

СИНЕРГЕТИЧНИЙ Й АДИТИВНИЙ ЕФЕКТИ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ІНГІБІТОРІВ ТИРОЗИНАЗИ

Ю.А. Шестеренко^{1*}, І.І. Романовська¹, О.С. Карпенко¹, І.І. Гайдаржи²

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського, Одеса, Україна

²Національний університет "Одеська політехніка", Одеса, Україна

*Corresponding author: yushesterenko@gmail.com

Received 7 August 2023; Accepted 18 October 2023

Проблематика. Надмірне накопичення меланіну в шкірі призводить до низки захворювань і косметологічних проблем. Для зменшення біосинтезу пігменту використовують інгібітори тирозинази, однак більшість із них мають суттєві побічні ефекти. Відомо, що при сумісному застосуванні ліків можуть спостерігатися синергізм, адитивний ефект і антагонізм. Комбіноване лікування декількома інгібіторами тирозинази розглядається як перспективний підхід до зменшення побічних ефектів і підвищення терапевтичної ефективності.

Мета. Дослідження сумісного використання інгібіторів тирозинази для визначення типу їх взаємодії: синергізм, адитивна дія.

Методика реалізації. У роботі використовували тирозиназу, виділену з грибів *Agaricus bisporus*. Інгібування ензиму досліджуваними сполуками визначали, вимірюючи його активність за тирозином (30 хв у 0,05 М Na-фосфатному буферному розчині, рН 6,5, 25 °С). Для вивчення сумісного інгібування розчини сполук змішували попарно в декількох концентраціях. Взаємодію розраховували з використанням комбінаційного індексу та побудови ізоболограм.

Результати. Для визначення впливу сумісної дії речовин на активність тирозинази були обрані як стандартні інгібітори ензиму (койєва кислота, арбутин, фенілтіосечовина), так і виявлений нами 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он. Розрахунок комбінаційного індексу та побудова ізоболограм для всіх досліджених сумішей стандартних інгібіторів тирозинази показали адитивний ефект при одночасному застосуванні в усіх вивчених випадках. Одночасне застосування койєвої кислоти чи арбутину із 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-оном має синергетичний ефект, однак суміш фенілтіосечовини із похідним індолу продемонструвала адитивну дію.

Висновки. Сумісне використання інгібіторів тирозинази в різних комбінаціях показало як адитивний, так і синергетичний ефекти. Синергетичний ефект при одночасному застосуванні двох інгібіторів відкриває широкі можливості для створення більш ефективних, економічних засобів лікування гіперпігментації в результаті зменшення концентрації кожного інгібітора.

Ключові слова: тирозиназа; інгібітори тирозинази; 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он; сумісне застосування; синергізм; адитивна дія.

Вступ

Утворення меланіну в організмі людини виконує важливу роль у захисті від УФ-випромінювання, яке може спричинити тяжкі захворювання (злоякісні новоутворення шкіри) [1], однак надмірне накопичення пігменту призводить до низки захворювань і косметологічних проблем (токсичних і лікарських меланодермій, посттравматичної гіперпігментації, пігментних плям, ластовиння тощо) [2, 3]. Для зменшення біосинтезу меланіну використовують інгібітори тирозинази, ензиму класу оксидоредуктаз (КФ. 1.14.18.1). На сьогодні відомі багато сполук як природного [4, 5], так і синтетичного походження [6], що знижують активність тирозинази, однак лише деякі з них використо-

вуються як ефективні препарати для лікування дерматологічних захворювань, оскільки існуючі інгібітори в низці випадків нестабільні, неекономічні, токсичні, вимагають складних методів синтезу чи виділення з природних об'єктів [7].

Відомо, що при сумісному застосуванні ліків може спостерігатися синергізм, тобто перевищення ефекту, який викликається кожним препаратом окремо, що дає змогу зменшити дози комбінованих препаратів. Крім того, при сумісному застосуванні речовин, що діють на один і той самий рецептор, кінцевий ефект може дорівнювати сумі ефектів окремо застосовуваних препаратів (адитивний ефект) чи зменшитися аж до повного усунення впливу одного із препаратів (антагонізм) [8].

Відносно інгібіторів тирозинази є обмежена кількість даних джерел літератури щодо їх сумісного застосування. Так, Y.C. Hseu зі співавт. було показано, що ліндеранолід В проявляв синергетичний ефект при сумісному застосуванні із койєвою кислотою, фенілтіосечовиною (ФТС) і арбутином, максимальний ефект спостерігався у суміші ліндераноліду В і арбутину [9]. При одночасному застосуванні арбутину й алоезину також був виявлений синергізм у випадку інгібування тирозинази грибів і людини [10]. Значне зменшення концентрації напівмаксимального інгібування активності ензиму (IC_{50}) спостерігалося як для 3-(2,4-дигідроксифеніл)пропіонової, так і для аскорбінової кислоти при їх сумісній дії [11].

Однак при використанні різних сумішей глабридину, ресвератролу, оксиресвератролу та фенілетилрезорцину був виявлений значний антагонізм (субстрат – тирозин) [12]. Аналогічний ефект показала сумісна дія ефірних олій цинамону, лавру і магнолії [13].

На сьогодні комбіноване лікування гіперпігментації шкіри поєднанням інгібіторів тирозинази розглядається як перспективний підхід до зменшення побічних ефектів і підвищення терапевтичної ефективності. Тому метою нашої роботи було дослідження сумісного використання інгібіторів тирозинази для визначення типу їх взаємодії: синергізм, адитивна дія.

Матеріали і методи

У роботі використовували препарат тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*, отриманий згідно з методом [14]. У виділеному препараті ензиму визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [15], вміст іонів купруму [16]. Активність за L-тирозином вимірювали згідно з [17] із деякими модифікаціями: у пробірку, що містила $2,5 \text{ см}^3$ $2,5 \text{ ммоль/дм}^3$ розчину L-тирозину в Na-фосфатному буферному розчині ($0,05 \text{ моль/дм}^3$, рН 6,5), вносили $0,5 \text{ см}^3$ розчину ензиму. Через 5 хв інкубації за $25 \text{ }^\circ\text{C}$ фотометрували при 475 нм у кюветі з довжиною ходу променя 1 см. Нативний електрофорез здійснювали у 10 % ПААГ за методом Орнстейн і Девіс [14].

