

## ŽIVOČÍŠNE LIPOXYGENÁZY – POLYFENOLY, AKO POTENCIÁLNE INHIBÍTORY LIPOXYGENÁZ

LÝDIA BEZÁKOVÁ<sup>a</sup>, ANDREA BALAZHOVÁ<sup>a</sup>,  
IVANA HOLKOVÁ<sup>a</sup>, MAREK OBLOŽINSKÝ<sup>a</sup>,  
KATARÍNA BAUEROVÁ<sup>c</sup> a PETER MIKUŠ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, <sup>b</sup> Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, <sup>c</sup> Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie, Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava bezakova@fpharm.uniba.sk

Došlo 24.7.19, prijaté 23.3.20.

Kľúčové slová: živočíšne lipoxigenázy, polynenasýtené mastné kyseliny, inhibítory lipoxigenáz, rastlinné sekundárne metabolity, polyfenoly, biologická aktivita

### Obsah

1. Úvod
2. Význam izoenzýmov lipoxigenáz pri vyhľadávaní potenciálnych inhibítorov
3. Polyfenoly – východisko pre výber molekúl s protizápalovým účinkom
  - 3.1. Klasifikácia a biologická aktivita
  - 3.2. Štruktúrne črty polyfenolov vo vzťahu k protizápalovej aktivite
4. Inhibícia lipoxigenáz polyfenolmi – vzťah štruktúry a účinku
  - 4.1. Mechanizmy inhibície
  - 4.2. Redoxné inhibítory
  - 4.3. Inhibítory viažuce Fe
  - 4.4. Analógy substrátov/produktov
  - 4.5. Alosterické inhibítory
  - 4.6. FLAP (aktivátor 5-lipoxigenázy) a jeho inhibítory
  - 4.7. Duálne inhibítory
  - 4.8. Inhibítory cysteinylových receptorov
5. Záver

### 1. Úvod

Lipoxigenázy (LOX, EC 1.13.11.x) patria do rodiny enzýmov peroxidujúcich lipidy, ktoré katalyzujú dioxygenáciu polynenasýtených mastných kyselín (PNMK) s obsahom *cis,cis*-1,4-pentadiénového systému. Aktívne

miesto v katalytickej doméne obsahuje nehémovo viazaný ión železa. LOX reakcie môžu iniciovať syntézu signálnych molekúl a štruktúrne a metabolické zmeny v bunke za rôznych patofyziologických podmienok. V cicavčích bunkách kyselina arachidónová (AA) (C20:Δ4, ω-6) a kyselina linolová (LA) (C18:Δ2, ω-6) (cit.<sup>1</sup>) sú najčastejšie PNMK, ktoré slúžia ako substrát pre rôzne izoenzýmy živočíšnych LOX. Vo všeobecnosti cicavčie LOX preferujú voľné mastné kyseliny (MK) ako substrát, ale sú schopné pôsobiť aj počas ich väzby v štruktúrach fosfolipidov, esterov cholesterolu a lipoproteínov<sup>2</sup>. Oxygenácia PNMK účinkom LOX je zdrojom vysoko aktívnych bioregulatorov a lipidových mediátorov, ktoré majú kľúčovú úlohu v patogenéze zápalových, nádorových, kardiovaskulárnych, neurodegeneratívnych a iných ochorení. Z primárnych metabolitov LOX cesty (hydroperoxy-eikosatetraénové kyseliny (HPETE) a hydroxyeikosatetraénové kyseliny (HETE)) sa tvoria bioaktívne lipidové mediátory – leukotriény, lipoxíny, hepoxilíny, eoxíny, resolvíny a protektíny<sup>3,4</sup>.

Miesto dioxygenácie dvojitej väzby v štruktúre PNMK určuje nomenklatúru cicavčích lipoxigenáz. Na základe polohovej špecifity sú lipoxigenázy kategorizované ako 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX a 15-LOX. Tieto izoenzýmy LOX sú polohovo a priestorovo špecifické, a tak sa výsledné eikosanoidy líšia nielen v polohe oxidácie, ale aj chiralitou, ktorá je kľúčovým faktorom ich biologickej aktivity<sup>5</sup>. U človeka sa nachádza šesť rôznych génov kódujúcich rôzne izoenzýmy LOX, a to *ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15*, *ALOX15B* a *ALOXE3*. Jednotlivé izoenzýmy LOX sa od seba odlišujú svojou funkciou a bunkovou a tkanivovou distribúciou<sup>6,7</sup>.

V súčasnosti sa výskum zameriava na vyhľadávanie terapeuticky účinných inhibítorov LOX s rôznym mechanizmom inhibičného účinku. V snahe nájsť selektívne a účinné LOX inhibítory sa testujú tak novo syntetizované zlúčeniny, ako aj sekundárne metabolity rastlín. Aktuálne sa pozornosť venuje rastlinným metabolitom zo skupiny fenolických látok (polyfenoly), ktoré preukazujú oxidoredukčné aktivity, ale môžu byť zapojené aj do štruktúrálnych a metabolických zmien v bunke v prípade rôznych ochorení.

