

# Optimizacija i primjena metode inhibicije hijaluronidaze za određivanje učinka lista masline (*Olea europaea*, L.)

---

Kadi, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:097233>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ana Kadi**

**Optimizacija i primjena metode inhibicije  
hijaluronidaze za određivanje učinka lista  
masline (*Olea europaea*, L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marijane Zovko Končić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marijani Zovko Končić, asistentici mag. pharm. Lejsi Jakupović i asistentu dr. sc. Marijanu Marijanu na uloženom trudu, vremenu i pomoći. Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj podršci koju su mi pružili tijekom studija.

## SADRŽAJ

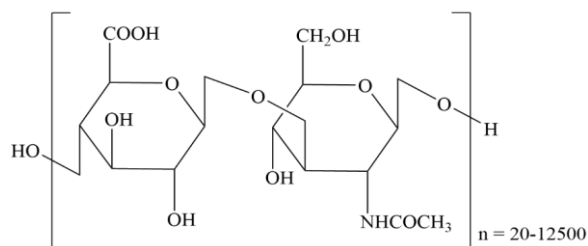
1. UVOD.....	1
1.1. Hijaluronska kiselina.....	1
1.1.1. Građa hijaluronske kiseline.....	1
1.1.2. Sinteza hijaluronske kiseline.....	2
1.1.3. Smještaj i uloga hijaluronske kiseline.....	2
1.1.3.1. Hijaluronska kiselina i koža.....	4
1.2. Hijaluronidaza.....	5
1.2.1. Klasifikacija hijaluronidaza.....	6
1.3. List masline (Oleae folium).....	8
1.4. Starenje kože.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali.....	12
3.1.1. Biljni materijal.....	12
3.1.2. Kemikalije.....	12
3.1.3. Uređaji.....	12
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Optimizacija metode inhibicije hijaluronidaze.....	13

3.2.1.1. Ovisnost apsorbancije o koncentracijama hijaluronske kiseline i hijaluronidaze.....	13
3.2.1.2. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1%-tne otopine DMAB-a.....	14
3.2.1.3. Ovisnost apsorbancije različitim koncentracijama DMAB reagensa.....	14
3.2.2. Ekstrakcija lista masline.....	14
3.2.3. Statistička obrada podataka.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Ovisnost apsorbancije o koncentracijama hijaluronske kiseline i hijaluronidaze.....	17
4.2. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1%-tne otopine DMAB a.....	18
4.3. Ovisnost apsorbancije o različitim koncentracijama DMAB reagensa.....	18
4.4. Određivanje optimalnih uvjeta metode.....	20
4.5. Primjena metode inhibicije hijaluronidaze na ekstraktima lista masline.....	20
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. LITERATURA.....	23
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	31
Temeljna dokumentacijska kartica (Basic documentation card)	

## 1. UVOD

### 1.1. Hijaluronska kiselina

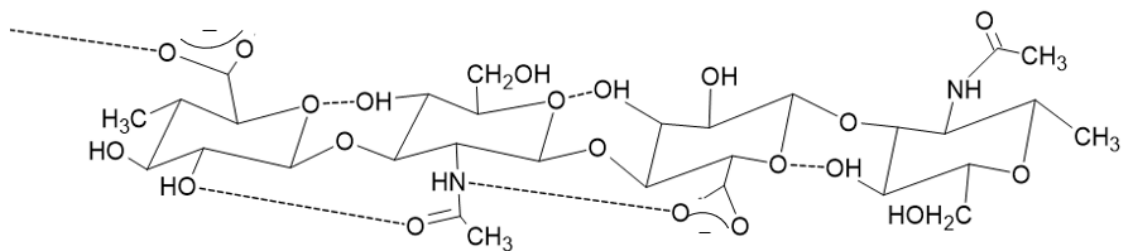
Hijaluronska kiselina (HA, grč. *hyalus* = staklo), još poznata pod nazivom hijaluronan ili hijaluronat, nerazgranati je polisaharid čija molekulska masa može premašiti vrijednost od  $4 \cdot 10^6$  Da (Salmen, 2004). Zajedno sa svojim suradnikom Johnom Palmerom, otkrio ju je Karl Meyer izolacijom iz staklovine goveđeg oka (Meyer i Palmer, 1934).



Slika 1. Struktura hijaluronske kiseline.

#### 1.1.1. Građa hijaluronske kiseline

Hijaluronska kiselina pripada skupini glikozaminoglikana koji su po svom sastavu polimeri aminošećera (*N*-acetilglukozamina ili *N*-acetilgalaktozamina) i uronskih kiselina (glukuronske ili iduronske kiseline). Ono po čemu se HA ističe, u odnosu na druge polisaharide glikozaminoglikana, jest izostanak sulfatacije na njezinim šećerima i činjenica da se ona ne ugrađuje u strukturu proteoglikana, već s njima ostvaruje vanjske veze. Građena je od ponavljajućih disaharidnih jedinica glukuronske kiseline i *N*-acetilglukozamina povezanih s izmjenjujućim β-1,3- i β-1,4-glikozidnim vezama (Slika 1). U vodenoj otopini, dvostruki heliks (susjedni disaharidi smješteni su pod kutom od 180° i tvore heliksnu vrpcu) koji formiraju lanci HA, stabiliziran je vodikovim vezama s vodom (Slika 2). Takva sekundarna struktura omogućava stvaranje hidrofobnog džepa (tvori ga otprilike 8 CH-grupa iz 3 ugljikohidratne jedinice), koji uz hidrofilne dijelove molekuli HA daje amfifilna svojstva (Scott, 1989). Hidrofobni džep omogućuje međusobno povezivanje polimera HA te ostvarivanje dodatnog kontakta s hidrofobnim dijelovima proteina i membranom stanica. Utjecajem veličine, hidrofilnih i hidrofobnih veza, HA stvara viskozni medij kojim obavlja stanice i time ostvaruje svoje brojne funkcije.



Slika 2. Tetrasaharidni fragment hijaluronske kiseline u vodenoj otopini.

### 1.1.2. Sinteza hijaluronske kiseline

Transmembranski enzimi, koji sintetiziraju HA djelujući kao glikoziltransferaze, jesu hijaluronan sintaze (HAS). Sinteza započinje s unutarnje strane stanične membrane, a polimer u nastajanju još se za vrijeme stvaranja prebacuje na vanjsku stranu membrane i u konačnici otpušta u ekstracelularni matriks (ECM). U sisavaca su identificirane tri izoforme: HAS-1, HAS-2 i HAS-3. Od tri izoforme hijaluronan sintaza, HAS-3 ima najveću aktivnost, stvara HA niske molekulske mase te je pojačano aktivna u upalnim procesima (Evrard i sur., 2021).

### 1.1.3. Smještaj i uloga hijaluronske kiseline

HA je jedna od građevnih komponenata ekstracelularnog i pericelularnog matriksa, no može se nalaziti i unutar stanica. Nađena je u tkivima svih kralježnjaka, ali sintetiziraju ju i neke vrste bakterija. Zasićenost tkiva s HA uvelike varira ovisno o vrsti tkiva te se u samoj koži nalazi 50 % od ukupne tjelesne količine hijalurona (Stern i Maibach, 2008).

Glavne karakteristike hijaluronskog matriksa, koje proizlaze iz strukture i ovise o molekulskoj masi i koncentraciji HA, jesu viskoznost i elastičnost. Primijećeno je da se viskoznost smanjuje s povećanjem primijenjene sile, dok se elastičnost istovremeno povećava. Taj fenomen

omogućava brz oporavak od deformacija i sprječava nastanak oštećenja pri djelovanju sile (npr. pri pomicanju zglobova) te HA djeluje kao biološki lubrikant. (Fraser i sur., 1997).

Ovisno o molekulskoj masi, uloge HA u organizmu se razlikuju. Polimeri s molekulskom masom od 0,4 do 4 kDa imaju antiapoptotička svojstva. HA molekulske mase 6 – 20 kDa potiče angiogenezu te djeluje imunostimulatorno i proupalno. Polimer molekulske mase 20 – 200 kDa sudjeluje u cijeljenju rana, razvoju embrija i procesu ovulacije. Molekule HA s molekulskom masom većom od 500 kDa posjeduju antiangiogena svojstva te djeluju imunosupresivno (Snetkov i sur., 2020).

