



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89487

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 8/18

A61Q 19/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЛІОФІЛІЗАТУ ДЕДИФЕРЕНЦІЙОВАНИХ РОСЛИННИХ КЛІТИН ДЛЯ ДЕПІГМЕНТАЦІЇ І/АБО ОСВІТЛЕННЯ ШКІРИ

1

(21) a200608519  
(22) 03.12.2004  
(24) 10.02.2010  
(86) PCT/FR2004/003109, 03.12.2004  
(31) 0315521  
(32) 29.12.2003  
(33) FR  
(46) 10.02.2010, Бюл.№ 3, 2010 р.  
(72) МЕКІДЕШ НІКОЛЬ, FR  
(73) БІОТЕКМАРІН, FR  
(56) WO 0182887 A, 08.11.2001  
FR 2846242 A, 30.04.2004  
WO 03077881 A, 25.09.2003  
FR 2657011 A, 19.07.1991

(57) 1. Застосування щонайменше одного із ліофілізатів дедиференційованих рослинних клітин, де вказані дедиференційовані рослинні клітини є галофільними рослинними клітинами, в косметичній композиції, при якому визначений ліофілізат дозволяє депігментувати і/або освітлювати, захищати і відновлювати епідерміс.  
2. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що дедиференційовані рослинні клітини одержані методом культури in vitro.  
3. Застосування за п. 2, яке відрізняється тим, що дедиференційовані рослинні клітини, одержані методом культури in vitro, є лініями клітин.  
4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, яке відрізняється тим, що солончаковою рослиною є морський критмум.  
5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що ліофілізат депігментує і/або освітлює епідерміс, блокуючи діяльність тирозинази.  
6. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що ліофілізат захищає епідерміс шляхом зменшення вмісту вільних радикалів.

2

7. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що ліофілізат відновлює епідерміс шляхом стимуляції розмноження клітин базального шару епідермісу.  
8. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що ліофілізат відновлює епідерміс шляхом уповільнення диференціації епідермісу.  
9. Косметична композиція для місцевого використання, яка відрізняється тим, що вона включає на допустимому фізіологічному рівні щонайменше ліофілізат галофільних рослинних дедиференційованих клітин за будь-яким з пп. 1-8.  
10. Косметична композиція для місцевого використання, яка відрізняється тим, що вона включає на прийнятному фізіологічному рівні щонайменше від 0,05 % до 2 % ліофілізату галофільних рослинних дедиференційованих клітин за будь-яким з пп. 1-8.  
11. Косметична композиція для місцевого використання, яка відрізняється тим, що вона включає на прийнятному фізіологічному рівні щонайменше від 0,1 % до 1 % ліофілізату галофільних рослинних дедиференційованих клітин за будь-яким з пп. 1-8.  
12. Косметична композиція для місцевого використання, яка відрізняється тим, що вона включає на прийнятному фізіологічному рівні щонайменше 0,5 % ліофілізату галофільних рослинних дедиференційованих клітин за будь-яким з пп. 1-8.  
13. Композиція за одним з пп. 9-12, призначена для надання шкірі більш молодого вигляду.  
14. Композиція за пп. 9-12, призначена для лікування пігментних плям.  
15. Композиція за пп. 9-12, призначена для відбілювання шкіри негроїдного і азіатського типу.

Використання в косметичній, або фармацевтичній суміші щонайменше одного ліофілізату дедиференційованих рослинних клітин для депігментації і/або освітлення, захисту і відновлення епідермісу.

Винахід відноситься до використання в косметичній або фармацевтичній, суміші щонайменше

одного ліофілізату дедиференційованих рослинних клітин для депігментації і/або освітлення епідермісу з ефектом захисту і відновлення. До того ж, винахід спрямований на косметичну або фармацевтичну суміш, яка містить щонайменше один такий ліофілізат для місцевого використання.

(19) UA (11) 89487 (13) C2

Шкіра - це захисна оболонка, яка являє собою границю між зовнішнім середовищем та іншими внутрішніми органами. Проте, вона не є герметичною і як абсорбуючий орган дозволяє розчиненим речовинам проходити через пори і волосяні мішечки.

Шкіра захищає від холоду, спеки і опромінення; від тиску і тертя, від хімічних ушкоджень, від проникнення мікроорганізмів, від втрати води і тепла.

Природний захист шкіри від ультрафіолетового опромінення відбувається завдяки коричневому пігменту - меланіну. Меланін присутній в клітинах основних шарів епідермісу - меланоцитах. Він синтезується з амінокислоти - тирозину, який модифікований ензимом - тирозиназою. Синтез меланіну спричиняють ультрафіолетові проміння. Потемнення кольору шкіри є першим природним захистом від сонця, якого надто недостатньо для найсвітліших тинів шкіри. Загар, що з'являється під дією ультрафіолету, є наслідком зростання меланінової активності у синтезі меланіну і накопичення меланіну в кератиноцитах.

Кількість меланіну і число меланоцитів є генетично запрограмованими факторами, які дають шкірі колір.

Надлишкове і локалізоване вироблення меланіну спричиняє появу плям: веснянок, маски вагітності, сонячного або старечого лентіго і тому подібного.

Дійсно, згідно з останньою номенклатурою, старечі плями є старечим лентіго, а сонячні лентіго - іншими плямами.

«Старечі плями» - це маленькі, рівні і, як правило, круглі плями блідо-коричневого кольору, найчастіше, на обличчі, тильній частині долонь, грудях і передпліччях. Їх появу спричиняє поєднання сонця і старіння. Їх кількість зростає з віком. Під дією ультрафіолетового проміння, що повторюється, меланоцити, зрештою, виробляють надмірну кількість меланіну.

Лентіго - це «веснянки», які не зникають взимку, коричневого кольору, маленькі і численні, розташовані дуже близько одна від одної. Найчастіше, вони знаходяться на обличчі, плечах і грудях. Їх появу спричиняє надмірна доза ультрафіолету і їх утворення можливе, починаючи з самого раннього віку.

«Маска вагітності» проявляється у вигляді великих коричневих плям неправильної форми, найчастіше, на обличчі, яке іноді приймає вигляд маски. Коли ці плями з'являються під час вагітності, їх називають хлоазма, в інших випадках - мелазма. Їх появу спричиняє гормональне стимулювання (вагітність, гормональна терапія) в поєднанні з ультрафіолетовим опроміненням.

Всі ці типи плям також можуть бути пов'язані з генотипом і, таким чином, зі спадковістю.