Cieľom predloženej práce je hodnotenie významu biologickej úlohy polohovo a priestorovo špecifických izoenzýmov LOX, ich štruktúry, regulácie aktivity a génovej expresie pri vyhľadávaní účinných inhibítorov zo skupiny polyfenolov. Z hľadiska perspektívneho využitia prezentovaných LOX inhibítorov, ako potenciálnych terapeuticky účinných látok, je potrebné poznanie mechanizmu ich účinku, ktorý je diskutovaný ako integrálna súčasť tejto práce.

## 2. Význam izoenzýmov lipoxygenáz pri vyhľadávaní potenciálnych inhibítorov

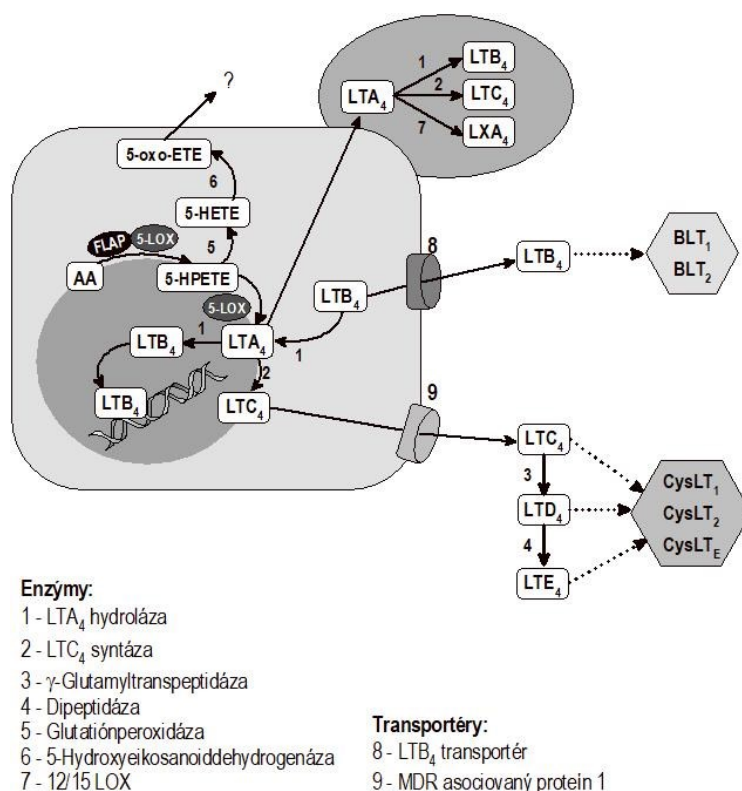
Pri štúdiu LOX je esenciálne objasnenie úloh ich metabolitov za fyziologických a patologických stavov. Dôležitý je vzťah medzi izoenzýmami LOX a ochoreniami, ako sú zápalové a nádorové procesy, ateroskleróza ale aj diabetes mellitus. K dispozícii je však málo informácií o vzťahoch medzi LOX metabolitmi a signálnymi molekulami, akým je napríklad nukleárny faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) patriaci medzi indukovateľné transkripčné faktory, ktoré regulujú imunitné a zápalové odpovede<sup>8</sup>. Kľúčová regulačná úloha LOX v spojení so signálnymi kaskádami ukazuje, že prostredníctvom molekúl inhibujúcich LOX možno prispieť k objasneniu rôznych patologických stavov<sup>8</sup>. Lipoxygenázy sa podieľajú na regulácii zápalových reakcií tvorbou prozápalových mediátorov, známych ako leukotriény a protizápalových mediátorov, označených ako lipoxíny<sup>9</sup>.

Z pohľadu štúdia biologickej aktivity lipoxygenáz a ich účasti na patologických procesoch sú významné ich polohovo a priestorovo špecifické formy, ktoré sú klasifikované ako 5-LOX (EC 1.13.11.34), 8-LOX (EC 1.13.11.40), 12-LOX (EC 1.13.11.31) a 15-LOX (EC 1.13.11.33) v závislosti na selektivitě ich oxygénácie MK (cit.<sup>10</sup>).

5-LOX vyžaduje k aktivácii malý membránový proteín FLAP (5-LOX aktivujúci proteín), s ktorým vytvára komplex. Enzým viazaný v tomto komplexe premieňa AA cez 5-HPETE a 5-HETE, na leukotrién A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) – epoxid s konjugovaným triénovým systémom. LTA<sub>4</sub> môže byť metabolizovaný na leukotrién LTB<sub>4</sub> alebo cysteinylleukotriény LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub> po konjugácii s glutatiónom. FLAP pôsobí na 5-LOX aktivitu alosterickým mechanizmom<sup>9,11</sup> (obr. 1). Ca<sup>2+</sup> ióny a adenozíntrifosfát (ATP) sú tiež aktivátormi 5-LOX (cit.<sup>12</sup>).

