



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94394 (13) C2

(51) МПК

A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 19/04 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A23L 1/0532 (2006.01)

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

(54) ЛІОФІЛІЗОВАНИЙ ПРОДУКТ З КЛІТИН БУРИХ ВОДОРОСТЕЙ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ВИКОРИСТАННЯ

1

(21) a200709244
(22) 14.12.2005
(24) 10.05.2011
(86) PCT/FR2005/003125, 14.12.2005
(31) 0500389
(32) 14.01.2005
(33) FR
(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.
(72) МЕКІДЕШ НІКОЛЬ, FR
(73) БІОТЕКМАРІН, FR
(56) FR A 2489689, 12.03.1982
US A1 2003/017185, 23.01.2003
FR A 2844449, 19.03.2004
CH A 500711, 31.12.1970
FR A 2838341, 17.10.2003
JP A 2004075634, 11.03.2004
JP A 2002265313, 18.09.2002
(57) 1. Ліофілізований продукт клітин гаметофітів бурих водоростей, збагачених фукоксантином.
2. Ліофілізований продукт за п. 1, який **відрізняється** тим, що він включає принаймні 1 % фукоксантину.
3. Спосіб одержання ліофілізованого продукту за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що включає наступні етапи:
збір зрілих спорофітів;
емісія спор у пробірці;

2

пророщення спор у пробірці;
збір клітин гаметофітів;
ліофілізація одержаних клітин гаметофітів.
4. Косметичний препарат для місцевого застосування, який **відрізняється** тим, що містить ліофілізований продукт за одним із пп. 1, 2 як активний інгредієнт.
5. Косметичний препарат за п. 4, що містить зазначений ліофілізований продукт в межах від 0,2 до 5 % по вазі.
6. Харчова добавка, яка **відрізняється** тим, що включає ліофілізований продукт за одним із пп. 1, 2 як активний інгредієнт.
7. Застосування косметичного препарату за п. 4 або 5 для пігментації шкіри.
8. Застосування косметичного препарату за п. 4 або 5 для підготовки шкіри в разі дії на неї ультрафіолетових променів.
9. Застосування косметичного препарату за п. 4 або 5 для захисту шкіри від окислювальної дії, викликаной ультрафіолетовими променями.
10. Застосування косметичного препарату за п. 4 або 5 для захисту шкіри проти клітинного старіння.
11. Застосування харчової добавки за п. 6 для підготовки шкіри в разі дії на неї ультрафіолетових променів.

Цей винахід стосується ліофілізованого (висушеного заморожуванням) продукту клітин бурих водоростей, способу його отримання, косметичного складу, що його містить, харчової добавки, що його містить та використання цього продукту.

Галузь винаходу

Клас бурих водоростей, що також мають назву Фукофусеа або Фаеопусеае, належить до відділу Хромовітів (Chromophyta) або "кольорових водоростей", які часто називають золотистими водо-

ростями (Chrysophyta). Цей відділ охоплює водорості, клітини яких містять "додаткові" пігменти каротиноїду, такі як фукоксантин (fucosanthin), на додаток до пігментів хлорофілу: "а" та "с".

Клас бурих водоростей включає порядки: Ascoseirales, Chordariales, Cutleriales, Desmarestiales, Dictyosiphonales, Dictyotales, Durvilleales, Ectocarpales, Fucales, Laminariales, Notheiales, Scytosiphonales, Sphacelariales, Sporochnales, Syringodermatales та Tilopteridales.

(13) C2

(11) 94394

(19) UA

Всі фотосинтетичні організми використовують пігменти для накопичення світлової енергії, зазвичай у формі хлорофілу "а". Стандартний хлорофіл - хлорофіл "а", що є необхідним для передачі поглинутої світлової енергії до молекул, які використовують цю енергію. Більшість хлорофілових організмів має інші пігменти для поглинання більшої кількості світла, але накопичена енергія завжди має передаватися до молекули хлорофілу "а".

Бурі водорості використовують ряд таких "додаткових" пігментів як хлорофіл "с" та каротиноїди. *Phaeophyceae* мають більшу кількість каротиноїдів у своїх пластидах, які містять бурі та жовті пігменти, що визначають їхній характерний бурий колір. Найважливіший пігмент каротиноїду бурих водоростей - фукоксантин, назва якого походить від *Fucus*. Фукоксантин поглинає довжини хвиль від 500 до 580 нм.

Пігменти каротиноїду мають аліфатичну або аліциклічну структуру. Вони розчиняються у жирах, що сприяє їхній безпосередній інтеграції в деякі мембрани.

Таким чином, їхня розчинність у воді може виникнути тільки у тому випадку, коли вони пов'язані з іншими молекулами. Це також є причиною того, що їхній метаболізм найчастіше знаходиться у прямому зв'язку з метаболізмом ліпідів.

Каротиноїди також називаються додатковими пігментами, тому що вони мають передати енергію, накопичену хлорофілом "а". Ці пігменти загалом є відомими через каротин (*carotene*), що дав свою назву цій родині пігментів.

Єдиним джерелом каротиноїдів, зокрема для тварин та людей, є продукти харчування. Каротиноїди виконують функцію антиоксиданту у людській плазмі, зокрема для обміну жирів (ліпідів). Ця функція виражена також на рівні мембрани клітини, до якої вони включені.

Каротиноїди беруть безпосередню участь у фарбуванні шкіри (жовто-жовтогарячий колір), імітуючи природну засмагу.

Попереднє використання

Каротин використовується як харчова добавка, яку слід вживати за кілька днів до початку та протягом знаходження під променями сонячного світла, щоб прискорити загар. Бета-каротин є попередником вітаміну А. Споживання бета-каротину спричинює затримку спалаху сонячної еритеми. Вітамін А збільшує кількість меланіну, що виробляється під дією синього світла. Крім того, вітамін А відіграє антиоксидантну захисну роль. Вітаміни А та Е запобігають окислювальній денатурації меланіну під дією ультрафіолетового світла.

У відомих харчових добавках, каротин пов'язаний з вітаміном С, вітаміном Е або із флавоноїдами.

Недолік у використанні каротину для фарбування шкіри полягає в тому, що кінцевий колір є значно більш жовтогарячим ніж природна засмага. Крім того, він швидко деградує у вітамін А.

Астаксантин (*astaxanthin*) зарекомендував себе як потужний антиоксидант. Патентна заявка США за номером 6.433.025 описує оральне використання з метою запобігання та затримки засмаги.

Кантаксантин (*canthaxanthin*), ще один пігмент каротиноїду, використовувався як харчова добавка для фарбування шкіри та її захисту проти дії променів ультрафіолетового світла" (GB 1.323.800). Проте, подібне використання кантаксантину заборонене у Франції через небезпеку осліплення, у той час як на ринку США цей продукт знаходиться у продажу (*Canthorex, DELTA@ Laboratories*).

Рак шкіри або меланома, у Франції в наступні роки, будуть найчастішими, та вже зараз у США реєструється 800.000 випадків щороку. Найчастіше, це наслідок надмірно швидкого розмноження клітин шкіри під впливом мутацій ДНК, викликаних ультрафіолетовим світлом (UV).

Люди стають все більш поінформованими про цю небезпеку та готові захистити себе від сонця. Однак, засмагла шкіра все ще залишається привабливою та бажаною особливістю, що задовольняє існуючим естетичним критеріям.

Тому, виробники косметики та фармацевтичних препаратів продовжують досліджувати активні речовини для пігментації та захисту шкіри від шкідливої дії ультрафіолетових променів.

Резюме винаходу

Заявник випадково та знеацька виявив, що ліофілізований (висушений заморожуванням) продукт клітин бурих водоростей, зокрема гаметофітів (*gametophytes*) збагачених фукоксантином, дозволяє досягати цієї комбінації бажаних ефектів: він пігментує епідерміс цілковито безпечним способом, стимулюючи меланогенез (*melanogenesis*), навіть без ультрафіолетового опромінення, при цьому захищаючи шкіру шляхом анти-радикальної дії та стимулювання її регенерації.

