УДК577.112.083/577.152.199.1

Ю. А. Шестеренко, І. І. Романовська, О. В. Севастьянов, О. С. Карпенко, С. О. Заноза
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, *e-mail:romairina@gmail.com*

ПОШУК НОВИХ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ ТИРОЗИНАЗИ

З грибів *Agaricus bisporus* за модифікованим методом виділено ензим тирозиназу. Виявлено, що введення поліетиленгліколю 4000 в процесі екстракції сприяє зменшенню вмісту поліфенолів у 3 рази у виділеному препараті, що приводить до зростання чистоти ензиму при збільшенні його активності на 25 %. Здійснено пошук нових інгібіторів тирозинази серед широкого ряду сполук, в тому числі похідних 3-хлор-1,4-нафтохінону, ізатину, 3-гідрокси-2-нафтойної кислоти та ін. Виявлено, що 2,7-дигідроксинафталін є перспективним інгібітором тирозинази, його концентрація напівмаксимального інгібування активності ензиму може бути порівняною із значенням IC_{50} койєвої кислоти – класичного інгібітора меланогенезу.

Ключові слова: тирозиназа *Agaricus bisporus*, виділення, інгібітор, 2,7-дигідроксинафталін.

Тирозиназа (монофенол, дигідрокси-L-фенілаланін: оксиген-оксидоредуктаза (КФ 1.14.18.1) – купрумвмісний фермент, що каталізує *о*-гідроксилювання монофенолів з утворенням *о*-дифенолів і окиснення *о*-дифенолів до *о*-хінонів в присутності молекулярного кисню [8].

Тирозиназа є ключовим ферментом біосинтезу меланінових пігментів, що є одними з найбільш поширених пігментів бактерій, грибів, рослин і тварин. Меланін є детермінантою кольору шкіри, волосся і очей, а також грає важливу роль у гомеостазі шкіри людини, зв'язуванні токсикантів і хімікатів, а також захисті від шкідливого ультрафіолетового випромінювання, здатного викликати тяжкі патологічні стани, такі як ракові захворювання шкіри [2].

Разом з тим надмірне накопичення меланіну, що викликає токсичні і лікарські меланодермії, мелазму, лентіго та ін. захворювання є важливою сучасною дерматологічною і косметологічною проблемами [18].

Незважаючи на певні успіхи у вивченні інгібіторів тирозинази природного (койєва кислота, арбутин, алоезин) і синтетичного (трополон, похідні гідрохінону, бензойної кислоти) походження [11, 17, 23, 24], актуальність таких досліджень знаходиться на високому рівні, оскільки існуючі інгібітори в ряді випадків нестабільні, неекономічні, токсичні, вимагають складних методів синтезу чи виділення з природних об'єктів [4, 13].

Тому метою даної роботи був пошук нових інгібіторів тирозинази з використанням виділеного з грибів *Agaricus bisporus* ензиму.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мас-спектри FAB реєстрували на спектрометрі VG 70-70 EQ. Іонізація здійснювалася пучком атомів аргону з енергією 10 кV (речовини розчиняли у 3-нітробензиловому спирті).

DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2304-0947.2017.4(64).115929

© Ю. А. Шестеренко, І. І. Романовська, О. В. Севастьянов, О. С. Карпенко, С. О. Заноза, 2017

1Н-Індол-2,3-діон (5), 5-бутил-1Н-індол-2,3-діон (8), 5-хлоро-1Н-індол-2,3-діон (9), 5-бромо-1Н-індол-2,3-діон (10) та **7-метил-1Н-індол-2,3-діон (11)** були отримані комерційним шляхом.

4-(3-Хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафталін-2-іламіно)-бензойна кислота (1). Синтезована, як описано у [22]. Вихід 81 %; $T_{пл}$ = 188-189 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): (327 (100) + 329 (35)) $[M + H]^+$, 292 (22), 282 (20) + 284 (5), 274 (10), 248 (53).

4-(3-Хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафталін-2-іламіно)-бензойної кислоти метиловий естер (2). Синтезований, як описано у [22]. Вихід 76 %; $T_{пл}$ = 178-180 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): (341 (100) + 343 (40)) $[M + H]^+$, 310 (50) + 312 (20), 306 (15), 282 (25), 262 (20), 247 (21).

(3-Хлоро-1,4-діоксо-1,4-дигідронафталін-2-іламіно)-оцтова кислота (3). Синтезована, як описано у [5]. Вихід 86 %; $T_{пл}$ = 165-168 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): (265 (30) + 267 (10)) $[M + H]^+$, 220 (100) + 222 (30).

