



(21) Numer zgłoszenia: **416041**

(22) Data zgłoszenia: **04.02.2016**

(51) Int.Cl.

**A61K 31/352 (2006.01)**

**A61K 31/7048 (2006.01)**

**A61P 17/00 (2006.01)**

Opis patentowy  
przedrukowano ze względu  
na zauważone błędy

(54) **Zastosowanie naryngeniny i preparatu zawierającego naryngeninę  
oraz sposób spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania  
plam bielaczych skóry**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**16.08.2017 BUP 17/17**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.08.2018 WUP 08/18**

(73) Uprawniony z patentu:

**LABORATORIUM KOSMETYCZNE DR IRENA ERIS  
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,  
Piaseczno, PL**

**INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. M. NENCKIEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK,  
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**IRENA SZOŁOMICKA-ORFINGER,  
Warszawa, PL**

**KATARZYNA ROGIEWICZ, Milanówek, PL**

**RENATA DĘBOWSKA, Stojadła, PL**

**ELŻBIETA JAKIMIUK, Piastów, PL**

**MAŁGORZATA SZUBERT, Warszawa, PL**

**KAROLINA BAZELA, Piaseczno, PL**

**MONIKA PASIKOWSKA, Warszawa, PL**

**PIOTR BEDNARCZYK, Warszawa, PL**

**JERZY DUSZYŃSKI, Podkowa Leśna, PL**

**JOANNA SZCZEPANOWSKA, Warszawa, PL**

**ADAM SZEWCZYK, Warszawa, PL**

**MARIUSZ WIĘCKOWSKI, Skierniewice, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Katarzyna Naperty**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie naryngeny i preparatu zawierającego naryngeninę oraz sposób spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielaczych skóry.

Bielactwo jest przewlekłą chorobą polegającą na zniszczeniu, bądź uszkodzeniu naskórkowych komórek barwnikowych – melanocytów, w skórze i mieszkach włosowych. Znane są dwa główne typy schorzenia: bielactwo nabyte (vitiligo) i wrodzone (albinizm). Ocenia się, że na bielactwo zapada 1–4% populacji. Objawem choroby jest pojawienie się plam bielaczych rozmieszczonych w obrębie skóry kończyn, tułowia i twarzy. Dokładne przyczyny powstawania bielactwa nie są do końca poznane. Istnieje kilka teorii dotyczących etiologii bielactwa. Przypuszcza się, że może być ono efektem zespołu czynników genetycznych, środowiskowych i reakcji autoimmunologicznych.

Teoria autoimmunologiczna jest najpowszechniejszą i najlepiej udokumentowaną (ok. 30% wszystkich przypadków) tezą dotyczącą etiopatogenezy bielactwa. Teoria ta zakłada, że do uszkodzenia melanocytów dochodzi na drodze immunologicznej, za czym przemawia częste współistnienie bielactwa z innymi chorobami autoimmunologicznymi np. chorobami tarczycy, niedokrwistością złośliwą, toczniem rumieniowatym, twardziną, cukrzycą, czy łysieniem plackowatym.

Wiele badań naukowych, wskazuje, że jednym z mechanizmów patogenezy bielactwa na poziomie komórkowym jest zaburzona równowaga stanu redoks komórek i tkanek. Niemniej jednak pomimo wielu prac na temat roli stresu oksydacyjnego, brakuje informacji na temat zależnego od stresu oksydacyjnego zaniku lub uszkodzenia melanocytów w warstwie naskórka (Zhang Y, Liu L, Jin L, Yi X, Dang E, Yang Y, Li C, Gao T. Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: new insights into the destruction of melanocytes. *J. Invest Dermatol.* 2014 Jan; 134 (1): 183-91; Bellei B, Pitisci A, Ottaviani M, Ludovici M, Cota C, Luzi F, Dell'Anna ML, Picardo M. Vitiligo: a possible model of degenerative diseases. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59782).