Коли існує проблема неестетичного вигляду внаслідок такої концентрації меланіну, особливо важливо мати препарат для місцевого використання, який дозволить запобігати їм і/або зменшувати їх.

Виробники косметичних і фармацевтичних препаратів знаходяться у постійному пошуку акти-

вних неагресивних природних речовин, які дозволяють уповільнювати або блокувати синтез меланіну, безпосереднім чи посереднім шляхом, або уповільнювати чи блокувати перехід меланосом в кератиноцити і, таким чином, освітлювати плями, захищаючи ці зони від сонячної пігментації. Також виробники косметичних препаратів шукають активні неагресивні природні речовини для того, щоб задовольнити зростаюче бажання людей з негроїдним і азіатським типом шкіри щодо її освітлення, пропонуючи їм продукцію для захисту шкіри.

Для того, щоб уникнути недоліків інших існуючих стомлюючих і/або агресивних методів (лазер, кріотерапія) депігментації, ці активні природні речовини повинні одночасно захищати шкіру і/або стимулювати відновлення клітин, з яких вона складається.

Дійсно, захист шкіри і/або стимулювання відновлення клітин шкіри дозволяє боротися одночасно проти фактора, який збільшує плями: старіння шкіри через численні причини.

Першою причиною старіння шкіри є «запрограмоване» старіння, яке може прискорити стрес, зловживання палінням і певні захворювання. З роками шкіра втрачає свою еластичність, оскільки епідерміс виробляє все менше фібри колагену та еластину. Звідси прогресуюче послаблення сполучної тканини і в'ялість шкіри. Здатність відновлення епідермісу також має тенденцію до послаблення, він стає сухішим, тонкішим, тому що змінюється його метаболізм. З часом, шкіра набуває сірого вигляду, що дає тьмяний колір, проти якого засоби освітлення також можуть боротись.

Другою причиною старіння є зменшення вироблення гормонів, що веде до поступового зменшення тканинної, клітинної і органічної діяльності. Такі гормони, як гормон росту (HGH), тестостерон, DHEA і мелатонін виробляються у великій кількості до двадцяти років і вони сприяють відновленню клітин.

Наслідки цих різних причин старіння разом з впливом на навколишнє середовище (різні види забруднення: відпрацьовані гази, сигаретний дим, заводський дим, хімічні продукти тощо) ведуть до надлишкового продукування вільних радикалів, які націлені на різні компоненти клітини: протеїни, ліпіди, цукор і ДНК, в чому і полягає, таким чином, інша причина старіння шкіри. Певні зовнішні причини підштовхують їх до початку реакції, тому що вони постійно шукають інші молекули, з якими можуть з'єднуватись. Таким чином, вони атакують фібри колагену, клітинні мембрани і жировий шар шкіри. Вони змінюють генотип клітин так, що якість нових клітин шкіри погіршується.

Тіло захищає себе проти цих агресорів за допомогою ензиматичних систем, протистоячи цим окисним реакціям (антиоксиданти). Але починаючи з двадцяти років механізми природного захисту поступово ослаблюються так, що шкіра не може більше захищати себе лише власними силами.

Заявник відкрив дивовижно і несподівано, що ліофілізат дедиференційованих рослинних клітин дозволяє отримувати комбінацію шуканих результатів: він забезпечує повністю безпечну депігмен-

тацію і/або освітлення епідермісу, його захищаючи і відновлюючи.

Дедиференційовані клітини зберігають весь клітинний потенціал як первинні клітини. Вони виявляють всі гени їх геноми; таким чином, всі протеїни дозволяють кожному типу спеціалізованої клітини захищати себе від зовнішнього середовища.

Винахід, таким чином, спрямований, по-перше, на використання у виробництві косметичної або фармацевтичної суміші щонайменше одного ліофілізату дедиференційованих рослинних клітин, тобто вищевказаного ліофілізату, що дозволяє депігментацію і/або освітлення, захист і відновлення епідермісу.

Під «рослинною дедиференційованою клітиною» розуміють всі рослинні клітини, які не представляють жодного признаку спеціалізації і можуть відновлювати власними силами саджанець рослини, з якої вона походить. Вона може бути відділена від будь-якого зразка цілої рослини або органу, такого як листя, стебло, корені, пиляк, плоди і тому подібне, який називають експлантат.

Переважно як експлантат використовують частину листя або насіння.

Як правило, перевагу віддають розведенню експлантату *in vitro*. Під «культурою *in vitro*» розуміють набір методів з попереднього дослідження, знайомого спеціалісту, який дозволяє в умовах, що повністю контролюються, відтворювати орган або цілу рослину на основі експлантату, вирощеного в або на певному поживному середовищі. Ці умови, які повністю контролюються, дозволяють повністю відтворювати і робити однорідними рослини. Зокрема, цей метод розведення дозволяє отримувати ідентичні клони в необмеженій кількості. Серед методів і середовищ розведення *in vitro*, які описані в попередньому дослідженні, можна процитувати, наприклад, середовища Gamborg (1968), Murashige і Skoog (1962), Morel (1970) і тому подібне, склад яких описаний у "Plant Culture Media: formulations and uses" авторів E.F. George, DJM Puttock і H.J. George (Exegetics Ltd 1987).

Зокрема, переважно використовують рослинні дедиференційовані клітини солончакової рослини, такого виду як *Salicornia ramossissima* (солонець), *Suaeda vera*, *Beta maritima*, *Obione portulacoides*, *Armeria maritima*, *Crithmum maritimum* (морський критмум), *Ophrys sphegodes*, *Artemia vulgaris*, *Muscicaria comosum*, *Eryngium maritimum*, *Saguisorba minor*, *Cochlearia officinalis*, *Fumaria officinalis*, *Vincetoxicum fullonum*, *Dispacus fullonum*, *Heraclium spondylium*, *Inula crithmoides*, *Inula britannica*, *Inula viscosa*, зокрема рослинні дедиференційовані клітини морського критмуму (*Crithmum maritimum*). Солончакові рослини, які також називають галофітами, є рослинами, що витримують багатий на сіль ґрунт. Вони розвинули систему захисту проти зовнішнього агресивного середовища, в якому вони знаходяться. Зокрема, галофіти є рослинами з морського берегу, які здатні витримувати багатий на сіль ґрунт, вологу і вітер. Вони постійно борються, щоб підтримувати осмотичний тиск в своїх клітинах; вода має тенденцію переносити плазмому мембрану в позаклітинну частину з найбільшим вмістом соди.