2-Хлоро-3-(3-морфолін-4-іл-пропіламіно)-[1,4]нафтохінон(4).Синтезований, аналогічно [5]. Вихід 96 %; $T_{пл}$ (гідрохлорид) > 250 °С Мас-спектр, m/z (I, %): (334 (100) + 336 (30)) $[M + H]^+$, 299 (20).

5-Метокси-1Н-індол-2,3-діон (6) та **5-метил-1Н-індол-2,3-діон (7)** були отримані за описаними методиками [14, 15] із виходами, близькими до наведених у літературі (65 та 45 % відповідно).

1Н-Індол-2,3-діон-3-оксим (12). Синтезований, як описано у [7]. Вихід 85 %; $T_{пл}$ > 220 °С (субл.); Мас-спектр, m/z (I, %): 163 (15).

5-Метил-1Н-індол-2,3-діон-3-оксим (13). Синтезований, як описано у [1]. Вихід 55 %; $T_{пл}$ > 245 °С (субл.); Мас-спектр, m/z (I, %): 181 (20 %).

5-Метокси-1Н-індол-2,3-діон-3-оксим (14). Синтезований, як описано у [1]. Вихід 71 %; $T_{пл}$ > 235 °С (субл.); Мас-спектр, m/z (I, %): 193 (10).

5-Хлоро-1Н-індол-2,3-діон-3-оксим (15). Синтезований, як описано у [21]. Вихід 65 %; $T_{пл}$ > 250 °С (субл.); Мас-спектр, m/z (I, %): (196 (20) + 198 (5)) $[M + H]^+$.

5-Бромо-1Н-індол-2,3-діон-3-оксим (16). Синтезований, як описано у [21]. Вихід 79 %; $T_{пл}$ > 280 °С (субл.); Мас-спектр, m/z (I, %): (241 (5) + 243 (5)) $[M + H]^+$.

Гідразони 3-гідроксинафтойної кислоти (17 – 22) отримані конденсацією 3-гідрокси-2-нафтойної кислоти з низкою гідразидів.

Метил 3-гідроксинафтоацетат. До розчину 10 г (0,053 моль) 3-гідрокси-2-нафтойної кислоти у метиловому спирті в присутності декількох крапель сульфатної кислоти додавали 0,1 г (0,0005моль) 4-хлоробензо-сульфокислоти та витримували при кипінні 4 год. Осад, що випадав, відфільтровували та висушували. Вихід 75 %.

3-Гідрокси-2-нафтогідразид. До розчину 17 г (0,085моль) метил-3-гідроксинафтоацетату у метиловому спирті при 65 °С додавали 4,73 $см^3$ (0,09 моль) гідразингідрату, витримували при кипінні 4 години, охолоджували. Осад, що випав, відфільтровували, промивали метиловим спиртом та висушували. Маточний розчин випаровували, осад, що випав, також відфільтровували, промивали метиловим спиртом та висушували. Вихід 88 %.

3-Гідрокси-N-((E)-((2-гідроксифеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (17). Синтезований, як описано у [3, 19]. Вихід 74 %; $T_{пл}$ = 217 – 219 °С (за даними літератури 217 – 219 °С [3]); Мас-спектр, m/z (I, %): 307 (100) $[M + H]^+$.

3-Гідрокси-N-((E)-((3-гідроксифеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (18). Синтезований, як описано у [19]. Вихід 79 %; $T_{пл}$ = 246 – 248 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): 307 (100) $[M + H]^+$.

3-Гідрокси-N-((E)-((4-гідроксифеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (19). Синтезований, як описано у [19]. Вихід 83 %; $T_{пл}$ = 292 – 294 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): 307 (100) $[M + H]^+$.

3-Гідрокси-N-((E)-((2-метоксифеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (20). Синтезований, як описано у [5]. Вихід 78 %; $T_{пл}$ = 275 – 277 °С (за даними літератури 274 – 279 °С); Мас-спектр, m/z (I, %): 321 (100) $[M + H]^+$.

3-Гідрокси-N-((E)-((4-метоксифеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (21). Синтезований, як описано у [3]. Вихід 85 %; $T_{пл}$ = 234 – 235 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): 321 (100) $[M + H]^+$.

3-Гідрокси-N-((E)-((2-гідрокси-5-бромофеніл)іміно)метил)-2-нафтамід (22). Синтезований, як описано у [3]. Вихід 85 %; $T_{пл}$ = 258 – 259 °С; Мас-спектр, m/z (I, %): 386 (100) $[M + H]^+$.