U procesu cijeljenja fetalnih rana primijećeno je kako je povišena koncentracija HA na oštećenom području zadržana dulje vrijeme (i do tri tjedna), za razliku od odraslog ozlijeđenog tkiva gdje njena koncentracija pada već nakon sedam dana. Takvo hijaluronom bogato okruženje omogućava cijeljenje fetalnih rana bez ožiljka (Longaker i sur., 1991). *In vitro* i *in vivo* istraživanja na miševima ukazala su na potencijal intradermalne primjene hidrogelova s hijaluronanom i njegovim sintetskim derivatima za cijeljenje rana (Hauck i sur., 2021; Thönes i sur., 2019).

Različiti proteini, zajednički nazvani hijaladherini, elektrostatskim interakcijama vežu HA (Stern i Maibach, 2008). Najpoznatiji hijaladherini jesu receptor za hijaluronom posredovanu mobilnost (RHAMM) i CD44 receptor. Obje molekule nakon vezanja HA posreduju u aktivaciji upalnog odgovora i migraciji stanica (Papakonstantinou i sur., 2012; Stern i Maibach, 2008; Nedvetzki i sur., 2004, Zhang i sur., 1995). HA ima i sposobnost vezanja agrekana (vrsta proteoglikana hrskavičnog tkiva), s kojima tvori makroagregate koji značajno stabiliziraju ekstracelularni matriks hrskavice (Hardingham i Muir, 1972).



### 1.1.3.1. Hijaluronska kiselina i koža

Koža se sastoji od epidermisa i dermisa, a ispod kože nalazi se potkožno tkivo (subkutis). Epidermis je, kao površinski sloj, u izravnom kontaktu s okolinom te se može podijeliti na nekoliko zasebnih slojeva. Počevši od najdonjeg, to su: bazalni sloj (*stratum basale*), nazubljeni sloj (*stratum spinosum*), zrnati sloj (*stratum granulosum*), svijetli sloj (*stratum lucidum*, prisutan samo u debljoj koži tabana i dlanova) te rožnati sloj (*stratum corneum*). U zrnatom sloju nalaze se keratohijalinska i lamelarna tjelešca koja, uz ostale komponente, sadrže keratin i lipide. Keratinociti u tom sloju polako odumiru, njihove organele propadaju da bi u konačnici nastali korneociti, tj. mrtve stanice rožnatog sloja. Korneociti, koji su ispunjeni keratinom i okruženi lipidnim matriksom, u rožnatom sloju formiraju vodootpornu barijeru. Takva organizacija omogućuje zadržavanje vode u donjim slojevima epidermisa, dok je istovremeno otežano prodiranje tvari iz okoline u epidermis. Keratinociti epidermisa proizvode HA te je ona u tom sloju kože smještena uglavnom ekstracelularno, u spinoznom i zrnatom predjelu (Stern i Maibach, 2008). Hijaluronat posjeduje veliki kapacitet vezanja vode (volumen HA vezanjem vode povećava se i do 1000 puta) te zbog toga ima ključnu ulogu u održavanju hidratacije kože.

Dermis se dijeli na gornji, papilarni sloj te donji, retikularni sloj. Sadržaj HA u dermisu značajno je veći od onog u epidermisu te je papilarni sloj bogatiji s HA od retikularnog sloja (Stern i Maibach, 2008). Fibroblasti dermisa sintetiziraju HA te ona zbog svoje specifične strukture i voluminoznosti u vodenom mediju ECM djeluje kao svojevrsno sito za selektivno propuštanje molekula u krvožilni i limfni sustav. Također je uključena u osmoregulaciju, mehaničku stabilizaciju kože te proces cijeljenja rana.

U literaturi su zabilježeni razni poremećaji kože povezani s promjenom u stvaranju i razgradnji HA. Juvenilna hijalina fibromatoza (JHF), rijetka autosomno recesivna bolest, očituje se papularnim i nodularnim kožnim lezijama, hiperplazijom gingive te deformacijom zglobova i kosti. Kod JHF značajno je smanjena ekspresija HAS-1 i HAS-3 enzima te je posljedično smanjeno stvaranje HA (Tzellos i sur., 2009a).

Topikalno primijenjeni glukokortikoidi gotovo potpuno suprimiraju ekspresiju HAS-2 enzima u dermisu. Zbog supresije enzima javlja se manjak HA u koži te ona kod dulje primjene

kortikosteroida atrofira, što bi dijelom moglo objasniti atrofiju kao nuspojavu uzrokovanu uporabom ovih lijekova (Stern i Maibach, 2008).

Atopijski dermatitis (AD), upalna bolest kože koja je karakterizirana svrbežom, kroničnim ili kronično recidivirajućim tijekom, također bilježi disregulaciju homeostaze HA. mRNA izoforme HAS-3 pojačano je eksprimirana kod AD. Niskomolekularna HA sintetizirana je u većim količinama te djeluje kao molekula povezana s oštećenjem tkiva (*Damage Associated Molecular Pattern*, DAMP) koja aktivira upalne procese. Fragmenti HA gomilaju se među keratinocitima epidermisa i na sebe navlače vodu što doprinosi nastanku karakteristične spongioze i edema prisutnog kod AD. S druge strane, visokomolekularna HA zadržava se u gornjim slojevima epidermisa, gdje zbog vezanja vode dodatno ometa integritet lipidne barijere. Matriks između korneocita tako postaje hidrofilniji od onog u zdravoj koži, što olakšava prodiranje alergena i drugih čestica kroz barijeru kože. Istovremeno je kod AD smanjena ekspresija hijaluronidaze Hyal-1 koja je bitna za održavanje optimalne količine HA u epidermisu. Kumulativni efekt svih navedenih pojava uvelike utječe na tijek AD i naglašava važnost održavanja homeostaze HA u koži (Evrard i sur., 2021).

## **1.2. Hijaluronidaza**

Duran – Reynals je u svojim istraživanjima 1928. godine otkrio da dodatak ekstrakta testisa u suspenziju inficiranog biološkog uzorka značajno ubrzava širenje i prodiranje infekta kroz biološki materijal. Odgovornu komponentu nazvao je faktorom širenja, odnosno T-faktorom (*testicular factor*), prema tkivu u kojem ga je prvobitno otkrio. Kasnije je istraživao utjecaj faktora širenja na prodiranje boja, bakterijskih toksina, otrova i drugih supstancija kroz tkivo te je zabilježio njegovu povećanu koncentraciju u neoplastičnim tkivima (Duran – Reynals, 1928. navedeno u radu Roca-Rosell i Glick, 1999.). Chaik i Duthie su 1939. utvrdili da je tzv. faktor širenja zapravo enzim hijaluronidaza koji razgrađuje hijaluronsku kiselinu.

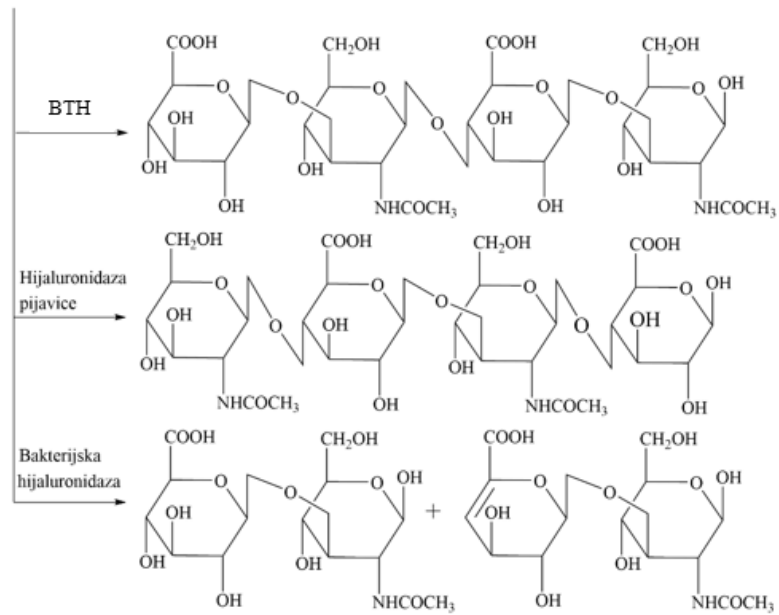
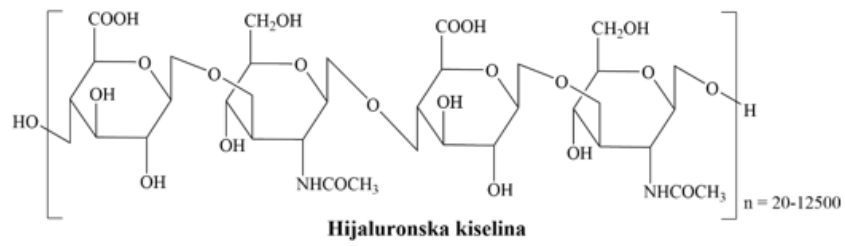
### 1.2.1. Klasifikacija hijaluronidaza

Mayer je 1971. hijaluronidaze podijelio u tri skupine, temeljeno na njihovom mehanizmu enzimskog djelovanja: hijaluronat 4-glikanohidrolaze (EC 3.2.1.35), hijaluronat 3-glikanohidrolaze (EC 3.2.1.36) i bakterijske hijaluronidaze nazvane hijaluronat liaze (EC 4.2.2.1). Ta se podjela zadržala do danas (Salmen, 2004).