У випадку використання солончакової рослини особливо важливо розвивати клітинну культуру *in vitro*, яка виробляє необмежену відтворювану біомасу для захисту цих видів, галофітів, яким загрожує забруднення з боку моря.

В окремому варіанті винаходу також можливо змінювати певні умови культури (рН, температуру, навколишній газовий склад, склад середовища культури, освітлення). Дедиференційовані клітини намагатимуться при цьому продукувати певні внутрішньоклітинні субстанції.

Друга сфера застосування винаходу - косметична або фармацевтична суміш для місцевого використання, яку характеризує те, що вона містить в основі, фізіологічно прийнятний, від 0,05 до 2%, переважно від 0,1 до 1%, особливо переважним чином 0,5% щонайменше один ліофілізат, як описано раніше.

Дійсно, такий ліофілізат можна використовувати як єдиний активний препарат суміші згідно з винаходом. Проте, деякі ліофілізати можна додавати до основи суміші згідно з винаходом.

В першому варіанті реалізації винаходу використовують щонайменше один ліофілізат рослинної дедиференційованої клітини для вироблення косметичної або фармацевтичної суміші, яка призначена для надання шкірі омолоджене вигляду.

В другому варіанті реалізації винаходу використовують щонайменше один ліофілізат рослинної дедиференційованої клітини для вироблення косметичної або фармацевтичної суміші, призначеної для лікування плям, які називають лентіго.

В третьому варіанті реалізації винаходу використовують щонайменше один ліофілізат рослинної дедиференційованої клітини для отримання косметичної або фармацевтичної суміші, призначеної для освітлення шкіри негроїдного та азіатського типу.

Наступні приклади ілюструють винахід, проте вони не обмежують сферу його використання.

Умовні позначення на кресленнях:

Фіг.1: загальна морфологія, забарвлення в гематоксилін/еозин (HES) на відновленому епідермісі SKINETHIC® звичайному (кератиноцити)

Фіг.2: загальна морфологія, забарвлення в гематоксилін/еозин (HES) на відновленому епідермісі SKINETHIC®, що містить меланоцити

Фіг.3: маркування філагріну

Фіг.4: маркування KI-67 (оцінка мітотичного індексу)

Приклад 1: Розведення *in vitro* дедиференційованих клітин морського критмуму на основі рослинної тканини:

1 - Отримання первинного калюсу

За допомогою ножиць відбирають шматочки тканини у вибраній зоні (мінімум 3см) зі стебла або листя.

Починаючи з цього етапу всі маніпуляції повинні відбуватись в стерильній атмосфері у витяжній шафі з ламінарним потоком.

Для стерилізації рослинного матеріалу тканину занурюють на 30 секунд в етанол, потім видаляють розчинник, промивають тричі у 100мл стерильної H<sub>2</sub>O, занурюють на 15 хвилин в гіпохлорит натрію, в який додано декілька крапель Tween 20,

після чого промивають тричі у 100мл стерильної  $H_2O$ .

Для того, щоб помістити тканину в культуру, фрагменти тканини розміщують у стерильній чашці Петрі (125мм) і розрізають на шматочки (2-3мм), видаляючи при цьому частини, що побіліли під дією жавелевої води. Таким чином отримані експлантати злегка надрізають і наполовину занурюють у живильне желеподібне середовище (Таблиця 1)

## 2 - Пересадження калюсу

Починаючи з цього етапу всі маніпуляції повинні відбуватись в стерильній атмосфері у витяжній шафі з ламінарним потоком.

Відбирають на рівні калюсу 2-3 клітинних згустки (1-2см) за допомогою шпателя.

Ці згустки розміщують і розподіляють на новому середовищі.

Склад середовища твердої культури:

Таблиця 1

Макроелементи	мг/л
$KNO_3$	2500
$(NH_4)_2SO_4$	134
$CaCl_2, 2H_2O$	150
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	300
$MgSO_4, 7H_2O$	250
Мікроелементи	мг/л
$MnSO_4, H_2O$	16,9
$ZnSO_4, 7H_2O$	8,6
$H_3BO_3$	6,2
KI	0,83
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0,25
$CuSO_4, 5H_2O$	0,025
$FeSO_4, 7H_2O$	27,8
Вітаміни	мг/л
Міоїнозит	100
Нікотинова кислота	1
D (+) - пантотенат кальцію	1
(+) біотин	0,01
Хлор гідрат піридоксалу	1
Двохлористий тіамін	1
Органічні сполуки	г/л
Сахароза	30
Фітогормони	мг/л
Нафталін оцтова кислота	1,5
2,4 Двохлориста феноксіоцтова кислота	0,5
Кінетик	0,5
Желююча речовина	г/л
Агар	9

## 3 - Збільшення клітин калюсу у рідкому середовищі

### Інокуляція

Клітини калюсу переносять у рідке середовище, ідентичне твердому середовищу без агару (Таблиця 1).

Їх вирощують в умовах збівтування (ПО обертів/хвилину) при температурі  $25^{\circ}C$  під постійним білим світлом (3500 люкс, лампа денного світла) в колбах Ерленмейера об'ємом 250мл із розрахунку 50мл на одну колбу Ерленмейера.

Їх розчиняють через 10-11 днів у пропорції  $\frac{1}{4}$ , тобто 100мл в 400мл.

Виробництво сухого матеріалу:

Клітини вирощують на основі розчину  $\frac{1}{4}$  інокуляту в колбах Ерленмейера 5л, із розрахунку 2л культури на одну колбу Ерленмейера в умовах збівтування (110 обертів/хвилину) при температурі  $25^{\circ}C$  під постійним білим світлом (3500 люкс, лампа денного світла) 12-13 днів.

Треба зауважити, що 2,4 двохлаориста феноксіоцтова кислота у процесі обміну повністю метаболізується і її не буде у кінцевому продукті.

Приклад 2: Отримання ліофілізату з де диференційованих клітин морського критмуму:

Рідку клітинну культуру в стані суспензії центрифугують для очищення клітин.

Клітини просівають через сито 150-200 $\mu m$ , заморозують, потім ліофілізують в ліофілізаторі пластинкового типу.

Приклад 3: Демонстрація на відновленому епідермісі SKINETHIC® при відсутності токсичності косметичного препарату, який містить ліофілізат де диференційованих клітин морського критмуму:

Відновлений епідерміс SKINETHIC® є моделлю епідермісу людини, яку розробила і продає компанією Societe SkinEthic Laboratories (Ніца, Франція).