У роботі використовували препарат тирозинази з грибів *Agaricus bisporus,* отриманий згідно методу [16], модифікованому додаванням у процесі виділення тирозинази поліетиленгліколю-4000.

Для виділення ензиму 1кг грибів гомогенізували з 2 $дм^3$ охолодженого екстрагенту (водні розчини, що містять 1% аскорбінової кислоти і 0,2% бензойної кислоти, pH розчину доводили гідроксидом амонію до 5,3), перемішували протягом години, після чого отриманий екстракт центрифугували при 11 000 об/хв 30 хв, при температурі 0°С. Осадження ферменту проводили, насичуючи надосадову рідину сульфатом амонію до 80% і центрифугували в аналогічних умовах. До осаду додавали 20 $см^3$ розчину бензойної й аскорбінової кислот і діалізували протягом 3-х днів проти розчину аскорбінової і бензойної кислот, а потім замінювали на дистильовану воду. Діалізований розчин насичували поліетиленгліколем 4000 (ПЕГ-4000) до 35 % та центрифугували при 11 000 об/хв. (10 000 g) 10 хв. Отриманий осад повторно розчиняли в водному розчині, що містив 1% аскорбінової кислоти (pH 5,3) та діалізували проти дистильованої води. Виділення проводили при температурі 0 °С.

У виділеному препараті тирозинази визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [9], вміст поліфенолів [20], активність за L-дигідроксифенілаланіном (L-ДОФА) [10] і L-тирозином згідно методу [12] з деякими модифікаціями. У пробірку, що містить 2,5 $см^3$ 2,5 ммоль/$дм^3$ розчину L-тирозину в натрій-фосфатному буферному розчині (0,05 моль/$дм^3$, pH 6,5), вносили 0,5 $см^3$ розчину ферменту. Через 10 хв інкубації при 25 °С фотометрували при 475 нм в кюветі з довжиною ходу променя 1 см.

pH-Оптимум ензиму визначали, додаючи до нього розчин субстрату та відповідні буферні розчини з різними значеннями pH (3,0-10,0). Після чого визначали активність за вищеописаною методикою.

Температурний оптимум визначали, вимірюючи активність тирозинази при температурі 2 – 80 °С.

Вплив органічних розчинників на активність тирозинази визначали згідно описаній вище методиці за L-тирозином, з використанням для розчинення субстрату водно-органічних розчинів.

Інгібування тирозинази досліджували, визначаючи моно- і дифенолазну активності ензиму за описаними вище методиками у присутності інгібітора в діапазоні концентрацій від 10 до 500 мкмоль/$дм^3$. Концентрацію напівмаксимального інгібування тирозинази IC_{50} визначали з графіка залежності активності ферменту від

концентрації інгібітора, використовуючи лінійну ділянку кривої та екстраполюючи її до 50 % збереження активності ензиму.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Скринінг інгібіторів тирозинази проводили з використанням ензиму із грибів *Agaricus bisporus* через те, що тирозинази людини і *Agaricus bisporus* мають близьку специфічність [8, 11].

З грибів *Agaricus bisporus* виділили препарат тирозинази. Методику отримання ензиму [16] модифікували додаванням в процесі виділенняПЕГ-4000 для видалення ендогенних поліфенолів, продукти окиснення яких є інгібіторами тирозинази. Введення ПЕГ-4000 дозволило зменшити в 3 рази кількість вільних поліфенолів, що сприяло підвищенню активності тирозинази на 25%.

Перевагою даного методу виділення є використання водних розчинів і проведення процесу при 0-4 ºС, на відміну від більшості таких, що широко використовуються і потребують застосування значної кількості токсичних органічних розчинників і підтримання низьких температур (-20 °С) [8]. Біохімічні і фізико-хімічні властивості отриманого препарату тирозинази представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Біохімічні і фізико-хімічні властивості тирозинази, виділеної із грибів Agaricus bisporus

Властивості ферменту	Показники (M±m)*
Вихід білка, мг/г грибів	0,82±0,03
Монофенолазна активність (за тирозином), од/мг білка за хв	391,0±16,1
Дифенолазна активність (за L-ДОФА), од/мг білка за хв	4340,0±177,9
pH-оптимум	6,5
Термооптимум, ºС	40

* При n=3

Необхідність використання водно-органічних розчинів при дослідженні впливу інгібіторів на активність обумовлена недостатньою розчинністю останніх у воді. Для підвищення їх розчинності використовують органічні розчинники, однак їх додавання може призводити до зниження активності ензиму.

