

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035858**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.20

(21) Номер заявки
201590638

(22) Дата подачи заявки
2013.09.16

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭКСТРАКТ АРХЕБАКТЕРИЙ DN-1

(31) 222127; 61/708,657

(32) 2012.09.24; 2012.10.02

(33) IL; US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/IL2013/050786

(87) WO 2014/045280 2014.03.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДР. НОНА ИНТЕРНЭШНЛ ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
Кучина Нона (IL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2003017973
RU-C1-2109515

"Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications" Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2002) 28, 56-63 2002 Nature Publishing Group. A Oren 31 Dec 2002 (2002/12/31) p. 60

Radiation damage | University of Maryland Medical Center <http://umm.edu/health/medical/altmed/condition/radiation-damage#ixzz2oxhknWW2>
University of Maryland Medical Center
Steven D. Ehrlich, NMD, Solutions
Acupuncture, a private practice 03 Mar 2012 (2012/03/03) all

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для местного применения для лечения повреждений кожи, содержащей экстракт архебактерий DN-1, содержащий по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию; и экстракт дуналиеллы. Изобретение также относится к способу лечения повреждения кожи, включающему местное нанесение на кожу указанной композиции, и к способу получения указанной композиции. Лечение с использованием архебактерий DN-1, содержащих сильные антиоксиданты, предотвращает распространение повреждения тканей и улучшает выживаемость и неврологический исход заболеваний.

B1

035858

**035858
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение направлено на композицию для лечения повреждения кожи с помощью экстрактов галобактерий и экстрактов дуналиеллы. Более конкретно изобретение относится к композиции, содержащей комбинацию экстрактов галобактерий и экстрактов дуналиеллы, предназначенной для улучшения и восстановления ткани кожи после лучевой терапии.

Уровень техники изобретения

Галобактерии известны как галофильные микроорганизмы. Данный тип архейных может служить хорошей моделью при изучении некоторых аспектов биологии эукариот, таких как репликация, транскрипция и трансляция ДНК. Сравнение генома галофилов с геномом других прокариот позволяет понять адаптацию микробов к экстремальным условиям. Галобактерии являются экстремальными облигатными бактериями. Для роста им необходимы очень высокие концентрации солей (от 10 до 30%) KCl, MgCl₂ и особенно NaCl. Указанные организмы выделяют из естественных сред. Для поддержания внутреннего осмотического давления, которое должно находиться в равновесии с концентрацией NaCl в среде, галобактерии аккумулируют от 3 до 4 М соли в цитоплазме в виде KCl. Суспендирование галобактерий в среде, содержащей NaCl в концентрации 2 М, вызывает полную потерю жесткости бактериальной оболочки, и бактерия при этом принимает округлую форму. Уменьшение концентрации соли ниже 1 М приводит к лизису бактерий.

Колонии галобактерий окрашены в красный цвет, их оболочки действительно содержат красящие пигменты (бактериоруберины), которые защищают их от интенсивного ультрафиолетового излучения, которому они подвергаются. Галобактерии содержат пигмент галородопсин, который закачивает в клетку ионы хлора под влиянием фотонов, создавая градиент напряжения и способствуя получению энергии из света. Данный процесс не имеет отношения к другим формам фотосинтеза, включающим транспорт электронов, однако при этом и галобактерии не способны к усвоению углерода из углекислого газа.

В насыщенной солевой среде галобактерии обычно имеют форму продолговатой бациллы длиной 4-10 мкм и диаметром 0,7 мкм. Бактерия имеет от 5 до 8 лоботрихальных жгутиков. *Halobacterium halobium* не способна использовать углеводы в качестве источника углерода и энергии.

Заявка EP № 1250918 описывает процесс экстракции и использование фракции гликопротеина, выделенного из архебактерии *Halobacterium halobium*.

Описанный продукт, включенный в косметический препарат, обладает особенностью защищать клетки кожи от вредного воздействия загрязнения и/или излучения.

Заявка RU № 2109515 описывает препарат, полученный из штамма *Halobacterium halobium*, обладающий биоактивными свойствами. Указанный штамм производит широкий спектр биологических веществ, обладающих макробиотической активностью. Антирадикальный эффект препарата останавливает разрушающее действие неустойчивых свободных радикалов. Препарат представляет собой лиофилизированный порошок биомассы галобактерии, и его можно использовать в качестве биологически активной добавки к пище, в качестве реагента, уменьшающего токсическое действие противоопухолевых соединений. Препарат можно использовать для профилактики и лечения лучевой болезни.

Известно, что различные экстракты галобактерии обладают полезными косметическими и/или терапевтическими свойствами, особенно при лечении рубцов, тепловых, электрических, химических и солнечных ожогов или различных типов язв, в виде композиции для местного применения, такой как молочко, крем, лосьон, сыворотка, маска или гель.

Таким образом, сохраняется неудовлетворенная и назревшая потребность в создании средств и способов для улучшения лечения ожогов, пятен и дефектов кожной ткани.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции для местного применения для лечения повреждения кожи, содержащей а) экстракт архебактерий DN-1, содержащий по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию; и б) экстракт дуналиеллы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения количество архебактерий DN-1 составляет 2,5-10% от веса композиции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная композиция дополнительно содержит консерванты, сурфактанты, увлажняющие вещества, эмульгаторы, загустители, отдушки, растительные или минеральные масла, антисептические средства, подкисляющие или подщелачивающие вещества, витамины, анти-УФ агенты, растворители, вещества, стабилизирующие pH, силиконы; или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная композиция находится в форме для местной доставки, выбранной из группы, состоящей из геля, молочка, лосьона, сыворотки, маски, мази и крема.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения повреждения кожи, включающему местное нанесение на кожу композиции по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции для местного применения для лечения повреждения кожи, включающему следующие стадии:

- а) получение экстрактов архебактерий DN-1;

- b) растворение указанных экстрактов архебактерий DN-1 в масле и в воде;
- c) получение экстрактов дуналиеллы;
- d) смешивание указанных экстрактов архебактерий DN-1 и дуналиеллы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения при получении композиции дополнительно добавляют агент, выбранный из группы, состоящей из консервантов, сурфактантов, увлажняющих веществ, эмульгаторов, загустителей, отдушек, растительных или минеральных масел, антисептических средств, подкисляющих или подщелачивающих веществ, витаминов, анти-УФ агентов, растворителей, веществ, стабилизирующих рН, силиконов или любой их комбинации.

Краткое описание чертежей

С задачей разъяснения изобретения и демонстрации того, как оно может быть реализовано на практике, применяют несколько вариантов осуществления, которые описаны в настоящем документе только в качестве неограничивающего примера со ссылкой на прилагаемые чертежи, где

фиг. 1 представляет собой график, на котором представлены результаты МТТ-теста для различных экспериментальных групп с применением или без применения УФБ-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 2 представляет собой график, на котором представлены результаты теста определения активности каспазы-3 для различных экспериментальных групп с применением или без применения УФБ-облучения в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 3 представляет собой график, на котором представлены результаты МТТ-теста для различных экспериментальных групп после индукции воспаления или без индукции воспаления в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 4 представляет собой график, на котором представлены результаты количественного определения IL-1 β методом ELISA после обработки кожи экстрактами и воздействия индукторов воспаления в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 5 представляет собой график, на котором представлены результаты количественного определения TNF α методом ELISA после обработки кожи экстрактами и воздействия индукторов воспаления в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 6 представляет собой график, на котором представлены результаты количественного определения IL-6 методом ELISA после обработки кожи экстрактами и воздействия индукторов воспаления в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 7 представляет собой график, на котором представлены результаты МТТ-теста для кератиноцитов, которые подвергали воздействию экстракта дуналиеллы, экстракта галобактерий и экстракта синергического действия, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения;

фиг. 8 представляет собой график, на котором представлены результаты МТТ-теста после воздействия на кератиноциты экстрактов, содержащих дуналиеллу и галобактерий в различных соотношениях, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Приведенное далее описание предоставляется, чтобы дать возможность любому специалисту в данной области воспользоваться изобретением, и в описании изложены лучшие варианты, предлагаемые авторами изобретения для осуществления изобретения.

