



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**  
**Λευκαντικά-«Skin Lighteners» και Αντιοξειδωτική Δράση**

Της

**Ιωάννας Μπαλλή**

A.M: AK202134

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**Επιβλέπων:** Βαρβαρέσου Αθανασία, Καθηγήτρια



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

**Master of Science in**  
Advanced Aesthetics and Cosmetic Science: Development-QualityControl  
and Safety of new cosmetic products

**Master Thesis**  
**Whitening Agents-«Skin Lighteners» and Antioxidant Action**

**By**

**Balli Ioanna**

Registration Number of Student in the Program: AK202134

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the  
Master's Degree in the Department of Biomedical Sciences  
of the University of West Attica

**Supervisor:** Varvaresou Athanasia, Professor

Athens, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**  
«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**  
**Λευκαντικά-«Skin Lighteners» και Αντιοξειδωτική Δράση**  
Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
	Βαρβαρέσου Αθανασία	Καθηγήτρια, ΠΑΔΑ	
	Γκόνος Ευστάθιος	Ερευνητής, Γενικός Διευθυντής Ινστιτούτου Παστέρ	
	Τράπαλη Μαρία	Λέκτορας, ΠΑΔΑ	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **ΜΠΑΛΛΗ ΙΩΑΝΝΑ** του **ΓΕΩΡΓΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **ΑΚ202134** φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων” του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών” της Σχολής “Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας” του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

**ΜΠΑΛΛΗ ΙΩΑΝΝΑ**

**Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα**  
(Υπογραφή)



Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica

All rights reserved



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## Λευκαντικά-«Skin Lighteners» και Αντιοξειδωτική Δράση

ΜΠΑΛΛΗ ΙΩΑΝΝΑ

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 2022

Οι ουσίες με αντιοξειδωτική δράση και οι ενώσεις λεύκανσης του δέρματος «skin lighteners», κρίνονται χρήσιμες για τον έλεγχο του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με την εξωγενή γήρανση αλλά και με τις διαταραχές μελάγχρωσης αντίστοιχα. Κύριος στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη για την κατανόηση των διαδικασιών που σχετίζονται με τα αντιοξειδωτικά μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό, η ανάλυση του ρόλου της μελανίνης και της ρύθμισής της στο υγιές ή στο παθολογικό δέρμα αλλά και η προσπάθεια εύρεσης του τρόπου της μεταξύ τους συσχέτισης. Προκειμένου να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων PubMed, Google Scholar και Scopus, όπου με την χρήση των «λέξεων κλειδιών» συγκεντρώθηκε η επιθυμητή και βοηθητική πληροφορία προς εξέταση. Η πληθώρα των -κατά κύριο λόγο- οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη βιοσύνθεση και έκφραση της μελανίνης στο δέρμα, αποτελεί ένδειξη ότι μια αντιοξειδωτική ουσία είναι πιθανό να παρέμβει στην μελανογένεση ή ότι μια ουσία που ρυθμίζει κάποιο στάδιο της μελανογένεσης θα μπορούσε να έχει δράση κατά των ελευθέρων ριζών. Η τυροσινάση, το ένζυμο-κλειδί της βιοσύνθεσης της μελανίνης, διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην παρούσα εργασία διότι μέσω της παρεμπόδισής της, ρυθμίζεται η μελάγχρωση. Επιπλέον, προκειμένου να είναι λειτουργική αποκτά διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις και συμμετέχει σε πολυάριθμες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, κάτι που εγείρει το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη ως προς την επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών σε αυτή. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν βιβλιογραφικά και ομαδοποιήθηκαν χημικά 100 ενώσεις, στην προσπάθεια συσχέτισης αντιοξειδωτικής δράσης, λευκαντικής για το δέρμα δράσης «skin lightening» και αντι-τυροσινάσης δράσης.

**Λέξεις κλειδιά:** αντιοξειδωτικά, οξειδωτικό στρες, λευκαντικοί παράγοντες, skin lightening, τυροσινάση, αναστολείς τυροσινάσης, βιοσύνθεση μελανίνης, υπερμελάγχρωση, διαταραχές μελάγχρωσης, μέλασμα, μελάνωμα, λεύκη, ορμονική μελάγχρωση

# ABSTRACT

## Whitening Agents-«Skin Lighteners» and Antioxidant Action

IOANNA BALLI

Department of Biomedical Sciences

University of West Attica, 2022

Substances with antioxidant activities and skin whitening compounds -«Skin Lighteners» are considered useful for the control of oxidative stress associated with exogenous aging and pigmentation disorders respectively. The main goal of this Master dissertation is the in-depth study and understanding of the processes related to antioxidants in the human body, the analysis of the role of melanin and its regulation in healthy or abnormal skin and the effort to find the correlation between all the above mentioned. In order to achieve the above goal, the PubMed, Google Scholar and Scopus databases were used. With the aim of the "keywords", all the desired and helpful information for examination were gathered. Each article that was of interest and selected to support the specific thesis, was studied and analyzed in depth. The plethora of -mainly- redox reactions that occur during the biosynthesis and expression of melanin in the skin, is an indication of how an antioxidant is likely to interfere with melanogenesis or that a substance that regulates some stage of melanogenesis could have action against free radicals. Tyrosinase, the key enzyme in melanin biosynthesis, plays an important role in this dissertation because its inhibition could lead to regulated pigmentation. In addition, in order for Tyrosinase to be functional, it acquires various oxidative states and participates in numerous redox reactions, which raises the interest for further study regarding the effect of antioxidants on it. In this work, 100 compounds were studied bibliographically and were chemically grouped, in an attempt to correlate antioxidant activity, skin «skin lightening» and anti-tyrosinase activity

**Keywords:** antioxidants, oxidative stress, bleaching agents, tyrosinase, tyrosinase inhibitors, melanin biosynthesis, hyperpigmentation, pigmentation disorders, melasma, melanoma, vitiligo, hormonal pigmentation

## Αφιέρωση

Στην οικογένεια, τους φίλους και την καθηγήτριά μου, που με στήριξαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας





## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Αθανασία Βαρβαρέσου για την ευκαιρία που μου δόθηκε να μελετήσω εις βάθος ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα με σκοπό να συμβάλω με τον τρόπο μου στην περαιτέρω κατανόηση και επεξήγησή του.

Επιπλέον, την ευχαριστώ που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας με εύστοχες παρατηρήσεις, διορθώσεις και ενθαρρυντικές συζητήσεις. Ελπίζω να ανταπεξήρθα των προσδοκιών της και να μπορέσουμε να συνεργαστούμε και στο μέλλον.



# Βιβλιογραφικό CV

ΜΠΑΛΛΗ ΙΩΑΝΝΑ

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών  
«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος  
και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»

Τίτλος: Λευκαντικά-«Skin Lighteners» και Αντιοξειδωτική Δράση

Επιστημονικό Πεδίο: Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία

Βιογραφικά Στοιχεία: Χημικός, Research & Development Chemist σε εταιρεία  
δερμοκαλλυντικών

Προσωπικά Στοιχεία: Άγαμη

Εκπαίδευση: Πτυχίο τμήματος Χημείας, Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2019

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών «Προχωρημένη  
Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων  
καλλυντικών προϊόντων» στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών  
Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, τον Οκτώβριο 2022.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Αθανασία Βαρβαρέσου

# Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
Αφιέρωση	8
Ευχαριστίες	9
Βιογραφικό CV	10
Πίνακας Περιεχομένων	11-13
Κατάλογος Συντομογραφιών	14-16
Κατάλογος Εικόνων	17-18
Εισαγωγή και Σκοπός της εργασίας	19-21
Κεφάλαιο 1. Αντιοξειδωτικά	22-32
1. Εισαγωγή	22
1.1 Ενδογενείς Παράγοντες Παραγωγής ROS	22-23
1.2 Εξωγενείς Παράγοντες Παραγωγής ROS	23-24
1.3 Ελεύθερες Ρίζες, Δραστικές μορφές Οξυγόνου & Οξειδωτικό Στρες	24-25
1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί	25-28
1.4.1 Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα	26
1.4.1.1 Συνδυαστική δράση Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (Superoxide dismutase, SOD) και Καταλάσης (Cat)	26
1.4.1.2 Υπεροξειδάση (Glutathione peroxidase GPx) και Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione reductase, GR)	26
1.4.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα	26-28
1.4.2.1 Γλουταθειόνη/Δισουλφίδιο Γλουταθειόνης (GSH/GSSG)	26-27
1.4.2.2 α-Λιποϊκό Οξύ	27
1.4.2.3 Ουβικινόλη/Ουβι-ημικινόνη/ουβικινόνη (Συνένζυμο Q10)	27
1.4.2.4 Βιταμίνη C, L-Ασκορβικό /Ημιδεϋδροασκορβικό/ Δεϋδροασκορβικό Οξύ (Ascorbic acid/semi-Dehydroascorbic acid/Dehydroascorbic acid, Asc/SDA/DHA)	27-28
1.4.2.5 Βιταμίνη E ή DL-α-Τοκοφερόλη	28
1.5 Επιδιορθωτικά Ένζυμα	29
1.6 Μέθοδοι Εκτίμησης Αντιοξειδωτικής Δράσης	29-32
1.6.1 Μέθοδος DPPH	29-30
1.6.2 Μέθοδος ORAC	30-31
1.6.3 Μέθοδος FRAP	31-32
Κεφάλαιο 2. Λευκαντικά	33-58
2. Εισαγωγή	33-34
2.1 Βιοσύνθεση Μελανίνης	34-38
2.1.1 Χρωστική Μελανίνη	34-35
2.1.2 Διάκριση Φωτοτύπων	35-36

2.1.3	Μελανινοκύτταρα και Μελανοσώματα .....	36-38
2.2	Ένζυμα της μελανογένεσης .....	39-45
2.2.1	Τυροσινάση .....	39-42
2.2.2	Παρεμπόδιση της μελανογένεσης .....	42-43
2.2.3	Αναστολή της τυροσινάσης .....	43-45
2.3	Κατηγορίες ενώσεων με λευκαντική -skin lightening δράση .....	46-57
2.3.1	Πολυφαινόλες .....	46-50
2.3.1.1	Φλαβονόλες .....	46
2.3.1.2	Φλαβόνες, Φλαβανόνες και Φλαβανόλες .....	46-47
2.3.1.3	Ισοφλαβονοειδή .....	47-48
2.3.1.4	Χαλκόνες .....	48-49
2.3.1.5	Στιλβένια .....	50
2.3.2	Κουμαρίνες .....	50
2.3.3	Βενζαλδεΐδες και Βενζοϊκά παράγωγα .....	50-51
2.3.4	Μακράς Αλυσίδας Λιπίδια και Στεροειδή .....	52-53
2.3.5	Άλλοι αναστολείς τυροσινάσης από φυσικές πηγές .....	53-54
2.3.6	Άλλοι αναστολείς τυροσινάσης από συνθετικές πηγές .....	54-55
2.3.7	Νέοι Αναστολείς τυροσινάσης .....	56-57
2.4	Μέθοδοι αξιολόγησης της ανασταλτικής δράσης ουσιών ως προς την τυροσινάση .....	57-58
Κεφάλαιο 3. Παθήσεις που σχετίζονται με την μελάγχρωση .....		59-77
3.	Εισαγωγή .....	59
3.1	Μέλασμα .....	59-62
3.1.1	Παθογένεια .....	60-61
3.1.2	Αντιμετώπιση .....	62
3.2	Ορμονικό σύστημα και μελάγχρωση .....	62-64
3.2.1	Επιδράσεις των οιστρογόνων στα μελανοκύτταρα .....	63-64
3.2.2	Επιδράσεις της προγεστερόνης στα μελανοκύτταρα .....	64
3.3	Μελάνωμα .....	64-71
3.3.1	Τέσσερεις τύποι του μελανώματος .....	65-66
3.3.2	Ρόλος της μελανίνης στο μελάνωμα .....	66-68
3.3.3	Σημασία του οξειδωτικού στρες στο μελάνωμα .....	68-69
3.3.4	Συσχέτιση αντιοξειδωτικής και λευκαντικής δράσης φαινολικών ενώσεων σε κύτταρα μελανώματος .....	69-71
3.4	Λεύκη .....	71-75
3.4.1	Επιδημιολογία .....	72
3.4.2	Παθογενετικοί μηχανισμοί και κληρονομικότητα .....	72-74
3.4.3	Κλινική εικόνα .....	74-75
3.5	Αλφισμός .....	75-77
3.5.1	Τύποι Αλφισμού .....	75-77
3.5.2	Διάγνωση .....	77
Κεφάλαιο 4. Οξειδωτικό στρες και διαταραχές μελάγχρωσης .....		78-92
4.	Εισαγωγή .....	78
4.1	Τυροσινάση και οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις .....	78-79

4.2 Μελανίνη και Οξειδωτικό στρες .....	79-80
4.3 Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικής άμυνας στα μελανοκύτταρα από παρακρινικούς παράγοντες .....	80-82
4.4 Επίδραση εξωγενών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε παθήσεις που σχετίζονται με τη μελάγχρωση .....	82-92
4.4.1 Η συμβολή της υδροκινόνης και των φαινολών στην ρύθμιση της μελάγχρωσης .....	83-84
4.4.2 Η συμβολή των φλαβονοειδών στην ρύθμιση της μελάγχρωσης	
4.4.3 Η συμβολή του L-Ασκορβικού οξέος και του Μαγνησίου-L-Ασκόρβυλ-2 φωσφορικού στην ρύθμιση της μελάγχρωσης ....	84-85
4.4.4 Η πιθανή συμβολή της γλουταθειόνης στην ρύθμιση της μελάγχρωσης .....	85-88
4.4.5 Η συμβολή της ρεσβερατρόλης στην ρύθμιση της μελάγχρωσης	88-89
4.4.6 Η συμβολή των λευκαντικών δραστικών στο μικροβίωμα της επιδερμίδας .....	89-92
4.4.6.1 Η σχέση της μελανίνης με το μικροβίωμα .....	91-92
Συμπεράσματα .....	93-96
Αντί Επιλόγου .....	97-98
Παράρτημα 1 .....	99-107
Βιβλιογραφία .....	108-128

## Κατάλογος Συντομογραφιών

**FR** Free Radicals

**ROS** Reactive Oxygen Species

**ATP** Adenosine Triphosphate

**NADPH** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

**SOD** Superoxide Dismutase

**GPx** Glutathione Peroxidase

**GR** Glutathione Reductase

**GSH** Glutathione

**Cat** Catalase

**GSSG** Glutathione Disulfide

**ASA** Ascorbic Acid

**SDA** semi-Dehydroascorbic Acid

**DHA** Dehydroascorbic Acid

**NADH** Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)

**ET** Electron Transfer

**HAT** Hydrogen Atom Transfer

**DPPH** 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate

**ORAC** Oxygen Radical Absorbance Capacity

**TEAC** Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

**FRAP** Ferric Reducing Antioxidant Power

**CUPRAC** Cupric Reducing Antioxidant Capacity

**UV** Ultra Violet

**EPR** Electron Paramagnetic Resonance

**AAPH** 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride

**TPTZ** 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

**TRP-1** Human Tyrosinase Related Protein-1

**TRP-2** Human Tyrosinase Related Protein-2

**DHI** 5, 6-dihydroxyl indole

**DHICA** 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid  
**WNT** Wingless-related Integration Site  
**SCF** Stem Cell Factor  
**MSH** Melanocyte-stimulating Hormone  
**cAMP** 3',5'-κυκλικό AMP  
**PKA** Protein Kinase A  
**MITF** Melanocyte Inducing Transcription Factor  
**Tyr** Tyrosinase  
**Gp100** Glycoprotein 100  
**Eoxy** oxytyrosinase  
**Edeoxy** deoxytyrosinase  
**Emet** met-tyrosinase  
**PTU** N-Phenylthiourea  
**HEVL** High Energy Visible Light  
**FST** Fitzpatrick Skin Type  
**iPS** Induced Pluripotent Stem  
**BCC** Basal Cell Carcinoma  
**SCC** Squamous Cell Carcinoma  
**MRP** Multidrug Resistance Associated Protein  
**OST** Overall Survival Time  
**DFS** Long-term Disease Free Survival  
**PTEN** Phosphatase and Tensin Homolog  
**Akt** Protein Kinase B  
**GSTP1** Glutathione S-transferase mu 1  
**MC1R** Melanocortin 1 Receptor  
**CA** Caffeic Acid  
**FA** Ferulic Acid  
**GA** Gallic Acid  
**PA** p-coumaric Acid  
**KA** Kojic Acid

**SV** Segmental Vitiligo

**NSV** Non-Segmental Vitiligo

**HLA** Human Leukocyte Antigen

**OCA** Oculocutaneous Albinism

**8-OHdG** 8-Hydroxyguanosine

**BER** Base Excision Repair

**ACTH** Adrenocorticotrophic Hormone

**Gs** Guanine Nucleotide-binding Proteins

**NRF-2** Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2,

**TNF- $\alpha$**  Tumor Necrosis Factor Alpha

**HQ** Hydroquinone

**LAMP-1** Lysosomal-Associated Membrane Protein 1

**MAP** Magnesium Ascorbyl Phosphate

## **Κατάλογος Εικόνων**



**Εικόνα 1.2.1** Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ROS.

**Εικόνα 1.4.2.1.1** Μετατροπή GSH σε GSSG.

**Εικόνα 1.4.2.4.1** Μετατροπή ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ.

**Εικόνα 1.6.1.1** Δομή της DPPH και αντίδραση αναγωγής της από ένα αντιοξειδωτικό μέσο.

**Εικόνα 1.6.2.1** Αρχή της ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC).

**Εικόνα 1.6.3.1** Αρχή της μεθόδου Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP.

**Εικόνα 2.1.1.1** Χημικές δομές ολιγομερών φαιομελανίνης και ευμελανίνης.

**Εικόνα 2.1.3.1** Βιοσύνθεση ευμελανίνης και φαιομελανίνης.

**Εικόνα 2.2.1.1** Χημική δομή της L-τυροσίνης, η οποία αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου τυροσινάσης.

**Εικόνα 2.2.1.2** Χημικές δομές των μορφών oxy-τυροσινάσης, deoxy-τυροσινάσης και met-τυροσινάσης.

**Εικόνα 2.2.1.3** Καταλυτικοί κύκλοι της υδροξυλίωσης της μονοφαινόλης και της οξείδωσης της ο-διφαινόλης σε ο-κινόνη από την τυροσινάση.[16]

**Εικόνα 2.2.3.1** Μηχανισμός δράσης αναστολέων.

**Εικόνα 2.2.3.2** Χημικές δομές μη αναστρέψιμων αναστολέων τυροσινάσης.

**Εικόνα 2.3.1.4.1** Δομή λικοχαλκόνης A.

**Εικόνα 2.3.1** Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν στις εξής κατηγορίες: I) Φλαβονόλες- η κερσετίνη (Quercetin), II) Φλαβόνες- η νοραρτοκαρπετίνη (Norartocarpetin), III) Φλαβανόνες- η στρεπογενίνη (Strepoggenin), IV) Φλαβανόλες- η διυδρομορίνη (Dihydromorin), V) Ισοφλαβόνες- η καλικοσίνη (Calycosin), VI) Χαλκόνες- η 2,4,2',4'- τετραυδροξυχαλκόνη (2,4,2',4'-Tetrahydroxychalcone).

**Εικόνα 2.3.2** Επιλεγμένοι αναστολείς του ενζύμου τυροσινάση που συγκαταλέγονται στα I) Στιλβένια- η οξυρεσβερατρόλη (Oxyresveratrol), II) Κουμαρίνες- η αλοεσίνη (Aloesin), III) παράγωγα βενζαλδεϋδης- η πρωτοκατεχουαλδεϋδη (protocatechualdehyde), και IV) παράγωγα διβενζυλίου- το 2,4,3',5'- Τετραυδροξυδιβενζύλιο (2,4,3',5'-tetrahydroxybibenzyl).

**Εικόνα 2.3.4.1** Δομή σογιασερεβροσίδης I.

**Εικόνα 2.3.4.2** Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν σε I) Λιπίδια μακράς αλυσίδας- η τριλινολείνη (Trilinolein) ή II) Στεροειδή- η στιγμαστ-5-ενε-3β,26-διόλη.

**Εικόνα 2.3.6.1** Χημικές δομές άλλων αναστολέων τυροσινάσης από I) Φυσικές- η A) physcion και η B) 6-n-pentyl- $\alpha$ -pyrone ή II) Συνθετικές πηγές- η A) PTU και η B) 4,4-dihydroxybiphenyl.

**Εικόνα 2.3.7.1** Νέοι αναστολείς τυροσινάσης όπου I) captopril, II) 3,5-dihydroxyphenyl decanoate, III) cetylpyridinium chloride και IV) p-hydroxybenzyl alcohol.

**Εικόνα 4.4.1.1** Δομή γλωροκίνης με υπόδειξη της 4-υποκαυεστημένης αμινομάδας.

## Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

Το δέρμα και οι βλεννογόνοι κατέχουν ρόλο επαφής και άμυνας απέναντι σε χημικές, φυσικές και βιολογικές επιδράσεις. Η διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, καθώς και όλων των μηχανισμών του ανοσοποιητικού περιλαμβάνει σειρές χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες που συχνά είναι δραστικές μορφές οξυγόνου τα οποία αντιδρούν άμεσα στο σημείο του κυττάρου που παράγονται. Έτσι μπορεί να αντιδράσουν με βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια ή DNA. Οι ενδογενείς ή εξωγενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δρουν εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Αρκετές φορές τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού είναι πιθανό να μην είναι επαρκή, η πρόσληψη αντιοξειδωτικών να μην είναι κατάλληλη, η παραγωγή ελευθέρων ριζών να είναι μεγάλη ή ακόμη και να συμβαίνουν όλα τα παραπάνω ταυτόχρονα. Η ατελή εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών έχει πολλαπλές συνέπειες: οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στην αιτιοπαθογένεση διαφόρων δερματοπαθειών, καθώς και στη διαδικασία γήρανσης και στην εμφάνιση δερματικών νεοπλασιών. Στην παρούσα εργασία μελετάται το οξειδωτικό στρες, οι ελεύθερες ρίζες καθώς και οι διάφοροι τύποι αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ενδογενών ή εξωγενών αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι συνηθέστεροι τρόποι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης περιλαμβάνουν τις μεθόδους DPPH, ORAC, FRAP κ.α. οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι αναστολές τυροσινάσης έχουν κινήσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον λόγω του βασικού ρόλου της τυροσινάσης τόσο στη μελανογένεση των θηλαστικών όσο και στην ενζυμική αμαύρωση φρούτων. Η μελανογένεση έχει οριστεί ως η όλη διαδικασία που οδηγεί στον σχηματισμό μακρομοριακών χρωστικών, δηλαδή του πολυμερούς μελανίνης. Η μελανίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του ανθρώπινου δέρματος από τις βλαβερές συνέπειες της υπερϊόδους ακτινοβολίας από τον ήλιο, καθορίζει τη φαινοτυπική εμφάνιση και σχηματίζεται από έναν συνδυασμό ενζυμικά καταλυόμενων χημικών αντιδράσεων.

Η μελανογένεση ξεκινά με το πρώτο βήμα της οξείδωσης τυροσίνης σε dopa και μετά σε ντοπακινόνη, με τη βοήθεια της τυροσινάσης. Αυτό το πρώτο βήμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στάδιο περιορισμού του ρυθμού στη σύνθεση μελανίνης. Η ευμελανίνη (καφέ ή μαύρη μελανίνη) σχηματίζεται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οξείδωσης από διυδροξυινδόλη (DHI) και διυδροξυινδολ-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA), τα οποία είναι τα προϊόντα αντίδρασης από το dopachrome. Παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης (που περιέχει κυστεΐνη), η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε κυστεΐνυλ-dopa ή γλουταθειονυλ-dopa. Στη συνέχεια, σχηματίζεται φαιομελανίνη (κίτρινη ή κόκκινη μελανίνη).

Διάφορες κατηγορίες ενώσεων έχουν μελετηθεί ως προς την δυνατότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της τυροσινάσης ή να επεμβαίνουν μέσω κάποιας άλλης οδού στην βιοσύνθεση της μελανίνης με μηχανισμούς οι οποίες πρόκειται να αναλυθούν στο Κεφάλαιο 2. Στις κατηγορίες αυτές συγκαταλέγονται οι πολυφαινόλες, οι κουμαρίνες, οι βενζαλδεΐδες και τα βενζοϊκά παράγωγα, τα λιπίδια μακράς αλυσίδας, τα στεροειδή καθώς και διάφορες νέες φυσικές ή συνθετικές ουσίες.

Το ενδιαφέρον για την μελέτη και τη ρύθμιση της μελανογένεσης προκύπτει τόσο από καλλυντικές ανάγκες όσο και από την ανάγκη της εις βάθος κατανόησης και καταπολέμησης διαφόρων παθήσεων που σχετίζονται με τις διαταραχές της μελάχρωσης. Διαταραχές της μελάχρωσης μπορεί να προκύψουν από μη φυσιολογική μετανάστευση των μελανοκυττάρων δέρμα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Επιπλέον, η διαταραχή της μεταφοράς μελανοσώματος στα γύρω κερατινοκύτταρα, μια αλλαγή στη σύνθεση μελανίνης και μια ελαττωματική αποικοδόμηση ή απομάκρυνση της μελανίνης μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη μελάχρωση του δέρματος όπως επίσης και οι ανοσολογικές ή τοξικές καταστροφές των μελανοκυττάρων. Οι διαταραχές της μελάχρωσης ταξινομούνται σε υπό- ή υπερμελάχρωση που μπορεί να εμφανιστεί ως γενετική ή επίκτητη ασθένεια. Μπορούν να εκδηλωθούν τοπικά ή διάχυτα. Η συγγενής υπομελάχρωση μπορεί να περιοριστεί στο δέρμα ή να αντιπροσωπεύει μια συστηματική ασθένεια. Οι πιο συχνές παθήσεις υπομελάχρωσης είναι η λεύκη και ο αλφισμός, ενώ παθήσεις που σχετίζονται με την υπερμελάχρωση είναι το μέλασμα, το μελάνωμα αλλά και διάφορες ορμονικές διαταραχές.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί και ο τρόπος δράσης τόσο των αντιοξειδωτικών μέσων όσο και των λευκαντικών παραγόντων και κυρίως των αναστολέων της τυροσινάσης, προκειμένου να διερευνηθεί μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ τους. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος “λευκαντικά” χρησιμοποιείται στα ελληνικά ως μετάφραση του αγγλικού όρου “whitening” για χάρη συντομίας ενώ στην πραγματικότητα η σωστή έκφραση του όρου είναι “ενώσεις που παρεμποδίζουν την σύνθεση μελανίνης”. Δεδομένης της πληθώρας οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη σύνθεση της μελανίνης αλλά και κατά την παρεμπόδιση της δράσης της τυροσινάσης, προκύπτει μια σχέση των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες με τη μελάχρωση αλλά και με τις διαταραχές που σχετίζονται με αυτή. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά

με το ρόλο της μελανίνης ή των ενδιάμεσων μελανίνης ως προ-οξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών ενώ στα μελανινοκύτταρα βρίσκονται και παρακρινικοί παράγοντες αντιοξειδωτικής άμυνας. Επιπλέον, πληθώρα αντιοξειδωτικών ενώσεων μπορεί να επιδράσει σε παθήσεις που σχετίζονται με τη μελάγχρωση επεμβαίνοντας ενδεχομένως σε στάδια της σύνθεσης της μελανίνης.

Στο παράρτημα 1 της εργασίας, παρατίθεται πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται εκατό χημικές ενώσεις με αντιοξειδωτική ή ανασταλτική της μελάγχρωσης δράση, ανά δομική χημική κατηγορία και οι οποίες μπορεί να χρησιμοποιούνται ήδη στο εμπόριο ή να βρίσκονται υπό πειραματικές δοκιμές. Αναφέρεται η αντιοξειδωτική δράση, αν υπάρχει, καθώς και η μέθοδος αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης. Επιπλέον, για την κάθε ένωση, αναφέρεται αν διαθέτει κατά της μελάγχρωσης δράση- λευκαντική δράση-, εάν έχει δράση αναστολής της τυροσινάσης και με ποιόν τρόπο έγινε η συγκεκριμένη διαπίστωση.

# Κεφάλαιο 1

## Αντιοξειδωτικά

### 1.Εισαγωγή

Οι βιολογικοί οργανισμοί επηρεάζονται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, (Free Radicals,FR) και δραστικών μορφών οξυγόνου, (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα ή ομάδες ατόμων, με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Προκειμένου να επιτύχουν πλήρωση της εξωτερικής τους στιβάδας, αντιδρούν ταχύτατα και με μεγάλη ευκολία στο σημείο που δημιουργούνται. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου περιέχουν είτε το άτομο του οξυγόνου σε μορφή ελεύθερης ρίζας όπως η υπεροξειδική ρίζα ή υπεροξυ-ρίζα ή υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2 \cdot^-$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ), είτε είναι πολύ δραστικά οξειδωτικά μόρια όπως για παράδειγμα το υπεροξείδιο του οξυγόνου ( $H_2O_2$ ). Σε περίπτωση που το κεντρικό στοιχείο είναι το άζωτο ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS). Οι παράγοντες που οδηγούν στον σχηματισμό των ROS και FR διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς με κριτήριο αν η επίδραση στο βιολογικό οργανισμό από το εσωτερικό του ή το εξωτερικό του περιβάλλον. <sup>[1-3]</sup>

Οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου, όταν δημιουργηθούν, δεν δρουν ανεξέλεγκτα καθώς ο οργανισμός προκειμένου να αποφύγει τις αρνητικές τους επιδράσεις, θέτει σε δράση τα δικά του αντιοξειδωτικά συστήματα. Στην περίπτωση όμως που διαταραχθεί η ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών που παράγονται και εκείνων που αδρανοποιούνται, ο οργανισμός υπόκειται σε οξειδωτικό στρες. Όταν συμβεί αυτό, είναι απαραίτητα εκτός από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και τα εξωγενή. <sup>[1-3]</sup>

### 1.1 Ενδογενείς Παράγοντες Παραγωγής ROS

Όσο αφορά στους ενδογενείς παράγοντες, οι κύριες πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών είναι ο φυσιολογικός μεταβολισμός, τα κύτταρα, τα ένζυμα και διάφορα είδη ασθενειών και λοιμώξεων. <sup>[1-3]</sup>

Η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP), συμβαίνει μέσω της μεταφοράς τεσσάρων ηλεκτρονίων και οδηγεί σε παραγωγή δραστικών μορφών

οξυγόνου, τα οποία μπορεί να διαρρεύσουν από τα μιτοχόνδρια στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, κάποια ένζυμα έχουν ως κύριο ρόλο την παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως για παράδειγμα η συνθάση του νιτρικού οξέος η οποία παράγει την ρίζα  $\text{NO}\cdot$ , ενώ κάποια άλλα παράγουν έμμεσα δραστικές μορφές οξυγόνου ως υποπροϊόν της δραστηριότητάς τους, όπως για παράδειγμα ο σχηματισμός υπεροξειδικών ριζών από την οξειδάση της ξανθίνης.<sup>[1-3]</sup>

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των λευκών αιμοσφαιρίων και λεμφοκυττάρων, είναι επίσης βασικοί παράγοντες παραγωγής ROS και άλλων παραγώγων τα οποία δρουν συνεργιστικά με τις ελεύθερες ρίζες. Αφού διεγερθούν τα συγκεκριμένα κύτταρα, παρουσιάζουν κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης και παραγωγή ανηγμένου φωσφορικού-νικοταναμιδο-αδενινωδινουκλεοτιδίου (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH), το οποίο λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων σε ένα ενεργοποιημένο ενζυμικό σύστημα στην πλασματική μεμβράνη. Αυτό το σύμπλοκο NADPH-οξειδάσης χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια για την παραγωγή υπεροξειδικών ριζών από το μόριο του οξυγόνου, οι οποίες μετατρέπονται στην συνέχεια σε ρίζες υδροξυλίου.<sup>[1-3]</sup>

## 1.2 Εξωγενείς Παράγοντες Παραγωγής ROS

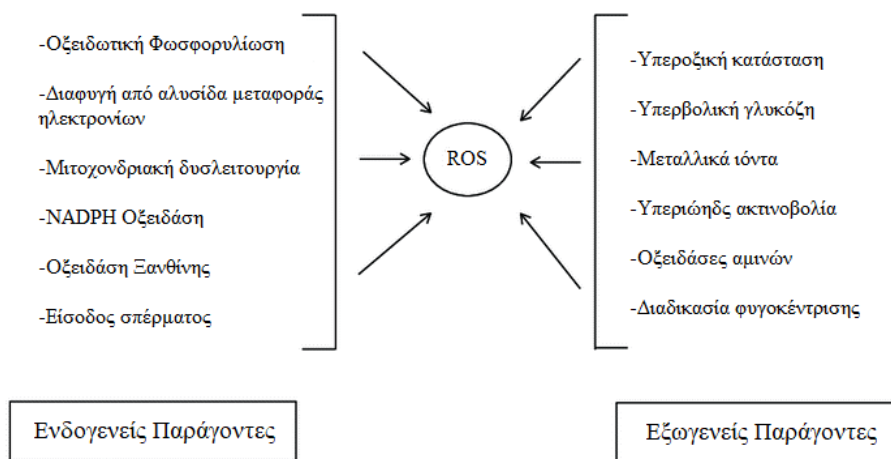
Στους εξωτερικούς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών ανήκουν η ιονίζουσα και μη ιονίζουσα ακτινοβολία, η γ-ακτινοβολία, η υπεριώδη ακτινοβολία, η υπέρηχοι, η διατροφή, οι φαρμακευτικές ουσίες, οι ρύποι του περιβάλλοντος και γενικότερα τα ξενοβιοτικά, δηλαδή ουσίες που δεν παράγονται από τον οργανισμό αλλά προσλαμβάνονται από το περιβάλλον στο οποίο αυτός ζει και μπορεί να φανούν επιβλαβείς σε μεγάλες ποσότητες. Στην περίπτωση της ακτινοβολίας, όταν αυτή προσπίπτει στα κύτταρα ενός βιολογικού οργανισμού, οδηγεί στην παραγωγή σημαντικού αριθμού δραστικών μορφών μέσω του νερού που βρίσκεται στα κύτταρα. Οι ρύποι του περιβάλλοντος, όπως τα καυσαέρια, ο καπνός του τσιγάρου ή τα βιομηχανικά απόβλητα, περιέχουν διάφορους τύπους παραγώγων μονοξειδίου του αζώτου,  $\text{NO}$ . Το μονοξείδιο του αζώτου έχει την ικανότητα να παράγει ελεύθερες ρίζες οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να δρουν καταστροφικά στον οργανισμό είτε ερχόμενα σε επαφή με το δέρμα είτε εισπνεόμενα.<sup>[1-3]</sup>

Τα ξενοβιοτικά, οι τοξίνες και τα χημικά που εισέρχονται στον οργανισμό, δημιουργούν δραστικές μορφές οξυγόνου κυρίως ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού

τους *in vivo* ενώ τα τρόφιμα που τείνουμε να καταναλώνουμε περιέχουν επίσης μεγάλο αριθμό οξειδωτικών όπως αλδεύδες, υπεροξειδία ή/και οξειδωμένα λιπαρά οξέα. [1-3]

### Εικόνα 1.2.1

Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ROS.



## 1.3 Ελεύθερες Ρίζες, Δραστικές μορφές Οξυγόνου και Οξειδωτικό Στρες

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η κατάσταση του οργανισμού κατά την οποία διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών προς αντιοξειδωτικά, δηλαδή η ισορροπία μεταξύ του ρυθμού που παράγονται οι ελεύθερες ρίζες και του ρυθμού με τον οποίο αδρανοποιούνται από αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού. Τα προ-οξειδωτικά είναι χημικές ουσίες που προκαλούν οξειδωτικό στρες, είτε δημιουργώντας δραστικές μορφές οξυγόνου είτε αναστέλλοντας αντιοξειδωτικά συστήματα ενώ τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες μπορούν να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες, να αναστέλλουν την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου ή/και να ενισχύουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Ορισμένες ουσίες μπορούν να χρησιμεύσουν είτε ως αντιοξειδωτικά είτε ως προ-οξειδωτικά, ανάλογα με τις συνθήκες, δηλαδή τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας και την ύπαρξη οξυγόνου ή μετάλλων μετάπτωσης. Για παράδειγμα το L-ασκορβικό οξύ ή η βιταμίνη C, θεωρείται ισχυρό αντιοξειδωτικό και παρεμβαίνει σε πολλές φυσιολογικές αντιδράσεις, αλλά μπορεί επίσης να είναι, υπό ορισμένες συνθήκες, προ-οξειδωτικό. Αυτό συμβαίνει όταν συνδυάζεται με σίδηρο ή χαλκό και ανάγει τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$  ή τον  $Cu^{3+}$  σε  $Cu^{2+}$



αντίστοιχα, κάτι το οποίο με τη σειρά του ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε ρίζες υδροξυλίου. [4-5]

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή/και από μειωμένη φυσιολογική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού ή και μειωμένη πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών. Κάθε βιολογικός οργανισμός, με τη βοήθεια ενζυμικών και μη ενζυμικών συστημάτων, συντηρεί ένα αναγωγικό ενδοκυτταρικό περιβάλλον, στο οποίο αν προκληθεί διαταραχή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, θα προκύψει παραγωγή ελευθέρων ριζών. [4-5]

## 1.4 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Για την αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών αλλά και για την προστασία των βιολογικών συστημάτων από τις επιβλαβείς τους επιδράσεις, ο οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικά συστήματα. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες οι οποίες υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα ευοξειδωτα υποστρώματα και έχουν την ικανότητα να καθυστερούν ή να αποτρέπουν την οξείδωση του υποστρώματος. Για να χαρακτηριστεί μια ουσία ως αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό για τον οργανισμό, θα πρέπει να είναι ικανή η εύκολη απορρόφησή της και η αποτροπή δημιουργίας, η αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών αλλά και η διατήρηση των θετικών επιδράσεων σε φυσιολογικά επίπεδα. Κάποιες από τις θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών όταν αυτές βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, είναι η δράση τους έναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και η συμμετοχή τους στην διακυτταρική επικοινωνία. [4-5]

Επιπλέον, θα πρέπει να μπορεί είναι συμβατή και λειτουργική σε υδατικές και μεμβρανικές περιοχές και να μην λειτουργεί παρεμποδιστικά στην έκφραση γονιδίων. Είναι εξαιρετικά σημαντική η ύπαρξη ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων, καθώς αυτά είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της υγιούς οξειδοαναγωγικής ενδοκυτταρικής κατάστασης. Στο δέρμα υπάρχουν τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά συστήματα. Στην κατηγορία των ενζύμων ανήκει η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Cat), το σύστημα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GPx) και αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione reductase, GR) ενώ στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ανήκουν οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους όπως η γλουταθειόνη (Glutathione, GSH), το α-

λιποϊκό οξύ, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C και η ουβικινόλη/ουβι-ημικινόνη/ουβικινόνη (που συχνά αποδίδεται με τον όρο «Συνένζυμο Q10»).<sup>[4-6]</sup>

### **1.4.1 Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα**

#### **1.4.1.1 Συνδυαστική δράση Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (Superoxide dismutase, SOD) και Καταλάσης (Cat)**

Η υπεροξειδική δισμουτάση ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών που δρουν άμεσα κατά των ελευθέρων ριζών. Τα ένζυμα σε αυτή την κατηγορία έχουν διαφορετικές δομές, ποικίλα συνένζυμα, μοριακές μάζες και σταθερές ταχύτητας αντίδρασης. Η ενζυμική τους δραστηριότητα είναι ικανή να ενισχύσει την αυθόρμητη μετατροπή των υπεροξειδικών ριζών σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσω της αντίδρασης<sup>[6]</sup>:

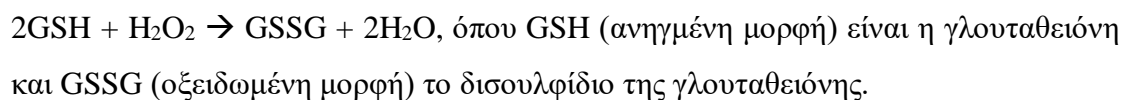


Η καταλάση είναι το ένζυμο το οποίο έχει την δυνατότητα να απομακρύνει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όταν αυτό βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Διαθέτει τέσσερις υπομονάδες, κάθε μια εκ των οποίων περιέχει ιόντα σιδήρου τα οποία οξειδώνονται όταν αλληλοεπιδράσουν με το υπεροξειδίο του υδρογόνου δίνοντας Fe<sup>4+</sup>. Ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου συμμετέχει στην εξής αντίδραση.<sup>[6]</sup>



#### **1.4.1.2 Υπεροξειδάση (Glutathione peroxidase GPx) και Αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione reductase, GR)**

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων καθώς και την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την παρακάτω αντίδραση:



Η αναγωγή της γλουταθειόνης συμμετέχει στην αναγέννηση της γλουταθειόνης (GSH) με τη συμμετοχή του NADPH.<sup>[6]</sup>

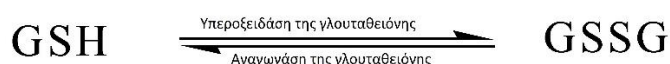
### **1.4.2 Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά Συστήματα**

#### **1.4.2.1 Γλουταθειόνη/Δισουλφίδιο Γλουταθειόνης (GSH/GSSG)**

Η γλουταθειόνη είναι πολικό, υδατοδιαλυτό τριπεπτίδιο που βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Όταν αυτό οξειδωθεί προς το αντίστοιχο δισουλφίδιο απενεργοποιεί οξυγονούχες ρίζες. Επίσης δρα αντιοξειδωτικά και με άλλο μηχανισμό δεσμεύοντας με τη θειολομάδα του μέταλλα που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης. [7]

#### **Εικόνα 1.4.2.1.1**

Μετατροπή GSH σε GSSG.