Enzým 8-LOX oxiduje AA za tvorby 8-HPETE. Ten sa následne redukuje na 8-HETE, ktorá je agonistom PPAR $\alpha$  receptorov (receptory aktivované proliferátormi peroxizomov)<sup>13</sup>. 8-LOX, prvotne objavená v epiderme myši, sa považuje za ortológ ľudskej 15-LOX2 na základe 78% sekvenčnej identity aminokyselín. 8-LOX a 15-LOX-2 sa nachádzajú v kožnom epiteli u ľudí aj u myši a sú tkanivovo a polohovo špecifické<sup>13</sup>.

12-LOX vytvára ako primárny produkt 12-HPETE, z neho sa tvorí 12-HETE a môžu vznikáť aj epoxy-MK (hepoxilíny)<sup>14</sup>. Sú známe 3 izoenzýmy, a to 12-LOX – leukocytový, trombocytový a epidermálny typ. Leukocytové a trombocytové typy 12-LOX sa líšia primárnou štruktúrou a tkanivovou špecifitou. Sú zapojené do zápalového procesu, hypertenzie a diabetes mellitus<sup>15</sup>. Aj ľudske bun-



Obr. 1. **Metabolická dráha kyseliny arachidónovej katalyzovaná 5-LOX;** V zápalovej bunke sa syntetizujú leukotriény, ktoré opúšťajú bunku prostredníctvom špecifických transportérov a aktivujú špecifické receptory<sup>11</sup>. AA – kyselina arachidónová; BLT<sub>1,2</sub> – receptory leukotriénu B<sub>4</sub>; CysLT<sub>1,2,E</sub> – cysteinylleukotriénové receptory; FLAP – proteín aktivujúci 5-LOX; HETE – kyselina hydroxyeikosatetraénová; HPETE – kyselina hydroperoxyeikosatetraénová; LOX – lipoxygenáza; LT – leukotrién; LX – lipoxín; MDR – viacnásobná lieková rezistencia; 5-oxo-EETE – kyselina 5-oxoeikosatetraénová

kové línie nádorov prostaty zvyšujú tvorbu 12-LOX, ktorá tak prispieva k rozvoju karcinómu prostaty u ľudí<sup>14</sup>.

Skupinu enzýmov 15-LOX je možné rozdeliť na dva typy: 15-LOX-1 a 15-LOX-2. Typ 15-LOX-1 sa pozoruje v leukocytoch a endotelových bunkách dýchacích ciest, zatiaľ čo 15-LOX-2 je prítomná v prostate, pľúcach, pečeni, obličkách a mozgu. Bunky indukované interleukínmi IL-4 a IL-13 vykazujú selektívne zvýšenie aktivity 15-LOX-1. Aktivita ľudskej epitelovej 15-LOX-2 je stimulovaná pri nádoroch epitelového tkaniva<sup>16</sup>. Pozornosť sa upriamuje na inhibítory 15-LOX ako potenciálne liečivá pre liečbu zápalových, alergických, kardiovaskulárnych a nádorových ochorení<sup>17,18</sup>. Vzhľadom k tomu, že retikulocytový typ 15-LOX je veľmi podobný 12-LOX typu leukocytov, označujú sa tieto enzýmy ako 12/15-LOX (cit.<sup>4</sup>).

12/15-LOX katalyzujú tvorbu aktívnych lipidových metabolitov, ktoré sa podieľajú na rozvoji diabetes mellitus typu 1 a typu 2, kardiovaskulárnych ochorení, ochorení obličiek a Alzheimerovej a Parkinsonovej choroby. Stimulácia 12/15-LOX bola popísaná v bazálnych gangliách centrálného nervového systému a jej metabolity 12-HETE a 15-HETE predstavujú druhých poslov v synaptickom prenos<sup>19,20</sup>.

Ľudský genóm obsahuje šesť funkčných génov pre LOX (*ALOX5*, *ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*), ktoré kódujú šesť rôznych LOX-izoenzýmov. Zatiaľ čo *ALOX5* gén je situovaný na chromozóme 10, všetky ostatné gény sú lokalizované na chromozóme 17. V genóme myši je sedem funkčných LOX génov<sup>20,21</sup>. Hoci LOX izoenzýmy katalyzujú rovnaký typ reakcie, inhibítory môžu rôznou mierou ovplyvňovať ich aktivitu. Napríklad inhibítor 5-LOX, ktorého cieľom je zabezpečiť antiastmatický účinok, nemá vplyv na aktivitu 12-LOX2. Táto funkčná multiplicita LOX vyžaduje vývoj inhibítorov špecifických voči danému izoenzýmu. Preto sa výskum orientuje na sledovanie izomorfných špecifít rôznych inhibítorov. Významná je aj príprava a používanie rekombinantných LOX (cit.<sup>3</sup>).

Mutagenetickými štúdiami, pri ktorých dochádza k zámene jednej alebo dvoch aminokyselín vo väzobných pozíciách aktívneho miesta LOX, sa potvrdil koncept triád s osobitným významom Leu353 a Ile593 ako kľúčových determinantov špecifity a bola dosiahnutá ako zmena aktivity, tak aj polohovej špecifity a preferencie substrátu (AA)<sup>4</sup>.

