozzi, S.; Colliva, C.; Camborata, C.; Roberti, M.; Ianni, C.; Neri, F.; Calvarese, C.; Lisotti, A.; Mazzella, G.; Roda, A. Berber-ine and its metabolites: relationship between physicochemical properties and plasma levels after administration to human subjects. *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77(4), 766-772.
- 20) Zhang, X.; Qiu, F.; Jiang, J.; Gao, C.; Tan, Y. Intestinal absorption mechanisms of berberine, palmatine, jateorhizine, and coptisine: Involvement of P-glycoprotein. *Xenobiotica*, **2011**, 41(4), 290-296.
- 21) Lv, X.Y.; Li, J.; Zhang, M.; Wang, C.M.; Fan, Z.; Wang, C.Y.; Chen, L. Enhancement of sodium caprate on intestine absorption and antidiabetic action of berberine. *AAPS PharmSciTech*, **2010**, 11(1), 372-382.
- 22) Zhaojie, M.; Ming, Z.; Shengnan, W.; Xiaojia, B.; Hatch, G.M.; Jingkai, G.; Li, C. Amorphous solid dispersion of berberine with absorption enhancer demonstrates a remarkable hypoglycemic effect via improving its bioavailability. *Int. J. Pharm.*, **2014**, 467(1-2), 50-59.
- 23) Fan, D.; Wu, X.; Dong, W.; Sun, W.; Li, J.; Tang, X. Enhancement by sodium caprate and sodium deoxycholate of the gastrointestinal absorption of berberine chloride in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2013**, 39(9), 1447-1456.
- 24) Chen, W.; Fan, D.; Meng, L.; Miao, Y.; Yang, S.; Weng, Y.; He, H.; Tang, X. Enhancing effects of chitosan and chitosan hydrochloride on intestinal absorption of berberine in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2012**, 38(1), 104-110.

- 25) Cano-Cebrián, M.J.; Zornoza, T.; Granero, L.; Polache, A. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. *Curr. Drug Deliv.*, **2005**, 2(1), 9-22.
- 26) Zhou, S.; Lim, L.Y.; Chowbay, B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab. Rev.*, **2004**, 36(1), 57-104.
- 27) Fu, L.; Liang, Y.; Deng, L.; Ding, Y.; Chen, L.; Ye, Y.; Yang, X.; Pan, Q. Characterization of tetrandrine, a potent inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2004**, 53(4), 349-356.
- 28) Wu, S.H.W.; Hopkins, W.K. Characteristics of D- α -tocopheryl PEG 1000 succinate for applications as an absorption enhancer in drug delivery systems. *Pharm. Technol.*, **1999**, 23, 52-68.
- 29) Cornaire, G.; Woodley, J.; Hermann, P.; Cloarec, A.; Arellano, C.; Houin, G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, **2004**, 278(1), 119-131.
- 30) Di, P.F. Bellone, I.; Rapacioli, G.; Putignano, P. Clinical role of a fixed combination of standardized *Berberis aristata* and *Silybum marianum* extracts in diabetic and hypercholesterolemic patients intolerant to statins. *Diabetes. Metab Syndr Obes Targets Ther*, **2015**, 8, 89-96.
- 31) Shan, Y.Q.; Zhu, Y.P.; Pang, J.; Wang, Y.X.; Song, D.Q.; Kong, W.J.; Jiang, J.D. Tetrandrine potentiates the hypoglycemic efficacy of berberine by inhibiting P-glycoprotein function. *Biol. Pharm. Bull.*, **2013**, 36(10), 1562-1569.
- 32) Shan, Y.Q.; Ren, G.; Wang, Y.X.; Pang, J.; Zhao, Z.Y.; Yao, J.; You, X.F.; Si, S.Y.; Song, D.Q.; Kong, W.J.; Jiang, J.D. Berberine analogue IMB-Y53 improves glucose-lowering efficacy by averting cellular efflux especially P-glycoprotein efflux. *Metabolism*, **2013**, 62(3), 446-456.
- 33) Mujtaba, A.; Ali, M.; Kohli, K. Formulation of extended release cefpodoxime proxetil chitosan-alginate beads using quality by design approach. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, 69, 420-429.
- 34) Zhang, Y.; Liu, H. Development of bioadhesive microspheres for oral bioavailability enhancement of berberine hydrochloride. *Int. J. Polym. Sci.*, **2016**, (3), 1-7.
- 35) Godugu, C.; Patel, A.R.; Doddapaneni, R.; Somagoni, J.; Singh, M. Approaches to improve the oral bioavailability and effects of novel anticancer drugs berberine and betulinic acid. *PLoS One*, **2014**, 9(3), e89919.