#### 1.4.2.2 α-Λιποϊκό Οξύ

Πρόκειται για λιπόφιλο μόριο το οποίο αδρανοποιεί την υδρόξυ ρίζα, την υπεροξειδική ρίζα, την ολεφινική υπεροξειδική ρίζα (LOO $\cdot$ ), το οξυγόνο στη διεγερμένη κατάσταση ( $^1\text{O}_2$ ) και το οξείδιο του αζώτου. Επιπλέον βοηθά στην αναγέννηση της τοκοφερόλης από την τοκοφεροξυρίζα (βιταμίνη E) και του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) από το δεϋδροασκορβικό οξύ ενώ παρουσιάζει καλή απορρόφηση από το δέρμα. [7]

#### 1.4.2.3 Ουβικινόλη/Ουβι-ημικινόνη/ουβικινόνη (Συνένζυμο Q10)

Το σύστημα ουβικινόλη/ουβι-ημικινόνη/ουβικινόνη εντοπίζεται όπως όλα τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά στην κυτταρική μεμβράνη. Η ουβικινόλη οξειδούμενη προς την αντίστοιχη ημικινόνη και κατόπιν ουβικονόνη, εμποδίζει τόσο την έναρξη όσο και τη μετάδοση της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Η ιδεβονόνη είναι μικρότερου μοριακού βάρους, συνθετικό παράγωγο της ουβικινόνης με σημαντική αντιοξειδωτική δράση. [7]

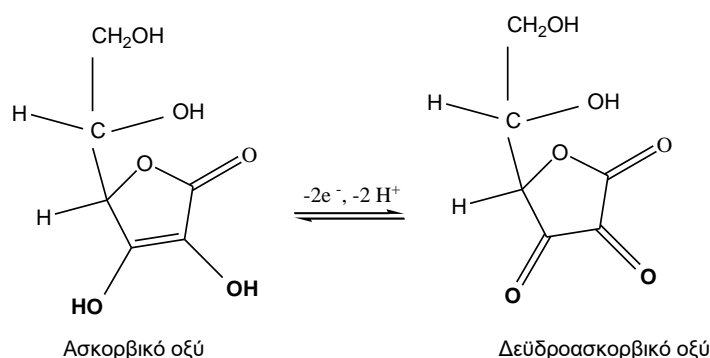
#### 1.4.2.4 Βιταμίνη C ή L-Ασκορβικό /Ημιδεϋδροασκορβικό/ Δεϋδροασκορβικό Οξύ (Ascorbic acid/semi-Dehydroascorbic acid/Dehydroascorbic acid, Asc/SDA/DHA)

Πρόκειται για υδατοδιαλυτό μόριο το οποίο συντίθεται από φυτά και ζώα αλλά όχι από τον άνθρωπο. Σε φυσιολογικό pH υπάρχει ως μονοανιόν και λειτουργεί, μεταξύ άλλων, και ως αδρανοποιητής ελευθέρων ριζών καθώς έχει τη δυνατότητα να δωρίζει δύο ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου. Με την απομάκρυνση του πρώτου

ηλεκτρονίου, το ασκορβικό οξύ μετατρέπεται σε ασκόρβυλ ρίζα και η οποία μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω. Η συγκεκριμένη ρίζα είναι αρκετά σταθερή ώστε να μπορεί είτε να οξειδωθεί είτε να επιστρέψει στην ανηγμένη της μορφή λαμβάνοντας ηλεκτρόνιο από κάποιον άλλον παράγοντα όπως τα GSH ή NADH.<sup>[7]</sup>

#### Εικόνα 1.4.2.4.1

Μετατροπή ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ.



#### 1.4.2.5 Βιταμίνη E ή DL-α-Τοκοφερόλη

Η Βιταμίνη E ή αλλιώς DL-α-Τοκοφερόλη διακρίνεται σε 8 μορφές (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες). Πρόκειται για λιπόφιλο μόριο το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύει την υπεροξειδική ρίζα καθώς και τις ολεφινικές υπεροξειδικές ρίζες. Επιπλέον έχει την ικανότητα να μειώνει την μελανογένεση, να προστατεύει τα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας από την οξείδωση, να παρουσιάζει φωτοπροστατευτική δράση καθώς και να μειώνει τον σχηματισμό διμερών κυκλοπυριμιδίνης.<sup>[7]</sup>

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που συγκεντρώνονται στο δέρμα, ενδογενή και εξωγενή, αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους έτσι ώστε το κύτταρο να αντιμετωπίζει ικανοποιητικά τις οξειδωτικές προσβολές. Όταν σχηματισθεί μια ελεύθερη ρίζα στην κυτταρική μεμβράνη, απενεργοποιείται από την τοκοφερόλη, η οποία οξειδώνεται προς την αντίστοιχη τοκοφεροξυ ρίζα. Η τοκοφερόλη αναγεννάται από την τοκοφεροξυ ρίζα με τη βοήθεια της λιπόφιλης ουβικινόλης, η οποία ταυτόχρονα οξειδώνεται προς ουβικινόνη. Επίσης σε περίπτωση μετακίνησης της τοκοφεροξυ ρίζας προς το κυτταρόπλασμα, αυτή μπορεί να αναχθεί με τη βοήθεια του ασκορβικού, το οποίο οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ. Στη συνέχεια το δεϋδροασκορβικό ανάγεται με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης προς το αντίστοιχο δισουλφίδιο. Το δισουλφίδιο με τη σειρά του ανάγεται από το NAD(P)H.<sup>[7]</sup>

## 1.5 Επιδιορθωτικά Ένζυμα

Στην περίπτωση που ο οργανισμός έχει υποστεί οξειδωτικό στρες που συνεπάγεται πιθανή πρόκληση βλαβών στα βιομόρια του, είναι απαραίτητη και μία ακόμα κατηγορία ενδογενών ενζύμων. Τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν ως κύριο σκοπό την αφαίρεση ή επιδιόρθωση των καταστραμμένων βιομορίων πριν αυτά συσσωρευτούν και οδηγηθούν σε αλλοιωμένο μεταβολισμό κυττάρων και μόνιμη βλάβη. Ο οργανισμός διαθέτει, για κάθε τύπο βιομορίου που έχει υποστεί βλάβη, και το αντίστοιχο εξειδικευμένο ένζυμο που θα τεθεί σε λειτουργία για την επιδιόρθωσή της. Για παράδειγμα, οι οξειδωμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται από τα πρωτεολυτικά συστήματα και τα οξειδωμένα λιπίδια επιδιορθώνονται από τις φωσφολιπάσες, τις υπεροξειδάσες και τις ακυλοτρανσφεράσες. Με την πάροδο του χρόνου είναι πιθανό κάποια βασικά συστήματα επιδιόρθωσης βλαβών να σταματούν να λειτουργούν στη μέγιστη αποδοτικότητά τους και έτσι να γίνονται ανεπαρκή σε γερασμένα κύτταρα οδηγώντας σε κυτταρικές βλάβες.<sup>[7]</sup>

Δεδομένου ότι η οξειδωτική βλάβη των κυττάρων του οργανισμού αυξάνεται με την ηλικία, η αυξημένη πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών μπορεί να υποστηρίξει την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα. Στα πιο διαδεδομένα εξωγενή αντιοξειδωτικά ανήκουν οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες.<sup>[7]</sup>

## 1.6 Μέθοδοι Εκτίμησης Αντιοξειδωτικής Δράσης

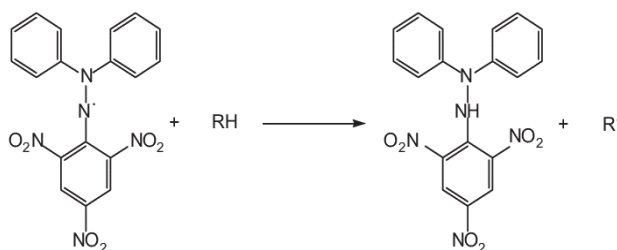
Μπορούν να διακριθούν σε δύο είδη, σε μεθόδους που μετρούν α) την αδρανοποίηση των ριζών από αντιοξειδωτικά που προσφέρουν ηλεκτρόνιο (Electron Transfer, ET) ή άτομο υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) στις ελεύθερες ρίζες και β) τη μείωση του οξειδωτικού δυναμικού. Στην πρώτη κατηγορία συγκαταλέγονται οι μέθοδοι «σάρωσης» ελευθέρων ριζών 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate DPPH, ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC), ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) κ.α. ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι αντιοξειδωτικής δυναμικής αναγωγής του σιδήρου (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP), αντιοξειδωτικής ικανότητας αναγωγής του διατομικού χαλκού (Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC) κ.α.<sup>[8]</sup>

### 1.6.1 Μέθοδος DPPH

Η δοκιμασία σάρωσης ελευθέρων ριζών, DPPH, είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων ενώσεων και ενώ βασίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίου, έχει μηχανισμό μεταφοράς υδρογόνου-ρίζας. Η ρίζα που χρησιμοποιείται είναι η 2,2-Διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) και η μέθοδος εξαρτάται από το εάν και πόσο το υπό εξέταση αντιοξειδωτικό είναι ικανό να μεταφέρει ηλεκτρόνιο προς τη ρίζα DPPH ώστε να την αδρανοποιήσει. Η αντίδραση συνοδεύεται από αλλαγή χρώματος της DPPH που μετράται στα 517 nm και ο αποχρωματισμός δρα ως δείκτης της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας. Η αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο σάρωσης DPPH αναφέρεται συχνά ως EC50 ως προς DPPH, που ορίζεται ως η αποτελεσματική συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH κατά 50%. Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι απαιτεί μόνο ένα φασματοφωτόμετρο. Μπορεί, ωστόσο, να χρησιμοποιηθεί και πιο ακριβός εξοπλισμός όπως φασματόμετρο παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (Electron Paramagnetic Resonance, EPR). Όσο αφορά στα μειονεκτήματα της μεθόδου, έχει υποστηριχθεί ότι η σάρωση της DPPH δεν μιμείται τον μηχανισμό δέσμησης ριζών των αντιοξειδωτικών σε πραγματικά τρόφιμα ή βιολογικά συστήματα αλλά ότι βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην υπόθεση ότι η αντιοξειδωτική δράση είναι ίση με την ικανότητα δωρεάς ηλεκτρονίων ή τη λεγόμενη αναγωγική ισχύ της. [8]

### Εικόνα 1.6.1.1

Δομή της DPPH και αντίδραση αναγωγής της από ένα αντιοξειδωτικό μέσο.



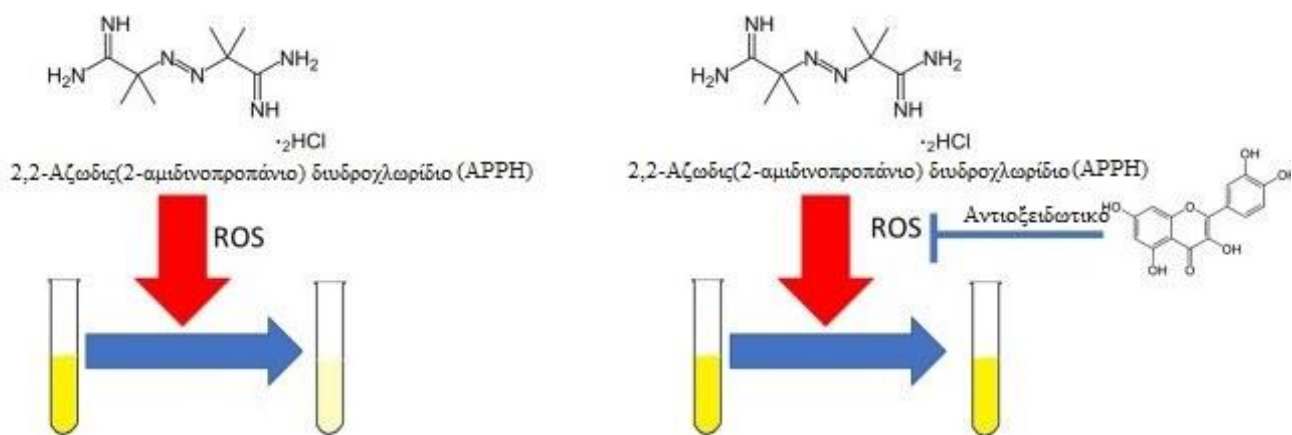
### 1.6.2 Μέθοδος ORAC

Η μέθοδος ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) βασίζεται στη μεταφορά υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό προς την

ελεύθερη ρίζα και έχει την ικανότητα να μετράει κατά πόσο το αντιοξειδωτικό μέσο μπορεί να διακόψει την αλυσίδα δημιουργίας ριζών, παρακολουθώντας την παρεμπόδιση της οξειδωσης που προκαλείται από την ρίζα ROO·. Η συγκεκριμένη ρίζα παράγεται από μια γεννήτρια. Ως γεννήτρια χαρακτηρίζεται μια ουσία όπως για παράδειγμα το 2,2'-αζωδισ(2-μεθυλπροπιοναμιδίνη) διυδροχλωρίδιο, [2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH], η οποία κατά τη θερμική της αποσύνθεση παράγει μια ελεύθερη ρίζα υπεροξυλίου (ROO·). Στη συνέχεια η ρίζα αυτή αντιδρά με έναν ανιχνευτή φθορισμού. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται απώλεια φθορισμού και μέτρησή της από ένα φθορισμόμετρο από το οποίο λαμβάνονται συγκρίσιμες καμπύλες με κύρια ένωση αναφοράς το Trolox. Το Trolox είναι μια χρωμανόλη, μέλος των φαινολών και μονοκαρβοξυλικό οξύ, δηλαδή ένα 6-υδροξυχρωμάνιο που φέρει υποκατάσταση από μια καρβοξυ ομάδα στη θέση 2 και ομάδες μεθυλίου στις θέσεις 2, 5, 7 και 8. Πρόκειται για υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E το οποίο χρησιμοποιείται συχνά ως πρότυπο για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σύνθετων μιγμάτων και έχει αντιοξειδωτικές ικανότητες.<sup>[8]</sup>

### Εικόνα 1.6.2.1

Αρχή της ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC).<sup>[9-10]</sup>



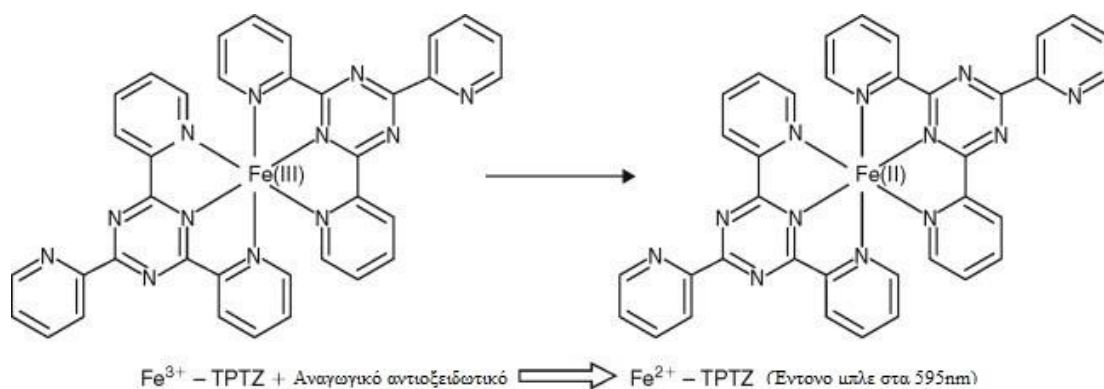
### 1.6.3 Μέθοδος FRAP

Η Ferric Reducing Antioxidant Power, (FRAP) βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίου (Electron Transfer, ET) και μετρά την αναγωγή των ιόντων σιδήρου από Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup> από αντιοξειδωτικές ενώσεις σε όξινο περιβάλλον. Η αντιοξειδωτική δράση

προσδιορίζεται ως αύξηση της απορρόφησης στα 593 nm και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μικρομοριακά ισοδύναμα (συγκέντρωση)  $Fe^{2+}$  σε σχέση με ένα αντιοξειδωτικό πρότυπο. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που βασίζονται σε ET, η ανάλυση FRAP πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες pH (pH = 3,6) προκειμένου να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου και το πιο σημαντικό, να οδηγήσει στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Αρχικά στον προσδιορισμό FRAP χρησιμοποιούνταν το σύμπλοκο τριπυριδυλτριαζίνης με  $Fe^{3+}$  (TPTZ), ως αντιδραστήριο σιδήρου ενώ πλέον το σιδηροκυανιούχο κάλιο είναι το πιο δημοφιλές αντιδραστήριο στη συγκεκριμένη μέθοδο. [8]

### Εικόνα 1.6.3.1

Αρχή της μεθόδου Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP.





## Κεφάλαιο 2

### Λευκαντικά

#### 2. Εισαγωγή

Η μελανογένεση είναι η διαδικασία σύνθεσης μελανίνης, η οποία είναι η υπεύθυνη χρωστική για τη χρώση του ανθρώπινου δέρματος, ματιών και μαλλιών. Στη διαδικασία της μελανογένεσης εμπλέκονται πολλές ενζυμικές αντιδράσεις και ένζυμα όπως η τυροσινάση, η σχετική με την τυροσινάση πρωτεΐνη-1 (Human tyrosinase related protein-1, TRP-1) και η σχετική με την τυροσινάση πρωτεΐνη-2 (Human tyrosinase related protein-2, TRP-2). Η τυροσινάση είναι το βασικό ένζυμο της διαδικασίας, το οποίο καταλύει τη σύνθεση μελανίνης και η μείωση της δράσης της τυροσινάσης είναι η πιο σημαντική προσέγγιση για την ανάπτυξη αναστολέων μελανογένεσης. Ως εκ τούτου, πολυάριθμοι αναστολείς που στοχεύουν την τυροσινάση αλλά και γενικότερα την μελανογένεση, έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια και έχουν ταξινομηθεί με βάση την ευρύτερη κατηγορία ενώσεων στην οποία ανήκουν αλλά και με βάση τον τρόπο δράσης τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλές χρωματικές παραλλαγές που μπορούν να παρατηρηθούν στο δέρμα και τα μαλλιά, μπορεί κανείς να αναμένει ότι η σύνθεση των μικτών μελανινών ρυθμίζεται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Ωστόσο, οι διαταραχές που σχετίζονται με την έκφραση της μελανίνης, είτε πρόκειται για υπερμελάγχρωση είτε για υπομελάγχρωση, μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα υγείας ή αισθητικής φύσης τα οποία επηρεάζουν την ποιότητα ζωής των ανθρώπων. Παράδειγμα τέτοιων διαταραχών είναι το μέλασμα, η μεταφλεγμονώδης υπερμελάγχρωση, οι φακίδες, η λεύκη κ.α.

Στη δυτική κουλτούρα εξακολουθεί να θεωρείται επιθυμητό το (χάλκινο) μαύρισμα παρά τις προειδοποιήσεις των ειδικών ενώ στον ανατολικό κόσμο υπάρχει μια παράδοση αιώνων σύμφωνα με την οποία μια ανοιχτόχρωμη επιδερμίδα θεωρείται ισοδύναμη με τη νεότητα και την ομορφιά. Η ανάπτυξη σκευασμάτων για τη μείωση της έντασης του χρώματος-«λεύκανση» των βλαβών που σχετίζονται με την υπερμελάγχρωση, είναι μία από τις προκλήσεις της βιομηχανίας καλλυντικών και συνεπώς, τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τη λεύκανση του δέρματος έχει αυξηθεί πάρα πολύ. Θα πρέπει να τονισθεί ότι ο όρος «λεύκανση» αν και

χρησιμοποιείται για λόγους συντομίας είναι παραπλανητικός. Τα προϊόντα αυτά στοχεύουν στη μείωση της υπέρχρωσης του δέρματος και στην αποκατάσταση του ομοιόμορφου τόνου χρώματος δέρματος-skin lighteners.

## 2.1 Βιοσύνθεση Μελανίνης

### 2.1.1 Χρωστική Μελανίνη

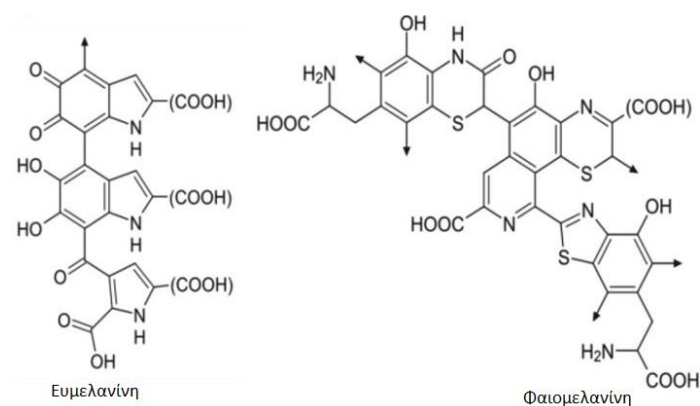
Η μελανίνη ανήκει σε μια οικογένεια χρωστικών που παράγονται από πληθώρα βιολογικών οργανισμών και προέρχεται από το αμινοξύ τυροσίνη. Η μελανίνη διακρίνεται σε τρεις βασικούς τύπους με διαφορετικές λειτουργίες, την ευμελανίνη, την φαιομελανίνη και την νευρομελανίνη. Η μελανίνη είναι υπεύθυνη για το χρώμα του δέρματος, των μαλλιών και των ματιών, κατέχει τον κρίσιμο ρόλο φωτοπροστασίας δεδομένου του ότι είναι ικανή να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και είναι εκείνη που δίνει τον χαρακτηριστικό ανθρώπινο φωτότυπο. Η μελανίνη έχει μία από τις υψηλότερες τιμές του δείκτη διάθλασης που είναι γνωστές για οποιοδήποτε βιολογικό υλικό (1,8-2) αλλά και ένα ευρύ φάσμα απορρόφησης, γεγονός που εξηγεί την δυνατότητά της να προστατεύει από τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας. Η νευρομελανίνη προσδίδει χρώμα σε συγκεκριμένα τμήματα του εγκεφάλου όπως η μέλαινα ουσία και πιστεύεται ότι προστατεύει τους νευρώνες στη μέλαινα ουσία από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τον σίδηρο. [9]

Η ευμελανίνη χαρακτηρίζεται από καφέ-μαύρο χρώμα και είναι ο επικρατέστερος τύπος μελανίνης στους σκουρόχρωμους φωτότυπους. Αποτελείται από δύο κύριες πρόδρομες ουσίες, την 5,6-διυροξυ-ινδόλη (DHI) και το 5,6-διυδροξυ-ινδολυλο-2-καρβοξυλικό οξύ (DHICA) αλλά η ακριβή της χημική δομή παραμένει αδιευκρίνιστη λόγω της αδιαλυτότητάς της στους περισσότερους διαλύτες αλλά και της άμορφης δομής της. Η φαιομελανίνη είναι λιγότερο μελετημένη από την ευμελανίνη, χαρακτηρίζεται από κόκκινο-κίτρινο χρώμα, είναι η λιγότερο επικρατέστερη μορφή μελανίνης και συναντάται στους φωτότυπους τύπου I και II. Φαίνεται να αποτελείται από δύο τύπους ενδιάμεσων βενζοθειαζίνης, συντίθεται παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης αλλά είναι ακόμη αδιευκρίνιστος ο τρόπος σύνδεσής τους. Η φυσική μελανίνη είναι δύσχρηστη στη μελέτη της, οι ερευνητές μελετούν συνθετικές μελανίνες χρησιμοποιώντας πειραματικές τεχνικές όπως φασματοφωτομετρία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier, φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτινών X κα. [9]

Η αναλογία ευμελανίνης/φαιομελανίνης στα μελανοσώματα καθορίζεται από τη δραστηριότητα του βασικού ενζύμου της μελανοσύνθεσης, την τυροσινάση, αλλά και από τη διαθεσιμότητα της κυστεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή της ευμελανίνης απαιτεί τη δραστηριότητα της ταυτομεράσης της dopachrome TRP-2 και της TRP-1, δύο ένζυμα τα οποία βρίσκονται μόνο στα ευμελανοσώματα ενώ η παραγωγή της φαιομελανίνης απαιτεί την μετατροπή της τυροσίνης σε ντοπακινόνη από την τυροσινάση αλλά και την παρουσία κυστεΐνης για τη δημιουργία των ενδιάμεσων της αντίδρασης. [9]

### Εικόνα 2.1.1.1

Χημικές δομές ολιγομερών φαιομελανίνης και ευμελανίνης.



### 2.1.2 Διάκριση Φωτοτύπων

Βάσει του συστήματος Fitzpatrick οι διαφορετικοί φωτότυποι του δέρματος διαφοροποιούνται βάσει την αντίδρασή τους στην ακτινοβολία και διαβαθμίζοντας το ερύθημα και τη μελάγχρωση που την ακολουθεί. Ο Fitzpatrick φωτότυπος εξαρτάται από το ποσοστό της χρωστικής μελανίνης που βρίσκεται στο δέρμα η οποία είναι ικανή να καθορίζει εκ γενετής το χρώμα του δέρματος και συνεπώς το πως αυτό αντιδράει στην υπεριώδη ακτινοβολία. Συνεπώς, η ένταση της μελάγχρωσης μετά από την έκθεση στη UV ακτινοβολία εξαρτάται από το γενετικά καθορισμένο επίπεδο σύνθεσης μελανίνης του οργανισμού χωρίς αυτό να σημαίνει ότι αυτό δεν μπορεί να αλλάξει χάρη διαφόρων ρυθμιστικών εγγενών είτε εξωγενών παραγόντων. [10]

Η ουσιαστική διαφορά των φωτοτύπων, πέρα από τα τυπικά χαρακτηριστικά, βασίζεται στη διαφορά αριθμού και μεγέθους των μελανοσωμάτων από οργανισμό σε οργανισμό, το ποσοστό, τον τύπο αλλά και τη διακίνηση και μεταφορά της μελανίνης

στα κερατινοκύτταρα. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των μελανοσωμάτων είναι μοναδικά για κάθε οργανισμό από τη γέννησή του και δεν επηρεάζονται από εξωτερικούς παράγοντες. <sup>[10]</sup>

Οι έξι φωτότυποι σύμφωνα με το παραπάνω σύστημα διακρίνονται σε αυτούς που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. <sup>[10]</sup>

### Πίνακας 1

Φωτότυποι κατά Fitzpatrick

ΦΩΤΟΤΥΠΟΣ	ΤΥΠΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΕ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ
<b>I</b>	Χλωμό λευκό δέρμα, μπλε/πράσινα μάτια, ξανθά/κόκκινα μαλλιά	Έγκαυμα, όχι μαύρισμα
<b>II</b>	Ανοιχτόχρωμο δέρμα, μπλε μάτια	Επιρρεπές στο έγκαυμα, ανεπαίσθητο μαύρισμα
<b>III</b>	Πιο σκούρο λευκό δέρμα	Μαύρισμα έπειτα από έγκαυμα
<b>IV</b>	Ανοιχτόχρωμο καφέ δέρμα	Ελαφρύ έγκαυμα, εύκολο μαύρισμα
<b>V</b>	Καφέ δέρμα	Σπανίως έγκαυμα, εύκολο σκούρο μαύρισμα
<b>VI</b>	Σκούρο καφέ ή μαύρο δέρμα	Ποτέ έγκαυμα, πάντα σκούρο μαύρισμα

#### 2.1.3 Μελανοκύτταρα και Μελανοσώματα

Η διαδικασία κατά την οποία παράγεται η μελανίνη ονομάζεται μελανογένεση, λαμβάνει χώρα στις ειδικές επιδερμικές μονάδες που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή και τη διανομή της, πραγματοποιείται σε πολλαπλά στάδια και χαρακτηρίζεται ως σύνθετη. Οι βασικές μονάδες στις οποίες λαμβάνει χώρα η μελανογένεση βρίσκονται στην επιδερμίδα και πρόκειται για εξειδικευμένα κύτταρα, τα χρωματοφόρα, τα οποία περιβάλλονται από τα κερατινοκύτταρα, η αλλιώς τα κύτταρα της βασικής στιβάδας του δέρματος και τα τριχοθυλάκια. Τα χρωματοφόρα λαμβάνουν διαφορετικά ονόματα

ανάλογα με τη χρωστική που περιέχουν επομένως στην περίπτωση των ανθρώπινων οργανισμών όπου η κύρια χρωστική είναι η μελανίνη, ονομάζονται μελανοκύτταρα. [11-13]

Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από τους μελανοβλάστες νευρικής ακρολοφίας που μεταναστεύουν σε διαφορετικούς προορισμούς συμπεριλαμβανομένου του βασικού στρώματος της επιδερμίδας και των τριχοθυλακίων. Η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των μελανοβλαστών σε μελανοκύτταρα εξαρτώνται από μεσολαβητές που παράγονται από τα κύτταρα του ραχιαίου νευρικού σωλήνα, τα εξώδερμα και τα κερατινοκύτταρα. Στους μεσολαβητές συγκαταλέγονται οι γλυκοπρωτεΐνες WNT (Wingless-related integration site, WNT), δηλαδή εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες που ενεργοποιούν διαφορετικές οδούς μεταγωγής ενδοκυτταρικών σημάτων, η ενδοθηλίνη από το γονίδιο EDN3 και ο παράγοντας βλαστοκυττάρων (Stem Cell Factor, SCF). [11-13]

Τα μελανοκύτταρα περιέχουν εξειδικευμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια, τα οποία προέρχονται από πρώιμες ενδοσωμικές μεμβράνες και ονομάζονται μελανοσώματα. Η βασική τους λειτουργία είναι η σύνθεση και η αποθήκευση μελανίνης. Τα μελανοσώματα ποικίλλουν σε μέγεθος, σχήμα και σύνθεση ανάλογα με τον τύπο μελανίνης που συνθέτουν και περιέχουν και συνδέονται μέσω μιας μεμβράνης λιπιδίων με το εξωτερικό τους περιβάλλον. Πριν ωριμάσουν ονομάζονται προ-μελανοσώματα και στη πορεία γίνονται μελανοσώματα. [11-13]

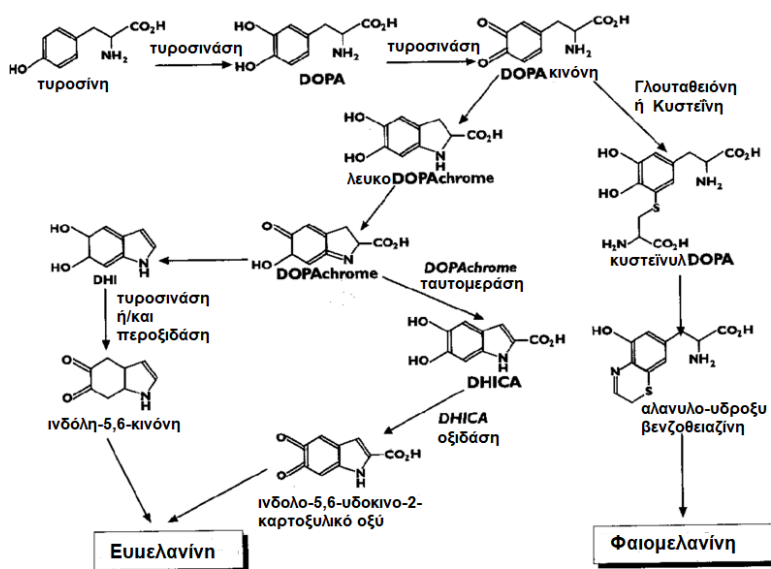
Τα ευμελανοσώματα είναι ελλειψοειδή και τείνουν να είναι μεγαλύτερα από τα φαιομελανοσώματα, τα οποία είναι γενικά πιο σφαιρικά και πιο ακανόνιστου σχήματος. Έχει υποτεθεί ότι το ακανόνιστο σχήμα των φαιομελανοσωμάτων οφείλεται στην έλλειψη πρωτεϊνών που αντιθέτως υπάρχουν στα ευμελανοσώματα, όπως η TRP-1 και η TRP-2. Παρόλα αυτά, κάθε τύπος μελανοσωμάτων περιέχει τυροσινάση η οποία καθορίζει το πρώτο βήμα της μελανοσύνθεσης, τη μετατροπή L-τυροσίνης σε L-ντοπακινόνη. Σε δεύτερη φάση αν υπάρχει σε επαρκείς ποσότητες κυστεΐνη, τότε αυτή αλληλοεπιδρά με την ντοπακινόνη ώστε να παραχθεί η φαιομελανίνη. Αποκλειστικά στα μελανοσώματα που περιέχουν τα ένζυμα TRP-1 και TRP-2 γίνεται και η παραγωγή της ευμελανίνης. Στη πορεία η παραγωγή της ευμελανίνης και της φαιομελανίνης ρυθμίζεται από την αντίθετη δράση της ορμόνης διέγερσης των άλφα-μελανοκυττάρων (Melanocyte-Stimulating Hormone,  $\alpha$ -MSH) και της πρωτεΐνης που

σχετίζεται με το agouti (Agouti-RP, AgRP). Το pH των μελανοσωμάτων διαδραματίζει επίσης πολύ σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία της σύνθεσης της μελανίνης αφού είναι ικανό να επηρεάσει την περίοδο υστέρησης και συνεπώς να ρυθμίζει την έναρξη της μελανογένεσης. [11-13]

Με το τέλος της μελανοσύνθεσης, ακολουθεί η μεταφορά των μελανοσωμάτων από τα μελανοκύτταρα στα κερατινοκύτταρα. Έχουν προτεθεί 4 διαφορετικοί μηχανισμοί μεταφοράς σχετικά με τη συγκεκριμένη κίνηση. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στο μοντέλο φαγοκυττάρωσης, όπου τα κερατινοκύτταρα μπορούν να φαγοκυτταρώσουν ολόκληρα συστατικά μελανοκυττάρων ως μέθοδο εγκλείσεως της μελανίνης. Ο δεύτερος μηχανισμός που έχει τεκμηριωθεί σχετίζεται με το μοντέλο σύντηξης των δενδριτών μελανοκυττάρων με τη μεμβράνη των κερατινοκυττάρων. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά στη μεταφορά κυστιδίων όπου προτείνεται ότι τα μελανοκύτταρα συσκευάζουν μελανοσώματα σε σφαιρίδια και στη συνέχεια τα μεταφέρουν μέσω των δενδριτικών εκβολών τους, στην περιφέρεια των κερατινοκυττάρων τα οποία με τη σειρά τους φαγοκυτταρώνουν αυτά τα σφαιρίδια. Ο τέταρτος μηχανισμός είναι το μοντέλο της εξωκυττάρωσης όπου μονάδες μελανίνης απαλλαγμένες από μελανοσωμικές μεμβράνες, απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο μεταξύ μελανοκυττάρου και κερατινοκυττάρου και στη συνέχεια εσωτερικεύονται από τα κερατινοκύτταρα μέσω φαγοκυττάρωσης. [11-13]

### Εικόνα 2.1.3.1

Βιοσύνθεση ευμελανίνης και φαιομελανίνης.