### 3. Polyfenoly – východisko pre výber molekúl s protizápalovým účinkom

Rastúci záujem o výskum polyfenolov z rastlinných zdrojov vychádza z ich pozitívnych účinkov na ľudský organizmus. Za fyziologických podmienok polyfenoly pôsobia prostredníctvom receptorov a bunkových signálnych kaskád.

Polyfenoly sú heterogénna skupina fenolických zlúčenín, výhradne rastlinného charakteru. V štruktúre ich molekuly je prítomný aspoň jeden aromatický kruh, na kto-

rom je jedna alebo viac hydroxylových skupín viazaných na alifatické alebo aromatické štruktúry.

#### 3.1. Klasifikácia a biologická aktivita

Fenolické zlúčeniny môžu byť rozdelené na flavonoidné a neflavonoidné<sup>22</sup>.

Flavonoidy sú široko distribuované, nízkomolekulové sekundárne metabolity rastlín. Tvoria veľkú skupinu polyfenolových zlúčenín s benzo- $\gamma$ -pyránovou štruktúrou. Sú zložené z dvoch aromatických kruhov spojených prostredníctvom kyslíkového heterocyklu. Biologická aktivita flavonoidov závisí od charakteru a polohy substituentov<sup>22</sup>. V závislosti od stupňa hydrogenácie a nahradenia heterocyklu sú ďalej rozdelené na flavanoly, flavóny, izoflavóny, antokyány, flavanoly a flavanóny<sup>23</sup>. Flavonoidy sa zvyčajne v prírode vyskytujú ako glykozidy. Kompetentný sacharid sa naviaže na uhlík C3, C5 alebo C7. Najčastejším monosacharidom, ktorý sa pripája, je glukóza, ale tiež je to aj galaktóza, xylóza, arabinóza a ramnóza<sup>23</sup>. Flavonoidy normalizujú priechodnosť ciev a kapilár, zlepšujú prietok krvi, znižujú koncentráciu cholesterolu v krvi, znižujú lámavosť ciev, majú hepatoprotektívny, vazodilatačný, antitrombotický, protinádorový, antiflogistický a imunomodulačný účinok. Patria medzi významné antioxidanty a vďaka týmto vlastnostiam môžu predchádzať vzniku zápalových, kardiovaskulárnych, nádorových a iných ochorení<sup>24,25</sup>. Flavonoidy sú využívané v tradičnom i modernom lekárstve. Cenným zdrojom takýchto biologicky účinných látok sú liečivé rastliny<sup>24</sup>.

Do skupiny neflavonoidov patria fenolické kyseliny, napr. hydroxylované deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej. Medzi najvýznamnejšie deriváty kyseliny hydroxyškoricovej patrí kyselina *p*-kumarová, kávová a ferulová, ktoré sa vyskytujú glykozylované alebo vo forme jednoduchých esterov. Vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou súvisia s typom a počtom funkčných skupín na aromatickom jadre (-COOH, -CHO, -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>3</sub>, -COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sup>26</sup>. Derivátmi fenolických kyselín sú aj stilbény, taníny, ligníny, kurkuminoidy a iné<sup>27</sup>.

#### 3.2. Štruktúrne črty polyfenolov vo vzťahu k protizápalovej aktivite

Prepojenie medzi fenolickou štruktúrou a protizápalovou aktivitou zohráva významnú úlohu vo vývoji nových liečiv. Boli definované základné štruktúrne požiadavky, ktoré by mali zabezpečiť účinnú protizápalovú aktivitu<sup>7,28</sup>:

- planárny kruhový systém,
- prítomnosť karbonylovej skupiny v pozícii C4 a C2-C3 a dvojité väzby v kruhu C,
- hydroxylové skupiny v pozíciách C5 a C7 kruhu A,
- dôležitý je počet a poloha hydroxylových skupín a ich *ortho*-pozícia na kruhu B.

Zároveň sa zistilo, že flavóny a flavanoly, ktoré majú hydroxylové skupiny v pozícii 4'- na kruhu B, ukázali vyššiu protizápalovú aktivitu než tie, ktoré ich nemajú.

## 4. Inhibícia lipoxygénáz polyfenolmi – vzťah štruktúry a účinku

### 4.1. Mechanizmy inhibície

Vzhľadom k tomu, že izoenzýmy LOX sú zakomponované do patogenézy rôznych ochorení, vyhľadávanie inhibítorov LOX je predmetom záujmu medicínskeho a farmaceutického výskumu.