Інгібування тирозинази досліджували, визначаючи активність ензиму за наявності інгібітора чи суміші інгібіторів. Ступінь інгібування активності тирозинази ($I\%$) визначали за формулою [12]

$$I \% = \frac{(A_2 - A_1) - (B_2 - B_1)}{(A_2 - A_1)} \times 100,$$

де A_1 і A_2 – оптична густина зразка без інгібітора при 475 нм у 0 і через 20 хв відповідно, B_1 і B_2 – оптична густина зразка з інгібітором при 475 нм у 0 і через 20 хв відповідно.

Для дослідження сумісного інгібування розчини інгібіторів змішували попарно в декількох концентраціях. Визначали IC_{50} і IC_{75} – концентрації індивідуальних сполук у суміші, що викликають 50 і 75 % інгібування активності тирозинази відповідно. Далі готували розчин одного з інгібіторів з концентрацією 25, 50 і 75 % від IC_{50} або IC_{75} для цієї сполуки (в кінцевому розчині) та додавали відповідний об'єм другого інгібітора, варіюючи його концентрацію для досягнення IC_{50} і IC_{75} інгібування активності ензиму. Взаємодію розраховували з використанням комбінаційного індексу (CI) згідно з [12]:

$$CI = \frac{IC_{50/75a \text{ мікс.}}}{IC_{50/75a}} + \frac{IC_{50/75b \text{ мікс.}}}{IC_{50/75b}},$$

де $IC_{50/75a}$ і $IC_{50/75b}$ – отримані значення концентрації для кожної сполуки окремо, $IC_{50/75a \text{ мікс.}}$ і $IC_{50/75b \text{ мікс.}}$ – концентрації індивідуальних сполук у суміші, що викликають 50 і 75 % інгібування активності тирозинази. Отримані значення $CI < 0,9$ вказують на синергізм, значення між 0,9 і 1,1 свідчать про адитивну дію, тоді як $CI > 1,1$ характерне для антагонізму [13].

Крім того, для дослідження сумісного інгібування тирозинази комбінацією сполук були побудовані ізоболограми. На осях x і y відкладаються дози двох сполук, необхідні для сумарного досягнення IC_{50} і IC_{75} інгібування активності ензиму [9]. Якщо спостерігається увігнутість кривої – взаємодія синергетична, опукла крива свідчить про антагонізм, лінійна ізобологра показує, що дія речовин є адитивною.

Кінетичні параметри інгібування тирозинази визначали за початковими швидкостями утворення продукту з тирозину з додаванням розчину інгібітора в декількох концентраціях ($1\text{--}4 \text{ мкмоль/дм}^3$). На основі отриманих даних методом Хейнса знаходили максимальну швидкість реакції $V_{\text{макс}}$ і константу Міхаеліса K_M , визначали тип інгібування [18]. Концентрації тирозину становили $0,08\text{--}0,48 \text{ ммоль/дм}^3$. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи t -критерій Стюдента, результати вважали достовірними при $P < 0,05$. Для отриман-

ня стандартних похибок кінетичних констант спочатку визначали значення та стандартні похибки коефіцієнтів лінійної регресії лінеаризованої кінетичної кривої, потім розраховували значення K_M і V_{\max} та їхні стандартні похибки, визначаючи похибки непрямих вимірювань. Константу інгібування визначали за вторинним графіком залежності K_M/V_{\max} від концентрації інгібітора [19].

Результати

Із грибів *Agaricus bisporus* виділений препарат тирозинази з виходом за протеїном 0,82 мг/г грибів, вмістом іонів купруму 0,19 %, питомою активністю 750 од/мг протеїну за хвилину за L-тирозином. Оскільки фенолоксидазна активність вихідного гомогенату грибів становила 15 од/мг протеїну за хвилину, виділений препарат тирозинази очищений у 50 разів. Методом нативного електрофорезу в ПААГ виявлено 17 білкових фракцій, 12 із яких мають виражену фенолоксидазну активність і становлять 92,5 % загального білка [14].

Для визначення впливу сумісної дії речовин на активність тирозинази були обрані як стандартні інгібітори ензиму (койєва кислота, арбутин, ФТС), так й ідентифікований нами новий ефективний інгібітор 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он (похідне індолу), синтез і вивчення його впливу на активність тирозинази детально описано в попередній роботі [20] (рис. 1).

Існує обмежена кількість робіт, що описують похідні індолу як інгібітори тирозинази. Більшість із них значно поступаються 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-ону за своєю інгібуючою здатністю, крім фторпохідних, що мають порівнянну ефективність [21]. Тому дослідження нових сполук цього ряду, вивчення кінетики, типу інгібування дає можливість розширити наші уявлення про речовини, які є ефективними інгібіторами досліджуваного ензиму.

Під час вивчення інгібіторів тирозинази виникає проблема складності порівняння інгібуючої здатності сполук через відмінності в умовах проведення експерименту, чистоті й активності ензиму. Наприклад, IC_{50} для койєвої кислоти у різних авторів коливається від 16,7 до 70 мкмоль/дм³ [22, 23]. Тому в ході дослідження сумісного інгібування тирозинази обраними сполуками для кожної окремо були встановлені значення IC_{50} і IC_{75} (концентрація інгібітора, за якої активність ензиму знижується на 50 і 75 % відповідно) (табл. 1).

Для вивчення впливу одночасного використання двох інгібіторів ензиму обрані сполуки змішували попарно в декількох концентраціях. Взаємодію розраховували з використанням комбінаційного індексу (CI). Отримані значення $CI < 0,9$ вказують на синергізм, значення між 0,9 і 1,1 свідчать про адитивну дію, тоді як $CI > 1,1$ характерне для антагонізму [13].