1. На відновленому епідермісі SKINETHIC® звичайному (складається лише з кератиноцитів):

Кератиноцити людського походження були засіяні на полікарбонатний фільтр 0,63см<sup>2</sup> у певному середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощували протягом 14 днів у контакті з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс, утворений таким чином, використовували для вивчення, починаючи з 17 дня культури.

Попередній аналіз було проведено для визначення часу контакту і кількості продукту, нанесеного на відновлений епідерміс, без цитотоксичності.

Всі тести проведені двічі з:

Лот 1: контрольним епідермісом, на який препарат не наноситься

Лот 2: обробленим епідермісом, на який нанесений крем PXTS + 0,1% АК205

Лот 3: обробленим епідермісом, на який нанесений крем PXTS + 0,5% АК205

Лот 4: обробленим епідермісом, на який нанесений препарат ліофілізат клітинний АК205

АК205 = ліофілізат з дедиференційованих клітин морського критмуму, отриманий згідно з Прикладами 1 і 2.

PXTS = крем для дуже сухої шкіри

Епідерміс, закріплений в 10% формальдегідному розчині, був розміщений в парафінові блоки. Вертикальні зрізи в 4 мікрони забарвлені в гематоксиліні / еозині і сфотографовані під оптичним мікроскопом.

Культури повинні представляти базальні, остеоподібні, зернисті і рогові клітинні шари, не ушкоджені та ортокератозні; епідермічне розшарування повинне бути рівномірним і нормальним. Клітини базального шару повинні поляризуватись вертикально. Численні гранули кератогіаліну по-

винні бути видимі (в ультрафіолеті) в зернистому шарі безпосередньо під роговим шаром.

Препарати, крем PXTS + 0,1% AK205, крем PXTS + 0,5% AK205 і препарат ліофілізату клітин морського критмуму (AK205), розміщені, із розрахунку 2  $\mu\text{L}$  на  $\text{cm}^2$ , на відновленому епідермісі, обробленому протягом 24 годин, у порівнянні з контрольним епідермісом, не призвели до жодного токсичного ефекту.

Гістологічні зображення обробленого епідермісу після забарвлення гематоксилином/еозином подібні до зображень контрольного епідермісу (порівняйте на кресленні 1).

2 - На відновленому епідермісі SKINETHIC®, що містить меланоцити:

Кератиноцити людського походження і меланоцити були засіяні на полікарбонатні фільтри 0,63  $\text{cm}^2$  у певному середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощували протягом 10 днів у контакт з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс типу VI (негроїдний) таким же чином утворений використовували починаючи з 10 дня культури.

Попередній аналіз був проведений для визначення часу контакту і кількості препарату, нанесеного на відновлений епідерміс, який не має цитотоксичності.

Аналіз проведений двічі з:

Лот 1: контрольним епідермісом, на який препарат не наноситься

Лот 2: позитивним контрольним епідермісом, на який нанесена койове кислота, 2%

Лот 3: обробленим епідермісом, на який нанесений крем PXTS + 0,1% AK205

Лот 4: обробленим епідермісом, на який нанесений крем PXTS + 0,5% AK205 = ліофілізатом з дедиференційованих клітин морського критмуму, отриманим згідно з Прикладами 1 і 2.

Епідерміс, закріплений в 10% формальдегідному розчині, був розміщений в парафінові блоки. Вертикальні розрізи в 4 мікрони забарвлені в гематоксилині/еозині і сфотографовані під оптичним мікроскопом.

Культури повинні представляти базальні, остеоподібні, зернисті і рогові клітинні шари, неушкоджені, ортокератозні, і епідермічне розшарування повинне бути рівномірним і нормальним. Клітини базального шару повинні поляризуватись вертикально. Численні гранули кератогіаліну повинні бути видимі (в ультрафіолеті) в зернистому шарі безпосередньо під роговим шаром.

Препарати, крем PXTS + 0,1% AK205 і крем PXTS + 0,5% AK205, розміщені із розрахунку 2  $\mu\text{L}$  на  $\text{cm}^2$ , на відновленому епідермісі, обробленому

протягом 24 годин, у порівнянні з контрольним епідермісом, не мали ніякої токсичності.

Гістологічні зображення обробленого епідермісу після забарвлення гематоксилином/еозином порівнянні з зображеннями контрольного епідермісу (порівняйте на рисунку 1).

Приклад 4: Оцінка ефекту депігментації косметичного препарату, який містить ліофілізат дедиференційованих клітин морського критмуму на відновленому епідермісі SKINETHIC®, що містить меланоцити:

#### 1 - Протокол експерименту

Кератиноцити людського походження і меланоцити були засіяні на полікарбонатні фільтри 0,63  $\text{cm}^2$  у певному середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощували протягом 10 днів у контакт з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс типу VI (негроїдний), утворений таким чином, використовували, починаючи з 10 дня культури.

Всі тести були проведені двічі з:

Лот 1: контрольним епідермісом, на якому препарат не застосовували

Лот 2: позитивним контрольним епідермісом, на який була нанесена койове кислота, 2%

Лот 3: обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS + 0,1% AK205

Лот 4: обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS + 0,5% AK205

AK205 - це ліофілізат дедиференційованих клітин морського критмуму, отриманий згідно з Прикладами 1 і 2.

Оцінка внутріклітинного синтезу меланіну (якісне дослідження) була проведена за допомогою спектрометрії на 475nm після того, як клітини були приведені до стану суспензії, потім розчинені у NaOH (1N) і диметилсульфоксиді протягом 30 хвилин.

Наприкінці періоду інкубації взяли проби середовища культури, потім епідерміс промили з фосфатним буферним соляним розчином PBS (Phosphate Buffer Saline) і ввели у контакт з Triton X-100 (Sigma, Франція) з концентрацією 1%, потім витримали в інкубації 10 хвилин. Ензиматична реакція була ініційована додаванням L-Dopamine (Sigma, Франція) з 10mM в PBS, в якому не було  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ .

Після 1 години інкубації при температурі 37°C в темному місці діяльність тирозинази була оцінена шляхом вимірювання абсорбції на 475nm за допомогою спектрофотометру.

#### 2 - Результати

а) дозування меланіну

Отримані результати представлені у вигляді таблиці:

	Абсорбційна здатність (475 nm)	%
Негативний контрольний зразок	0,160 $\pm$ 0,02	
Позитивний контрольний зразок	0,09 $\pm$ 0,01	-44
КРЕМ PXTS+0,1% AK205	0,139 $\pm$ 0,02	-13
КРЕМ PXTS+0,5% AK205	0,101 $\pm$ 0,01	-37

Отримані результати показали, що застосування крему PXTS +0,5% AK205 призводить до значного зменшення проценту меланіну на рівні відновленого епідермісу, який містить меланоцити (-37%). Крем PXTS +0,1% AK205 дещо зменшує

цей процент (-13%) у порівнянні з позитивним контрольним зразком.