**Hijaluronat 4-glikanohidrolaze** su enzimi koji kidaju  $\beta$ -1,4-glikozidnu vezu u polimeru hijaluronske kiseline (HA) što rezultira stvaranjem tetrasaharida kao glavnog produkta (Salmen, 2004). Enzimi ove skupine koji se najčešće spominju jesu hijaluronidaza iz pčelinjeg otrova, hijaluronidaza iz goveđih testisa (BTH), lizosomalna hijaluronidaza te ljudska hijaluronidaza.

**Hijaluronat 3-glikanohidrolaze** u HA kidaju  $\beta$ -1,3-glikozidnu vezu te je glavni produkt reakcije također tetrasaharid. Predstavnik ove skupine enzima jest hijaluronidaza pijavice.

**Hijaluronat liaze** u reakciji  $\beta$ -eliminacije razgrađuju HA na disaharidne fragmente i u strukturu šećera uvode dvostruku vezu. Glavni produkt reakcije je 2-acetamido-2-deoksi-3-O-( $\beta$ -D-gluko-4-enpiranoziluronska kiselina)-D-glukoza (Pritchard i sur., 2000; Kreil, 1995). Predstavnici ovih enzima su bakterijske hijaluronat liaze iz *S. pneumoniae* i *S. agalactiae* (Jedrzejcas i Chantalat, 2000; Pritchard i sur., 2000). Na Slici 3 prikazani su produkti razgradnje HA različitim tipovima hijaluronidaza (Salmen, 2004).



Slika 3. Produkti enzimske reakcije između različitih vrsta hijaluronidaza i hijaluronske kiseline. BTH: hijaluronidaza iz goveđih testisa.

### 1.3. List masline (*Oleae folium*)

Maslina (*Olea europaea* L., Oleaceae, Slika 4) od davnina je korištena u prehranbene, medicinske i kozmetičke svrhe. U narodnoj medicini mediteranskih zemalja prerađevine masline koriste se kao lijek za vrućicu, prehladu i malariju (Benavente-García i sur., 2000). Istraživanja su pokazala kako ekstrakt lista masline ima vazodilatatorno djelovanje te potencijalni hipotenzivni učinak (Zarzuelo i sur., 1991), djelovanje na HIV (Lee-Huang i sur., 2003), antiproliferativno i proapoptotično djelovanje (Han i sur., 2009) te hipolipemijski učinak (Jemai i sur., 2008).

Prema literaturnim podacima, flavonoidi i sekoiridoidi najzastupljenije su komponente ukupnog sadržaja polifenola u listu masline te su one najvećim dijelom odgovorne za navedene farmakološke učinke (Abaza i sur., 2015; Talhaoui i sur., 2015; Tsimidou i Papoti, 2010). Ostale sastavnice, prisutne u manjim količinama, jesu jednostavni fenoli (hidroksitirozol), fenolne kiseline i lignani. Od flavonoida zastupljeni su flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin), flavonoli (rutin) i flavan-3-oli (katehin) (Abaza i sur., 2015). Najzastupljeniji sekoiridoid u listu masline jest oleuropein (Talhaoui i sur., 2015; Benavente-García i sur., 2000). Brojna istraživanja ispituju i potvrđuju antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva, koji različitim mehanizmima neutraliziraju slobodne radikale kao uzročnike oksidativnog stresa i oštećenja stanica (Benavente-García i sur., 2000; Van Acker i sur., 1996; Morel i sur., 1993).

Nekoliko novijih istraživanja bavilo se, između ostalog, mjerenjem inhibicijskog potencijala ekstrakata masline i njezinih prerađevina za enzim hijaluronidazu (Cádiz-Gurrea i sur., 2021; Nunes i sur., 2021). Spojevi koji se u literaturi navode kao inhibitori hijaluronidaze jesu fenoli, poglavito iridoidi te flavoni apigenin i luteolin (Cádiz-Gurrea i sur., 2021; Melguizo-Rodríguez i sur., 2021; Jusri i sur., 2019; Kolayli i sur.; 2016; Muhit i sur., 2016; Bralley i sur., 2008). Ekstrakti lista masline, zahvaljujući oleuropeinu, pokazali su potencijal prevencije kroničnog oštećenja kože miševa uzrokovanog UV-B zračenjem (Mosleh i sur., 2016). Također je primjenom ekstrakata uočeno usporavanje napredovanja te cijeljenje hrskavičnih degeneracija u zečeva (Gong i sur., 2011), ubrzavanje cijeljenja rana i pospješivanje reepitelizacije u miševa (Mehraein i sur., 2014) te moguća korist u liječenju akni, ekcema i skleroderme (Mosleh i sur., 2016).



Slika 4. Grana masline s listovima i plodovima (preuzeto s Unsplash uz dopuštenje autora, autor Lucio Patone; <https://unsplash.com/license>).

#### 1.4. Starenje kože

Rastući interes znanosti za metabolizam i funkcije HA usmjeren je prema odgađanju starenja kože. U procesu starenja dolazi do značajnog smanjenja koncentracije HA u epidermisu, dok se u dermisu ona nastavlja stvarati. Zbog gubitka HA, epidermis postepeno gubi vodu i koža postaje dehidrirana. HA u dermisu ostarjele kože ima povećan afinitet za vezanje stanica i komponenata ECM što vodi do veće rigidnosti i smanjene fleksibilnosti kože te smanjene sposobnosti HA da veže vodu (Stern i Maibach, 2008). Tijekom prirodnog starenja dolazi i do povećane aktivnosti hijaluronidaza, čime se smanjuje koncentracija HA u koži te nastaju bore (Ndlovu i sur., 2013). Također je poznata činjenica da UV zračenje ubrzava proces starenja te tako pretjerano izlaganje suncu uzrokuje trajna oštećenja u epidermisu i dermisu (Bernstein i sur., 1996). Homeostaza HA narušena je u procesu fotostarenja te se ono, u vidu metabolizma hijaluronana, razlikuje od intrinzičnog starenja. HA koju u fotooštećenoj koži

uglavnom sintetizira HAS-3, ima smanjenu molekularnu masu u odnosu na HA u intrinzično ostarjeloj koži te se pojavljuje u fragmentima koji djeluju kao DAMP-ovi (Evrard i sur., 2021). Također je prisutna značajno smanjena ekspresija HAS-1 izoforme, CD44 receptora i

RHAMM receptora (Tzellos i sur., 2009b). Istraživanja na miševima pokazala su da čak i kratkotrajno izlaganje (5 minuta) nezaštićene kože UV zračenju izaziva blagu upalu i početno povećano gomilanje HA (Stern i Maibach, 2008). Za vrijeme ekstenzivnog i ponavljano izlaganja dolazi do smanjenja stvaranja HA. Povećana koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta, nastalih zbog izlaganja UV zračenju, dovodi do aktivacije hijaluronidaze te posljedično ubrzane razgradnje HA polimera u koži. Sve navedene promjene rezultiraju naglašenim stvaranjem bora i starenjem kože (Ndlovu i sur., 2013).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U farmaciji i dermatokozmetici sve je veći interes za hijaluronidazu i njezin supstrat, hijaluronsku kiselinu. Istraživanja ispituju potencijalnu korist od inhibicije hijaluronidaze, sa svrhom prevencije prijevremenog starenja kože, (Jusri i sur., 2019; Fayad i sur., 2017; Ndlovu i sur., 2013), postizanja hondroprotektivnog (Sumantran i sur., 2008), antiinflamatornog i antialergijskog djelovanja (Nishida i sur., 2014) te inhibicije širenja otrova u tkivu (Kemparaju i Girish, 2006; Girish i Kemparaju, 2005). Određeni biljni ekstrakti pokazuju antioksidativno djelovanje i biološke učinke poput inhibicije enzima.