Однако возможны различные модификации, которые будут очевидны специалистам в данной области, так как общие принципы настоящего изобретения определены особо для предоставления полезных архебактерий DN-1 для лечения повреждений кожи, возникающих вследствие облучения, хирургического вмешательства или какой-либо лекарственной терапии (такие как рубцы, ожоги, пролежни и мукотит).

Настоящее изобретение представляет собой композицию, которая включает в себя архебактерии DN-1, которые содержат сильные антиоксиданты, которые растворяются в масле и в воде. Композиция оказывает влияние в широком диапазоне на восстановление кожи. Лечение производится местно. Лечение с использованием архебактерий DN-1, содержащих сильные антиоксиданты, предотвращает распространение повреждения тканей и улучшает выживаемость и неврологический исход заболеваний. Одним из параметров, который изменяется под действием избыточного количества радикалов или приема пищевых антиоксидантов (и поэтому может рассматриваться как более репрезентативный параметр *in vivo* баланса между окисляющими частицами и веществами-антиоксидантами, неизвестными, измеряемыми и неизмеряемыми) является общая антиоксидантная емкость плазмы крови (ТАС).

Существует несколько методов оценки антиоксидантной активности вещества.

Оценка адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам (ORAC) представляет собой метод измерения антиоксидантных емкостей в биологических образцах *in vitro*. В методе измеряют окислительную деградацию флуоресцирующей молекулы (бета-фикоэритрина или флуоресцеина) после смешивания с генераторами свободных радикалов, такими как соединения-азоинициаторы.

DPPH (2-дифенил-1-пикрилгидразил) состоит из стабильных молекул свободных радикалов. DPPH

действует как индикатор химических реакций с участием радикалов. DPPH является радикалом и ловушкой ("поглотителем") для других радикалов. Поэтому снижение скорости химической реакции после добавления DPPH используют в качестве индикатора радикальной природы реакции. Метод DPPH обеспечивает простой и быстрый путь оценки потенциальных антиоксидантов.

Антиоксидантную активность также можно измерить с помощью метода оценки железовосстанавливающей активности антиоксидантов (FRAP). Железосстанавливающая способность плазмы (FRAP, также называемая антиоксидантной способностью восстановления ионов железа) представляет собой метод определения антиоксидантной емкости, в котором в качестве стандарта используют тролокс. В методе FRAP антиоксиданты используют в качестве восстановителей в окислительно-восстановительном колориметрическом методе, с применением системы, обеспечивающей стехиометрический избыток легко восстанавливающего окислителя.

Метод ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоуксислота) представляет собой другой метод измерения антиоксидантных емкостей. В данном методе ABTS превращается в катион-радикал при добавлении персульфата натрия. Катион-радикал имеет голубую окраску и поглощает свет при длине волны 734 нм. Катион-радикал ABTS реагирует с большинством антиоксидантов, в том числе с фенолами, тиолами и витамином С. Во время реакции голубой катион-радикал ABTS превращается в свою бесцветную нейтральную форму. Данную реакцию можно отслеживать спектрофотометрически. Указанный метод часто обозначают как метод определения антиоксидантной способности в эквивалентах тролокса (TEAC). Реакционную способность различных тестируемых антиоксидантов сравнивают с реакционной способностью тролокса, который представляет собой водорастворимый аналог витамина Е.

Метод определения антиоксидантной способности в эквивалентах тролокса (TEAC) представляет собой еще один метод измерения антиоксидантной способности на основе тролокса, измеряемой в единицах, называемых тролокс-эквиваленты (ТЕ), например мкмоль ТЕ/100 г. Вследствие сложностей, связанных с измерением активности отдельных антиоксидантных компонентов в сложной смеси (например, в чернике или в томатах), определение активности в эквивалентах тролокса используют в качестве эталонного теста для определения антиоксидантной емкости такой смеси. Антиоксидантную активность, выраженную в эквивалентах тролокса, наиболее часто измеряют методом обесцвечивания ABTS.

Настоящее изобретение дополнительно предоставляет композицию для лечения повреждений кожи у индивида-млекопитающего, композиция содержит экстракт галобактерий архебактерий DN-1, экстракт содержит (а) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию; (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию. Архебактерии DN-1 обладают антиоксидантной активностью, которую измеряют с помощью любого из *in vitro* методов 1-4; активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови организма, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль ТЕ/100 г, при измерении методом 1 с определением адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам (ORAC) в участке обработки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции для лечения повреждений кожи у индивида-млекопитающего, композиция содержит экстракт галобактерий архебактерий DN-1, экстракт содержит (а) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию; (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию. Архебактерии DN-1 обладают антиоксидантной активностью, которую измеряют с помощью любого из *in vitro* методов 1-4; активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови организма, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль ТЕ/100 г, при измерении методом 4 с определением железо-восстанавливающей способности плазмы крови (FRAP), в участке обработки. Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции для лечения повреждений кожи у индивида-млекопитающего, композиция содержит экстракт галобактерий архебактерий DN-1, экстракт содержит (а) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию; (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию. Архебактерии DN-1 обладают антиоксидантной активностью, которую измеряют с помощью любого из *in vitro* методов 1-4; активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови организма, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль ТЕ/100 г, при измерении методом 4 с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH) в участке обработки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции для лечения повреждений кожи у индивида-млекопитающего, композиция содержит экстракт галобактерий архебактерий DN-1, экстракт содержит (а) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию; (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию. Архебактерии DN-1 обладают антиоксидантной активностью, которую можно измерить с помощью любого из *in vitro* методов 1-4, активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль ТЕ/100 г, при измерении с помощью метода 4 с использованием 3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS) в участке обработки.

Настоящее изобретение дополнительно относится к композиции для лечения повреждений кожи у индивида-млекопитающего, композиция содержит экстракт галобактерий архебактерий DN-1, экстракт содержит (а) по меньшей мере одну водорастворимую фракцию; (b) по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию. Архебактерии DN-1 обладают антиоксидантной активностью, которую можно

измерить с помощью любого из *in vitro* методов 1-4, активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови организма, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль ТЕ/100 г, при измерении методом 5 с определением антиоксидантной способности в эквивалентах тролокса (ТЕАС) в участке обработки.

Образец сыворотки крови для проведения измерения получают из любого участка тела. Общую антиоксидантную емкость сыворотки крови выражают в ммоль эквивалентов тролокса.

Экстракт галобактерий имеет возможные применения благодаря сильным антиоксидантам, которые растворимы в масле и в воде; сильные антиоксиданты обладают способностью ингибировать механизмы окисления, которые приводят к повреждениям кожи.

Экстракт галобактерий обладает антиоксидантной активностью благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам, что приводит к увеличению количества эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), увеличению концентрации интерлейкина-6 (IL-6) и глутатиона.

Увеличение уровня IL-6 провоспалительного и противовоспалительного цитокина, секретируемого Т-клетками и макрофагами, стимулирует иммунный ответ во время инфекции и после травмы. Кроме того, экстракт галобактерий защищает мембраны от окисления путем реагирования с радикалами, образующимися в цепной реакции.

