



Univerzitet u Tuzli
Bosna i Hercegovina



Inhibicija enzima tirozinaze i *in vivo* ispitivanje indeksa melanina kozmetičkih emulzija izrađenih sa kojičnom kiselinom, niacinamidom i ekstraktima odabranih biljaka

Dr. sci. Merima Ibišević, docent
FARMACEUTSKI FAKULTET

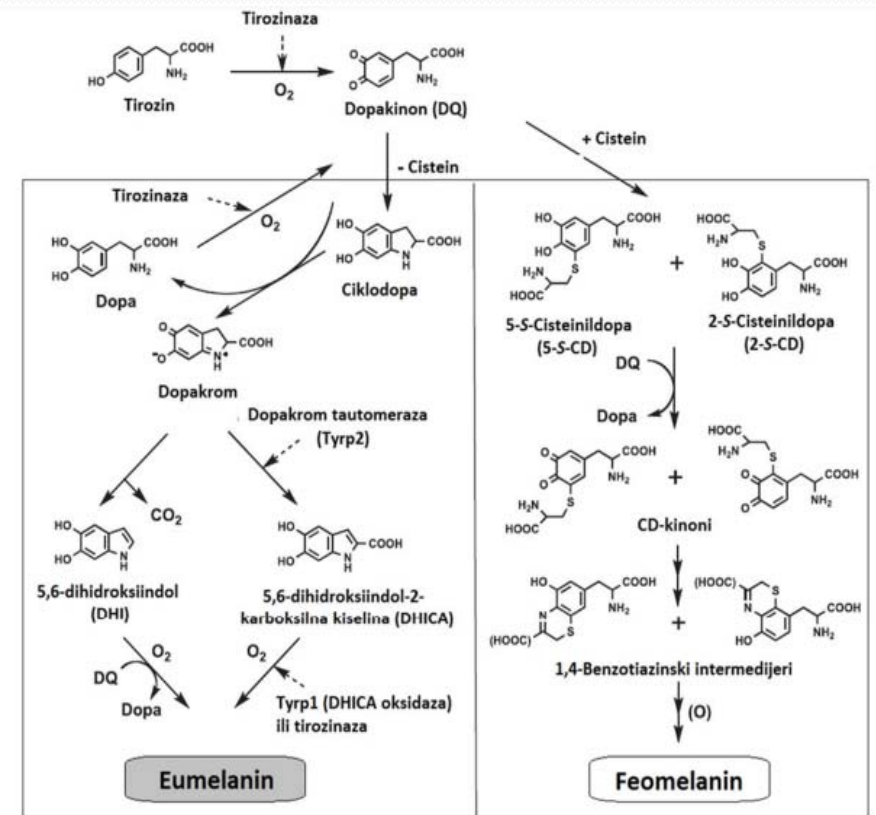
**NAUČNO-ISTRAŽIVAČKI PROJEKAT ODOBREN PO
KONKURSU FMON BiH ZA 2023. GODINU**

Predmet istraživanja

- Hiperpigmentacija je poremećaj kože koji nastaje usljed povećane proizvodnje melanina.
- Pojavljuje se u obliku tamnih mrlja i čini ten neujednačenim. Pigmentacijske mrlje, kao što su staračke mrlje (poznate kao i mrlje od sunca), manifestuju se najčešće na dlanovima, licu i rukama.



- Hidrokinon se smatra zlatnim standardom za liječenje hiperpigmentacije, ali u pogledu njegove dugoročne upotrebe moguć je i njegov citotoksični efekat.
- Tokom posljednje decenije izvedeni su brojni slučajevi i studije koje ističu upotrebu proizvoda kao što su cink, arbutin, kojična kiselina, spojevi vitamina C i ekstrakti zelenog čaja, kao novije terapije za liječenje bolesnika s melazmom.
- Enzim tirozinaza je odgovoran za sintezu melanina koji je ključan faktor hiperpigmentacije.



- Kroz istraživanje bazirat ćemo se na formulacijama kozmetičkih emulzija, koje će u svom sastavu kao aktivne komponente sadržavati kojičnu kiselinu, niacinamid kao i biljne ekstrakte odabranih biljnih vrsta koje bi mogle pozitivno djelovati u tretmanu hiperpigmentacija poput *Vitis vinifera*, *Apium graveolens*, *Morus alba*, te će se uporediti inhibitorna aktivnost na enzim tirozinazu između korištenih komponenata.