- 36) Sahibzada, M.U.K.; Sadiq, A.; Faidah, H.S.; Khurram, M.; Amin, M.U.; Haseeb, A.; Kakar, M. Berberine nanoparticles with enhanced *in vitro* bioavailability: characterization and antimicrobial activity. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2018**, *12*, 303-312.
- 37) Yu, F.; Li, Y.; Chen, Q.; He, Y.; Wang, H.; Yang, L.; Guo, S.; Meng, Z.; Cui, J.; Xue, M.; Chen, X.D. Monodisperse microparticles loaded with the self-assembled berberine-phospholipid complex-based phytosomes for improving oral bioavailability and enhancing hypoglycemic efficiency. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2016**, *103*, 136-148.
- 38) Mujtaba, A.; Hassan, K. Nanotechnology based approach to enhance the potential of chemopreventive agent berberine hydrochloride in cancer therapy. *Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci.*, **2017**, *6*(5), 1-23.
- 39) Liu, X.; Wu, W.Y.; Jiang, B.H.; Yang, M.; Guo, D.A. Pharmacological tools for the development of traditional Chinese medicine. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2013**, *34*(11), 620-628.
- 40) Jia, W.; Li, H.; Zhao, L.; Nicholson, J.K. Gut microbiota: A potential new territory for drug targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*(2), 123-129.
- 41) Tremaroli, V.; Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, **2012**, *489*(7415), 242-249.
- 42) Feng, R.; Shou, J.W.; Zhao, Z.X.; He, C.Y.; Ma, C.; Huang, M.; Fu, J.; Tan, X.S.; Li, X.Y.; Wen, B.Y.; Chen, X.; Yang, X.Y.; Ren, G.; Lin, Y.; Chen, Y.; You, X.F.; Wang, Y.; Jiang, J.D. Transforming berberine into its intestine-absorbable form by the gut microbiota. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 12155.
- 43) Akhter, M.H.; Ahmad, A.; Ali, J.; Mohan, G. Formulation and development of CoQ10-loaded s-SNEDDS for enhancement of oral bioavailability. *J. Pharm. Innov.*, **2014**, *9*(2), 121-131.
- 44) Ahmad, J.; Amin, S.; Singh, S.; Mustafa, G.; Beg, S.; Barkat, M.; Ahmad, F., M.A. Self-nanoemulsifying drug delivery system for improving efficacy of bioactive phytochemicals In: *Nanophytomedicine*; Eds.; Springer: Singapore, **2020**.
- 45) Yu, C.; Gu, P.; Zhang, W.; Qi, N.; Cai, C.; He, H.; Tang, X. Preparation and evaluation of zolmitriptan submicron emulsion for rapid and effective nasal absorption in beagle dogs. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2011**, *37*(12), 1509-1516.
- 46) Balakrishnan, P.; Lee, B.J.; Oh, D.H.; Kim, J.O.; Lee, Y.I.; Kim, D.D.; Jee, J.P.; Lee, Y.B.; Woo, J.S.; Yong, C.S.; Choi, H.G. Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *374*(1-2), 66-72.
- 47) Qi, X.; Wang, L.; Zhu, J. Water-in-oil-in-water double emulsions: an excellent delivery system for improving the oral bioavailability of pidotimod in rats. *J. Pharm. Sci.*, **2011**, *100*(6), 2203-2211.

- 48) Zhu, J.X.; Tang, D.; Feng, L.; Zheng, Z.G.; Wang, R.S.; Wu, A.G.; Duan, T.T.; He, B.; Zhu, Q. Development of self-microemulsifying drug delivery system for oral bioavailability enhancement of berberine hydrochloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2013**, 39(3), 499-506.
- 49) Kuche, K.; Bhargavi, N.; Dora, C.P.; Jain, S. Drug-phospholipid complex-a go through strategy for enhanced oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech*, **2019**, 20(2), 43.
- 50) Yu, F.; Ao, M.; Zheng, X.; Li, N.; Xia, J.; Li, Y.; Li, D.; Hou, Z.; Qi, Z.; Chen, X.D. PEG-lipid-PLGA hybrid nanoparticles loaded with berberine-phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency. *Drug Deliv.*, **2017**, 24(1), 825-833.
- 51) Hadinoto, K.; Sundaresan, A.; Cheow, W.S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2013**, 85(3 Pt A), 427-443.