Cilj ovog istraživanja bio je modificirati i prilagoditi metodu inhibicije hijaluronidaze laboratorijskim uvjetima te ispitati inhibitorni učinak ekstrakata lista masline na enzim hijaluronidazu.

Pretpostavke istraživačkog rada bile su da će odabrani uvjeti reakcijske smjese rezultirati stvaranjem optimalnog sustava za određivanje inhibitorne aktivnosti ekstrakata lista masline, te da će zbog svog fenolnog sadržaja, ekstrakt lista masline ostvariti određeni stupanj inhibicije hijaluronidaze. Optimizirana metoda ponudit će definirane uvjete u kojima se može određivati inhibicija hijaluronidaze s različitim ekstraktima i spojevima i na taj način pridonijeti budućim istraživanjima.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Biljni materijal**

Za ispitivanje su korišteni osušeni listovi masline (*Oleae folium*), vrste *Olea europaea* L., (*Oleaceae*), prikupljeni na otoku Ugljanu, Hrvatska (44°5'N, 15°10'E).

##### **3.1.2. Kemikalije**

U radu su korištene sljedeće kemikalije: destilirana voda, acetatni pufer (pH=3,6), hijaluronidaza (Sigma Aldrich, SAD), kalcij klorid (CaCl<sub>2</sub>), natrij hijaluronat (TCI, Japan), natrij hidroksid (NaOH), natrij tetraborat (Sigma Aldrich, SAD), p-dimetilaminobenzaldehid - DMAB (ThermoFischer GmbH, Njemačka), ledena octena kiselina (Gram-mol, Hrvatska), klorovodična kiselina (HCl; VMR International, Francuska).

##### **3.1.3. Uređaji**

U ispitivanjima su korišteni sljedeći uređaji: UV/Vis spektrofotometar (FLUOstar Omega; BMGLabtech, Njemačka), termo miješalica (Biosan, Latvija), grijač (Grant Instruments, Engleska), analitička vaga (Mettler Toledo, Švicarska), magnetna miješalica (2mag, Njemačka), ultrazvučna kupelj (Sonorex digital, Bandelin electronic, Njemačka).

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Optimizacija metode inhibicije hijaluronidaze**

Optimizacija metode inhibicije hijaluronidaze provedena je s pomoću UV/Vis spektrofotometra, po uzoru na literaturu, uz manje modifikacije (Salmen, 2004; Muckenschnabel i sur., 1998; Gacesa i sur., 1981; Reissig i sur., 1955). U jažice mikrotitarske pločice dodana je destilirana voda i puferirana otopina hijaluronidaze (pH=3,6) te je pločica stavljena na inkubaciju u inkubator s rotirajućom podlogom (80 rpm) na 20 minuta (37 °C). Nakon prve inkubacije, slijedila je aktivacija enzima dodatkom vodene otopine CaCl<sub>2</sub> (12,5 mM) i nova inkubacija od 20 minuta (37 °C). Zatim je u reakcijsku smjesu dodana puferirana otopina natrijevog hijaluronata (pH=3,6) i smjesa je inkubirana još 40 min, uz uključenu rotaciju podloge (250 rpm). Reakcija je zaustavljena promjenom pH dodatkom NaOH (0,9 M) i natrijevog tetraborata (0,2 M) i zagrijavanjem 3 minute na 100 °C. Nakon grijanja i hlađenja pločice na sobnoj temperaturi u smjesu je dodan DMAB reagens i pločica je inkubirana još 10 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, mjerena je apsorbancija na 585 nm. Tijekom eksperimenata mijenjani su omjeri volumena i koncentracija HA, hijaluronidaze i DMAB reagensa te su u konačnici odabrani optimalni i ponovljivi uvjeti, koji su primijenjeni i na ekstraktima.

#### **3.2.1.1. Ovisnost apsorbancije o koncentracijama hijaluronske kiseline i hijaluronidaze**

U jažice pločice dodano je 25 µL destilirane vode i različiti volumeni (20 µL i 40 µL) puferske otopine hijaluronidaze (c=6 mg/mL). Slijedila je prva inkubacija (20 min, 37 °C) nakon koje je dodano 40 µL otopine CaCl<sub>2</sub> (20 min, 37 °C). Potom je pipetirano 25 µL otopine HA u koncentracijskom nizu 0,6 – 12 mg/mL i smjesa je ponovno inkubirana (37 °C). Nakon 40 minuta reakcija je zaustavljena dodatkom 20 µL NaOH (0,9 M) i 40 µL natrijevog tetraborata (0,2 M) te zagrijavanjem na 100 °C 3 minute. Nakon hlađenja dodano je 50 µL 1 %-tne otopine DMAB-a. Apsorbancija je nakon 10 minuta inkubacije (37 °C) mjerena na 585 nm.

### **3.2.1.2. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1 %-tne otopine DMAB-a**

U sljedećem koraku protokol metode ostao je isti, promijenjen je volumen dodanog 1 %-tnog DMAB reagensa te koncentracije i volumeni otopina enzima i supstrata. Dodano je 20  $\mu\text{L}$  otopine hijaluronidaze ( $c = 6 \text{ mg/mL}$ ) i 25  $\mu\text{L}$  otopine HA ( $c = 5,12 - 11,91 \text{ mg/mL}$ ). U jažice je nakon hlađenja smjese dodano 50  $\mu\text{L}$  i 75  $\mu\text{L}$  1 %-tne otopine DMAB-a. Apsorbancija je nakon 10 minuta inkubacije (37 °C) mjerena na 585 nm.

### **3.2.1.3. Ovisnost apsorbancije različitim koncentracijama DMAB reagensa**

Uz nepromijenjeni postupak metode, izmijenjeni su volumeni i koncentracije dodanih otopina HA (50  $\mu\text{L}$ ,  $c=3,5 \text{ mg/mL}$ ) i hijaluronidaze (20  $\mu\text{L}$ ,  $c=4 \text{ mg/mL}$ ). Također je povećana koncentracija DMAB reagensa. U jažice je nakon hlađenja dodano 50  $\mu\text{L}$ , 75  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 125  $\mu\text{L}$  2,5 %-tne i 5 %-tne otopine DMAB-a. Apsorbancija je nakon 10 minuta inkubacije na 37 °C mjerena na 585 nm.

## **3.2.2. Ekstrakcija lista masline**

Osušeni biljni materijal usitnjen je s pomoću mlina za mljevenje. Prašak biljnog materijala pomiješan je s otapalom A, odnosno otapalom B. Ekstrakcija je provedena s pomoću ultrazvučne kupelji (ekstrakt A08U, snaga ekstrakcije 360 W) i magnetne miješalice (ekstrakti B08M i B042M, broj okretaja 300 rpm). Ultrazvučna ekstrakcija provedena je prema literaturnom propisu (Jakupović i sur., 2021). Opis sastava ekstrakata prikazan je u Tablici 1, a priprema je opisana u Tablici 2.

Tablica 1: Sastav ekstrakata.

Ekstrakt	Masa droge (g)	Otapalo	Udio sastavnica otapala	
			(% , m/m)	
B042M	0,42	B	PPG	28,8
			Destilirana voda	63,8
			Mliječna kiselina	7,4
B08M	0,8	B	PPG	28,8
			Destilirana voda	63,8
			Mliječna kiselina	7,4
A08U	0,8	A	PPG	10
			Destilirana voda	89
			Mliječna kiselina	1

Tablica 2: Priprema ekstrakata.