б) Оцінка активності тирозинази

Отримані результати представлені у вигляді таблиці:

	Абсорбційна здатність (475 nm)	%
Негативний контрольний зразок	0,245 ± 0,03	
Позитивний контрольний зразок	0,153 ± 0,01	-38
КРЕМ PXTS+0,1% AK205	0,198 ± 0,02	-19
КРЕМ PXTS +0,5% AK205	0,167 ± 0,02	-32

Отримані результати показали, що застосування крему PXTS +0,5% AK205 призводить до значного зменшення діяльності тирозинази на рівні відновленого епідермісу, який містить меланоцити (-32%), у порівнянні з позитивним контрольним зразком (-38%). Було спостережене незначне зменшення (-19%) після обробки кремом PXTS +0,1% AK205.

На закінчення, в отримуваних експериментальних умовах, препарат - крем PXTS +0,5% AK205 показав яскраво виражену депігментацію відносно відновленого епідермісу, який містить меланоцити. Більш обмежена, але реальна дія спостерігалась при застосуванні крему PXTS +0,1% AK205.

Приклад 5:

Демонстрація на відновленому епідермісі SKINETHIC® ефекту проти вільних радикалів косметичного препарату, який містить ліофілізат диференційованих клітин морського критуму:

1 - Навіщо дозувати малондіальдегід?

В біологічних системах молекулярний кисень є стабільним і мало вступає в реакції. Він поводить себе як акцептор електронів і його відновлення закінчується виробництвом води. Але неповне відновлення  $O_2$  закінчується виробництвом вільних радикалів метаболітів, таких як аніон пероксид  $O_2^-$ , токсичний пергідроксид  $HO_2^-$  (в присутності двовалентного заліза реакція може привести до появи  $OH^-$ , дуже агресивного), або пероксид водню  $H_2O_2$ .

Дисмутаційний пероксид (SOD) захищає мембрани швидкою дисмутацією  $O_2^-$  в  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$ , відносно стабільний, відновлюється у воду ( $H_2O$ ) каталазою та пероксидазою. Ці вільні радикали, які з'явилися від неповного відтворення  $O_2$ , є чутливими до рівня подвійних зв'язків, що сприяють виникненню інших вільних радикалів внаслідок делокалізації електронів. Початок ланцюгової реакції з утворенням вільних радикалів відбуваються на рівні жирних поліненасичених кислот. Таким чином, реакція починається всередині клітинної мембрани і призводить до вивільнення малондіальдегідів (MDA), а також інших альдегідів і алканів, які є продуктами розпаду. Ці останні можуть з'явитись під час реакції з тіобарбітуровою кислотою (TBA).

Дозуючи MDA, які є основними ознаками цитотоксичності, викликані окисними процесами і стресами, отримуємо, таким чином, показник, що дозволяє визначити активність даної речовини проти у боротьбі з вільними радикалами.

2 - Протокол експерименту

Кератиноцити людського походження були засіяні на полікарбонатні фільтри  $0,63\text{cm}^2$  у певному середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощували протягом 14 днів у контакті з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс, утворений таким чином, використовували для проведення дослідження, починаючи з 17 дня культури.

Дослідження було проведено тричі після 24 годин з моменту контакту препарату з епідермісом:

Лот 1: з негативним контрольним епідермісом, на якому не застосовували жодного препарату

Лот 2: з обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS + 0,1% AK205

Лот 3: з обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS + 0,1% AK205

Лот 4: з обробленим епідермісом, на який був нанесений препарат - ліофілізат клітин (морського критуму)

Препарати, що вивчаються, використовувались на поверхні кожного обробленого епідермісу, із розрахунку  $2\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$

Екстракція малондіальдегіду

Після 24 контакту продукту з епідермісом останній перевели у стан суспензії

у:

-250  $\mu\text{L}$  буферного розчину Tris 50 mM, pH 8, який містить NaCl 0,1 M;

Етилендіамінтетраоцтова кислота ЕДТК 20 mM

-25  $\mu\text{L}$  додецильсульфонат натрію до 7%

-300  $\mu\text{L}$  HCl (0,1 N)

-38  $\mu\text{L}$  фосфоровольфраматова кислота 1% у воді

-300  $\mu\text{L}$  тіобарбітурової кислоти 0,67% у воді

Після однієї години інкубації у темряві при температурі  $50^\circ\text{C}$  і охолодження у льодяній воді у кожну трубку було додано 300мл n-бутанолу. Трубки були центрифуговані при 10000 g при температурі  $0^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин. Вища фаза була рекуперована для дозування MDA

Дозування малондіальдегіду MDA

MDA дозували шляхом флуоресценції після сепарації комплексної сполуки MDA-TBA за допомогою рідинної хроматографії високого тиску.

- Hacos Bischoff, модель 2.200

- Автоматичний інжектор Alcot, модель 788, автоматичний дозатор

- Колонка Ultrasep C18 (30 cm x 0,18) 6мм пористості

- Детектор флуоресценції, jasco 821-FI

Виявлення флуоресценції проведене з ініціюванням 515nm і емісією при 553nm. Використовуваний елюент складається з метанолу та води, 40:60 (об/об), при pH, відкоригованому за допомогою KOH 1M.

Кількісний аналіз проведений шляхом порівняння з еталонними зразками, обробленими так само, як і зразки (0,125; 0,25; 0,5 і 1 mM) за допомогою комп'ютерної програми ICS (Фіг.3)

Дозування протеїнів

	MDA (цМ/mg протеїнів)	%
Контрольний зразок	652±31	-
КРЕМ PXTS + 0,1% АК 205	638±47	-2 (нз)
КРЕМ PXTS + 0,5% АК 205	620±32	-5 (нз)
ЛЮФІЛІЗАТ КЛІТИН	594±57	-9 (нз)

нз: не значне

Результати показують, що досліджені продукти не призводять до жодного вивільнення MDA в фізіологічних умовах у порівнянні з необробленим контрольним зразком.

Дозування протеїнів проведене згідно з методом BRADFORD. Підвищення абсорбційної здатності до 595nm пропорційне концентрації протеїнів, визначеної за допомогою спектрофотометру UNI CAM 8625.