Вивчення застосування органічних розчинників в процесі окиснення тирозину показало значний вплив етилового спирту на монофенолазну активність тирозинази, а також зниження активності ензиму в присутності ацетонітрилу та ДМСО у концентрації 5 % (табл. 2). ДМСО у концентрації 2 % не впливає на активність тирозинази, тому його було обрано для подальших досліджень (у випадках, де це дозволяла розчинність досліджуваних сполук).

Відомо, що ряд сполук, які мають у своїй структурі хіноїдний фрагмент, карбоксильні групи, карбонільні групи в положенні 1,2 в гетероциклічному фрагменті, гідроксильні групи в певному положенні ароматичного чи гетероциклу, є інгібіторами тирозинази [4, 11, 13].

Таблиця 2

Зміна монофенолазної активності тирозинази під впливом органічних розчинників

Розчинник	Активність ферменту, % (М±м)*
Буферний розчин без додавання органічного розчинника	100,0±2,9
Етиловий спирт, 15 %	36,6±1,1
Ацетонітрил, 2%	90,2±2,9
ДМСО, 2 %	100,0±3,0
ДМСО, 5 %	73,9±2,1

*При n=3

В ході дослідження був проведений скринінг широкого ряду сполук, в тому числі похідних 3-хлор-1,4-нафтохінону, ізатину, 3-гідрокси-2-нафтойної кислоти та ін., на їх здатність інгібувати тирозиназу грибів *Agaricus bisporus*. (рис. 1).

При визначенні впливу досліджуваних речовин на монофенолазну і дифенолазну активність ензиму в концентраціях 0,1-0,5 ммоль/дм^3 не виявлено інгібуючої дії, подальше збільшення концентрації було недоцільним через те, що вони значно перевищують такі для відомих ефективних інгібіторів тирозинази [4, 11, 13]. Отже, вивчені сполуки не є придатними для подальших досліджень.

Під час дослідження інгібіторів виникає проблема неможливості порівняння інгібуючої здатності через відмінності в умовах визначення активності. Тому як позитивний контроль зазвичай використовують добре відомий інгібітор тирозинази. В даній роботі як стандартний інгібітор порівняння використовували койєву кислоту.

Інгібування активності тирозинази койєвою кислотою визначали за двома субстратами (L-тирозин, L-ДОФА). Для стандартного інгібітора значення IC_{50}становило 60,75 і 31,9 мкмоль/дм^3, відповідно (рис. 2, рис. 3).

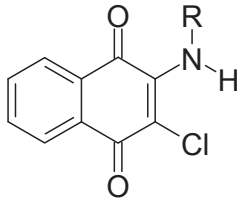
Відомо, що одним з природних субстратів тирозинази грибів є 1,8-дигідроксинафталін (рис. 4, сполука **24**), тому було припущено, що 2,7-дигідроксинафталін (рис. 4, сполука **25**) може бути перспективним інгібітором активності ензиму.

При дослідженні інгібуючого впливу 2,7-дигідроксинафталіну була визначена його специфічність по відношенню до монофенолазної активності тирозинази. Додавання 2,7-дигідроксинафталіну істотно знижує монофенолазну активність і ніяк не впливає на дифенолазну активність ензиму. Окиснення тирозину є першою і швидкість-лімітуючою стадією у тирозиназному каталізі, тому відсутність впливу на окиснення L-ДОФА не знижує практичної цінності інгібітора [6, 11].

Значення концентрації напівмаксимального інгібування для сполуки **25** за L-тирозином становило 96,5 мкмоль/дм^3 (рис. 2).

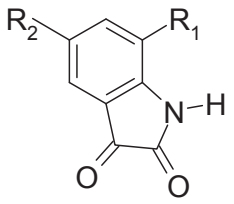
Концентрація напівмаксимального інгібування монофенолазної активності тирозинази 2,7-дигідроксинафталіном може бути порівняною із значенням IC_{50} стандартного інгібітора.