Досліджено вплив відомих інгібіторів на активність ензиму при сумісному введенні койє-

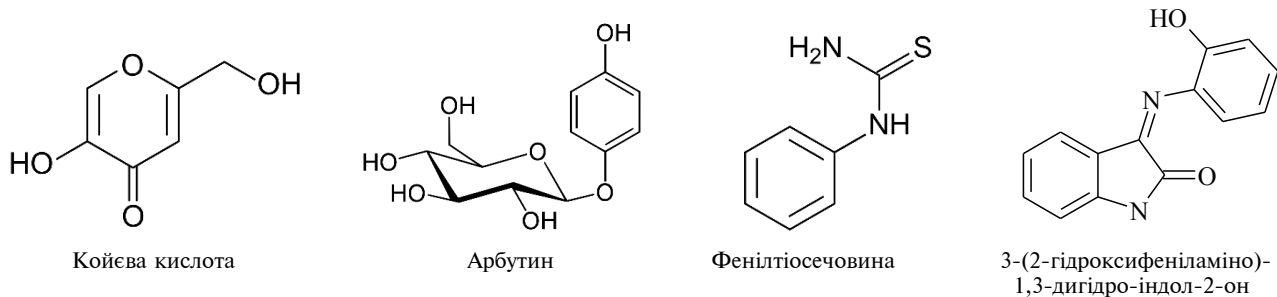


Рисунок 1: Структури використаних у роботі інгібіторів тирозинази

Таблиця 1: IC_{50} і IC_{75} інгібування тирозинази досліджуваними сполуками

Сполука	Концентрація інгібітора, мкмоль/дм ³ *	
	IC_{50}	IC_{75}
Койєва кислота	60,8 ± 1,8	148,4 ± 4,4
Арбутин	180,0 ± 5,3	451,8 ± 13,2
Фенілтіосечовина	6,2 ± 0,2	15,4 ± 0,4
3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он	8,8 ± 0,3	22,1 ± 0,6

Примітки. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; $n = 5$. IC_{50} і IC_{75} – концентрації сполук, що викликають 50 і 75 % інгібування активності тирозинази відповідно.

вої кислоти з арбутином, койевої кислоти з ФТС й арбутину з ФТС. Отримані результати представлені в табл. 2.

Розраховані значення комбінаційного індексу для всіх досліджених сумішей стандартних інгібіторів тирозинази були близькими до 1, що свідчить про адитивний ефект при одночасному застосуванні в усіх вивчених випадках.

У роботі [10] автори дослідження стверджують, що синергетичний ефект інгібування ензиму при сумісному використанні двох сполук наявний, якщо інгібітори мають різний механізм дії, наприклад арбутин – конкурентний інгібітор і алоезин – неконкурентний інгібітор. Вивчені стандартні інгібітори тирозинази койєва кислота, арбутин і ФТС відносяться до конкурентних інгібіторів. Тому для подальших досліджень комбінованої дії інгібіторів був обраний 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он.

Рис. 2 демонструє, що досліджувана сполука відноситься до неконкурентних інгібіторів тирозинази, для яких характерне збереження значення константи Міхаеліса за істотного зменшення максимальної швидкості реакції при вивченні впливу похідного індолу на кінетичні особливості тирозиназного каталізу.

Константа інгібування була визначена шляхом побудови графіка залежності відношення константи Міхаеліса до максимальної швидкості реакції від концентрації інгібітора для чотирьох досліджених концентрацій останнього (рис. 3). Встановлене значення константи інгібування становить 8,48 мкмоль/дм³.

Отримані результати показали, що одночасне застосування койєвої кислоти й арбутину із похідним індолу має синергетичний ефект ($CI < 0,9$), однак вивчення суміші ФТС із похідним індолу виявило адитивну дію (табл. 3).

Таблиця 2: Комбінаційний індекс і тип взаємодії стандартних інгібіторів при сумісному інгібуванні активності тирозинази

Суміш сполук	Значення CI*		Тип взаємодії
	IC ₅₀	IC ₇₅	
Койєва кислота + + арбутін	1,02 ± 0,03	1,03 ± 0,02	Адитивна дія
Койєва кислота + + фенілтіосечовина	1,01 ± 0,04	0,96 ± 0,03	Адитивна дія
Арбутін + фенілтіосечовина	1,01 ± 0,02	1,03 ± 0,03	Адитивна дія

Примітки. * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; $n = 5$, CI – комбінаційний індекс, IC₅₀ і IC₇₅ – концентрації сполук, що викликають 50 і 75 % інгібування активності тирозинази відповідно.

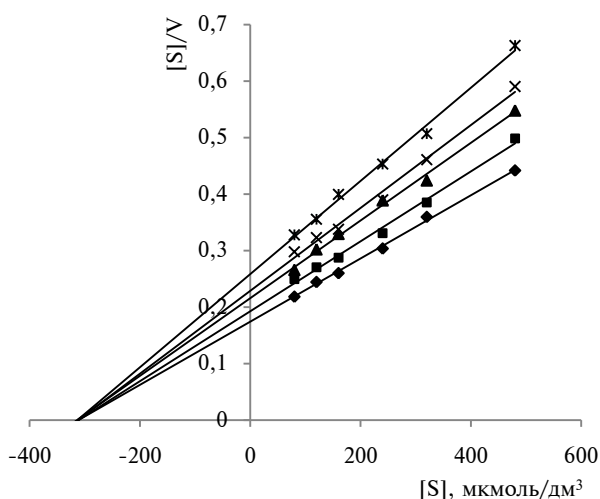


Рисунок 2: Визначення кінетичних параметрів інгібування активності тирозинази за наявності 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-ону за методом Хейнса, за яким відношення початкової концентрації субстрату [S] до швидкості реакції V відкладено залежно від [S]: ♦ – без інгібітора, ■ – 1 мкМ, ▲ – 2 мкМ, × – 3 мкМ, * – 4 мкМ