Настоящее изобретение может предоставить экстракты галобактерий на основе пищевых добавок, фармацевтических препаратов, нутрицевтиков, косметики с активными фармацевтическими ингредиентами, повязок и других продуктов на основе экстрактов, применяемые при рубцах, ожогах или других типах повреждений кожи, и более конкретно для восстановления тканей организма после облучения, для смягчения подавления, применяемые как местно, так и перорально.

Также могут быть включены некоторые применения и преимущества композиций, такие как уменьшение клинических синдромов, обусловленных облучением, в различных системах (таких как нервная система, пищеварительная система и сердечно-сосудистая система); лечение пациента, имеющего заболевание сердца, печени или сосудов, композициями галобактерий; стабилизация и улучшение состояния иммунной системы и эндокринной системы, которое также становится возможным с помощью некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения.

Термины "галобактерии", "архебактерии", "галофильные археи галобактерий", которые используются в описании, также следует понимать как *Archaeobacterium*, *Halobacterium halobium*.

Некоторые побочные эффекты, возникающие в результате лучевой терапии, как правило, ограничиваются областью тела пациента, которая подвергается обработке. Одной из целей лучевой терапии является уменьшение побочных эффектов до минимума.

Основными отмечаемыми побочными эффектами являются утомляемость и раздражение кожи, такое как от легкого до умеренного ожога. Утомляемость часто появляется в середине курса лечения и может продолжаться в течение нескольких недель после окончания лечения. Раздраженная кожа заживает, но может быть не такой эластичной, как раньше.

Существует несколько острых побочных эффектов, обусловленных лучевой терапией.

Повреждение эпителиальных поверхностей

Эпителиальные поверхности могут быть повреждены в результате лучевой терапии. В зависимости от области, которую облучают, эпителиальная поверхность может включать кожу, слизистую оболочку полости рта, глотки, слизистую оболочку кишечника и мочеочника. Скорость развития повреждения и восстановления после него зависит от скорости обмена в эпителиальных клетках. Обычно кожа краснеет и становится болезненной после нескольких недель лечения. Реакция может становиться более тяжелой во время лечения и в течение приблизительно недели после окончания лучевой терапии, и кожа может разрушаться. Хотя указанная влажная десквамация причиняет неудобство, восстановление обычно происходит быстро. Кожные реакции, как правило, наиболее выражены в областях естественных складок кожи, например под молочной железой у женщин, позади уха и в паховой области.

Повреждения рта и глотки

При лечении области головы и шеи проходящая болезненность и изъязвление обычно наблюдаются во рту и в горле. Если повреждения тяжелые, они могут мешать глотанию, и пациенту могут потребоваться обезболивающие средства и нутритивная поддержка/биодобавки. Болезненность пищевода также может развиваться, если лечат непосредственно пищевод или если, как происходит в большинстве случаев, пищевод оказывается в зоне облучения при лечении рака легких.

Поздние побочные эффекты возникают спустя от нескольких месяцев до нескольких лет после лечения и обычно ограничиваются областью, которую облучали. Они часто являются следствием повреждения кровеносных сосудов и клеток соединительной ткани. Многие поздние эффекты уменьшаются путем фракционирования лечения на несколько меньших частей.

Фиброз

Ткани, которые подверглись облучению, как правило, становятся менее упругими с течением времени из-за процесса диффузного рубцевания.

Эпиляция

Эпиляция (выпадение волос) может наблюдаться на любой части кожи, покрытой волосами, при

использовании доз свыше 1 Гр. Эпиляция происходит только в пределах облучаемого поля (полей). Выпадение волос может быть стойким при использовании однократной дозы 10 Гр, но если дозу фракционируют, необратимого выпадения волос может не наблюдаться до тех пор, пока доза не превышает 45 Гр.

Сухость

Слюнные железы и слезные железы имеют допустимую дозу облучения приблизительно 30 Гр, при проведении облучения фракциями по 2 Гр, указанная доза превышает в большинстве схем интенсивной лучевой терапии рака головы и шеи. Сухость во рту (ксеростомия) и сухость глаз (ксерофтальмия) может стать раздражающей проблемой на долгое время и значительно ухудшить качество жизни пациента. Аналогичным образом потовые железы в облученном участке кожи (например, в подмышке), как правило, перестают работать, и влажная в норме слизистая оболочка влагалища часто становится сухой после лучевой терапии органов малого таза.

Лимфедема, состояние, характеризующееся локальной задержкой жидкости и отеком тканей, может быть вызвано повреждением лимфатической системы, возникшим во время лучевой терапии. Лимфедема является наиболее часто описываемым осложнением у пациентов, получающих лучевую терапию молочной железы, которым проводят адьювантную лучевую терапию подмышечной области после операции удаления подмышечных лимфатических узлов.

Заболевание сердца

Облучение повышает потенциальный риск смерти в результате развития заболевания сердца, что наблюдали после применения некоторых режимов лучевой терапии рака молочной железы.

Лучевой проктит

Лучевой проктит может включать в себя отдаленные последствия воздействия облучения на прямую кишку, в том числе кровотечения, диарею и позывы к дефекации, и он связан с лучевой терапией органов малого таза. Лучевая терапия органов малого таза также может вызвать лучевой цистит, если затронут мочевой пузырь.

Одним из побочных эффектов химиотерапевтического и лучевого лечения рака является мукозит, известный как болезненное воспаление и изъязвление слизистых оболочек, выстилающих пищеварительный тракт. Мукозит может появляться в любом месте желудочно-кишечного (GI) тракта, но оральный мукозит относится к конкретному воспалению и изъязвлению, которое наблюдается в ротовой полости. Оральный мукозит является обычным и зачастую изнуряющим осложнением противоопухолевой терапии.

Оральный и гастроинтестинальный (GI) мукозит развивается практически у всех пациентов, перенесших химиотерапию в высоких дозах и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), у 80% пациентов со злокачественными опухолями головы и шеи, получающих лучевую терапию, и у широкого круга пациентов, получающих химиотерапию. Мукозит пищеварительного тракта увеличивает смертность и частоту осложнений и вызывает рост затрат на здравоохранение.

Лучевая терапия головы и шеи, или органов таза, или брюшной полости связана с оральным или GI мукозитом 3-й и 4-й степени соответственно, часто наблюдающимся более чем у 50% пациентов. У пациентов, перенесших лучевую терапию головы и шеи, боль и снижение функции ротовой полости может сохраняться в течение долгого времени после завершения терапии. Фракционная лучевая терапия увеличивает риск развития мукозита у >70% пациентов в большинстве исследований. Оральный мукозит является особенно тяжелым и длительным у реципиентов HSCT, которым проводят общее облучение всего организма.

У онкологических пациентов, перенесших химиотерапию, симптомы обычно появляются спустя 4-5 дней после начала лечения достигают пика приблизительно на 10-й день, и затем происходит медленное улучшение состояния в течение нескольких недель. Мукозит, связанный с лучевой терапией, обычно возникает в конце второй недели лечения и может продолжаться от шести до восьми недель. В результате гибели клеток в ответ на химиотерапию или лучевую терапию слизистая оболочка полости рта становится тонкой, может шелушиться, а затем краснеет, воспаляется и изъязвляется. Язвы могут покрываться желтовато-белыми сгустками фибрина, называемыми псевдомембраной. Обычно присутствует периферийная эритема. Размер язв может варьировать от 0,5 см и до свыше 4 см. Оральный мукозит может быть крайне болезненным. Степень боли, как правило, связана с объемом повреждения тканей. Боль часто описывается как чувство жжения, сопровождающееся покраснением.