Таким чином, здійснено пошук інгібіторів тирозинази серед широкого ряду сполук, в тому числі похідних 3-хлор-1,4-нафтохінону, ізатину, 3-гідрокси-2-нафтойної кислоти та ін., з використанням ензиму, виділеного за модифікованим



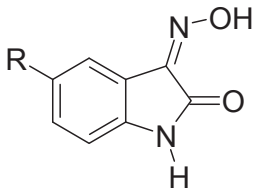
(**1-5**)

R = -4-C_6H_4COOH (**1**),
R =-4-$C_6H_4COOCH_3$ (**2**),
R =-CH_2COOH (**3**),
R =-$(CH_2)_3$-$N(CH_2CH_2)_2O$ (**4**)



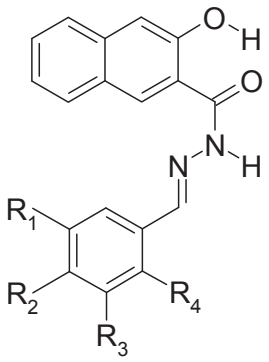
(**6-11**)

R_1 = H, R_2 = H (**5**),
R_1 = H, R_2 = OCH_3 (**6**),
R_1 = H, R_2 = CH_3 (**7**),
R_1 = H, R_2 = C_4H_9 (**8**),
R_1 = H, R_2 = Cl (**9**)
R_1 = H, R_2 = Br (**10**),
R_1 = CH_3, R_2 = H(**11**).



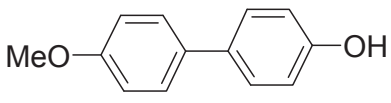
(**12-16**)

R = H (**12**),
R = CH_3 (**13**),
R = OCH_3 (**14**),
R = Cl (**15**),
R = Br (**16**),



(**17-22**)

R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = OH (**17**),
R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H,R_4 = H (**18**),
R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H,R_4 = H (**19**),
R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H,R_4 = OCH_3 (**20**),
R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H,R_4 = H (**21**),
R_1 = Br, R_2 = H, R_3 = H,R_4 = OH (**22**).



(**23**)

Рис. 1. Структури досліджуваних сполук.

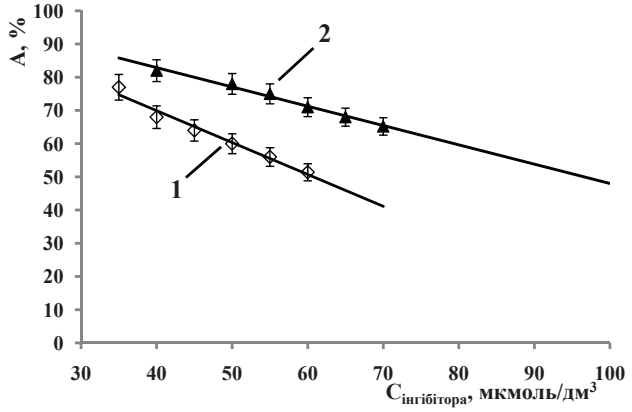


Рис. 2. Залежність збереження монофенолазної активності тирозинази від концентрації інгібітора: койєвої кислоти (1) і 2,7-дигідроксинафталіну (2).

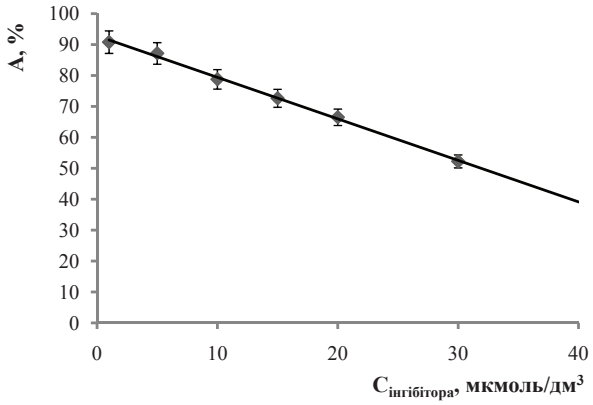
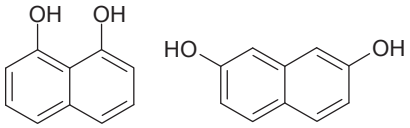


Рис. 3. Залежність збереження дифенолазної активності тирозинази від концентрації койєвої кислоти.



(**24**) (**25**)

Рис. 4. Субстрат тирозинази грибів - 1,8 дигідроксинафталін (24) та потенційний інгібітор тирозинази - 2,7 дигідроксинафталін (25).