Фактично, бурі водорості мають комплексний дигенетичний цикл. Для порядку ламінарієвих (*Laminariales*) (дивіться Фігуру 1) спостерігається чергування між диплоїдним спорофітом, розвиненим у макроскопічному таломі (*thallos*), та мікроскопічними чоловічими гаметофітами та жіночими гаплоїдами. У цьому випадку, гаметофіти - це тільки сукупність клітин, що є результатом різних мітозів спори.

Гаметофіт є лише перехідною стадією утворення гамет. Оскільки він не розвивається у справжній талом, він є слабо фотосинтетичним та містить максимальну кількість захисних пігментів фукоксантину, у порівнянні із справжніми пігментами фотосинтезу, якими є хлорофіли.

Таким чином, Заявник вибрав цю стадію гаметофітів для отримання ліофілізованого продукту клітин бурих водоростей із надзвичайним збагаченням на фукоксантин, простим та недорогим способом, порівняно із класичним екстрактом фукоксантину, з біомаси, що наявна в необмеженій кількості протягом цілого року.

Детальний опис винаходу

Таким чином, першим предметом даного винаходу є ліофілізований продукт клітин бурих морських водоростей, збагачених на фукоксантин, що зокрема містять принаймні 1% фукоксантину. Зазначені клітини бурих водоростей є переважно спорами або гаметофітами, зокрема перевага надається, гаметофітам.

Другим предметом даного винаходу є процес отримання ліофілізованого продукту із гаметофітів клітин бурих водоростей, що включає наступні етапи:

- збір зрілих спорифітів;
- емісія спор у пробірці;
- пророщення спор у пробірці;
- збір гаметофітних клітин;
- ліофілізація отриманих гаметофітних клітин.

"Зрілий спорифіт" означає спорифіт, що містить спори у спеціальних вмістилищах, наприклад у сорусах.

Третім предметом даного винаходу є косметичний препарат для місцевого застосування, що містить ліофілізований продукт відповідно до винаходу, в якості активного компоненту, переважно в межах від 0.2 до 5% у вазі, більш переважно, від 1 до 2% у вазі.

Четвертим предметом даного винаходу є харчова добавка, що включає ліофілізований продукт відповідно до винаходу, в якості активного компоненту.

Косметичний препарат відповідно до винаходу може використовуватися для пігментації шкіри, для підготовки шкіри в разі дії на неї ультрафіолетових променів, для захисту шкіри від окислювальної дії, викликаній ультрафіолетовими променями та/або для захисту шкіри проти клітинного старіння.

Харчова добавка відповідно до винаходу може використовуватися для підготовки шкіри в разі дії на неї ультрафіолетових променів.

Опис фігур

Фігура 1: цикл розмноження ламінарієвих (Laminariales);

Фігура 2: ділянки епідермісу, оброблені/необроблені, протравлені гематоксиліном/еоїном/шафраном (HES - hematoxylin/eosine/safran).

Приклад 1: Отримання гаметофітів бурих водоростей - ламінарієвих

Гаметофітні клітини були отримані для наступних різновидів: ламінарії цукристої (*Laminaria saccharina*), ламінарії північної (*Laminaria hyperborea*), аларії їстівної (*Alaria esculenta*), ундарії пір'ястої (*Undaria pinnatifida*).

Було зібрано талом родючих зрілих спорифітів, що містив соруси (див. Фігуру 1), у день J0, на французькому узбережжі у Бретані, між жовтнем та лютим.

Вони були промиті фільтрованою морською водою та порізані на шматки від 5 до 10 см², які послідовно опускалися у фільтровану морську воду, білизна 0.2% протягом 20-30 секунд, у двох ємкостях з фільтрованою морською водою.

Потім, частини талом були висушені на поглинаючому папері, шляхом розкладання по 30 частин на одному аркуші поглинаючого паперу, при чому аркуші поглинаючого паперу скручувалися у рулон.

Аркуші скрученого поглинаючого паперу, що містять частини талом, інкубувалися протягом 12 годин при температурі 15°C. Потім вони були поміщені у фільтровану морську воду і згодом, були отримані спори.

Спори виведені у визначеному середовищі культури, що містить 0.1% розчину Провасолі (Provasoli) (див. Таблицю 1), у колбі, що до якої проникало світло (1800-2000 люксів цілодобово) та з незначним збовтуванням.

Температура підвищувалася на половину градусу щодня до 22°C. Середовище оновлювалося кожних два тижні.

Спори проростають протягом 6-20 днів вирощування, а врожай гаметофітів збирають через 10-12 днів після пророщування (див. Таблицю 2).

Таблиця 1

Склад розчину Провасолі для 1L

EDTA (етилендіамінтетраацетат)	3 г
Fe(Cl)	0.08 г
Mn(Cl)	0.12 г
Zn(Cl)	0.015 г
Co(Cl)	0.003 г
Ca(SO ₄)	0.0012 г
B(H ₃ BO ₃)	0.6 г
Mo(Na ₂ MoO ₄)	0.05 г

Таблиця 2

Різновид	Період пророщування дні	Отримання гаметофітів дні
Ламінарія цукриста	9	J19-J21
Ламінарія північна	11-20	J21-J32
Аларія їстівна	6-1	J16-J19
Ундарія пір'яста	1	J17-J19

Приклад 2: Отримання ліофілізованого продукту з клітин гаметофітів бурих водоростей

Пригнічення розвитку гаметофітів у канаміцин-сульфатному середовищі вільному від двоокису германію з метою запобігання проростання проростків.

Культура фільтрується на решеті, клітини обполіскуються морською водою та ліофілізуються у ліофільній сушарці.

З метою введення фукоксантину шляхом рідинної хроматографії високого тиску (HPLC), готується екстракт етанолу при 0.05% ліофілізованого продукту для 10 мл. 70%-ого етанолу, що розміщується протягом 6 годин у темряві, а потім фільтрується.

Аналіз HPLC виконується на адсорбційній колоні "Absorbsphere" (компанії Alltech) з розчинником/градієнтом:

A = ацетат/метанол амонію (20:80)

B = ацетонітрил 90%

C = ацетат етилу

Приклад 3: Приготування продукту "BB"

Ліофілізований продукт з гаметофітів морської водорості ундарії пір'ястої (*Undaria pinnatifida*) (Ламінарієві) готується відповідно до Прикладу 2.

З метою використання цього ліофілізованого продукту належним чином на шкірі, ліофілізований продукт знову розміщується в середовищі культури гаметофітів. Ця суміш обробляється ультразву-

ком, а потім фільтрується. Фільтрований продукт, отриманий таким способом, називається "BB".

Приклад 4: Оцінка слизової толерантності ліофілізованого продукту з гаметофітів клітин бурих водоростей у дослідженнях цитотоксичності на реконструйованій роговій оболонці SKINETHIC®

1. - Опис досліджу

Використовувалися кератіноцити (Keratinocytes) лінії TR 146, довільно перетворені та посилені клітинною культурою у визначеному модифікованому середовищі MCDB 153.

При культивуванні у повітряному/рідкому визначеному середовищі, ці людські кератіноцити формують багатошаровий епітелій без шару роговиці, подібного до людської роговиці.

Продуктом, що має досліджуватися, у цьому випадку, є продукт "BB" відповідно до Прикладу 3, що застосовується в об'ємі 30 мл на поверхні восьми еквівалентних культур з використанням мікропіпетки. Ці культури згодом інкубуються при 37°C, 5% CO₂, протягом 10 хвилин, 1 години, 3 годин та 24 годин, за нормою - дві культури за інкубаційний період.

Були підготовлені в стерильних умовах негативний (буферізований розчин солі) та позитивний (SDS 0.5% та 1%) контрольні розчини, що застосовувалися однаковою способом до двох культур, відповідно.

Ці культури згодом інкубуються при 37°C, 5% CO₂, протягом 1 години та 24 годин, за нормою - дві культури за інкубаційний період.