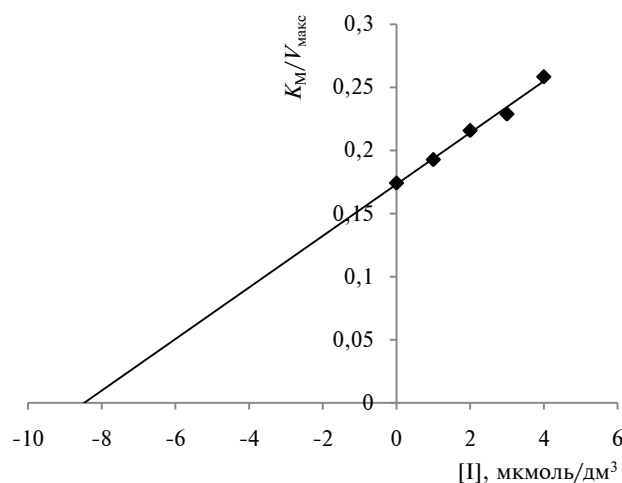


Рисунок 3: Визначення константи інгібування активності тирозинази 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-оном шляхом побудови вторинного графіка (K_M – константа Міхаеліса, V_{\max} – максимальна швидкість реакції, [I] – концентрація інгібітора)

Крім комбінаційного індексу, для визначення ефекту при застосуванні комбінації двох речовин використовують діаграми ізоболі. Відомо, що увігнутість кривої означає, що взаємодія була синергетичною, опукла крива свідчить про антагонізм, лінійна ізобола показує, що дія речовин є адитивною [9].

Досліджено вплив стандартних інгібіторів на активність ензиму при сумісному введенні койєвої кислоти з арбутином, койєвої кислоти з ФТС й арбутину з ФТС шляхом побудови ізобол (рис. 4).

Усі ізоболі представлені у вигляді прямих ліній, що свідчить про адитивний ефект при

Таблиця 3: Комбінаційний індекс і тип взаємодії стандартних інгібіторів і похідного індолу при сумісному інгібуванні активності тирозинази

Суміш сполук	Значення СІ*		Тип взаємодії
	IC ₅₀	IC ₇₅	
Койєва кислота + похідне індолу	0,83±0,02	0,75±0,02	Синергізм
Арбутін + похідне індолу	0,86±0,03	0,80±0,02	Синергізм
Фенілтіосечовина + похідне індолу	1,0±0,03	1,02±0,03	Адитивна дія

Примітки. *P ≤ 0,05 порівняно з контролем; n = 5, СІ – комбінаційний індекс, IC₅₀ і IC₇₅ – концентрації сполук, що викликають 50 і 75 % інгібування активності тирозинази відповідно.