Ako inhibítory LOX boli testované rôzne syntetické molekuly a niektoré boli zavedené do terapeutickú praxe. V liečbe bronchiálnej astmy a alergickej rinitídy sa uplatnili montelukast, zafirlukast a pranlukast, ktoré sú inhibítory cysteinyl leukotriénových (CysLT) receptorov. Zileuton, inhibítor 5-LOX, bol schválený ako antiastmatikum, ale vzhľadom na jeho nepriaznivé farmakokinetické hodnotenia nedosiahol širokého rozšírenia<sup>9,30</sup>. Na druhej strane, rastlinné sekundárne metabolity sú historicky overené tak v ľudovom liečiteľstve, ale aj v modernej medicíne, a sú alternatívnym prístupom v modulácii patologických procesov<sup>9</sup>. Zo skupiny polyfenolov sú v centre pozornosti flavonoidy, fenolické kyseliny a ich deriváty (stilbény, kurkumín a iné). Vo fyziologických systémoch pôsobia prostredníctvom receptorov a bunkových signálnych kaskád<sup>31</sup>. Štúdie zároveň dokázali, že inhibícia závisí od oxidačného stupňa nehémového železa v aktívnom mieste enzýmu. Mechanizmus inhibície LOX flavonoidmi sa vysvetľuje tým, že elektrón pochádzajúci z flavonoidnej štruktúry prijme  $Fe^{3+}$  forma LOX, dochádza k jej redukcii na  $Fe^{2+}$  a tým aj k inhibícii enzýmu<sup>32</sup>.

Podľa mechanizmu inhibície môžu byť inhibítory LOX rozdelené do nasledovných skupín. Mnoho inhibíto-

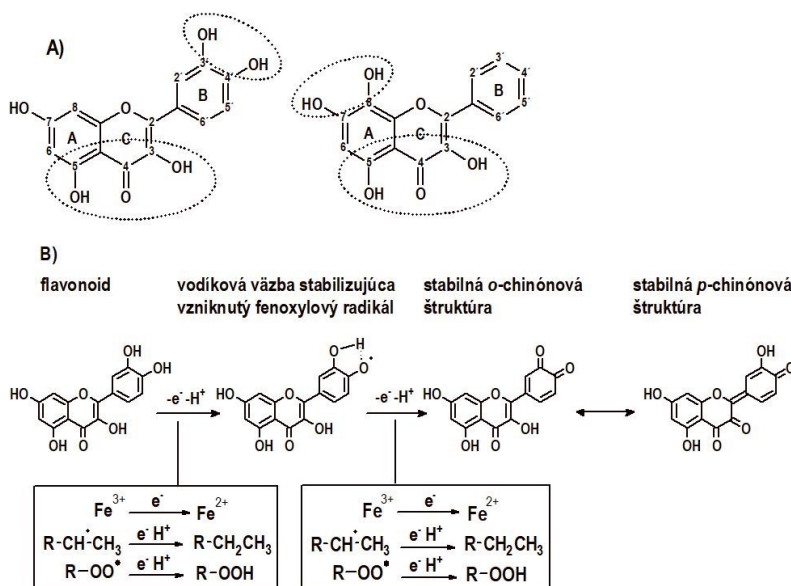
rov však vykazuje viac typov inhibičných mechanizmov súčasne<sup>33</sup>.

### 4.2. Redoxné inhibítory

Keďže v priebehu lipoxygénázovej reakcie vznikajú voľné radikály peroxidov, predstavuje použitie antioxidantov vhodnú cestu prirodzenej inhibície LOX neutralizáciou radikálov generovaných procesom lipidovej peroxidácie<sup>34</sup>. Redoxné inhibítory pôsobia ako antioxidanty pri oxidatívnej reakcii uskutočnenej LOX. Okrem redoxných vlastností je pre ich aktivitu určujúca i lipofilita<sup>9</sup>. Zlúčeniny s antioxidantnými vlastnosťami sú teda zväčša látky lipofilného charakteru s aromatickým fenolovým kruhom vo svojej štruktúre, ktorý podlieha oxidácii na chinóny. Súčasne redukujú atóm železa v aktívnom mieste enzýmu a tak bránia iniciácii LOX katalyzovanej reakcie. Z rastlinných antioxidantov sú známe flavonoidy, kyselina kávová a kumaríny. Podmienkou zachovania antioxidantnej aktivity flavonoidov je prítomnosť hydroxylových skupín v polohách C5, C6, C7 a C8 kruhu A (cit.<sup>9</sup>) (obr. 2).

### 4.3. Inhibítory viažuce ión železa

Do tejto skupiny inhibítorov patria zlúčeniny schopné chelatacie iónu železa v aktívnom mieste enzýmu a/alebo redukcie aktívnej  $Fe^{3+}$  obsahujúcej formy na neaktívnu  $Fe^{2+}$  formu. To znamená, že inhibítory sa môžu kovalentne viazať na ión železa alebo tvoria molekulárne komplexy blokujúce prístup k železu<sup>33</sup>. *In vivo* aktivita inhibítorov môže závisieť od izoenzýmov LOX, ale aj od oxidačného stavu iónu železa<sup>35</sup>. K inhibícii enzýmu dochádza v jeho aktívnom centre naviazaním inhibítora na atóm železa za



Obr. 2. **A)** Podmienky pre antioxidantnú aktivitu polyfenolov – blízkosť dvoch hydroxylových funkčných skupín alebo hydroxylovej a oxo-skupiny; **B)** Mechanizmus antioxidantnej aktivity polyfenolov – poskytnutie elektrónu, ktorý redukuje železitý kation a neutralizuje radikálové medziproduky

tvorby chelátu. Do tejto skupiny inhibítorov patria flavonoidy, kurkumín a zlúčeniny, ktoré v molekule obsahujú *N*-hydroxymočovinu (zileuton)<sup>29,30</sup>.