методом. Виявлено, що значний вплив на активність тирозинази, близький до койєвої кислоти – класичного інгібітора меланогенезу, чинить 2,7-дигідроксинафталін.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Bartlett A.F., Dickel D.F., Taylor W.I.* The alkaloids of tabernanthe iboga. Part IV. The structures of ibogamine, ibogaine, tabernanthine and voacangine // J. Am. Chem. Soc. – 1958. – Vol. 80, N 1. – P. 126–136. https://doi.org/10.1021/ja01534a036
2. *Borovansky J., Riley P.A.* Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Structure, Physiological and Pathological Functions. – John Wiley & Sons, 2011. – 424 p.
3. *Caboni L., Egan B., Kelly B., Blanco F., Fayne D., Meegan M.J., Lloyd D.G.* Structure−activity relationships in non-ligand binding pocket (NonLBP) diarylhydrazide antiandrogens // J. Chem. Inf. Model. – 2013. – Vol. 53, N 8. – P. 2116 – 2130. http://doi.org/10.1021/ci400189m
4. *Chen C.Y., Lin L.C., Yang W.F.* An updated organic classification of tyrosinase inhibitors of melanin biosynthesis // Curr. Org. Chem. – 2015. – Vol. 19. – P. 4-18. https://doi.org/10.2174/1385272819666141107224806
5. *Дрегерис Я.Я., Лиепиня И.Я., Фрейманис Я.Э.* Синтез и свойства комплексов и автокомплексов с переносом заряда // Известия АН Латвийской ССР, Сер хим. – 1977. – Т. 4. – С. 136-164.
6. *Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A.* Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // Enzyme Microb. Technol. – 2002. – Vol. 31. – P. 907 – 931. http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00214-4
7. *Жунгиету Г.И., Рехтер М.А.* Изатин и его производные. – Штиинца, 1977. – С 92.
8. *Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C.* Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 100. – P. 219-232. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x
9. *Hartree E.F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – Vol. 48. – P. 422-427. http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2
10. *Ikehata K., Nicell J.A.* Color and toxicity removal following tyrosinase – catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. – 2000. – Vol. 16, N 4. – P. 533-540. https://doi.org/10.1021/bp0000510
11. *Lee S.Y., Baek N., Nam T.G.* Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors // J. Enzym. Inhib. Med. Chem. – 2015. – Vol. 31. – P. 1-13. http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058
12. *Leeuwen J. V., Wichers H.J.* Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies // Mycological Res. – 1999. - Vol. 103. – P. 413-418. http://dx.doi.org/10.1017/S095375629800731X
13. *LoizzoM.R., Tundis R., Menichini F.* Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update // Compr. Rev. Food Science Food Saf. – 2012. – Vol. 11. – P. 378-398. http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x
14. *Мнджоян А.Л.* Синтезы гетероциклических соединений. – Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1985, № 15. – С. 56.
15. *Мнджоян А.Л.* Синтезы гетероциклических соединений. – Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1959, № 4. – С. 54.
16. *Пат.* 2 956929 США, МКИ 195-68. Tyrosinase concentrate and extractant and method for making the same / E. M. Cohen, L.L. Lerner. Заявл. 24.04.1958;. Опубл. 18.10.1960.
17. *Pintus F., Matos M.J., Vilar S.* New insights into highly potent tyrosinase inhibitors based on 3-heteroarylcoumarins: Anti-melanogenesis and antioxidant activities, and computational molecular modeling studies // Bioorg. Med. Chem. – 2017. – Vol. 25. – P. 1687-1695. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.037
18. *Rossi A.M., Perez M.I.* Treatment of hyperpigmentation // Facial Plastic Surgery Clinics of North America. – 2011. – Vol. 19. – P. 313-324. https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.05.010
19. *Seki H., Xue S., Hixon M.S., Pellett S., Remes M., Johnsonc E.A., Janda K.D.* Toward the discovery of dual inhibitors for botulinum neurotoxin A: concomitant targeting of endocytosis and light chain protease activity // Chem. Commun. – 2015. – Vol. 51. – P. 6226 – 6229. https://doi.org/10.1039/c5cc00677e
20. *Singleton V. L., Othofer R., Lamnela-Raventos R.* Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // Methods Enzym. – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1
21. *Surendra N.P., Singh U.K., Srivastava B.K.*, Kukreja P. Synthesis and anticonvulsant activity of substituted isatin-3-oximes // Intern. J. Synth. Charact. – 2012. – Vol. 1, N 5. – P. 45 – 49.