3 - Результати

а) фізіологічне ліпопероксикування

Отримані результати представлені у вигляді таблиці:

б) Ліпопероксикування, спричинене ультрафіолетом

Отримані результати представлені в вигляді таблиці:

	MDA (цМ/mg протеїнів)	%
Контрольний зразок	652±31	
UVB(150mJ/cm <sup>2</sup> )	832±63	+28*
КРЕМ PXTS+ 0,1%АК	660±51	-21**
205 + UVB(150mJ/cm <sup>2</sup> )		
КРЕМ PXTS + 0,5% АК 205 + UVB(150mJ/cm <sup>2</sup> )	625±42	-25**
ЛЮФІЛІЗАТ КЛІТИН + UVB(150mJ/cm <sup>2</sup> )	602±37	-28**

\* відносно до негативного контрольного зразка

\*\* відносно до позитивного контрольного зразка, опроміненого UVB

Отримані результати показали значний захист, який надають продукти: крем PXTS + 0,1% АК 205, крем PXTS + 0,5% АК 205 і ліофілізат клітини (морського критмуму), що наносять на поверхню відновленого епідермісу SKINETHIC®, у порівнянні з ліпопероксидацією, яку спричиняє ультрафіолетове випромінювання «В»(150mJ/cm<sup>2</sup>).

Продуктування MDA зменшилось на 21% , 25% та 28% відповідно для крему PXTS + 0,1% АК 205, крему PXTS + 0,5% АК 205 та ліофілізату клітини (морського критмуму) у порівнянні з опроміненим епідермісом

Якщо опромінення UVB (позитивний контрольний зразок) спричиняє збільшення продуктування MDA на 28% , то застосування таких продуктів як крем PXTS + 0,1% АК 205, крем PXTS + 0,5% АК 205 і ліофілізат клітини (морського критмуму) до опромінення дозволяє підтримувати продуктування MDA на своєму фізіологічному рівні.

Приклад 6:

Демонстрація на відновленому епідермісі SKINETHIC® ефекту, який стимулює косметичний препарат, який містить ліофілізат дедиференційованих клітин морського критмуму:

1 - Критерії оцінки стимулювання

Клітинна культура кератиноцитів людського походження дозволила детальніше описати спе-

цифічний вплив похідних вітаміну А на маркери поступової диференціації епідермісу: стимулюється видавлювання KI-67 у надбазальному шарі, спричиняється видавлювання типових кератинів епідермічної гіперпроліферації (K19, K13), відбувається втрата полярності клітин базального шару, в той час як синтез філагрину, протеїну, який відповідає за укладання кератинів у роговий шар, уповільнюється. Гранули кератозгіаліну, розташовані у зернистому шарі, який багатий на філагрін, зникають за 24 години при наявності 0,05% ретинолової кислоти (кислота вітаміну А) в середовищі культури. Таким чином, ретиноїди, в цілому, спричиняють стимуляцію проліферації і уповільнення епідермічної модифікації [Rosdy, M. та інші, In Vitro Toxicology, Vol. 10 n°1, crop. 39-476 1997, "Retinoic acid inhibits epidermal differentiation when applied topically on the stratum corneum of epidermis formed in vitro by human keratinocytes grown on defined medium"].

Філагрін і протеїн KI-67 можуть, таким чином, використовуватись як маркери епідермічної модифікації.

2 - Вивчення епідермічної диференціації

Протокол

Кератиноцити людського походження були засіяні на полікарбонатні фільтри 0,63см<sup>2</sup> у певному

середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощували протягом 14 днів у контакті з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс, утворений таким чином, використовували для проведення дослідження, починаючи з 17 дня культури.

Дослідження було проведено тричі після 24 годин з моменту контакту препарату з епідермісом:

Лот 1: з негативним контрольним епідермісом, на якому не застосовували жодного препарату

Лот 2: з обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS + 0,1% AK205

Лот 3: з обробленим епідермісом, на який був нанесений продукт - крем PXTS + 0,5% AK205

Лот 4: з обробленим епідермісом, на який був нанесений продукт - ліофілізат клітин (морського критмуму)

Контрольні зразки епідермісу, на яких не застосовували жодного продукту, і епідермісу, обробленого продуктом у процесі вивчення протягом 24 годин контакту, були заморожені при температурі -80°C. Після розміщення в парафінові блоки ці епідерміси були розрізані, потім оброблені імуногістохімічним способом. Ця реакція була здійснена з моноклоновими антитілами, відновленими з філагрину.

Результати затримання диференціації клітин епідермісу

Порівняльний аналіз відновленого епідермісу контрольних зразків, оброблених продуктами - кремом PXTS+0,1% AK 205, кремом PXTS+0,5% AK 205 та ліофілізатом клітин (морський критмум), виявив різницю у щільності маркерів філагрину на рівні зернистого шару (див. Фіг. 3)

Дійсно, у фізіологічних умовах лікування епідермісу:

- кремом PXTS+0,1% AK205 призвело до чіткого зменшення диференціації епідермісу, яке відзначається помітним зменшенням маркерів філагрину у порівнянні зі зразками, які не були оброблені продуктом;

- кремом PXTS+0,5% AK 205 призвело до чіткого зменшення диференціації епідермісу, яке відзначається помітним зменшенням маркерів філагрину у порівнянні зі зразками, що не були оброблені,

- ліофілізатом клітин (морський критмум) призвело до значного зменшення диференціації епідермісу, яке відзначається явним зменшенням маркерів філагрину у порівнянні зі зразками, що не були оброблені.

3 - Дослідження розмноження клітин базального шару епідермісу

Протокол

Кератини людського походження були засіяні на полікарбонатний фільтр 0,63см<sup>2</sup> у певному середовищі (модифікований MCDB 153) з добавками. Клітини вирощувалися 14 днів у контакті з повітрям/рідиною, середовище культури змінювали кожні два дні.

Епідерміс, сформований таким чином, використовували для проведення дослідження, починаючи з 17 дня культури.

Активність продуктів була виявлена шляхом імуногістохімічного маркера.

Випробовування було проведено тричі після 24 годинного контакту продукту з епідермісом:

- Лот 1: з негативним контрольним епідермісом, на якому не застосовували жодного препарату;

- Лот 2: з обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS+0,1% AK205;

- Лот 3: з обробленим епідермісом, на який був нанесений крем PXTS+0,5% AK205;

- Лот 4: з обробленим епідермісом, на який був нанесений продукт - ліофілізат клітин (морського критмуму)

Контрольні зразки епідермісу, на яких не застосовували жодного продукту, і епідермісу, обробленого продуктом у процесі вивчення, протягом 24 годин контакту були закріплені у 10% формальдегіді. Після розміщення в парафінові блоки ці епідерміси були розрізані, потім оброблені імуногістохімічним способом. Ця реакція була здійснена з антитілом MIB1 (імунотехнологія), пептидом, який рекомбінує ядерний антиген KI-67.