#### 4.4. Analógy substrátov/produktov

Medzi vysoko selektívne a účinné inhibítory LOX patria zlúčeniny súťažiaci s AA o väzbu na aktívne miesto enzýmu – kompetitívne inhibítory. Jedná sa o látky, ktoré sú štruktúrne podobné substrátom LOX. Medzi analógy AA patria ETIA (kyselina all-*cis*-5,8,11-eikosatriénová) a ETYA (kyselina all-*cis*-5,8,11,14-eikosatetraénová). Z rastlinných obsahových látok tiež kurkumín, štruktúrne podobný substrátu, je kompetitívnym inhibítorom izoenzýmov LOX (cit.<sup>36</sup>).

Zlúčeniny, ktoré sa štruktúrou podobajú produktom LOX reakcie sú inhibítory, ktoré pôsobia mechanizmom spätnej inhibície. Sem patria 15-HETE; 5-HETE-laktón; 5,6-metano-LTA<sub>4</sub> a metoxyalkyltiazol<sup>37</sup>.

#### 4.5. Alosterické inhibítory

Tento typ inhibície bol objavený pri *in vitro* inhibíciách sójovej LOX1 ale aj humánnej 15-LOX zlúčeninou oleylsulfát. Oleylsulfát sa viaže na alosterické miesto enzýmu, čo spôsobí zmenu konformácie enzýmu a deformáciu aktívneho miesta<sup>38</sup>.

#### 4.6. FLAP (aktivátor 5-LOX) a jeho inhibítory

FLAP je proteín aktivujúci 5-LOX, ktorý sa podieľa na transporte a na vhodnej orientácii AA k 5-LOX. Medzi FLAP inhibítory sa zaraďujú zlúčeniny, ktoré selektívne inhibujú FLAP bez priameho ovplyvnenia aktivity 5-LOX, pričom znemožňujú uľahčený prenos substrátu k 5-LOX. Patrí sem zlúčenina MK-866 prvýkrát zavedená skupinou vedcov pod vedením Johna Gillarda<sup>39</sup>.

#### 4.7. Duálne inhibítory

Zaujímavé sú snahy získať zlúčeniny, ktoré umožňujú súčasnú inhibíciu aktivity LOX a cyklooxygenázy a dosiahnuť zvýšenie ich antiflogistického, antidiabetického a protinádorového účinku. Tieto inhibítory sa nazývajú duálne inhibítory a vyznačujú sa synergickými účinkami. Duálne inhibítory sú nesteroidné antiflogistiká (NSAID), pyrazolinové a pyrolizinové deriváty, deriváty tiofénu a iné<sup>40</sup>.

#### 4.8. Inhibítory cysteinylových receptorov

Cysteinylleukotrién (CysLT) je jedným z prozápalových mediátorov. CysLT pôsobí prostredníctvom špecifických receptorov spolupracujúcich s G-proteínmi. Antagonisty CysLT1 receptorov, ktoré sú už uvedené v medicínskej praxi (montelukast, zafirlukast, pranlukast, ibudilast) obsadzujú väzbové miesta cys-leukotriénov, čím tlmia nástup astmatických záchvatov<sup>41</sup>.

Zo štruktúrnych vlastností fenolických látok vyplýva aj ich schopnosť inhibovať aktivitu polohovo špecifických LOX. Existuje mnoho prác, ktoré sa zameriavajú na sledovanie vplyvu rastlinných biologicky aktívnych látok typu polyfenolov na aktivitu LOX. Aj na našom pracovisku sa venujeme štúdiu antilipoxygenázovej aktivity sekundárnych metabolitov rastlín v modeloch diabetes mellitus a reumatoidnej artritídy. V publikovaných prácach sme testovali vplyv flavonoidov izolovaných z *Calendula officinalis* L. (cit.<sup>42</sup>), fenylypropanoidov *Ligustrum vulgare* L. (cit.<sup>43</sup>) a kurkumínu<sup>44</sup> na aktivitu LOX. Doteraz nepublikovanými výsledkami sme dosiahli inhibíciu rekombinantnej 12/15 LOX použitím modifikovaných flavonoidov.

## 5. Záver

Mnohé štúdie sa venujú syntéze a hodnoteniu účinku rôznych chemických zlúčenín, ktoré pôsobia ako inhibítory LOX. Vzhľadom na existenciu izoenzýmov LOX, ktoré sú polohovo a tkanivovo špecifické, sa ukazuje, že vývoj selektívneho inhibítora je náročný. Funkčná multiplicita LOX vyžaduje vývoj inhibítorov špecifických voči izoenzýmom. Preto sa výskum orientuje na sledovanie izomorfnej špecifity rôznych inhibítorov. Existuje obmedzený počet úspešných liečiv, ktoré sa môžu použiť na terapeutické účely.