- 52) Cui, F.; Shi, K.; Zhang, L.; Tao, A.; Kawashima, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release*, **2006**, 114(2), 242-250.
- 53) Sut, S.; Faggian, M.; Baldan, V.; Poloniato, G.; Castagliuolo, I.; Grabnar, I.; Perissutti, B.; Brun, P.; Maggi, F.; Voinovich, D.; Peron, G.; Dall'Acqua, S. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to enhance berberine absorption: An *in vivo* pharmacokinetic study. *Molecules*, **2017**, 22(11), 1921.
- 54) Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 766, 61-68.
- 55) Faggian, M.; Sut, S.; Perissutti, B.; Baldan, V.; Grabnar, I.; Dall'Acqua, S. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: Pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: Possible application in nutraceuticals. *Molecules*, **2016**, 21(11), 1531.
- 56) Engel, A.; Oswald, S.; Siegmund, W.; Keiser, M. Pharmaceutical excipients influence the function of human uptake transporting proteins. *Mol. Pharm.*, **2012**, 9(9), 2577-2581.
- 57) Ma, B.L.; Yang, Y.; Dai, Y.; Li, Q.; Lin, G.; Ma, Y.M. Polyethylene glycol 400 (PEG400) affects the systemic exposure of oral drugs based on multiple mechanisms: Taking berberine as an example. *RSC Adv.*, **2017**, 7, 2435-2442.
- 58) Han, H.K.; Lee, B.J.; Lee, H.K. Enhanced dissolution and bioavailability of biochanin A via the preparation of solid dispersion: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.*, **2011**, 415(1-2), 89-94.

- 59) Pham, C.V.; Cho, C.W. Application of D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 succinate (TPGS) in Transdermal and Topical Drug Delivery Systems (TDDS). *J. Pharm. Investig.*, **2017**, *47*, 111-121.
- 60) Planinšek, O.; Kovačič, B.; Vrečer, F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int. J. Pharm.*, **2011**, *406*(1-2), 41-48.
- 61) Zhang, Z.; Chen, Y.; Deng, J.; Jia, X.; Zhou, J.; Lv, H. Solid dispersion of berberine-phospholipid complex/TPGS 1000/SiO₂: preparation, characterization and *in vivo* studies. *Int. J. Pharm.*, **2014**, *465*(1-2), 306-316.
- 62) Poonia, N.; Kharb, R.; Lather, V.; Pandita, D. Nanostructured lipid carriers: Versatile oral delivery vehicle. *Future Sci. OA*, **2016**, *2*(3), FSO135.
- 63) Andrade, L.M.; de Fátima Reis, C.; Maione-Silva, L.; Anjos, J.L.; Alonso, A.; Serpa, R.C.; Marreto, R.N.; Lima, E.M.; Taveira, S.F. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, *in vitro* release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2014**, *88*(1), 40-47.
- 64) Qi, J.; Zhuang, J.; Lu, Y.; Dong, X.; Zhao, W.; Wu, W. *In vivo* fate of lipid-based nanoparticles. *Drug Discov. Today*, **2017**, *22*(1), 166-172.
- 65) Ogawa-Wong, A.N.; Berry, M.J.; Seale, L.A. Selenium and metabolic disorders: An emphasis on type 2 diabetes risk. *Nutrients*, **2016**, *8*(2), 80.
- 66) Yin, J.; Hou, Y.; Yin, Y.; Song, X. Selenium-coated nanostructured lipid carriers used for oral delivery of berberine to accomplish a synergic hypoglycemic effect. *Int. J. Nanomedicine*, **2017**, *12*, 8671-8680.
- 67) F.M. Galogahi, Y. Zhu, H. An, N.T. Nguyen, Core-shell microparticles: generation approaches and applications, *J. Sci.: Adv. Mater. Devices*. **2020**, *5*(4), 417–435.
- 68) C.Y. Wong, H. Al-Salami, C.R. Dass, Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin, *Int. J. Pharm.* **2018**, *537*(1–2), 223–244.
- 69) A.E. Müderrisoğlu, T. Çomoğlu, An overview of polymeric particulate drug delivery system formulations, *J. Fac. Pharm. Ankara*. **2010**, *39*(4), 343–368.
- 70) D. Zhao, S. Yu, B. Sun, S. Gao, S. Guo, K. Zhao, Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles, *Polymers* **2018**, *10*(4), 462.
- 71) M. Handa, S. Beg, R. Shukla, M.A. Barkat, H. Choudhry, K.K. Singh, Recent advances in lipid-engineered multifunctional nanophytomedicines for cancer targeting, *J. Contr. Release* **2021**, *340*, 48–59.