Ekstrakt	Temperatura (°C)	Trajanje	
		ekstrakcije (min)	Uređaj za ekstrakciju
B042M	25	20	Magnetna miješalica
B08M	25	20	Magnetna miješalica
A08U	25	20	Ultrazvučna kupelj

Ispitivanje inhibicije enzima hijaluronidaze rađeno je prema protokolu spektrofotometrijske metode. Na pločicu dodano je 25  $\mu$ L ekstrakta i 25  $\mu$ L destilirane vode te su uzorci serijski razrijeđeni. Zatim je dodano 20  $\mu$ L puferirane otopine hijaluronidaze ( $c=4$  mg/mL; pH=3,6). Smjesa je inkubirana 20 minuta pri 37 °C. Nakon prve inkubacije dodano je 40  $\mu$ L 12,5 mM CaCl<sub>2</sub> te je smjesa inkubirana još dodatnih 20 minuta pri 37 °C. Nakon druge inkubacije, u smjesu je dodano 50  $\mu$ L puferirane otopine natrijevog hijaluronata ( $c=3,5$  mg/mL; pH=3,6) te je smjesa inkubirana 40 minuta pri 37 °C na rotirajućoj podlozi. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 20  $\mu$ L 0,9 M NaOH i 40  $\mu$ L 0,2 M natrijevog tetraborata u reakcijsku smjesu, uz zagrijavanje 3 minute na 100 °C. Nakon zaustavljanja reakcije i hlađenja (5 minuta), dodano je 130  $\mu$ L 5 %-tnog DMAB-a (0,25 g DMAB-a otopi se u 4,4 mL ledene octene kiseline i 0,6 mL 10 M HCl) i reakcijska smjesa inkubirana je još 10 minuta, pri 37 °C. Apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 585 nm. Kao pozitivna kontrola korištena je taninska kiselina ( $c=0,5$  mg/mL). Inhibicija enzima hijaluronidaze (HYAL Inh (%)) iskazana je jednadžbom (Ahmed i sur., 2020):

$$HYAL\ Inh\ (\%) = \frac{A_{kontrola} - A_E}{A_{kontrola}} \times 100 \quad (3-1)$$

3-1:  $A_{kontrola}$  je apsorbancija negativne kontrole,  $A_E$  je apsorbancija ispitivane reakcijske otopine ekstrakta/taninske kiseline/otapala. Rezultat je izražen kao koncentracija dodanog uzorka koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju enzima, odnosno kao IC<sub>50</sub>.

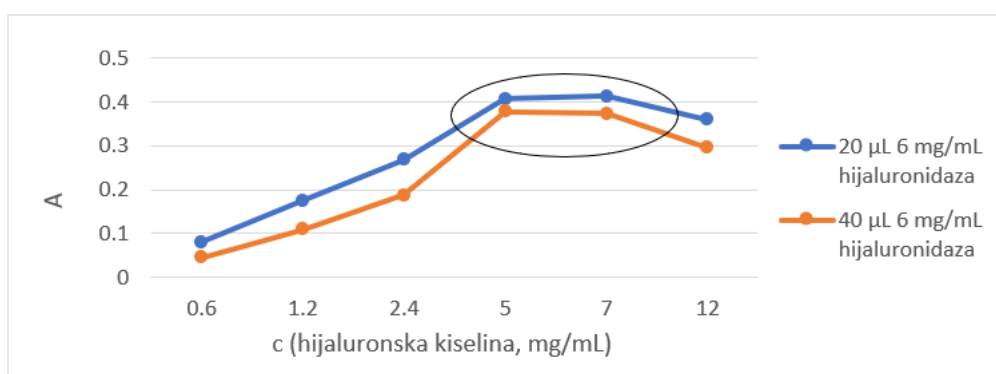
### 3.2.3. Statistička obrada podataka

Sva ispitivanja na ekstraktima provedena su u triplikatu. Dobiveni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel (Microsoft, USA), a rezultati su iskazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Analiza statističke značajnosti rezultata rađena je u programu GraphPad Prisma 8.0 te su korišteni Tuckeyev t-test i Anova metoda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Ovisnost apsorbancije o koncentracijama hijaluronske kiseline i hijaluronidaze

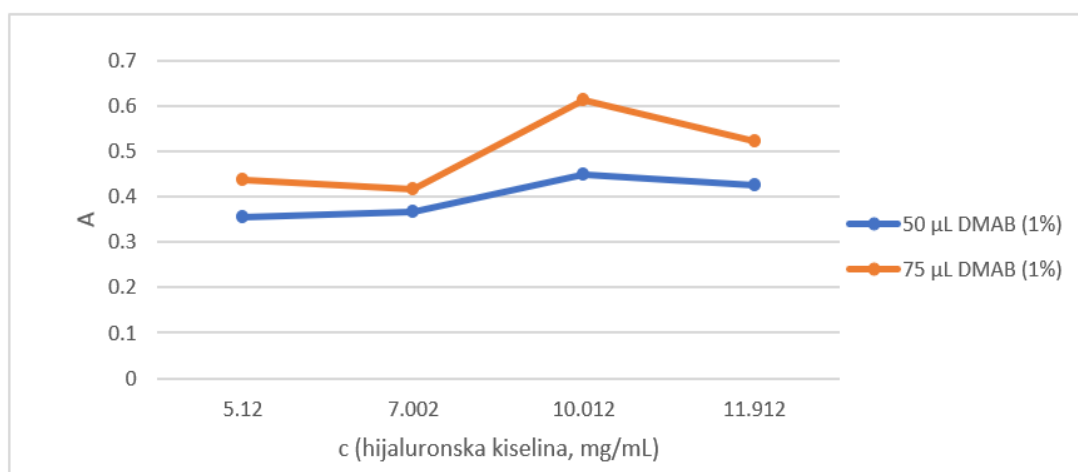
U prvom koraku ispitivanja promatrana je ovisnost apsorbancije o promjeni koncentracija hijaluronske kiseline i hijaluronidaze. Povećanjem koncentracije hijaluronske kiseline, bez obzira na koncentraciju enzima, dolazilo je do povećanja apsorbancije. Maksimalna apsorbancija koja je dobivena ovisila je o količini DMAB reagensa koji se vezao za kromogen III (nastao u reakciji iz *N*-acetilglukozamina) i stvarao obojeni produkt. Prestanak rasta apsorbancije (plato), uz povećanje koncentracije hijaluronske kiseline pokazuje kako količina reagensa bitno utječe na stvaranje obojenog produkta i posljedično veću maksimalnu apsorbanciju pri određenim koncentracijama enzima i supstrata (Slika 5).



Slika 5. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji otopine hijaluronske kiseline i dva različita volumena hijaluronidaze (crnim obročem označen je plato).

#### 4.2. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1%-tne otopine DMAB-a

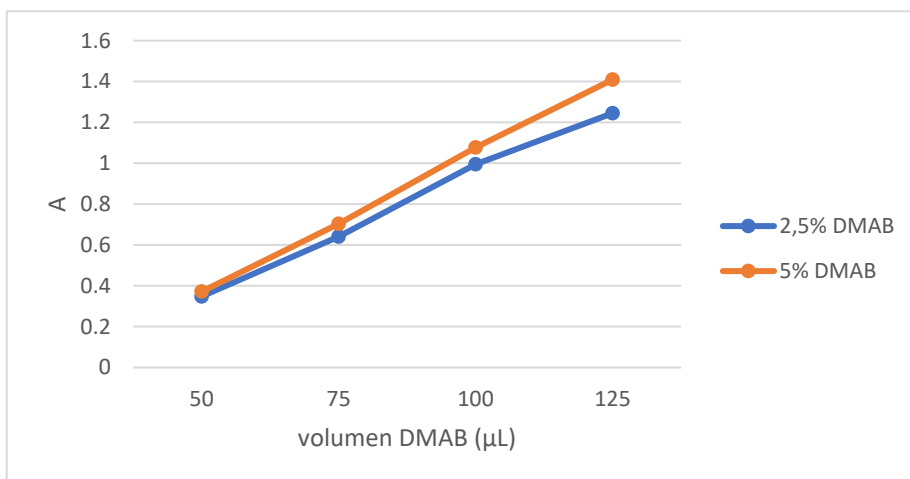
U drugom koraku ispitivanja promatrana je ovisnost apsorbancije o porastu koncentracije hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1 %-tne otopine DMAB-a (Slika 6). Povećanjem volumena otopine reagensa došlo je do povećanja apsorbancije, no zbog niske koncentracije DMAB-a nije postignut značajniji porast (ciljna vrijednost  $A \approx 1$  odabrana zbog jednostavnijeg računanja).



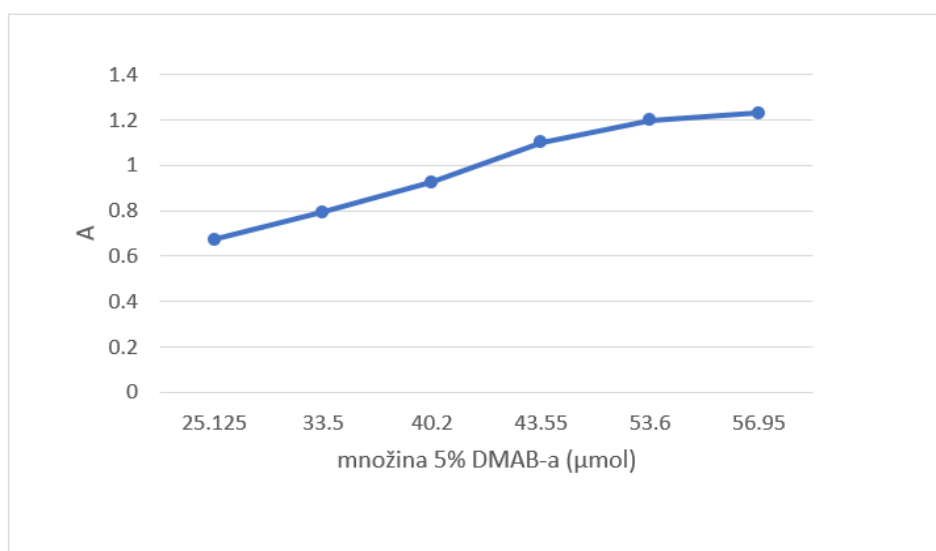
Slika 6. Ovisnost apsorbancije o različitim koncentracijama hijaluronske kiseline i različitim volumenima 1 %-tne otopine DMAB-a.