2. - Оцінка клітинної життєздатності

Клітинна життєздатність надалі обмірювалася якісно після маркування барвником. За допомогою

тесту МТТ вимірюється активність мітохондріальної дегідрогенази живих клітин. Ключовим компонентом є 3-[4,5-діметилтіазол-2-у1]-2,5-діфеніл тетразоліум бромід або МТТ.

Розчини солі, буферізовані МТТ, за відсутності червоного фенолу, мають жовтий колір. Мітохондріальна дегідрогеназа живих клітин перериває цикл тетразоліуму у такий спосіб призводячи до формування фіолетових кристалів формазану, нерозчинних у водних розчинах.

Кристали, сформовані живими клітинами затримуються у полікарбонатних фільтрах, які забезпечують підтримку епітеліальних культур. Культури набувають однорідного інтенсивного синього/фіолетового кольору, якщо вони життєздатні, але залишаються білими/жовтими у випадку загибелі клітини.

Результати порівнюються з негативним та позитивним контрольними розчинами.

0.15 мл середовища культури, що містить 10% об'єму розчину МТТ наноситься піпеткою на кожний фільтр підтримки культури. Після інкубації протягом 30 хвилин в умовах кімнатної температури перевіряється колір різних культур.

Негативні контрольні культури повинні мати інтенсивний синій/фіолетовий колір, що є доказом життєздатності слизової оболонки після контакту протягом 24 годин.

Позитивні контрольні культури повинні мати білий колір, що є доказом загибелі клітин, починаючи з 1-ої години контакту.

3. - Результати

Таблиця 3

Продукт	Колір обох культур				Токсичність
	10 хвилин	1 година	3 години	24 години	
BB	синій	синій	синій	білий	N1
Негативний контрольний розчин	синій	синій	синій	синій	N1
SDS 0.5%	синій	білий	білий	/	I
SDS 1%	білий	білий	/	/	VI

N1 = не подразнюючий

I = подразнюючий

VI = дуже подразнюючий

4. - Висновок

В умовах проведення досліджу, продукт "BB" відповідно до Прикладу 3, досліджений у чистому вигляді, не спричинює подразнення клітин, що формують модель SKINETHIC® у пробірці реконструйованої слизової оболонки.

Приклад 5: Оцінка шкірної толерантності ліофілізованого продукту з гаметофітів клітин бурих водоростей у дослідженнях цитотоксичності на реконструйованій епідермічній шкірі SKINETHIC®

1 - Опис досліджу

Кератіноцити людського походження розміщувалися на полікарбонатних фільтрах розміром 0.63 см² у визначеному та доповненому середовищі (модифікована MCDB 153). Клітини культивувалися протягом 10 днів у повітряному/рідкому

середовищі, при чому середовище культури поновлювалося кожних два дні.

Епідерміс, сформований у такий спосіб, використовувався для проведення дослідження, починаючи з 14-ого дня культури.

Тест виконувався на трьох екземплярах після інкубації продукту протягом 24 годин за нормою 2 мл епідермісу.

Контрольний епідерміс не отримував жодного продукту.

Епідерміс, поміщений у 10% формальдегідний розчин, зберігався у парафінових блоках. Вертикальні частки 4 мікронів були протравлені сумішшю HES (гематоксилін/еозин/шафран), та за допомогою оптичного мікроскопу були зроблені фотографії.

Якщо продукт є нетоксичним, культури повинні мати базальні, шиповидні, гранульовані шари клітин та неушкоджену ортокератозну роговицю, а стратифікація шкіри повинна бути регулярною та нормальною. Клітини базального шару повинні бути поляризовані вертикально. Численні кератогіалінові зерна мають бути чітко видимі (у фіолетовому кольорі) у гранульованому шарі безпосередньо під шаром роговиці.

2 - Результати

Див. Фігуру 2

3. - Висновок

В умовах проведення дослідів, продукт "BB" відповідно до Прикладу 3, досліджений у чистому вигляді, виявився не цитотоксичним для реконструйованої шкіри SKINETHIC®.

Приклад 6: Тестування пігментації

1. - Матеріали та методи

Продукт "BB" розчиняється в етанолі, а потім додається до косметичного складу.

Тестувалися наступні продукти:

а - продукт "BB" включений до складу при 0.05%

б - продукт "BB" включений до складу при 0.15%

с - продукт "BB" включений до складу при 0.30%

Усі продукти зберігалися при температурі 4°C аж до їхнього використання.

2. - Біохімічна оцінка

Наприкінці інкубації, меланін, що міститься в лізатах клітини був обчислений кількісно за допомогою спектроскопічного методу. Вимірювання вмісту меланіну здійснювалося паралельно з аналізом.

Результати виражені в мг меланіну на 1 мл лізату захисного шару клітин (середній показник +/- стандартне відхилення SD).

Статистичне значення спостережуваних розходжень між "обробленими" умовами та "контрольними" умовами оцінювалося шляхом аналізу різниці щодо фактору (One Way ANOVA), що супроводжувався тестом Бонферроні "t-test" (*:p<0.05; **:p<0.01).

Таблиці 4, 5 та 6: біохімічне визначення кількості меланового вмісту у реконструйованому обробленому/необробленому меланізованому епідерміс людини:

Таблиця 4

Без ультрафіолетового випромінювання	Тільки середовище	α -MSH 100 nM	ЕТОН BB			
			0.05	0.15	0.3	0.15 без повторного застосування
Меланін (мг/мл)	47.3	70.3	56.6	59.9	69.1	70.3
	67.3	86.9	58.7	60.5	77.2	69.0
	75.8	85	56.1	66.1	56	58.5
Середній показник	57.3	80.7	57.1	62.2*	73.1**	69.6*
S.D.	14.1	9.1	1.3	3.4	5.7	0.9
% тільки середовище	100	141	100	108	128	122
% ЕТОН BB 0.05			100	108.8	128	121.9

Таблиця 5

+ Ультрафіолетове випромінювання	Тільки середовище	α -MSH 100 nM	ЕТОН BB			
			0.05	0.15	0.3	0.15 без повторного застосування
Меланін (мг/мл)	57.4	95.6	69.7	63.5	64.7	61.2
	73.9	84.7	66.3	64.1	66.3	66.3
	73.4	107.9	57.3	65.7		
Середній показник	68.2	96.1	64.5	64.4	65.5	62.6
S.D.	9.4	11.6	6.4	1.2	1.2	3.3
% тільки середовище	100	141	94	94	96	92

Таблиця 6

+ Ультрафіолетове випромінювання	Тільки середовище	α -MSH 100 nM	ЕТОН BB			
			0.05	0.15	0.3	0.15 без повторного застосування
Меланін (мг/мл)	82.6	99.5	60.7	64.6	40.1	44.8
	91.4	115.5	65.8	66.1	30.9	65.3
	75.3	104.6	67.1	70.5	38.7	64.5
Середній показник	83.1	106.5	64.5	67.1	36.6	58.2
S.D.	8	8.2	3.4	3.1	5	11.6
% тільки середовище	100	128	78	81	44	70

3. - Гістологічна оцінка

Зразки епідермісу шкіри розміщувалися у розчині формальдегіду після завершення інкубації, а потім зберігалися у парафінових блоках. Згодом частини завтовшки 4 мікронів зрізалися.

Меланін, що міститься у зрізах шкіри, проявлявся шляхом протравлювання спеціальним реагентом "Fontana Masson". Слайди відповідно до зазначених умов виконувалися з 400-кратним збільшенням. Видимий меланін на цих слайдах обчи-

лювався кількісно шляхом аналізу зображення з використанням програми "Image J".

Результати виражені у формі поверхні, яку займає меланін (кількість пікселів, сіра шкала яких знаходиться в межах від 0 до 100; 0 = чорний/255 = білий) на кожному слайді (середній показник +/- стандартне відхилення, SD).

Статистичне значення спостережуваних розходжень між обробленими умовами та контрольними умовами оцінювалося шляхом тесту Стюдента (*:p<0.05, **:p<0.01; ***:p<0.001).