- 72) Y. Luo, Q. Wang, Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 64, 353–367.
- 73) L. Bugnicourt, C. Ladavière, Interests of chitosan nanoparticles ionically crosslinked with tripolyphosphate for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* **2016**, 60, 1–17.
- 74) T.A. Ahmed, B.M. Aljaeid, Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery, *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, 10, 483.
- 75) Hu, S.; Zhao, R.; Liu, Y.; Chen, J.; Zheng, Z.; Wang, S. Preventive and therapeutic roles of berberine in gastrointestinal cancers. *BioMed Res. Int.*, **2019**, 2019, 6831520.
- 76) Fu, L.; Chen, W.; Guo, W.; Wang, J.; Tian, Y.; Shi, D.; Zhang, X.; Qiu, H.; Xiao, X.; Kang, T.; Huang, W.; Wang, S.; Deng, W. Berberine targets AP-2/hTERT, NF-κB/COX-2, HIF-1α/VEGF and cytochrome-c/caspase signaling to suppress human cancer cell growth. *PLoS One*, **2013**, 8(7), e69240.
- 77) Tan, W.; Li, Y.; Chen, M.; Wang, Y. Berberine hydrochloride: Anticancer activity and nanoparticulate delivery system. *Int. J. Nanomedicine*, **2011**, 6, 1773-1777.
- 78) Mantena, S.K.; Sharma, S.D.; Katiyar, S.K. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3 dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, 5(2), 296-308.
- 79) Yan, K.; Zhang, C.; Feng, J.; Hou, L.; Yan, L.; Zhou, Z.; Liu, Z.; Liu, C.; Fan, Y.; Zheng, B.; Xu, Z. Induction of G1 cell cycle arrest and apoptosis by berberine in bladder cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **2011**, 661(1-3), 1-7.
- 80) James, M.A.; Fu, H.; Liu, Y.; Chen, D.R.; You, M.M.A.J. Dietary administration of berberine or *Phellodendron amurense* extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Mol. Carcinog.*, **2011**, 50(1), 1-7.
- 81) Mittal, A.; Tabasum, S.; Singh, R.P. Berberine in combination with doxorubicin suppresses growth of murine melanoma B16F10 cells in culture and xenograft. *Phytomedicine*, **2014**, 21(3), 340-347.
- 82) Cai, Y.; Xia, Q.; Luo, R.; Huang, P.; Sun, Y.; Shi, Y.; Jiang, W. Berberine inhibits the growth of human colorectal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *J. Nat. Med.*, **2014**, 68(1), 53-62.
- 83) Letasiová, S.; Jantová, S.; Cipák, L.; Múcková, M. Berberine antiproliferative activity *in vitro* and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer Lett.*, **2006**, 239(2), 254-262.

- 84) S.K. Battu, M.A. Repka, S. Maddineni, A.G. Chittiboyina, M.A. Avery, S. Majumdar, Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery, *AAPS PharmSciTech* **2010**, 11(3), 1466–1475.
- 85) X. Feng, A. Sureda, S. Jafari, Z. Memariani, D. Tewari, G. Annunziata, A.Z. Shen, Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics, *Theranostics* **2019**, 9(7), 1923.
- 86) S. Gaba, A. Saini, G. Singh, V. Monga, An insight into the medicinal attributes of berberine derivatives: a review, *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 38, 116143.
- 87) F. Zuo, N. Nakamura, T. Akao, M. Hattori, Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry, *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34(12), 2064–2072.
- 88) Ahmed, T.; Gilani, A.U.H.; Abdollahi, M.; Daglia, M.; Nabavi, S.F.; Nabavi, S.M. Berberine and neurodegeneration: A review of literature. *Pharmacol. Rep.*, **2015**, 67(5), 970-979.
- 89) J. Dostál, S. Man, P. Seckarova, D. Hulova, M. Necas, M. Potacek, R. Marek, Berberine and coptisine free bases, *J. Mol. Struct.* **2004**, 687(1-3), 135–142.
- 90) Qiu, F., Zhu, Z., Kang, N., Piao, S., Qin, G., & Yao, X. Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, **2008**, 36(11), 2159–2165.
- 91) Qiang, X., Xu, L., Zhang, M., Zhang, P., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Y. Demethyleneberberine attenuates non-alcoholic fatty liver disease with activation of AMPK and inhibition of oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2016**, 472(4), 603–609.
- 92) Kumari, S. Investigating the antioxidant and anticancer effect of alkaloids isolated from root extracts of *Berberis aristata*. *Chemical Data Collections*, **2022**, 37, 100805.