#### 4.3. Ovisnost apsorbancije različitim koncentracijama DMAB reagensa

U nastavku eksperimenta, povećane su koncentracije DMAB reagensa, kako bi se vrijednosti apsorbancija smjese dodatno povisile (Slika 7). Time je postignuto potrebno povećanje množine reagensa te je pri istim volumenima dodanog DMAB-a, apsorbancija smjese veća s dodatkom koncentriranije otopine reagensa. Grafički je prikazana ovisnost apsorbancije o množini dodanog 5 %-tnog DMAB-a (Slika 8) te je vidljivo kako se linearnost postepeno gubi pri množinama reagensa većim od 43,55 µmol (pri volumenu od 130 µL). Do platoa dolazi zbog povezivanja ukupno nastalog kromogena III s DMAB-om pa s daljnjim povećanjem volumena, reagens ostaje u suvišku i apsorbancija više ne raste.



Slika 7. Ovisnost apsorbancije o različitim volumenima i koncentracijama otopine DMAB-a.



Slika 8. Ovisnost apsorbancije o množini 5 %-tnog DMAB-a dodanog u reakcijsku smjesu; 4 mg/mL hijaluronidaza, 3,5 mg/mL hijaluronska kiselina.



#### **4.4. Određivanje optimalnih uvjeta metode**

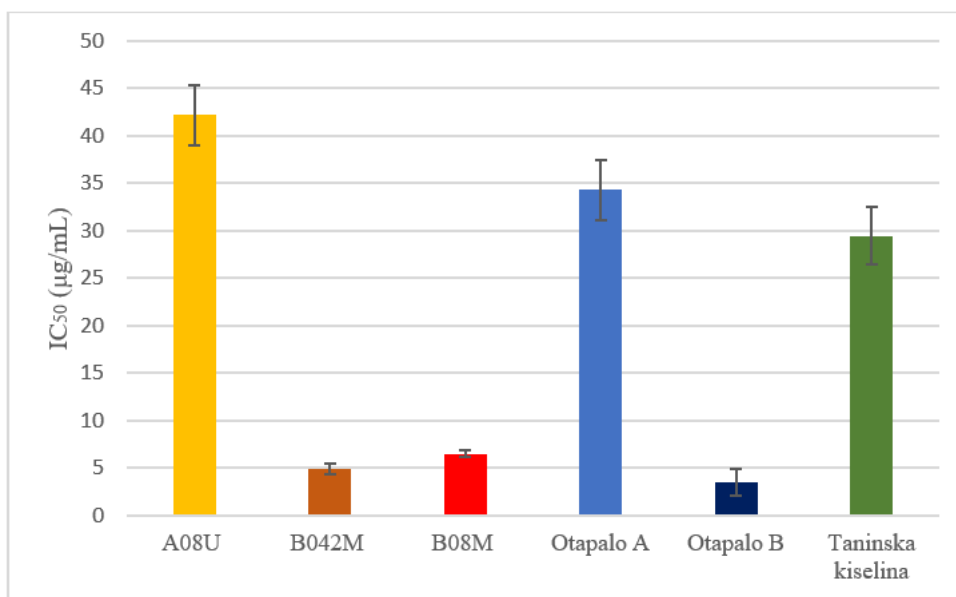
Nakon što su uzeti u obzir svi navedeni rezultati, odabrani su reakcijski uvjeti kojima je ostvarena željena vrijednost apsorbancije, s reagensom kao reaktantom u suvišku. Eksperimenti su pokazali da varijacije u koncentraciji i volumenu otopine DMAB-a imaju najveći utjecaj na krajnju apsorbanciju reakcijske smjese. Odabrana je koncentracija otopine DMAB-a od 5 %, volumena 130  $\mu\text{L}$ . Množina reagensa u tim uvjetima iznosila je 43,55  $\mu\text{mol}$ , dok je apsorbancija iznosila 1,1 (Slika 8). Koncentracija enzima koja se pokazala optimalnom iznosila je 4 mg/mL s volumenom otopine 20  $\mu\text{L}$ , uz otopinu HA koncentracije 3,5 mg/mL i volumena 50  $\mu\text{L}$ . Navedeni uvjeti primijenjeni su na ekstraktima lista masline.

#### **4.5. Primjena metode inhibicije hijaluronidaze na ekstraktima lista masline**

U radu s ekstraktima primijenjena je optimizirana metoda inhibicije hijaluronidaze. Nakon mjerenja apsorbancije izračunata je  $\text{IC}_{50}$  vrijednost za navedene dodatke te su rezultati prikazani u Tablici 3. Manja  $\text{IC}_{50}$  vrijednost označava snažniju inhibiciju enzima. Ekstrakti pokazuju  $\text{IC}_{50}$  od  $42,23 \pm 3,18$ ,  $4,91 \pm 0,56$  i  $6,5 \pm 0,37$   $\mu\text{g/mL}$ , redom kojim su navedeni u Tablici 3, stoga je vidljivo kako među ekstraktima B042M najjače inhibira enzim ( $\text{IC}_{50}=4,91 \pm 0,56$   $\mu\text{g/mL}$ ). Od svih ispitivanih uzoraka, najveću inhibiciju pokazuje otapalo B ( $\text{IC}_{50}=3,47 \pm 1,45$   $\mu\text{g/mL}$ ), a najmanju ekstrakt A08U ( $42,23 \pm 3,18$   $\mu\text{g/mL}$ ).  $\text{IC}_{50}$  vrijednost za taninsku kiselinu iznosila je  $29,45 \pm 3,03$   $\mu\text{g/mL}$ , što ukazuje na slabiju inhibiciju od otapala B te od ekstrakata B08M i B042M (Slika 9).

Tablica 3: IC<sub>50</sub> vrijednosti za ekstrakte lista masline, pozitivnu kontrolu (taninska kiselina) i otapala.

Dodatak reakcijskoj smjesi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
A08U ekstrakt	42,23 ± 3,18
B042M ekstrakt	4,91 ± 0,56
B08M ekstrakt	6,5 ± 0,37
Otapalo A	34,31 ± 3,16
Otapalo B	3,47 ± 1,45
Taninska kiselina	29,45 ± 3,03



Slika 9. Prikaz IC<sub>50</sub> vrijednosti dobivenih za ekstrakte, otapala i taninsku kiselinu.

## 5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog eksperimentalnog rada, ostvaren je cilj istraživanja, odnosno metoda inhibicije hijaluronidaze je modificirana i prilagođena laboratorijskim uvjetima te je ispitan inhibitorski učinak ekstrakata lista masline na enzim hijaluronidazu.