Niacinamide (Vit B3)



Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj je formulirati stabilnu kozmetičku emulziju koja će imati inhibitorno dejstvo na enzim tirozinazu, a ujedno pokazati i efikasnost na hiperpigmentacijskim mrljama kod dobrovoljaca.

Osnovni cilj proizilazi iz više pojedinačnih ciljeva kao što su:

- Određivanje antioksidativne aktivnosti kojične kiseline, niacinamida i ekstrakata odabranih biljaka
- Određivanje antimikrobne aktivnosti kojične kiseline, niacinamida i ekstrakata odabranih biljaka

Ciljevi istraživanja

- Određivanje sposobnosti inhibicije enzima tirozinaze za kojičnu kiselinu, niacinamid i biljne ekstrakte
- Razvoj formulacija kozmetičkih emulzija sa navedenim aktivnim komponentama, karakterizacija i ispitivanje fizičke stabilnosti
- *In vivo* ispitivanje melanin indeksa na koži dobrovoljaca nakon aplikacije izrađenih formulacija (uz informirani pristanak i odobrenje Etičkog komiteta)

Hipoteze

- H1: Kojična kiselina i niacinamid posjeduju inhibitorne osobine na enzim tirozinazu koji je odgovoran za sintezu melanina
- H2: Biljni ekstrakti odabranih biljaka imaju potencijalno inhibitorno dejstvo na enzim tirozinazu
- H3: Formulacije kozmetičkih emulzija sa kojičnom kiselinom, niacinamidom i biljnim ekstraktima odabranih biljaka smanjuju indeks melanina

Metode istraživanja

Metode pripreme biljnih ekstrakata

- Priprema biljnih ekstrakata od odabranih biljaka (*Vitis vinifera*, *Morus alba*, *Apium graveolens* ili drugih) vršit će se metodama ekstrakcije biljnog materijala.
- Ova aktivnost podrazumijeva uzorkovanje, homogenizaciju i ekstrakciju aktivnih tvari u kombinaciji tri otapala i tri načina ekstrakcije. Potom se dobijeni ekstrakti prečiste i pripreme za daljnju analizu.
- Na osnovu gravimetrijskih analiza ekstrakata i polaznog uzorka, odredit će se i faktor efikasnosti ekstrakcije obzirom na vrstu otapala i načina ekstrakcije.



Metoda za ispitivanje inhibicije enzima tirozinkinaze kojičnom kiselinom, niacinamidom i biljnim ekstraktima

- Aktivnost enzima tirozinaze će se odrediti spektrofotometrijskom metodom koju je prvi opisao Hearing (Hearing, 1987.).
- Ispitivanje aktivnosti enzima tirozinaze biće provedeno u mikrotitar pločama, a reakcija će biti praćena stvaranjem dopahroma na 495 nm. Uzorci za ispitivanje biće otopljeni u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koji se dodaje pufer, supstrat i enzim.
- Kao supstrat koristit će se *L*-tirozin ili *L*-Dopa.

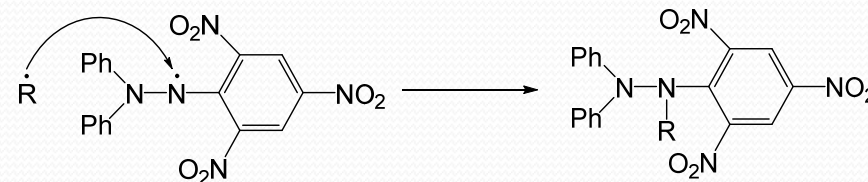
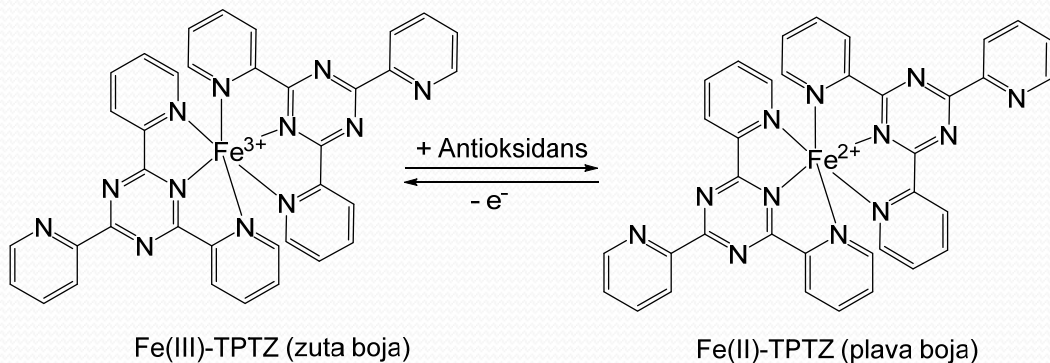
Procenat inhibicije enzima tirozinaze računa se prema jednačini:

$$\% \text{ inhibicije tirozinaze} = (A-B) - (C-D) / (A-B) \times 100$$

- A. apsorbanca slijepe probe sa enzimom
- B. apsorbanca slijepe probe bez enzima
- C. apsorbanca uzoraka sa enzimom
- D. apsorbanca uzoraka bez enzima

Metoda za ispitivanje antioksidativne aktivnosti kojične kiseline, niacinamida i biljnih ekstrakata

Metode koje se koriste za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala zasnovane su na prenosu jednog elektrona (Single electron transfer, SET) i uključuju pored ostalih **DPPH** i **FRAP** postupak.



*U reakciji sa antioksidansima DPPH radikal
reducira se u blijedo-žuti hidrazinski oblik*

Metoda određivanja antiinflamatornog djelovanja biljnih ekstrakata korištenjem goveđeg serumskog albumina

- Kao dio ispitivanja mehanizma protuupalnog djelovanja, procjenjuje se sposobnost biljnih ekstrakata u inhibiciji denaturacije proteina.
- Apsorbancija se mjeri pomoću UV vidljivog spektrofotometra na 660 nm. Kontrola predstavlja 100% denaturaciju proteina.

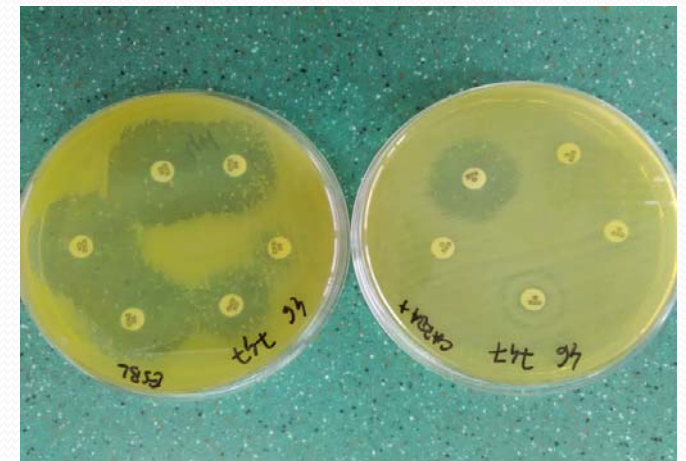
$$\text{Postotak inhibicije} = \frac{\text{Abs kontrola}}{\text{Abs test} - \text{Abs kontrola}} \times 100$$

Abs test = Apsorbancija ispitnog uzorka,

Abs kontrola = Apsorbancija kontrole.

Metoda određivanja antimikrobne aktivnosti kojične kiseline, niacinamida i biljnih ekstrakata

- Ispitivanje antimikrobnog dejstva će se vršiti difuzionom metodom.
- Difuziona metoda se bazira na difuziji testirane supstance iz vertikalnog cilindra u čvrsti sloj agara u petrijevoj posudi tako da je rast dodatog mikroorganizma inhibiran u kružnom području ili zoni oko cilindra.



Formulacija i ispitivanje fizikalno – hemijskih osobina U/V krema

Razvoj formulacija i organoleptička ispitivanja

- Kozmetičke emulzije će biti izrađene kao U/V emulzije, dodavanjem vodene faze u masnu fazu zagrijanih na približno istoj temperaturi, nakon čega slijedi emulgovanje.
- Nakon izrade će se izvršiti organoleptička ispitivanja. Formulacija datih emulzija trebaju zadovoljiti bojom, izgledom, mirisom ali i konzistencijom.
- Osim ovih ispitivanja, trebaju zadovoljiti i aplikativne osobine (ljepljivost, dobra razmazivost, moć upijanja, te film koji data emulzija ostavlja na koži).