- 93) Wang, J.; Wang, L.; Lou, G.H.; Zeng, H.R.; Hu, J.; Huang, Q.W.; Peng, W.; Yang, X.B. *Coptidis rhizoma*: A comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Pharm. Biol.*, **2019**, 57(1), 193-225.
- 94) Desai, A.B.; Shah, K.M.; Shah, D.M. Berberine in treatment of diarrhoea. *Indian Pediatr.*, **1971**, 8(9), 462-465.
- 95) Naruka, B.S.; Sharma, U.; Saxena, S.; Sharma, M.L. Berberine in the treatment of infective diarrhoea of infancy and childhood. *Arch. Child Health*, **1979**, 21, 88-98.
- 96) Chevallier, A. *Encyclopedia of Medicinal Plants. Encycl Med Plants*, 2nd ed; Dorling Kindersley: London, **2001**.

- 97) Kim, S.H.; Shin, D.S.; Oh, M.N.; Chung, S.C.; Lee, J.S.; Oh, K.B. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*(2), 421-424.
- 98) Paterson, G.K.; Mitchell, T.J. The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol.*, **2004**, *12*(2), 89-95.
- 99) Peng, L.; Kang, S.; Yin, Z.; Jia, R.; Song, X.; Li, L.; Li, Z.; Zou, Y.; Liang, X.; Li, L.; He, C.; Ye, G.; Yin, L.; Shi, F.; Lv, C.; Jing, B. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2015**, *8*(5), 5217-5223.
- 100) Kim, S.H.; Shin, D.S.; Oh, M.N.; Chung, S.C.; Lee, J.S.; Oh, K.B. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*(2), 421-424.
- 101) Paterson, G.K.; Mitchell, T.J. The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol.*, **2004**, *12*(2), 89-95.
- 102) Wojtyczka, R.D.; Dziedzic, A.; Kępa, M.; Kubina, R.; KabałDzik, A.; Mularz, T.; Idzik, D. Berberine enhances the antibacterial activity of selected antibiotics against coagulase-negative *Staphylococcus* strains *in vitro*. *Molecules*, **2014**, *19*(5), 6583-6596.
- 103) Zhang, Y.; Li, X.; Zhang, Q.; Li, J.; Ju, J.; Du, N.; Liu, X.; Chen, X.; Cheng, F.; Yang, L.; Xu, C.; Bilal, M.U.; Wei, Y.; Lu, Y.; Yang, B. Berberine hydrochloride prevents postsurgery intestinal adhesion and inflammation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2014**, *349*(3), 417-426.
- 104) Wang, X.; Feng, S.; Ding, N.; He, Y.; Li, C.; Li, M. Antiinflammatory effects of berberine hydrochloride in an lps-induced murine model of mastitis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, **2018**, 5164314.
- 105) Xiao, X.; Zhang, Q.; Feng, K.; Wang, T.; Li, W.; Yuan, T. Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, **2011**, 924851.
- 106) Xie, X.; Li, W.; Lan, T.; Liu, W.; Peng, J.; Huang, K.; Huang, J.; Shen, X.; Liu, P.; Huang, H. Berberine ameliorates hyperglycemia in alloxan-induced diabetic C57BL/6 mice through activation of Akt signaling pathway. *Endocr. J.*, **2011**, *58*(9), 761-768.
- 107) Dong, H.; Wang, N.; Zhao, L.; Lu, F. Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A systemic review and meta-analysis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2012**, *2012*, 591654.
- 108) Jiang, S.J.; Dong, H.; Li, J.B.; Xu, L.J.; Zou, X.; Wang, K.F.; Lu, F.E.; Yi, P. Berberine inhibits hepatic gluconeogenesis via the LKB1-AMPK-TORC2 signaling pathway in streptozotocininduced diabetic rats. *World J. Gastroenterol.*, **2015**, *21*(25), 7777-7785.

- 109) Xia, X.; Yan, J.; Shen, Y.; Tang, K.; Yin, J.; Zhang, Y.; Yang, D.; Liang, H.; Ye, J.; Weng, J. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS One*, **2011**, 6(2), e16556.
- 110) Yin, J.; Ye, J.; Jia, W. Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharm. Sin. B*, **2012**, (4), 327-334.
- 111) Zhang, W.; Xu, Y.C.; Guo, F.J.; Meng, Y.; Li, M.L. Anti-diabetic effects of cinnamaldehyde and berberine and their impacts on retinol-binding protein 4 expression in rats with type 2 diabetes mellitus. *Chin. Med. J. (Engl.)*, **2008**, 121(21), 2124-2128.