Polyfenoly, sekundárne metabolity rastlín, sa vyznačujú efektívnou antilipoxygenázovou aktivitou, pričom môžu pôsobiť ako antioxidanty a zhašáče voľných radikálov. Z hľadiska možnosti ich využitia ako selektívnych inhibítorov izoenzýmov LOX je podstatné študovať mechanizmus inhibície LOX. Perspektívne hľadanie optimálnych inhibítorov vyžaduje aj objasnenie štruktúry a úloh LOX pri rôznych ochoreniach. Vývoj zvieracích modelov, príprava purifikovaných a rekombinantných enzýmov a ciele mutácie sú cesty k lepšiemu pochopeniu úloh LOX. Toto môže byť dôležitým nástrojom pri vyhľadávaní terapeuticky účinných látok.

#### Zoznam skratiek

|       |  |
|-------|--|
| AA    | kyselina arachidónová  |
| CysLT | cysteinylleukotrién  |
| ETIA  | kyselina all- <i>cis</i> -5,8,11-eikosatriénová                          |
| ETYA  | kyselina all- <i>cis</i> -5,8,11,14-eikosatetraénová                     |
| FLAP  | five-lipoxygenase activating protein (proteín aktivujúci 5-lipoxygenázu) |
| HETE  | hydroxyeikosatetraénové kyseliny   |
| HPETE | hydroperoxyeikosatetraénové kyseliny                                     |
| IL    | interleukín  |
| LA    | kyselina linolová  |
| LOX   | lipoxygenáza   |
| LT    | leukotrién   |
| MK    | masné kyseliny   |
| NF-κB | nukleárny faktor kappa B   |
| NSAID | nesteroidné antiflogistiká   |
| PNMK  | polynenasýtené masné kyseliny  |
| PPARα | α-receptor aktivovaný proliferátormi peroxizómov                         |

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov VEGA 1/0394/18, VEGA 1/0290/16, VEGA 1/0463/18, 2/0115/19 a APVV-15-0308.

## LITERATÚRA

- Valentine R. C., Valentine D. L.: *Prog. Lipid Res.* 43, 383 (2004).
- Tootle T. L.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1629 (2013).
- Kuhn H., Banthiya S., Leyen K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 308 (2015).
- Pekárová M., Kuhn H., Bezáková L., Ufer C., Heydeck D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 571, 50 (2015).
- Ivanov I., Heydeck D., Hofheinz K., Roffeis J., O'Donnell V. B., Kuhn H., Walter M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 503, 161 (2010).
- Horn T., Kakularam K. R., Anton M., Richter C., Reddana P., Kuhn H.: *Redox Biol.* 1, 566 (2013).
- Rådmark O., Werz O., Steinhilber D., Samuelson B.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 331 (2015).
- Yamamoto Y., Gaynor R. B.: *Curr. Mol. Med.* 1, 287 (2001).
- Wisastra R., Dekker F. J.: *Cancers* 6, 1500 (2014)
- Liavonchanka A., Feussner I.: *J. Plant Physiol.* 163, 348 (2006).
- Poeckel D., Funk C. D.: *Cardiovasc. Res.* 86, 243 (2010).
- Horn T., Adel S., Schumann R., Sur S., Kakularam K. R., Polamarasetty A., Reddanna P., Kuhn H., Heydeck D.: *Prog. Lipid Res.* 57, 13 (2015).
- Jisaka M. a 10 spoluautorov: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 136 (2005).
- Dobrian A. D., Lieb D. C., Cole B. K., Taylor-Fishwick D. A., Chacrabarti S. K., Nadler J. L.: *Prog. Lipid Res.* 50, 115 (2011).
- Rapp J.: *Dissertation*. The University of Toledo, Toledo, USA, 2006.
- Jameson J. B., Kantz A., Schultz L., Kalyanaram C., Jacobson M. P., Maloney D. J., Jadhav A., Simeonov A., Holman T. R.: *PLoS One* 9, e104094 (2014).
- Joo Y. C., Oh D. K.: *Biotechnol. Adv.* 30, 1524 (2012).
- Balistreri C. R. (ed.): *Eicosanoids, Inflammation and Chronic Inflammatory Diseases: Pathophysiology, Health Effects and Targets for Therapies*. Nova Science Publisher, New York 2015.
- Sun L., Xu Y. W., Hang J., Liang H., Wang N., Cheng Y.: *J. Lipid. Res.* 56, 502 (2015).
- Mashima R., Okuyama T.: *Redox Biol.* 6, 297 (2015).
- Szefel J., Piotrowska M., Kruszewski W. J., Jankun J., Lysiak-Szydłowska W., Skrzypczak-Jankun E.: *Curr. Mol. Med.* 11, 13 (2011).
- Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A.: *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14950 (2013).
- Pietta P. G.: *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
- Mojžiš J., Mojžišová G.: *Flavonoidy a ich biologické účinky*, Viena Košice, Košice 2001.
- Allgrove J. E., Davison G., v knihe: *Polyphenols in Human Health and Disease* (Watson R. R., Preedy V. R., Zibadi S., ed.), kap. 19, str. 241. Academic Press, San Diego 2014.
- Kumar N., Pruthi V.: *Biotechnol. Rep. (Amst.)* 4, 86 (2014).
- Ambriz-Pérez D. L., Bang W. Y., Nair V., Angulo-Escalante M. A., Cisneros-Zevallos L., Heredia J. B.: *J. Agric. Food Chem.* 64, 1899 (2016).
- Gautam R., Jachak S. M.: *Med. Res. Rev.* 29, 767 (2009).
- Theron A. J., Steel H. C., Tintinger G. R., Gravett C. M., Anderson R., Feldman C. J.: *Immunol. Res.* 2014, 608930 (2014).
- Rossi A., Pergola C., Koeberle A., Hoffmann M., Dehm F., Bramanti P., Cuzzocrea S., Werz O., Sautebin L.: *Br. J. Pharmacol.* 161, 555 (2010).
- Aggarwal B. B., Harikumar B. K.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40 (2009).
- Herre S., Schadendorf T., Ivanov I., Herrberger C., Steinle W., Braun K., Preissner R., Kuhn H.: *ChemBioChem* 7, 1089 (2006).
- Skrzypczak-Jankun E., Chorostowska-Wymimko J., Selman S., Jankun J.: *Curr. Enzyme Inhib.* 3, 119 (2007).
- Bezáková L., Holková I., Balážová A., Obložinský M., Mikuš P.: *Chem. Listy* 111, 567 (2017).
- Chedea V. S., Jisaka M.: *Afr. J. Biotechnol.* 12, 2786 (2013).
- Skrzypczak-Jankun E., McCabe N. P., Selman S. H., Jankun J.: *Int. J. Mol. Med.* 5, 521 (2000).
- Mogul R., Johanson E., Holman T. R.: *Biochemistry* 39, 4801 (2000).
- Walther M., Hofheinz K., Vogel R., Roffeis J., Kuhn H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 516, 1 (2011).
- Gillard J. a 27 spoluautorov: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 456 (1989).
- Yoshimoto T., Takahashi Y.: *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 245 (2002).
- Konstan M. W., Doring G. G., Heltshe S. L., Lands L. C., Hilard K. A., Koker P., Bhattacharya S., Hamilton A.: *J. Cystic Fibrosis* 13, 148 (2014).
- Bezáková L., Mašterová I., Pauliková I., Pšenák M.: *Pharmazie* 51, 126 (1996).
- Mučaji P., Záhradníková A., Bezáková L., Cupáková M., Rauová D., Nagy M.: *Molecules* 16, 8198 (2011).
- Bezáková L., Košťálová D., Obložinský M., Hoffman P., Pekárová M., Kollárová R., Holková I., Mošovská S., Šturdík E.: *Čes. Slov. Farm.* 63, 26 (2014).