Поражения кожи или язвы, возникающие вследствие облучения, могут инфицироваться вирусами, бактериями или грибами. Боль и потеря вкусовых ощущений затрудняет потребление пищи, что приводит к потере веса. Язвы могут выступать в качестве среды для развития местной инфекции и входных ворот для микрофлоры полости рта, что в некоторых случаях может привести к сепсису. Примерно у половины пациентов, получающих химиотерапию, развивается серьезный оральный мукозит, требующий ограничения дозы, в результате чего необходимо менять лечение рака у пациента, что ухудшает прогноз.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей экстракты галобактерий. Галобактерии относятся скорее к археям, чем к бактериям. Название "галобактерии" было присвоено данной груп-

пе организмов до того, как был сформирован домен Археи, и остается действующим в соответствии с таксономическими правилами. В нетаксономическом контексте галофильные археи также иногда называют галоархеями, чтобы отличить их от галофильных бактерий.

Композиция содержит археобактерии DN-1, которые также известны как DN-1-гомогенат галообактерий. Гомогенат DN-1 содержит две группы антиоксидантов - растворимые в воде и растворимые в масле, так что он представляет собой экстракт, содержащий антиоксиданты, с широким спектром эффектов, направленных на восстановление организма после облучения, ран, ожогов, пролежней и рубцов после операции. Антиоксидант поддерживает и повышает выживаемость и, кроме того, увеличивает продолжительность жизни. Существует несколько методов измерения адсорбционной активности антиоксидантов. Метод определения емкости по отношению к кислородным радикалам (ORAC) является современным промышленным стандартом для оценки антиоксидантной эффективности цельных продуктов, соков и пищевых добавок. Другие методы измерения включают метод с использованием реагента Фолина-Чокалтеу и метод определения антиоксидантной способности в эквивалентах тролокса.

Композиция экстрактов галообактерий по настоящему изобретению обладает способностью как стимулировать, так и усиливать иммунную систему человека. Кроме того, композиция усиливает систему естественной устойчивости организма, увеличивает способность организма противостоять состоявшейся бактериальной и/или вирусной инвазии и усиливает способность организма к восстановлению. Указанная композиция также обеспечивает эффективную очистку крови и детоксикацию.

Продукт может быть получен следующим образом: бактериальную массу, полученную из культуры археобактерий, сначала освобождают от ее липидных компонентов путем двух последовательных экстракций, первая экстракция с галогенированным растворителем и вторая экстракция с C₁-C₄ алканолом, и затем экстрагируют дистиллированной водой. Полученный экстракт затем подвергают ультрафильтрации для удаления остаточных неорганических солей. После выпаривания и сушки фильтрата в вакууме получают желтовато-белый порошок, который демонстрирует сильную положительную реакцию на нингидрин.

Способ экстрагирования продукта согласно изобретению применяют для археобактерий, предпочтительно для галообактерий и более предпочтительно для *Halobacterium halobium*.

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать экстракты дуналиеллы. Комбинация экстрактов галообактерий и экстракта дуналиеллы обеспечивает дополнительную антиоксидантную активность и в связи с этим увеличивает эффективность лечения повреждений кожи, возникающих вследствие облучения, хирургического вмешательства или какой-либо лекарственной терапии (таких как рубцы, ожоги, пролежни и мукузит).

Дуналиелла, солелюбивая зеленая водоросль, накапливает β-каротин в высоких концентрациях, когда ее выращивают в определенных условиях. Дуналиелла обладает способностью накапливать в очень больших количествах β-каротин (свыше 10% сухого веса водоросли) в определенных условиях. Показано, что степень накопления β-каротина находится в прямой зависимости от общего количества света и высокой концентрации NaCl, которые воздействуют на водоросли во время цикла деления.

β-каротин обладает мощными противораковыми свойствами за счет уменьшения количества вредных свободных радикалов в организме, которые в других случаях могут повредить ДНК, что вызывает косметические проблемы, такие как появление морщин, и, что более важно, они могут увеличивать риск развития рака у индивида. Известно, что дуналиелла оказывает непосредственное влияние на клетки иммунной системы. Кроме того, дуналиелла содержит другой каротиноид, называемый зеаксантином, ценный антиоксидант, способный как помочь предотвратить, так и вылечить деструктивное состояние, которое вызывает прогрессирующую потерю зрения.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения фракции археобактерий DN-1, включающему стадии: (a) получение бактериальной массы путем культивирования археобактерий, (b) диспергирование некоторого количества бактериальной массы в растворителе с образованием раствора, (c) экстрагирование раствора галогенированным растворителем, (d) экстрагирование раствора алканолом C₁-C₄; (e) экстрагирование раствора водой.

Экстракт галообактерий представляет собой экстракт археобактерий DN-1, обладающий антиоксидантной активностью, который оказывает влияние в широком диапазоне на восстановление ткани кожи после облучения; активность в существенной степени коррелирует со значением ТАС сыворотки крови организма, которое составляет по меньшей мере 167,1 мкмоль тролокс-эквивалентов/100 г в участке обработки. Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция дополнительно предназначена для уменьшения клинических синдромов, возникающих вследствие облучения в различных системах, таких как нервная система, пищеварительная система и сосудистая система.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция дополнительно предназначена для лечения заболеваний сердца, печени или сосудов, стабилизации и улучшения состояния иммунной системы и эндокринной системы.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция

содержит по весу 2,5-10% архебактерий DN-1.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где способ доставки выбирают из группы, состоящей из геля, молочка, лосьона, сыворотки, маски, мазей или крема.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция лечит дефекты кожи, такие как рубцы, ожоги или/и пролежни, возникающие вследствие облучения, хирургического вмешательства или какой-либо лекарственной терапии.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция содержащая экстракт галобактерий, способствует восстановлению тканей организма после облучения, смягчению подавления, уменьшению клинических синдромов, возникших вследствие лучевой терапии заболеваний сердца, печени или сосудов, стабилизации и улучшению состояния иммунной системы и эндокринной системы.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где композиция дополнительно содержит консерванты, сурфактанты, увлажняющие вещества, эмульгаторы, загустители, отдушки, растительные или минеральные масла, антисептические средства, подкисляющие или подщелачивающие вещества, витамины, анти-УФ агенты, растворители, вещества, стабилизирующие pH силиконы и их комбинации.

Способ по настоящему изобретению - согласно приведенному выше определению, где экстракт галобактерий обладает антиоксидантной активностью благодаря своим окислительно-восстановительным свойствам, что приводит к увеличению количества эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), увеличению концентрации интерлейкина-6 (IL-6) и глутатиона.

Примеры

Известно, что экстракты галобактерий и дуналиеллы оказывают благоприятные эффекты на кожу человека. Создан новый препарат на основе смеси указанных двух экстрактов (препарат синергического действия) и необходимо провести проверку его эффективности в сравнении с индивидуальными экстрактами. Предыдущая оценка эффективности препарата синергического действия в модели кожи человека *ex vivo* показала, что низкая концентрация испытуемого препарата хорошо переносилась, хотя достоверный эффект отсутствовал как в модели воспаления кожи, так и в модели защиты кожи от УФ-облучения. Было сделано предположение, что концентрация тестируемого препарата синергического действия была ниже, чем его эффективная концентрация. Для решения указанной проблемы был создан новый препарат синергического действия, и исследование было начато с экспериментов по установлению зависимости "доза-ответ" и оптимизации состава композиции для определения наиболее эффективного препарата синергического действия. Кроме того, экстракт тестировали в новых модельных системах, чтобы оценить его воздействие на кератиноциты человека и клеточные линии кожи.