## 2.2 Ένζυμα της μελανογένεσης

Η τυροσινάση, η οποία αποτελεί το βασικό ένζυμο για την διαδικασία της σύνθεσης της μελανίνης, είναι ένα πολυλειτουργικό μεταλλοένζυμο, μια γλυκοπρωτεΐνη, που βρίσκεται στη μεμβράνη των μελανοσωμάτων. Στο εσωτερικό του μορίου υπάρχουν τμήματα ιστιδίνης. Στην ιστιδίνη συνδέονται τα ιόντα του δισθενούς χαλκού ο οποίος είναι απαραίτητος προκειμένου η τυροσινάση να είναι λειτουργική και να επιτελέσει την βασική της λειτουργία και ταυτόχρονα το βασικότερο στάδιο της μελανογένεσης, την κατάλυση της μετατροπής της L-τυροσίνης σε L-dopa (L-dopa). Η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του ενζύμου τυροσινάση εξαρτάται από την οξειδωση του μέσω κάποιου αναγωγικού μέσου όπως L-dopa, βιταμίνη C ή το υπεροξείδιο ή/και το μονοξείδιο του αζώτου.<sup>[11-15]</sup>

Στη μεμβράνη των μελανοσωμάτων βρίσκονται και δύο ακόμη πρωτεΐνες με δομή παρόμοια της τυροσινάσης, η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την τυροσινάση τύπου 1, TRP-1 και η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την τυροσινάση τύπου 2, TRP-2, οι οποίες, παρόλο που δεν είναι ακόμη γνωστή η ακριβής τους δράση, είναι γνωστό ότι ενισχύουν την ενεργοποίηση και τη σταθεροποίηση της τυροσινάσης, την σύνθεση των μελανοσωμάτων ακόμα και αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών. Η TRP-2 λειτουργεί ως ταυτομεράση της dopachrome, καταλύει την αναδιάταξη της σε 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA), διαθέτει ένα μεταλλικό ιόν προκειμένου να είναι λειτουργική και έχει ως συμπράγοντα τον ψευδάργυρο. Η TRP-1 οξειδώνει το DHICA σε καρβοξυλιωμένη ινδολο-κινόνη η οποία τελικά μετατρέπεται σε μελανίνη.<sup>[11-15]</sup>

### 2.2.1 Τυροσινάση

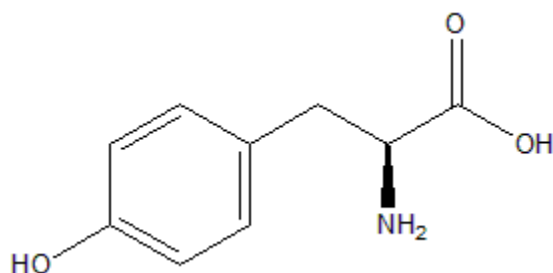
Η τυροσινάση παράγεται από τα μελανοκύτταρα και φέρει δύο ιόντα δισθενούς χαλκού στο ενεργό κέντρο που συνδέονται με τρεις ιστιδίνες ανά ιόν χαλκού. Μετά την παραγωγή και την επεξεργασία της μεταφέρεται στα μελανοσώματα. Ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών χαλκού, πρωτεϊνών δηλαδή που περιλαμβάνουν ιόντα χαλκού τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μοριακό οξυγόνο και είναι ικανές να συνδέονται ισχυρά μέσω των ιόντων με διάφορους υποκαταστάτες. Τα ιόντα χαλκού κατά τους καταλυτικούς κύκλους του ενζύμου διαφοροποιούν την οξειδωτική τους κατάσταση η οποία ποικίλλει από +2, +1 έως 0 όταν το ένζυμο είναι απενεργοποιημένο.

[14-15]

Η τυροσινάση, χάρη στην ικανότητά της να συνδέεται ομοιοπολικά με μοριακό οξυγόνο, έχει δύο κύριες δράσεις στον καταλυτικό της κύκλο. Η μία αφορά στην κατάλυση της οξείδωσης μονοφαινολών (δραστηριότητα κρεζολάσης ή μονοφαινολάσης) και η άλλη στην κατάλυση οξείδωσης ορθο-διφαινολών (δραστηριότητα κατεχολάσης ή διφαινολάσης) προς δραστικές ορθο-κινόνες. Η ονομασία τυροσινάση προέρχεται από την τυροσίνη η οποία είναι το τυπικό υπόστρωμα του ενζύμου. Οι δύο δράσεις της τυροσινάσης ως ένζυμο παρουσιάζουν ποικίλες ειδικότητες υποστρώματος, παρόλο που το ένζυμο διαθέτει υψηλή συγγένεια ως προς τα L-ισομερή υποστρώματα και χαμηλότερα συγγένεια ως προς τα D-ισομερή. [14-15]

### Εικόνα 2.2.1.1

Χημική δομή της L-τυροσίνης, η οποία αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου τυροσινάση.



Στους μύκητες και τα σπονδυλωτά, η τυροσινάση καταλύει το αρχικό βήμα στο σχηματισμό της χρωστικής μελανίνης από την τυροσίνη. Στα φυτά, τα φυσιολογικά υποστρώματα είναι μια ποικιλία φαινολικών ενώσεων. Από το *Agaricus bisporus* (*Agaricaceae*) εξάγεται μία τυροσινάση, η οποία παρουσιάζει δομική ομοιότητα με αυτή των θηλαστικών και λαμβάνεται με εύκολη και οικονομική πειραματική διαδικασία. Γι' αυτό το λόγο, η τυροσινάση μανιταριού χρησιμοποιείται για μελέτες που σχετίζονται με την διαδικασία παραγωγής μελανίνης και για έλεγχο ενώσεων που έχουν ανασταλτική δράση της τυροσινάσης. [14-15]

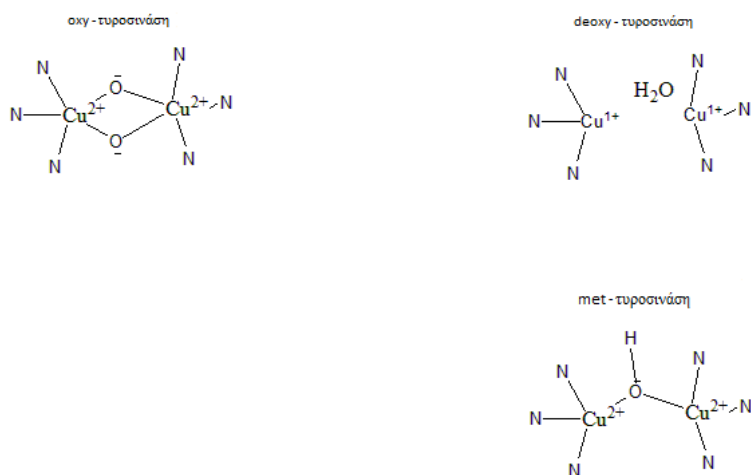
Οι τυροσινάσες, ανεξάρτητα από ποια πηγή προέρχονται, διατηρούν την κεντρική τους περιοχή, η οποία περιέχει δύο ιόντα χαλκού, κάθε ένα από τα οποία συνδέεται με τρεις ιστιδίνες. Στον σχηματισμό χρωστικών μελανίνης εμπλέκονται τρεις τύποι τυροσινάσης, η oxy-τυροσινάση (oxy-tyrosinase, Oxy), η met-τυροσινάση (met-tyrosinase, Met) και η deoxy-τυροσινάση (deoxy-tyrosinase, Deoxy). Οι τρεις αυτοί



τύποι διαφέρουν ως προς την οξειδωτική κατάσταση των ατόμων χαλκού στην ενεργό θέση του ενζύμου. Η οξυγονωμένη μορφή, oxy-τυροσινάση, αποτελείται από δύο άτομα χαλκού (II), καθένα από τα οποία συντονίζεται από δύο ισχυρούς ισημερινούς δεσμούς και έναν ασθενέστερο αξονικό δεσμό με μόριο ιστιδίνης. Το εξωγενές μόριο οξυγόνου δεσμεύεται ως υπεροξείδιο και γεφυρώνει τα δύο κέντρα χαλκού. Η μορφή met-τυροσινάση είναι παρόμοια με τη μορφή oxy-τυροσινάσης. Περιέχει δύο ιόντα χαλκού (II) συζευγμένα μέσω μιας ενδογενούς γέφυρας, αλλά συνδέονται με τη θέση του χαλκού, εκτός από το υπεροξείδιο, και συνδέεται υδροξειδίου. Η deoxy-τυροσινάση περιέχει δύο ιόντα χαλκού (I) με διάταξη παρόμοια με αυτή της met-τυροσινάσης, αλλά χωρίς τη γέφυρα υδροξειδίου. Η μορφή ηρεμίας της τυροσινάσης είναι ένα μείγμα 85% Met και 15% Oxy. [16]

### Εικόνα 2.2.1.2

Χημικές δομές των μορφών oxy-τυροσινάσης, deoxy-τυροσινάσης και met-τυροσινάσης.



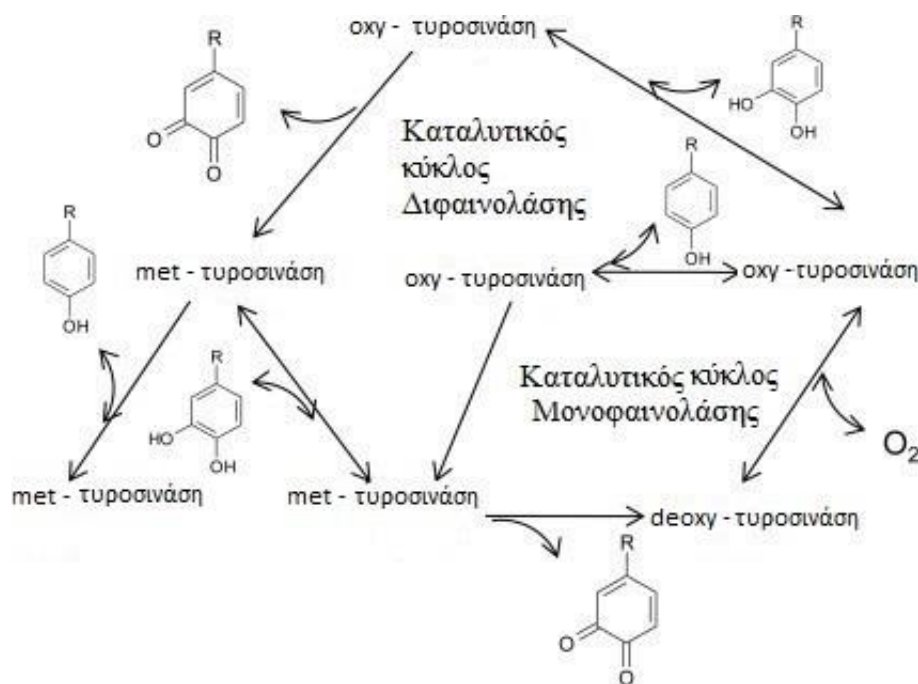
Στον κύκλο της μονοφαινόλασης, η μονοφαινόλη μπορεί να αντιδράσει μόνο με τη oxy-τυροσινάση και να οξειδωθεί προς την ο-κινόνη, με αποτέλεσμα να προκύψει μια deoxy-τυροσινάση έτοιμη για περαιτέρω δέσμευση διοξυγόνου. Στη συνέχεια, η oxy-τυροσινάση αναγεννάται μετά τη δέσμευση του μοριακού οξυγόνου με τη deoxy-τυροσινάση. Εάν υπάρχει μόνο ο-δифαινόλη (ο κύκλος της διφαινόλασης), τόσο η oxy-όσο και η met-τυροσινάση, αντιδρούν με την ο-δифαινόλη, οξειδώνοντάς την προς την ο-κινόνη. Η ο-δифαινόλη συνδέεται με την oxy-τυροσινάση και οξειδώνεται σε ο-κινόνη, αποδίδοντας την met-τυροσινάση. Η τελευταία μορφή μετατρέπεται ένα άλλο μόριο ο-δифαινόλης σε ο-κινόνη και ανάγεται στη deoxy μορφή. Στις περισσότερες

περιπτώσεις, μια διφαινόλη είναι απαραίτητη ως αναγωγικός παράγοντας για να ληφθεί η deoxy-τυροσινάση, η μόνη ικανή να αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και να συνεχίζει την καταλυτική δράση. Για το λόγο αυτό, η δραστηριότητα μονοφαινόλης παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό χρόνο καθυστέρησης μέχρι να παραχθεί επαρκής ποσότητα κατεχόλης (που απαιτείται για να ανάγεται η met-τυροσινάση σε deoxy-τυροσινάση) από τη μικρή ποσότητα της oxy-τυροσινάσης που γενικά υπάρχει στην κατάσταση ηρεμίας.<sup>[16]</sup>

Η διάρκεια του χρόνου καθυστέρησης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες: την πηγή του ενζύμου, τη συγκέντρωση της μονοφαινόλης (η περίοδος υστέρησης είναι μεγαλύτερη όταν η συγκέντρωση της μονοφαινόλης αυξάνεται), τη συγκέντρωση του ενζύμου (με την περίοδο υστέρησης να μειώνεται, αλλά να μην εξαφανίζεται εντελώς, όταν η συγκέντρωση του ενζύμου είναι αυξημένη) και τέλος την παρουσία καταλυτικών ποσοτήτων ο-διφαινόλης ή ιόντων μετάλλου μεταπτώσεως, που καταργούν πλήρως την περίοδο υστέρησης.<sup>[16]</sup>

### Εικόνα 2.2.1.3

Καταλυτικός κύκλος της υδροξυλίωσης της μονοφαινόλης και της οξείδωσης της ο-διφαινόλης σε ο-κινόνη από την τυροσινάση.<sup>[16]</sup>



### 2.2.2 Παρεμπόδιση της μελανογένεσης

Η μελανογένεση μπορεί να παρεμποδιστεί μέσω των παρακάτω μεθόδων:<sup>[17]</sup>

1. **Αναγωγικοί παράγοντες.** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι ουσίες που ανάγουν την ντοπακινόνη. Για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ μπορεί να ανάγει την ο-ντοπακινόνη σε dopa εμποδίζοντας έτσι, τον σχηματισμό dopachrome και μελανίνης.<sup>[17]</sup>
2. **Δεσμευτές ο-ντοπακινόνης.** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ουσίες που περιέχουν ομάδες θείου, οι οποίες αντιδρούν με την ντοπακινόνη προς τον σχηματισμό άχρωμων προϊόντων καθιστώντας την μη διαθέσιμη. Η μελανογένεση συνεχίζεται με μειωμένο ρυθμό έως να τελειώσει όλη η ποσότητα του δεσμευτή και κατόπιν επανέρχεται στον αρχικό της ρυθμό.<sup>[17]</sup>
3. **Εναλλακτικά υποστρώματα τυροσινάσης.** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν διάφορες φαινολικές ενώσεις που λειτουργούν ως υπόστρωμα τυροσινάσης δίνοντας όμως προϊόντα που απορροφούν σε φασματική περιοχή διαφορετική από αυτή του dopachrome. Όταν αυτά τα φαινολικά παρουσιάζουν καλή συγγένεια με το ένζυμο, αποτρέπεται ο σχηματισμός dopachrome.<sup>[17]</sup>
4. **Μη ειδικοί αδρανοποιητές ενζύμων.** Τα οξέα ή οι βάσεις που μετουσιώνουν μη ειδικά την τυροσινάση καθιστώντας τη πλέον μη λειτουργική.<sup>[17]</sup>
5. **Ειδικοί αδρανοποιητές του ενζύμου τυροσινάσης.** Η τυροσινάση μπορεί να αντιδράσει με τους συγκεκριμένους αναστολείς, σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς, κάτι το οποίο αδρανοποιεί μη αναστρέψιμα το ένζυμο.<sup>[17]</sup>
6. **Ειδικοί αναστολείς τυροσινάσης.** Οι ενώσεις αυτές έχουν την δυνατότητα να συνδέονται αναστρέψιμα με την τυροσινάση και συνεπώς να μειώνουν την λειτουργικότητά της ως προς την κατάλυση.<sup>[17]</sup>

### 2.2.3 Αναστολή της τυροσινάσης

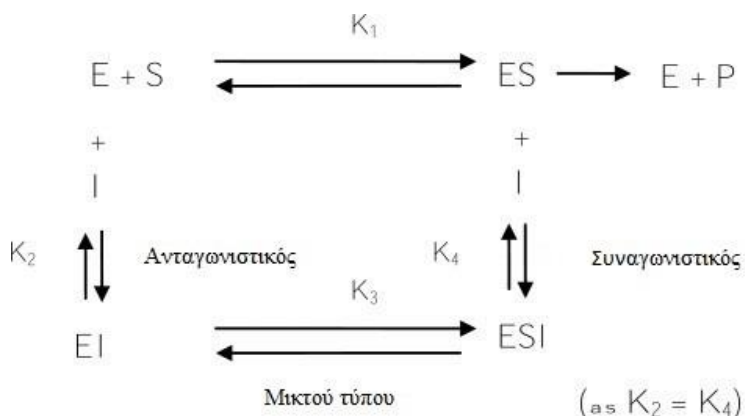
Από τους τύπους ενώσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω, μόνο η 5<sup>η</sup> κατηγορία, δηλαδή οι ειδικοί αδρανοποιητές του ενζύμου καθώς και η 6<sup>η</sup> κατηγορία δηλαδή οι

ειδικοί αναστολείς μπορούν να χαρακτηριστούν ως πραγματικοί αναστολείς και αυτό γιατί συνδέονται άμεσα με την τυροσινάση αναστέλλοντας τη δραστηριότητά της. Όσον αφορά τους ειδικούς αναστολείς, ο μηχανισμός αναστολής τους είναι αναστρέψιμος και διακρίνεται στους εξής τύπους: συναγωνιστικός, ανταγωνιστικός και μικτού τύπου (συναγωνιστικός/μη ανταγωνιστικός).<sup>[17]</sup>

Στη περίπτωση της συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας I (Inhibitor) και το υπόστρωμα S (Substrate), συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο ένζυμο της τυροσινάσης, μεταβάλλοντας και την σταθερά εξειδικεύσεως του ενζύμου ενώ στην περίπτωση του ανταγωνιστικού αναστολέα, ο αναστολέας δεσμεύεται μόνο στο ένζυμο που έχει δεσμευτεί το υπόστρωμα και όχι στο ελεύθερο ένζυμο, γεγονός που δεν μεταβάλλει την σταθερά εξειδικεύσεως. Ο μικτός αναστολέας συνδυάζει την συναγωνιστική και ανταγωνιστική δράση και μπορεί να προσδεθεί είτε στο ελεύθερο ένζυμο ή στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος.<sup>[17]</sup>

### Εικόνα 2.2.3.1

Μηχανισμός δράσης αναστολέων. Τα E (Enzyme), S (Substrate), I (Inhibitor) και P (Product) είναι το ένζυμο, το υπόστρωμα, ο αναστολέας και το προϊόν, αντίστοιχα. Το ES είναι το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και το EI και το ESI είναι τα σύμπλοκα ενζύμου-αναστολέα και ενζύμου-υποστρώματος-αναστολέα, αντίστοιχα.



Οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς δεσμεύονται εκλεκτικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και διαθέτουν στοχοποιημένη δράση και όχι γενική τροποποίηση του ενζύμου. Παρεμποδίζουν τη δέσμευση του υποστρώματος, τροποποιούν ανεπανόρθωτα μέσω

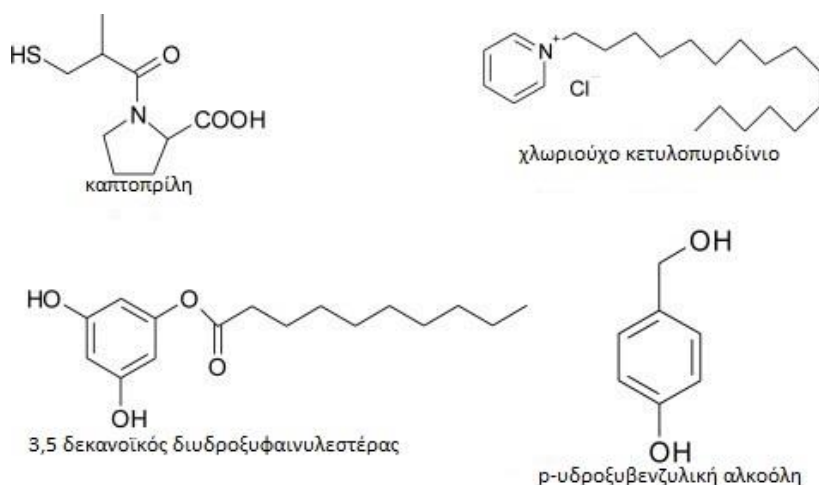
ομοιοπολικού δεσμού κάποιο κρίσιμο αμινοξικό κατάλοιπο και το αποτέλεσμα στην κινητική του ενζύμου μοιάζει με εκείνο ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.<sup>[17]</sup>

Η καπτοπρίλη, ένα αντιυπερτασικό φάρμακο [(2S)-1-(3-μερκαπτο-2-μεθυλπροπιονυλ)-1-πρόλίνη], σχηματίζει σύμπλοκο χαλκού-καπτοπρίλης και δεσμό δισουλφιδίου μεταξύ καπτοπρίλης και πλούσιων σε κυστεΐνη περιοχές στην ενεργή θέση της τυροσινάσης. Κατά συνέπεια, το φάρμακο είναι σε θέση να αποτρέψει το σχηματισμό μελανίνης αναστέλλοντας μη αναστρέψιμα τη δραστηριότητα μονοφαινόλασης και διφαινόλασης της τυροσινάσης μανιταριού με συναγωνιστικό και ανταγωνιστικό τρόπο, αντίστοιχα, καθώς και με αδρανοποίηση των παραγόμενων ο-κινονών για να σχηματιστεί ένα άχρωμο συζυγές προϊόν.

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι επίσης αδρανοποιητής πολλών ενζύμων που περιέχουν χαλκό, όπως η ντοπαμίνη β-μονοοξυγενάση και η τυροσινάση μανιταριού. Προκαλεί την οξείδωση υπολείμματος μεθειονίνης στη θέση 374 της ενεργής θέσης της τυροσινάσης του μανιταριού προς σουλφοξείδιο της μεθειονίνης. Οι Chen et al. περιέγραψαν δύο άλλους μη αναστρέψιμους αναστολείς της τυροσινάσης: το χλωριούχο κητυλοπυριδίνιο και το δεκανοϊκό 3,5-διυδροξυφαινυλεστέρα. Με τη χρήση φθορισμομετρίας αποδείχθηκε ότι το χλωριούχο κητυλοπυριδίνιο μπορεί να συνδεθεί με το μόριο της τυροσινάσης και να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή του. Από την άλλη πλευρά, ο μηχανισμός αναστολής του δεκανοϊκού 3,5-διυδροξυφαινυλεστέρα ήταν μη αναστρέψιμη και μικτή αναστολή με ποικίλες σταθερές αδρανοποίησης που κυμαίνονταν από 1,93 έως  $7,912 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[37]</sup>

### Εικόνα 2.2.3.2

Χημικές δομές μη αναστρέψιμων αναστολέων τυροσινάσης.



## 2.3 Κατηγορίες ενώσεων με λευκαντική -skin lightening δράση

### 2.3.1 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν κύρια ομάδα παρεμποδιστών της δράσης της τυροσινάσης αφού μπορούν να λειτουργήσουν ως υποστρώματά της. Η αποτελεσματικότητα της παρεμπόδισης εξαρτάται από τη χημική δομή τους δηλαδή από την ύπαρξη, το είδος και την ακριβή θέση των υποκαταστατών που φέρουν. Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινόλων και είναι παράγωγα βενζο-γ-πυρόνης. Αποτελούνται από φαινολικούς και βενζο-πυρενικούς δακτυλίους και είναι ευρέως κατανεμημένα στα φύλλα, στα άνθη, τους σπόρους και το φλοιό διαφόρων φυτών. Ο ρόλος που έχουν οι συγκεκριμένες ενώσεις ως προς τα φυτά, είναι να τα προστατεύουν μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης από τις αρνητικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας. Τα φλαβονοειδή, διακρίνονται σε επτά υποκατηγορίες: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ισοφλαβονοειδή, χαλκόνες και κατεχίνες. Η ταξινόμηση των φλαβονοειδών σε υποκατηγορίες εξαρτάται από τους υποκαταστάτες που φέρουν. Η δομή των φλαβονοειδών είναι συμβατή με τους ρόλους τόσο των υποστρωμάτων όσο και των (πιθανώς ανταγωνιστικών) αναστολέων της τυροσινάσης. Εκτός από τα φλαβονοειδή, άλλες πολυφαινόλες, οι οποίες επίσης αναγνωρίζονται ως αναστολείς τυροσινάσης, είναι τα στυλβένια και παράγωγα κουμαρίνης. <sup>[17,20-22]</sup>

#### 2.3.1.1 Φλαβονόλες

Ο τρόπος με τον οποίο αναστέλλουν οι φλαβονόλες την δράση της τυροσινάσης, είναι συνήθως ανταγωνιστική αναστολή για την αντίδραση οξείδωσης της L-dopa από την τυροσινάση και το τμήμα 3-υδροξυ-4-κετο της δομής της φλαβονόλης ενεργεί ως χηλικός υποκαταστάτης πρόσδεσης στον χαλκό. Όσον αφορά την ισχύ του αναστολέα, μερικοί από τους αναστολείς φλαβονόλης που μελετήθηκαν ως προς την κινητική της παρεμπόδισης που προκαλούν, και κατατάσσονται ως εξής: κερσετίνη (5,7,3',4'-τετραυδροξυφλαβονόλη) > μυρικετίνη (5,7,3',4',5'-πενταυδροξυ-φλαβονόλη) > καεμπερόλη (5,7,4'-τριυδροξυφλαβονόλη) > γαλαγγίνη (5,7-διυδροξυφλαβονόλη) κ.α. <sup>[20-22]</sup>

#### 2.3.1.2 Φλαβόνες, Φλαβανόνες και Φλαβανόλες

Μερικά από τα φλαβονοειδή που ανήκουν στις κατηγορίες των φλαβονών, των φλαβανονών και των φλαβανολών, αναγνωρίστηκαν ως αναστολείς τυροσινάσης συμπεριλαμβανομένης της νομπιλετίνης (5,6,7,8,3',4'-εξαμεθοξυφλαβόνη), της ναρινγίνης (5,7,4'-τριυδροξυφλαβανόνης) και της νεοεσπεριδίνης (5,7,3'-τριυδροξυ-4'-μεθοξυφλαβόνη). Ωστόσο, η ανασταλτική ισχύς των τριών αναστολέων, βάση βιβλιογραφίας και σύγκρισης του IC<sub>50</sub>, βρέθηκε να είναι μικρή έναντι της τυροσινάσης των μανιταριών σε σύγκριση με το κοχικό οξύ. Το IC<sub>50</sub> είναι ένα μέτρο της ισχύος μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας, στη συγκεκριμένη περίπτωση της τυροσινάσης και αναφέρεται στη μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση.<sup>[23]</sup>

Εκχυλίσματα από το γένος *Morus* (*Moraceae*), έχουν επίσης υψηλές δυνατότητες ως παράγοντες «λεύκανσης»-μείωσης χρώματος του δέρματος λόγω πολλών ισχυρών αναστολέων τυροσινάσης που απομονώνονται από διαφορετικά μέρη του φυτού. Η ουσία μορασίνη (M-6,3'-di-O-β-γλυκοπυρανοσίδη) που απομονώθηκε από τα φύλλα του φυτού παρουσίασε δράση αντιδιφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού 4,5 φορές υψηλότερη από αυτή του κοχικού οξέος όταν προστέθηκε σε μίγμα με τυροσινάση και τυροσίνη και στη συνέχεια μετρήθηκε το IC<sub>50</sub>. Εκτός από τα φύλλα και το στέλεχος του φυτού, οι ρίζες του γένους *Morus* βρέθηκαν επίσης να περιέχουν πολλούς πολύ ισχυρούς αναστολείς τυροσινάσης, συμπεριλαμβανομένης της οξυρεσβερατρόλης, της νοαρτοκαρπετίνης και της στρεπτογενίνης (5,7,2',4'-τετραϋδροξυ-φλαβανόνη).<sup>[24]</sup>

### 2.3.1.3 Ισοφλαβονοειδή

Τα εκχυλίσματα από τις ρίζες και τους σπόρους του γένους *Glycyrrhiza* (*Leguminosae*) έχει βρεθεί ότι διαθέτουν ανασταλτική δράση της μελανογένεσης η οποία οφείλεται στα ισοφλαβονοειδή του φυτού. Λήφθηκαν από τις ρίζες του φυτού και αναγνωρίστηκαν ως ισχυροί αναστολείς τυροσινάσης, η γλαμπριδίνη και το ανάλογό της γλαμπρένη (2',2'-διμέθυλ-2*H*,2'*H*-[3,8'-bi-1-βενζοπυρανο]-5',7-διόλη) και η γλυκασπερίνη C.<sup>[25]</sup>

Η θέση και ο αριθμός των υδροξυλομάδων στον Α δακτύλιο της δομής της ισοφλαβόνης επηρεάζει τόσο την ανασταλτική ισχύ όσο και την σύνδεση των ισοφλαβονών με την τυροσινάση των μανιταριών. Οι Te-Sheng Chang et al. μελέτησαν μια ισοφλαβόνη με υδροξυλομάδες και στις δύο θέσεις C6 και C7 στον Α δακτύλιο

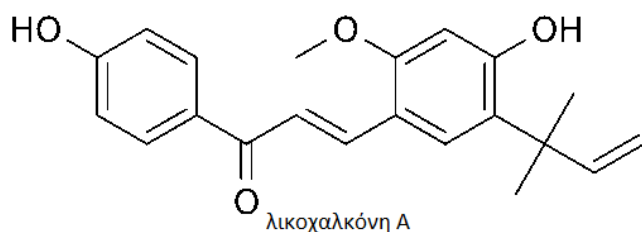
(6,7,4'-τριδροξυισοφλαβόνη) και απέδειξαν ότι αυτή αύξανε περισσότερο από 10 φορές τόσο την ανασταλτική δράση (κρινόμενη από τις τιμές IC<sub>50</sub>) όσο και τη συγγένεια με το ένζυμο (κρίνεται από τις σταθερές Michaelis) σε σύγκριση με εκείνη των ισοφλαβονών είτε με μία μόνο ομάδα υδροξυλίου στη θέση C7 είτε χωρίς καμία υδροξυλομάδα στον δακτύλιο A. Εναλλακτικά, οι υδροξυλομάδες και στις δύο θέσεις C7 και C8 (7,8,4'-τριδροξυισοφλαβόνη και 5,7,8,4'-τετραϋδροξυισοφλαβόνη) τροποποιούν σημαντικά τον ανασταλτικό μηχανισμό των ισοφλαβονών από αναστρέψιμο ανταγωνιστικό σε μη αναστρέψιμο. Η αποσαφήνιση του λεπτομερούς μηχανισμού των επιδράσεων των ομάδων υδροξυλίου στον δακτύλιο A στη δομή των ισοφλαβονών στην ανασταλτική τους δράση έναντι της τυροσινάσης χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. <sup>[17]</sup>

#### 2.3.1.4 Χαλκόνες

Οι χαλκόνες αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους σε *trans* διαμόρφωση, που συνδέονται μεταξύ τους με αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Στην αλυσίδα υπάρχει διπλός δεσμός και καρβυλομάδα. Ορισμένες φυσικές πρενυλιωμένες χαλκόνες έδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση τυροσινάσης. Τρία παράγωγα χαλκονών, όπως η λικουρασίδη, η ισολικιριτίνη και η λικοχαλκόνη A έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του γένους *Glycyrrhiza* και έχουν αναστείλει ανταγωνιστικά τη δραστηριότητα μονοφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού. <sup>[26-27]</sup>

##### Εικόνα 2.3.1.4.1

Δομή λικοχαλκόνης A.



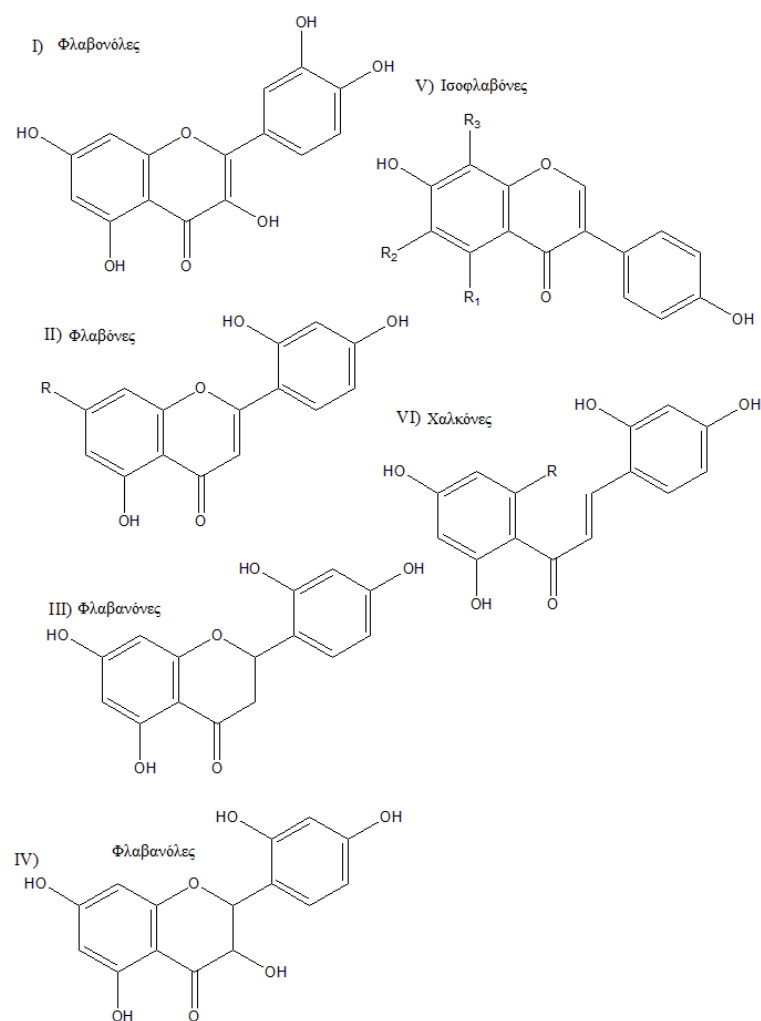
Από τις μελετημένες φυσικές χαλκόνες που αναφέρονται παραπάνω, φαίνεται ότι το τμήμα 4-ρεσορκινόλης (2,4-διυδροξυλικές ομάδες στον αρωματικό δακτύλιο) στη δομή της χαλκόνης είναι η βασική ομάδα στην άσκηση ισχυρής ανασταλτικής δράσης. Μερικές απλές 4-αλκυλορεσορκινόλες αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση τυροσινάσης. Για να αξιολογηθεί η σχέση δομής-δραστηριότητας



μεταξύ των αριθμών και των θέσεων των ομάδων υδροξυλίου στον σκελετό της χαλκόνης και της ανασταλτικής δραστηριότητας προς την τυροσινάση μανιταριού, έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την ανασταλτική δράση συνθετικών υδροξυχαλκονών έναντι της τυροσινάσης μανιταριών και έχει αποδειχθεί ότι το τμήμα 4-ρεσορκινόλης παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης όχι μόνο στις χαλκόνες αλλά και σε άλλες δομές φλαβονοειδών.<sup>[26-27]</sup>

### Εικόνα 2.3.1

Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν στις εξής κατηγορίες: I), Φλαβονόλες- η κερσετίνη (Quercetin), II) Φλαβόνες- η νοραρτοκαρπετίνη (Norartocarpetin), III) Φλαβανόνες- η στρεπογενίνη (Streptoggenin), IV) Φλαβανόλες- η διυδρομορίνη (Dihydromorin), V) Ισοφλαβόνες- η καλικοσίνη (Calycosin), VI) Χαλκόνες- η 2,4,2',4'- τετραυδροξυχαλκόνη (2,4,2',4'- Tetrahydroxychalcone).



### 2.3.1.5 Στιλβένια

Ένα στιλβένιο αποτελείται από έναν διπλό δεσμό αιθενίου υποκατεστημένο με έναν δακτύλιο βενζυλίου και στα δύο άτομα άνθρακα του διπλού δεσμού. Η οξυρεσβερατρόλη (2,4,3',5'-τετραϋδροξυ-τρανς-στιλβένιο), η οποία αρχικά απομονώθηκε από το *Morus Alba* (*Moraceae*), εμφανίζει ισχυρή ανασταλτική δράση και δρα μη ανταγωνιστικά στη δραστηριότητα τόσο της μονοφαινόλης όσο και της διφαινόλης της τυροσινάσης μανιταριού. Ο ανασταλτικός μηχανισμός της, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει άμεσα την ενζυμική δραστηριότητα αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση γονιδίων, δηλαδή επεμβαίνει στον τρόπο που δρουν τα ένζυμα και όχι στην έκφρασή τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η οξυρεσβερατρόλη περιέχει επίσης τη δομή του τμήματος 4-ρεσορκινόλης στον δακτύλιο Β και του τμήματος 5-ρεσορκινόλης στον δακτύλιο Α, αντίστοιχα. <sup>[28-29]</sup>

Ο βασικός ρόλος του δομικού τμήματος 4-ρεσορκινόλης στον δακτύλιο Β και του τμήματος 5-ρεσορκινόλης στον δακτύλιο Α, στην αναστολή της τυροσινάσης έχει επικυρωθεί σε φλαβόνες, χαλκόνες και στιλβένια. Κάτι ακόμα που μπορεί να προσδίδει ιδιαίτερη ανασταλτική δράση στα στιλβένια είναι η ο διπλός δεσμός που ενώνει τους δύο αρωματικούς δακτυλίους. <sup>[28-29]</sup>

### 2.3.2 Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες (ή αλλιώς 2H-χρωμεν-2-όνες) είναι λακτόνες φαινυλοπροπανοϊκού οξέος. Μεταξύ των αναστολέων τυροσινάσης τύπου κουμαρίνης, η αλοεσίνη, η οποία είναι και η πιο γνωστή, είναι ένας φυσικός γλυκοσίτης υδροξυκουμαρίνης που απομονώνεται από την *Aloe Vera* (*Asphodelaceae*). <sup>[30]</sup> Ένα άλλο ανάλογο κουμαρίνης, το 9-υδροξυ-4-μεθοξυψωραλένιο, απομονώθηκε από την *Angelica dahurica* (*Apiaceae*) και εμφάνισε έξι φορές μεγαλύτερη ανασταλτική δράση τυροσινάσης από αυτή του κοχικού οξέος (σύγκριση IC<sub>50</sub>). <sup>[31]</sup>

### 2.3.3 Βενζαλδεΐδες και Βενζοϊκά παράγωγα

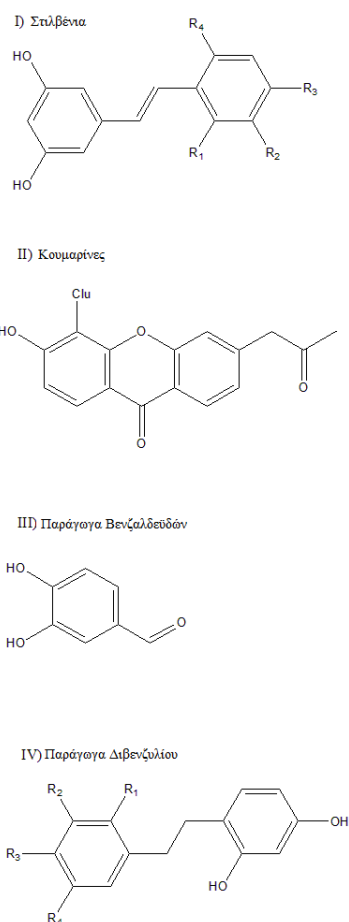
Σημαντικός αριθμός βενζαλδεΐδων και βενζοϊκών παραγώγων έχουν ληφθεί από διαφορετικά είδη φυτών και έχουν αναγνωρισθεί ως ενώσεις με πιθανή ανασταλτική της τυροσινάσης δράση. Κάποια από τα εν λόγω παράγωγα προκύπτουν από το βενζοϊκό οξύ, την βενζαλδεΐδη, το ανισικό οξύ, την ανισαλδεΐδη, το κινναμωμικό οξύ και το μεθοξυκινναμωμικό οξύ, τις 4-βενζαλδεΐδες που έχουν απομονωθεί από κύμινο

ή αλλιώς *Cuminum cyminum* (*Apiaceae*), την 2-υδρόξυ-4-μεθόξυβενζαλδεΐδη από τις ρίζες του φυτού *Mondia whitei* (*Apocynaceae*) αλλά και το π-κουμαρικό οξύ από το *Panax ginseng* (*Araliaceae*)<sup>[32]</sup>

Η αλδεΐδομάδα που διαθέτουν αντιδρά με ομάδες που διαθέτουν πυρηνόφιλο χαρακτήρα όπως για παράδειγμα η αμινομάδες, οι υδροξυλομάδες και η σουλφυδρυλομάδες. Οι ενώσεις τύπου βενζαλδεΐδη, αναστέλλουν της τυροσινάση μέσω του σχηματισμού βάσης Schiff με αμινομάδα του ενζύμου. Η ανασταλτική δράση της τυροσινάσης μπορεί να γίνει και μέσω του βενζοϊκού οξέος όταν αυτό προσδένεται χηλικά στον χαλκό <sup>[32]</sup>.