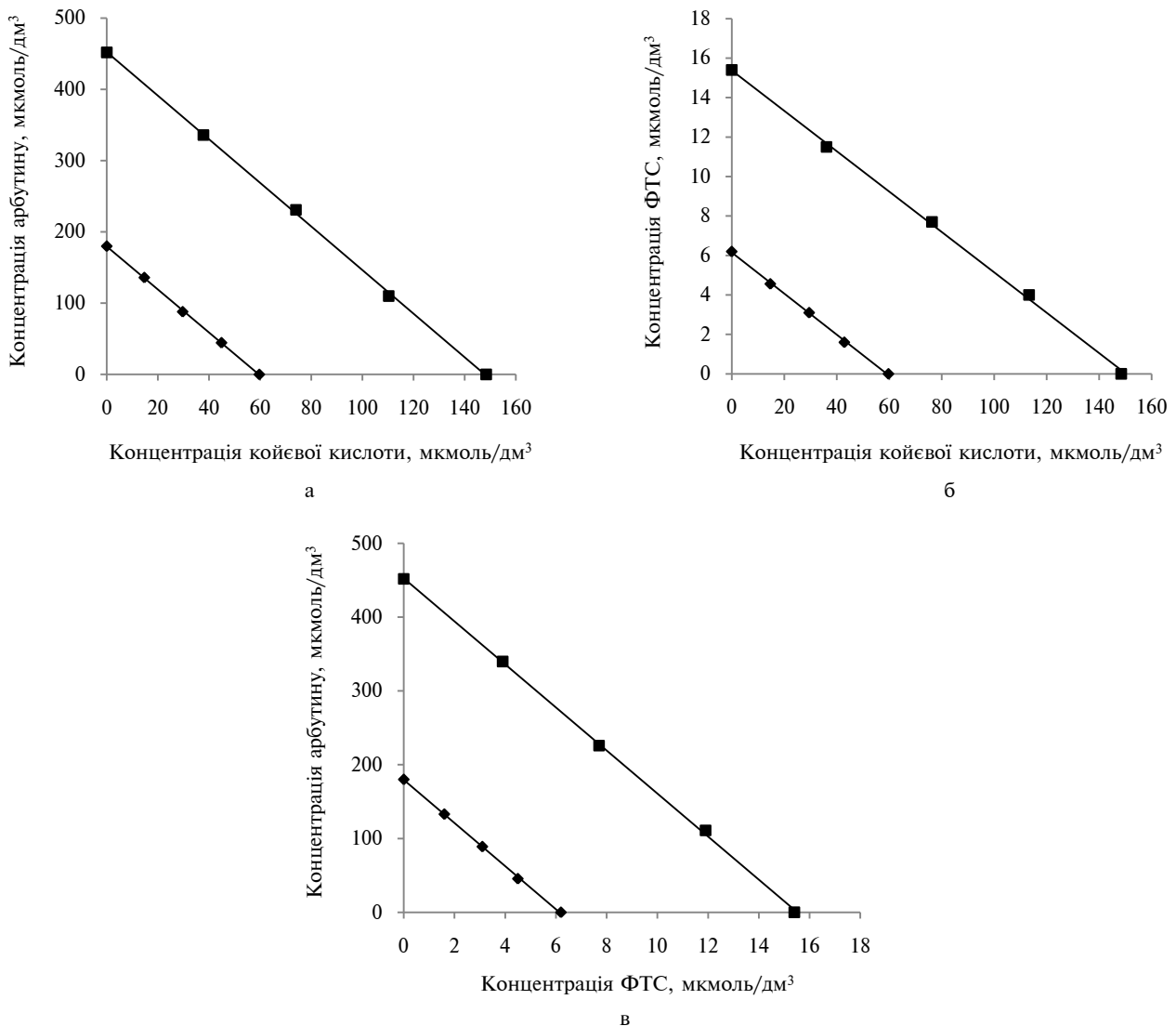


Рисунок 4: Ізоболограми одночасного застосування: (а) койєвої кислоти й арбутину, (б) койєвої кислоти і фенілтіосечовини (ФТС), (в) арбутину і ФТС (IC₅₀ і IC₇₅ – концентрації сполук, що викликають 50 і 75% інгібування активності тирозинази відповідно); ◆ – IC₅₀, ■ – IC₇₅

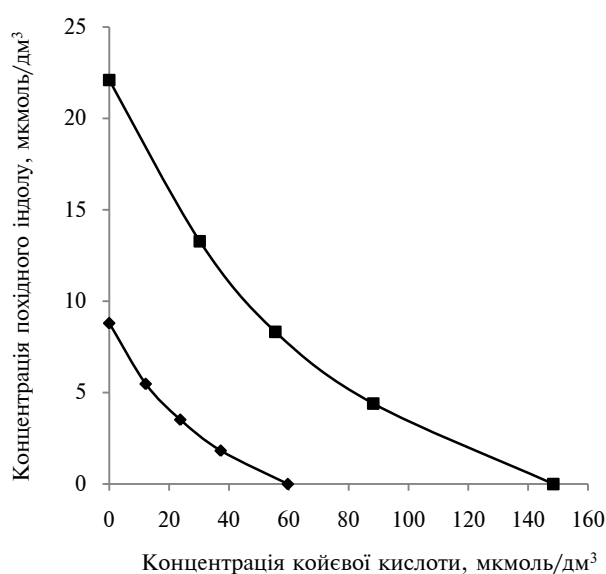
одночасному застосуванні в усіх досліджених випадках, що відповідає даним, отриманим за допомогою комбінаційного індексу.

На рис. 5 представлені результати одночасного застосування нового інгібітора тирозинази 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-ону зі стандартними інгібіторами.

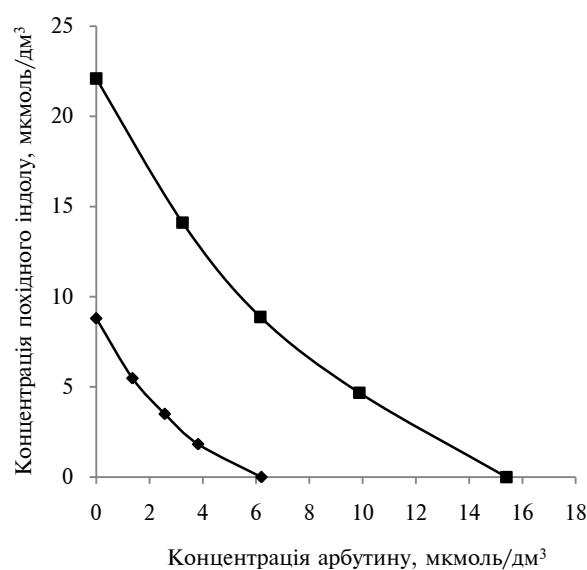
Увігнутість кривих при сумісному застосуванні похідного індолу з койевою кислотою і арбутином свідчить про наявність синергізму в інгібуванні тирозинази для цих сумішей. Однак

у випадку комбінації похідного індолу з ФТС ізоболі представлені у вигляді прямих ліній, що свідчить про адитивний ефект і узгоджується з результатами розрахунку комбінаційного індексу.

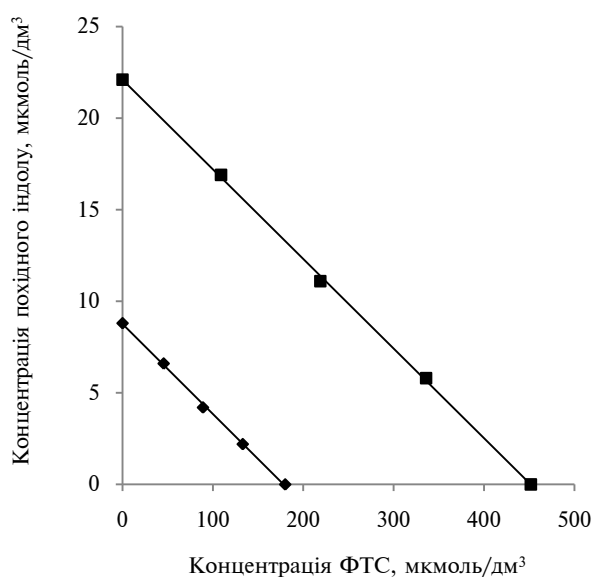
Таким чином, у ході дослідження впливу сумісного використання інгібіторів активності тирозинази (койевої кислоти, арбутину, ФТС і 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-ону в різних комбінаціях були виявлені як адитивний, так і синергетичний ефекти.



а



б



в

Рисунок 5: Ізоболограми одночасного застосування похідного індолу з: (а) койевою кислотою, (б) арбутином, (в) фенілтіосечовиною (ФТС) (IC_{50} і IC_{75} – концентрації сполук, що викликають 50 і 75% інгібування активності тирозинази відповідно); \blacklozenge – IC_{50} , \blacksquare – IC_{75}

Обговорення

Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) – купрумвмісний ензим, що каталізує *o*-гідроксилування монофенолів і окиснення *o*-дифенолів до *o*-хінонів за наявності молекулярного кисню [24]. Тирозиназа є ключовим ензимом біосинтезу меланіну, що є детермінантою кольору шкіри, волосся й очей, а також грає важливу роль у захисті від шкідливого УФ-випромінювання, здатного викликати тяжкі патологічні стани, такі як ракові захворювання шкіри [25]. Разом із тим надмірне накопичення меланіну, що викликає токсичну й лікарську меланодермію, посттравматичну гіперпігментацію, пігментні плями тощо, є важливою сучасною дерматологічною та косметологічною проблемою [2].