22. *Шишкина Р.П., Эктова Л.П., Матошина К.И., Фокин К.П.* Синтез 2,3-бисаминопроизводных 1,4-нафтохинона // Известия Сибирского отд. АН СССР. – 1982. – Т. 12, Вып.5. – С. 136-141.
23. *Xie W., Zhang H., He J.* Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – Vol. 27. – P. 530-532. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.027
24. *Yang Y.F., Lai X.Y., Lai G.Y.* Purification and characterization of a tyrosinase inhibitor from camellia pollen // J. Funct. Foods. – 2016. – Vol. 27. – P. 140-149. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.056

Стаття надійшла до редакції 22.06.2017

Ю. А. Шестеренко, И. И. Романовская, О. В. Севастьянов, А. С. Карпенко, С. А. Заноза
Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, e-mail: romairina@gmail.com

ПОИСК НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНАЗЫ

Из грибов *Agaricus bisporus* по модифицированному методу выделен энзим тирозиназа. Выявлено, что введение полеиэтиленгликоля 4000 в процессе экстракции способствует уменьшению содержания полифенолов в 3 раза в выделенном препарате, что приводит к росту чистоты энзима при увеличении его активности на 25%. Осуществлен поиск новых ингибиторов тирозиназы среди широкого ряда соединений, в том числе производных 3-хлор-1,4-нафтохинона, изатина, 3-гидрокси-2-нафтойнойкислоты и др. Выявлено, что 2,7-дигидроксинафталин является перспективным ингибитором тирозиназы, его концентрация полумаксимального ингибирования активности энзима сравнима со значением IC_{50} койевой кислоты – классического ингибитора меланогенеза.

Ключевые слова: тирозиназа *Agaricus bisporus*, выделение, ингибитор, 2,7-дигидроксинафталин.

Yu. Shesterenko, I. Romanovska, O. Sevastyanov, A. Karpenko, S. Zanoza
A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute, NAS of Ukraine
Odessa, Ukraine, Lyustdorfskaya doroga, 86, E-mail: romairina@gmail.com

SEARCH OF NEW SYNTHETIC INHIBITORS OF TYROSINASE

Melanin pigmentation of skin plays the most important role in the protection of organism against UV-irradiation, but the excessive accumulation of melanin brings to toxic melanodermia, melasma, lentigo and other skin lesions. Tyrosinase is the key enzyme of skin melanin pigment biosynthesis. In spite of certain progress in investigation of natural and synthetic tyrosinase inhibitors, actuality of such studies is of a high level, because the existing inhibitors are in some cases unstable, expensive, toxic, requires complex methods of synthesis or isolation from natural sources.
The aim of the work is screening of new tyrosinase inhibitors, using the enzyme, isolated from *Agaricus bisporus*.
Tyrosinase was isolated from *Agaricus bisporus* mushrooms by a modified method. It was found, that the introduction of polyethylene glycol 4000 in the extraction process promotes 3-fold reduction of polyphenol content, which leads to increase purity of enzyme with an increase in its activity by 25%. A search for new tyrosinase inhibitors among a wide range of compounds, including derivatives of 3-chloro-1,4-naphthoquinone, isatin, 3-hydroxy-2-

naphthoic acid, etc was conducted. The studied substances did not displayed inhibitory effect at concentration of 0,1-0,5 mmol/dm^3.
It is known, that the natural substrate of mushroom tyrosinase is 1,8-dihydroxynaphthalene, thus it was supposed that the 2,7-dihydroxynaphthalene may be prospective inhibitor of enzyme activity. It was shown, that the concentration of half-maximal inhibition of tyrosinase monophenolase activity by 2,7-dihydroxynaphthalene is close to that of kojic acid – classic inhibitor of melanogenesis. It was found, that 2,7-dihydroxynaphthalene exerts inhibitory action only on monophenolase activity of tyrosinase in contrast to kojic acid, which inhibits both monophenolase and diphenolase enzyme activity.

Key words: tyrosinase, *Agaricus bisporus*, isolation, inhibitor, 2,7-dihydroxynaphthalene.