Результати були отримані методом пероксидаза-антипероксидаза після антигенної демаскації шляхом попередньої термічної обробки.

Маркування хромогеном DAB виявляє коричневим кольором ядерні сита KI-67 збільшення розщеплення клітин, вираженого в фазах:

=> G1 і S = латентні і синтезні фази клітини

=> G2 = фаза подвоєння клітинних компонентів

=> M = мітоз.

Мітотичний індекс визначили шляхом підрахунку кольорових ядерних ситів, із розрахунку 10 полів на скло оптичного мікроскопу, збільшення х 250, у порівнянні із зрізами зразків епідермісу.

Результати: стимуляція розмноження клітин епідермісу

Отримані результати представлені у формі таблиці:

	Середня кількість забарвлених ядер на поле підрахунку мікроскопом
Контрольний зразок	7±2
Крем PXTS+0,1 % AK205	8±2
Крем PXTS+0,5 % AK205	12±2
Клітинний ліофілізат	14±3

Підрахунок забарвлених у пігменті ядерних ситів всіх зразків після імуногістохімічної обробки виявили наступне:

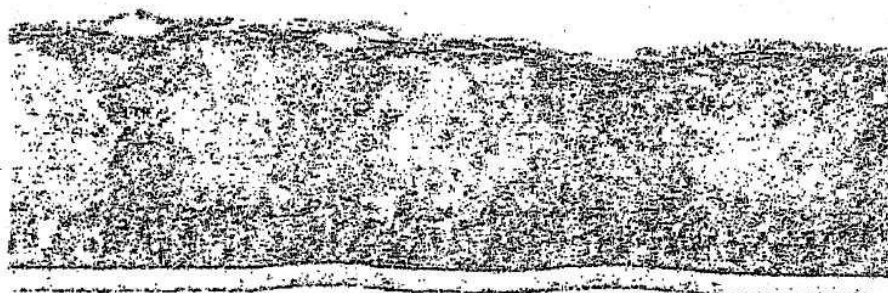
- крем PXTS+0,1 % AK205 викликав слабе, але показове посилення розмноження клітин базального рівня. Кількість забарвлених ядерних



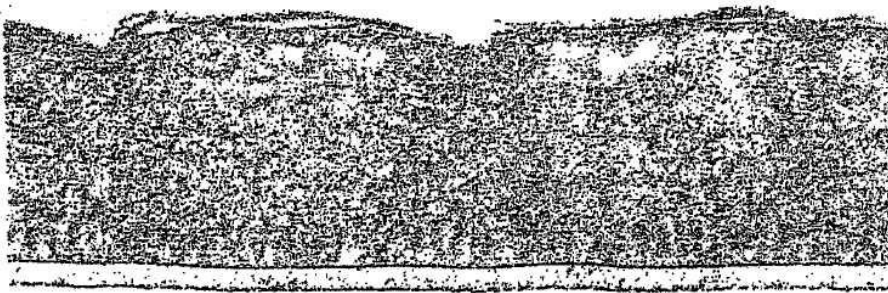
ситів подібна кількості на необроблених контрольних зразках (див. Фіг.4)

- крем PXTS+0,5 % AK205 викликав слабке, але показове посилення розмноження клітин базального рівня у порівнянні з необробленим контрольним зразком. Кількість забарвлених ядерних ситів вища за рівень на необробленому контрольному зразку, (див. Фіг.4)

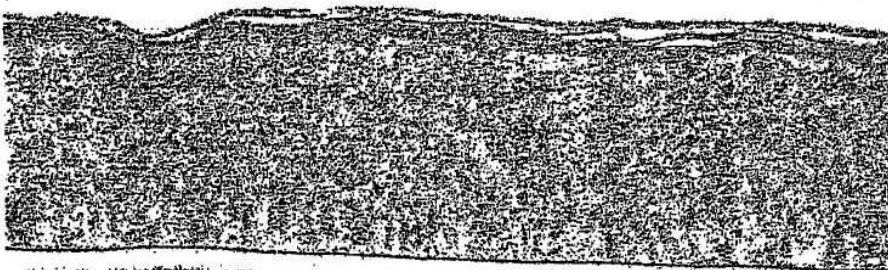
- клітинний ліофілізат (морський критмум) викликав значне посилення розмноження клітин базального шару у порівнянні з необробленим контрольним зразком. Кількість забарвлених ядерних ситів значно вища за рівень на необробленому контрольному зразку (див. Фіг.4).



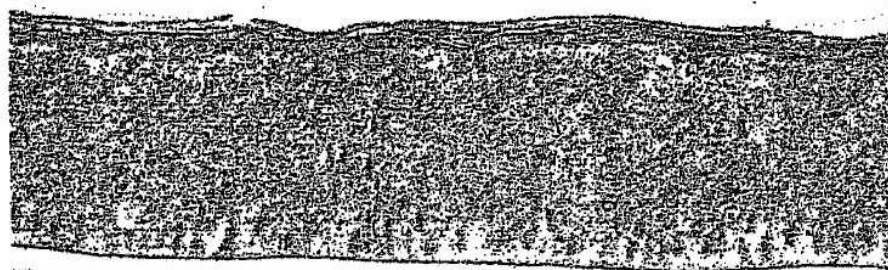
контрольний зразок



крем PXTS + 0,1% AK205



крем PXTS + 0,5% AK205

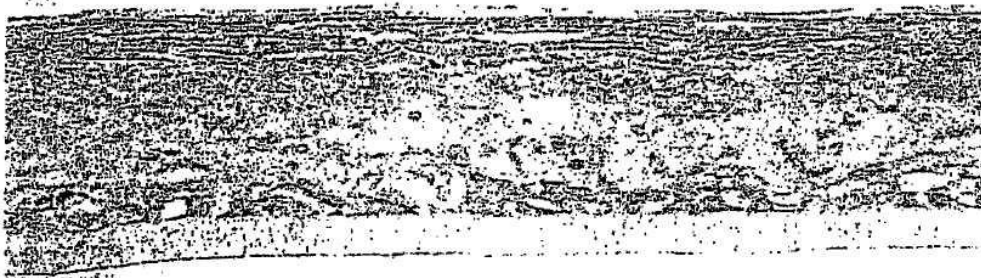


ліофілізат клітин (Критмум морський)