Таблиця 7

Визначення кількості меланового вмісту у реконструйованому обробленому/необробленому меланізованому епідермісі людини шляхом аналізу зображення:

Без ультрафіолетового випромінювання	Тільки середовище	α -MSH 100 nM	ЕТОН ВВ			
			0.05	0.15	0.3	0.15 без повторного застосування
Поверхня, яку займає меланін (пікселів)	24131	38565	22754	29849	22821	22036
	17119	25757	16628	15245	15368	19500
	30306	42233	16392	36248	20144	25949
	13966	55615	12954	7678	19722	16277
	9673	51363	22308	6990	21260	11746
	19100	43652	7362	10329	18916	19408
	13226	44188	4473	10212	20203	42503
	20874	44053	17132	22152	25844	19002
	26733	22738	17195	25753	17680	30479
	18715	34614	9717	15909	17895	14747
Середній показник	19384.3	40277.8	14691.5	18036.5	19985.3*	22164.7*
S.D.	6370.9	10308.4	6034.9	10055.1	2911.3	8944.6
% тільки середовище	100	208	76	93	103	114
% ЕТОН ВВ 0.05	-	-	100	122.8	136	150.9

4. - Результати

Склад "ЕТОН ВВ 0.15" збільшує вміст меланіну у реконструйованому механізованому епідермісі людини, до якого не застосовувалося UVA або UVB, без повторного застосування (+22% відповідно до біохімічного аналізу, +51% відповідно до аналізу зображення).

Склад "ЕТОН ВВ 0.3" значно збільшує вміст меланіну у реконструйованому меланізованому епідермісі людини, до якого не застосовувалося UVA або UVB (+28% відповідно до біохімічного аналізу, +36% відповідно до аналізу зображення).

Приклад 7: Ефект транспортування макромолекул:

7.1 - Оцінка швидкості транспортування макромолекул (глюцидів, ліпідів та протеїнів) у системі ізольованих мікросом. Прямий ефект продукту "ВВ" на ізольовані мікросоми:

Мікросоми людських кератиноцитів формують мембранну фракцію, отриману шляхом швидкодійного диференціального центрифугування гомогенату клітини. Ця підготовка мікросом вимагає додавання екзогенних кофакторів типу NADPH.

7.1.1 - Транспортування глюцидів (глюкози)

Дослідження проводилося на трьох екземплярах після прямої обробки мікросом.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (0.25 мМ флоретину).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 0.25 мМ флоретином та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Отримані мікросоми із людських кератиноцитів у культурі тричі промивалися буферним розчином PBS без глюкози, потім преінкубувалися в 1 мл того ж самого буферного розчину протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Згодом, цей розчин зливався, а мікросоми були поміщені в буферний розчин PBS без глюкози, що містив 3-0-метилглюкози (MG) та [³H] 3-0- MG, який перемішувався на водяній бані при температурі 37°C. Захоплення 3-0- MG зупиняється шляхом додавання 1 мл холодного розчину PBS, що містить цитохалазин В. Кінетика інкубації мала місце між 30 та 120 секундами. Надалі мікросоми обполіскувалися двічі розчином PBS, а потім розчинялися в NaOH (1M) при 4°C, протягом однієї ночі. Радіоактивність визначалася за допомогою сцинтиляційного лічильника.

Була здійснена обробка мікросом лише продуктом "ВВ" або в присутності флоретину одночасно

із введенням $[^3\text{H}]$ 3-0- MG в інкубаційне середовище.

Аналіз протеїну виконувався відповідно до Бредфордського методу. Збільшення поглинаючої

здатності при 595 нм, що визначалося за допомогою спектрофотометра, є пропорційним концентрації протеїну.

Результати:

	Захоплення $[^3\text{H}]$ 3-0- MG мг (nmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	9	15	19	21
BB 1/10	10	14	20	22
BB 1/5	9	15	20	22
BB 1/2	11	16	21	21
Флоретин (0.25 мМ)	4	6	8	8
BB (1/10) + Флоретин	5	11	17	19
BB (1/5) + Флоретин	6	12	18	21
BB (1/2) + Флоретин	7	14	18	22

Отримані результати, після прямої обробки мікросом кератіноцитів продуктом "BB" у зазначених концентраціях, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування глюкози. Кінетика захоплення глюкози за фізіологічних умов є квазіідентичною у контрольних мікросомах та мікросомах, оброблених продуктом "BB" у використовуваних 3 концентраціях.

Пряма обробка мікросом флоретином у значній мірі пригнічує швидкість транспортування глюкози. Обробка мікросом продуктом "BB" у зазначених 3 концентраціях одночасно з флоретином суттєво відновлює швидкість транспортування глюкози. Кінетика захоплення глюкози, за умов пригнічення, в повній мірі відновлюється завдяки продукту "BB" у 3 використовуваних концентраціях.

7.1.2 - Транспортування ліпідів

Дослідження проводилося на трьох екземплярах після прямої обробки мікросом.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (1 мМ дифенгідрамін).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 1 мМ дифенгідраміном та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Отримані мікросоми із людських кератіноцитів у культурі тричі промивалися у 25 мМ буферного розчину Триса, потім преінкубувалися в 1 мл того ж самого буферного розчину протягом 30 хвилин при температурі 37°C. Згодом, цей розчин зливався, а мікросоми були поміщені у 25 мМ буферного розчину Триса, що містив $[^3\text{H}]$ холін, який перемішувався на водяній бані при температурі 37°C. Захоплення холіну було зупинено шляхом додавання буферного розчину лізісу, що містив (50 мМ Трису, 140 мМ NaCl, 1.5 мМ MgSO₄, 0.5% Ірепал-Са-630, 0.2% SDS). Кінетика інкубації мала місце між 30 та 120 секундами. Надалі мікросоми обполіскувалися двічі розчином PBS, а потім розчинялися в NaOH (1М) при температурі 4°C протягом однієї ночі. Радіоактивність визначалася за допомогою сцинтиляційного лічильника.

Була здійснена обробка мікросом лише продуктом "BB" або в присутності дифенгідраміну (DPA) одночасно із введенням $[^3\text{H}]$ холіну в інкубаційне середовище.

Аналіз протеїну виконувався відповідно до Бредфордського методу. Збільшення поглинаючої здатності при 595 нм, що визначалося за допомогою спектрофотометра, є пропорційним концентрації протеїну.

Результати:

	Захоплення $[^3\text{H}]$ холін (pmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	155	201	261	301
BB 1/10	175	212	268	310
BB 1/5	163	210	277	321
BB 1/2	194	240	289	312
DPA (1 IriM)	74	105	132	142
BB (1/10)+DPA	100	121	153	183
BB (1/5)+ DPA	113	131	168	199
BB (1/2)+ DPA	125	140	189	223

Отримані результати, після прямої обробки мікросом кератіноцитів продуктом "BB" у зазначених концентраціях, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування ліпідів. Кінетика захоплення холіну за фізіологічних умов є квазіідентичною у контрольних мікросомах та мікросомах, оброблених продуктом "BB" у використовуваних 3 концентраціях.

Отримані результати свідчать, що пряма обробка мікросом дифенгідраміном у значній мірі пригнічує швидкість транспортування ліпідів. Обробка мікросом продуктом "BB" у зазначених 3 концентраціях одночасно з дифенгідраміном відновлює швидкість транспортування ліпідів. Кінетика захоплення холіну, за умов пригнічення, в сере-

дньому ступені відновлюється завдяки продукту "BB" у 3 використуваних концентраціях.

7.1.3 - Транспортування протеїнів (альбуміну)

Дослідження проводилося на трьох екземплярах після прямої обробки мікросом.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (нокодазол, 6 мг/мл).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 6 мг/мл нокодазолом та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Отримані мікросоми із людських кератиноцитів у культурі тричі промивалися буферним розчином, потім преінкубувалися в 1 мл того ж самого буферного розчину протягом 30 хвилин при температурі 3°C. Згодом, цей розчин зливався, а мікросоми були поміщені у буферний розчин HBSS, що містить альбумін-FITC, який перемішувався на водяній бані при температурі 37°C. Захоплення альбуміну

було зупинено шляхом додавання розчину Рінгера, що містив 122.5 мМ NaCl; 5.4 мМ KCl; 1.2 мМ CaCl₂; 0.8 мМ MgCl₂; 0.8 Na₂HPO₄; 0.2 NaHPO₄; 5.5 мМ глюкози; 10 мМ HEPES, pH 7.4. Надалі мікросоми оброблялися розчином Тритон X-100 у (0.1% v/v у 3-(N-морфоліні) пропансульфоновій кислоті 20 мМ, pH 7.4). Флюоресценція визначалася кількісно за допомогою спектрофотометру (збудження 480 нм: емісія 520 нм). Кінетика інкубації мала місце між 30 та 120 секундами.