Настоящий метод применим для экстракции галобактерий. Метод основан на неустойчивости клеточных оболочек указанных микроорганизмов к воздействию низких концентраций солей, например, пресной воды; в таких условиях клетки галофильных бактерий лизируются (разрываются) с высвобождением клеточных компонентов в среду. Следующие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, однако не являются ограничивающими по своему характеру.

In vitro

Настоящее изобретение описывает действие экстракта галобактерий, дуналиеллы и их синергического действия в моделях *ex vivo* кожи человека и клеточных линий кератиноцитов.

Экспериментальная платформа *ex vivo* культуры кожи человека

Культивирование кожи

Кожу человека для органных культур получали от здоровых женщин в возрасте 45-51 лет, перенесших пластическую операцию. Исследование начинали в день операции.

Кусочки кожи для экспланта определенного размера (0,64 см²) вырезали из кожной ткани (брюшная область) с использованием утвержденного прессового устройства. Кусочки кожи помещали в 6-луночные культуральные планшеты, содержащие среду для культивирования клеток кожи (среда DMEM, дополненная антибиотиками), дермальной стороной в среду и эпидермисом вверх. Кусочки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂ для восстановления.

Защита от УФ-излучения

Кусочки кожи получали, как описано выше (см. раздел "Культивирование кожи").

После восстановления жизнеспособность и степень апоптоза в слое эпидермиса измеряли с помощью МТТ-теста и теста определения активности каспазы-3 соответственно.

Тестирование защиты от УФБ-излучения начинали с местного нанесения тестируемых экстрактов (галобактерий, дуналиеллы и синергического действия: 3 мкл) на кожу. Каждая лунка содержала три кусочка кожи (2 лунки × 3 кусочка для каждого вида обработки). В качестве отрицательных контролей использовали находящиеся в носителе (7,5% NaCl) кусочки кожи, которые не подвергали обработке.

Кусочки инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

На следующий день кусочки из экспериментальных групп отмывали PBS и подвергали воздействию 300 мДж УФБ светового излучения. Сразу после воздействия PBS заменяли 2 мл свежей культуральной среды. В качестве необработанного контроля использовали кусочки с экстрактами, не подвергавшиеся

воздействию УФ-излучения. Культуральную среду заменяли во всех контрольных группах. Кусочки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂.

Эпидермис отделялся от всех кусочков кожи.

Жизнеспособность и степень апоптоза в эпидермисе измеряли с помощью МТТ-теста и теста определения активности каспазы 3.

Противовоспалительная активность

Кусочки кожи получали, как описано выше (см. раздел "Культивирование кожи").

После выделения жизнеспособность эпидермиса оценивали с помощью МТТ-теста.

Для индукции характеристик воспаления, свежую среду для культивирования клеток кожи дополняли комбинацией EGF (2,5 нг/мл) и LPS (10 мкг/мл) и добавляли в соответствующие лунки. Свежую культуральную среду без добавок использовали в качестве отрицательного необработанного контроля. Свежую культуральную среду без добавления трех экстрактов использовали в качестве отрицательного контроля исходного уровня. Культуры, стимулированные LPS и EGF, обрабатывали тестируемыми экстрактами (экстракт галобактерий, экстракт дуналиеллы и экстракт синергического действия) путем их местного нанесения на эпидермис (3 мкл). Положительный контроль содержал LPS и EGF без добавления лечебного средства.

Кусочки инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂.

Каждую обработку осуществляли в триплетах, при этом каждая лунка содержала два кусочка кожи (3 лунки × 2 кусочка на каждую группу).

После инкубации использованную среду из обработанных культур клеток кожи собирали в стандартных условиях (~1000 мкл) и центрифугировали при 14000 g в течение 5 мин для удаления частиц. Чистые супернатанты замораживали при -70°C для проведения анализа ELISA.

Эпидермис отделялся от всех кусочков кожи, и жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста.

Содержание цитокинов TNFα, IL-1β и IL-6 в культуральных супернатантах анализировали с использованием соответствующих наборов согласно инструкциям производителей. Калибровочные кривые для цитокинов строили в дубликатах. Каждый образец тестировали в дубликатах.

Экспериментальная платформа с использованием кератиноцитов человека

Данную часть эксперимента осуществляли с использованием сертифицированной клеточной линии HaCaT (линия иммортализованных кератиноцитов человека), которую приобретали в CLS GmbH.

Задачей эксперимента было оценить непосредственный эффект тестируемых экстрактов на клетки кожи человека, без необходимости проникать внутрь слоев кожи с использованием тестов измерений клеточной цитотоксичности. Разное действие экстракта на изолированные клетки и на кожу может указывать на то, что экстракт не проникает внутрь эпидермиса.

Результаты

Защита кожи от УФБ-облучения

Органнне культуры кожи человека *ex vivo* обрабатывали без применения или с применением экстрактов дуналиеллы и галобактерий. Затем образцы подвергали воздействию 300 мДж УФБ-излучения. Жизнеспособность проверяли с помощью МТТ-теста. Различные экстракты не снижали жизнеспособность клеток кожи человека, как показано на фиг. 1. Также измеряли степень апоптоза с помощью теста определения активности каспазы 3. Не обнаружен достоверный эффект экстрактов галобактерий и дуналиеллы на повреждение, вызванное УФБ-излучением, как показано на фиг. 2.

Кожа - противовоспалительная активность

Воспаление в органнне культурах кожи человека *ex vivo* индуцировали с помощью LPS & EGF и лечили с применением или без экстракта, содержащего дуналиеллу (0,69 мг/см²) и галобактерии (2,76 мг/см²), отношение 20:80, или обоих экстрактов по отдельности.

Различные экстракты не уменьшали жизнеспособность клеток кожи человека, как показано на фиг. 3. Комбинация дуналиеллы (20%) и галобактерии (80%) синергически уменьшала LPS/EGF-индуцированное воспаление кожи человека, о чем свидетельствуют результаты количественного теста ELISA для IL-1β после обработки кожи экстрактами и воздействия на нее индукторов воспаления, как показано на фиг. 4. Экстракт синергического действия уменьшал индукцию IL-1β в образцах воспаленной кожи. Результаты количественного теста ELISA для TNFα после обработки кожи экстрактами и воздействия на нее индукторов воспаления представлены на фиг. 5. Экстракт синергического действия уменьшал индукцию TNFα в образцах воспаленной кожи. Результаты количественного теста ELISA для IL-6 после обработки кожи экстрактами и воздействия на нее индукторов воспаления представлены на фиг. 6. Экстракт синергического действия не уменьшал индукцию IL-6 в образцах воспаленной кожи.

Кератиноциты человека: анализ зависимости "доза-эффект" и композиция синергического действия

Анализ зависимости "доза-эффект" действия экстракта дуналиеллы и галобактерии на жизнеспособность клеточной линии кератиноцитов. Результаты МТТ-теста для кератиноцитов, на которые воздействовали экстрактами дуналиеллы, галобактерий и экстрактом синергического действия, представлены на фиг. 7. Результаты МТТ-теста после воздействия на кератиноциты в различных соотношениях ду-

налиеллы и галобактерий представлены на фиг. 8.