REFERENCES

1. Bartlett A.F., Dickel D.F., Taylor W.I. *The alkaloids of tabernanthe iboga. Part IV. The structures of ibogamine, ibogaine, tabernanthine and voacangine.* J. Am. Chem. Soc., 1958, vol. 80, no 1, pp. 126–136. https://doi.org/10.1021/ja01534a036
2. Borovansky J., Riley P.A. *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Structure, Physiological and Pathological Functions*. Weinheim, John Wiley & Sons, 2011. 424 p.
3. Caboni L., Egan B., Kelly B., Blanco F., Fayne D., Meegan M.J., Lloyd D.G. *Structure-activity relationships in non-ligand binding pocket (NonLBP) diarylhydrazide antiandrogens*. J. Chem. Inf. Model., 2013, vol. 53, no 8, pp. 2116 – 2130. http://doi.org/10.1021/ci400189m
4. Chen C.Y., Lin L.C., Yang W.F. *An updated organic classification of tyrosinase inhibitors of melanin biosynthesis*. Curr. Org. Chem., 2015, vol. 19, pp. 4-18. https://doi.org/10.2174/1385272819666141107224806
5. Dregeris Ya.Ya., Liepinya I.Ya., Freimanis Ya.E. *Sintez i svoystva kompleksov i avtokompleksov s perenosom zaryada*. Izvestiya AN Latviyskoy SSR, 1977, vol. 4, pp. 136-164 (*in Russian*).
6. Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A. *Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*. Enzyme Microb. Technol. , 2002, vol. 31, pp. 907 – 931. http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00214-4
7. Zhungiyetu G.I., Rekhter M.A. Izatin i yego proizvodnyye (Izatin and its derivatives). Kishinev, Shtiintsa, 1977, p. 92 (*in Russian*).
8. Halaouli S., Asther M., Sigoillot I.-C. *Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application.* J. Appl. Microbiol., 2006, vol. 100, pp. 219-232. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02866.x
9. Hartree E.F. *Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response*. Anal. Biochem., 1972, vol. 48, pp. 422-427. http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2.
10. Ikehata K. Nicell J.A. *Color and toxicity removal following tyrosinase – catalyzed oxidation of phenols.* Biotechnol. Prog., 2000, vol. 16, no 4, pp. 533-540. https://doi.org/10.1021/bp0000510
11. Lee S.Y., Baek N., Nam T.G. *Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors*. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2015, vol. 31, pp. 3-13. http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058
12. Leeuwen J. V., Wichers H.J. *Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of Agaricus bisporus fruit bodies.* Mycological Res., 1999, vol. 103, pp. 413-418. http://dx.doi.org/10.1017/S095375629800731X
13. Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F. *Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update*. Compr. Rev. Food Science Food Saf., 2012, vol. 11, pp. 378-398. http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x
14. Mnjoyan A.L. *Sintezy geterotsiklicheskikh soyedineniy* (Syntheses of heterocyclic compounds), Yerevan, Izdatel'stvo AN ArmSSR, 1985, no 15, p. 56 (*in Russian*).
15. Mnjoyan A.L. *Sintezy geterotsiklicheskikh soyedineniy* (Syntheses of heterocyclic compounds), Yerevan, Izdatel'stvo AN ArmSSR, 1959, no 4, p. 54 (*in Russian*).
16. Cohen E.M., Lerner L.L. *Tyrosinase concentrate and extractant and method for making the same*, Patent USA, no 2 956929. 1960.
17. Pintus F., Matos M.J., Vilar S. *New insights into highly potent tyrosinase inhibitors based on 3-heteroarylcoumarins: Anti-melanogenesis and antioxidant activities, and computational molecular modeling studies*. Bioorg. Med. Chem., 2017, vol. 25, pp. 1687-1695. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.037

18. Rossi A.M., Perez, M.I. *Treatment of hyperpigmentation*. Facial Plastic Surgery Clinics of North America, 2011, vol. 19, pp. 313-324. https://doi.org/10.1016/j.fsc.2011.05.010
19. Seki H., Xue S., Hixon M.S., Pellett S., Remes M., Johnsons E.A., Janda K.D. *Toward the discovery of dual inhibitors for botulinum neurotoxin A: concomitant targeting of endocytosis and light chain protease activity.* Chem. Commun., 2015, vol. 51, pp. 6226 – 6229. https://doi.org/10.1039/c5cc00677e
20. Singleton V. L., Othofer R., Lamnela-Raventos R. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Methods Enzym., 1999, vol. 299, pp. 152-178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1
21. Surendra N.P., Singh U.K., Srivastava B.K., Kukreja P. *Synthesis and anticonvulsant activity of substituted isatin-3-oximes.* Intern. J. Synth. Charact., 2012, vol. 1, no 5, pp. 45 – 49.
22. Shishkina RP, Ektova LP, Matoshina KI. and Fokin K.P. *Sintez 2,3-bisaminoproizvodnykh 1,4-naftokhinona*. Izvestiya Cibirskogo otdeleniya AN SSSR, 1982, vol. 12, no 5, pp. 136-141. (*in Russian*).
23. Xie W., Zhang H., He J. *Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2017, vol. 27, pp. 530-532. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.027
24. Yang Y.F., Lai X.Y., Lai G.Y. *Purification and characterization of a tyrosinase inhibitor from camellia pollen*. J. Funct. Foods., 2016, vol. 27, pp. 140-149. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.056