**L. Bezáková<sup>a</sup>, A. Balažová<sup>a</sup>, I. Holková<sup>a</sup>, M. Obložinský<sup>a</sup>, K. Bauerová<sup>c</sup>, and P. Mikuš<sup>b</sup>**  
(<sup>a</sup>*Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava,* <sup>b</sup>*Department of Pharmaceutical Analysis and Nuclear Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava,* <sup>c</sup>*Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Centre of Experimental Medicine Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Animal Lipoxygenases – Polyphenols as Potential Lipoxygenase Inhibitors**

Lipoxygenases belong to the multigene family of dioxygenases containing non-heme iron in the active site of the enzyme. They catalyze the stereospecific insertion of molecular oxygen into the *cis,cis*-1,4-pentadiene configuration of polyunsaturated fatty acids, thus forming corresponding hydroperoxides which serve as starting compounds for the synthesis of leukotrienes and lipoxins, i.e., mediators of allergic and inflammatory diseases. Based on their positional specificity, lipoxygenases are categorized as 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX and 15-LOX isoenzymes, which differ not only in the position of oxidation but also in the chirality, essential for their biological activity. Increased expression of genes for lipoxygenase in the pathogenesis of inflammatory, cardiovascular or cancer diseases, but also diabetes mellitus and other diseases, has prompted considerable research efforts toward finding new

effective inhibitors applicable in the therapy. Furthermore, in addition to the searching for new selective inhibitors of LOX isoenzymes, the current attention is also focused on plant secondary metabolites, particularly from the group of polyphenols. For the application of medicinal plants containing polyphenols, the isolation and characterization of their biologically active compounds and study of the mechanism of their lipoxygenase inhibitory activity is a way to succeed. The use of LOX as a model enzyme in the search for effective inhibitors requires consideration of the functional multiplicity of the enzyme and the selection of inhibitors specific for LOX isoenzymes. The preparation of purified and recombinant forms and targeted mutations of LOX coding genes could be the way of obtaining potential therapeutically active agents.

**Keywords:** animal lipoxygenases, polyunsaturated fatty acids, lipoxygenase inhibitors, plant secondary metabolites, polyphenols, biological activity

#### *Acknowledgements*

*This work was supported by grants from the Slovak Scientific Grant Agency (Grant numbers: VEGA 1/0394/18, 1/0290/16, 1/0463/18, 2/0115/19) and Slovak Research and Development Agency (Grant Number: APVV-15-0308).*