

ІНГІБУВАННЯ 15-ЛІПОКСИГЕНАЗИ ЕКСТРАКТОМ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

**Бессарабов В.І.¹, Кузьміна Г.І.¹, Харитоненко Г.І.¹, Лісовий В.М.¹,
Пашченко І.О.¹, Василенко В.Ю.¹, Матвєєва Н.А.²**

¹Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна, e-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ, Україна

У статті представлено результати дослідження впливу екстракту з *Artemisia tilesii* на активність 15-ліпоксигенази в реакції ферментативного окиснення лінолевої кислоти як субстрату. Кінетичні дослідження виконувалися з використанням спектрофотометричного методу аналізу. Вперше встановлено, що екстракт з *Artemisia tilesii* є ефективним інгібітором 15-ліпоксигенази за змішаним (частковим) механізмом інгібування. Отримані результати можуть бути використані при розробці нових косметичних та лікарських засобів для лікування запальних захворювань з використанням екстракту з *Artemisia tilesii* в якості АФІ.

Ключові слова: інгібування, 15-ліпоксигеназа, екстракт, рослинна сировина, активні фармацевтичні інгредієнти.

INHIBITION OF 15-LIPOXYGENASE BY PLANT-DERIVED EXTRACT

**Bessarabov V.I.¹, Kuzmina G.I.¹, Kharitonenko G.I.¹, Lisovyi V.M.¹,
Pashchenko I.O.¹, Vasilenko V.Y.¹, Matvieieva N.A.²**

¹Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The article presents the results of the study of the effect of extract from *Artemisia tilesii* on the activity of 15-lipoxygenase in the reaction of enzymatic oxidation of linoleic acid as a substrate.

Kinetic studies were performed using a spectrophotometric method of analysis. For the first time, *Artemisia tilesii* extract has been found to be an effective inhibitor of 15-lipoxygenase by a mixed (partial) inhibition mechanism. The results obtained can be used in the development of new cosmetics and drugs for the treatment of inflammatory diseases using an extract of *Artemisia tilesii* as API.

Keywords: inhibition, 15-lipoxygenase, extracts, herbs, active pharmaceutical ingredients.

Запалення – це типовий процес, який сформувався в еволюції як захисно-приспосувальна реакція організму на дію патогенних факторів, що спрямована на локалізацію, знищення та видалення флогогенного агенту, а також на усунення наслідків його дії [1].

Відповідно до аналізу літературних джерел відомим є той факт, що хронічне запалення виникає в результаті оксидативного стресу, який розвивається через надлишок вільних радикалів в клітинах.

Активні форми кисню утворюються внаслідок інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів, яке може ініціювати фермент 15-ліпоксигеназа – оксидоредуктаза, що каталізує реакцію окиснення поліненасичених жирних кислот [2]. Ця реакція перекисного окиснення є початковою ланкою широкого ферментативного каскаду, в ході якого утворюється велика кількість біологічно-активних речовин, що характеризуються потужним спектром регуляторної дії. Зокрема, 15-ліпоксигеназу пов'язують з продукуванням медіаторів запалення [3].

Таким чином, актуальним є дослідження речовин, що можуть виявляти інгібувальну здатність по відношенню до 15-LOX. Отже, незважаючи на те, що багато сполук, здатних впливати на активність цього ензиму, були знайдені та біологічно вивчені, все ж на фармацевтичному ринку існує незначна кількість лікарських засобів, що містять у своєму складі інгібітори ліпоксигеназ. Зареєстровані препарати не мають специфічної дії, тому актуальним є виокремлення та дослідження речовин та природних біологічних сумішей, що

здатні впливати саме на 15-ліпоксигеназу, для розробки косметичного засобу з протизапальними лікувальними властивостями.

Для дослідження був обраний екстракт з *Artemisia tilesii*, яка є малодослідженою рослиною та містить велику кількість флавоноїдів [4]. Дана рослина здатна рости за суворих умов Аляски та півночі Росії. Публікацій стосовно біологічної активності цих рослин практично немає. Відомо лише, що корінне населення Аляски використовує їх для лікування різних хвороб [5]. Отже, перспективним та доцільним є проведення досліджень щодо використання екстракту з *Artemisia tilesii* в якості інгібітору ферменту 15-ліпоксигенази, що дозволить оцінити можливість його використання у якості потенційного активного фармацевтичного інгредієнта для розробки нового ефективного протизапального косметичного засобу.

Мета дослідження: вивчення впливу екстракту з *Artemisia tilesii* на активність 15-ліпоксигенази в реакції ферментативного окиснення лінолевої кислоти як субстрату.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження проводили з використанням спектрофотометричного методу, фіксуючи збільшення ступеня поглинання реакційної суміші з часом при довжині хвилі 235 нм. Така довжина хвилі відповідає максимальному поглинанню спряженого дієнового хромофору в молекулі гідропероксиду лінолевої кислоти (молярний коефіцієнт поглинання – $23\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) [6, 7].