Була здійснена обробка мікросом лише продуктом "BB" або в присутності нокодазолу (ND) одночасно із введенням альбумін-FITC в інкубаційне середовище.

Аналіз протеїнів виконувався відповідно до Бредфордського методу.

Збільшення поглинаючої здатності при 595 нм, що визначалося за допомогою спектрофотометра, є пропорційним концентрації протеїнів.

Результати:

	Захоплення альбумін-FITC (µg/mg протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	0.32	0.45	0.55	0.75
BB 1/10	0.3	0.47	0.59	0.74
BB 1/5	0.37	0.5	0.62	0.76
BB 1/2	0.4	0.55	0.67	0.8
ND (6 mg/ml)	0.11	0.29	0.34	0.43
BB (1/10) +ND	0.12	0.3	0.33	0.41
BB (1/5)+ND	0.19	0.33	0.38	0.49
BB (1/2)+ND	0.23	0.38	0.44	0.57

Отримані результати, після прямої обробки мікросом кератиноцитів продуктом "BB" у зазначених концентраціях, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування протеїнів. Кінетика захоплення альбуміну за фізіологічних умов є квазіідентичною у контрольних мікросомах та мікросомах, оброблених продуктом "BB" у використуваних 3 концентраціях.

Отримані результати свідчать, що пряма обробка мікросом нокодазолом у значній мірі пригнічує швидкість транспортування ліпідів. Обробка мікросом продуктом "BB" у концентраціях 1/5 та 1/2 одночасно з нокодазолом у середньому ступені відновлює швидкість транспортування ліпідів. Жодного ефекту не було помічено при концентрації 1/10.

7.2 - Оцінка швидкості транспортування макромолекул на рівні звичайних людських кератиноцитів

Застосовувався метод культивування тканини у штучному середовищі, що дозволяє отримувати, шляхом біопсії людської шкіри, кератиноцити у первинних культурах. Дослідження проводилося на кератиноцитах між 2-ою та 4-ою ділянками, з метою забезпечення відновлення між різними дослідженнями.

Кератиноцити поділялися на багатоджерельні пластини (6 джерел) за кількістю 10⁵ клітин на 1 джерело у 1 мл середовища культури SKINETHIC, з додаванням інсуліну та гідрокортизону. Клітини інкубувалися в присутності та за відсутності досліджуваного продукту.

7.2.1 - Транспортування гліюцидів (глюкози)

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на культурі звичайних людських кератиноцитів.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (0.25 мМ флоретину).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом.

Проба 6-8: обробка 0.25 мМ флоретином та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності та за відсутності 0.25 мМ флоретину протягом 20 хвилин при температурі 37°C. Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення [³H] 3-О-метил-глюкози було прийнято для визначення швидкості транспортування глюкози (див. параграф 7.1.1).

Результати:

	Захоплення [^3H] 3-О- MG (nmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	6	12	15	19
BB 1/10	7	10	16	17
BB 1/5	8	13	17	18
BB 1/2	10	14	18	20
Флоретин (0.25 мМ)	6	8	9	10
BB (1/10) + Флоретин	6	10	15	18
BB (1/5) + Флоретин	7	13	16	19
BB (1/2) + Флоретин	8	13	17	18

Отримані результати, після обробки звичайних кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування глюкози. Кінетика захоплення глюкози за фізіологічних умов є квазіідентичною у контрольних мікросомах кератиноцитів та мікросомах кератиноцитів, оброблених продуктом "BB" у використовуваних 3 концентраціях.

Обробка звичайних кератиноцитів флоретином, до відділення мікросом, у значній мірі пригнічує швидкість транспортування глюкози. Обробка звичайних кератиноцитів продуктом "BB" у зазначених 3 концентраціях одночасно з флоретином суттєво відновлює швидкість транспортування глюкози. Кінетика захоплення глюкози, за умов пригнічення, в повній мірі відновлюється завдяки продукту "BB" у 3 використовуваних концентраціях.

7.2.2 - Транспортування ліпідів

	Захоплення [^3H] холіну (pmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	142	173	202	215
BB 1/10	151	163	198	223
BB 1/5	162	178	207	227
BB 1/2	174	191	218	231
DPA (1 мМ)	92	115	143	156
BB (1/10) + DPA	112	128	159	174
BB (1/5) + DPA	119	132	165	179
BB (1/2) + DPA	127	139	174	191

Отримані результати, після обробки звичайних кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування ліпідів. Кінетика захоплення холіну за фізіологічних умов є квазіідентичною у контрольних мікросомах кератиноцитів та мікросомах кератиноцитів, оброблених продуктом "BB" у використовуваних 3 концентраціях.

Обробка звичайних кератиноцитів дифенгідраміном, до відділення мікросом, у середньому ступені пригнічує швидкість транспортування ліпідів. Обробка звичайних кератиноцитів продуктом "BB" у зазначених 3 концентраціях одночасно з дифенгідраміном відновлює швидкість транспортування ліпідів. Кінетика захоплення холіну, за умов пригнічення, в середньому ступені відновлюється завдяки продукту "BB" у 3 використовуваних концентраціях.

7.2.3 - Транспортування протеїнів (альбуміну)

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на культурі звичайних людських кератиноцитів.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (1 мМ дифенгідрамін).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 1 мМ дифенгідраміном та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності 1 мМ дифенгідраміну протягом 120 хвилин при температурі 37°C. Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення [^3H] холіну було прийнято для визначення швидкості транспортування холіну (див. параграф 7.1.2).

Результати:

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на культурі звичайних людських кератиноцитів.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (нокодазол, 6 мг/мл).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 6 мг/мл нокодазолом та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності та за відсутності нокодазолу, 6 мг/мл, протягом 120 хвилин при температурі 37°C. Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення альбуміну-FITC було прийнято для визначення швидкості транспортування альбуміну (див. параграф 7.1.3).

Результати:

	Захоплення альбумін-FITC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ протеїнів)			
	30 сек.	60 сек.	90 сек.	120 сек.
Негативний контроль	0.25	0.39	0.45	0.61
BB 1/10	0.24	0.40	0.48	0.63
BB 1/5	0.28	0.44	0.52	0.67
BB 1/2	0.31	0.46	0.54	0.73
S.D. (6 mg/ml)	0.09	0.22	0.26	0.37
BB (1/10) + S.D.	0.1	0.24	0.26	0.39
BB (1/5) + S.D.	0.12	0.27	0.30	0.41
BB (1/2) + S.D.	0.16	0.29	0.36	0.47

Отримані результати, після обробки звичайних кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчать про відсутність пригнічення швидкості транспортування протеїнів. Кінетика захоплення альбуміну за фізіологічних умов є ідентичною у контрольних мікросомах кератиноцитів та мікросомах кератиноцитів, оброблених продуктом "BB" у концентрації 1/10. Незначне прискорення швидкості транспортування протеїнів відмічається для концентрацій 1/2 та 1/5.

Обробка звичайних кератиноцитів нокодазолом, до відділення мікросом, пригнічує швидкість транспортування протеїнів. Обробка звичайних кератиноцитів продуктом "BB" у зазначених 2 концентраціях одночасно з нокодазолом у середньому ступені відновлює швидкість транспортування протеїнів. Жодного ефекту не було помічено при концентрації 1/10.