### Εικόνα 2.3.2

Επιλεγμένοι αναστολείς του ενζύμου τυροσινάση που συγκαταλέγονται στα I) Στυλβένια- η οξυρεσβερατρόλη (Oxyresveratrol), II) Κουμαρίνες- η αλοεσίνη (Aloesin), III) παράγωγα βενζαλδεΐδης- η πρωτοκατεχουαλδεΐδη (protocatechualdehyde), και IV) παράγωγα διβενζυλίου- το 2,4,3',5'-Τετραυδροξυδιβενζύλιο (2,4,3',5'-tetrahydroxybibenzyl).



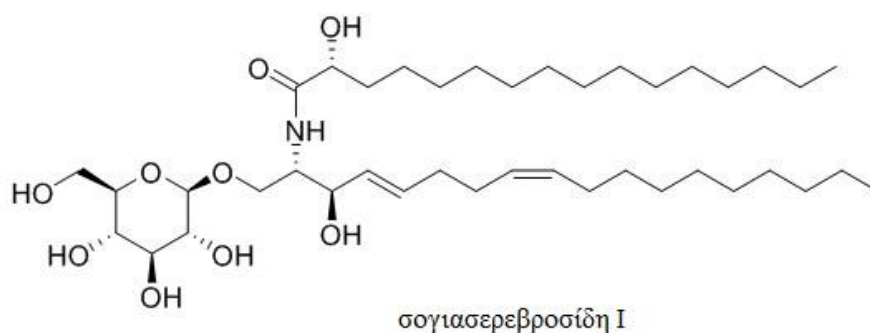
### 2.3.4 Μακριάς Αλυσίδας Λιπίδια και Στεροειδή

Αρκετά λιπίδια έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές και έχουν εμφανίσει δράση κατά της τυροσινάσης. Στις οινολάσπες *sake* ως παραπροϊόν της παρασκευής του ομώνυμου αφηνήματος, βρέθηκε μία τριακυλογλυκερόλη η οποία ονομάζεται τριλινολεΐνη και η οποία φάνηκε να έχει παρόμοια ανασταλτική δράση με το κοχικό οξύ ως προς την διφαινολάση της τυροσινάσης μανιταριού (σύγκριση IC<sub>50</sub>). Με βάση τη βιβλιογραφία, συμπεριλαμβανομένης της αδυναμίας χηλικής πρόσδεσης του χαλκού, της έλλειψης δυνατότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών και της κινητικά μη ανταγωνιστικής αναστολής του αναστολέα, ο ανασταλτικός μηχανισμός του προτάθηκε είναι η δέσμευση της ένωσης σε κάποια θέση της τυροσινάσης, εκτός από την καταλυτική θέση. [33]

Από τα φύλλα του *Guioa villosa Radlk. (Sapindaceae)* απομονώθηκε ένα γλυκοσφιγγολιπίδιο, η σογιασερεβροσίδη I (soyacerebroside I). Το συγκεκριμένο γλυκοσφιγγολιπίδιο φάνηκε να έχει περίπου τη μισή ανασταλτική ικανότητα της μονοφαινολάσης και της διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού σε σύγκριση με το κοχικό οξύ (σύγκριση IC<sub>50</sub>). [34]

#### Εικόνα 2.3.4.1

Δομή σογιασερεβροσίδης I

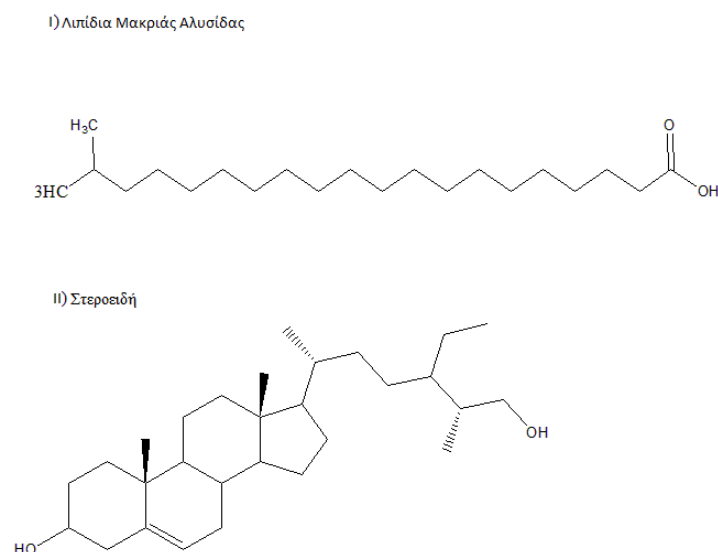


Εκτός από τα λιπίδια μακριάς αλυσίδας, ορισμένα στεροειδή έχουν χαρακτηριστεί επίσης ως αναστολείς τυροσινάσης. Τρία στεροειδή που απομονώθηκαν από την ερευνητική ομάδα των Choudhary και Khan από τα εναέρια μέρη του *Trifolium balansae (Fabaceae)*, έδειξαν υψηλότερη ανασταλτική δράση της διφαινολάσης έναντι της τυροσινάσης των μανιταριών από εκείνη του κοχικού οξέος. Μεταξύ αυτών των

στεροειδών, η στιγμαστ-5-ενο-3β,26-διόλη ήταν 7 φορές πιο δραστική, όπως φάνηκε από τη σύγκριση των IC<sub>50</sub>.<sup>[35]</sup>

### Εικόνα 2.3.4.2

Χημικές δομές επιλεγμένων αναστολέων τυροσινάσης που ανήκουν σε I) Λιπίδια μακράς αλυσίδας- η τριλινολείνη (Trilinolein) ή II) Στεροειδή- η στιγμαστ-5-ενο-3β,26-διόλη.



### 2.3.5 Άλλοι αναστολείς τυροσινάσης από φυσικές πηγές

Οι ανθρακινόνες από διαφορετικές φυτικές πηγές χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα λόγω των καθαρτικών ιδιοτήτων τους. Αυτή η κατηγορία ενώσεων έχει δείξει μεγάλη ποικιλία φαρμακολογικών δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδεις, επουλωτικές, αναλγητικές, αντιπυρετικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές. Η 1,8-διυδροξυ-2-μεθοξυ-3-μεθυλανθρακινόνη, αναστέλλει την δράση της τυροσινάσης σε αντίστοιχο βαθμό με το κοχικό οξύ, έχουν δηλαδή παρόμοιο IC<sub>50</sub> <sup>[36]</sup>, ενώ μία ακόμη ανθρακινόνη, η 1,5-διυδροξυ-7-μεθοξυ-3-μεθυλανθρακινόνη, επέδειξε επίσης αναστολή της τυροσινάσης. Έτσι προκύπτει η ανάγκη σύγκρισης σχέσης δομής-δραστηκότητας μεταξύ των λειτουργικών ομάδων που συνδέονται με τον σκελετό της ανθρακινόνης και της δράσης της κατά της τυροσινάσης.<sup>[37]</sup>

Επιπλέον, πολλές λιγνάνες που απομονώθηκαν από τις ρίζες του *Vitex negundo* (*Lamiaceae*) εμφάνισαν υψηλότερη ανασταλτική δράση τυροσινάσης από το κοχικό οξύ (σύγκριση IC<sub>50</sub>), ενώ η πιο δραστική λιγνάνη από το φυτό ήταν η (+)-

λυονιρεσινόλη, της οποίας η δραστηριότητα ήταν 5,2 φορές υψηλότερη από αυτή του κοχικού οξέος (σύγκριση IC<sub>50</sub>).<sup>[38]</sup>

Εκτός από τους αναστολείς από τα φυτά, οι θαλάσσιοι οργανισμοί παράγουν ουσίες με χρήσεις σε φάρμακα και καλλυντικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων αναστολέων τυροσινάσης. Ένα παράγωγο φλωρογλυκινόλης, το dieckol, απομονώθηκε από το θαλάσσιο καφέ φύκι *Ecklonia stolonifera* (*Ecklonia*), και έχει τρεις φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από αυτή του κοχικού οξέος με σύγκριση των IC<sub>50</sub>.<sup>[39]</sup>

### 2.3.6 Άλλοι αναστολείς τυροσινάσης από συνθετικές πηγές

Μέσω χημικών συνθετικών μεθόδων είναι πλέον ευκολότερο να σχεδιαστούν και να συντεθούν οι δομές ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως αναστολείς τυροσινάσης, προκειμένου με αλλαγές στους υποκαταστάσεις να βελτιωθεί η ανασταλτική τους δράση. Η N-φαινυλοθειουρία (PTU) είναι ένας γνωστός αναστολέας της τυροσινάσης. Το άτομο θείου της ένωσης δεσμεύεται και στα δύο ιόντα χαλκού στην ενεργό θέση του ενζύμου και εμποδίζει τη δραστηριότητά του. Οι Criton και Le Mellay-Hamon συνέθεσαν μια σειρά αναλόγων της N-φαινυλοθειουρίας και αξιολόγησαν τη ανασταλτική δράση των αναλόγων έναντι της δράσης διφαινολάσης της τυροσινάσης μανιταριού. Η αμινομάδα και τα τμήματα θείου της N-φαινυλοθειουρίας αντικαταστάθηκαν από N-υδροξυλαμίνη και οξυγόνο, αντίστοιχα, και η προκύπτουσα ένωση εμφάνισε έξι φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από αυτή της N-φαινυλοθειουρίας σύμφωνα με τα αντίστοιχα IC<sub>50</sub>.<sup>[40]</sup> Οι Kang et al συνέθεσαν μια σειρά ενώσεων συνδυάζοντας τις δομές δύο αναστολέων τυροσινάσης, του κοχικού οξέος και του καφεϊκού οξέος, για να σχηματίσουν νέους αναστολείς, οι οποίοι έδειξαν δράση αντιδιφαινολάσης ίση με αυτή του κοχικού οξέος έναντι της τυροσινάσης μανιταριών, αλλά ενίσχυσαν και τη δραστηριότητα αποχρωματισμού στα κύτταρα μελανώματος.<sup>[41]</sup>

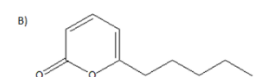
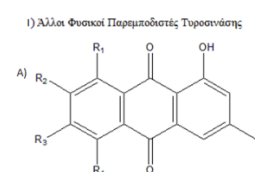
Μερικές απλές ενώσεις φαινυλίου και διφαινυλίου συντέθηκαν επίσης και αναγνωρίστηκαν ως ενώσεις που μπορούν να αναστέλλουν ισχυρά την καταλυτική δράση της τυροσινάσης.<sup>[42]</sup> Το 4,4'-διυδροξυδιφαινύλιο έδειξε 12 φορές μεγαλύτερη ανασταλτική δράση μονοφαινολάσης του ενζύμου τυροσινάσης του μανιταριού σε σχέση με το κοχικό οξύ με τρόπο ανταγωνιστικής αναστολής σε αντίθεση με τα γλυκοσιτικά παράγωγα από το *Pyracantha fortuneory* (*Rosaceae*) τα οποία έδειξαν μικρότερη ανασταλτική δράση.<sup>[43]</sup> Το 4,4'-διυδροξυδιφαινύλιο έχει την ικανότητα να αναστέλλει άμεσα την δράση της τυροσινάσης αλλά και να καταστέλλει βασικές

κυτταρικές παραμέτρους στη μελανογόνο οδό ρυθμίζοντας προς τα κάτω το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης K που εξαρτάται από το cAMP καταστέλλοντας την έκφραση τυροσινάσης.

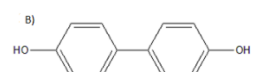
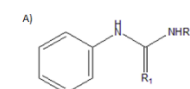
Συμπερασματικά και βάση του μεγάλου αριθμού ερευνών, παρόλο που πολλές ενώσεις έχουν φανεί να αναστέλλουν επιτυχημένα την καταλυτική δράση της τυροσινάσης, μικρός είναι ο αριθμός εκείνων που φαίνεται να μειώνουν την δραστηριότητα της παραγωγής μελανίνης σε κύτταρα ή μοντέλα δέρματος. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι αυτό οφείλεται στο ότι οι μελέτες των παρεμποδιστών της μελανίνης βασίζονται κατά κύριο λόγο στο κατά πόσο αυτοί παρεμποδίζουν την καταλυτική δράση της τυροσινάσης μανιταριού. Ωστόσο, από πολλές απόψεις, η τυροσινάση από το μανιτάρι είναι πολύ διαφορετική από την ανθρώπινη τυροσινάση. Η τυροσινάση μανιταριού είναι ένα τετραμερές ένζυμο που υπάρχει στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ενώ η ανθρώπινη τυροσινάση είναι μια μονομερής και γλυκοζυλιωμένη μορφή που συνδέεται με τη μεμβράνη. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η ανθρώπινη τυροσινάση έχει μεγαλύτερη τάση για οξειδωση της L-dopa από ότι η τυροσινάση μανιταριού.

### Εικόνα 2.3.6.1

Χημικές δομές άλλων αναστολέων τυροσινάσης από II) Φυσικές- η A) Παράγωγο ανθρακινόνης και η B) 6-n-πεντυλο-α-πυρόνη ή II) Συνθετικές πηγές- η A) PTU και η B) το 4,4-διυδροξυδιφαινύλιο.



II) Άλλοι Συνθετικοί Παρεμποδιστές Τυροσινάσης



### 2.3.7 Νέοι Αναστολείς τυροσινάσης

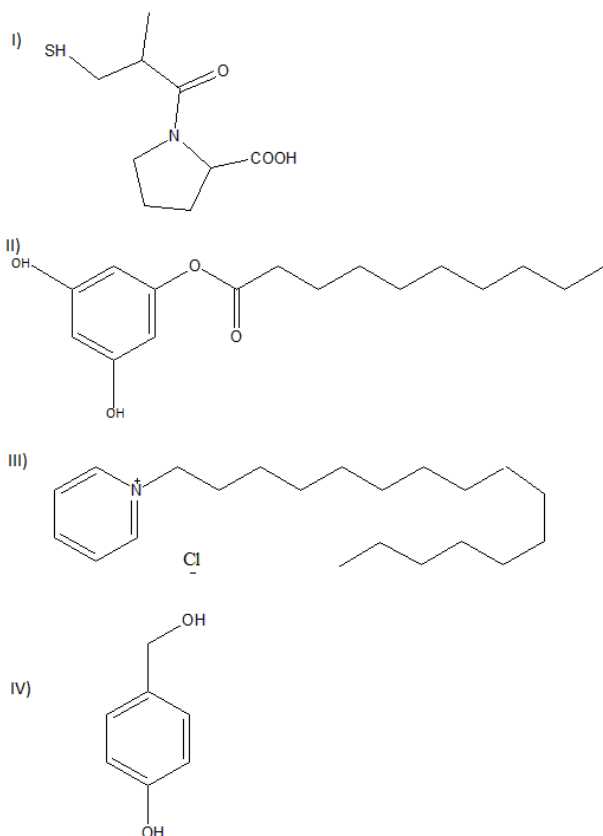
Σε πρόσφατες μελέτες, οι Wang et al ανέφεραν την απομόνωση της (-)-N-φορμυλανανοϊνης από το φυτό *Michelia alba*(*Magnoliaceae*) ως αναστολέα ανθρώπινης τυροσινάσης αλλά και ως αντιοξειδωτικό. Τόσο στον προσδιορισμό αναστολής της τυροσινάσης μανιταριών όσο και στον προσδιορισμό αναστολής της ανθρώπινης τυροσινάσης, η (-)-N- φορμυλανανοϊνη έδειξε συγκρίσιμη δράση με το κοχικό οξύ σύμφωνα με τις τιμες IC<sub>50</sub>, και εμφάνισε πολύ μικρότερη κυτταροτοξικότητα από αυτό. Η ένωση φάνηκε να δεσμεύει την ενεργό θέση της τυροσινάσης αντιδρώντας με δύο ιόντα Cu<sup>2+</sup>. Η αντιοξειδωτική δράση της ένωσης προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου DPPH.<sup>[44]</sup>

Σε μια άλλη έρευνα, οι Akihisa et al. απομόνωσαν έναν αρωματικό γλυκοσίδη, τον 3-ο-δεσμεθυλνικοενοσίτη και 11 γνωστές ενώσεις από τον φλοιό του στελέχους του *Acer buergerianum* (*Sapindaceae*).<sup>[45]</sup> Όλες οι ενώσεις που απομονώθηκαν, αξιολογήθηκαν για τις ανασταλτικές τους δράσεις κατά της μελανογένεσης σε κύτταρα μελανώματος B16 όπου είχε προστεθεί και επιδράσει η ορμόνη διέγερσης α-μελανοκυττάρων (α-MSH). Ο 3-ο-δεσμεθυλνικοενοσίτης εμφάνισε συγκρίσιμη δραστηριότητα με το κοχικό οξύ όταν μετρήθηκε η παραγόμενη μελανίνη. Επιπλέον, οι Mohd et al. απομόνωσαν τρία παράγωγα ξανθόνης από *Arctocarpus obtusus* (*Moraceae*). Μεταξύ αυτών, η πυρανοκυκλοαρτοβιλοξανθόνη A ανέστειλε την τυροσινάση των μανιταριών με συγκρίσιμη δράση με το κοχικό οξύ ενώ χαρακτηρίστηκε και ως ισχυρός αδρανοποιητής ελεύθερων ριζών έναντι των ελεύθερων ριζών DPPH με τιμή IC<sub>50</sub> 2 μg/mL.<sup>[46]</sup>

#### Εικόνα 2.3.7.1

Νέοι αναστολείς τυροσινάσης όπου A) καπτοπρίλη, B) δεκανοϊκός 3,5-διυδροξυφαινυλεστέρας, C) χλωριούχο κετυλοπυριδίνιο και D) π-υδροξυβενζυλική αλκοόλη.





## 2.4 Μέθοδοι αξιολόγησης της ανασταλτικής δράσης ουσιών ως προς την τυροσινάση

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος μέτρησης της «λευκαντικής» δράσης μιας ένωσης είναι η *in vitro* μέτρηση της αναστολής της τυροσινάσης μανιταριού ή της αναστολής της κυτταρικής δραστηριότητας της ανθρώπινης τυροσινάσης.<sup>[47]</sup>

Η δραστηριότητα της τυροσινάσης μανιταριού μπορεί να μετρηθεί παρακολουθώντας τη μετατροπή φαινολικών ενώσεων σε παράγωγα κίνησης χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία. Για παράδειγμα, οι περισσότεροι αναστολείς σύνθεσης μελανίνης, όπως το κοχικό οξύ, η αρβουτίνη ή το ελαγγικό οξύ, καταστέλλουν τη μελανογένεση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της τυροσινάσης.<sup>[47]</sup>

Σε αυτή τη μέθοδο, δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες δράσης της τυροσινάσης ενώ προστίθεται επίσης και ο υπό εξέταση αναστολέας. Χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα με pH περίπου 6,5-6,8, το υπόστρωμα της τυροσινάσης και η τυροσινάση. Μετά από λίγη ώρα γίνεται μέτρηση της απορρόφησης με τη βοήθεια UV-Vis φασματοφωτόμετρου σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και λαμβάνεται μέσω

εξίσωσης σε σχέση με την πρότυπη ένωση, το ποσοστό της αναστολής που επιφέρει ο αναστολέας της τυροσινάσης που εξετάζεται. Η ευκολία με την οποία μπορεί να διεξαχθεί ο προσδιορισμός της τυροσινάσης μανιταριού και η διαθεσιμότητα μιας σημαντικής ποσότητας δομικών και λειτουργικών δεδομένων που σχετίζονται με αυτό το ένζυμο το καθιστούν ιδανικό σύστημα για την εισαγωγή των μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας ενζύμου.<sup>[47]</sup>

## Κεφάλαιο 3

### Παθήσεις που σχετίζονται με την μελάγχρωση

#### 3. Εισαγωγή

Οι διαταραχές μελάγχρωσης επηρεάζουν το χρώμα του δέρματος το οποίο αποκτάται από την χρωστική μελανίνη. Όταν τα κύτταρα στα οποία παράγεται η μελανίνη καταστραφούν ή υποστούν κάποια μη φυσιολογική αλλαγή, επηρεάζεται η παραγωγή της χρωστικής οδηγώντας σε ορισμένες διαταραχές μελάγχρωσης. Οι συγκεκριμένες διαταραχές μπορούν να εκφραστούν ως υπερχρωμία ή υποχρωμία με εντοπισμένες κηλίδες είτε με γενικευμένη βλάβη που εκτείνεται σε περισσότερα από ένα σημεία στο σώμα.

Μερικοί παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε τοπική υπερμελάγχρωση είναι η εγκυμοσύνη, η έκθεση στον ήλιο ή το μέλασμα, ενώ σε περίπτωση κακοήθειας μπορεί να πρόκειται και για μελάνωμα.

Η λεύκη είναι μια δερματοπάθεια που προκαλεί την εμφάνιση υπόχρωμων κηλίδων στο δέρμα ενώ ο αλφισμός είναι μια γενετική πάθηση που χαρακτηρίζεται από έλλειψη μελανίνης στο δέρμα, τα μαλλιά και τα μάτια.

#### 3.1 Μέλασμα

Το μέλασμα είναι μια συνηθισμένη φωτοεπιδεινούμενη δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κηλίδων υπερμελάγχρωσης συμμετρικά κατανομημένων στο πρόσωπο. Μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με το τρόπο κατανομής του σε κεντροπροσωπικό (το πιο σύνηθες), ελαιοειδή και κάτω γνάθου. Η μορφή που ονομάζεται εξωπροσωπικό μέλασμα μπορεί να εμφανιστεί σε μέρη του σώματος εκτός του προσώπου, συμπεριλαμβανομένου του λαιμού, του στέρνου, των αντιβραχίων και των άνω άκρων. <sup>[48]</sup>

Η φυσιοπαθολογία του μελάσματος περιλαμβάνει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικής, ορμονών του φύλου (συμπεριλαμβανομένης της εγκυμοσύνης, της ορμονικής θεραπείας και των από του στόματος αντισυλληπτικών ή και άλλων φαρμάκων) και την έκθεση στον ήλιο. Το ορατό φως, ιδιαίτερα το υψηλής ενέργειας

(400–450 nm) και το UVA (370–400 nm) συμβάλλουν με βασικό ρόλο στην αιτιολογία του μελάσματος.<sup>[49-50]</sup>

Το μέλασμα παρατηρείται σε όλους τους τύπους δέρματος, αν και επηρεάζει δυσανάλογα τα άτομα με σκουρόχρωμο δέρμα και ιδιαίτερα τις γυναίκες. Περίπου το 30% έως 50% των Λατινοαμερικανών και των Ασιατών, μεταξύ άλλων φυλών, μπορεί να παρουσιάσει μέλασμα.<sup>[51-52]</sup>

Το μέλασμα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα ζωής και να οδηγήσει σε μειωμένη αυτοεκτίμηση και υψηλή συχνότητα καταθλιπτικών και αγχωδών διαταραχών μεταξύ των ασθενών με μέλασμα, οι οποίοι είναι πιθανό να παρουσιάσουν αξιοσημείωτη βελτίωση της αυτοεκτίμησης και της ποιότητας ζωής μετά από επιτυχή θεραπεία του μελάσματος.<sup>[53]</sup>

### **3.1.1 Παθογένεια**

Το μέλασμα είναι μια σύνθετη διαταραχή που σχετίζεται με διάφορους παθομηχανισμούς: (1) ακατάλληλη ενεργοποίηση μελανοκυττάρων, (2) συσσώρευση μελανίνης και μελανοσωμάτων στην επιδερμίδα και το χόριο, (3) αυξημένο αριθμό μαστοκυττάρων και ηλιακή ελάστωση, (4) μεταβολή της βασικής μεμβράνης και (5) αυξημένη αγγείωση. Η χρόνια έκθεση στον ήλιο παίζει κρίσιμο ρόλο σε κάθε έναν από αυτούς τους παθομηχανισμούς.<sup>[49-50]</sup> Είναι ενδιαφέρον ότι σε μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη, ο κίνδυνος εμφάνισης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συσχετίστηκε με το χρόνο που έχει ζήσει ο εθελοντής σε εξωτερικούς χώρους. Η ίδια μελέτη ανέφερε μια πιο νωρίς έναρξη του μελάσματος σε ασθενείς με ανοιχτόχρωμο δέρμα σε σύγκριση με το σκούρο δέρμα.<sup>[54]</sup>

Το μέλασμα επηρεάζει όχι μόνο τα μελανοκύτταρα αλλά και τα κερατινοκύτταρα, τους ινοβλάστες, τα μαστοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και πιθανώς τα σηγγατοκύτταρα. Η αλλοιωμένη βασική μεμβράνη και η αυξημένη αγγείωση είναι τα χαρακτηριστικά της φωτογήρανσης και το μέλασμα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια διαταραχή φωτογήρανσης του δέρματος που εμφανίζεται σε προδιατεθειμένο γενετικό υπόβαθρο, και όχι απλώς ως ασθένεια μελάγχρωσης. Περαιτέρω, οι ινοβλάστες που απομονώνονται από το φωτογηρασμένο δέρμα έχει φανεί ότι παράγουν αυξημένο αριθμό προμελανογόνων αυξητικών παραγόντων. Το υψηλής ενέργειας ορατό φως (High Energy Visible Light, HEVL) μόνο του ή σε συνδυασμό με υπέρυθρη

ακτινοβολία μπορεί να δημιουργήσει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), αυξανόμενη έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών και αποδόμηση κολλαγόνου.<sup>[50]</sup> Το οξειδωτικό στρες είναι πιθανό να συμβάλλει επίσης στη μελάχρωση<sup>[55]</sup> ενώ το HEVL μπορεί να προκαλέσει τόσο άμεση όσο και επίμονη υπερμελάχρωση σε ανώτερους φωτότυπους δέρματος III-IV αλλά όχι στους φωτότυπους I και II.

Έπειτα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, μπορεί μέσω των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών, να ξεκινήσει η διαδικασία της μελανοσύνθεσης. Μία κύρια οδός της μελάχρωσης που προκαλείται τόσο από την υπεριώδη ακτινοβολία όσο και από το υψηλής ενέργειας ορατό φως (High Energy Visible Light, HEVL), είναι η έκκριση του παράγοντα βλαστοκυττάρων (Stem Cell Factor, SCF), του συνδέτη για τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης, c-kit, που οδηγεί σε αύξηση του πολλαπλασιασμού των μελανοκυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε την αυξημένη έκφραση του SCF στο χόριο και του c-kit στην επιδερμίδα σε περιοχές με μέλασμα<sup>[41]</sup>.

Το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη μελάσματος, ενισχύοντας την υπόθεση της γενετικής προδιάθεσης για την πάθηση. Ωστόσο, δεν έχει διεξαχθεί μελέτη σε ολόκληρο το γονιδίωμα για την εξέταση των σχετικών γονιδίων, αλλά τα τρέχοντα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα υπεύθυνα γονίδια περιλαμβάνουν μελαχρωματικές, φλεγμονώδεις, ορμονικές και πιθανώς αγγειακές αποκρίσεις. Οι ασθενείς με τύπο δέρματος Fitzpatrick (FST) II και III είναι λιγότερο πιθανό να έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό σε σχέση με ασθενείς με πιο σκουρόχρωμους τύπους δέρματος (IV-VI)]<sup>[54]</sup>.

Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του μελάσματος διαδραματίζουν και οι ορμονικές επιδράσεις κάτι που έχει φανεί έπειτα από περιπτώσεις με εγκυμοσύνη, χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών και άλλες ορμονικές θεραπείες. Το εξωπροσωπικό μέλασμα έχει επίσης συσχετιστεί με μια περιεμμηνοπαυσιακή κατάσταση.<sup>[56-57]</sup> Σε σχετική έρευνα, μια ανοσοϊστοχημική μελέτη της επιδερμίδας και του χορίου του προσβεβλημένου και μη προσβεβλημένου γειτονικού δέρματος έδειξε σημαντικά αυξημένη έκφραση του υποδοχέα προγεστερόνης στην επιδερμίδα του προσβεβλημένου δέρματος. Υπήρξε επίσης αυξημένη έκφραση πρωτεΐνης υποδοχέα οιστρογόνου στο χόριο και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία, η οποία είναι επί του παρόντος άγνωστης σημασίας.<sup>[57]</sup>

### 3.1.2 Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση ή η θεραπεία για το μέλασμα είναι μια διαδικασία που απαιτεί συνδυασμό λήψης τοπικών ή/και συστηματικών δραστικών ουσιών, οι οποίες μπορεί να στοχεύουν σε ποικίλες πτυχές της παθογένεσης του μελάσματος, συμπεριλαμβανομένης της φωτοφθοράς, της φλεγμονής, της αγγείωσης και της μελάγχρωσης.<sup>[49]</sup>

Τα αντηλιακά προϊόντα προστατεύουν το δέρμα από την ηλιακή ακτινοβολία και μπορεί να αποτρέψουν ή να μειώσουν σε ένα βαθμό την εμφάνιση του προβλήματος. Η υδροκινόνη δρα αναστέλλοντας την δράση της τυροσινάσης και μειώνει την μελάγχρωση αλλά χορηγείται κατόπιν ιατρικής συνταγής και για μικρό χρονικό διάστημα λόγω της κυτταροτοξικότητας. Τα κορτικοστεροειδή μπορούν επίσης να αποτρέψουν τη μελάγχρωση μέσω μη επιλεκτικής καταστολής της μελανογένεσης ενώ λειτουργούν και ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και η τοπική τρετινοΐνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στη θεραπεία του μελάσματος, μέσω ενός μηχανισμού προαγωγής της μεταβολής των κερατινοκυττάρων. <sup>[49]</sup>

Υπάρχουν και επεμβατικοί τρόποι για την αντιμετώπιση του μελάσματος. Η πρόσφατη βιβλιογραφία για τις διαδικαστικές θεραπείες περιλαμβάνει κυρίως αναφορές περιστατικών και σειρές περιπτώσεων που αξιολογούν τη χρήση χημικών πύλινγκ, μικροβελονισμού με αντιοξειδωτικές ουσίες, μικροδερμοαπόξεσης και λέιζερ, συνήθως σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους θεραπείας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλές διαδικαστικές μελέτες περιλαμβάνουν ταυτόχρονη χρήση τοπικών θεραπειών και φωτοπροστασίας.<sup>[49]</sup>

### 3.2 Ορμονικό σύστημα και μελάγχρωση

Τα κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς μέσω των οποίων μπορούν να ανταποκριθούν στις στεροειδείς ορμόνες του φύλου. Τα οιστρογόνα αυξάνουν τη μελανογένεση όταν δράσουν στα μελανοκύτταρα και διεγείρουν την παραγωγή μελανογόνων παραγόντων από τα κερατινοκύτταρα. *In vitro* μελέτες σε μονοστιβάδες κυττάρων έχουν δείξει ότι η επίδραση των ορμονών του φύλου στα κύτταρα, ιδιαίτερα στα μελανοκύτταρα και τους ινοβλάστες, ποικίλλει ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των ορμονών που χρησιμοποιούνται αλλά και με τους δότες των κυττάρων. Τα μελανοκύτταρα των σκούρων φωτοτύπων είναι πιο ευαίσθητα στην προγεστερόνη,

ενώ αυτά των ανοιχτών φωτοτύπων είναι πιο ευαίσθητα στα οιστρογόνα.<sup>[58]</sup> Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί το μέλασμα εμφανίζεται νωρίτερα σε ανοιχτούς φωτοτύπους παρά σε σκουρόχρωμους.

Σε τρισδιάστατα μοντέλα (ανακατασκευασμένη επιδερμίδα ) τα οιστρογόνα φαίνεται να συμμετέχουν περισσότερο στη ρύθμιση της μελάγχρωσης από την προγεστερόνη, αλλά το αποτέλεσμα είναι και πάλι εξαρτώμενο από τον δότη, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η γενετική προδιάθεση είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην επίδραση των ορμονών. Τόσο η υπεριώδης ακτινοβολία από μόνη της όσο και οι ορμόνες του φύλου από μόνες τους μπορούν να προκαλέσουν μελάγχρωση, ιδιαίτερα σε ανθρώπους με προδιάθεση. Στις γυναίκες, τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης ποικίλλουν κατά τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου και της εγκυμοσύνης και η ισορροπία τους τροποποιείται.<sup>[59]</sup>

Είναι πιθανό μια τοπική αύξηση της οιστραδιόλης στο χόριο να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μια τέτοια τοπική αύξηση στα αιμοφόρα αγγεία μπορεί να τροποποιήσει τα τοπικά επίπεδα οιστρογόνων, προγεστερόνης και SCF. Επιπλέον, μια αύξηση στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί επίσης να προκαλέσει τοπική αύξηση του οξυγόνου που θα διεγείρει τη μελανογένεση, μια επίδραση που έχει ήδη παρατηρηθεί στα μελανοκύτταρα τόσο σε μονοστιβάδες όσο και σε τρισδιάστατες καλλιέργειες και θα μπορούσε να ενισχύσει την υπερμελάγχρωση. Η χρόνια ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει τοπική διαταραχή που θα διεγείρει κερατινοκύτταρα, μελανοκύτταρα, μαστοκύτταρα και ινοβλάστες. Η διέγερση των παραπάνω κυττάρων θα μπορούσε να ενισχύσει και να διατηρήσει την υπερμελάγχρωση και να τροποποιήσει τη βασική μεμβράνη.<sup>[59]</sup>

### **3.2.1 Επίδρασεις των οιστρογόνων στα μελανοκύτταρα**

Στην σχετική μελέτη του Muriel Cario<sup>[60]</sup>, η έκθεση σε 17β-οιστραδιόλη σε συγκεντρώσεις που βρέθηκαν σε άνδρες (10–11 mol/L) και μη έγκυες γυναίκες (10–9 mol/L) προκάλεσε αύξηση της περιεκτικότητας σε μελανίνη στα αποκρινόμενα μελανοκύτταρα 3 ημέρες μετά τη θεραπεία ενώ μειώθηκε μετά από 10 ημέρες.<sup>[59]</sup> Υπό διέγερση με 25 pmol/L (2,5,10–8 mol/L) 17β-οιστραδιόλης, συγκέντρωση που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή 2,5,10–8 mol/L αιθινυλοιστραδιόλης, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε από του στόματος αντισυλληπτικά χάπια, η σύνθεση μελανίνης αυξήθηκε σε μελανοκύτταρα που

καλλιεργήθηκαν σε μονοστιβάδες<sup>[60]</sup>. Οι τροποποιήσεις στην παραγωγή μελανίνης συσχετίστηκαν αντιστρόφως με τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων.

### **3.2.2 Επιδράσεις της προγεστερόνης στα μελανοκύτταρα**

Οι επιδράσεις της προγεστερόνης στη μελάχρωση δεν έχουν μελετηθεί τόσο όσο οι επιδράσεις των οιστρογόνων γι' αυτό και δεν έχουν βρεθεί δεδομένα με συγκεντρώσεις προγεστερόνης που βρέθηκαν σε άνδρες και μη έγκυες γυναίκες. Η προγεστερόνη στα 5,10–7M, μια φυσιολογική συγκέντρωση που παρατηρήθηκε στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης μείωσε τη μελάχρωση σε μελανοκύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε μονοστιβάδες κυττάρων.<sup>[59]</sup>

Τα θηλυκά μελανοκύτταρα που προέρχονται από τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Induced pluripotent stem, iPS) και τα αρσενικά μελανοκύτταρα από διάφορες θέσεις του σώματος και διαφορετικές ηλικίες (ενήλικες έναντι νεογνών), είχαν παρόμοια απόκριση στα οιστρογόνα και την προγεστερόνη.<sup>[59]</sup>

## **3.3 Μελάνωμα**

Το μελάνωμα είναι μια σοβαρή μορφή καρκίνου του δέρματος που ξεκινά από τα μελανοκύτταρα. Ενώ είναι λιγότερο συχνό από το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Basal Cell Carcinoma, BCC) και το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (Squamous Cell Carcinoma, SCC), το μελάνωμα είναι πιο επιβλαβές λόγω της ικανότητάς του να εξαπλώνεται σε άλλα όργανα πιο γρήγορα εάν δεν αντιμετωπιστεί σε πρώιμο στάδιο.<sup>[61]</sup>

Οι σκουρόχρωμοι φωτότυποι που διαθέτουν περισσότερη ευμελανίνη ενώ οι ανοιχτόχρωμοι χαρακτηρίζονται από περισσότερη φαιομελανίνη. Ενώ η ευμελανίνη έχει την ικανότητα να προστατεύει το δέρμα από τις βλάβες του ήλιου, η φαιομελανίνη δεν έχει τέτοια δράση. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο τα άτομα με πιο σκούρο δέρμα διατρέχουν μικρότερο κίνδυνο να αναπτύξουν μελάνωμα από τα άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα που, λόγω έλλειψης ευμελανίνης, είναι πιο ευαίσθητα σε βλάβες από τον ήλιο ή ακόμη και σε καρκίνο του δέρματος.<sup>[61]</sup>

Τα μελανώματα παρουσιάζονται ως βλάβες στην επιδερμίδα σε πολλά διαφορετικά σχήματα, μεγέθη και χρώματα και γι' αυτό είναι δύσκολο να παρέχεται ένα ολοκληρωμένο σύνολο προειδοποιητικών σημάτων. Η έγκαιρη ανίχνευση μελανώματος είναι ζωτικής σημασίας καθώς το μελάνωμα είναι συνήθως ιάσιμο όταν



ανιχνεύεται και αντιμετωπίζεται έγκαιρα. Αν το μελάνωμα εξαπλωθεί βαθύτερα στο δέρμα ή σε άλλα μέρη του σώματος, είναι πιο δύσκολο να αντιμετωπιστεί. <sup>[61]</sup>

### **3.3.1 Τέσσερις τύποι του μελανώματος**

#### **A) Επιφανειακό μελάνωμα που εξαπλώνεται<sup>[61]</sup>**

Το επιφανειακό μελάνωμα που εξαπλώνεται είναι η πιο κοινή μορφή μελανώματος και μπορεί να εμφανιστεί σε έναν προ-υπάρχοντα σπίλο ή να εμφανιστεί ως νέα βλάβη.

Όταν ξεκινά σε ένα σπίλο που βρίσκεται ήδη στο δέρμα, τείνει να αναπτυχθεί στην επιφάνεια του δέρματος για κάποιο χρονικό διάστημα πριν διεισδύσει πιο βαθιά. Ενώ μπορεί να βρεθεί σχεδόν οπουδήποτε στο σώμα, είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί στον κορμό στους άνδρες, στα πόδια στις γυναίκες και στο πάνω μέρος της πλάτης και στα δύο φύλα.