Активність ферменту оцінювали за значенням стаціонарної швидкості реакції (V_{st}), як середнє значення з відхиленням не більше, ніж 5%.

Матеріали та обладнання.

У роботі використовували наступне обладнання та матеріали: двопроменевий УФ-спектрофотометр SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина), облаштований термостатом; кювети з кварцевого скла з товщиною

оптичного шару 1 см; одноканальні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл; рН-метр рН-150МИ (Измерительная техника, Росія); таймер.

Реактиви.

Для проведення дослідження активності 15-LOX використовували такі реактиви: Lipoxydase (Sigma-Aldrich (Merck), США) типу I-B з сої; кислота лінолева 99% (Sigma-Aldrich (Merck), США); буфер фосфатний (рН=7,6); спирт етиловий 96%; диметилсульфоксид (ДМСО) 99% (Sigma-Aldrich (Merck), США); сухий екстракт з *Artemisia tilesii*; вода очищена III класу.

Як субстрат використовували кислоту лінолеву з концентрацією 2,5 мМ. Розчин ферменту готували з концентрацією 0,7 мг/мл. Розчин екстракту *Artemisia tilesii* використовували у концентраціях 25, 50, 100 мкМ за рутинном, розчинений у ДМСО.

Результати дослідження.

В результаті проведених досліджень розраховано середні значення стаціонарної швидкості реакції окиснення за каталітичної дії 15-LOX при відповідній концентрації лінолевої кислоти.

Графічну інтерпретацію даних в координатах $V_{st} = f([S])$ відображено на рисунку (крива 1). Крива має гіперболічну форму, характерну для кінетики, яка описується рівнянням Міхаеліса-Ментен (формула 1):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S]+K_m}, \quad (1)$$

де v – швидкість реакції;

V_{max} – максимальна швидкість реакції;

$[S]$ – концентрація субстрату;

K_m – константа Міхаеліса, значення якої відповідає концентрації субстрату, за якої швидкість реакції дорівнює половині від максимальної швидкості.

Для визначення найбільш прийнятної кінетичної моделі та відповідного типу інгібування проведено серію розрахунків в різних умовах з ранжируванням результатів за критерієм значення коефіцієнта кореляції R^2 . Розрахунок кінетичних параметрів проводили відповідно до стандартних методик та кінетичних моделей у програмному пакеті SigmaPlot 12.5.

Найпридатнішою за критерієм значення коефіцієнту кореляції ($R^2 = 0,986$) є модель Mixed (Partial), тобто змішаного (часткового) типу інгібування.

Змішане (часткове) інгібування зустрічається в тому випадку, коли інгібітор зв'язується як у активному центрі ферменту, так і зовні, а фермент-субстратний комплекс зберігає часткову активність у порівнянні з нативним ферментом.

Результати дослідження впливу екстракту з *Artemisia tilesii* у концентраціях 25 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ на стаціонарну швидкість реакції ліпоксигеназного каталізу графічно представлені на рисунку 1.

Результати експерименту свідчать про те, що екстракт з *Artemisia tilesii*, як інгібітор 15-ліпоксигенази, зменшує максимальну швидкість ферментативної реакції та збільшує константу Міхаеліса, що повністю відповідає ефекту змішаного інгібування.