7.3 - Оцінка швидкості транспортування макромолекул на рівні людських кератиноцитів у процесі старіння

Старіння - явище клітинного старіння, коли клітини зупиняються на стадії G1 клітинного циклу та ніколи не входять у стадію синтезу, що веде до поділу клітин. Старіючі клітини характеризуються своїм повільним метаболізмом при синтезі та транспортуванні на рівні макромолекул.

Клітини в культурі, позбавленій сироватки, припиняють свій ріст, але продовжують прогресувати через клітинний цикл до тих пір, поки вони не досягнуть стадії G1.

Метод, що застосовувався, дозволяє отримувати, шляхом біопсії людської шкіри, кератиноцити у первинних культурах. Дослідження проводилося на кератиноцитах між 8-ою та 10-ою ділянками, з метою забезпечення наявності старіючих клітин на рівні контрольних клітин.

Кератиноцити висівалися на багатоджерельні пластини (6 джерел) за кількістю 10^5 клітин на 1 джерело у 3 мл середовища культури SKINETHIC, з додаванням EGF, гідрокортизолу, інсуліну та гентаміцину. Потім вони утримувалися протягом 5 днів в інкубаторі з CO_2 .

7.3.1 - Транспортування гліюцидів (глюкози)

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на людських кератиноцитах на стадії старіння.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (0.25 мМ флоретину).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом.

Проба 6-8: обробка 0.25 мМ флоретином та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності та за відсутності 0.25 мМ флоретину протягом 20 хвилин при температурі 37°C . Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення [^3H] 3-0-метил-глюкози було прийнято для визначення швидкості транспортування глюкози (див. параграф 7.1.1).

Результати:

	Захоплення [^3H] 3-0- MG (nmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	30 сек.	30 сек.	30 сек.
Негативний контроль	3	5	10	11
BB 1/10	4	8	12	12
BB 1/5	6	8	13	13
BB 1/2	7	10	14	15
Флоретин (0.25 мМ)	1	3	5	7
BB (1/10) + Флоретин	3	5	7	8
BB (1/5) + Флоретин	5	8	9	11
BB (1/2) + Флоретин	6	10	12	13

Отримані результати свідчать, що рівень швидкості транспортування глюкози є помітно низьким у кератиноцитів на стадії старіння порівняно із звичайними кератиноцитами.

Обробка старіючих кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчить про збільшення швидкості транспортування глюкози порівняно із необробленими контрольними клітинами. Кінетика захоплення глюкози за фізіологічних умов

є вищою на рівні мікросом кератиноцитів, оброблених продуктом "BB", порівняно із контрольними мікросомами кератиноцитів. Цей результат було отримано для різних інкубаційних періодів (30, 60, 90 та 120 секунд).

Обробка старіючих кератиноцитів флоретином, до відділення мікросом, у значній мірі пригнічує швидкість транспортування глюкози. Обробка звичайних кератиноцитів продуктом "BB" у 2 концент-

раціях (1/5 та 1/2) одночасно з флоретином суттєво відновлює швидкість транспортування глюкози. Незначний ефект відмічався при концентрації 1/10.

7.3.2 - Транспортування ліпідів

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на людських кератиноцитах на стадії старіння.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (1 мМ дифенгідрамін).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 1 мМ дифенгідраміном та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності та при відсутності 1 мМ дифенгідраміну протягом 120 хвилин при температурі 37°C. Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення [³H] холіну було прийнято для визначення швидкості транспортування холіну (див. параграф 7.1.2).

Результати:

	Захоплення [³ H] холіну (pmol/mg протеїнів)			
	30 сек.	30 сек.	30 сек.	30 сек.
Негативний контроль	114	132	164	181
BB 1/10	110	135	166	173
BB 1/5	113	143	188	194
BB 1/2	121	153	187	201
DPA (1 мМ)	55	79	106	119
BB (1/10) + DPA	52	69	110	125
BB (1/5) + DPA	67	87	132	141
BB (1/2) + DPA	77	104	137	148

Отримані результати свідчать, що рівень швидкості транспортування ліпідів є помітно низьким у кератиноцитів на стадії старіння порівняно із звичайними кератиноцитами.

Обробка старіючих кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчить про відсутність пригнічення швидкості транспортування ліпідів порівняно із необробленими контрольними клітинами. Кінетика захоплення ліпідів за фізіологічних умов є подібною для мікросом кератиноцитів, оброблених продуктом "BB", та контрольних мікросом кератиноцитів.

Обробка старіючих кератиноцитів дифенгідраміном, до відділення мікросом, у значній мірі пригнічує швидкість транспортування ліпідів. Обробка старіючих кератиноцитів продуктом "BB" у 2 концентраціях (1/5 та 1/2) одночасно з дифенгідраміном суттєво відновлює швидкість транспортування ліпідів. Жодного ефекту не було помічено при концентрації 1/10.

7.3.3 - Транспортування протеїнів (альбуміну)

Дослідження проводилося у трьох екземплярах на людських кератиноцитах на стадії старіння.

Проба 1: негативний контроль, без додавання будь-якого продукту.

Проба 2: позитивний контроль (нокодазол, 6 мг/мл).

Проба 3-5: обробка досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Проба 6-8: обробка 6 мг/мл нокодазолом та досліджуваним продуктом (3 концентрації).

Виконувалася обробка кератиноцитів продуктом "BB" у присутності та за відсутності нокодазолу, 6 мг/мл, протягом 120 хвилин при температурі 37°C. Мембранні мікросоми роз'єднувалися шляхом диференціального центрифугування.

Аналогічний протокол захоплення альбумін-FITC було прийнято для визначення швидкості транспортування альбуміну (див. параграф 7.1.3).

	Захоплення альбумін-FITC (μg/mg протеїнів)			
	30 сек.	30 сек.	30 сек.	30 сек.
Негативний контроль	0.17	0.29	0.35	0.49
BB 1/10	0.18	0.34	0.39	0.52
BB 1/5	0.18	0.36	0.41	0.54
BB 1/2	0.2	0.37	0.43	0.55
ND (6 mg/ml)	0.06	0.11	0.19	0.3
BB (1/10) + ND	0.05	0.12	0.22	0.33
BB (1/5) + ND	0.09	0.14	0.27	0.38
BB (1/2) + ND	0.1	0.19	0.3	0.43

Отримані результати свідчать, що рівень швидкості транспортування протеїнів є помітно низьким у кератиноцитів на стадії старіння порівняно із звичайними кератиноцитами. Обробка старіючих кератиноцитів продуктом "BB", до відділення мікросом, свідчить про відсутність пригнічення швидкості транспортування протеїнів порівняно із необробленими контрольними клітинами. Кінетика

захоплення альбуміну за фізіологічних умов є подібною до мікросом кератиноцитів, оброблених продуктом "BB", та контрольних мікросом кератиноцитів.

Обробка старіючих кератиноцитів нокодазолом, до відділення мікросом, пригнічує швидкість транспортування протеїнів. Обробка старіючих кератиноцитів продуктом "BB" у 2 концентраціях

(1/5 та 1/2) одночасно з нокодазолом суттєво відновлює швидкість транспортування протеїнів. Незначний ефект відмічався при концентрації 1/10.

Приклад 8: Дія на респірацію та синтез атр

8.1 - Дослідження дії продукту на мітохондріальну та клітинну респірацію

Кількість розчиненого кисню у розчині може бути визначена за допомогою електроду Кларка. Кисень, що розсіюється через тefлонову плівку буде скорочуватися на рівні платинового катода, поляризованого на 0.8 вольт. За цих умов, струм, що проходить між цим катодом та срібним анодом, є пропорційним концентрації кисню у розчині. Іонний міст між обома електродами створюється за допомогою насиченого розчину KCl.

Збір та обробка вимірів виконується з використанням мікрокомп'ютера (IBM-PC) у реальному часі. Програма дозволяє безупинно споглядати кількість кисню у резервуарі та миттєву похідну, що також відповідає швидкості споживання кисню, розраховану в реальному часі.