Κλινικά μπορεί να εμφανίζεται ως μια επίπεδη ή ελαφρώς ανασηκωμένη και αποχρωματισμένη, ασύμμετρη βλάβη με ανώμαλα όρια. Τα χρώματα που μπορεί να έχει η βλάβη περιλαμβάνουν αποχρώσεις του καφέ, του μαύρου, του κόκκινου/ροζ, του μπλε ή του λευκού. Η βλάβη μπορεί ακόμη να είναι αμελανοτική, δηλαδή να μην εμφανίζει κάποιο χρώμα λόγω έλλειψης χρωστικής.

#### **B) Κακοήθες μελάνωμα επί φακής<sup>[61]</sup>**

Αυτή η μορφή μελανώματος εμφανίζεται συχνά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Όταν αυτός ο καρκίνος γίνεται διεισδυτικός ή εξαπλώνεται πέρα από την αρχική εστία, η ασθένεια είναι γνωστή ως μελάνωμα *Lentigo Maligna*. Όσο αφορά την εξάπλωσή της, αυτή η μορφή μελανώματος είναι παρόμοια με το επιφανειακό μελάνωμα που εξαπλώνεται, καθώς στην αρχή αναπτύσσεται κοντά στην επιφάνεια του δέρματος ενώ στην πορεία μπορεί να εμφανιστεί και αλλού. Ο όγκος εμφανίζεται συνήθως σε δέρμα που έχει υποστεί βλάβη από τον ήλιο στο πρόσωπο, τα αυτιά, τα χέρια ή το άνω μέρος του κορμού.

Η όψη των βλαβών μπορεί να μοιάζει με ένα επίπεδο ή ελαφρώς ανασηκωμένο, κηλιδωμένο έμπλαστρο με ανομοιόμορφα περιγράμματα. Το χρώμα είναι συνήθως μπλε-μαύρο, αλλά μπορεί να ποικίλλει από καστανό σε καφέ ή σκούρο καφέ.

#### **Γ) Ακραίο φακοειδές μελάνωμα<sup>[61]</sup>**

Το ακραίο φακοειδές μελάνωμα είναι η πιο κοινή μορφή μελανώματος που εντοπίζεται σε ανθρώπους με σκούρους φωτότυπους, συμπεριλαμβανομένων ατόμων αφρικανικής καταγωγής. Εμφανίζεται συχνά σε δυσδιάκριτα σημεία, συμπεριλαμβανομένων των σημείων κάτω από τα νύχια (υπογόνιο) και στα πέλματα των ποδιών ή στις παλάμες των χεριών. Μπορεί να εμφανίζεται ως μαύρη ή καφέ περιοχή.

#### **Δ) Οζώδες μελάνωμα<sup>[61]</sup>**

Το οζώδες μελάνωμα είναι ο πιο επιθετικός τύπος μελανώματος. Αντιπροσωπεύει το 10 έως 15 τοις εκατό όλων των περιπτώσεων. Ο όγκος αναπτύσσεται πιο βαθιά στο δέρμα πιο γρήγορα από άλλους τύπους και εντοπίζεται συχνότερα στον κορμό, τα πόδια και τα χέρια, καθώς και στο τριχωτό της κεφαλής σε ηλικιωμένους άνδρες. Είναι συνήθως επεμβατικός τη στιγμή που διαγιγνώσκεται για πρώτη φορά.

Το οζώδες μελάνωμα συχνά αναγνωρίζεται ως εξόγκωμα στο δέρμα, συνήθως μπλε-μαύρου χρώματος, αλλά σπάνια μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως ροζ ή κόκκινο εξόγκωμα.

### **3.3.2 Ρόλος της μελανίνης στο μελάνωμα**

Η σύνθεση της μελανίνης, μια οδός πολλαπλών σταδίων και πολυρυθμιζόμενη, αντιπροσωπεύει μια κύρια διαφοροποιημένη λειτουργία των φυσιολογικών και κακοήθων μελανοκυττάρων. Αν και η κύρια λειτουργία της μελανίνης είναι να προστατεύει από βλάβες που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, η χρωστική μελανίνη μπορεί επίσης να ρυθμίσει την επιδερμική ομοιόσταση και έτσι μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά του μελανώματος.<sup>[62]</sup>

Οι Sarna et al.<sup>[63]</sup> μελέτησαν την υπόθεση ότι η χρωστική μελανίνη μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά των κυττάρων μελανώματος *in vitro*. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η παρουσία της χρωστικής μελανίνης επηρέαζε τις ελαστικές ιδιότητες των κυττάρων καθώς και τις ικανότητες μετανάστευσης με τα ανασταλτικά αποτελέσματα να είναι μηχανικής φύσης. Οι Sarna et al, θεωρούν ότι η ελαστικότητα των κυττάρων μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο στην εξάπλωση κυττάρων μελανώματος *in vivo*.

Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η μηχανική (φυσική) επίδραση της πλήρωσης των κυττάρων μελανώματος με κόκκους μελανίνης μπορεί να μετριάσει την κίνηση των κακοήθων μελανοκυττάρων προς τη μεταστατική οδό. Αυτό θα ήταν αναμενόμενο

για τα μελανώματα σταδίου 1 που εντοπίζονται στην επιδερμίδα και το χόριο. Ωστόσο, άλλες παράμετροι όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό και η κινητικότητα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα SKMEL-188, καθώς και τα κύτταρα μελανώματος Bomirski Ab και AbC1, όταν καλλιεργούνται σε μέσα συμπληρωμένα με L-τυροσίνη, όχι μόνο υφίστανται ταχεία μελανοποίηση εντός 3-5 ημερών, αλλά η πρόκληση μελανογένεσης συνοδεύεται από δραματικές αλλαγές στην κυτταρο-αρχιτεκτονική, όπως η στρογγυλή μορφολογία των βαριά χρωματισμένων κυττάρων.

Επίσης, τα κύτταρα SKMEL-188 μπορούν εύκολα να αποκολληθούν από το υπόστρωμα, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αμελανωτικά κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο μέσο Ham's<sup>[62]</sup>. Στόχος είναι να καθοριστούν ο μηχανισμός που οδηγεί σε μειωμένη προσκόλληση των μελαγχρωστικών κυττάρων, οι αλλαγές στον κυτταροσκελετό καθώς και η φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία βρίσκονται κύτταρα με αλλαγμένο επίπεδο μελάγχρωσης και συνακόλουθη κυτταρομορφολογία.

Στη δημοσίευση των Sarna et al.<sup>[63]</sup>, αναφέρεται ότι η μελάγχρωση που προκαλεί η μελανίνη είναι ένας σημαντικός δείκτης, ο οποίος θα πρέπει να αντιπροσωπεύει ένα μέρος της συνοπτικής αναφοράς μελανωμάτων από παθολόγους. Μια τέτοια αναφορά μπορεί να προσδιορίσει τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μελανογένεση (Multidrug Resistance Associated Protein, MRP) ως στόχο για ανοσοθεραπεία. Επίσης, πρόσφατες κλινικοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι το υψηλό επίπεδο μελάγχρωσης συσχετίζεται αντίστροφα με το συνολικό χρόνο επιβίωσης (Overall survival time, OST) και τον ελεύθερο νόσου χρόνο επιβίωσης (Long-term disease free survival, DFS) σε ασθενείς με μελανώματα σταδίων III και IV. Η παθολογικά απορυθμισμένη μελανογένεση μπορεί να συντομεύσει το OST και το DFS των ασθενών με μελάνωμα μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Έτσι, η χρωστική ουσία μελανίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσική πορεία του μελανώματος προστατεύοντας τα μελανοκύτταρα από την υπερϊώδη ακτινοβολία και το οξειδωτικό στρες, αλλά μερικές φορές και επιταχύνοντας την εξέλιξη του μελανώματος και μειώνοντας τα αποτελέσματα της τρέχουσας φαρμακολογικής θεραπείας με στόχο τον χειρισμό αυτής της καταστροφικής ασθένειας.

Συμπερασματικά, η μελανογένεση και η χρωστική μελανίνη επηρεάζουν τη συμπεριφορά φυσιολογικών και κακοήθων μελανοκυττάρων με πιθανές επιπτώσεις στη θεραπεία και τη διάγνωση του μελανώματος.

### 3.3.3 Συσχέτιση οξειδωτικού στρες και μελανώματος

Το ηλιακό φως είναι σημαντικός παράγοντας αφενός σχηματισμού ROS στο δέρμα και αφετέρου ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος. Η ακτινοβολία του δέρματος από τις UVA και/ή UVB βλάπτει τη φυσική αντιοξειδωτική άμυνα και προκαλεί παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS. Η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για τη μελανογένεση. Η ακτινοβολία καλλιεργημένων ανθρώπινων μελανοκυττάρων με υπεριώδη ακτινοβολία (75% UVB, 25% UVA) οδηγεί σε ταχεία δοσοεξαρτώμενη παραγωγή  $H_2O_2$ .<sup>[64]</sup>

Υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην έναρξη και την εξέλιξη του μελανώματος. Μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια που σχετίζονται με το μελάνωμα προκύπτουν από ή επιδεινώνονται από το οξειδωτικό στρες. Η μετάλλαξη V600EBRAF, μια σωματική μετάλλαξη που εκφράζεται συνήθως σε σπίλους και στο μελάνωμα, μπορεί να προκαλείται από οξειδωτικό στρες.<sup>[65]</sup> Στα μελανοκύτταρα, το p16 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του οξειδωτικού στρες και η έλλειψή του σε καλλιέργεια ανθρώπινων μελανοκυττάρων αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα ROS. Τα μελανοκύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στην έλλειψη του p16 από ό,τι είτε τα κερατινοκύτταρα είτε οι ινοβλάστες, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τη συσχέτιση των μεταλλάξεων του p16 με το μελάνωμα. Η απώλεια του ομολόγου φωσφατάσης και τενσίνης (Phosphatase and tensin homolog, PTEN) σχετίζεται με την εξέλιξη του μελανώματος, πιθανώς λόγω αυξημένου ανιόντος υπεροξειδίου που προκύπτει από την παρατεταμένη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (Protein kinase B ή Akt).<sup>[66]</sup>

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει την επιδιόρθωση της εκτομής νουκλεοτιδίων, την κύρια οδό επιδιόρθωσης των φωτοπροϊόντων του DNA που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, μέσω προϊόντων υπεροξειδωσίας λιπιδίων που απενεργοποιούν τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA. Κάποιοι πολυμορφισμοί του GSTM1 που ανήκει στην οικογένεια των αντιοξειδωτικών γονιδίων της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης έχουν συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο μελανώματος, ειδικά σε άτομα με ιστορικό ηλιακών εγκαυμάτων στην παιδική ηλικία. Ένας μεμονωμένος πολυμορφισμός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο της S-τρανσφεράσης

της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase mu 1, GSTP1) το οποίο μειώνει τη δραστηριότητα του ενζύμου, έχει συσχετιστεί με ευαισθησία μελανώματος και με περαιτέρω αύξηση του κινδύνου μελανώματος, όταν συνυπάρχει και έκφραση αλληλόμορφων παραλλαγμένων υποδοχέων μελανοκορτίνης 1 (Melanocortin 1 receptor, MC1R).

### **3.3.4 Συσχέτιση αντιοξειδωτικής και λευκαντικής δράσης φαινολικών ενώσεων σε κύτταρα μελανώματος**

Ουσίες που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και ανασταλτική δράση ως προς την υπερμελάγχρωση, όπως για παράδειγμα οι φαινολικές ενώσεις, έχουν αποτελέσει αντικείμενο της ανάπτυξης καλλυντικών προϊόντων με σκοπό τη μείωση της έντασης της μελαχρωματικής κηλίδας (skin lighteners).

Στην μελέτη των Weerawon Thangboonjit et al. <sup>[67]</sup> ο στόχος ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας αντι-τυροσινάσης και των αντιοξειδωτικών δράσεων διαφόρων φαινολο-καρβοξυλικών οξέων όπως του καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid, CA), του φερουλικού οξέος (Ferrulic Acid, FA), του γαλλικού οξέος (Gallic Acid, GA), του π-κουμαρικού οξέος (p-coumaric Acid, PA) και φαινολικών παραγώγων όπως της κερσετίνης (Quercetin) καθώς και του κοχικού οξέος (Kojic Acid, KA), το οποίο ανήκει στους ευρέως διαδεδομένους αναστολείς της τυροσινάσης, που χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά προϊόντα.

Η μελέτη έγινε τόσο *in vitro* όσο και σε κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος, G361. Τα προς μελέτη φαινολο-καρβοξυλικά οξέα αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της DPPH μεθόδου και ως προς την λευκαντική τους δράση, μέσω της δραστηριότητάς τους κατά της δράσης της τυροσινάσης μανιταριού. Επιπλέον, αξιολογήθηκε και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα αλλά και η παρεμποδιστική τους δράση ως προς την τυροσινάση σε κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος (G361) που ακτινοβολήθηκαν με UVA. Τα δεδομένα έδειξαν ότι η δράση των προς μελέτη ουσιών κατά της δραστηριότητας της τυροσινάσης μανιταριού συσχετίστηκε με τις δραστηριότητές τους όσο αφορά την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών στα *in vitro* συστήματα, ότι το GA είχε χαμηλότερες ανασταλτικές επιδράσεις στην τυροσινάση μανιταριών από την κερσετίνη, το PA, το CA και το FA, ενώ απέδωσε μεγαλύτερη δραστηριότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών από την κερσετίνη και την PA.

[67]

Επιπλέον, τα CA και FA αποδείχθηκε ότι διαθέτουν τόσο ανασταλτική δράση όσο αφορά την κυτταρική τυροσινάση όσο και παράλληλα αντιοξειδωτική δράση, ενώ τα ευρήματά της μελέτης στον προσδιορισμό τυροσινάσης μανιταριού δεν σχετίζονται με αυτά που παρατηρήθηκαν στη μελέτη κυτταρικής τυροσινάσης. Τα CA και FA αποδείχθηκε ότι έχουν συγκρίσιμες ανασταλτικές δραστηριότητες έναντι των ελεύθερων ριζών τυροσινάσης μανιταριού και DPPH, ενώ το CA παρείχε μεγαλύτερη προστατευτική δράση από το FA στη μελανογένεση που προκαλείται από την ακτινοβόληση UVA σε κύτταρα G361. [67]

## Πίνακας 2

Σύγκριση φαινολο-καρβοξυλικών οξέων ως προς την δράση τους κατά της τυροσινάσης και την αντιοξειδωτική τους δράση *in vitro* και σε κύτταρα G361.

	<i>In vitro</i> μελέτη		Μελέτη σε κύτταρα μελανώματος G361	
<b>Μέθοδος</b>	Ανασταλτική δράση κατά της τυροσινάσης	Μέθοδος DPPH	Αντιμελανογόνος δράση	Σάρωση ελευθέρων ριζών
<b>Χημικές Ενώσεις</b>	κερσετίνη=PA=CA=FA>GA	GA>κερσετίνη=PA=CA=FA	CA>FA	GA>CA,GA

Όπου PA= π-κουμαρικό οξύ (P-coumaric Acid), CA= καφεϊκό οξύ (Caffeic Acid), FA=φερουλικό οξύ (Ferrulic Acid), GA= γαλλικό οξύ (Gallic Acid).

Η τυροσινάση καταλύει δύο αντιδράσεις στη βιοσύνθεση μελανίνης: α) την υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-dopa και β) την οξείδωση της L-dopa σε ντοπακινόνη, μια εξαιρετικά δραστική ο-κινόνη, που μετατρέπεται εύκολα σε dopachrome, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή μελανίνης μετά από μια σειρά πολύπλοκων χημικών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Οι ιδιότητες αντι-τυροσινάσης των αποχρωματιστικών-«λευκαντικών» ενώσεων μπορεί να αποδοθούν σε διαφορετικές δράσεις, συμπεριλαμβανομένης της ανταγωνιστικής αναστολής στην καταλυτική θέση χαλκού της τυροσινάσης και της συναγωνιστικής αναστολής κατά της οξείδωσης της L- dopa, της αναγωγής της ο-κινόνης προς τον σχηματισμό του dopachrome αλλά και της αδρανοποίησης των ROS που εμπλέκονται στο σχηματισμό της μελανίνης. Επομένως, είναι πιθανό, ενώσεις που είναι αποτελεσματικές στην αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης μανιταριών μπορεί να είναι και

σαρωτές ελευθέρων ριζών. Η παραπάνω μελέτη επιβεβαίωσε ότι ενώ το ΚΑ είχε μεγαλύτερη ικανότητα από το GA να αναστέλλει τη δραστηριότητα της τυροσινάσης μανιταριών, η ικανότητά του να αδρανοποιεί ελεύθερες ρίζες ήταν χαμηλότερη από αυτή του GA.<sup>[67]</sup>

Η οξειδωση του μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού, που εντοπίζεται στο δέρμα όπως η γλουταθειόνη (GSH) που προκαλείται από την ακτινοβολία UVA θεωρείται ότι συνεισφέρει στη μη φυσιολογική μελανογένεση. Η μελέτη έδειξε ότι η αντιμελανογόνης δράση του CA συσχετίστηκε με την ικανότητά του να αποκαθιστά την ισορροπία οξειδοαναγωγής μέσω της αύξησης της περιεκτικότητας σε GSH στα ακτινοβολημένα κύτταρα. Η ανασταλτική δράση των φαινολικών παραγώγων κατά της τυροσινάσης των μανιταριών φάνηκε να μην συσχετίζεται με αυτή κατά της κυτταρικής μελανογένεσης<sup>[215],[216],[217]</sup>. Πιθανώς οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς μείωσης της χρώσης που περιλαμβάνουν διάφορους στόχους, όπως η έμμεση αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης, οι μεταγραφικοί και/ή μεταφραστικοί μηχανισμοί της τυροσινάσης, οι χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στο σχηματισμό μελανίνης και η μεταφορά και/ή κατανομή του μελανοσώματος.<sup>[67]</sup>

Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν, ότι ενώ το εκχύλισμα εσπεριδοειδών *Citrus Hassaku* εμφάνιζε ασθενή ανασταλτική δράση κατά της τυροσινάσης των μανιταριών, ήταν ικανό να προστατεύει από τη μελανογένεση τόσο σε κύτταρα μελανώματος B16 όσο και σε δέρμα καφέ ινδικού χοιριδίου που εκτίθεται σε UVB.

Ως εκ τούτου, η καταστολή της μελανογένεσης σύμφωνα με την μελέτη αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της τυροσινάσης ή στην αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, τα συστήματα μοντέλων και οι τύποι κυττάρων που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των ιδιοτήτων αντι-τυροσινάσης των αποχρωματιστικών παραγόντων.<sup>[68]</sup>

### **3.4 Λεύκη**

Η λεύκη είναι μια επίκτητη δερματοπάθεια που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση σαφώς αφοριζόμενων λευκών κηλίδων, συχνά με συμμετρική κατανομή. Προκαλείται από την καταστροφή των μελανοκυττάρων της επιδερμίδας και ενίοτε, των τριχικών θυλάκων. Λόγω της εμφάνισής που δίνει στο δέρμα, τα παλαιότερα

κυρίως χρόνια δημιουργούσε σημαντικό αισθητικό πρόβλημα με σημαντική επίδραση στην αυτοεκτίμηση και τις διαπροσωπικές σχέσεις.

### **3.4.1 Επιδημιολογία**

Η επίπτωση της νόσου αφορά περισσότερο από το 0,5% του γενικού πληθυσμού σε παγκόσμια κλίμακα και μπορεί να εκδηλωθεί σε όλες τις ηλικίες, κυρίως όμως μεταξύ 10-30 ετών. Το 50% των ασθενών εμφανίζει τη λεύκη πριν την ηλικία των 20 ετών ενώ το 70% των ασθενών, πριν την ηλικία των 30 ετών. Η λεύκη προσβάλλει όλα τα φύλα με την ίδια επίπτωση. [69]

Ωστόσο, μεγαλύτερος αριθμός θηλέων προσέρχονται στον δερματολόγο εξαιτίας του ψυχο-κοινωνικού αντίκτυπου της νόσου. Διακρίνονται 2 κύριες μορφές της λεύκης: Η τμηματική ή δερματομακική (Segmental, SV) και η μη-τμηματική-γενικευμένη (Non-segmental, NSV). Σε σχέση με την NSV, η SV εμφανίζει έναρξη σε νεαρότερη ηλικία και είναι σπάνια. Η μελέτη οικογενών περιπτώσεων NSV έδειξε ότι η κληρονομικότητα είναι πολυγονιδιακή και πολυπαραγοντική. Είναι πιθανό να υπάρχουν διάφορα μοντέλα κληρονομικότητας της λεύκης ανάλογα με την ηλικία έναρξης και την παρουσία συγκεκριμένων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (Human leukocyte antigen, HLA). [69]

### **3.4.2 Παθογενετικοί μηχανισμοί και κληρονομικότητα**

Η λεύκη φαίνεται να αντιπροσωπεύει μία ομάδα διαταραχών διαφορετικών παθοφυσιολογικά αλλά με κοινό φαινότυπο. Ο μηχανισμός καταστροφής και εξαφάνισης των μελανοκυττάρων από το πάσχον δέρμα δεν έχει πλήρως αποδειχθεί. Ο τρόπος κληρονομικότητας της λεύκης είναι πολυπαραγοντικός και πολυγονιδιακός. Η πιθανότητα εμφάνισης λεύκης σε συγγενείς πρώτου βαθμού, των ασθενών με λεύκη είναι 6%. [69]

Στους παθογενετικούς μηχανισμούς που έχουν προταθεί για τη λεύκη συγκαταλέγονται οι εξής: 1. Αυτοάνοση υπόθεση 2. Νευροχημική υπόθεση 3. Αυτοκυτταροτοξική υπόθεση 4. Βιοχημική υπόθεση 5. Υπόθεση οξειδωτικού stress 6. Μελανοκυττορραγική υπόθεση και 7. Υπόθεση μειωμένης επιβίωσης των μελανοκυττάρων. [69]



Στην περίπτωση της αυτοάνοσης υπόθεσης, η συνύπαρξη της λεύκης με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, η ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι αντιγόνων της μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος των μελανοκυττάρων καθώς και τα αυξημένα επίπεδα ειδικών για τα μελανοκύτταρα κυτταροτοξικών T- λεμφοκυττάρων στο αίμα και στην περιφέρεια των βλαβών, είναι κάποια από τα ευρήματα τα οποία συνηγορούν υπέρ της. [69]

Η νευροχημική υπόθεση βασίζεται σε αυξημένα επίπεδα νοραδρεναλίνης στις βλάβες καθώς και σε εμφάνιση δερματομιακής λεύκης καθώς και έναρξη λεύκης μετά από έντονο στρες. Η νοραδρεναλίνη είναι μια κατεχολαμίνη (παράγωγο του αμινοξέος τυροσίνη) που δρα ως ορμόνη και νευροδιαβιβαστής. Οι δράσεις της είναι παρόμοιες με αυτές της αδρεναλίνης. Στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες, οι ελεύθερες ρίζες πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεση φλεγμονωδών δερματικών νοσημάτων, στην καρκινογένεση, στη φωτογήρανση και στη λεύκανση των τριχών. Τα μιτοχόνδρια είναι η πιο συχνή ενδογενής πηγή ROS, αλλά αποτελούν επίσης ταυτόχρονα και στόχο της βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες. Επομένως οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία, μειωμένη αποτελεσματικότητα αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού και περισσότερες ROS, μέσα από ένα φαύλο κύκλο οξειδωτικής ανισορροπίας. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει παρουσία οξειδωτικού στρες σε όλη την επιδερμίδα ασθενών με λεύκη, η οποία αποδίδεται σε υψηλή περιεκτικότητα  $H_2O_2$  της τάξεως των  $10^{-3}$  M. [69]

Η μελανοκυτταρική υπόθεση μπορεί πιθανώς να ερμηνευτεί μέσω του φαινομένου Koebner. Η τενασκίνη, η οποία αναστέλλει την προσκόλληση των μελανοκυττάρων στη ινονεκτίνη, είναι συνήθως αυξημένη στις βλάβες των ασθενών με λεύκη. Το φαινόμενο Koebner, που ονομάζεται επίσης "απόκριση Koebner" ή "ισόμορφη απόκριση", αναφέρεται σε δερματικές βλάβες που εμφανίζονται σε γραμμές τραύματος ή ερεθισμού. Για το φαινόμενο Koebner έχουν ενοχοποιηθεί κυτταροκίνες, στρες πρωτεΐνες και αυτοαντιγόνα. Οι αιτίες του φαινομένου Koebner που είναι δευτερογενείς στο ξύσιμο και όχι σε μολυσματικό ή χημικό αίτιο περιλαμβάνουν λεύκη, ψωρίαση, ομαλό λειχήνα, λειχήνα nitidus, pityriasis rubra pilaris και ωθυλακική κεράτωση (νόσος Darier). Το φαινόμενο

Koebner περιγράφει δερματικές βλάβες που εμφανίζονται στο σημείο του τραυματισμού. [69]

### 3.4.3 Κλινική εικόνα

Οι κλινικές μορφές της λεύκης είναι οι εξής:

- Εντοπισμένη Εστιακή Δερματομακρή (Segmental, SV) Βλεννογόνων
- Γενικευμένη Κοινή Ακροπροσωπική
- Καθολική

Η κοινή λεύκη είναι η πιο συχνή μορφή της γενικευμένης λεύκης. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυάριθμων αχρωμικών κηλίδων με συμμετρική κατανομή. Η ακροπροσωπική λεύκη αφορά την εμφάνιση της νόσου στα δάκτυλα των άκρων χεριών και πέριξ των στομών του προσώπου ενώ η μικτή λεύκη είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την παρουσία SV και NSV, στον ίδιο ασθενή. Η γενικευμένη λεύκη μπορεί να πρωτοεμφανιστεί σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Εντούτοις, τα χέρια και το πρόσωπο, συνήθως αναφέρονται ως τα αρχικά σημεία εμφάνισης της λεύκης. Έχει αναφερθεί ότι με αρχική προσβολή των χεριών, η λεύκη ακολούθως επεκτείνεται στο πρόσωπο, γεγονός που εξηγεί την συχνότητα προσβολής των άκρων σε αυτούς τους ασθενείς. Από δερματολογικές μελέτες φαίνεται ότι όταν η αρχική προσβολή αφορά τον πρόσθιο κορμό ή τα πόδια, η λεύκη τείνει να γενικευθεί. Οι εκτατικές επιφάνειες του σώματος, όπως οι αγκώνες, τα γόνατα, οι μετακαρπιοφαλαγγικές αρθρώσεις, προσβάλλονται συχνά. Συνήθως η προσβολή είναι συμμετρική και συχνά μπορεί να εμφανίζεται και πέριξ των στομών (μάτια, στόμα, μύτη, πρωκτός). [69]

Η λεύκη εκτός από τις βασικές κλινικές μορφές εμφανίζει και κάποιους κλινικούς υπότυπους: Τη φλεγμονώδη λεύκη, την πολύχρωμη (τρίχρωμη), την περιορισμένης έκτασης και την κυανή. Οι αχρωμικές βλάβες μπορεί να εμφανίζουν ένα επηρμένο φλεγμονώδες όριο και να συνοδεύονται από αίσθημα κνησμού. Η παρουσία φλεγμονώδους ορίου σε πολλές βλάβες ταυτόχρονα είναι ασυνήθης. Όταν η φλεγμονή υποχωρήσει, το δέρμα εμφανίζεται αποχρωματισμένο. [69]

Ο υπότυπος της πολύχρωμης (τρίχρωμη) συναντάται κυρίως σε σκούρους φωτότυπους. Εντός της βλάβης της λεύκης, συνυπάρχουν περιοχές αχρωμικές και υποχρωμικές. Η «τρίχρωμη» λεύκη είναι ο όρος που συνήθως χρησιμοποιείται, αλλά μπορεί να υπάρχει ποικίλος αριθμός αποχρώσεων (τετράχρωμη, πεντάχρωμη, κλπ). Έτσι πιο κατάλληλος θεωρείται ο όρος «πολύχρωμη» λεύκη. [69]

Παρότι αναφέρεται σπάνια, ο υπότυπος της περιορισμένης έκτασης δεν είναι ασυνήθης σε σκουρόχρωμους φωτότυπους και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας ομογενούς υποχρωμικής πλάκας. Μία μεταφλεγμονώδης υπερμελάχρωση μπορεί να προκαλέσει μια κυανή δυσχρωμία των βλαβών μετά από φλεγμονώδη λεύκη. [69]

### 3.5 Αλφισμός

Ο αλφισμός οφείλεται σε ανεπάρκεια της χρωστικής μελανίνης στο δέρμα, τα μαλλιά και τα μάτια (οφθαλμοδερματικός αλφισμός, OCA) ή κυρίως στον οφθαλμό (οφθαλμικός αλφισμός, OA) και προκύπτει από μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης. Η έλλειψη χρωστικής μελανίνης στον οφθαλμό οδηγεί σε υποπλασία του βοθρίου και μη φυσιολογική δρομολόγηση των οπτικών νεύρων. Αυτές οι αλλαγές είναι υπεύθυνες για τον νυσταγμό, τον στραβισμό και τη μειωμένη οπτική οξύτητα που είναι κοινή σε όλους τους τύπους αλφισμού. Μεταλλάξεις σε έξι γονίδια έχουν αναφερθεί ότι είναι υπεύθυνες για διαφορετικούς τύπους οφθαλμοδερματικού και οφθαλμικού αλφισμού, συμπεριλαμβανομένων των TYR (44%), OCA2 (17%), TYRP1 (1%), SLC45A2 (7%) and SLC24A5 (<0.5%). Η λειτουργία μόνο των δύο από τα γονιδιακά προϊόντα είναι γνωστή και είναι αυτή της τυροσινάσης και της πρωτεΐνης-1 που σχετίζεται με την τυροσινάση (TRP-1), τα οποία είναι ένζυμα στη βιοσυνθετική οδό της μελανίνης. Η συνεχής ανάλυση μεταλλάξεων σε συνδυασμό με μελέτες λειτουργίας/δομής θα πρέπει να βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας των υπόλοιπων γονιδίων και του ρόλου τους στον αλφισμό. [70]

#### 3.5.1 Τύποι Αλφισμού

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι αλφισμού. Επιπλέον, λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας ολόκληρου του ανθρώπινου πληθυσμού, δεν εκδηλώνουν όλα τα άτομα με αλφισμό τα ίδια συμπτώματα ή με την ίδια ένταση. Το μόνο χαρακτηριστικό που περιλαμβάνει όλους τους διαφορετικούς τύπους είναι η έλλειψη ή η μείωση της χρωστικής σε διάφορα μέρη του σώματος. Οι δύο βασικοί τύποι είναι ο οφθαλμοδερματικός αλφισμός, OCA και ο οφθαλμικός αλφισμός, OA. Αυτή η ταξινόμηση βασίζεται στον βαθμό μείωσης ή έλλειψης χρωστικής στο δέρμα, τα μαλλιά και τα μάτια. [70]

Στον πρώτο τύπο, όπως υποδηλώνει το όνομά του, οι ασθενείς έχουν μειωμένη χρώση ή έλλειψη χρώσης στο δέρμα, τα μαλλιά και τα μάτια. Όσον αφορά τον δεύτερο τύπο, η απώλεια χρωστικής ουσίας εμφανίζεται κυρίως στους οφθαλμούς. Με τη σειρά τους, αυτοί οι δύο τύποι μπορούν να υποδιαιρεθούν σε διάφορους υποτύπους, ανάλογα με το γονίδιο που επηρεάζεται. Οι κύριοι υπότυποι του αλφισμού είναι οι εξής:

**OCA τύπου 1:** Τα άτομα τείνουν να έχουν γαλακτώδες δέρμα, λευκά μαλλιά και μπλε μάτια. Με την ηλικία, το δέρμα και τα μαλλιά ορισμένων ατόμων μπορεί να σκουρύνουν. [70]

**OCA τύπου 2:** Λιγότερο σοβαρό από τον τύπο 1. Εμφανίζεται συχνότερα σε Αφρικανούς της υποσαχάριας Αφρικής, Αφροαμερικανούς και ορισμένες κοινότητες ιθαγενών της Αμερικής. [70]

**OCA τύπου 3:** Τα προβλήματα όρασης είναι συνήθως πιο ήπια στον τύπο 3 από ό,τι σε άλλους τύπους. Αυτός ο τύπος επηρεάζει κυρίως τους έγχρωμους Νοτιοαφρικανούς. [70]

**OCA τύπος 4:** Αυτός ο τύπος είναι πιο κοινός στους πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας. Παρουσιάζεται παρόμοια με τον τύπο 2. [70]

**X-συνδεδεμένος οφθαλμικός αλφισμός:** Μια γενετική μετάλλαξη στο χρωμόσωμα X προκαλεί οφθαλμικό αλφισμό που επηρεάζει κυρίως τους άνδρες. Υπάρχουν προβλήματα όρασης, αλλά το χρώμα των ματιών, των μαλλιών και του δέρματος είναι γενικά εντός του φυσιολογικού εύρους. [70]

**Σύνδρομο Hermansky-Pudlak:** Αυτή η σπάνια παραλλαγή είναι η πιο κοινή στο Πουέρτο Ρίκο. Τα συμπτώματα είναι παρόμοια με εκείνα του οφθαλμοδερματικού

αλφισμού, αλλά οι ασθένειες του εντέρου, της καρδιάς, των νεφρών και των πνευμόνων ή αιμορραγικές διαταραχές, όπως η αιμορροφιλία, είναι πιο πιθανές. <sup>[70]</sup>

**Σύνδρομο Chediak-Higashi:** Αυτή είναι μια πολύ σπάνια μορφή αλφισμού που προκύπτει από μετάλλαξη στο γονίδιο CHS1. Τα συμπτώματά του μπορεί να μοιάζουν με εκείνα του οφθαλμοδερματικού αλφισμού, αλλά τα μαλλιά ενός ατόμου που πάσχει, μπορεί να φαίνονται ασημί και το δέρμα του μπορεί να φαίνεται ελαφρώς γκριζο. <sup>[70]</sup>

### 3.5.2 Διάγνωση

Η διαδικασία διάγνωσης του αλφισμού μπορεί να περιλαμβάνει μια φυσική εξέταση ή μια συζήτηση σχετικά με τις αλλαγές μελάγχρωσης του δέρματος και των μαλλιών, την εξέταση των ματιών από ειδικό οφθαλμίατρο καθώς και τη σύγκριση του χρωματισμού του ατόμου με αυτόν των βιολογικών μελών της οικογένειας. Άλλες ασθένειες μπορεί επίσης να προκαλέσουν αλλαγές στη μελάγχρωση, αλλά δεν προκαλούν αλλαγές στην όραση. Εάν υπάρχουν και οι δύο αλλαγές, δηλαδή στο χρώμα του δέρματος αλλά και στην όραση, οι γιατροί θεωρούν τον αλφισμό μια πιθανή διάγνωση. <sup>[70]</sup>

Ο γενετικός έλεγχος είναι ο πιο αξιόπιστος τρόπος για τη διάγνωση του αλφισμού. Ωστόσο, είναι ακριβός και οι γιατροί δεν το θεωρούν απαραίτητο σε οικογένειες με αντίστοιχο ιστορικό. Ενώ ο αλφισμός δεν είναι μια απειλητική για τη ζωή ασθένεια, τα άτομα που πάσχουν από αυτήν είναι επιρρεπή σε άλλες ασθένειες, όπως ο καρκίνος του δέρματος ή τα ηλιακά εγκαύματα. Έτσι, είναι απαραίτητη η κατάλληλη προστασία από τον ήλιο, καθώς και η γνώση του τύπου αλφισμού που υποφέρουν. Οι ιατρικές συμβουλές είναι ζωτικής σημασίας για αυτούς τους ασθενείς, καθώς και για τη χρήση υψηλής ποιότητας προστατευτικών κρεμών. <sup>[70]</sup>

## Κεφάλαιο 4

### Οξειδωτικό στρες και διαταραχές μελάγχρωσης

#### 4. Εισαγωγή

Οι διάφορες διαταραχές μελάγχρωσης είναι πιθανό να προκύπτουν από μη επιθυμητές αλλαγές στον αριθμό ή στην λειτουργία των μελανοκυττάρων όπως για παράδειγμα μη φυσιολογική παραγωγή ή κατανομή μελανίνης, η αλόγιστη μεταφορά στα κερατινοκύτταρα ή μη φυσιολογική αποικοδόμηση μελανίνης.

Η σύνθεση της μελανίνης είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας και η οποία περιλαμβάνει αντιδράσεις οξείδωσης και παραγωγής ανιόντων υπεροξειδικής ρίζας ( $O^{2-}$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) τα οποία είναι ικανά να υποβάλλουν τα μελανοκύτταρα σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Το γεγονός ότι η σύνθεση της μελανίνης λαμβάνει χώρα συγκεκριμένα και μόνο στα μελανοσώματα, εξυπηρετεί στην προστασία των άλλων κυτταρικών συστημάτων και συστατικών από οποιαδήποτε πιθανή οξειδωτική βλάβη.

#### 4.1 Τυροσινάση και οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις

Η τυροσινάση αποτελεί το κυριότερο ένζυμο της σύνθεσης της μελανίνης και επιτελεί την αντίδραση υδροξυλίωσης των μονοφαινόλων σε ο-διφαινόλες (πχ την τυροσίνη σε L-dopa) αλλά και την οξείδωση των ο-φαινόλων σε ο-κινόνες (πχ την L-dopa σε ντοπακινόνη). Η ντοπακινόνη είναι μια όρθο κινόνη που είναι ικανή να αντιδράσει με πυρηνόφιλες ενώσεις όπως οιθειόλες ή με αμινομάδες. Η καταλυτική δράση της τυροσινάσης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία  $O^{2-}$ . Η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε dopachrome μέσω αντίδρασης οξειδοαναγωγής. Μετά από αυθόρμητη αποκαρβοξυλίωση, το dopachrome οδηγεί: α) στη σύνθεση της διυδροξυινδόλης (5,6-Dihydroxyindole, 5,6-DHI), η οποία οξειδώνεται σε ινδολοκινόνη, ή β) στη σύνθεση διυδροξυινδολικού καρβοξυλικού οξέος (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, 5,6-DHICA) μετά από αντίδραση ταυτομερίωσης μέσω της πρωτεΐνης 2 που σχετίζεται με την τυροσινάση (TRP2) και το 5,6-DHICA στη συνέχεια μετατρέπεται στην αντίστοιχη κινόνη.<sup>[16]</sup>

Επιπλέον, η TRP2 προστατεύει από το οξειδωτικό στρες αυξάνοντας τα επίπεδα γλουταθειόνης και μειώνοντας τη βλάβη του DNA που προκαλείται από τις ελεύθερες

ρίζες. Οι αλυσιδωτές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των υδροξύ-ινδολών προς κινόνες παράγουν ενδιάμεσα και δραστικές μορφές οξυγόνου, ενώ ο πολυμερισμός αυτών των κινονών οδηγεί τελικά στο σχηματισμό της καφέ/μαύρης ευμελανίνης.