Выводы

Защита от УФБ-индуцированного повреждения: авторы изобретения описали способность соединений защищать от УФ-индуцированного повреждения. Как показано на фиг. 1, жизнеспособность эпидермиса во всех группах не уменьшалась ниже исходного уровня, который измеряли в день 1. После местного нанесения трех соединений образцы облучали в дозе 300 мДж (от умеренного до сильного облучения). В контрольном образце наблюдали очевидное существенное увеличение степени апоптоза, измеряемого по активации каспазы 3 (фиг. 2). Экстракты дуналиеллы и галобактерий не оказывали заметного защитного действия. Хотя экстракт синергического действия уменьшал активность каспазы 3 на 25%, результаты не достигали уровня достоверности.

Противовоспалительная активность: описана противовоспалительная активность экстрактов дуналиеллы, галобактерий и экстракта синергического действия в образцах кожи человека. Воспаление кожи вызывали в соответствии со стандартной методикой с помощью комбинации EGF и LPS. Как можно видеть на фиг. 3, жизнеспособность эпидермиса не изменялась. На фиг. (4, 5, 6) показано, что индекс воспаления (рассчитанный по кратности увеличения цитокинов) существенно снижался при использовании экстракта синергического действия. В частности, экстракт синергического действия, содержащий соотношение дуналиеллы (20):галобактерии (80), уменьшает индукцию IL-1 β и TNF α в образцах воспаленной кожи. Однако уровни IL-6 не изменяются под действием различных экстрактов. Примечательно, что IL-1 β и TNF α описаны в литературе как ключевые факторы воспалительных заболеваний кожи, таких как псориаз и атопический дерматит. Кроме того, недавно разработанные биологические препараты против двух указанных цитокинов (антитела) в настоящее время проходят проверку FDA. Таким образом, предполагаемый положительный эффект экстракта синергического действия при указанных заболеваниях является весьма перспективным.

Анализ зависимости "доза-эффект" в культуре кератиноцитов человека: описана оценка прямого действия тестируемых экстрактов на клетки кожи человека, без необходимости проникновения в слои кожи с использованием измерений клеточной цитотоксичности. Полученные результаты теста определения жизнеспособности отличаются от результатов, полученных в эксперименте с кусочками кожи: различные экстракты уменьшали жизнеспособность клеток дозозависимым образом (фиг. 7-8). Однако результаты, полученные в модели воспаления кожи, явно указывают, что активное соединение может проходить через барьер рогового слоя кожи и воздействовать на заданную область.

Экстракция гомогената галобактерий DN-1

Экстракция гомогената галобактерий DN-1, полученного из *Halobacterium halobium*, получение солевого маточного раствора: добавляют 240 г/л NaCl, 30 г/л MgCl₂·6H₂O, 35 г/л MgSO₄·7H₂O, 7 г/л KCl в резервуар. Добавляют чистую воду почти до конечного требуемого объема резервуара, затем растворяют соли с использованием магнитной мешалки.

Добавляют CaCl₂·2H₂O.

Доводят значение pH раствора в резервуаре до 7 с помощью 1M буфера Tris Cl.

Переносят вышеупомянутый раствор в мерный цилиндр и доливают воду до точного конечного объема.

Некоторое количество бактериальной массы предварительно диспергируют и добавляют в раствор, как описано ниже.

Добавляют 767 мл солевого маточного раствора, 200 мл чистой воды, 5 г пептина, 1 г экстракта дрожжей, 5 мл бактериального маточного раствора и 1 г казеина.

Доводят объем 1000 мл чистой воды.

Проводят инкубацию культуры в течение достаточного времени при температуре 42°C.

Суспендируют культуру в течение приблизительно двух недель.

В конце двухнедельной фазы четыре порции по 50 мл каждая переносят в чистые контейнеры и центрифугируют.

Центрифугируют культуру после 2 недель культивирования со скоростью 7500 об/мин при температуре 4°C в течение 15 мин и получают осадок. Выделяют осадок и повторно суспендируют в смеси 2 M раствор NaCl+0,15 M раствор MgCl₂.

Центрифугируют раствор со скоростью 7500 об/мин при температуре 4°C в течение дополнительных 15 мин и получают осадок. Выделяют осадок и вновь суспендируют его в 7,5%-ном растворе NaCl. Обрабатывают вышеуказанный раствор ультразвуком три раза по 30 с в 15 мл контейнерах. В промежутках охлаждая раствор на бане со льдом до тех пор, пока не появится разница в цвете и непрозрачности или прозрачности раствора.

Центрифугируют раствор, получая фракции разделения (центрифугирование осуществляют со скоростью 7500 об/мин при температуре 4°C в течение 10 мин). Полученный осадок выделяют и хранят при -4°C.

Гомогенат красных галобактерий-архей и микроводоросли дуналиеллы получают в 7,5% NaCl и при pH=7.

Для приготовления раствора галобактерий-*Archea* смешивают 375 г NaCl, 75 мл указанного выше гомогената, добавляют воду до достижения точного объема 5 л.

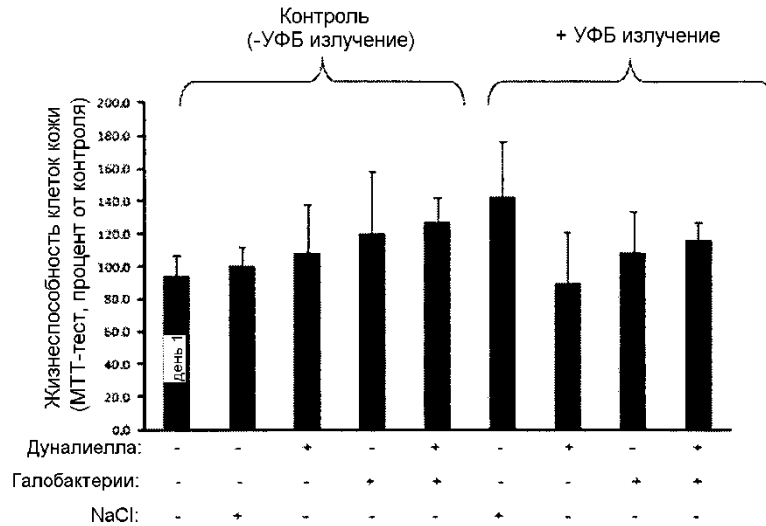
Раствор микроводорослей *Dunaliella* добавляют к раствору гелобактерий для достижения пропорции 80% экстракта галобактерии DN-1 и 20% экстракта *Dunaliella**.

*Экстракт *Dunaliella* приобретает у сертифицированного поставщика.

В приведенном выше описании варианты осуществления настоящего изобретения, в том числе предпочтительные варианты, представлены с задачей иллюстрации и описания. Они не претендуют на исчерпывающий характер или не предназначены для ограничения изобретения точной раскрытой формой. Очевидные модификации или вариации возможны в свете изложенных выше сведений. Варианты осуществления были выбраны и описаны для обеспечения наилучшей иллюстрации принципов изобретения и его практического применения и для обеспечения возможности специалисту в данной области использовать изобретение в различных вариантах осуществления и с различными модификациями, подходящими для конкретного предполагаемого использования. Все такие модификации и варианты входят в объем изобретения, как установлено пунктами прилагаемой формулы изобретения, при их интерпретации в соответствии с объемом охраны они являются объективно, легально и справедливо названными.