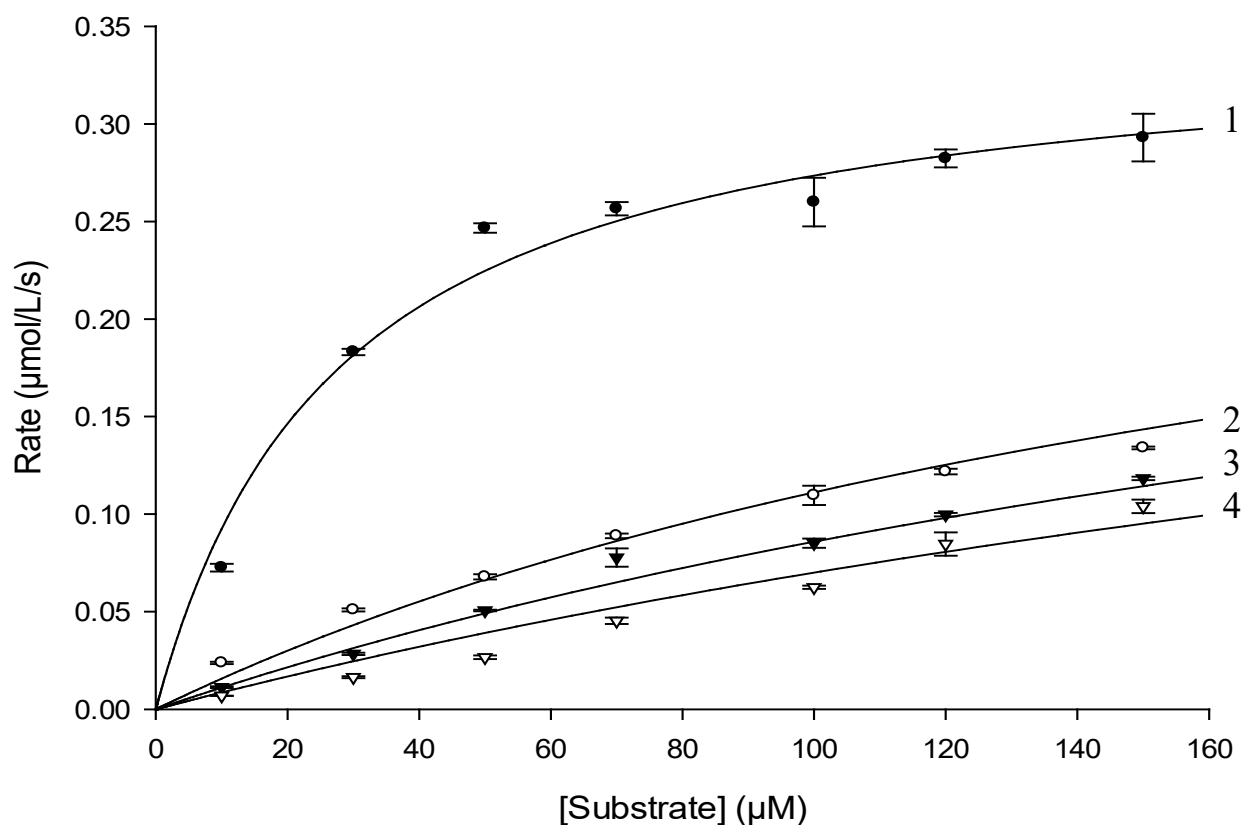
Обраховані за обраною моделлю кінетичні константи мають такі значення:

$$K_i = 2,37 \pm 0,33 \text{ мкМ};$$

$$K_m = 27,73 \pm 2,25 \text{ мкМ};$$

$$V_{\max} = 0,349 \pm 0,008 \text{ мкМ/сек.}$$

Michaelis-Menten



$V_{max} = 0.3494$
 $K_m = 27.7$
 $K_i = 2.4$
 $\alpha = 19.5$
 $\beta = 0.9398$

● I = 0
○ I = 25
▼ I = 50
▽ I = 100

Рисунок 1. Стаціонарні швидкості перетворення субстрату 15-ліпоксигеназою в залежності від концентрацій субстрату без інгібітору (крива 1) та в присутності екстракту з *Artemisia tilesii* в концентраціях 25 мкМ (крива 2), 50 мкМ (крива 3), 100 мкМ (крива 4).

Висновки.

1. Екстракт з *Artemisia tilesii* є ефективним інгібітором 15-ліпоксигенази за змішаним (частковим) механізмом інгібування.

2. Отримані результати дозволяють стверджувати, що екстракт з *Artemisia tilesii* може потенційно використовуватись в якості АФІ лікарських та

косметичних засобів з протизапальним характером, оскільки має високу ефективність як інгібітор 15-ліпоксигенази.

Список літератури.

1. Висмонт Ф. И. Воспаление (патофизиологические аспекты): уч. метод. пособ. Мн.: БГМУ, 2006. 48 с.
2. Атаман О. В. Запалення: навч. посіб. Суми: Видавництво СумДУ. 2006. 66 с.
3. J. Craft, K. L. McCance, S. E. Huether. Understanding Pathophysiology – Chatswood, N.S.W.: Elsevier Health Sciences. 2015. 1166 p.
4. Matvieieva N.A., Shakhovsky A.M., Belokurova V.B., Drobot K.O. *Artemisia tilesii* Ledeb hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 46, № 4. P. 342-345. doi: 10.1080/10826068.2015.1031393.
5. Griffin D. Contributions to the Ethnobotany of the Cup'it Eskimo, Nunivak Island, Alaska. *J. of Ethnobiology.* 2001. Vol. 21, № 2. P. 91-127.
6. Харитоненко Г.І., Скатерна Т.Д., Мельник А.К. та ін. Взаємодія 5-ліпоксигенази з алостеричним ефектором – додецилсульфатом натрію. *Укр. біохім. журн.* 2008. № 3. С. 31–39.
7. Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Пат. 2144674 РФ. МПК G 01N 33/52, G 01N 33/68, № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000