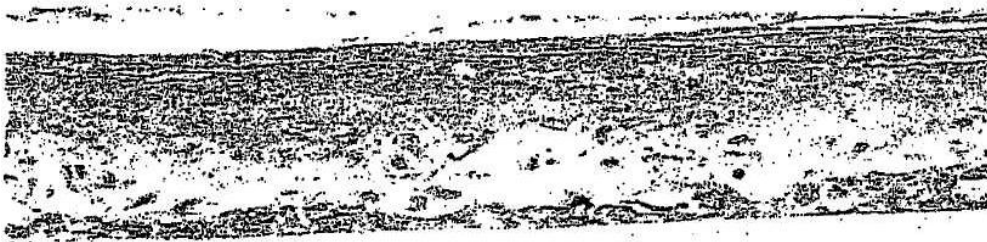
Фіг 1



негативний контрольний зразок



позитивний контрольний зразок  
(кислота койіque)

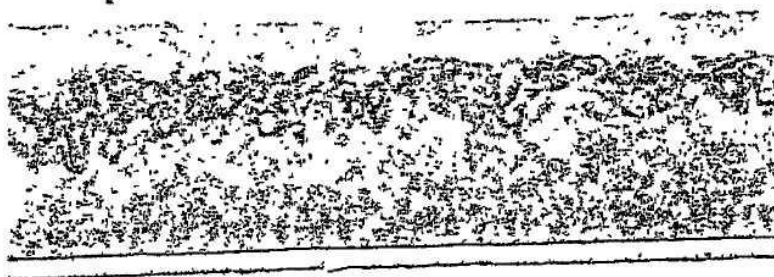


крем PXTS + 0,1% AK2O5



крем PXTS + 0,5% AK2O5

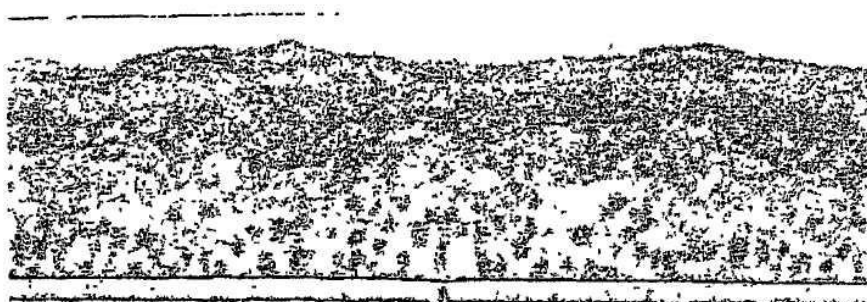
Fig 2



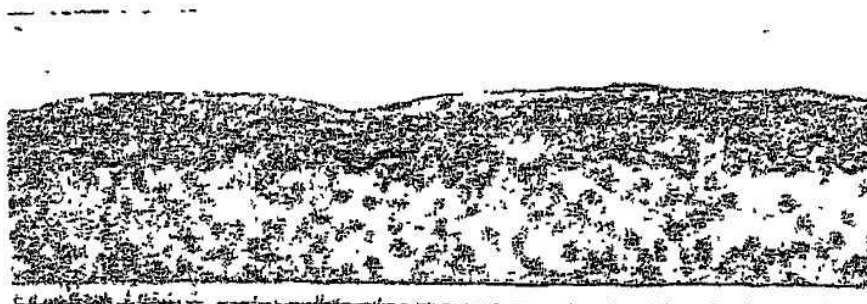
контрольний зразок



крем PXTS + 0,1% AK<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

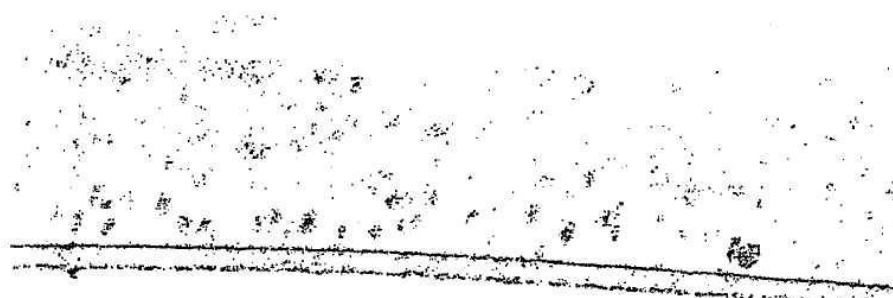


крем PXTS + 0,5% AK<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

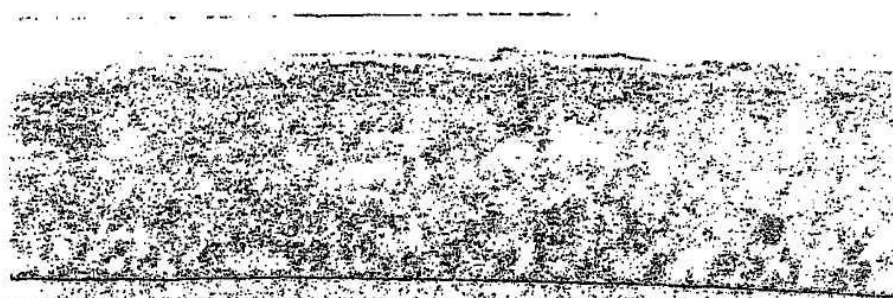


ліофілізат клітин (Критмум морський)

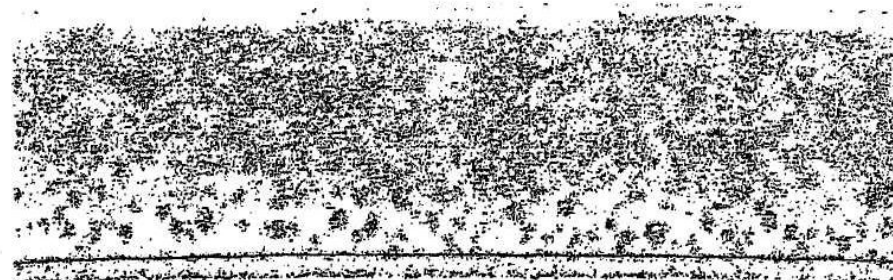
Фіг 3



контрольний зразок



крем PXTS + 0,1% AK2O5



крем PXTS + 0,5% AK2O5



ліофілізат клітин (Критмум морський)

Фіг 4