U procesu optimizacije metode inhibicije hijaluronidaze, reagens DMAB pokazao se kao najutjecajnija komponenta reakcijske smjese. Odabrane vrijednosti volumena i koncentracije DMAB-a jesu 130  $\mu\text{L}$  5 %-tne otopine reagensa. Koncentracija hijaluronidaze koja se pokazala optimalnom iznosila je 4 mg/mL s volumenom otopine 20  $\mu\text{L}$ , a koncentracija hijaluronske kiseline 3,5 mg/mL, volumena otopine 50  $\mu\text{L}$ . Potvrđena je pretpostavka rada koja je zahtijevala stvaranje reakcijskog sustava pomoću kojega će biti moguće odrediti inhibitorsku aktivnost ekstrakata lista masline te pretpostavka da će ekstrakti lista masline ostvariti određenu razinu inhibicije hijaluronidaze. Inhibicijom se ističe ekstrakt B042M, s  $\text{IC}_{50}$  vrijednošću od  $4,91 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti uzoraka dobivenih ekstrakcijom s otapalom B manje su od onih izmjerenih za A-ekstrakte, odnosno inhibicija enzima B-ekstraktima je jača. Najvećim dijelom inhibitorski se učinak ekstrakata može pripisati djelovanju samih otapala čije su  $\text{IC}_{50}$  vrijednosti bliske onima izračunatima za pripadajuće ekstrakte. Prema podacima iz literature, određeni stupanj inhibicije koju su ostvarili ekstrakti rezultat je prisutnosti polifenola u sastavu lista masline, osobito luteolina i apigenina. Otapalo B pokazalo je najjaču inhibiciju u odnosu na sve korištene ekstrakte i otapala ( $\text{IC}_{50} = 3,47 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$ ). Pozitivna kontrola, taninska kiselina, pokazala je slabiju inhibiciju enzima u usporedbi s otapalom B. Rezultate inhibitorskog učinka ekstrakata i taninske kiseline nije moguće usporediti s literaturnim podacima jer se uvjeti reakcije razlikuju i korištena su otapala drugačijeg sastava te je za usporedbu potrebno provesti dodatna istraživanja.

## 6. LITERATURA

Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M., 2015. Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants* 4, 682–698.

Ahmed, M.H., Aldesouki, H.M., Badria, F.A., 2020. Effect of phenolic compounds from the rind of *Punica granatum* on the activity of three metabolism-related enzymes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 67, 960–972.

Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 68, 457–462.

Bernstein, E.F., Underhill, C.B., Hahn, P.J., Brown, D.B., Uitto, J., 1996. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br. J. Dermatol.* 135, 255–262.

Bralley, E., Greenspan, P., Hargrove, J.L., Hartle, D.K., 2008. Inhibition of Hyaluronidase Activity by Select Sorghum Brans. *J. Med. Food* 11, 307–312.

Cádiz-Gurrea, M. de la L., Pinto, D., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F., 2021. Olive Fruit and Leaf Wastes as Bioactive Ingredients for Cosmetics—A Preliminary Study. *Antioxidants* 10, 245.

Chaik, E., Duthie, E.S., 1939. A Mucolytic Enzyme in Testis Extracts. *Nature* 144, 977–978.

Evrard, C., Lambert de Rouvroit, C., Poumay, Y., 2021. Epidermal Hyaluronan in Barrier Alteration-Related Disease. *Cells* 10, 3096.

Fayad, S., Nehmé, R., Tannoury, M., Lesellier, E., Pichon, C., Morin, P., 2017. Macroalga *Padina pavonica* water extracts obtained by pressurized liquid extraction and microwave-assisted extraction inhibit hyaluronidase activity as shown by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1497, 19–27.

Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* 242, 27–33.

Gacesa, P., Savitsky, M.J., Dodgson, K.S., Olavesen, A.H., 1981. A recommended procedure for the estimation of bovine testicular hyaluronidase in the presence of human serum. *Anal. Biochem.* 118, 76–84.

Girish, K.S., Kemparaju, K., 2005. Inhibition of *Naja naja* Venom Hyaluronidase by Plant-Derived Bioactive Components and Polysaccharides. *Biochem. Mosc.* 70, 948–952.

Gong, D., Geng, C., Jiang, L., Wang, L., Yoshimuram, H., Zhong, L., 2011. Olive leaf extract facilitates healing of experimental cartilaginous injuries in rabbits. *J Med Food* 14, 268–275.

Han, J., Talorete, T.P.N., Yamada, P., Isoda, H., 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45–53.

Hardingham, T.E., Muir, H., 1972. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* 279, 401–405.

Hauck, S., Zager, P., Halfter, N., Wandel, E., Torregrossa, M., Kakpenova, A., Rother, S., Ordieres, M., Räthel, S., Berg, A., Möller, S., Schnabelrauch, M., Simon, J.C., Hintze, V., Franz, S., 2021. Collagen/hyaluronan based hydrogels releasing sulfated hyaluronan improve dermal wound healing in diabetic mice via reducing inflammatory macrophage activity. *Bioact. Mater.* 6, 4342–4359.

Jedrzejewski, M.J., Chantalat, L., 2000. Structural studies of streptococcus agalactiae hyaluronate lyase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 460–463.

Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H., Sayadi, S., 2008. Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2630–2636.

Jusri, R., Widodo, W.S., Widowati, W., Armansyah, A., Sormin, D.E., Fachrial, E., Lister, I.N.E., 2019. Comparison of Antioxidant and Anti-hyaluronidase Potentials of Pineapple Core Extract (*Ananas comosus* (L.) Merr.) and Luteolin. *Maj. Kedokt. Bdg.* 51, 63–69.

Kemparaju, K., Girish, K.S., 2006. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* 24, 7–12.

Kolayli, S., Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O., Sahin, K., 2016. Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31, 599–602.

Kreil, G., 1995. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 4, 1666–1669.

Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, Philip Lin, Chang, Y.-T., Huang, Paul L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 1029–1037.

Longaker, M.T., Chiu, E.S., Adzick, N.S., Stern, M., Harrison, M.R., Stern, R., 1991. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann. Surg.* 213, 292–296.

Mehraein, F., Sarbishegi, M., Aslani, A., 2014. Evaluation of Effect of Oleuropein on Skin Wound Healing in Aged Male Balb/c Mice. *Cell J* 16, 25–30.

Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montesa, R., Costela-Ruiz, V.J., García-Martínez, O., 2021. Potential Effects of Phenolic Compounds That Can Be Found in Olive Oil on Wound Healing. *Foods* 10, 1642.

Meyer, K., Palmer, J.W., 1934. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. *J. Biol. Chem.* 107, 629–634.

Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., Cillard, J., 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* 45, 13–19.

Mosleh, G., Mohagheghzadeh, A., Faridi, P., 2016. Olive Leaf: From Tradition to Clinic. *Trends in Pharmaceutical Sciences* 2, 241–252.

Muckenschnabel, I., Bernhardt, G., Spruss, T., Dietl, B., Buschauer, A., 1998. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan–Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Lett.* 131, 13–20.

Muhit, Md.A., Izumikawa, M., Umehara, K., Noguchi, H., 2016. Phenolic constituents of the Bangladeshi medicinal plant *Pothos scandens* and their anti-estrogenic, hyaluronidase inhibition, and histamine release inhibitory activities. *Phytochemistry* 121, 30–37.

Ndlovu, G., Fouche, G., Tselanyane, M., Cordier, W., Steenkamp, V., 2013. In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13, 304.

Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., Reich, R., Williams, R.O., Thurmond, R.L., Huang, J.-F., Neudecker, B.A., Wang, F.-S., Turley, E.A., Naor, D., 2004. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18081–18086.

Nishida, Y., Sugahara, S., Wada, K., Toyohisa, D., Tanaka, T., Ono, M., Yasuda, S., 2014. Inhibitory effects of the ethyl acetate extract from bulbs of *Scilla scilloides* on lipoxygenase and hyaluronidase activities. *Pharm. Biol.* 52, 1351–1357.

Nunes, A., Gonçalves, L., Marto, J., Martins, A.M., Silva, A.N., Pinto, P., Martins, M., Fraga, C., Ribeiro, H.M., 2021. Investigations of Olive Oil Industry By-Products Extracts with Potential Skin Benefits in Topical Formulations. *Pharmaceutics* 13, 465.

Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G., 2012. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* 4, 253–258.



Pritchard, D.G., Trent, J.O., Li, X., Zhang, P., Egan, M.L., Baker, J.R., 2000. Characterization of the active site of group B streptococcal hyaluronan lyase. *Proteins* 40, 126–134.

Reissig, J.L., Storminger, J.L., Leloir, L.F., 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217, 959–966.

Roca-Rosell, A., Glick, T., 1999. Francesc Duran Reynals (Barcelona, 1899New Haven, USA, 1958) : Virus and cancer: a controversial theory.

Salmen, S., 2004. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase - Synthesis and structure-activity relationships (phd).

Scott, J.E., 1989. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Found. Symp.* 143, 6–15; discussion 15-20, 281–285.

Snetkov, P., Zakharova, K., Morozkina, S., Olekhovich, R., Uspenskaya, M., 2020. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers* 12, 1800.

Stern, R., Maibach, H.I., 2008. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clinics in Dermatology* 26, 106–122.

Sumantran, V.N., Kulkarni, A., Chandwaskar, R., Harsulkar, A., Patwardhan, B., Chopra, A., Wagh, U.V., 2008. Chondroprotective Potential of Fruit Extracts of *Phyllanthus emblica* in Osteoarthritis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 5, 329–335.

Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2015. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res. Int.*, **FOOD BIOACTIVE COMPOUNDS: QUALITY CONTROL AND BIOACTIVITY** 77, 92–108.

Thönes, S., Rother, S., Wippold, T., Blaszkiewicz, J., Kanagasabai, B., Möller, S., Ruiz-Gómez, G., Schnabelrauch, M., Scharnweber, D., Saalbach, A., Rademann, J., Pisabarro, M.T., Hintze, V., Anderegg, U., 2019. Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of Heparin-Binding EGF-like growth factor. *Acta Biomater.* 86.

Tsimidou, M.Z., Papoti, V.T., 2010. Chapter 39 - Bioactive Ingredients in Olive Leaves, in: Preedy, V.R., Watson, R.R. (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego, pp. 349–356.

Tzellos, Thrasivoulos G., Dionyssopoulos, A., Klagas, I., Karakiulakis, G., Lazaridis, L., Papakonstantinou, E., 2009a. Differential glycosaminoglycan expression and hyaluronan homeostasis in juvenile hyaline fibromatosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61, 629–638.

Tzellos, T. G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Kyrgidis, A., Karakiulakis, G., Zouboulis, C.C., Papakonstantinou, E., 2009b. Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp. Dermatol.* 18, 1028–1035.

Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 331–342.

Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., González, M., Utrilla, M.P., 1991. Vasodilator Effect of Olive Leaf. *Planta Med.* 57, 417–419.

Zhang, L., Underhill, C.B., Chen, L., 1995. Hyaluronan on the Surface of Tumor Cells Is Correlated with Metastatic Behavior<sup>1</sup>. *Cancer Res.* 55, 428–433.

## 7. SAŽETAK

Hijaluronska kiselina jedna je od esencijalnih komponenata tkiva koja sudjeluje u održavanju hidratacije, međustaničnoj komunikaciji i djeluje kao fiziološki lubrikant. Hijaluronidaza, kao enzim koji razgrađuje hijaluronsku kiselinu, sve više je u fokusu znanstvenih istraživanja u svrhu prevencije preuranjenog starenja kože i usporavanja progresije pojedinih bolesti. Cilj ovog diplomskog rada bila je optimizacija spektrofotometrijske metode inhibicije hijaluronidaze i njezina primjena na ekstraktima lista masline. U eksperimentima je korištena hijaluronidaza iz goveđih testisa i natrijeva sol hijaluronske kiseline. Metoda je prilagođena laboratorijskim uvjetima i primijenjena na ekstraktima lista masline te je ispitan njihov inhibicijski potencijal za enzim hijaluronidazu. Pozitivna kontrola bila je taninska kiselina, no najniži  $IC_{50}$ , odnosno ukupno najjaču inhibiciju ostvarilo je otapalo B ( $IC_{50}=3,47 \pm 1,45$   $\mu\text{g/mL}$ ; sastav: 28,8% PPG, 63,8% destilirana voda, 7,4% mliječna kiselina). Najsnažniju inhibiciju među ekstraktima pokazao je uzorak B042M, s  $IC_{50}$  vrijednošću od  $4,91 \pm 0,56$   $\mu\text{g/mL}$ .  $IC_{50}$  vrijednosti čistih otapala (A i B) usporedive su s  $IC_{50}$  vrijednostima dobivenima za ekstrakte priređene s pripadajućim otapalima, stoga se može zaključiti kako sama otapala najviše utječu na izmjerenu inhibiciju. Za potvrdu i točnije definiranje inhibicijskog učinka sastavnica iz lista masline potrebno je provesti dodatna istraživanja.

## SUMMARY

Hyaluronic acid is an essential component of tissues and some of its roles are retaining hydration, intercellular communication, and lubrication. Hyaluronidase, as an enzyme that degrades hyaluronic acid, attracts the attention of researchers who study premature skin aging and different diseases connected to disbalanced hyaluronan homeostasis. The goal of this diploma thesis is to optimize the spectrophotometric method for determining hyaluronidase inhibition. Bovine testicular hyaluronidase was the experimental enzyme and sodium hyaluronate was its substrate. The method has been adjusted to laboratory requirements and was used for measuring hyaluronidase - inhibiting potential of olive leaf extracts. Tannic acid was used as positive control, but the lowest  $IC_{50}$  and overall strongest inhibition was exhibited by solvent B ( $IC_{50}=3,47 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$ ; composition: 28,8% PPG, 63,8% purified water, 7,4% lactic acid). Sample B042M exhibited the strongest inhibition of all extracts, with  $IC_{50}$  of  $4,91 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ .  $IC_{50}$  values of pure solvents (A and B) are comparable to the values measured for the extracts. This result indicates that the solvents alone act as strong inhibitors of the hyaluronidase enzyme. For exact determination of inhibition by olive leaf extracts, more research needs to be done.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Farmakognoziju  
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

# Optimizacija i primjena metode inhibicije hijaluronidaze za određivanje učinka lista masline (*Olea europaea*, L.)

Ana Kadi

## SAŽETAK

Hijaluronska kiselina jedna je od esencijalnih komponenata tkiva koja sudjeluje u održavanju hidratacije, međustaničnoj komunikaciji i djeluje kao fiziološki lubrikant. Hijaluronidaza, kao enzim koji razgrađuje hijaluronsku kiselinu, sve više je u fokusu znanstvenih istraživanja u svrhu prevencije preuranjenog starenja kože i usporavanja progresije pojedinih bolesti. Cilj ovog diplomskog rada bila je optimizacija spektrofotometrijske metode inhibicije hijaluronidaze i njezina primjena na ekstraktima lista masline. U eksperimentima je korištena hijaluronidaza iz goveđih testisa i natrijeva sol hijaluronske kiseline. Metoda je prilagođena laboratorijskim uvjetima i primijenjena na ekstraktima lista masline te je ispitan njihov inhibicijski potencijal za enzim hijaluronidazu. Pozitivna kontrola bila je taninska kiselina, no najniži  $IC_{50}$ , odnosno ukupno najjaču inhibiciju ostvarilo je otapalo B ( $IC_{50}=3,47 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$ ; sastav: 28,8% PPG, 63,8% destilirana voda, 7,4% mliječna kiselina). Najsnažniju inhibiciju među ekstraktima pokazao je uzorak B042M, s  $IC_{50}$  vrijednošću od  $4,91 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ .  $IC_{50}$  vrijednosti čistih otapala (A i B) usporedive su s  $IC_{50}$  vrijednostima dobivenima za ekstrakte priređene s pripadajućim otapalima, stoga se može zaključiti kako sama otapala najviše utječu na izmjerenu inhibiciju. Za potvrdu i točnije definiranje inhibicijskog učinka sastavnica iz lista masline potrebno je provesti dodatna istraživanja

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 9 grafičkih prikaza, 3 tablice i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hijaluronidaza, hijaluronska kiselina, list masline, inhibicija

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmacognosy  
Independent course (name of the course)  
Marulić Square 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# Optimization of hyaluronidase inhibition method and determination of inhibition by olive leaf extracts (*Olea europaea*, L.)

Ana Kadi

## SUMMARY

Hyaluronic acid is an essential component of tissues and some of its roles are retaining hydration, intercellular communication, and lubrication. Hyaluronidase, as an enzyme that degrades hyaluronic acid, attracts the attention of researchers who study premature skin aging and different diseases connected to disbalanced hyaluronan homeostasis. The goal of this diploma thesis is to optimize the spectrophotometric method for determining hyaluronidase inhibition. Bovine testicular hyaluronidase was the experimental enzyme and sodium hyaluronate was its substrate. The method has been adjusted to laboratory requirements and was used for measuring hyaluronidase - inhibiting potential of olive leaf extracts. Tannic acid was used as positive control, but the lowest IC<sub>50</sub> and overall strongest inhibition was exhibited by solvent B (IC<sub>50</sub>=3,47 ± 1,45 µg/mL; 28,8% PPG, 63,8% purified water, 7,4% lactic acid). Sample B042M exhibited the strongest inhibition of all the extracts, with IC<sub>50</sub> of 4.91 ± 0.56 µg/mL. IC<sub>50</sub> values of pure solvents (A and B) is comparable to the values measured for the extracts. This result indicates that the solvents alone act as strong inhibitors of the hyaluronidase enzyme. For exact defining of inhibition by olive leaf extracts, more research needs to be done.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 9 figures, 3 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hyaluronidase, hyaluronic acid, olive leaf extract, inhibition

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2022.