Незважаючи на певні успіхи у вивченні інгібіторів тирозинази природного (койєва кислота та її похідні [26], флавоноїди [4, 5], стільбени [27], арбутин [28] тощо) і синтетичного (похідні гідрохінону [29], тріазолу [24], бензойної кислоти [30] тощо) походження, актуальність таких досліджень знаходиться на високому рівні, оскільки існуючі інгібітори в низці випадків нестабільні та вимагають складних методів синтезу чи виділення з природних об'єктів [3, 4].

Тому в цьому дослідженні ми вивчали можливість одночасного застосування двох інгібіторів тирозинази для більш ефективного лікування гіперпігментації.

Незважаючи на широкий діапазон молекулярних мас тирозиназ різних організмів, їхні активні центри є дуже подібними структурно, і, відповідно, їх специфічність до субстратів і до інгібіторів є досить близькою. Тому для вивчення інгібування тирозинази в сучасних наукових дослідженнях зазвичай обирають доступну тирозиназу *Agaricus bisporus* замість тирозинази людини [24, 31, 32].

Синергізм при сумісному застосуванні двох сполук сприяє зниженню дози обох інгібіторів, наприклад для 3-(2,4-дигідроксифеніл)пропіонової й аскорбінової кислот [11], що зменшує побічні ефекти. Однак при взаємодії кількох речовин може спостерігатися і протилежне явище – антагонізм, тому для багатьох лікарських засобів дуже прискіпливо вивчається їх взаємодія з іншими препаратами та навіть їжею.

У нашій роботі для дослідження впливу одночасного використання двох сполук на активність тирозинази ми обрали відомі інгібіто-

ри: койєву кислоту, арбутин, ФТС і знайдений нами новий ефективний інгібітор 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он.

Одним із методів дослідження сумісного використання двох речовин є розрахунок комбінаційного індексу. Значення $CI < 0,9$ вказують на синергізм, значення між 0,9 і 1,1 свідчать про адитивну дію, тоді як $CI > 1,1$ характерне для антагонізму [13].

Перспективним методом визначення ефекту при застосуванні комбінації двох речовин є побудова діаграми ізоболі [9]. Якщо спостерігається увігнутість ізоболі, це означає, що взаємодія була синергетичною, опукла крива свідчить про антагонізм, лінійна ізоболоа показує, що дія речовин є адитивною.

Слід відзначити, що розрахунок комбінаційного індексу та побудова ізоболограм широко використовуються в сучасній науковій літературі для визначення типу взаємодії комбінацій інгібіторів як тирозинази, так і інших ензимів [13, 33–35].

Визначення типу взаємодії койєвої кислоти, арбутину та ФТС показало наявність адитивної дії, тобто ці сполуки можуть використовуватися одночасно, на відміну від глабридину, ресвератролу, оксиресвератролу та фенілетилрезорцину. Так, Y. Wang зі співавт. показали значний антагонізм (CI становить 1,2–2,0) при застосуванні усіх сумішей цих сполук за використання тирозину як субстрату [12]. Також антагонізм виявили Z. You з колегами при дослідженні інгібування тирозинази сумішами ефірних олій цинамону, лавру та магнолії [13].

Y. H. Jin зі співавт. стверджують, що синергетичний ефект інгібування ензиму двома речовинами проявляється, якщо інгібітори мають різний механізм дії. У своїй роботі автори використовували арбутин – конкурентний інгібітор і алоезин – неконкурентний інгібітор і показали синергетичний тип взаємодії [10].

Вивчені стандартні інгібітори тирозинази койєва кислота, арбутин і ФТС відносяться до конкурентних інгібіторів. Тому для подальших досліджень ми обрали неконкурентний інгібітор – 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-он.

Увігнутість кривих ізоболограм при сумісному застосуванні похідного індолу з койєвою кислотою й арбутином свідчить про наявність синергізму в інгібуванні тирозинази для цих сумішей, що підтверджується також значеннями комбінаційного індексу (CI для сумішей із койєвою кислотою й арбутином становили 0,75

і 0,8 відповідно). Однак при комбінації похідного індолу з ФТС ізоболі представлені у вигляді прямих ліній, що свідчить про адитивний ефект і також узгоджується з результатами розрахунку комбінаційного індексу.

Хоча койєва кислота, арбутин і ФТС відносяться до конкурентних інгібіторів, механізм їх дії суттєво різниться. Точних даних про місце зв'язування цих сполук із тирозиназою наразі немає. Лише для ФТС проведений рентгеноструктурний аналіз комплексу з рослинною поліфенолоксидазою катехолоксидазою [36]. Активний центр більшості поліфенолоксидаз дуже консервативний, тому можна припустити наявність гідрофобних і Ван-дер-Ваальсових взаємодій між ФТС і залишками амінокислот тирозинази, крім того, сульфгідрильна група ФТС, вірогідно, замінює гідроксильну групу між двома атомами купруму активного центру.

Койєва кислота є конкурентним інгібітором при окисненні монофенольних субстратів (тирозин), однак при окисненні дифенолів ця сполука виявилася інгібітором змішаного типу. Додатковим внеском койєвої кислоти у зниження синтезу меланіну є відновлення о-ДОФА-хінону, який утворюється в процесі окиснення тирозину, що перешкоджає його внутрішньомолекулярній циклізації в ДОФА-хром [23].