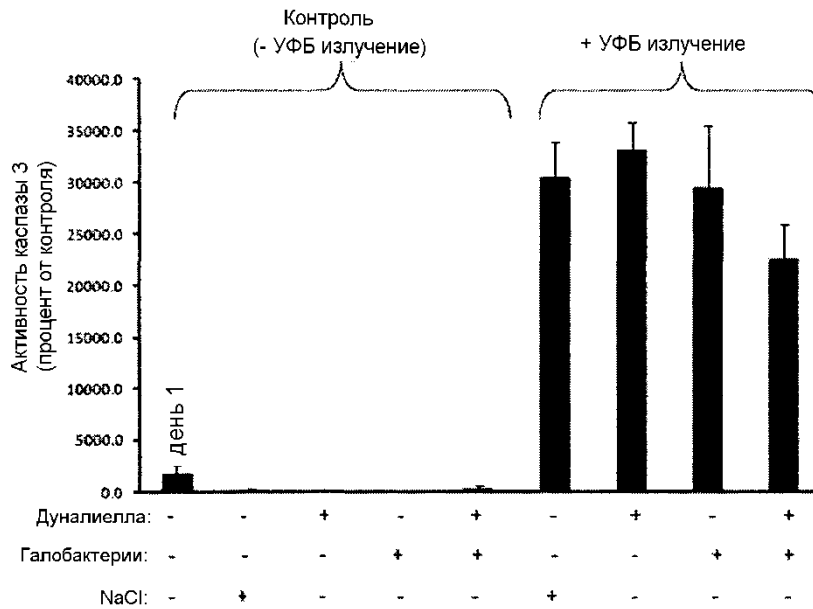
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для местного применения для лечения повреждения кожи, содержащая:
 - a) экстракт архебактерий DN-1, содержащий по меньшей мере одну водорастворимую фракцию и по меньшей мере одну маслорастворимую фракцию;
 - b) экстракт дуналиеллы.
2. Композиция по п.1, где количество архебактерий DN-1 составляет 2,5-10% от веса композиции.
3. Композиция по п.1 или 2, где указанная композиция дополнительно содержит консерванты, сурфактанты, увлажняющие вещества, эмульгаторы, загустители, отдушки, растительные или минеральные масла, антисептические средства, подкисляющие или подщелачивающие вещества, витамины, анти-УФ агенты, растворители, вещества, стабилизирующие pH, силиконы; или любую их комбинацию.
4. Композиция по любому из пп.1-3, которая находится в форме для местной доставки, выбранной из группы, состоящей из геля, молочка, лосьона, сыворотки, маски, мази и крема.
5. Способ лечения повреждения кожи, включающий местное нанесение на кожу композиции по любому из пп.1-4.
6. Способ получения композиции для местного применения для лечения повреждения кожи, включающий стадии:
 - a) получение экстрактов архебактерий DN-1;
 - b) растворение указанных экстрактов архебактерий DN-1 в масле и в воде;
 - c) получение экстрактов дуналиеллы;
 - d) смешивание указанных экстрактов архебактерий DN-1 и дуналиеллы.
7. Способ по п.6, где дополнительно добавляют агент, выбранный из группы, состоящей из консервантов, сурфактантов, увлажняющих веществ, эмульгаторов, загустителей, отдушек, растительных или минеральных масел, антисептических средств, подкисляющих или подщелачивающих веществ, витаминов, анти-УФ агентов, растворителей, веществ, стабилизирующих pH, силиконов или любой их комбинации.



Различные экстракты не уменьшают жизнеспособность клеток кожи человека. HSOC инкубировали с использованием или без использования 20% D (0,69 мг/см²), 80% B (2,76 мг/см²) или обоих экстрактов в течение 24 часов и подвергали воздействию 300 мДж УФБ-излучения. Затем жизнеспособность эпидермиса измеряли с помощью МТТ-теста. Результаты представлены в виде процента от контроля. Среднее значение \pm SEM, n=3-4

Фиг. 1

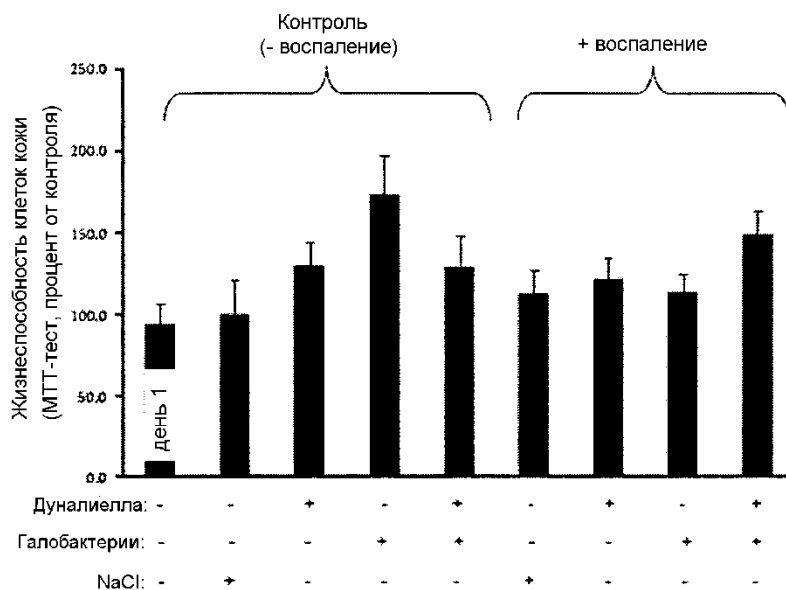


Не обнаружено статистически значимого эффекта экстрактов В и D на УФБ-индуцированное повреждение.

Ткани обрабатывали, как указано в описании к фиг. 5. Затем измеряли степень апоптоза с помощью теста определения активности каспазы 3. Результаты представлены в виде процента от контроля.

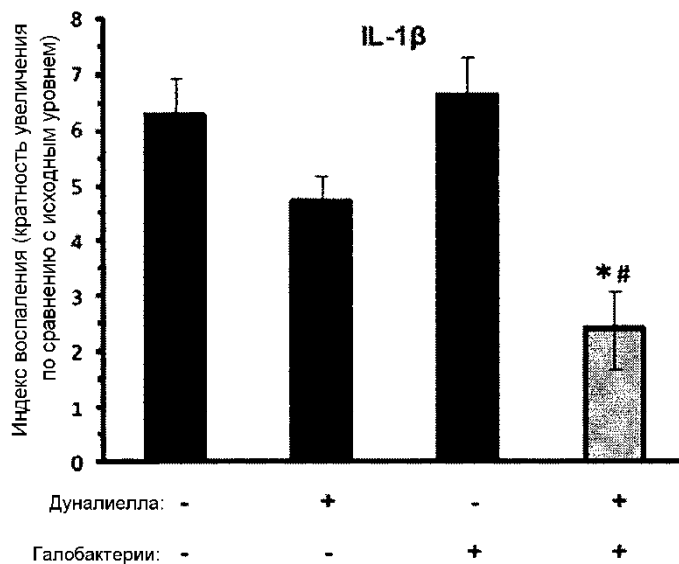
Среднее значение \pm SEM, n=3-4

Фиг. 2



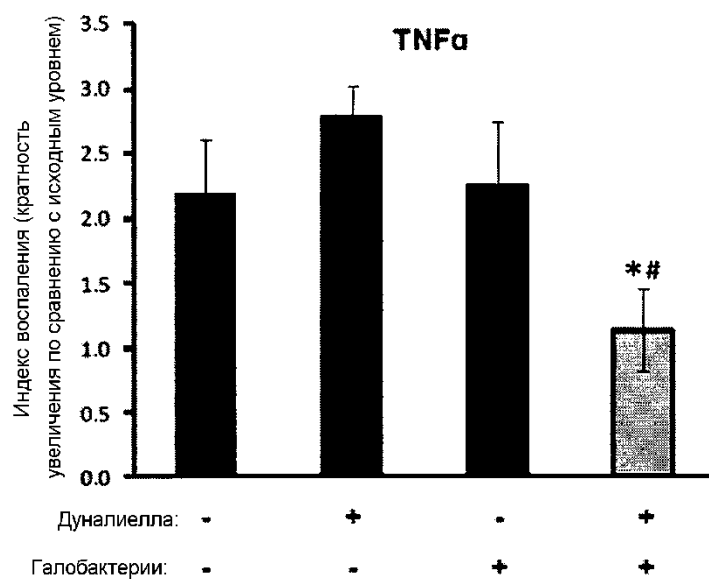
Различные экстракты не уменьшают жизнеспособность клеток кожи человека. Воспаление в HSOC вызывали обработкой LPS/EGF. HSOC затем инкубировали с использованием или без использования 20% D (0,69 мг/см²), 80% B (2,76 мг/см²) или обоих экстрактов в течение 24 часов. Жизнеспособность эпидермиса измеряли с помощью МТТ-теста. Результаты представлены в виде процента от контроля. Среднее значение ± SEM, n=3-4