- 112) Yin, J.; Hu, R.; Chen, M.; Tang, J.; Li, F.; Yang, Y.; Chen, J. Effects of berberine on glucose metabolism *in vitro*. *Metabolism*, **2002**, 51(11), 1439-1443.
- 113) Wang, Y.; Jia, X.; Ghanam, K.; Beaupaire, C.; Zidichouski, J.; Miller, L. Berberine and plant stanols synergistically inhibit cholesterol absorption in hamsters. *Atherosclerosis*, **2010**, 209(1), 111-117.
- 114) Kim, W.S.; Lee, Y.S.; Cha, S.H.; Jeong, H.W.; Choe, S.S.; Lee, M.R.; Oh, G.T.; Park, H.S.; Lee, K.U.; Lane, M.D.; Kim, J.B. Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2009**, 296(4), E812-E819.
- 115) Wang, Y.; Yi, X.; Ghanam, K.; Zhang, S.; Zhao, T.; Zhu, X. Berberine decreases cholesterol levels in rats through multiple mechanisms, including inhibition of cholesterol absorption. *Metabolism*, **2014**, 63(9), 1167-1177.
- 116) Jia, X.; Chen, Y.; Zidichouski, J.; Zhang, J.; Sun, C.; Wang, Y. Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rats. *Atherosclerosis*, **2008**, 201(1), 101-107.
- 117) He, K.; Kou, S.; Zou, Z.; Hu, Y.; Feng, M.; Han, B.; Li, X.; Ye, X. Hypolipidemic effects of alkaloids from *Rhizoma coptidis* in diet induced hyperlipidemic hamsters. *Planta Med.*, **2016**, 82(8), 690-697.
- 118) Hepatoprotective effects of berberine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Chin Med.*, **2010**, 5, 33.
- 119) Pirillo, A.; Catapano, A.L. Berberine, a plant alkaloid with lipid and glucose-lowering properties: From *in vitro* evidence to clinical studies. *Atherosclerosis*, **2015**, 243(2), 449-461.
- 120) Zhang, Y.; Cui, Y.L.; Gao, L.N.; Jiang, H.L. Effects of β -cyclodextrin on the intestinal absorption of berberine hydrochloride, a P-glycoprotein substrate. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2013**, 59, 363-371.

- 121) Maeng, H.J.; Yoo, H.J.; Kim, I.W.; Song, I.S.; Chung, S.J.; Shim, C.K. P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, **2002**, *91*(12), 2614-2621.
- 122) Zuo, F.; Nakamura, N.; Akao, T.; Hattori, M. Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, *34*(12), 2064-2072.
- 123) Ma, J.Y.; Feng, R.; Tan, X.S.; Ma, C.; Shou, J.W.; Fu, J.; Huang, M.; He, C.Y.; Chen, S.N.; Zhao, Z.X.; He, W.Y.; Wang, Y.; Jiang, J.D. Excretion of berberine and its metabolites in oral administration in rats. *J. Pharm. Sci.*, **2013**, *102*(11), 4181-4192.
- 124) M. Yanat, K. Schro“en, Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging, *React. Funct. Polym.* **2021**, 161, 104849.
- 125) Dongying Zhao, Shuang Yu, Beini Sun, Shuang Gao, Sihan Guo and Kai Zhao Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles *Polymers* **2018**, *10*(4), 462
- 126) X.Z. Shu, K.J. Zhu, The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54*(2), 235–243.
- 127) W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *90*, 21–27.
- 128) S. Naskar, S. Sharma, K. Kuotsu, Chitosan-based nanoparticles: an overview of biomedical applications and its preparation, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *49*, 66–81.
- 129) Y. Zhou, S. Liu, J. Ming, Y. Li, M. Deng, B. He, Sustained release effects of berberine-loaded chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2017**, *43*(10), 1703–1714.
- 130) F. Yu, Y. Li, Q. Chen, Y. He, H. Wang, L. Yang, X.D. Chen, Monodisperse microparticles loaded with the self-assembled berberine-phospholipid complex-based phytosomes for improving oral bioavailability and enhancing hypoglycemic efficiency, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *103*, 136–148.
- 131) S.K. Battu, M.A. Repka, S. Maddineni, A.G. Chittiboyina, M.A. Avery, S. Majumdar, Physicochemical characterization of berberine chloride: a perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery, *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*(3), 1466–1475.