Було досліджено п'ять концентрацій та визначення виконувалися на трьох екземплярах. Це дослідження виконувалося залежно від двох різних умов:

8.1.1 - Дія продукту на клітинну респірацію: Вимір базальної респірації

Дія на швидкість базальної респірації клітин з непроникнутою мембраною в присутності глюкози.

Кератиноцити культивувалися в інкубаторі з CO₂, зі швидкістю 10⁶ клітин за один цикл у середовищі культури DMEM з додаванням гідрокортизону, EGF та FCS (10 %).

Цей протокол виконувався шляхом прямого застосування продукту на клітини у резервуарі оксиграфа.

Клітини (кератиноцити), у концентрації 10⁶ клітин/мл, поміщалися в "буферному респіраційному розчині" (Hanks-Hepes 20 mM глюкози) у резервуарі оксиграфа, піддавалися термостатуванню при 30°C та облаштовувалися електродом Кларка (1 мл буферного респіраційного розчину, що містить за цих умов 480 атомів кисню).

За цих умов, швидкість споживання кисню (базальна респірація клітин) може вимірюватися. Додавання різної кількості продукту (кінцеві концентрації: 1/10; 1/5 та 1/2) до резервуару оксиграфа дозволяє виявити можливе стимулювання або пригнічення цієї респірації.

Усі визначення підсумовуються в наступній Таблиці.

Таблиця

Продукт, що тестується (BB)	Контроль	1/10	1/5	1/2
Швидкість респірації (п атом О/мін/10 ⁶ клітин) n=3	3.64 ±0.37	3.72 ±0.31	4.26 ± 0.25	4.75 ± 0.50
% базальної респірації n=3	100 ±6	102 ±4	117 ± 3	130 ±5

За прикладних експериментальних умов та з огляду на отримані результати, продукт у контакті з кератиноцитами спричиняє значне підвищення швидкості базальної респірації у концентраціях (1/5 та 1/2).

8.1.2. - Дія продукту на мітохондріальну респірацію:

Дія на швидкість респірації клітини з проникною мембраною в присутності респіраційного субстрату, піруват-малату, з метою оцінки мітохондріальної респірації.

Кератиноцити культивувалися в інкубаторі з CO₂, зі швидкістю 10⁶ клітин за один цикл у середовищі культури DMEM з додаванням гідрокортизону, EGF та FCS (10 %).

Цей протокол виконувався шляхом прямого застосування продукту на клітини у резервуарі оксиграфа.

Клітини (кератиноцити), у концентрації 10⁶ клітин/мл, поміщалися в "буферному респіраційному розчині" (Hanks-Hepes 20 mM глюкози) у резервуарі оксиграфа, піддавалися термостатуванню при 30°C та облаштовувалися електродом Кларка (1 мл буферного респіраційного розчину, що містить за цих умов 480 атомів кисню). Клітини оброблялися дігітоніном. Додавання респіраційного субстрату (10 mM пірувату та 10 mM малату) дозволяє спостерігати швидкість споживання кисню (стадія 2 за Шансом). Додавання різної кількості продукту (кінцеві концентрації: 1/10; 1/5 та 1/2) до резервуару оксиграфа дозволяє виявити можливе стимулювання або пригнічення цієї респірації.

Усі визначення підсумовуються в наступній Таблиці.

Таблиця

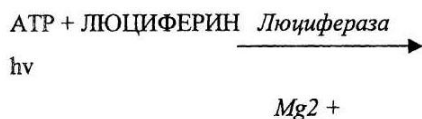
Продукт, що тестується (BB)	Контроль	1/10	1/5	1/2
Швидкість респірації (п атом О/хв./10 ⁶ клітин) n=3	2.67 ±0.21	2.83 ±0.15	3.25 ±0.11	3.52 ±0.09
% базальної респірації n=3	100 ±2	106 ±4	122 ±3	132 ±5

За прикладних експериментальних умов та з огляду на отримані результати, продукт у контакті з культурою людських кератиноцитів спричиняє значне підвищення швидкості мітохондріальної респірації у концентраціях (1/5 та 1/2).

8.2 - Дослідження дії продукту на мітохондріальний синтез АТР

Вимірювання здійснювалося за допомогою пристрою типу Люміноскан (Luminoscan), що використовує реактив моніторингу АТР (комплект для дослідження біоломінесценції АТР типу "HS II")

виробництва "Boehringer Mannheim". Кількість ATP, присутніх у цій аликвотній пробі може визна-



Інтенсивність світла, що випромінюється, протягом цієї реакції може вимірюватися за допомогою люмінометра (люміноскану), що трансформує ці виміри у одиниці відносної яскравості (RLU). Вимірювані одиниці RLU можуть конвертуватися в моли (mols) ATP з посиланням на діапазон стандартів ATP.

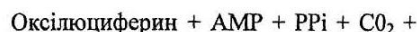
Швидкість синтезу ATP виражена в nmols/min/10⁶ клітин.

Було досліджено п'ять концентрацій та визначення виконувалися на трьох екземплярах.

Кератіноцити культивувалися в інкубаторі з CO₂, зі швидкістю 10⁶ за один цикл у середовищі культури DMEM з додаванням гідрокортизону, EGF та FCS (10 %).

Цей протокол виконувався шляхом прямого застосування продукту на клітини у резервуарі оксиграфа.

чатися за допомогою наступної ферментативної реакції:



Клітини (кератіноцити), у концентрації 10⁶ клітин/мл, поміщалися в "буферному респіраційному розчині" (Hanks-Hepes 20 mM глюкози) у резервуарі оксиграфа, піддавалися термостатуванню при 30°C. Клітини оброблялися дігітоніном. Додавання респіраційного субстрату (10 mM пірувату та 10 mM малату) дозволяє спостерігати швидкість споживання кисню (стадія 2 за Шансом). Після додавання різної кількості продукту (концентрації: 1/10; 1/5 та 1/2) до резервуару оксиграфа з регулярними інтервалами, аликвотна проба була взята з резервуара оксиграфа з метою аналізу ATP відповідно до методу, описаного вище. Додавання різної кількості продукту до резервуару оксиграфа дозволяє виявити можливе активування або пригнічення синтезу ATP.

Усі визначення підсумовуються в наступній Таблиці.

Таблиця

Продукт, що тестується (BB)	Контроль	1/10	1/5	1/2
Швидкість синтезу ATP (nmol/min/10 ⁶ клітин n=3)	5.78 ± 0.25	6.16 ± 0.34	6.96 ± 0.29	7.24 ± 0.54
% синтезу ATP n=3	100 ± 3	107 ± 5	120 ± 8	125 ± 6

За прикладних експериментальних умов та з огляду на отримані результати, продукт у контакт з культурою людських кератіноцитів спричиняє значне підвищення швидкості мітохондріального синтезу ATP у концентраціях (1/5 та 1/2).

8.3 - Дослідження дії продукту на енергетичний метаболізм

Оцінка дії продукту на рівні енергетичного метаболізму шляхом вимірювання концентрації аденілових нуклеотидів. Дослідження проводилося на первинних культурах людських кератіноцитів, що оброблялися протягом 5 днів до проведення аналізу.

Кількість ATP, ADP та AMP, що містяться у клітинах, вимірюється шляхом рідинної хроматографії високого тиску (HPLC).

Використовувався пристрій Бекмана, колона (10 × 0.46 см) з опорою "Spherisorb" NH₂ з гранулометриєю 5 μm. Розчинник для вимивання (елюювання) - фосфат калію; залежно від його полярності та pH, час відстоювання нуклеотидів є більш тривалим. Швидкість вимивання становить 1

мл/хвилину. Профіль вимивання контролюється шляхом вимірювання поглинаючої здатності при 254 нм ізократичного елюювання.

Діапазон стандартів виконується між 0.1 та 1 nmol ATP, ADP та AMP шляхом вимірювання поверхні під відповідними максимумами.

Було досліджено п'ять концентрацій та визначення виконувалися на трьох екземплярах.