Η κόκκινη/κίτρινη φαιομελανίνη, προκειμένου να συντεθεί, απαιτεί υψηλά επίπεδα κυστεΐνης στα μελανοσώματα αλλά και παραγωγή δύο ισομερών κυστεΐνυλδωρα τα οποία οδηγούν σε ενδιάμεσα βενζοθειαζίνης. Τα ενδιάμεσα αυτά, υπό την επίδραση θερμότητας ή φωτός και μέσω πολύπλοκων αντιδράσεων, μετατρέπονται σε βενζοθειαζόλη η οποία μειώνει την γλουταθειόνη και ενισχύει την παραγωγή  $H_2O_2$ . Με βάση τα παραπάνω, εξηγείται γιατί υπό επίδραση ηλιακού φωτός, η φαιομελανίνη επιδεικνύει προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή την ικανότητά της να δημιουργεί δραστικές μορφές οξυγόνου, σε αντίθεση με την ευμελανίνη η οποία προστατεύει το δέρμα από τις αρνητικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας.<sup>[16]</sup>

## 4.2 Μελανίνη και Οξειδωτικό στρες

Στο δέρμα, η ισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της μελανίνης καθορίζεται κυρίως από τη σχετική περιεκτικότητα σε ευμελανίνη και φαιομελανίνη, τα επίπεδα των ενδιάμεσων μελανίνης και τις συγκεντρώσεις των ενεργών μετάλλων στο μικροπεριβάλλον του μελανοσώματος<sup>[71]</sup>. Υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με το ρόλο της μελανίνης ή των ενδιάμεσων μελανίνης ως προ-οξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών.

Η μελάχρωση συσχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα της καταλάσης (ένζυμο που αδρανοποιεί το  $H_2O_2$ ) σε καλλιέργεια ανθρώπινων μελανοκυττάρων και με τα επίπεδα αναγωγάσης θειορεδοξίνης στο ανθρώπινο δέρμα. Η δημιουργία  $H_2O_2$  στο δέρμα ως απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, συσχετίζεται αντιστρόφως με τη μελάχρωση. Δηλαδή, σε περιπτώσεις δέρματος με έντονη μελάχρωση παρατηρούνται χαμηλά ποσοστά  $H_2O_2$ , ενώ σε δέρματα με χαμηλότερη περιεκτικότητα ευμελανίνης, η περιεκτικότητα σε  $H_2O_2$  είναι υψηλότερη υποδηλώνοντας ότι η μελανίνη μπορεί να διαθέτει αντιοξειδωτική δράση. Στα μελανοκύτταρα, η επαγωγή βλαβών του DNA από υπεριώδη ακτινοβολία όπως η σύνθεση της 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνης (8-Hydroxyguanosine, 8-OHdG), και η έκφραση αρκετών γονιδίων επιδιόρθωσης εκτομής βάσης (Base excision repair, BER) είναι υψηλότερη από ότι στα κερατινοκύτταρα. Παραδόξως, τα καλλιεργημένα ανθρώπινα μελανοκύτταρα με υψηλή περιεκτικότητα σε μελανίνη αναφέρεται ότι είναι πιο εύαλωτα στην UVA

ακτινοβολία, αλλά λιγότερο ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες στο DNA που προκαλούνται από το  $H_2O_2$  σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μελανοκύτταρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε μελανίνη. [71]

Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα και κύτταρα μελανώματος ποντικού, αναφέρεται ότι όταν στα παραπάνω κύτταρα επέδρασε UVA ακτινοβολία προκειμένου να ξεκινήσει η μελανογένεση, παρατηρήθηκε ότι αυξήθηκαν οι βλάβες στο DNA. [72] Αντίθετα, η διέγερση της μελανογένεσης σε καλλιεργημένα ανθρώπινα μελανοκύτταρα από την  $\alpha$ -μελανοτρόπο (alpha-Melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH) αυξάνει τη δραστηριότητα και τα επίπεδα της καταλάσης και μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και ελευθέρων ριζών αρά και τις βλάβες στο DNA. Στα ανθρώπινα μελανωματικά κύτταρα, η αυξημένη μελάγχρωση προστατεύει από τη βλάβη του μιτοχονδριακού DNA που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία ή το  $H_2O_2$ . [72-73]

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, απορρύθμιση του βιολογικού μεταβολισμού καθώς και μεταβολές στις οδούς σηματοδότησης των μελανοκυττάρων. Εάν οι δραστικές μορφές οξυγόνου συσσωρευτούν με μη φυσιολογικό και αναμενόμενο τρόπο στα κερατινοκύτταρα και στους ινοβλάστες, τότε είναι πολύ πιθανή η εμφάνιση διαταραχών μελάγχρωσης που επηρεάζουν τα κερατινοκύτταρα. Λόγω της συσχέτισης οξειδωτικού στρες και διαταραχών μελάγχρωσης, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα η ύπαρξη πολλών τόσο παρακρινικών όσο και εξωγενών φυσικών προϊόντων ή φυτικών, οργανικών ενώσεων με αντιοξειδωτικές δράσεις οι οποίες δύναται να αντιμετωπίσουν αυτές τις διαταραχές μελάγχρωσης. [72-73]

### **4.3 Ενεργοποίηση αντιοξειδωτικής άμυνας στα μελανοκύτταρα από παρακρινικούς παράγοντες**

Η ομοίωση των επιδερμικών ανθρώπινων μελανοκυττάρων διατηρείται κυρίως από ένα σύνθετο παρακρινικό δίκτυο που αποτελείται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που συντίθενται από επιδερμικά κερατινοκύτταρα και δερματικούς ινοβλάστες και ρυθμίζονται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η ενδοθελίνη-1 που προέρχεται από κερατινοκύτταρα είναι ένας ισχυρός μιτογόνος και μελανογόνος



παράγοντας που μειώνει τη δημιουργία  $H_2O_2$  αλλά και την απόπτωση σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα ακτινοβολημένα με υπεριώδη ακτινοβολία. [71-73]

Η  $\alpha$ -μελανοτρόπος ορμόνη (alpha-Melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH) συντίθενται από τα κερατινοκύτταρα και τα μελανοκύτταρα και διεγείρει τη σύνθεση ευμελανίνης, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μελανοκυττάρων δεσμεύοντας και ενεργοποιώντας τον υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 (Melanocortin 1 receptor, MC1R). Ο MC1R είναι ένας υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης (guanine nucleotide-binding proteins, Gs) και εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των μελανοκυττάρων. [71-73]

Η  $\alpha$ -MSH μειώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, αυξάνει τα επίπεδα και τη δραστηριότητα της καταλάσης και εξουδετερώνει την ανασταλτική επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην καταλάση. Στη συνέχεια, η επίδραση  $\alpha$ -MSH μειώνει την επαγωγή της 8-οξο-2'-δεοξυγουανουσίνης (8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine, 8-oxodG), ένα οξειδωμένο παράγωγο της δεοξυγουανουσίνης και κύριο προϊόν της οξείδωσης του DNA και ενισχύει την επισκευή της σε μελανοκύτταρα που ακτινοβολούνται με υπεριώδη ακτινοβολία. Οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις της  $\alpha$ -MSH απαιτούν δέσμευση και ενεργοποίηση του MC1R, είναι απύσες σε μελανοκύτταρα που εκφράζουν MC1R με μειωμένη λειτουργία και αναστέλλονται από την πρωτεΐνη σηματοδότησης agouti, τον φυσιολογικό ανταγωνιστή του MC1R. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν τη σημασία του ενεργοποιημένου MC1R στην προστασία των μελανοκυττάρων από το οξειδωτικό στρες. [73]

Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μέσω του οποίου το ενεργοποιημένο MC1R μειώνει το οξειδωτικό στρες στα μελανοκύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η p53 ρυθμίζει τη μελάγχρωση αυξάνοντας την έκφραση της τυροσινάσης στα ανθρώπινα μελανοκύτταρα και την προοπιομελανοκορτίνη, την πρόδρομο ένωση των μελανοκορτινών, στα κερατινοκύτταρα ποντικού<sup>[76]</sup>. Η ενεργοποίηση του MC1R με δέσμευση  $\alpha$ -MSH αυξάνει την επαγόμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία συσσώρευση της p53 σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα αυξάνοντας τη φωσφορυλίωση της p53 στο Ser15. [71-73]

Επιπλέον, η ενεργοποίηση του MC1R από την  $\alpha$ -MSH ρυθμίζει την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση ρυθμίζοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της οξυγενάσης της αίμης-1 (Heme Oxygenase 1, HO-1), της

φερριτίνης και της υπεροξυρεδοξίνης-1. Η  $\alpha$ -MSH ενεργοποιεί έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των μελανοκυττάρων. Σε φυσιολογικά ανθρώπινα μελανοκύτταρα αλλά και κύτταρα μελανώματος, ο αισθητήρας οξειδοαναγωγής APE-1 είναι στόχος του παράγοντα μεταγραφής που επάγει μελανοκύτταρα (melanocyte inducing transcription factor, MITF), του κύριου ρυθμιστή της επιβίωσης και της λειτουργίας των μελανοκυττάρων. [71-73]

Η θεραπεία ανθρώπινων μελανοκυττάρων με  $\alpha$ -MSH ρυθμίζει τους παράγοντες MITF και APE-1. Τα μελανοκύτταρα εκφράζουν επίσης έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση των γονιδίων για τα ένζυμα αποτοξίνωσης φάσης II, και τον κύριο στόχο του την HO-1. Ο παράγοντας αυτός ονομάζεται παράγοντας 2 που σχετίζεται με τον πυρηνικό παράγοντα ερυθροειδούς 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF-2). Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από την  $\alpha$ -MSH είναι ο NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), ο οποίος είναι πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA και ενεργοποιείται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων άλφα (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) και από δραστικές μορφές οξυγόνου. Η θεραπεία των μελανοκυττάρων με  $\alpha$ -MSH αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία αυξάνοντας τα επίπεδα πρωτεϊνών Bcl2 (B-cell lymphoma 2, Bcl2), ενός γνωστού στόχου των NF $\kappa$ B και Mitf. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Bcl2 ρυθμίζει τον κυτταρικό θάνατο αναστέλλοντας την απόπτωση των κυττάρων αλλά αυξάνει και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. [71-73]

#### **4.4 Επίδραση εξωγενών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε παθήσεις που σχετίζονται με τη μελάγχρωση**

Δεδομένου ότι η μελανογένεση είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, είναι πιθανό πολλές αντιοξειδωτικές ενώσεις να μπορούν να λειτουργήσουν και ως παράγοντες ρύθμισής της. Εκτός από τις επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητές τους, τα τοπικά και από του στόματος αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως συμπληρωματικές θεραπείες για την πρόληψη της υπερμελάγχρωσης που προκαλείται από τις διάφορες μορφές ακτινοβολίας. [235]

Τα φυσιολογικά αντιοξειδωτικά εμφανίζονται σε όλο το σώμα και χρησιμεύουν στην εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες. Στο δέρμα, τα επίπεδα αντιοξειδωτικών έχει αποδειχθεί ότι είναι μεγαλύτερα στα βαθύτερα βασικά στρώματα του δέρματος παρά στα πιο επιφανειακά στρώματα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γήρανσης και μετά από αθροιστική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών συστημάτων του δέρματος μειώνονται σημαντικά, αυξάνοντας την ευαισθησία του δέρματος στις επιβλαβείς επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας. Πολυάριθμες συνθετικές αντιοξειδωτικές θεραπείες υποκατάστασης έχουν γίνει διαθέσιμες σε τοπικά και από του στόματος σκευάσματα. [235]

Ωστόσο, λίγες μελέτες περιγράφουν την ικανότητα αυτών των αντιοξειδωτικών να αποτρέπουν την επαγόμενη μελάγχρωση από τους διάφορους τύπους ακτινοβολιών. Τα καροτενοειδή και οι πολυφαινόλες για παράδειγμα έχουν μελετηθεί περαιτέρω σχετικά με την συμβολή τους στην πρόληψη της μελάγχρωσης του δέρματος λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας. [235]

#### **4.4.1 Η συμβολή της υδροκινόνης και των φαινόλων στην ρύθμιση της μελάγχρωσης**

Η υδροκινόνη (1,4-διυδροξυβενζόλιο, HQ) είναι η πιο γνωστή ένωση για τη θεραπεία της υπερμελάγχρωσης. Μπορεί να βρεθεί στο σιτάρι, το τσάι, τα μούρα, τη μύρα και τον καφέ, αλλά μετατρέπεται μέσα στο σκύωτι σε αδρανείς ενώσεις. Η υδροκινόνη είναι μια φαινολική ένωση και παράγοντας αποχρωματισμού που ασκεί κυρίως την επίδρασή της στα μελανοκύτταρα με ενεργή τυροσινάση. Καθώς η εξαρτώμενη από την HQ μελανογονική αναστολή απαιτεί την παρουσία δραστικής τυροσινάσης, δεν είναι χρήσιμη για την αλλαγή του χρώματος της μελανίνης που υπήρχε προηγουμένως στο χόριο και την επιδερμίδα. [71-73]

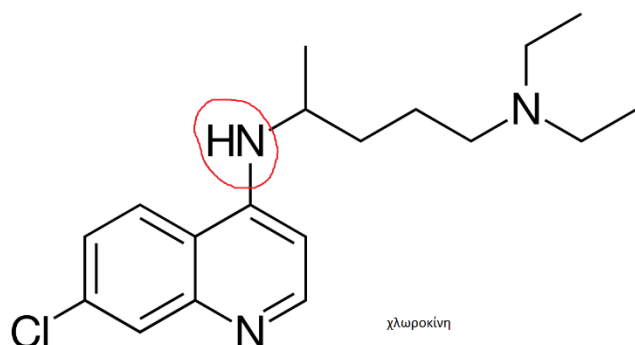
Η δομική ομοιότητα μεταξύ της HQ και των μελανογόνων πρόδρομων ουσιών επιτρέπει την αλληλεπίδραση της HQ με την τυροσινάση. Αυτή η αλληλεπίδραση μεσολαβεί στην αναστολή της τυροσινάσης από την HQ δεσμεύοντας ιστιδίνες ή χαλκό στην ενεργό θέση του ενζύμου. Επιπλέον, η επαγόμενη από την HQ παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και κινονών οδηγεί στην οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης όπως η τυροσινάση. Η υδροκινόνη θεωρείται επίσης ότι αναστέλλει τη μελάγχρωση μειώνοντας τη γλουταθειόνη, τροποποιώντας τον

σχηματισμό μελανοσωμάτων ή μειώνοντας τη σύνθεση DNA και RNA με ταυτόχρονη αποικοδόμηση μελανοσώματος και καταστροφή μελανοκυττάρων. [71-73]

Στην πραγματικότητα, οι χημικές δομές αρκετών φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση, έχουν διερευνηθεί για να προσδιοριστεί και η ανασταλτική δραστηριότητα της τυροσινάσης που σχετίζεται με τη δομή τους. Έχει προταθεί ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη ομάδας υδροξυλίου σε θέση π-(πάρα-) σε ομάδα ηλεκτρονιοδότη, για να μπορεί ένα μόριο να είναι εναλλακτικό υπόστρωμα για την τυροσινάση. Στη μελέτη δομής-δράσης που έγινε από τους Ni-Komatsu et al. στις κινολίνες οι οποίες περιέχουν μια 4-υποκατεστημένη αμινομάδα (ηλεκτρονιοδότης, +R), φάνηκε ότι οι παραπάνω παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση της τυροσινάσης. Ωστόσο, αυτές οι κινολίνες, όπως η χλωροκίνη, δεν αναφέρθηκε ότι επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα της τυροσινάσης, αλλά μάλλον την ενδοκυτταρική διακίνηση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την τυροσινάση και της μεμβρανικής πρωτεΐνης-1 που σχετίζεται με το λυσόσωμα (Lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1). [74]

#### Εικόνα 4.4.1.1

Δομή χλωροκίνης με υπόδειξη της 4-υποκατεστημένης αμινομάδας.



#### 4.4.2 Η συμβολή των φλαβονοειδών στην ρύθμιση της μελάγχρωσης

Τα φλαβονοειδή είναι επίσης πιθανό να έχουν ιδιότητες δέσμευσης δραστικών μορφών οξυγόνου αλλά και την ικανότητα να συνδέονται με μέταλλα στην ενεργή θέση των μεταλλοενζύμων ενώ μπορεί ακόμη να αναστέλλουν άμεσα τη δραστηριότητα της τυροσινάσης σε απομακρυσμένα τμήματα της μελανογόνου οδού. [71-73]

Η ανάλυση δομής-δράσης των φλαβονοειδών δείχνει ότι τα φλαβονοειδή με ομάδα α-κετο εμφανίζουν ισχυρή αναστολή της τυροσινάσης λόγω της ομοιότητας μεταξύ της ομάδας διυδροξυ-φαινυλίου της dopa και των φλαβονοειδών που περιέχουν α-κετο ομάδα.<sup>[71-74]</sup>

#### **4.4.3 Η συμβολή του L-Ασκορβικού οξέος και του Μαγνησίου-L-Ασκόρβυλ-2 φωσφορικού εστέρα στην ρύθμιση της μελάγχρωσης**

Το L-ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid, AsA) παρεμβαίνει στη σύνθεση μελανίνης ανάγοντας την οξειδωμένη ντοπακινόνη, διακόπτοντας την οξείδωση του DHICA και αλληλοεπιδρώντας με ιόντα χαλκού στην ενεργό θέση της τυροσινάσης. Το AsA εξουδετερώνει δραστικές μορφές οξυγόνου που βρίσκονται στο υδατικό περιβάλλον του κυττάρου. Το AsA είναι εξαιρετικά ασταθές, οξειδώνεται γρήγορα και αποσυντίθεται σε υδατικά διαλύματα. Η υδρόφιλη φύση του AsA περιορίζει επίσης τη διείσδυσή του στο δέρμα, εκτός εάν διαταραχθεί ο φραγμός της κεράτινης στιβάδας. Επίσης απαιτείται χαμηλό pH του καλλυντικού προϊόντος-φορέα για να υπάρχει ικανοποιητική δερματική διαπερατότητα των αδιάστατων μορίων του ασκορβικού οξέος.<sup>[176]</sup>

Ο μαγνήσιο-1-ασκορβυλ-2-φωσφορικός εστέρας (Magnesium Ascorbyl Phosphate, MAP) είναι σταθερότερο. Υδρολύεται από φωσφατάσες στο δέρμα σε AsA.<sup>[176]</sup>

#### **4.4.4 Η πιθανή συμβολή της γλουταθειόνης στην ρύθμιση της μελάγχρωσης**

Η γλουταθειόνη είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους, υδατοδιαλυτό θειολοτριπεπτίδιο το οποίο αποτελείται από τρία αμινοξέα, το γλουταμινικό, την κυστεΐνη και την γλυκίνη. Χάρη στην σουλφυδρυλομάδα που διαθέτει μέσω της κυστεΐνης, μπορεί να αλληλοεπιδράσει με πληθώρα βιολογικών συστημάτων αλλά και να συμβάλλει στη διατήρηση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας κάτι το οποίο την χαρακτηρίζει ως ισχυρό αντιοξειδωτικό. Συναντάται στον οργανισμό σε δύο αλληλομετατρέψιμες μορφές, την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η GSH είναι η κυρίαρχη ενδοκυτταρική μορφή που δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό και προστατεύει από τοξικές ενώσεις και ξενοβιοτικά. Σε αυτή τη διαδικασία, η GSH οξειδώνεται συνεχώς σε GSSG από το ένζυμο υπεροξειδάση

γλουταθειόνης και η ανηγμένη μορφή (GSH) αναγεννάται με την αναγωγή της γλουταθειόνης.<sup>[75-76]</sup>

Η γλουταθειόνη παρουσιάστηκε ως ένας παράγοντας που υπόσχεται γενική λεύκανση έπειτα από χορήγηση από το στόμα. Τα αντιοξειδωτικά μέσω χορήγησης από στόματος έχουν την ικανότητα να μειώνουν την μελανογένεση καταστέλλοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου που παράγονται από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.<sup>[236]</sup> Μια από τις πρώτες ενδείξεις ότι η γλουταθειόνη μπορεί να έχει λευκαντική δράση, προήρθε από την εργασία των Halprin KM. και Ohkawara A., οι οποίοι χρησιμοποίησαν μικρό δείγμα από ιστό ανθρώπινης επιδερμίδας και αναγωγή γλουταθειόνης από μαγιά. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η ένωση που περιείχε σουλφυδρυλομάδα και μπόρεσε να παρεμποδίσει την δράση της τυροσινάσης άρα και την μελανογένεση, ήταν η γλουταθειόνη. Όταν η συγκεκριμένη ένωση οξειδώθηκε και αδρανοποιήθηκε από συνθήκες όπως θερμοκρασία ή ακτινοβολία, τότε παρατηρήθηκε αύξηση της μελανίνης.<sup>[77]</sup>

Στη μελέτη των Sidharth et al., μελετάται ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης, ο μηχανισμός δράσης αλλά και η αποτελεσματικότητά της σχετικά με την δυνητικά λευκαντική της δράση η οποία σχετίζεται με την παρεμπόδιση της δράσης της τυροσινάσης. Η γλουταθειόνη μπορεί να παρεμποδίσει την τυροσινάση με τρεις μηχανισμούς:

- Προσδένεται μέσω της σουλφυδρυλομάδας στο ενεργό κέντρο χαλκού του ενζύμου
- Παρεμβαίνει στην μεταφορά της τυροσινάσης στα προμελανοσώματα
- Έμμεσα μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης, δηλαδή μέσω αντίδρασης της σουλφυδρυλομάδας με την ντοπακινόνη, μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση φαιομελανίνης αντί της ευμελανίνης.<sup>[78]</sup>

Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη σε πενήντα ασθενείς με μέλασμα και 50 υγιείς εθελοντές, έδειξε υψηλότερα ποσοστά του ενζύμου υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στους ασθενείς με μέλασμα από ότι στους υγιείς εθελοντές, κάτι το οποίο υποδεικνύει τον ρόλο του οξειδωτικού στρες στο μέλασμα και συνεπώς θετική συμβολή αντιοξειδωτικής ουσίας στην περίπτωση του μελάσματος και της υπερμελάγχρωσης.<sup>[79]</sup>

Οι οδοί χορήγησης που χρησιμοποιούνται για τη λεύκανση του δέρματος είναι τοπικά (κρέμες, πλύσεις προσώπου), από του στόματος (κάψουλες και υπογλώσσια/παραϊακά δισκία) και ενδοφλέβιες ενέσεις. Μια τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική δοκιμή που διεξήχθη σε 30 υγιείς γυναίκες από τις Φιλιππίνες ηλικίας 30–50 ετών έχει προσφέρει στοιχεία που ευνοούν την αποτελεσματικότητα του τοπικού 2% GSSG σε λοσιόν για προσωρινή λεύκανση δέρματος. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: Η ομάδα I χρησιμοποίησε λοσιόν με γλουταθειόνη ως 2% GSSG (οξειδωμένη μορφή της GSH) και η ομάδα II χρησιμοποίησε το εικονικό προϊόν, δύο φορές την ημέρα για δέκα εβδομάδες. Η GSSG, παρόλο που ως οξειδωμένη μορφή δεν είναι δραστική, όταν εισέρθει στο δέρμα, δηλαδή μετά από δερματική απορρόφηση, δημιουργεί GSH η οποία παρουσιάζει και την ενεργό δράση. Οι αλλαγές στον δείκτη μελανίνης, την περιεκτικότητα σε υγρασία της κεράτινης στιβάδας, η απαλότητα του δέρματος, η ελαστικότητα του δέρματος και ο σχηματισμός ρυτίδων αξιολογήθηκαν αντικειμενικά. Η μείωση του δείκτη μελανίνης με επίδραση γλουταθειόνης ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με το εικονικό σκεύασμα. Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου. <sup>[80]</sup>

Οι Sidharth et al , αναφέρουν ότι λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας της από του στόματος γλουταθειόνης, οι ενδοφλέβιες ενέσεις προωθούνται για την παροχή επιθυμητών θεραπευτικών επιπέδων στο αίμα και στο δέρμα και για την παραγωγή «στιγμιαίας» λεύκανσης του δέρματος. Παρόλο που εδώ και χρόνια χρησιμοποιούνται ενδοφλέβιες και ενδοδερμικές εγχύσεις γλουταθειόνης (χωρίς την έγκριση του FDA), δεν υπάρχει ούτε μία κλινική δοκιμή αξιολόγησης της αποτελεσματικότητάς τους. Οι κατασκευαστές των ενέσεων γλουταθειόνης συνιστούν μια δόση 600–1200 mg για λεύκανση δέρματος, για ένεση μία φορά δύο φορές την εβδομάδα. Η διάρκεια η οποία επιτρέπεται να γίνονται οι ενέσεις δεν προσδιορίζεται. <sup>[78]</sup>

Προς το παρόν, υπάρχει έλλειψη ισχυρών αποδεικτικών στοιχείων υπέρ της γλουταθειόνης για τη θεραπεία της υπερμελάγχρωσης παρόλο που ο μηχανισμός δράσης της ευνοεί τις δυνατότητές της ως λευκαντικός παράγοντας. Μόνο τρεις τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής αλλά με βραχυπρόθεσμες περιόδους παρακολούθησης. Αυτές οι μελέτες αφορούν δέρματα στα οποία φαίνονται αποτελέσματα τοπικής, καθώς και από του στόματος γλουταθειόνης. Το προφίλ ασφάλειας της τοπικής και από του στόματος γλουταθειόνης φαίνεται να

είναι λογικό ενώ η χρήση της ενδοφλέβιας γλουταθειόνης δεν βρίσκει στοιχεία που να την υποστηρίζουν και χρήζει περαιτέρω μελέτης.<sup>[78]</sup>

#### 4.4.5 Η συμβολή της ρεσβερατρόλης στην ρύθμιση της μελάγχρωσης

Η ρεσβερατρόλη (trans-3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο) είναι μια πολυφαινολική ένωση η οποία μπορεί να βρεθεί σε διάφορα είδη φυτών όπως τα σταφύλια ή τα μούρα. Βασικό χαρακτηριστικό της ρεσβερατρόλης, είναι να δρα ως αντιοξειδωτικός παράγοντας αδρανοποιώντας την ρίζα υδροξυλίου, το μονοξειδίο του αζώτου και την υπεροξειδική ρίζα, οι οποίες όταν παραχθούν σε υπερβολικό βαθμό στον οργανισμό μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες.<sup>[81]</sup>

Η ρεσβερατρόλη, όπως άλλωστε και τα διάφορα στυλβενοειδή, έχει την ικανότητα να αναστέλλει ανταγωνιστικά τη δραστηριότητα της τυροσινάσης των μανιταριών. Ως αναστολέας της τυροσινάσης μανιταριών χαρακτηρίζεται μέτριος και όχι πολύ ισχυρός. Επιπλέον, μερικά παράγωγά της, όπως για παράδειγμα η οξυρεσβερατρόλη ή η πικεατανόλη, παρουσιάζουν εξίσου καλή ή ακόμη καλύτερη ανασταλτική δράση κατά της τυροσινάσης ποντικού ή της τυροσινάσης μανιταριού αντίστοιχα.<sup>[82]</sup> Η Gnetin C, ένα διμερές ρεσβερατρόλης που απομονώθηκε από το φυτό *Melinjo* (*Gnetum gnemon*) έχει αποδειχθεί ότι είναι εξίσου αποτελεσματική με τη ρεσβερατρόλη όσον αφορά την ανασταλτική της δράση έναντι της τυροσινάσης μανιταριού, αλλά η πρώτη έχει πολύ ασθενέστερη ανασταλτική δράση έναντι της τυροσινάσης ποντικού.<sup>[83]</sup>

Σε άλλη μελέτη, όταν η ρεσβερατρόλη χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με 4-n-βουτυλική ρεσορκινόλη ή οξυρεσβερατρόλη, ανέστειλαν συνεργιστικά την δραστηριότητα της τυροσινάσης αλλά και την έκφραση του γονιδίου τυροσινάσης.<sup>[84]</sup> Η ρεσβερατρόλη, το τριοξικό ρεσβερατρώλιο (RTA) και το τριγλυκολικό ρεσβερατρώλιο (RTG) μείωσαν το mRNA και τα επίπεδα τυροσινάσης, DCT και MITF σε ανθρώπινα επιδερμικά μελανοκύτταρα. Η ρεσβερατρόλη και ο τριμεθυλαιθέρας της, μείωσαν τα επίπεδα της τυροσινάσης και τη δραστηριότητα της τυροσινάσης στα κύτταρα B16 που διεγείρονται από α-MSH. Η ρεσβερατρόλη και τα ανάλογα της θεωρείται ότι μειώνουν τη γονιδιακή έκφραση του MITF και μελανογόνων ενζύμων αναστέλλοντας το εξαρτώμενο από το cAMP μονοπάτι της μελανογένεσης.<sup>[85]</sup>

Η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί και αυξάνει τη sirtuin 1, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες p53 και forkhead box O (FOXO) στα



ανθρώπινα μελανοκύτταρα. Οι ανασταλτικές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στην έκφραση του MITF και της τυροσινάσης δεν επηρεάστηκαν από τον αναστολέα sirtuin 1, αλλά μειώθηκαν από τον αναστολέα της N-τερματικής κινάσης c-Jun (JNK) που επίσης ρυθμίζει το FOXO3a. Έτσι, παρόλο που χρειάζονται πρόσθετα στοιχεία, έχει προταθεί ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να προσδώσει την αντιμελανογόνο δράση μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από το FOXO3a.<sup>[86]</sup>

Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη είναι επίσης γνωστή ως ισχυρός επαγωγέας της αυτοφαγίας, ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται για την αφαίρεση λανθασμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών ή περιττών οργανιδίων. Η ρεσβερατρόλη έχει την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου 5 (ATG5) που σχετίζεται με την αυτοφαγία ενώ μειώνει το MITF, την τυροσινάση και την TYRP1 σε κύτταρα Melan-A, η οποία είναι μια πρωτεΐνη γνωστή ως αντιγόνο μελανώματος. Μικρή διαμεσολαβούμενη από RNA εξάντληση του ATG5 διέσωσε την έκφραση του MITF, της τυροσινάσης και του TYRP1 παρουσία ρεσβερατρόλης, υποδεικνύοντας ότι η αυτοφαγία σχετίζεται με τις αντιμελανογόνες επιδράσεις της ρεσβερατρόλης.<sup>[87]</sup>

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από μελέτες *in vivo* ή κλινικές μελέτες υποστηρίζουν τη «λευκανση» του δέρματος που επιτυγχάνει η ρεσβερατρόλη και τα ανάλογά της. Σε μελέτες σε ζώα και σε κλινικές δοκιμές, 1% ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη μελάγχρωση που προκαλείται από την υπερϊώδη ακτινοβολία όταν εφαρμόζεται τοπικά στο δέρμα.<sup>[88]</sup> Η ρεσβερατρόλη μπορεί να προκαλεί μείωση της μελάγχρωσης στο ανθρώπινο δέρμα μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

- Άμεση αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας της ανθρώπινης τυροσινάσης
- Καταστολή της γονιδιακής έκφρασης και ωρίμανσης της τυροσινάσης και άλλων μελανογόνων ενζύμων και
- Άμεση σάρωση των ROS και/ή αναστολή της παραγωγής τους.<sup>[89]</sup>

#### **4.4.6 Η συμβολή των «λευκαντικών» δραστικών στο μικροβίωμα της επιδερμίδας**

Είναι γεγονός πως μια πληθώρα μικροοργανισμών κατοικεί εσωτερικά και εξωτερικά του σώματος των ανθρώπων αλλά και των βακτηρίων, των ιών, των αρχαίων κα. Το σύνολο αυτών των μικροοργανισμών αποκαλείται μικροβίωμα και πρόκειται για ένα

πλήρες και πολύπλοκο οικοσύστημα που οργανώνεται σε κοινότητες με μεγάλη ποικιλομορφία ανάλογα με τη θέση του σώματος, την ηλικία και το φύλο του ξενιστή, τη διατροφή, τη γενετική, την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, τη γεωγραφία, την κατάσταση εγκυμοσύνης και την περιβαλλοντική έκθεση.<sup>[90]</sup> Τα μέλη του ανθρώπινου μικροβιώματος ανήκουν σε 19 βακτηριακές φυλές, με επικρατέστερα τα *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* και *Bacteroidetes*. Το μικροβίωμα του εντέρου και του δέρματος ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, ενώ τα μικρόβια του δέρματος συμμετέχουν στην επιδερμική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, το μικροβίωμα του εντέρου εμπλέκεται στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και στον μεταβολισμό.<sup>[91]</sup>

Οι ενέργειες της καθημερινής ζωής, όπως το άγγιγμα, το φαγητό και η αναπνοή διαμορφώνουν το ανθρώπινο μικροβίωμα από την αρχή του και μπορούν να αλλάξουν τη σύνθεσή του σε όλα τα στάδια της ζωής ενός ατόμου. Παρόλο που το ανθρώπινο μικροβίωμα παρουσιάζει κάποια αντίσταση στην αλλαγή και, σε κάποιο βαθμό, ικανότητα να ανακτήσει τη βασική του σύνθεση μετά από μια αλλαγή, ισχυρές και επιλεκτικές δυνάμεις μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά του μικροβιώματος και να οδηγήσουν σε προσωρινές ή και μόνιμες αλλοιώσεις.<sup>[90]</sup> Το δέρμα, ως η πιο εκτεθειμένη στο περιβάλλον επιφάνεια, επηρεάζεται συνεχώς από χημικές, βιολογικές και φυσικές μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα και τη σύνθεσή του. Η έκθεση σε αυτές τις μεταβλητές μπορεί να είναι προσωρινή και βραχείας διάρκειας, όπως στην περίπτωση των τοπικών αντισηπτικών και αλοιφών, ή επαναλαμβανόμενη και μακράς διάρκειας, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), τα υφάσματα και τα καλλυντικά.<sup>[92]</sup>

Το ανθρώπινο δέρμα είναι όξινο, αφυδατωμένο και σχετικά αραιό σε διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών σε σύγκριση με άλλα όργανα, αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα λιγότερο από το ιδανικό περιβάλλον για την υποστήριξη της βακτηριακής ανάπτυξης.<sup>[92]</sup> Η παρουσία ιδρώτα πλούσιου σε αλάτι και αντιβακτηριακών μορίων επιβάλλει ένα ακόμη εμπόδιο. Ωστόσο, το δέρμα προσφέρει πολλές ειδικές επιφάνειες που διαφέρουν ως προς τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH και η διαθεσιμότητα οξυγόνου, δημιουργώντας πολλαπλά μικροπεριβάλλοντα όπου τα μικρόβια, ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών μπορεί να βρει μια σταθερή οικολογική θέση που προσφέρει κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη των ειδών

*Propionibacterium* (*Propionibacteriaceae*) υποστηρίζεται από πλούσιες σε λιπίδια επιφάνειες δέρματος, όπως σμηγματογόνες θέσεις του προσώπου, ενώ το *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcaceae*) βρίσκεται σε ενυδατωμένο δέρμα, με υψηλή θερμοκρασία και υγρασία, όπως η μασχαλιαία κοιλότητα και το δάχτυλο του ποδιού. Η σχέση μεταξύ ξενιστή και μικροοργανισμών, πιστεύεται ότι έχει ως αποτέλεσμα την καθιέρωση αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων, στις οποίες το ένα ή και τα δύο μέλη επωφελούνται από την παρουσία του άλλου.<sup>[93]</sup>

Το μικροβίωμα του δέρματος είναι ένα εξαιρετικά ετερογενές, αλλά οργανωμένο και σταθερό σύνολο μικροοργανισμών που σχηματίζουν ένα πολύπλοκο δίκτυο. Όταν υποβάλλεται σε τυχαίες σύντομες διαταραχές, το μικροβίωμα μπορεί, σε κάποιο βαθμό, να παραμείνει αδιατάρακτο. Ωστόσο, η συνεχής έκθεση σε εξωτερικές πιέσεις μπορεί να προκαλέσει αποσταθεροποίηση της ισορροπίας. Αυτό το φαινόμενο, γνωστό ως δυσβίωση, περιγράφει μια ανισορροπία της κοινότητας των μικροοργανισμών πάνω ή μέσα στο σώμα μας. Η υψηλή συσχέτιση μεταξύ των βακτηρίων που αποτελούν το εξαιρετικά οργανωμένο μικροβίωμα θεωρείται ότι οδηγεί σε ένα αλυσιδωτό φαινόμενο, όπου μια μετατόπιση σε ένα από τα είδη οδηγεί σε αλλοιώσεις στα άλλα. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι ποικίλης φύσης, που κυμαίνονται από αυξημένο αριθμό βακτηρίων, πιθανή αντικατάσταση μιας λειτουργίας που είχε χαθεί προηγουμένως ή πλήρη εξάντλησή της, οδηγώντας πιθανώς σε μια επιβλαβή κατάσταση.<sup>[94]</sup> Η δυσβίωση έχει μελετηθεί ευρέως σε σχέση με διάφορες δερματικές παθήσεις, όπως η ατοπική δερματίτιδα (AD), η ακμή και η λεύκη.<sup>[95]</sup>

#### 4.4.6.1 Η σχέση της μελανίνης με το μικροβίωμα

Κάποια μικροβιακά στελέχη έχουν την δυνατότητα να παράγουν μελανίνη κάτι το οποίο θα μπορούσε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία του δέρματος.<sup>[96]</sup> Για παράδειγμα, η μελανίνη που συλλέγεται από καλλιέργειες *Streptomyces glaucescens* (*Streptomycetaceae*) παρουσιάζει αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις στους ανθρώπινους ινοβλάστες.<sup>[97]</sup> Τα βακτήρια και οι μύκητες παράγουν μελανίνη ως προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, την ηλιακή ακτινοβολία ή την ακτινοβολία γάμμα.