Formulacija i ispitivanje fizikalno – hemijskih osobina U/V krema

Određivanje pH vrijednosti

- Prema Pravilniku od zdravstvenoj ispravnosti predmeta opšte upotrebe, pH vrijednost kozmetičkih preparata trebala bi biti u intervalu od 3,5-8,0.
- Mjerenje pH će se izvesti potencijometrijski, uranjanjem staklene elektrode u ispitivane uzorke krema.



Formulacija i ispitivanje fizikalno – hemijskih osobina U/V krema

Određivanje električne provodljivosti

- Konduktometrija je metoda koja će se koristiti za praćenje stabilnosti datih formuacija, ali i za određivanje njihove prirode.
- Analiza će se odraditi na sobnoj temperaturi $22 \pm ^\circ\text{C}$, te će se elektroda konduktometra direktno uroniti u ispitivane uzorke krema.



Formulacija i ispitivanje fizikalno – hemijskih osobina U/V krema

Određivanje fizičke stabilnosti centrifugiranjem

- Metodom centrifugiranja može se uočiti da li će doći do nestabilnosti datih uzoraka krema. Utjecaj sile gravitacije ubrzat će starenje emulzija, odnosno krema U/V tipa.
- Analiza će se odraditi za svaki uzorak i to u trajanju od 30 minuta na 3000 obt/min.

Ispitivanje prisustva teških metala

- Ispitat će se i prisustvo teških metala, te će se obratiti pažnja na one metale koji su odgovorni za toksičnost i to olovo, kadmij, arsen i živa.

Granične vrijednosti za nabrojane metale su:

Olovo: 20 ppm

Živa: 1 ppm

Kadmij: 5 ppm

Arsen: 5 ppm

In vivo ispitivanje melanin indeksa kozmetičkih emulzija sa kojičnom kiselinom, niacinamidom i biljnim ekstraktima

- Evaluacija se provodi mjerenjem melaninskog indeksa (M-indeks) na mjestu hiperpigmentacije kože u svakoj vremenskoj tački (2, 4 i 8 sedmica) prije i nakon upotrebe uzorka.
- Indeks melanina je definisan kao prosječna vrijednost dobijena petostrukim mjerenjem hiperpigmentacije kože pomoću Mexameter® MX 18 (Courage+ Khazaka electronic, GmbH, Nemačka).
- Studija će se provoditi uz nadzor ljekara specijaliste dermatologije, na najmanje 30 dobrovoljaca. Rezultati ispitivanja će biti statistički obrađeni.



Članovi istraživačkog tima

- *Dr.sc Merima Ibišević, docent – voditelj projekta*
- *Dr.sci. Nermina Hadžigrahić, red.prof.*
- *Dr.sci. Adaleta Softić, red.prof.*
- *Dr.sci. Aida Smajlović, red.prof.*
- *Dr.sci. Nahida Srabović, van.prof.*
- *Dr.sci. Darja Husejnagić, docent*
- *Mr.ph. Enida Karić, viši asistent*
- *Mr.ph. Lamija Kolarević, asistent – mladi istraživač*

Konsultanti i vanjski saradnici

- *Dr.sci. Halid Makić, red.prof.* (Univerzitet u Bihaću, Biotehnički fakultet)
- *Dr.sci. Saša Pilipović, van.prof.* (Agencija za lijekove i medicinska sredstva BiH; Univerzitet u Tuzli)
- *Dr.sci. Zahida Ademović, van.prof.* (Univerzitet u Sarajevu, Šumarski fakultet)
- *Mr.sci. Samira Dedić, viši asistent* (Univerzitet u Bihaću, Biotehnički fakultet)
- *Mr.sci. Emir Horozić, viši asistent* (KŠC Tuzla; Univerzitet u Tuzli)

Očekivani rezultati istraživanja

- Ovim istraživanjem očekujemo potvrdu naših tvrdnji da kojična kiselina i niacinamid pokazuju inhibitorne osobine na enzim tirozinazu, ali i da će i ekstrakti odabranih biljaka imati približnu efikasnost.
- Cilj istraživanja je dobiti sigurnu i stabilnu formulaciju kozmetičkih emulzija koja će zadovoljiti parametre fizikalno-hemijskog ispitivanja.
- Rezultati kao i metode koje će se koristiti kroz projekat, mogu poslužiti kao osnova za izradu sličnih formulacija za tretman hiperpigmentacija, ali isto tako i za pripremu i pisanje naučnih i stručnih radova na ovu temu.