Концентрації ATP, ADP та AMP клітинного екстракту (10⁶ клітин/мл) аналізувалися шляхом рідинної хроматографії високого тиску (HPLC). Вони виражені в nmol/min/mg протеїнів. Енергетичне навантаження (E. C.) розраховується відповідно до формули:

$$([\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$$

Обчислення енергетичного навантаження виконувалося у трьох екземплярах по контрольних пробах та оброблених пробах.

Усі визначення підсумовуються в наступній Таблиці.

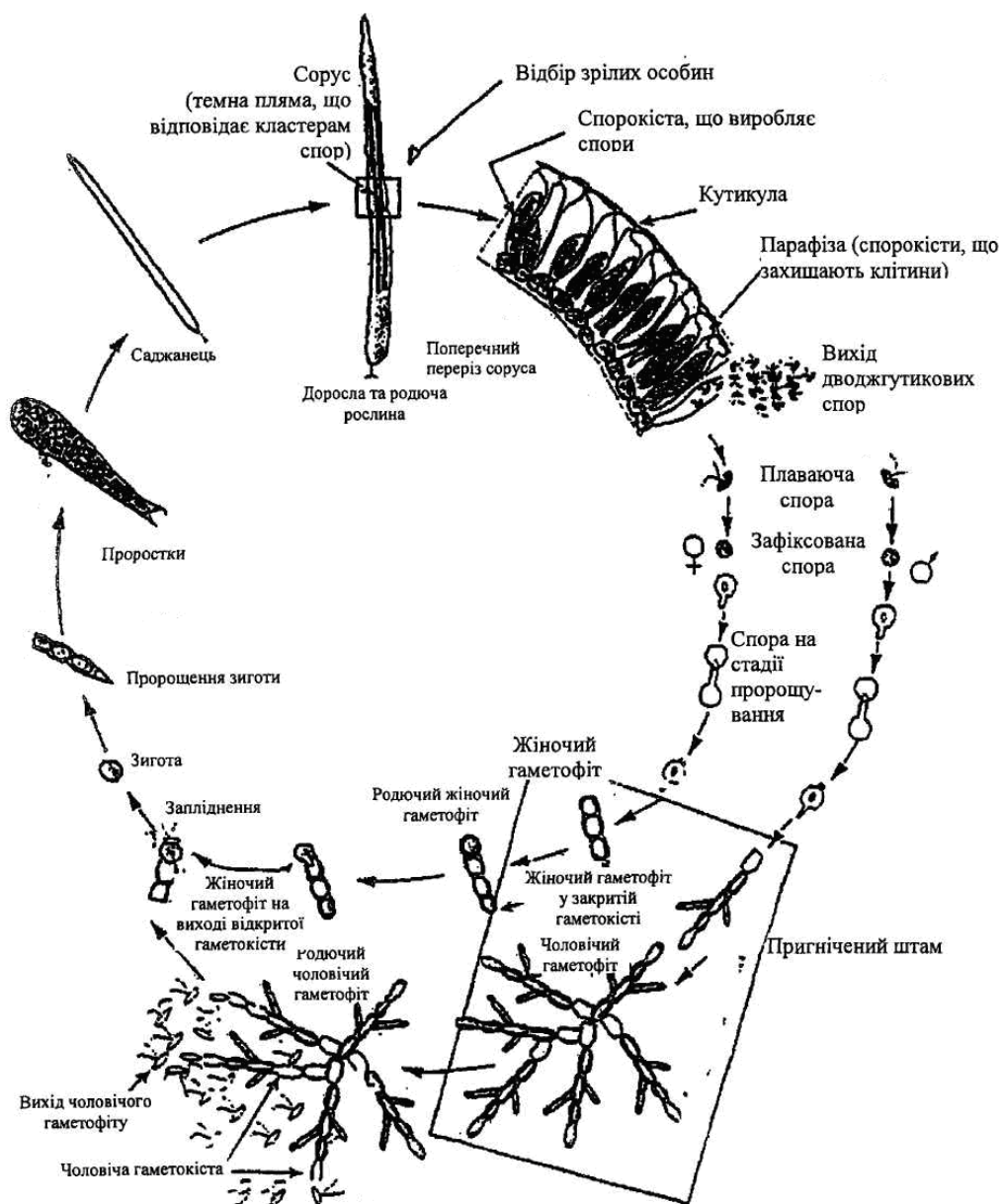
Концентрації ATP, ADP та AMP виражені в nmol/mg протеїнів (n=3).

Таблиця

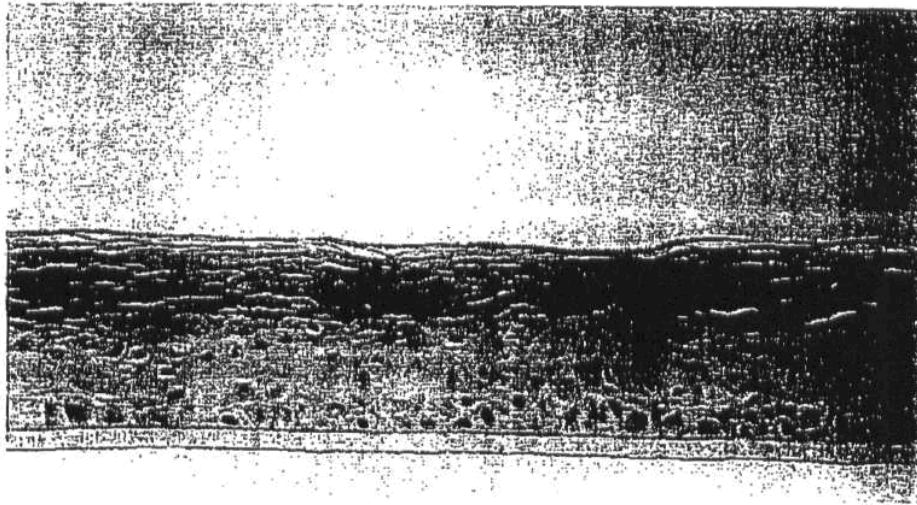
Продукт, що тестується (BB)	Контроль	1/10	1/5	1/2
[ATP]	4214	4060	4554	4860
[ADP]	936	ПОЗ	1162	936
[AMP]	673	488	719	1178
[ATP/ADP]	4.50	3.68	3.92	5.19
Total	5823	5651	6434	6973
E.C.	0.804	0.816	0.798	0.764

За прикладних експериментальних умов та з огляду на отримані результати, продукт у контакті з культурою людських кератинцитів не спричиняє

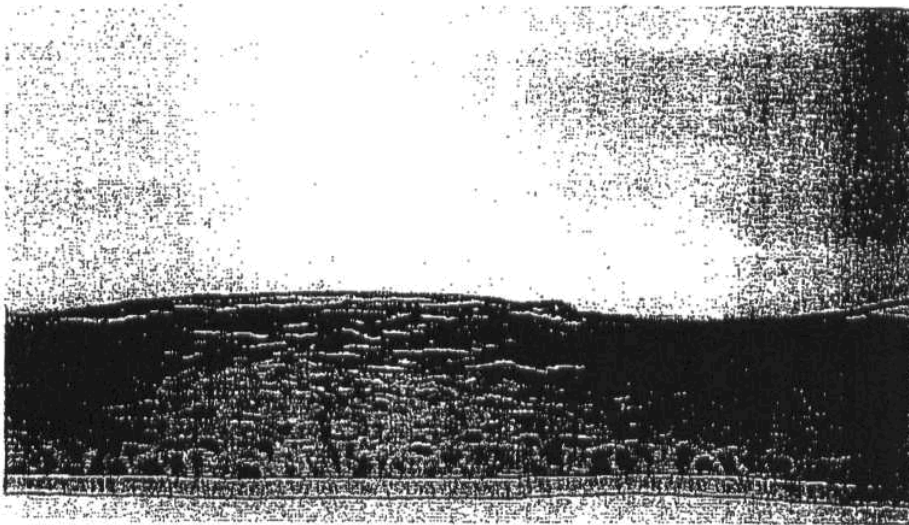
зміни енергетичного навантаження у концентраціях продукту.



Фіг.1



Контрольний епідерміс



Епідерміс, оброблений продуктом "ВВ"

Фіг.2