Με βάση τις αυξανόμενες ενδείξεις βλάβης στο μικροβίωμα του δέρματος που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η μελανίνη θα ήταν χρήσιμη ως φωτοπροστασία όχι μόνο για το δέρμα, αλλά και για το

δερματικό μικροβίωμα. Πράγματι, έχει συζητηθεί η πρόκληση παραγωγής μελανίνης ή η μεταφορά αυτής της ικανότητας σε μη μελανογόνα μικρόβια χρησιμοποιώντας γενετική τροποποίηση.<sup>[98]</sup> Είναι ενδιαφέρον ότι τα ανασυνδυασμένα στελέχη του *Bacillus thuringiensis* (*Bacillaceae*) και του *Pseudomonas putida* (*Pseudomonadaceae*), τα οποία θα μπορούσαν να παράγουν αυξημένα επίπεδα μελανίνης, έδειξαν υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και αντοχή στην έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Τέτοια (ανασυνδυασμένα) μικρόβια ικανά να παράγουν και/ή να επάγουν μελανίνη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόληψη των καταστροφικών επιπτώσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας στο μόνιμο μικροβίωμα και όχι μόνο.<sup>[99]</sup>

Παρόλα αυτά κάποιοι οργανισμοί έχουν μελετηθεί και σχετικά με το εάν μπορεί να έχουν λευκαντική δράση. Για παράδειγμα, το είδος *Malassezia* (*Malasseziaceae*) είναι σύμφωνο με το μικροβίωμα του δέρματος και εμπλέκεται σε ασθένειες του δέρματος και του τριχωτού της κεφαλής, συμπεριλαμβανομένης της *Tinea Versicolor*, μιας μυκητιασικής πάθησης του δέρματος, και της σμηγματορροϊκής δερματίτιδας. Σε περιπτώσεις *Tinea Versicolor*, η υπερανάπτυξη *Malassezia* οδηγεί συχνά σε αλλαγές μελάγχρωσης του δέρματος (συμπεριλαμβανομένης τόσο της υπο όσο και της υπερμελάγχρωσης). Στη μελέτη των McCraw et al. , ο σκοπός ήταν να συνδεθεί η καλοήγησ αλλαγή μελάγχρωσης με τη μαλασεζίνη, έναν μεταβολίτη ινδόλης που εκκρίνεται από το *Malassezia*, αλλά και να καταδείξει την ασφάλεια και την ικανότητα της μαλασεζίνης να μειώνει τη μελανίνη σε μοντέλα *in vitro*. Μελέτες της μαλασεζίνης σε μοντέλα *Melanoderm* κατέδειξαν μείωση της μελανίνης και συγκρίθηκαν ευνοϊκά με το κοχικό οξύ. Μελέτες *ex vivo* με χρήση διαφορετικής γονιδιακής έκφρασης δεν έδειξαν αλλαγές που αναμένονται από τυπικούς μηχανισμούς τροποποίησης της μελάγχρωσης. Επιπλέον, η μαλασεζίνη δεν βρέθηκε να είναι αναστολέας τυροσινάσης. Η Malassezin, , έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ασφαλής και αποτελεσματικός παράγοντας λεύκανσης χρωστικών ουσιών *in vitro*, με έναν δυνητικά νέο μηχανισμό δράσης.<sup>[100]</sup>

## Συμπεράσματα

Η σύνθεση μελανίνης στα μελανοκύτταρα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, στην οποία καθοριστικό ρόλο παίζει η τυροσινάση. Η τυροσινάση οξειδώνει την L-τυροσίνη σε L-3,4-διυδροξυ-φαινολαλανίνη (L-dopa) και την L-dopa σε ντοπακινόνη. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ένας αριθμός ενδιάμεσων που καταλήγουν σε ινδολο-5,6-κινόνη, η οποία πολυμερίζεται για να σχηματίσει μελανίνη. Η παρεμπόδιση της μελανοσύνθεσης μπορεί να συμβεί με τη βοήθεια ουσιών που ανάγουν την ντοπακινόνη, μέσω ενώσεων που διαθέτουν θειολομάδες και αντιδρούν με την ντοπακινόνη προς άχρωμα προϊόντα, μέσω αδρανοποιητών ενζύμων όπως τα οξέα και οι βάσεις και μέσω παρεμπόδισης της δράσης της τυροσινάσης.

Η τυροσινάση μπορεί να παρεμποδιστεί από ενώσεις οι οποίες λειτουργούν σαν εναλλακτικά υποστρώματά της όπως για παράδειγμα διάφορες φαινολικές ενώσεις, από ουσίες που συνδέονται ομοιοπολικά με το ένζυμο και το αδρανοποιούν μη αναστρέψιμα αλλά και από ειδικούς αναστολείς που συνδέονται αναστρέψιμα στο ένζυμο μειώνοντας την λειτουργικότητά του. Οι κατηγορίες ενώσεων που συνδέονται με την τυροσινάση, είναι εκείνες που χαρακτηρίζονται ως πραγματικοί αναστολείς του ενζύμου.

Οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς δεσμεύονται ομοιοπολικά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζουν τη δέσμευση του υποστρώματος ενώ οι ειδικοί αναστολείς λειτουργούν είτε με συναγωνιστική, ανταγωνιστική ή μικτή αναστολή. Το  $H_2O_2$  είναι αδρανοποιητής πολλών ενζύμων που περιέχουν χαλκό συμπεριλαμβανομένης της τυροσινάσης μανιταριού. Προκαλεί την οξείδωση υπολείμματος μεθειονίνης στη θέση 374 της ενεργής θέσης της τυροσινάσης του μανιταριού προς σουλφοξείδιο της μεθειονίνης.

Έχει μελετηθεί σημαντικός αριθμός χημικών ομάδων ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν λευκαντική-skin lightening δράση. Στις ομάδες αυτές ανήκουν οι πολυφαινόλες, οι κουμαρίνες, οι βενζαλδεΐδες και τα βενζοϊκά παράγωγα, τα μακριάς αλυσίδας λιπίδια και τα στεροειδή. Οι πολυφαινόλες, και κυρίως τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και τα παράγωγα κουμαρίνης, παρεμποδίζουν την τυροσινάση λειτουργώντας ως υποστρώματά της ή ως -πιθανώς- ανταγωνιστικοί αναστολείς της, με αποτελεσματικότητα που εξαρτάται από την χημική τους δομή.

Πολλές φαινολικές ενώσεις φάνηκε να παρουσιάζουν μικρότερο IC50, όσο αφορά την παρεμπόδιση της δράσης της τυροσινάσης, από ότι το κοχικό οξύ. Μελέτες στις συγκεκριμένες ενώσεις, όπως για παράδειγμα στην λικοχαλκόνη A, έδειξαν ότι συγκεκριμένα δομικά τους τμήματα όπως πχ το τμήμα 4-ρεσορκινόλης είναι η βασική ομάδα για την άσκηση ισχυρής ανασταλτικής δράσης στην τυροσινάση. Οι βενζαλδεΰδες και τα βενζοϊκά παράγωγα αναστέλλουν την τυροσινάση μέσω σχηματισμού βάσης Schiff με αμινομάδα του ενζύμου και μέσω χηλικής πρόσδεσης στον χαλκό αντίστοιχα.

Υπάρχουν ωστόσο και άλλες ενώσεις οι οποίες έχουν μελετηθεί ως προς την δυνατότητά τους να αναστείλουν την τυροσινάση. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να προέρχονται είτε από φυσικές πηγές, όπως οι ανθρακινόνες, οι λιγνάνες από το *Vitex negundo* (*Lamiaceae*), είτε από συνθετικές πηγές όπως για παράδειγμα η ένωση που προέκυψε όταν στην N-φαινυλοθειουρία αντικαταστάθηκε η αμινομάδα από N-υδροξυλαμίνη και τα τμήματα θείου από οξυγόνο και φάνηκε να έχει υψηλότερο IC50 από ότι η ίδια N-φαινυλοθειουρία. Πρόσφατες μελέτες, ανέδειξαν κάποιους ακόμη νέους αναστολείς της τυροσινάσης όπως είναι η (-)-N-φορμυλανανοϊνη από το φυτό *Michelia alba* (*Magnoliaceae*), η οποία δρα ως αναστολέα ανθρώπινης τυροσινάσης αλλά και ως αντιοξειδωτικό.

Βλάβες στα μελανοκύτταρα αλλά και στην παραγωγή ή/και την διάχυση της μελανίνης, έχουν συσχετιστεί με παθήσεις του δέρματος όπως το μελάνωμα, οι τοπικές υπερμελαγχρώσεις, η λεύκη κ.α. Υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην έναρξη και την εξέλιξη του μελανώματος καθώς μεταλλάξεις πολλών γονιδίων που σχετίζονται με το μελάνωμα προκύπτουν ή επιδεινώνονται από το οξειδωτικό στρες. Μερικές από τις μεταλλάξεις αυτές αφορούν στην έλλειψη του p16 ή στην απώλεια του ομολόγου φωσφατάσης και τενσίνης κ.α. Το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να επιφέρει πρόβλημα στην επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία μέσω προϊόντων υπεροξειδωσης λιπιδίων που απενεργοποιούν τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA.

Μελέτες σε κύτταρα μελανώματος G361 που ακτινοβολήθηκαν με UVA, έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας αντι-τυροσινάσης (σε τυροσινάση μανιταριού) και των αντιοξειδωτικών δράσεων (αξιολόγηση με μέθοδο DPPH) διαφόρων φαινολοκαρβοξυλικών οξέων και φαινολικών παραγώγων. Οι παραπάνω μελέτες σε

συνδυασμό με το γεγονός ότι η μελανοσύνθεση αποτελείται από μεγάλο αριθμό οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, είναι πιθανό, ενώσεις που είναι αποτελεσματικές στην αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινάσης μανιταριών να είναι και σαρωτές ελευθέρων ριζών.

Επιπλέον, υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές σχετικά με το ρόλο της ίδιας της μελανίνης αλλά και των ενδιάμεσων της ως προ-οξειδωτικά ή αντιοξειδωτικά στο δέρμα. Η δημιουργία  $H_2O_2$  στο δέρμα ως απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, συσχετίζεται αντιστρόφως με τη μελάχρωση. Δηλαδή, σε περιπτώσεις δέρματος με έντονη μελάχρωση παρατηρούνται χαμηλά ποσοστά  $H_2O_2$ , ενώ σε δέρματα με χαμηλότερη περιεκτικότητα ευμελανίνης, η περιεκτικότητα σε  $H_2O_2$  είναι υψηλότερη υποδηλώνοντας ότι η μελανίνη μπορεί να διαθέτει αντιοξειδωτική δράση.

Παραδόξως, τα καλλιεργημένα ανθρώπινα μελανοκύτταρα με υψηλή περιεκτικότητα σε μελανίνη αναφέρεται ότι είναι πιο ευάλωτα στην UVA ακτινοβολία, αλλά λιγότερο ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες στο DNA που προκαλούνται από το  $H_2O_2$  σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μελανοκύτταρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε μελανίνη.

Προκειμένου να αποφευχθούν βλάβες των μελανοκυττάρων από ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες, ο οργανισμός θέτει σε λειτουργία ένα σύνθετο παρακρινικό δίκτυο που αποτελείται από αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες όπως η ενδοθηλίνη-1, η α-μελανοτρόπος ορμόνη κ.α. Η ενδοθηλίνη-1 είναι ένας ισχυρός μελανογόνος παράγοντας που μειώνει τη δημιουργία  $H_2O_2$  αλλά και την απόπτωση σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα ακτινοβολημένα με υπεριώδη ακτινοβολία ενώ η α-MSH επιτελεί ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών μεταξύ των οποίων είναι η μείωση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, η αύξηση των επιπέδων και της δραστηριότητας της καταλάσης και η ενεργοποίηση του υποδοχέα μελανοκορτίνης 1. Επιπλέον, η α-MSH, ενεργοποιεί έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των μελανοκυττάρων.

Πέραν όμως των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων, διάφορες εξωγενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν να επιδράσουν σε παθήσεις που σχετίζονται με τη μελάχρωση. Ωστόσο, λίγες μόνο μελέτες έχουν περιγράψει την ικανότητα αυτών των αντιοξειδωτικών να αποτρέπουν την επαγόμενη μελάχρωση από τους διάφορους τύπους ακτινοβολιών και αυτές αφορούν συνήθως τα καροτενοειδή και τις

πολυφαινόλες. Στην πραγματικότητα, οι χημικές δομές αρκετών φαινολικών ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση, έχουν διερευνηθεί για να προσδιοριστεί και η ανασταλτική δραστηριότητα της τυροσινάσης που σχετίζεται με τη δομή τους. Έχει προταθεί ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη ομάδας υδροξυλίου σε θέση π-(πάρα-) σε ομάδα ηλεκτρονιοδότη, για να μπορεί ένα μόριο να είναι εναλλακτικό υπόστρωμα για την τυροσινάση. Η ανάλυση δομής-δράσης των φλαβονοειδών δείχνει ότι τα φλαβονοειδή με ομάδα α-κετο εμφανίζουν ισχυρή αναστολή της τυροσινάσης λόγω της ομοιότητας μεταξύ της ομάδας διυδροξυ-φαινυλίου της dopa και των φλαβονοειδών που περιέχουν α-κετο ομάδα.

Το L-ασκορβικό οξύ παρεμβαίνει στη σύνθεση μελανίνης ανάγοντας την οξειδωμένη ντοπακινόνη, διακόπτοντας την οξείδωση του DHICA και αλληλοεπιδρώνοντας με ιόντα χαλκού στην ενεργό θέση της τυροσινάσης. Η γλουταθειόνη προσδένεται μέσω της σουλφυδρυλομάδας στο ενεργό κέντρο χαλκού του ενζύμου, παρεμβαίνει στην μεταφορά της τυροσινάσης στα προμελανοσώματα και μέσω αντίδρασης της σουλφυδρυλομάδας με την ντοπακινόνη, μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση φαιομελανίνης αντί της ευμελανίνης.

Η ρεσβερατρόλη με τα παράγωγά της, αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη δραστηριότητα της τυροσινάσης μανιταριών, μειώνουν την γονιδιακή έκφραση του MITF και TYRP1 και μελανογόνων ενζύμων και ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες όπως p53 και FOXO3a.

Με σκοπό την στήριξη της υπόθεσης ότι κάποιες ουσίες διαθέτουν παράλληλα αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση, κατασκευάστηκε ο πίνακας του Παραρτήματος 1, στον οποίο παρουσιάζονται συνολικά 100 ενώσεις κατηγοριοποιημένες ανά δομή. Παρέχεται στον πίνακα πληροφορίες: εάν η κάθε ένωση διαθέτει αντιοξειδωτική ή/και λευκαντική δράση, εάν η λευκαντική δράση αυτή αφορά στην παρεμπόδιση της τυροσινάσης, καθώς και με ποια μέθοδο μελετήθηκε η εκάστοτε δράση σε συνδυασμό με την αντίστοιχη βιβλιογραφία. Ο συγκεκριμένος πίνακας έδειξε ότι το 70% των ενώσεων που μελετήσαμε επιδεικνύει λευκαντική και ταυτόχρονα αντιοξειδωτική δράση.



## Αντί Επιλόγου

### **Προϊόντα με αντιοξειδωτική ή/και «λευκαντική δράση»- «skin lightening» και ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων**

Η «λεύκανση» του δέρματος ή η προώθηση του ομοιόμορφου τόνου του δέρματος, όπως είναι δόκιμο να αποκαλείται, αποτελεί τάση που αν και έχει εμφανισθεί πολλά χρόνια πριν, την τελευταία δεκαετία αυξάνεται συνεχώς. Σε όλο τον κόσμο, πολλοί καταναλωτές επιθυμούν να αποκτήσουν ένα πιο λευκό και λαμπερό δέρμα. Οι εταιρείες δερμοκαλλυντικών στην προσπάθειά τους να καλύψουν την επιθυμία των καταναλωτών για πιο λαμπερό χρώμα δέρματος, για ομοιόμορφο τόνο επιδερμίδας και για δέρμα απαλλαγμένο από κηλίδες ηλικίας, δημιούργησαν και κυκλοφόρησαν προϊόντα τα οποία περιέχουν τόσο αντιοξειδωτικούς όσο και λευκαντικούς παράγοντες.

Μια γρήγορη αναζήτηση στο διαδίκτυο αποκαλύπτει μεγάλη ποικιλία προϊόντων για τη λεύκανση του δέρματος, που κυμαίνονται από βασικά γαλακτωματοποιημένα προϊόντα έως πιο πολύπλοκες καλλυντικοτεχνικές μορφές ή και προϊόντα αισθητικών θεραπειών-εγχύσεων με ενσωμάτωση συνθετικών ουσιών ή/και φυτικών εκχυλισμάτων. Στα προϊόντα του εμπορίου που υπόσχονται λευκαντική δράση, συναντάται πολύ συχνά η νιασιναμίδη, η δράση της οποίας βασίζεται στην ανασταλτική επίδραση στη μεταφορά μελανοσώματος από τα μελανοκύτταρα στα κερατινοκύτταρα. Για προϊόντα που έχουν ως στόχο την μείωση των κηλίδων στα χέρια, η επίτευξη του στόχου είναι δυσκολότεροι καθώς αυτά τα σημάρια, ιδιαίτερα εμφανή στο ραχιαίο δέρμα των χεριών, μπορεί επίσης να περιέχουν λιποφουσκίνη, την πολυμερή χρωστική ουσία που αποτελείται και από υποπροϊόντα λιπαρών οξέων.

Σε αυτό μπορεί να βοηθήσει η απολέπιση της επιδερμίδας γι' αυτό και πολλά αντίστοιχα προϊόντα περιέχουν α-υδροξυοξέα όπως το γαλακτικό και το γλυκολικό οξύ που δρουν μέσω απολέπισης. Τα παράγωγα του ασκορβικού οξέος, εμφανίζονται επίσης σε μεγάλο αριθμό προϊόντων «λεύκανσης» του δέρματος, με ή χωρίς υδροκινόνη (η οποία πλέον έχει απαγορευτεί για καλλυντική χρήση).

Άλλες δραστικές ουσίες για τη λεύκανση του δέρματος που συναντώνται συχνά σε καλλυντικά προϊόντα περιλαμβάνουν το κοχικό οξύ, έναν αναστολέα τυροσινάσης που

δρα μέσω της χηλικής ένωσης με τον χαλκό στην ενεργό θέση του ενζύμου, την γλαμπριδίνη η οποία καλύπτεται από διπλώματα ευρεσιτεχνίας, το αζελαϊκό οξύ.

Η βιβλιογραφία διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας αποκαλύπτει επίσης μερικές ενδιαφέρουσες νέες τεχνολογίες, όπως τα τετραϋδροκουρκουμινοειδή καθώς και πολλά φαινολικά παράγωγα-φλαβονοειδή-κουμαρίνες-στιλβένια, βενζαλδεΐδες και τα βενζοϊκά παράγωγα και μακριάς αλυσίδας λιπίδια.

Οι πειραματικές προσπάθειες για «skin lightening» προϊόντα, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης και της αναστολής της τυροσίνης για 100 ενώσεις διαφορετικών χημικών δομών που αποδίδονται συνοπτικά στον Πίνακα του παραρτήματος 1, αποδεικνύουν την πολυπλοκότητα του θέματος και το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για αυτό.

Η συσχέτιση μεταξύ αντιοξειδωτικής και λευκαντικής δράσης-«skin lightening» είναι ένα ζήτημα το οποίο δεν έχει μόνο κοινωνική και οικονομική σημασία για την ανάπτυξη καινοτόμων καλλυντικών προϊόντων, αλλά ενδεχομένως και να συνεισφέρει στην ανάπτυξη νέων μορίων για την αντιμετώπιση του μελανώματος.

# Παράρτημα 1

Σύνολο εκατό ενώσεων οι οποίες επιδεικνύουν αντιοξειδωτική ή/και «λευκαντική δράση» συνοδευόμενες από τη βιβλιογραφία και τις μεθόδους με τις οποίες παρατηρήθηκε η εκάστοτε δράση.

No	Active Substance	Depigmenting			Antioxidant			References
		In Use	Novel	Tyrosinase Inhibitors	In Use	Novel	Methods for Evaluation of Antioxidant Activity	
	<b>Extracts</b>							
1	Cucumis Sativus L.Extract	X			X		DPPH	101,102
2	Licorice Extract	X		X	X		DPPH, ABTS	103
3	Soy Bean Extract	X			X		In Vivo	104,105
4	Rose Petal Extract (Rosa gallica)	X			X		abts	106,107
5	Glechama Hederacea Extract	X			X		DPPH, ABTS	108,109
6	Amla Emblica Officinalis Extract		X			X	DPPH	110,111

7	Sargassum siliquosum J. Agardh (Fucales, Ochrophyta ) Extract		X	X		X	DPPH	112
8	Lichen Extract		X			X	DPPH	113,114
9	Artocarpus Lakoocha Heartwood Extract		X	X		X	DPPH, ABTS	115
10	Asphodelus Microcarpu s Extract		X	X		X	DPPH, ABTS	116,117
11	Lilium CandidumB ulb Extract		X		X		DPPH, ABTS, CUPRAC, HRSA	118
12	Bellis Berennis Daisy Flower Extract				X		DPPH, ORAC, DCFH-DA	119
13	Green Tea Extract		X	X	X		DPPH, FRAP, CUPRAC	120
14	Red Raspberry Extract					X	TBAES, OxHLIA, $\beta$ -CBI	121
15	Callus Extract from Centella Asiatica (L.)					X	DPPH	122

16	Seed Oil from Carthamus tinctorius L					X	DPPH, FRAP, ABTS	123
	<b>Amino Acids &amp; Amines &amp; Derivatives</b>							
17	Tranexamic Acid	X		X				124
18	L-Mimosine	X		X	X		DPPH, ABTS, FRAP	125,126
19	Undecylen oyl Phenylalani ne	X						127
20	Cetyl Tranexama te Mesylate	X				X		128
21	(4- Methoxy- benzyliden e) -(3- methoxy- phenyl)- Amine		X	X				129
22	Mycosporin e-Like Amino Acids					X	DPPH, ABTS, ORAC	130
23	N-Benzyn-2-(4- (4- (carbamothioyl hydrazono)met hyl)phenoxy)me thyl)-1H-1,2,3-		X	X		X	DPPH	131,132

	triazol-1-yl)acetamide							
	<b>Lipids</b>							
24	Sphingosine-1-phosphate		X					133
25	Lysophosphatidic Acid	X						134
26	Ceramides	X						135
27	Sphingosylphosphorylcholine	X			X		DPPH	136
	<b>Fatty Acids</b>							
28	Linoleic Acid	X		X	X		DPPH	137,138
29	Palmitic Acid	X		X				139
30	Undecanoic Acid		X			X	DPPH	140,141
31	Stearic Acid		X			X	ABTS	142
32	Linolenic Acid				X		DPPH	143
33	Oleic Acid				X		DPPH	144
	<b>Peptides</b>							
34	Glutathione	X			X		DPPH	145,146
35	Cathelicidin-OA1					X	DPPH, ABTS	147
36	Lectins					X	DPPH, ABTS	148
37	Neoglycoproteins					X		149
	<b>Alpha-Hydroxy</b>							

	<b>Acids &amp; Carboxylic Acids</b>							
38	Glycolic Acid	X		X				150
39	Lactic Acid	X		X				150
	<b>Carboxylic Acids</b>							
40	Azelaic Acid	X		X		X	O <sub>2</sub> ,H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,OH LEVELS	151,152
41	(E)-2,3-diphenylacrylic Acid		X	X	X		DPPH	153
42	Gentisic Acid	X		X	X		DPPH	154,155
	<b>Benzenes</b>							
43	4-butylresorcinol	X		X				156
44	hexylresorcinol	X		X				157
45	Phenylethylresorcinol		X	X		X	DPPH, ABTS	158,159
	<b>Alkaloids</b>							
46	Allantoin				X		DPPH, FRAP, CUPRAC	160
	<b>Pyridines</b>							
47	Niacinamide	X			X			161,162
	<b>Ubiquinones</b>							
48	Coenzyme Q10	X			X		measurement of the levels of phosphotyrosine kinase activity	163,164

							and glutathione levels	
	<b>Retinoids</b>							
49	Retinol		X		X			165,166
	<b>Tocopherols</b>							
50	Vitamin E				X		DPPH	167
	<b>Coumarins</b>							
510	6-Hydroxy-3,4-dihydrocoumarin					X	DPPH	168
52	4H-Chromene		X	X	X		DPPH	169
	<b>Xanthines</b>							
53	Caffeine				X		hydroxyl radical generating system	170
	<b>Difluoro Compounds</b>							
54	Gem Difluorocompound TFC-1067		X					171
	<b>Thiazoles</b>							
55	3(3H)-Thiazoles		X	X		X	measurements of Nitric oxide, Hydrogen peroxide, Lipid peroxidation	172,173
	<b>Pyranones</b>							
56	Kojic Acid	X		X			DPPH	174,175



	<b>Butenolide s</b>							
57	3-O-Ethyl Ascorbic Acid	X		X	X			176
58	Magnesium Ascorbyl Phosphate	X		X	X			177,178
59	Ascorbic Acid	X		X	X			177,178
	<b>Stilbenoids</b>							
60	Mulberrosi de A	X		X	X		DPPH, ABTS	179,180
61	Resveratrol	X		X	X		DPPH, ABTS, DMPD, O <sub>2</sub> - & H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	181,182
62	Azastiblene Analog		X			X	DPPH	183,184
63	Oxyresvera trol		X	X		X	DPPH	185,186
64	Dihydro- Resveratrol		X	X		X	DPPH	187,188
	<b>Chalcones</b>							
65	4- phenyllure nyl- chalcone		X	X		X	DPPH	189,190
66	Licochalcon e A		X	X		X	DPPH	189,190
67	2,3,2',4'- tetrahydrox ychalcone		X	X		X	DPPH	189,190
68	Kuraridin		X	X		X	DPPH	189,190
69	Kararidinol		X	X		X	DPPH	189,190

70	2,4,2',4',6'-pentahydroxychalcone		X	X		X	DPPH	189,190
71	Tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone , TMBC		X	X		X	DPPH	189,190
	<b>Terpenoids</b>							
72	Betulin		X		X		DPPH, ABTS	191
73	Astaxanthin	X			X		DPPH	192
74	a-Amyrin		X	X		X	DPPH, ABTS	193
75	b-Amyrin		X	X		X	DPPH, ABTS	193
76	Bixin		X	X		X	DPPH	194,195
77	Norbixin		X	X		X	DPPH	194,195
	<b>Glycosyl Compounds</b>							
78	Aloin		X		X		DPPH	196,197
	<b>Thioureas</b>							
79	Thiosemicarbazide		X	X		X		198,199
	<b>Phenolic Compounds</b>							
80	Silymarin	X		X			DPPH, ABTS, CUPRAC	200,201
81	Arbutin	X		X	X		DPPH, ABTS, ORAC	202,203
82	Ferulic acid		X		X		DPPH	204,205
83	Glabridin	X		X	X		DPPH	206,207

84	Ellagic acid	X		X	X		DPPH	208,209
85	Gallic acid		X		X			210,211
86	Curcumin	X			X		DPPH, FRAP	212,213
87	Centaureidin					X	DPPH	214
88	Sinapic acid	X		X	X		DPPH	215,216
89	Quercetin	X			X			217,218
90	Catechin	X		X		X	ABTS, FRAP	219,220
91	Rhamnetin	X		X		X		221,222
92	Kaempferol	X		X		X	DPPH	223
93	Morin	X		X		X	DPPH	224,225
94	Steppogenin	X		X				226
95	3-arylxanthones		X	X		X		227,228
96	7,8,4'-trihydroxyisoflavone		X	X		X	DPPH	229,230
97	5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone		X	X		X	DPPH	229,230
98	7,3',4'-trihydroxyisoflavone		X	X		X	DPPH	229,230
99	Hydroxytyrosol	X		X	X		DPPH	231,232
100	Luteolin		X		X		DPPH, FRAP	233,234

## Βιβλιογραφία

1. Borut Poljsak, Dušan Šuput, Irina Milisav , Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants, *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:956792 doi: 10.1155/2013/956792 PMID: PMC3657405
2. Mercedes Vitek, Mirjam Gosenca Matjaž, Robert Roškar, Mirjana Gašperlin, Alenka Zvonar Pobirk, A comparative study of lipid-based drug delivery systems with different microstructure for combined dermal administration of antioxidant vitamins. *Journal of Dispersion Science and Technology* 0:0, pages 1-14, 2022
3. OLGA BLOKHINA, EIJA VIROLAINEN, KURT V. FAGERSTEDT *Ann Bot, Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review.*,. 2003 Jan 2; 91(2): 179–194. doi: 10.1093/aob/mcf118 PMID: PMC4244988
4. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jan;30(1):11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0. Epub 2014 Jul 15. PMID: 25646037; PMID: PMC4310837.
5. Kohen, Roni & Nyska, Abraham. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology.* 30. 620-50. 10.1080/01926230290166724.
6. Matés, J M et al. “Antioxidant enzymes and human diseases.” *Clinical biochemistry* vol. 32,8 (1999): 595-603. doi:10.1016/s0009-9120(99)00075-2
7. Moussa, Z., Judeh, Z. M., & Ahmed, S. A. (2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. *Free Radical Medicine and Biology*, 1-22.
8. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3380. Published 2021 Mar 25. doi:10.3390/ijms22073380
9. Mason HS. The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of trihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 1948;172:83–99. [PubMed] [Google Scholar]
10. Gupta, Vishal, and Vinod Kumar Sharma. “Skin typing: Fitzpatrick grading and others.” *Clinics in dermatology* vol. 37,5 (2019): 430-436. doi:10.1016/j.clindermatol.2019.07.010
11. Liliana D’Alba and Matthew D. Shawkey , Melanosomes: Biogenesis, Properties, and Evolution of an Ancient Organelle, 26 SEP 2018<https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2017>
12. A. N. D’Mello, Graeme J. Finlay, Bruce C. Baguley, Marjan E. Askarian-Amiri , Signaling Pathways in Melanogenesis Stacey *Int J Mol Sci.* 2016 Jul; 17(7): 1144. Published online 2016 Jul 15. doi: 10.3390/ijms17071144 PMID: PMC4964517 Article PubReader PDF–2.2M

13. Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.* 2008;17:395–404. [PubMed] [Google Scholar]
14. Sánchez-Ferrer A, Rodríguez-López JN, García-Cánovas F, García-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995;1247:1–11. [PubMed] [Google Scholar]
15. Te-Sheng Chang , An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *Int J Mol Sci.* 2009 Jun; 10(6): 2440–2475. Published online 2009 May 26. doi: 10.3390/ijms10062440 PMID: PMC2705500 Article PubReader PDF–383K
16. Ramsden, Christopher & Riley, Patrick. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 22. 10.1016/j.bmc.2014.02.048.
17. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2009 May 26;10(6):2440-75. doi: 10.3390/ijms10062440. PMID: 19582213; PMID: PMC2705500.
18. Espín, Juan Carlos & Wichers, Harry. (2001). Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochimica et biophysica acta.* 1544. 289-300. 10.1016/S0167-4838(00)00230-2.
19. Chen QX, Huang H, Kubo I. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase by cetylpyridinium chloride. *J. Protein Chem.* 2003;22:481–487
20. Samaneh Zolghadri, Asieh Bahrami, Mahmud Tareq Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, Ali Akbar Saboury, A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 10.1080/14756366.2018.1545767, 34, 1, (279-309), (2019).
21. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62:1707–1723. [PubMed] [Google Scholar]
22. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2002;17:207–218. [PubMed] [Google Scholar]
23. Zhang C, Lu Y, Tao L, Tao X, Su X, Wei D. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007;22:83–90. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]activities. *Photochemistry.* 2005;66:935–940. [PubMed] [Google Scholar]
24. Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25:1045–1048. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
25. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from Licorice roots. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:1201–1207. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]

26. Fu B, Li H, Wang X, Lee FS, Cui S. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:7408–7414. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
27. Shimizu K, Kondo R, Sakai K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 2000;66:11–15. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
28. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;243:801–803. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
29. Likhitwitayawuid K, Sornsute A, Sritularak B, Ploypradith P. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006;16:5650–5653. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
30. Jones K, Hughes J, Hong M, Jia Q, Orndorff S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 2002;15:335–340. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
31. Piao XL, Baek SH, Park MK, Park JH. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. *Biol. Pharm. Bull.* 2004;27:1144–1146. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
32. Conrad JS, Dawso SR, Hubbard ER, Meyers TE, Strothkamp KG. Inhibitor binding to the binuclear active site of tyrosinase: temperature, pH and solvent deuterium isotope effects. *Biochemistry.* 1994;33:5739–5744. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
33. Jeon HJ, Noda M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Suqivama M. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:9827–9833. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
34. Maqid AA, Voutquenne-Nazabadioko L, Bontemps G, Litaudon M, Lavaud C. Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from *Guioa villosa*. *Planta Med.* 2008;74:55–60. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
35. Sabudak T, Khan MT, Choudhary MI, Oksuz S. Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. *Nat. Prod. Res.* 2006;20:665–670. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
36. Leu YL, Hwang TL, Hu JW, Fang JY. Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use. *Phyther. Res.* 2008;22:552–556. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
37. Devkota KP, Khan MT, Ranjit R, Lannang AM, Samreen, Choudhary MI. Tyrosinase inhibitory and antileishmanial constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla*. *Nat. Prod. Res.* 2007;21:321–327. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]

38. Azhar-Ul-Haq, Malik A, Khan MT, Anwar-Ul-Haq, Khan SB, Ahmad A, Choudhary MI. Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn. and their structure-activity relationship. *Phytomedicine*. 2006;13:255–260. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
39. Kang HS, Kim HR, Byun DS, Son BW, Nam TJ, Choi JS. Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* 2004;27:1226–1232. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
40. Criton M, Le Mellay-Hamon V. Analogues of N-hydroxy-N'-phenylthiourea and N-hydroxy-N'-phenylurea as inhibitors of tyrosinase and melanin formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008;18:3607–3610. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
41. Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol.* 2006;154(6):1094–1099. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07179.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
42. Kim YJ, No JK, Lee JH, Chung HY. 4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* 2005;28:323–327. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
43. Dai Y, Zhou GX, Kurihara H, Ye WC, Yao XS. Biphenyl glycosides from the fruit of *Pyracantha fortuneana*. *J. Nat. Prod.* 2006;69:1022–1024. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
44. Hui-Min Wang, Chung-Yi Chen, Chun-Yen Chen, Mei-Ling Ho, Yi-Ting Chou, Hou-Chien Chang, Chih-Hung Lee, Chau-Zen Wang, I-Ming Chu, (–)-N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 18, Issue 14, 2010, Pages 5241-5247, ISSN 0968-0896, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.045>.
45. Akihisa, Toshihiro et al. “Melanogenesis-inhibitory activity of aromatic glycosides from the stem bark of *Acer buergerianum*.” *Chemistry & biodiversity* vol. 10,2 (2013): 167-76. doi:10.1002/cbdv.201200251
46. Hashim, Najihah Mohd et al. “Antiproliferative activity of xanthones isolated from *Artocarpus obtusus*.” *Journal of biomedicine & biotechnology* vol. 2012 (2012): 130627. doi:10.1155/2012/130627
47. Jeong-Keun Kim, Keun-Tae Park, Hyun-Sun Lee, Mijin Kim & Young-Hee Lim (2012) Evaluation of the inhibition of mushroom tyrosinase and cellular tyrosinase activities of oxyresveratrol: comparison with mulberroside A, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27:4, 495-503, DOI: 10.3109/14756366.2011.598866
48. Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:14–27. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
49. Artzi O, Horovitz T, Bar-Ilan E, et al. The pathogenesis of melasma and implications for treatment. *J Cosmet Dermatol.* 2021;20:3432-3445.
50. Passeron T, Picardo M. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018;31:461-465

51. Hourblin V, Nouveau S, Roy N, de Lacharrière O. Skin complexion and pigmentary disorders in facial skin of 1204 women in 4 Indian cities. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2014;80:395-401. 6.
52. Cestari T, Arellano I, Hexsel D, Ortonne JP. Latin American Pigmentary Disorders Academy. Melasma in Latin America: options for therapy and treatment algorithm. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2009;23:760-772.
53. Espósito MCC, Espósito ACC, Jorge MFS, D'Elia MPB, Miot HA. Depression, anxiety, and self-esteem in women with facial melasma: an Internet-based survey in Brazil. *Int J Dermatol*. 2021;60:e346-e347.
54. Ortonne JP, Arellano I, Berneburg M, et al. A global survey of the role of ultraviolet radiation and hormonal influences in the development of melasma. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2009;23:1254-1262.
55. Agar N, Young AR. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res*. 2005;571:121-132.
56. Tamega Ade A, Miot LD, Bonfietti C, Gige TC, Marques ME, Miot HA. Clinical patterns and epidemiological characteristics of facial melasma in Brazilian women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(2):151–156. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04430.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
57. Hexsel D, Lacerda DA, Cavalcante AS, Machado Filho CA, Kalil CL, Ayres EL, et al. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. *Int J Dermatol*. 2014;53(4):440–444. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05748.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
58. Natale CA, Duperret EK, Zhang J, et al. Sex steroids regulate skin pigmentation through nonclassical membrane-bound receptors. *Elife*. 2016;5:e15104. Published 2016 Apr 26. doi:10.7554/eLife.15104
59. Abbassi-Ghanavati, Mina et al. “Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians.” *Obstetrics and gynecology* vol. 114,6 (2009): 1326-1331. doi:10.1097/AOG.0b013e3181c2bde8
60. Muriel Cario, How hormones may modulate human skin pigmentation in melasma: An in vitro perspective, 18 March 2019, <https://doi.org/10.1111/exd.13915>
61. Puckett Y, Wilson AM, Farci F, et al. Melanoma Pathology. [Updated 2021 Oct 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459367/>
62. Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. Pigment Cell Melanoma Res. 2012;25:14–27. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
63. Sarna, Michal et al. “Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells.” *Experimental dermatology* vol. 23,11 (2014): 813-8. doi:10.1111/exd.12535
64. P.A. van der Kemp, J.C. Blais, M. Bazin, et al., Ultraviolet-B-induced inactivation of human OGG1, the repair enzyme for removal of 8-oxoguanine in DNA, *Photochem Photobiol*, 76 (2002), pp. 640-648



65. M.T. Landi, J. Bauer, R.M. Pfeiffer, et al., MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma, *Science*, 313 (2006), pp. 521
66. B. Govindarajan, J.E. Sligh, B.J. Vincent, et al., Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma, *J Clin Invest*, 117 (2007), pp. 719
67. Thangboonjit, W., Limsaeng-u-rai, S., Pluemsamran, T., & Panich, U. (2014). Comparative Evaluation of Antityrosinase and Antioxidant Activities of Dietary Phenolics and their Activities in Melanoma Cells Exposed to UVA. *Siriraj Medical Journal*, 66(1). Retrieved from <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/sirirajmedj/article/view/55287>
68. Itoh K, Hirata N, Masuda M, Naruto S, Murata K, Wakabayashi K, Matsuda H. Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol Pharm Bull*. 2009 Mar;32(3):410-5.
69. Dwivedi, M. et al., 2015, 'Vitiligo – A Complex Autoimmune Skin Depigmenting Disease', in K. Chatzidionysiou (ed.), *Autoimmunity - Pathogenesis, Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases*, IntechOpen, London. 10.5772/59762.
70. Federico, Justin R. and Karthik Krishnamurthy. "Albinism." StatPearls, StatPearls Publishing, 27 August 2021.
71. L. Marrot, J.-P. Belaidi, J.-R. Meunier, et al., The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment, *Photochem Photobiol*, 69 (1999), pp. 686-693
72. X. Song, N. Mosby, J. Yang, et al. , alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes, *Pigment Cell Melanoma Res*, 22 (2009), pp. 809-818
73. J.W. Haycock, S.J. Rowe, S. Cartledge, et al.,  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines, *J Biol Chem*, 275 (2000), pp. 15629-15636
74. Li Ni-Komatsu, Seth J. Orlow, Identification of Novel Pigmentation Modulators by Chemical Genetic Screening, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 127, Issue 7, 2007, Pages 1585-1592, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700852>.
75. Murray RK. Metabolism of xenobiotics. In: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 28th ed. Michigan: McGraw-Hill; 2009. p. 612-3.
76. Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:610-6.
77. Halprin KM, Ohkawara A. Glutathione and human pigmentation. *Arch Dermatol* 1966;94:355-7.
78. Sonthalia S, Daulatabad D, Sarkar R. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016 May-Jun;82(3):262-72. doi: 10.4103/0378-6323.179088. PMID: 27088927.