- 132) N. Ghobadi-Oghaz, A. Asoodeh, M. Mohammadi, Fabrication, characterization and in vitro cell exposure study of zein-chitosan nanoparticles for co-delivery of curcumin and berberine, *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, 204, 576–586.
- 133) S. Mahya, J. Ai, S. Shojae, H.A. Khonakdar, G. Darbemamieh, S. Shirian, Berberine loaded chitosan nanoparticles encapsulated in polysaccharide-based hydrogel for the repair of spinal cord, *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 182, 82–90.
- 134) Ayca Gungor Ak, Inci Turan, Hale Sayan Ozacmak, Aysegul Karatas, Chitosan nanoparticles as promising tool for berberine delivery: Formulation, characterization and in vivo evaluation, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2023**, 80, 104203.
- 135) W. Cheng, C. Zhang, W. Chen, H. Yuan, S. Xu, Preparation and in vivo-in vitro evaluation of polydatin-phospholipid complex with improved dissolution and bioavailability, *Int. J. Drug Dev. Res.* **2017**, 9(1), 39–43.
- 136) E. Roger, F. Lagarce, J.P. Benoit, The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules, *Int. J. Pharm.* **2009**, 379 (2), 260–265.
- 137) T. Wang, J. Xue, Q. Hu, M. Zhou, Y. Luo, Preparation of lipid nanoparticles with high loading capacity and exceptional gastrointestinal stability for potential oral delivery applications, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 507, 119–130
- 138) Kim, S., Lee, S. Y., & Cho, H.-J. Berberine and zinc oxide-based nanoparticles for the chemophotothermal therapy of lung adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2018**, 501(3), 765–770.
- 139) Grebinyk, A., Prylutska, S., Grebinyk, S., Evstigneev, M., Krysiuk, I., Skaterna, T.... Matyshevska, O. Antitumor efficiency of the natural alkaloid berberine complexed with C60 fullerene in Lewis lung carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Nanotechnology*, **2021**, 12(1), 1–18.
- 140) An, Y.-W., Jin, H.-T., Yuan, B., Wang, J.-C., Wang, C., & Liu, H.-Q. Research progress of berberine mediated photodynamic therapy. *Oncology Letters*, **2021**, 21(5), 1–10.
- 141) Zheng, C., Luo, W., Liu, Y., Chen, J., Deng, H., Zhou, Z., & Shen, J. Killing three birds with one stone: Multi-stage metabolic regulation mediated by clinically usable berberine liposome to overcome photodynamic immunotherapy resistance. *Chemical Engineering Journal*, **2023**, 454, 140164.
- 142) Pearl, W. G., Selvam, R., Karmenyan, A. V., Perevedentseva, E. V., Hung, S.-C., Chang, H.-H.,... Tuchin, V. V. Berberine mediated fluorescent gold nanoclusters in biomimetic erythrocyte ghosts as a nanocarrier for enhanced photodynamic treatment. *RSC Advances*, **2024**, 14(5), 3321–3334.

- 143) Katiyar, S. K., Meeran, S. M., Katiyar, N., & Akhtar, S. p53 cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo. *Molecular Carcinogenesis*, **2009**, 48(1), 24–37.
- 144) Chen, Q., Hou, Y., Li, D., Ding, Z., Xu, X., Hao, B.,... Fan, L. (2022). Berberine induces non-small cell lung cancer apoptosis via the activation of the ROS/ASK1/JNK pathway. *Annals of Translational Medicine*, **2022**, 10(8), 485.
- 145) Gao, Z., Tan, C., & Sha, R. Berberine promotes A549 cell apoptosis and autophagy via miR-144. *Natural Product Communications*, **2022**, 17(9), 1934578X221124752.
- 146) Chen, P., Dai, C.-H., Shi, Z.-H., Wang, Y., Wu, J.-N., Chen, K.,... Li, J. Synergistic inhibitory effect of berberine and icotinib on non small cell lung cancer cells via inducing autophagic cell death and apoptosis. *Apoptosis*, **2021**, 26(11), 639–656.
- 147) Li, J., Liu, F., Jiang, S., Liu, J., Chen, X., Zhang, S., & Zhao, H. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways. *Oncology Letters*, **2018**, 15(5), 7409–7414.
- 148) Fu, L., Chen, W., Guo, W., Wang, J., Tian, Y., Shi, D.,... Kang, T. Berberine targets AP-2/hTERT, NF- κ B/COX-2, HIF-1 α /VEGF and cytochrome-c/caspase signaling to suppress human cancer cell growth. *PLoS One*, **2013**, 8(7), e69240.