Фиг. 3



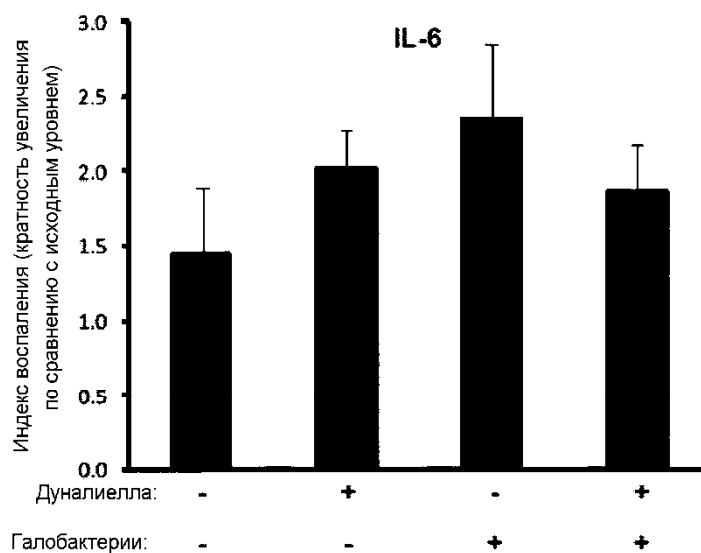
Экстракт синергического действия уменьшал индукцию **IL-1 β** в образцах кожи с воспалением. Ткани обрабатывали, как указано в описании фиг.7. Затем уровень секретируемого **IL-1 β** измеряли с помощью ELISA согласно инструкциям производителя. Результаты представлены в виде кратности увеличения по сравнению с исходным уровнем секреции. Среднее значение ± SEM, n=4-6; *p<0,05 по сравнению с необработанным контролем; *p<0,05 по сравнению с аддитивными эффектами, наблюдаемыми в клетках, обработанных экстрактами дуналиеллы и галобактерий.

Фиг. 4



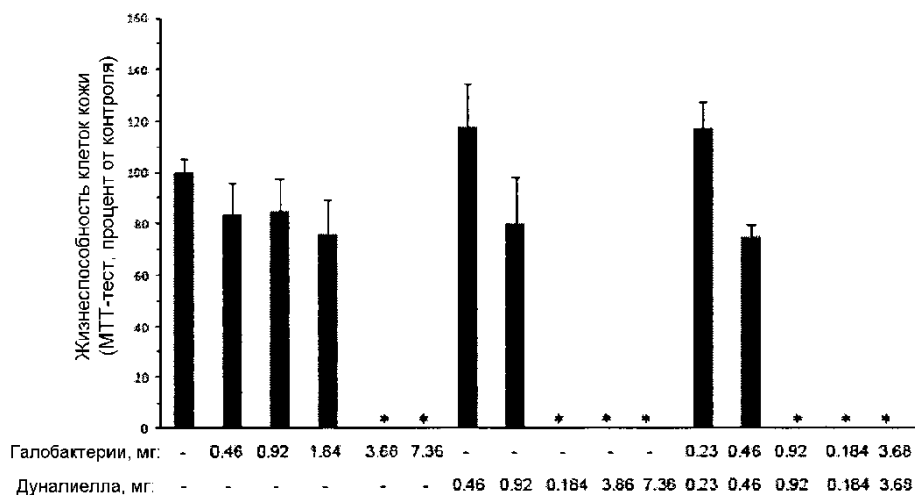
Экстракт синергического действия уменьшал индукцию **TNFα** в образцах кожи с воспалением. Ткани обрабатывали, как указано в описании фиг.7. Затем уровни секретируемого **TNFα** измеряли с помощью ELISA согласно инструкциям производителя. Результаты представлены в виде кратности увеличения по сравнению с исходным уровнем секреции. Среднее значение \pm SEM, $n=5-6$; * $p<0,05$ по сравнению с необработанным контролем; *# $p<0,05$ по сравнению с аддитивными эффектами, наблюдаемыми в клетках, обработанных экстрактами дуналиеллы и галобактерий.

Фиг. 5



Отсутствие уменьшающего действия экстракта синергического действия на индукцию IL-6 в образцах кожи с воспалением. Ткани обрабатывали, как указано в описании фиг.7. Затем уровни секретируемого IL-6 измеряли с помощью ELISA согласно инструкциям производителя. Результаты представлены в виде кратности увеличения по сравнению с исходным уровнем секреции. Среднее значение \pm SEM, $n=5-6$

Фиг. 6



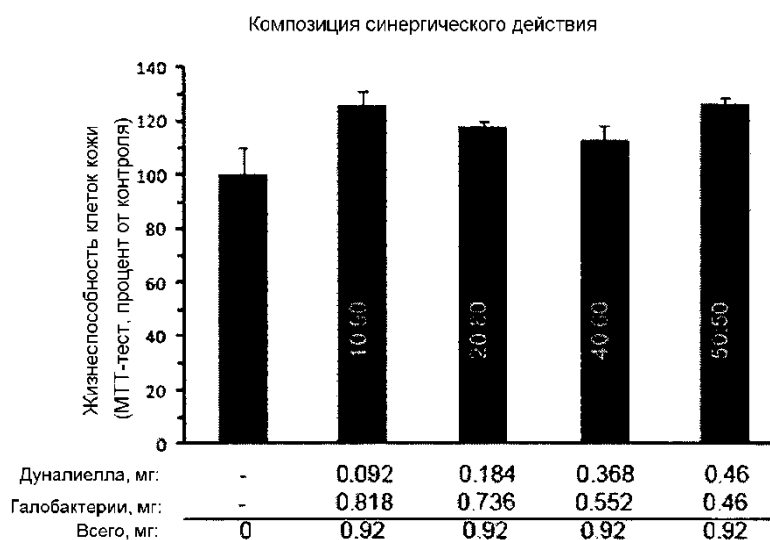
Анализ зависимости доза - эффект действия экстрактов на жизнеспособность кератиноцитов.

Клетки HaCaT инкубировали с использованием и без указанных концентраций экстракта дуналиеллы, экстракта галобактерий и экстракта синергического действия в течение 24 часов.

Жизнеспособность клеток измеряли с помощью МТТ-теста. Результаты представлены в виде процента от контроля. Среднее значение \pm SEM, n=5-6.

*p<0,05 по сравнению с необработанным контролем.

Фиг. 7



Анализ зависимости доза - эффект действия различных соотношений D/B на жизнеспособность кератиноцитов. Клетки HaCaT инкубировали с использованием и без экстракта синергического действия, содержащего указанные соотношения, в течение 24 часов.

Жизнеспособность клеток измеряли с помощью МТТ-теста. Результаты представлены в виде процента от контроля. Среднее значение \pm SEM, n=4-5.

Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2