79. Seçkin HY, Kalkan G, Bas Y, Akbas A, Önder Y, Özyurt H, et al. Oxidative stress status in patients with melasma. *Cutan Ocul Toxicol* 2014;33:212-7
80. Watanabe F, Hashizume E, Chan GP, Kamimura A. Skin lightening and skin-condition-improving effects of topical oxidized glutathione: A double-blind and placebo-controlled clinical trial in healthy women. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014;7:267-74
81. Mahal, H.S.; Mukherjee, T. Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: Antioxidant effect. *Res. Chem. Intermed.* 2006, 32, 59–71.
82. Yokozawa, T.; Kim, Y.J. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30, 2007–2011.
83. Yanagihara, M.; Yoshimatsu, M.; Inoue, A.; Kanno, T.; Tatefuji, T.; Hashimoto, K. Inhibitory effect of gnetin C, a resveratrol dimer from melinjo (*Gnetum gnemon*), on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 2012, 35, 993–996.
84. Kim, S.Y.; Park, K.C.; Kwon, S.B.; Kim, D.S. Hypopigmentary effects of 4-n-butylresorcinol and resveratrol in combination. *Pharmazie* 2012, 67, 542–546
85. Park, J.; Park, J.H.; Suh, H.J.; Lee, I.C.; Koh, J.; Boo, Y.C. Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. *Arch. Dermatol. Res.* 2014, 306, 475–487.
86. Kwon, S.H.; Choi, H.R.; Kang, Y.A.; Park, K.C. Depigmenting Effect of Resveratrol Is Dependent on FOXO3a Activation without SIRT1 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1213.
87. Delmas, D.; Solary, E.; Latruffe, N. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: Apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, 1100–1121.
88. Wu, Y.; Jia, L.L.; Zheng, Y.N.; Xu, X.G.; Luo, Y.J.; Wang, B.; Chen, J.Z.; Gao, X.H.; Chen, H.D.; Matsui, M.; et al. Resveratrate protects human skin from damage due to repetitive ultraviolet irradiation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013, 27, 345–350.
89. Boo, Yong Chool. (2019). Human Skin Lightening Efficacy of Resveratrol and Its Analogs: From in Vitro Studies to Cosmetic Applications. *Antioxidants*. 8. 332. [10.3390/antiox8090332](https://doi.org/10.3390/antiox8090332).
90. Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., Creasy H.H., Earl A.M., FitzGerald M.G., Fulton R.S. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207. [Google Scholar] [Ref list]
91. Meisel J.S., Sfyroera G., Bartow-McKenney C., Gimblet C., Bugayev J., Horwinski J., Kim B., Brestoff J.R., Tyldsley A.S., Zheng Q. Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. *Microbiome*. 2018;6:20. doi: 10.1186/s40168-018-0404-9. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
92. Grice E.A., Segre J.A. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011;9:244. doi: 10.1038/nrmicro2537. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

93. Byrd A.L., Belkaid Y., Segre J.A. The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018;16:143. doi: 10.1038/nrmicro.2017.157. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
94. Oh J., Conlan S., Polley E.C., Segre J.A., Kong H.H. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. *Genome Med.* 2012;4:77. doi: 10.1186/gm378. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
95. Kong H.H., Oh J., Deming C., Conlan S., Grice E.A., Beatson M.A., Nomicos E., Polley E.C., Komarow H.D., Murray P.R. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.* 2012;22:850–859. doi: 10.1101/gr.131029.111. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
96. Rastogi R.P., Incharoensakdi A. Analysis of UV-absorbing photoprotectant mycosporine-like amino acid (MAA) in the cyanobacterium *Arthrospira* sp. CU2556. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014;13:1016–1024. doi: 10.1039/c4pp00013g. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
97. Bell E. Vitamin D3 promotes immune function in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:174–175. doi: 10.1038/nri2047. [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
98. Martinez L.M., Martinez A., Gosset G. Production of Melanins With Recombinant Microorganisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:285. doi: 10.3389/fbioe.2019.00285. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
99. Ruan L., Yu Z., Fang B., He W., Wang Y., Shen P. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* 2004;27:286–289. doi: 10.1078/0723-2020-00265. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]
100. McCraw, Tim & Coryell, Edna & Duvvuri, Muralikrishna & Grimes, Pearl & Einziger, Michael & Einziger, Ann & Macdonald, Timothy & Sackier, Jonathan. (2020). Malassezin: A preclinical assessment of a novel microbiome-based skin lightener.
101. Neelesh K et al. “Cucumis sativus fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent.” *Archives of dermatological research* vol. 303,4 (2011): 247-52. doi:10.1007/s00403-010-1103-y
102. Kai, Hisahiro et al. “Inhibitory effect of Cucumis sativus on melanin production in melanoma B16 cells by downregulation of tyrosinase expression.” *Planta medica* vol. 74,15 (2008): 1785-8. doi:10.1055/s-0028-1088338
103. Kim HJ, Seo JY, Suh HJ, Lim SS, Kim JS. Antioxidant activities of licorice-derived prenylflavonoids. *Nutr Res Pract.* 2012;6(6):491-498. doi:10.4162/nrp.2012.6.6.491
104. Christine Paine, Elizabeth Sharlow, Frank Liebel, Magdalena Eisinger, Stanley Shapiro, Miri Seiberg, *An Alternative Approach to*

- Depigmentation by Soybean Extracts via Inhibition of the PAR-2 Pathway, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 116, Issue 4, 2001, Pages 587-595, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01291.x>.
105. Hu, Chih-Chieh et al. "Antioxidant activity of fermented soybean extract." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 52,18 (2004): 5735-9. doi:10.1021/jf035075b
  106. Antioxidant and Elastase Inhibitor Potential of Petals and Receptacle of Rose Flower (*Rosa damascena*) Evi Mawarni<sup>1</sup> , Chrismis Novalinda Ginting<sup>1\*</sup>, Linda Chiuman<sup>1</sup> , Ermi Girsang<sup>1</sup> , Rr. Anisa Siwianti Handayani<sup>2</sup> , and Wahyu Widowati<sup>3</sup> <sup>1</sup> Universitas Prima Indonesia, Medan, North Sumatra, Indonesia <sup>2</sup> Aretha Medika Utama, Biomolecular and Biomedical Research Center, Pharmaceutical Sciences and Research (PSR), 7 (2), 2020, 105 – 113
  107. Song, Young-Ran et al. "Rose Petal Extract (*Rosa gallica*) Exerts Skin Whitening and Anti-Skin Wrinkle Effects." *Journal of medicinal food* vol. 23,8 (2020): 870-878. doi:10.1089/jmf.2020.4705
  108. Gwiazdowska, D.; Uwineza, P.A.; Frąk, S.; Juś, K.; Marchwińska, K.; Gwiazdowski, R.; Waśkiewicz, A. Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Properties of *Glechoma hederacea* Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction, Using Different Extraction Conditions. *Appl. Sci.* 2022, 12, 3572. <https://doi.org/10.3390/app12073572>
  109. Ha, Jae Hyoun et al. "Clinical evaluation of the depigmenting effect of *Glechoma Hederacea* extract by topical treatment for 8 weeks on UV-induced pigmentation in Asian skin." *European journal of dermatology* : EJD vol. 21,2 (2011): 218-22. doi:10.1684/ejd.2010.1232
  110. Chaikul P, Kanlayavattanakul M, Somkumnerd J, Lourith N. *Phyllanthus emblica* L. (amla) branch: A safe and effective ingredient against skin aging. *J Tradit Complement Med.* 2021;11(5):390-399. Published 2021 Feb 9. doi:10.1016/j.jtcme.2021.02.004
  111. Xiaoli Liu, Mouming Zhao, Jinshui Wang, Bao Yang, Yueming Jiang, Antioxidant activity of methanolic extract of *emblica* fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China, *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 21, Issue 3, 2008, Pages 219-228, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.001>.
  112. Bioactive properties of *Sargassum siliculosum* J. Agardh (Fucales, Ochrophyta) and its potential as source of skin-lightening active ingredient for cosmetic application , Eldrin De Los Reyes Arguelles<sup>1\*</sup>, Arsenia Basaran Sapin<sup>2</sup> , *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 10(07), pp 051-058, July, 2020 DOI: 10.7324/JAPS.2020.10707 ISSN 2231-3354
  113. Jha, B.N., Shrestha, M., Pandey, D.P. et al. Investigation of antioxidant, antimicrobial and toxicity activities of lichens from high altitude regions of Nepal. *BMC Complement Altern Med* 17, 282 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1797-x>

114. Malaspina P, Catellani E, Burlando B, et al. Depigmenting potential of lichen extracts evaluated by in vitro and in vivo tests. *PeerJ*. 2020;8:e9150. Published 2020 May 15. doi:10.7717/peerj.9150
115. Hazwani Mat Saad, Chun Hoe Tan, Siew Huah Lim, Sugumaran Manickam, Kae Shin Sim, Evaluation of anti-melanogenesis and free radical scavenging activities of five *Artocarpus* species for cosmeceutical applications, *Industrial Crops and Products*, 10.1016/j.indcrop.2020.113184, 161, (113184), (2021).
116. Di Petrillo, A., González-Paramás, A.M., Era, B. et al. Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complement Altern Med* 16, 453 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1442-0>
117. Taketsugu TADOKORO, Frédéric BONTÉ, Jean C. ARCHAMBAULT, Jean H. CAUCHARD, Michèle NEVEU, Kentaro OZAWA, Fumihito NOGUCHI, Aya IKEDA, Maki NAGAMATSU, Sachiko SHINN, Whitening efficacy of plant extracts including orchid extracts on Japanese female skin with melasma and lentigo senilis, First published: 24 May 2010 <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2010.00897.x>
118. Jin, Lei & Zhang, Yanlong & Yan, Linmao & Guo, Yulong & Niu, Lixin. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Bulb Extracts of Six *Lilium* Species Native to China. *Molecules* (Basel, Switzerland). 17. 9361-78. 10.3390/molecules17089361.
119. Karakaş, Fatma & Turker, Arzu & Karakas, Alper & Mshvildadze, Vakhtang & Pichette, André & Legault, Jean. (2016). In vitro cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities and phenolic content in wild-grown flowers of common daisy—A medicinal plant. *Journal of Herbal Medicine*. 8. 10.1016/j.hermed.2016.11.003.
120. Korkmaz, Nuriye, Sener, Sila Ozlem, Akkaya, Seyda, Badem, Merve, Aliyazicioglu, Rezzan, Abudayyak, Mahmoud, Oztas, Ezgi and Ozgen, Ufuk. "Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas" *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 44, no. 3, 2019, pp. 278-288. <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0345>
121. Vara, Ana & Pinela, José & Inês, Maria & Petrovic, Jovana & Nogueira, António & Soković, Marina & Ferreira, Isabel & Barros, Lillian. (2020). Compositional Features of the “Kweli” Red Raspberry and Its Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Foods*. 9. 1522. 10.3390/foods9111522.
122. Buranasudja V, Rani D, Malla A, Kobtrakul K, Vimolmangkang S. Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Sci Rep*. 2021;11(1):13459. Published 2021 Jun 29. doi:10.1038/s41598-021-92958-7
123. Ikram Khémiri, Badiaa Essghaier, Najla Sadfi-Zouaoui, Lotfi Bitri, "Antioxidant and Antimicrobial Potentials of Seed Oil from *Carthamus tinctorius* L. in the Management of Skin Injuries", *Oxidative Medicine and*

- Cellular Longevity, vol. 2020, Article ID 4103418, 12 pages, 2020.  
<https://doi.org/10.1155/2020/4103418>
124. Cho, Yeong Hee et al. "Tranexamic acid inhibits melanogenesis by activating the autophagy system in cultured melanoma cells." *Journal of dermatological science* vol. 88,1 (2017): 96-102.  
 doi:10.1016/j.jdermsci.2017.05.019
  125. Benjakul S, Kittiphattanabawon P, Sumpavapol P, Maqsood S. Antioxidant activities of lead (*Leucaena leucocephala*) seed as affected by extraction solvent, prior dechlorophyllisation and drying methods. *J Food Sci Technol.* 2014;51(11):3026-3037. doi:10.1007/s13197-012-0846-1
  126. Nguyen, B.C.Q.; Tawata, S. Mimosine Dipeptide Enantiomers: Improved Inhibitors against Melanogenesis and Cyclooxygenase. *Molecules* 2015, 20, 14334-14347. <https://doi.org/10.3390/molecules200814334>
  127. Katoulis, Alexander et al. "A double-blind vehicle-controlled study of a preparation containing undecylenoyl phenylalanine 2% in the treatment of melasma in females." *Journal of cosmetic dermatology* vol. 13,2 (2014): 86-90. doi:10.1111/jocd.12089
  128. da Silva Souza, Ivan D et al. "New topical tranexamic acid derivative for the improvement of hyperpigmentation and inflammation in the sun-damaged skin." *Journal of cosmetic dermatology* vol. 20,2 (2021): 561-565. doi:10.1111/jocd.13545
  129. Choi, Sang Yoon et al. "(4-Methoxy-benzylidene)-(3-methoxy-phenyl)-amine, a nitrogen analog of stilbene as a potent inhibitor of melanin production." *Chemical & pharmaceutical bulletin* vol. 50,4 (2002): 450-2. doi:10.1248/cpb.50.450
  130. Wada, N.; Sakamoto, T.; Matsugo, S. Mycosporine-Like Amino Acids and Their Derivatives as Natural Antioxidants. *Antioxidants* 2015, 4, 603-646. <https://doi.org/10.3390/antiox4030603>
  131. Hassan, M.; Vanjare, B.D.; Sim, K.-Y.; Raza, H.; Lee, K.H.; Shahzadi, S.; Kloczkowski, A. Biological and Cheminformatics Studies of Newly Designed Triazole Based Derivatives as Potent Inhibitors against Mushroom Tyrosinase. *Molecules* 2022, 27, 1731. <https://doi.org/10.3390/molecules27051731>
  132. Pokuri, Sateesh et al. "Insights on the antioxidant potential of 1, 2, 4-triazoles: synthesis, screening & QSAR studies." *Current drug metabolism* vol. 15,4 (2014): 389-97. doi:10.2174/1389200215666140908101958
  133. Kim, Dong-Seok et al. "Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation." *Journal of cell science* vol. 116,Pt 9 (2003): 1699-706. doi:10.1242/jcs.00366
  134. Lei, Li et al. "The role of lysophosphatidic acid in the physiology and pathology of the skin." *Life sciences* vol. 220 (2019): 194-200. doi:10.1016/j.lfs.2018.12.040
  135. Jeong, HS., Lee, S.H., Yun, HY. et al. Involvement of mTOR signaling in sphingosylphosphorylcholine-induced hypopigmentation effects. *J Biomed Sci* 18, 55 (2011). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-55>

136. Aksu, Feyza et al. "Antioxidant and renoprotective effects of sphingosylphosphorylcholine on contrast-induced nephropathy in rats." *Renal failure* vol. 38,7 (2016): 1089-98. doi:10.1080/0886022X.2016.1194142
137. Shigeta, Yasutami et al. "Skin whitening effect of linoleic acid is enhanced by liposomal formulations." *Biological & pharmaceutical bulletin* 27 4 (2004): 591-4 .
138. Fagali, Natalia, and Angel Catalá. "Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques." *Biophysical chemistry* vol. 137,1 (2008): 56-62. doi:10.1016/j.bpc.2008.07.001
139. Ando, Hideya et al. "Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function." *The Journal of biological chemistry* vol. 279,15 (2004): 15427-33. doi:10.1074/jbc.M313701200
140. Geethanjali, Gorla et al. "Synthesis, characterization, and evaluation of 10-undecenoic acid-based epithio derivatives as multifunctional additives." *Journal of agricultural and food chemistry* vol. 62,47 (2014): 11505-11. doi:10.1021/jf5033558
141. Karimi E, Jaafar HZ, Ghasemzadeh A, Ebrahimi M. Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial properties of the microwave aqueous extract of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Biol Res.* 2015;48(1):9. Published 2015 Jan 23. doi:10.1186/0717-6287-48-9
142. Schütz R, Rawlings AV, Wandeler E, et al. Bio-derived hydroxystearic acid ameliorates skin age spots and conspicuous pores. *Int J Cosmet Sci.* 2019;41(3):240-256. doi:10.1111/ics.12529
143. Cho, Kyung-Hyun et al. "Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid." *Journal of medicinal food* vol. 13,1 (2010): 99-107. doi:10.1089/jmf.2009.1024
144. van den Berg, J J et al. "Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid." *Lipids* vol. 30,7 (1995): 599-605. doi:10.1007/BF02536996
145. Villarama, C D, and H I Maibach. "Glutathione as a depigmenting agent: an overview." *International journal of cosmetic science* vol. 27,3 (2005): 147-53. doi:10.1111/j.1467-2494.2005.00235.x
146. Tahir I, Khan MR, Shah NA, Aftab M. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and amelioration of pulmonary fibrosis with *Phyllanthus emblica* leaves. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(1):406. Published 2016 Oct 24. doi:10.1186/s12906-016-1387-3
147. Cao X, Wang Y, Wu C, Li X, Fu Z, Yang M, Bian W, Wang S, Song Y, Tang J, Yang X. Cathelicidin-OA1, a novel antioxidant peptide identified from an amphibian, accelerates skin wound healing. *Sci Rep.* 2018 Jan 17;8(1):943. doi: 10.1038/s41598-018-19486-9. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Oct 23;8(1):15906. PMID: 29343843; PMCID: PMC5772731.

148. Rodrigo Rodrigues e Lacerda, Edilza Silva do Nascimento, José Thalles Jocelino Gomes de Lacerda, Luciano da Silva Pinto, Caroline Rizzi, Mirna Marques Bezerra, Isabela Ribeiro Pinto, Samuel Mateus Pereira Filho, Vicente de Paulo Texeira Pinto, Gerardo Cristino Filho, Carlos Alberto de Almeida Gadelha, Tatiane Santi Gadelha, Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 95, 2017, Pages 1072-1081, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.097>.
149. Zhang, H.; Nakamura, S.; Kitts, D.D. Antioxidant Properties of Casein Phosphopeptides (CPP) and Maillard-Type Conjugated Products. *Antioxidants* 2020, 9, 648. <https://doi.org/10.3390/antiox9080648>
150. Usuki A, Ohashi A, Sato H, Ochiai Y, Ichihashi M, Funasaka Y. The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp Dermatol.* 2003;12 Suppl 2:43-50. doi: 10.1034/j.1600-0625.12.s2.7.x. PMID: 14756523.
151. Schallreuter KU, Wood JW. A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Arch Dermatol Res.* 1990;282(3):168-71. doi: 10.1007/BF00372617. PMID: 2114832.
152. Jones DA. Rosacea, reactive oxygen species, and azelaic Acid. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2009;2(1):26-30.
153. Ullah S, Park Y, Park C, Lee S, Kang D, Yang J, Akter J, Chun P, Moon HR. Antioxidant, anti-tyrosinase and anti-melanogenic effects of (E)-2,3-diphenylacrylic acid derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2019 Jun 1;27(11):2192-2200. doi: 10.1016/j.bmc.2019.04.020. Epub 2019 Apr 15. PMID: 31027707.
154. Nan Shun Ma, Marion Abraham, Myeong Jun Choi, Jung Sun Kim, Skin permeation and comparative evaluation of gentisic acid ester derivatives as skin-lightening agents, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Volume 24, Issue 2, 2014, Pages 212-217, ISSN 1773-2247, [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50034-2](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50034-2).
155. Joshi R, Gangabhairathi R, Venu S, Adhikari S, Mukherjee T. Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of gentisic acid: in-vitro and pulse radiolysis studies. *Free Radic Res.* 2012 Jan;46(1):11-20. doi: 10.3109/10715762.2011.633518. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22023109.
156. Kolbe L, Mann T, Gerwat W, Batzer J, Ahlheit S, Scherner C, Wenck H, Stäb F. 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 Jan;27 Suppl 1:19-23. doi: 10.1111/jdv.12051. PMID: 23205541.
157. Fidalgo J, Deglesne PA, Arroya R, Ranneva E and Deprez P\*, 4-Hexylresorcinol a New Molecule for Cosmetic Application, *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics, J Biomol Res Ther*, Vol. 8 Iss. 1 No: 170



158. Kim BS, Na YG, Choi JH, et al. The Improvement of Skin Whitening of Phenylethyl Resorcinol by Nanostructured Lipid Carriers. *Nanomaterials* (Basel). 2017;7(9):241. Published 2017 Aug 28. doi:10.3390/nano7090241
159. 오성근, Preparation of alpha-bisabolol and phenylethyl resorcinol/TiO<sub>2</sub> hybrid composites for potential applications in cosmetics,2016, *INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE*, v. 38, NO. 5, Page. 524-534
160. Selamoglu Z, Dusgun C, Akgul H, Gulhan MF. In-vitro Antioxidant Activities of the Ethanolic Extracts of Some Contained-Allantoin Plants. *Iran J Pharm Res.* 2017;16(Suppl):92-98.
161. Hakozaki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, Greatens A, Hillebrand GG, Bissett DL, Boissy RE. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br J Dermatol.* 2002 Jul;147(1):20-31. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04834.x. PMID: 12100180.
162. R.K. Ameta, Man Singh, A thermodynamic in vitro antioxidant study of vitamins B (niacin and niacin amide) and C (ascorbic acid) with DPPH through UV spectrophotometric and physicochemical methods, *Journal of Molecular Liquids*, Volume 195,2014,Pages 40-46,ISSN 0167-7322,https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.01.029.
163. Hoppe, U & Bergemann, Jörg & Diembeck, W & Ennen, Joachim & Gohla, Sven & Harris, I & Jacob, J & Kielholz, J & Mei, W & Pollet, D & Schachtschabel, D & Sauermann, G & Schreiner, V & Stüb, F & Steckel, F. (1999). Coenzyme Q 10 , a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors* (Oxford, England). 9. 371-8. 10.1002/biof.5520090238.
164. Hseu YC, Ho YG, Mathew DC, Yen HR, Chen XZ, Yang HL. The in vitro and in vivo depigmenting activity of Coenzyme Q10 through the down-regulation of  $\alpha$ -MSH signaling pathways and induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated skin keratinocytes. *Biochem Pharmacol.* 2019 Jun;164:299-310. doi: 10.1016/j.bcp.2019.04.015. Epub 2019 Apr 13. PMID: 30991050.
165. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1999 Mar;26(5-6):746-61. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00266-4. PMID: 10218665.
166. Sato K, Morita M, Ichikawa C, Takahashi H, Toriyama M. Depigmenting mechanisms of all-trans retinoic acid and retinol on B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Oct;72(10):2589-97. doi: 10.1271/bbb.80279. Epub 2008 Oct 7. PMID: 18838813.
167. Di Mambro VM, Azzolini AE, Valim YM, Fonseca MJ. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm.* 2003 Aug 27;262(1-2):93-9. doi: 10.1016/s0378-5173(03)00333-8. PMID: 12927391.
168. Rehakova Z, Koleckar V, Cervenka F, Jahodar L, Saso L, Opletal L, Jun D, Kuca K. DPPH Radical Scavenging Activity of Several Naturally Occurring Coumarins and Their Synthesized Analogs Measured by the

- SIA Method. *Toxicol Mech Methods*. 2008;18(5):413-8. doi: 10.1080/15376510701511448. PMID: 20020865.
169. Brasil, Edikarlos & Canavieira, Luciana & Cardoso, Erica & Silva, Edilene & Lameira, Jerônimo & Nascimento, José & Eifler-lima, Vera & Macchi, Barbarella & Sriram, Dharmarajan & Bernhardt, Paul & Silva, José & Williams, Craig & Alves, C.. (2017). Inhibition of Tyrosinase by 4H-Chromene Analogues: Synthesis, Kinetic Studies and Computational Analysis. *Chemical biology & drug design*. 90. 10.1111/cbdd.13001.
  170. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*. 2003 Sep;9(9):BR325-30. PMID: 12960921.
  171. Draelos, Zoe & Deliencourt-Godefroy, Geraldine & Lopes, Lenaig. (2020). An effective hydroquinone alternative for topical skin lightening. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 19. 3258-3261. 10.1111/jocd.13771.
  172. V. Jaishree, N. Ramdas, J. Sachin, B. Ramesh, In vitro antioxidant properties of new thiazole derivatives, *Journal of Saudi Chemical Society*, Volume 16, Issue 4, 2012, Pages 371-376, ISSN 1319-6103, <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.02.007>.
  173. Emami S, Hosseinimehr SJ, Shahrbandi K, Enayati AA, Esmaeeli Z. Synthesis and evaluation of 2(3H)-thiazole thiones as tyrosinase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2012 Aug;345(8):629-37. doi: 10.1002/ardp.201200028. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22532401.
  174. Gonçalves, Máira Lima et al. "Structural characterization and in vitro antioxidant activity of kojic dipalmitate loaded w/o/w multiple emulsions intended for skin disorders." *BioMed research international* vol. 2015 (2015): 304591. doi:10.1155/2015/304591
  175. Lajis AF, Hamid M, Ariff AB. Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:952452. doi: 10.1155/2012/952452. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23091364; PMCID: PMC3468271.
  176. Siang-Jyun Chen, You-Cheng Hseu, Yugandhar Vudhya Gowrisankar, Yi-Ting Chung, Yan-Zhen Zhang, Tzong-Der Way, Hsin-Ling Yang, The anti-melanogenic effects of 3-O-ethyl ascorbic acid via Nrf2-mediated  $\alpha$ -MSH inhibition in UVA-irradiated keratinocytes and autophagy induction in melanocytes, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 173, 2021, Pages 151-169, ISSN 0891-5849, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.030>.
  177. Yuyang Liu, Chuanqun Liu, and Jianjun Li, Comparison of Vitamin C and Its Derivative Antioxidant Activity: Evaluated by Using Density Functional Theory, September 25, 2020, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04318>
  178. Sanadi, Rizwan M, and Revati S Deshmukh. "The effect of Vitamin C on melanin pigmentation - A systematic review." *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP* vol. 24,2 (2020): 374-382. doi:10.4103/jomfp.JOMFP\_207\_20

179. Kim JK, Kim M, Cho SG, Kim MK, Kim SW, Lim YH. Biotransformation of mulberroside A from *Morus alba* results in enhancement of tyrosinase inhibition. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010 Jun;37(6):631-7. doi: 10.1007/s10295-010-0722-9. Epub 2010 Apr 22. PMID: 20411402.
180. Timalisina, Binod & Park, Seul & Kwon, Ryeong & Thaku, Niha & Choi, Jae & Jung, Hyun. (2019). Antioxidant Activity of the Polar Fraction of *Morus alba* Root Bark and a Stilbene Compound, Mulberroside A. 10.13140/RG.2.2.16143.64164.
181. Franco, Danielle Cristina Zimmermann et al. "Inhibitory effects of resveratrol analogs on mushroom tyrosinase activity." *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 17,10 11816-25. 9 Oct. 2012, doi:10.3390/molecules171011816
182. İlhami Gülçin, Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 11, Issue 1, 2010, Pages 210-218, ISSN 1466-8564, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>.
183. Fan GJ, Liu XD, Qian YP, Shang YJ, Li XZ, Dai F, Fang JG, Jin XL, Zhou B. 4,4'-Dihydroxy-trans-stilbene, a resveratrol analogue, exhibited enhanced antioxidant activity and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem*. 2009 Mar 15;17(6):2360-5. doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.014. Epub 2009 Feb 14. PMID: 19251420.
184. Larissa Lavorato Lima, Rebeca Mól Lima, Annelisa Farah da Silva, Antônio Márcio Resende do Carmo, Adilson David da Silva, Nádia Rezende Barbosa Raposo, "Azastilbene Analogs as Tyrosinase Inhibitors: New Molecules with Depigmenting Potential", *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 274643, 7 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/274643>
185. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide*. 2003 Sep;9(2):64-76. doi: 10.1016/j.niox.2003.09.005. PMID: 14623172.
186. Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):16340-4. doi: 10.1074/jbc.M200678200. Epub 2002 Feb 25. PMID: 11864987.
187. Franco DC, de Carvalho GS, Rocha PR, da Silva Teixeira R, da Silva AD, Raposo NR. Inhibitory effects of resveratrol analogs on mushroom tyrosinase activity. *Molecules*. 2012 Oct 9;17(10):11816-25. doi: 10.3390/molecules171011816. PMID: 23047482; PMCID: PMC6268222.
188. Vitalini S, Cicek SS, Granica S, Zidorn C. Dihydroresveratrol Type Dihydrostilbenoids: Chemical Diversity, Chemosystematics, and Bioactivity. *Curr Med Chem*. 2018;25(10):1194-1240. doi: 10.2174/0929867324666170830112343. PMID: 28875843.

189. Nerya O, Musa R, Khatib S, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*. 2004 May;65(10):1389-95. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.04.016. PMID: 15231412.
190. Sökmen M, Akram Khan M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. *Inflammopharmacology*. 2016 Jun;24(2-3):81-6. doi: 10.1007/s10787-016-0264-5. Epub 2016 May 17. PMID: 27188988; PMCID: PMC4883448.
191. Günther, Andrzej et al. "Enhancement of the Antioxidant and Skin Permeation Properties of Betulin and Its Derivatives." *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26,11 3435. 5 Jun. 2021, doi:10.3390/molecules26113435
192. Rao AR, Sindhuja HN, Dharmesh SM, Sankar KU, Sarada R, Ravishankar GA. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J Agric Food Chem*. 2013 Apr 24;61(16):3842-51. doi: 10.1021/jf304609j. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23473626.
193. Viet, Tran Duc et al. "α-Amyrin and β-Amyrin Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials." *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 26,23 7248. 29 Nov. 2021, doi:10.3390/molecules26237248
194. Amrita Anantharaman, Hridya Hemachandran, Rajendra Rao Priya, Mohan Sankari, Mohan Gopalakrishnan, Nallasamy Palanisami, Ramamoorthy Siva, Inhibitory effect of apocarotenoids on the activity of tyrosinase: Multi-spectroscopic and docking studies, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 121, Issue 1, 2016, Pages 13-20, ISSN 1389-1723, <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.007>.
195. Pipin T. Kurniawati(1\*), H. Soetjipto(2), Leenawati Limantara(3), ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF BIXIN PIGMENT FROM ANNATTO (*Bixa orellana* L.) SEEDS, *INDONESIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, Vol 7, No 1 (2007) > Kurniawati, <https://doi.org/10.22146/ijc.21719>
196. Tan C, Zhu W, Lu Y. Aloin, cinnamic acid and sophorcarpidine are potent inhibitors of tyrosinase. *Chin Med J (Engl)*. 2002 Dec;115(12):1859-62. PMID: 12622939.
197. Bing Tian, Yuejin Hua, Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA, *Food Chemistry*, Volume 91, Issue 3, 2005, Pages 413-418, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.018>.
198. Haldys K, Latajka R. Thiosemicarbazones with tyrosinase inhibitory activity. *Medchemcomm*. 2019 Feb 5;10(3):378-389. doi: 10.1039/c9md00005d. PMID: 31015905; PMCID: PMC6457196.
199. Nguyen DT, Le TH, Bui TT. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)thiosemicarbazide. *Eur J Med Chem*. 2013 Feb;60:199-

207. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.004. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23291121.
200. Kim JY, Kim JY, Jenis J, Li ZP, Ban YJ, Baiseitova A, Park KH. Tyrosinase inhibitory study of flavonolignans from the seeds of *Silybum marianum* (Milk thistle). *Bioorg Med Chem*. 2019 Jun 15;27(12):2499-2507. doi: 10.1016/j.bmc.2019.03.013. Epub 2019 Mar 7. PMID: 30871862.
201. Köksal E, Gülçin I, Beyza S, Sarikaya O, Bursal E. In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009 Apr;24(2):395-405. doi: 10.1080/14756360802188081. PMID: 18830883.
202. Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic Res*. 2010 Apr;44(4):473-8. doi: 10.3109/10715761003610760. PMID: 20166881.
203. Boo YC. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1129. Published 2021 Jul 15. doi:10.3390/antiox10071129
204. Park HJ, Cho JH, Hong SH, Kim DH, Jung HY, Kang IK, Cho YJ. Whitening and anti-wrinkle activities of ferulic acid isolated from *Tetragonia tetragonoides* in B16F10 melanoma and CCD-986sk fibroblast cells. *J Nat Med*. 2018 Jan;72(1):127-135. doi: 10.1007/s11418-017-1120-7. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28884442.
205. Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem*. 2002 Mar 27;50(7):2161-8. doi: 10.1021/jf011348w. PMID: 11902973.
206. Carmeli E, Fogelman Y. Antioxidant effect of polyphenolic glabridin on LDL oxidation. *Toxicol Ind Health*. 2009 May-Jun;25(4-5):321-4. doi: 10.1177/0748233709103034. PMID: 19651803.
207. Chen J, Yu X, Huang Y. Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2016 Nov 5;168:111-117. doi: 10.1016/j.saa.2016.06.008. Epub 2016 Jun 5. PMID: 27288962.
208. Ortiz-Ruiz CV, Berna J, Tudela J, Varon R, Garcia-Canovas F. Action of ellagic acid on the melanin biosynthesis pathway. *J Dermatol Sci*. 2016 May;82(2):115-22. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.02.004. Epub 2016 Feb 12. PMID: 26899308.
209. Han DH, Lee MJ, Kim JH. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Res*. 2006 Sep-Oct;26(5A):3601-6. PMID: 17094489.
210. Kumar KJ, Vani MG, Wang SY, Liao JW, Hsu LS, Yang HL, Hseu YC. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases. *Biofactors*. 2013 May-Jun;39(3):259-70. doi: 10.1002/biof.1064. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23322673.

211. Bharti Badhani,a Neha Sharma and Rita Kakkar\*a , Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, RSC ADVANCES, ISSUE 2015
212. E. M. Tanvir, Md. Sakib Hossen, Md. Fuad Hossain, Rizwana Afroz, Siew Hua Gan, Md. Ibrahim Khalil, Nurul Karim, "Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh", Journal of Food Quality, vol. 2017, Article ID 8471785, 8 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8471785>
213. Lv Jinpeng, Yang Ying, Jia Bingyi, Li Siqi, Zhang Ximei, Gao Rong, The Inhibitory Effect of Curcumin Derivative J147 on Melanogenesis and Melanosome Transport by Facilitating ERK-Mediated MITF Degradation, Frontiers in Pharmacology, 12, 2021
214. Salomon L, Lorenz P, Bunse M, Spring O, Stintzing FC, Kammerer DR. Comparison of the Phenolic Compound Profile and Antioxidant Potential of *Achillea atrata* L. and *Achillea millefolium* L. *Molecules*. 2021 Mar 11;26(6):1530. doi: 10.3390/molecules26061530. PMID: 33799635; PMCID: PMC8000477.
215. Zych, M.; Wojnar, W.; Borymski, S.; Szalabska, K.; Bramora, P.; Kaczmarczyk-Sedlak, I. Effect of Rosmarinic Acid and Sinapic Acid on Oxidative Stress Parameters in the Cardiac Tissue and Serum of Type 2 Diabetic Female Rats. *Antioxidants* 2019, 8, 579. <https://doi.org/10.3390/antiox8120579>
216. Sang W. Choi and Gerald M. Sapers, Purpling Reaction of Sinapic Acid Model Systems Containing L-DOPA and Mushroom Tyrosinase, Publication Date: May 1, 1994, American Chemical Society
217. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. *Molecules*. 2019;24(6):1123. Published 2019 Mar 21. doi:10.3390/molecules24061123
218. Choi, M.-H.; Shin, H.-J. Anti-Melanogenesis Effect of Quercetin. *Cosmetics* 2016, 3, 18. <https://doi.org/10.3390/cosmetics3020018>
219. Sato K, Toriyama M. Depigmenting effect of catechins. *Molecules*. 2009;14(11):4425-4432. Published 2009 Nov 4. doi:10.3390/molecules14114425
220. Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chem*. 2018 Feb 15;241:480-492. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28958556.
221. Naseem B, Shah SW, Hasan A, Sakhawat Shah S. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media: a UV-visible spectroscopic study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2010 Apr;75(4):1341-6. doi: 10.1016/j.saa.2009.12.083. Epub 2010 Jan 6. PMID: 20163982.
222. Liu-Smith, Feng, and Frank L Meyskens. "Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma." *Molecular nutrition & food research* vol. 60,6 (2016): 1264-74. doi:10.1002/mnfr.201500822

223. Rho HS, Ghimeray AK, Yoo DS, Ahn SM, Kwon SS, Lee KH, Cho DH, Cho JY. Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules*. 2011 Apr 18;16(4):3338-44. doi: 10.3390/molecules16043338. PMID: 21512441; PMCID: PMC6260593.
224. Wang Y, Zhang G, Yan J, Gong D. Inhibitory effect of morin on tyrosinase: insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Food Chem*. 2014 Nov 15;163:226-33. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.106. Epub 2014 May 9. PMID: 24912720.
225. Lee MH, Cha HJ, Choi EO, Han MH, Kim SO, Kim GY, Hong SH, Park C, Moon SK, Jeong SJ, Jeong MJ, Kim WJ, Choi YH. Antioxidant and cytoprotective effects of morin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress are associated with the induction of Nrf-2 mediated HO-1 expression in V79-4 Chinese hamster lung fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2017 Mar;39(3):672-680. doi: 10.3892/ijmm.2017.2871. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28204816.
226. Zheng ZP, Cheng KW, To JT, Li H, Wang M. Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Dec;52(12):1530-8. doi: 10.1002/mnfr.200700481. PMID: 18683821.
227. Yu L, Chen L, Luo G, Liu L, Zhu W, Yan P, Zhang P, Zhang C, Wu W. Study on Synthesis and Biological Evaluation of 3-Aryl Substituted Xanthone Derivatives as Novel and Potent Tyrosinase Inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2019 Nov 1;67(11):1232-1241. doi: 10.1248/cpb.c19-00572. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31495804.
228. Seca, Ana M L et al. "Xanthenedione derivatives, new promising antioxidant and acetylcholinesterase inhibitor agents." *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 19,6 8317-33. 19 Jun. 2014, doi:10.3390/molecules19068317
229. Chang TS. Two potent suicide substrates of mushroom tyrosinase: 7,8,4'-trihydroxyisoflavone and 5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone. *J Agric Food Chem*. 2007 Mar 7;55(5):2010-5. doi: 10.1021/jf063095i. Epub 2007 Feb 13. PMID: 17295516.
230. Yoon, Gun-Ae, and Sunmin Park. "Antioxidant action of soy isoflavones on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in exercised rats." *Nutrition research and practice* vol. 8,6 (2014): 618-24. doi:10.4162/nrp.2014.8.6.618
231. Uchida R, Ishikawa S, Tomoda H. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. *Acta Pharm Sin B*. 2014;4(2):141-145. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.008
232. Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem*. 2001 May;49(5):2480-5. doi: 10.1021/jf000537w. PMID: 11368623.
233. Choi MY, Song HS, Hur HS, Sim SS. Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16

- melanoma cells. *Arch Pharm Res.* 2008 Sep;31(9):1166-71. doi: 10.1007/s12272-001-1284-4. Epub 2008 Sep 20. PMID: 18806960.
234. Ahmadi SM, Farhoosh R, Sharif A, Rezaie M. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Luteolin and Catechin. *J Food Sci.* 2020 Feb;85(2):298-305. doi: 10.1111/1750-3841.14994. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31957877.
235. Piquero-Casals J, Granger C, Piquero-Casals V, Garre A, Mir-Bonafé JF. A Treatment Combination of Peels, Oral Antioxidants, and Topical Therapy for Refractory Melasma: A Report of 4 Cases. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020 Mar 4;13:209-213. doi: 10.2147/CCID.S242180. PMID: 32161485; PMCID: PMC7061430.
236. Wahab S, Anwar AI, Zainuddin AN, Hutabarat EN, Anwar AA, Kurniadi I. Combination of topical and oral glutathione as a skin-whitening agent: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Int J Dermatol.* 2021 Aug;60(8):1013-1018. doi: 10.1111/ijd.15573. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33871071.