- 149) Peng, P.-L., Hsieh, Y.-S., Wang, C.-J., Hsu, J.-L., & Chou, F.-P. Inhibitory effect of berberine on the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2006**, 214(1), 8–15.
- 150) Qi, H., Xin, L., Xu, X., Ji, X., & Fan, L. Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. *Journal of Translational Medicine*, **2014**, 12(1), 1–10.
- 151) Gu, W., Zhang, M., Gao, F., Niu, Y., Sun, L., Xia, H.,... Du, G. Berberine regulates PADI4-related macrophage function to prevent lung cancer. *International Immunopharmacology*, **2022**, 110, 108965.
- 152) Liu, Y., Liu, X., Zhang, N., Yin, M., Dong, J., Zeng, Q.,... Deng, H. Berberine diminishes cancer cell PD-L1 expression and facilitates antitumor immunity via inhibiting the deubiquitination activity of CSN5. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2020**, 10(12), 2299–2312.
- 153) Zhu, T., Li, L.-L., Xiao, G.-F., Luo, Q.-Z., Liu, Q.-Z., Yao, K.-T., & Xiao, G.-H. Berberine increases doxorubicin sensitivity by suppressing STAT3 in lung cancer. *The American Journal of Chinese Medicine*, **2015**, 43(7), 1487–1502.

- 154) Zhang, S., Zhou, L., Zhang, M., Wang, Y., Wang, M., Du, J.,... Geng, S. Berberine maintains the neutrophil N1 phenotype to reverse cancer cell resistance to doxorubicin. *Frontiers in Pharmacology*, **2020**, 10, 1658.
- 155) Zheng, F., Li, J., Ma, C., Tang, X., Tang, Q., Wu, J.,... Hann, S. S. Novel regulation of miR-34a-5p and HOTAIR by the combination of berberine and gefitinib leading to inhibition of EMT in human lung cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **2020**, 24(10), 5578–5592.
- 156) Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA*, **2021**, 71, 209–249.
- 157) Wang, Z., Kim, J., Zhang, P., Achi, J. M. G., Jiang, Y., & Rong, L. Current therapy and development of therapeutic agents for lung cancer. *Cell Insight*, **2022**, 1, 100015.
- 158) Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, **2018**, 553(7689), 446–454.
- 159) Lin, J. J., & Shaw, A. T. (2016). Resisting resistance: Targeted therapies in lung cancer. *Trends in Cancer*, **2016**, 2(7), 350–364.
- 160) Najafi, M., Goradel, N. H., Farhood, B., Salehi, E., Solhjoo, S., Toolee, H.,...Mortezaee, K. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*, **2019**, 234(5), 5700–5721.
- 161) Zhang, J., Liu, S., Chen, X., Xu, X., & Xu, F. Non-immune cell components in tumor microenvironment influencing lung cancer immunotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2023**, 166, 115336.
- 162) Chen, Q.-Q., Shi, J., Ding, Z., Xia, Q., Zheng, T., Ren, Y.,... Fan, L. Berberine induces apoptosis in non-small-cell lung cancer cells by upregulating miR-19a targeting tissue factor. *Cancer Management and Research*, **2019**, 11, 9005–9015.
- 163) Goradel, N. H., Jahangiri, S., & Negahdari, B. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on angiogenesis in regenerative medicine. *Current Regenerative Medicine Formerly: Recent Patents on Regenerative Medicine*, **2017**, 7(1), 46–53.
- 164) Liu, Y., Liu, X., Zhang, N., Yin, M., Dong, J., Zeng, Q.,... Deng, H. Berberine diminishes cancer cell PD-L1 expression and facilitates antitumor immunity via inhibiting the deubiquitination activity of CSN5. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2020**, 10(12), 2299–2312.
- 165) Ma, X., Zhou, J., Zhang, C.-X., Li, X.-Y., Li, N., Ju, R.-J.,... Mu, L.-M. Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes. *Biomaterials*, **2013**, 34(18), 4452–4465.

- 166)** Kheir, M.M.; Wang, Y.; Hua, L.; Hu, J.; Li, L.; Lei, F.; Du, L. Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48(4), 1105-1110.
- 167)** Li, G.H.; Wang, D.L.; Hu, Y.D.; Pu, P.; Li, D.Z.; Wang, W.D.; Zhu, B.; Hao, P.; Wang, J.; Xu, X.Q.; Wan, J.Q.; Zhou, Y.B.; Chen, Z.T. Berberine inhibits acute radiation intestinal syndrome in human with abdomen radiotherapy. *Med. Oncol.*, **2010**, 27(3), 919-925.
- .