Досі немає одностайної думки, як арбутин зв'язується з тирозиназою. Однак більшість авторів схиляється до того, що ця сполука є так званим "поганим" субстратом ензиму і збільшення концентрації арбутину навіть на декілька порядків не призводить до повного пригнічення активності тирозинази [37]. Такий різний механізм інгібування активності тирозина-

зи койєвою кислотою, арбутином і ФТС, вірогідно, пояснює наявність як синергетичного, так і адитивного типу взаємодії описаними сполуками із неконкурентним інгібітором – 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-оном. Слід підкреслити, що обрані методи досліджень відповідають таким, опублікованим у сучасній науковій літературі, що дали змогу отримати актуальні дані щодо комплексної дії інгібіторів тирозинази з можливістю підвищення ефективності їх дії. Дизайн роботи сприяє вирішенню поставлених завдань.

Висновки

При вивченні впливу сумісного використання інгібіторів тирозинази (койєвої кислоти, арбутину, ФТС та 3-(2-гідроксифеніламіно)-1,3-дигідро-індол-2-ону) у різних комбінаціях показані як адитивний, так і синергетичний ефекти. Різні типи взаємодії інгібіторів, ймовірно, пов'язані з різними механізмами їх зв'язування з ензимом.

Синергетичний ефект при одночасному застосуванні двох інгібіторів тирозинази відкриває широкі можливості для створення більш ефективних засобів лікування гіперпігментації через зменшення концентрації кожного інгібітора. Крім того, відсутність антагонізму не перешкоджає одночасному застосуванню комбінацій усіх досліджених сполук.

Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів до розкриття.

References

- [1] Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):539-49. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x
- [2] Nautiyal A, Wairkar S. Management of hyperpigmentation: Current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34. DOI: 10.1111/pcmr.12986
- [3] Kutlubay Z, Cesur SK, Aşkın Ö, Tüzün Y. The color of skin: brown diseases of the skin, nails, and mucosa. *Clin Dermatol.* 2019;37(5):487-506. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2019.07.007
- [4] El-Nashar HAS, El-Din MIG, Hritcu L, Eldahshan OA. Insights on the Inhibitory Power of Flavonoids on Tyrosinase Activity: A Survey from 2016 to 2021. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26(24). DOI: 10.3390/molecules26247546
- [5] Jakimiuk K, Sari S, Milewski R, Supuran CT, Şıhretöğlü D, Tomczyk M. Flavonoids as tyrosinase inhibitors in in silico and in vitro models: basic framework of SAR using a statistical modeling approach. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2022;37(1):421-30. DOI: 10.1080/14756366.2021.2014832
- [6] Li J, Feng L, Liu L, Wang F, Ouyang L, Zhang L, et al. Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113744. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113744

- [7] Zolghadri S, Beygi M, Mohammad TF, Alijanianzadeh M, Pillaiyar T, Garcia-Molina P, et al. Targeting tyrosinase in hyperpigmentation: Current status, limitations, and future promises. *Biochem Pharmacol.* 2023;212:115574. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115574
- [8] Nanok K, Sansenya S. Combination effects of rice extract and five aromatic compounds against α -glucosidase, α -amylase, and tyrosinase. *J Biosci Biotechnol Eng.* 2021;132(1):9-17. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.02.003
- [9] Hseu YC, Cheng KC, Lin YC, Chen CY, Chou HY, Ma DL, et al. Synergistic effects of linderanolid B combined with arbutin, PTU or kojic acid on tyrosinase inhibition. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015;16(12):1120-6. DOI: 10.2174/1389201016666150907112819
- [10] Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH, et al. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch Pharmacol Res.* 1999;22(3):232-6. DOI: 10.1007/bf02976355
- [11] Chen X, Haniu A, Kashiwagi T, Watanabe H, Watanabe T, Okamoto Y, et al. The evaluation of the synergistic effect of 3-(2,4-dihydroxyphenyl)propionic acid and l-ascorbic acid on tyrosinase inhibition. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2017;72(3-4):119-21. DOI: 10.1515/znc-2016-0095
- [12] Wang Y, Hao MM, Sun Y, Wang LF, Wang H, Zhang YJ, et al. Synergistic promotion on tyrosinase inhibition by antioxidants. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2018;23(1). DOI: 10.3390/molecules23010106
- [13] You Z, Li Y, Chen M, Wong VKW, Zhang K, Zheng X, et al. Inhibition of plant essential oils and their interaction in binary combinations against tyrosinase. *Food Nutr Res.* 2022;66. DOI: 10.29219/fnr.v66.8466
- [14] Romanovska II, Shesterenko YA, Sevast'yanov OV, Osetrov VE, Pashkin IJ. Phenol removal by tyrosinase, immobilized in modified poly-N-vinylpyrrolidone, with inorganic coagulants application. *Int Rev Biophys Chem.* 2011;2:54-60.
- [15] Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972;48(2):422-7. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90094-2
- [16] Stark GR, Dawson CR. Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide. *Anal Chem.* 1958;30(2):191-4. DOI: 10.1021/ac60134a009
- [17] Ikehata K, Nicell JA. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol Prog.* 2000;16(4):533-40. DOI: 10.1021/bp0000510
- [18] Yu L. Inhibitory effects of (S)- and (R)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acids on tyrosinase activity. *J Agric Food Chem.* 2003;51(8):2344-7. DOI: 10.1021/jf0208379
- [19] Shi Y, Chen Q-X, Wang Q, Song K-K, Qiu L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem.* 2005;92(4):707-12. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.031
- [20] Shesterenko AY, Romanovska II, Sevastyanov OV, Karpenko AS. Benzylideneaniline and related compounds as tyrosinase inhibitors. *Odesa Natl Univ Herald Chem.* 2018;23(4):56-63. DOI: 10.18524/2304-0947.2018.4(68).147821
- [21] Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2019;34(1):279-309. DOI: 10.1080/14756366.2018.1545767
- [22] Wibowo JP, Batista FA, van Oosterwijk N, Groves MR, Dekker FJ, Quax WJ. A novel mechanism of inhibition by phenylthiourea on PvdP, a tyrosinase synthesizing pyoverdine of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Biol Macromol.* 2020;146:212-21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.252
- [23] Wang W, Gao Y, Wang W, Zhang J, Yin J, Le T, et al. Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins. *Antioxidants (Basel).* 2022 Mar 4;11(3):502. DOI: 10.3390/antiox11030502
- [24] Mermer A, Demirci S. Recent advances in triazoles as tyrosinase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2023:115655. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115655
- [25] Feng D, Fang Z, Zhang P. The melanin inhibitory effect of plants and phytochemicals: A systematic review. *Phytomedicine.* 2022;107:154449. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154449
- [26] He M, Fan M, Yang W, Peng Z, Wang G. Novel kojic acid-1,2,4-triazine hybrids as anti-tyrosinase agents: Synthesis, biological evaluation, mode of action, and anti-browning studies. *Food Chem.* 2023;419:136047. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136047
- [27] Oyama T, Yoshimori A, Ogawa H, Shirai Y, Abe H, Kamiya T, et al. The structural differences between mushroom and human tyrosinase cleared by investigating the inhibitory activities of stilbenes. *J Mol Struct.* 2023;1272:134180. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134180
- [28] Masyita A, Salim E, Asri RM, Nainu F, Hori A, Yulianty R, et al. Molecular modeling and phenoloxidase inhibitory activity of arbutin and arbutin undecylenic acid ester. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;547:75-81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.006
- [29] Ramsden CA, Riley PA. Mechanistic aspects of the tyrosinase oxidation of hydroquinone. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(11):2463-4. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.04.009

- [30] Nazir Y, Saeed A, Rafiq M, Afzal S, Ali A, Latif M, et al. Hydroxyl substituted benzoic acid/cinnamic acid derivatives: Tyrosinase inhibitory kinetics, anti-melanogenic activity, and molecular docking studies. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;30(1):126722. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.126722
- [31] Kurt BZ, Altundağ Ö, Gökçe M, Cakmak U, Tuncay FO, Kolcuoğlu Y, et al. Synthesis of naproxen thiazazole urea hybrids and determination of their anti-melanoma, anti-migration, tyrosinase inhibitory activity, and molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2023;136618. DOI: 10.1016/j.molstruc.2023.136618
- [32] Zhao Y, Zhang T, Ning Y, Wang D, Li F, Fan Y, et al. Identification and molecular mechanism of novel tyrosinase inhibitory peptides from the hydrolysate of 'Fengdan' peony (*Paeonia ostii*) seed meal proteins: Peptidomics and in silico analysis. *LWT*. 2023;180:114695. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114695
- [33] Wang H, Zhang H, Zhang X, Yin Y, Ding G, Tang X, et al. Identification of coniferyl ferulate as the bioactive compound behind the xanthine oxidase inhibitory activity of Chuanxiong Rhizome. *J Funct Foods*. 2023;100:105378. DOI: 10.1016/j.jff.2022.105378
- [34] Wang Y, Chen L, Liu H, Xie J, Yin W, Xu Z, et al. Characterization of the synergistic inhibitory effect of cyanidin-3-O-glucoside and catechin on pancreatic lipase. *Food Chem*. 2023;404:134672. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134672
- [35] Yin Y, Sun S, Wang H, Guo M, Li Z, Lv C, et al. Mechanism of interaction between urolithin A and α -glucosidase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry, and molecular docking. *J Mol Struct*. 2023;1286:135567. DOI: 10.1016/j.molstruc.2023.135567
- [36] Ryazanova AD, Alekseev AA, Slepneva IA. The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012 Feb;27(1):78-83. DOI: 10.3109/14756366.2011.576010.
- [37] Chandorkar N, Tambe S, Amin P, Madankar C. Alpha arbutin as a skin lightening agent: a review. *Int J Pharmaceut Res*. 2021;13:3502-10. DOI: 10.31838/ijpr/2021.13.02.446

Yu.A. Shesterenko¹, I.I. Romanovska¹, O.S. Karpenko¹, I.I. Gaydarzhi²

¹O.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine, Odesa, Ukraine

²Odesa Polytechnic National University, Odesa, Ukraine

SYNERGIC AND ADDITIVE EFFECTS OF THE COMBINED EFFECT OF TYROSINASE INHIBITORS

Background. Excessive melanin accumulation in the skin can lead to various diseases and cosmetic issues. While tyrosinase inhibitors are commonly used to reduce pigment biosynthesis, many of them are associated with significant side effects. When multiple drugs are used in combination, it can result in synergism, additive effects, or antagonism. Combining multiple tyrosinase inhibitors is considered a promising approach to minimize side effects and enhance therapeutic efficacy.

Objective. This study aims to investigate the combined use of tyrosinase inhibitors to determine the nature of their interaction, whether it's synergistic or additive.

Methods. We utilized tyrosinase isolated from *Agaricus bisporus* mushrooms. Enzyme inhibition by test compounds was assessed by measuring tyrosinase activity using tyrosine (30 min in 0.05 M Na-phosphate buffer solution, pH 6.5, 25 °C). To explore joint inhibition, compound solutions were mixed in pairs at various concentrations. The interaction was quantified using the combination index and isobolograms.

Results. To determine the effect of the combined action of agents on tyrosinase activity, we examined standard inhibitors of the enzyme (kojic acid, arbutin, phenylthiourea) and our discovered compound, 3-(2-hydroxyphenylamino)-1,3-dihydro-indol-2-one. Calculations of the combination index and isobolograms for all studied combinations of standard tyrosinase inhibitors revealed additive effects in all studied cases. Simultaneous use of kojic acid or arbutin with 3-(2-hydroxyphenylamino)-1,3-dihydro-indol-2-one demonstrated a synergistic effect. However, the mixture of phenylthiourea with the indole derivative demonstrated an additive effect.

Conclusions. The combined usage of tyrosinase inhibitors in various combinations displayed both additive and synergistic effects. The synergistic effect of using two inhibitors simultaneously presents significant opportunities for the development of more effective and cost-efficient treatments for hyperpigmentation by reducing the concentration of each inhibitor.

Keywords: tyrosinase; tyrosinase inhibitors; 3-(2-hydroxyphenylamino)-1,3-dihydro-indol-2-one; combined usage; synergism; additive action.