Istnieją badania, które dowodzą, że melanocyty izolowane od osób chorych na bielactwo nabyte wykazują zmiany w przekazywaniu sygnałów komórkowych, charakterystyczne dla niektórych chorób neurodegradacyjnych: zaburzenia w metabolizmie lipidów, nadaktywację kinaz MAP, czy zależną od białka p53 kaskadę sygnałową, mogącą prowadzić do programowanej śmierci komórki. Dodatkowo melanocyty pobrane od pacjentów produkują wiele białek pre-apoptycznych (senescence-associated secretory phenotype SAPS), takich jak interleukina-6 (IL-6), metaloproteinaza-3 (MMP3), cyklooksyzgenaza-2 (Cox-2) czy TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) (Bellei B, Pitisci A, Ottaviani M, Ludovici M, Cota C, Luzi F, Dell'Anna ML, Picardo M. Vitiligo: a possible model of degenerative diseases. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59782).

Innym czynnikiem mającym wpływ na dysfunkcje melanocytów są zaburzenia w obrębie komórek naskórka, które wpływają negatywnie na funkcjonowanie komórek barwnikowych (Moretti S, Fabbri P, Baroni G, Berti S, Bani D, Berti E, Nassini R, Lotti T, Massi D. Keratinocyte dysfunction in vitiligo epidermis: cytokine microenvironment and correlation to keratinocyte apoptosis. *Histol Histopathol.* 2009 Jul; 24 (7): 849–57; Moretti S, Spallanzani A, Amato L, Hautmann G, Gallerani I, Fabiani M, Fabbri P. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res.* 2002 Apr; 15 (2): 87–92; Moretti S, Spallanzani A, Amato L, Hautmann G, Gallerani I, Fabbri P. Vitiligo and Epidermal Microenvironment: Possible Involvement of Keratinocyte-Derived Cytokines. *Arch Dermatol.* 2002; 138 (2): 273–274).

W przyczynach degradacji melanocytów i rozwoju bielactwa nabytego upatruje się zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów. Zaburzoną równowagę w ilości antyoksydantów (np. katalazy czy dysmutazy ponadtlenkowej) związaną z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu, zaburzenia w potencjale transbłonowym oraz wzrost ilości komórek apoptycznych zaobserwowano u pacjentów z bielactwem. Sugeruje się, że mitochondria mogą być celem dla ROS, cytokin, katecholaminy, zaburzeń w metabolizmie Ca<sup>2+</sup>, które to czynniki są zdolne do zaindukowania degradacji melanocytów (Dell'Anna ML, Maresca V, Briganti S, Camera E, Falchi M, Picardo M. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. *J Invest Dermatol.* 2001 Oct; 117 (4): 908–13).

Istnieje wiele metod leczenia lub łagodzenia objawów bielactwa, jednak żadna nie daje pełnej gwarancji powodzenia. Wybór najefektywniejszej terapii zależy od wielu czynników, w tym od wieku pacjenta, typu klinicznego bielactwa, rozległości zmian i dynamiki procesu chorobowego. W leczeniu

miejscowym stosuje się: kortykosteroidy, inhibitory kalcyneuryny, filtry słoneczne, maskowanie, tj. kosmetyki do makijażu korygującego. Stosuje się także fototerapię bądź laseroterapię. W leczeniu ogólnym stosowana bywa, jako terapia wspomagająca, suplementacja antyoksydantami.

Jakkolwiek znanych jest kilka środków przeznaczonych do profilaktyki, leczenia i łagodzenia objawów bielactwa, to nadal istniała potrzeba opracowania skutecznych środków mogących poprawiać kondycję skóry pacjentów.

Naryngenina (5,7,4'-trihydroksyflawanon) jest aglikonem – pochodną uwodornionego flawonu, nie zawierającego podwójnego wiązania między atomami węgla C-2 i C-3 (flawanon). W przyrodzie bogatym źródłem flawanonów są owoce cytrusowe, przede wszystkim pomarańcze (*Citrus sinensis*) i mandarynki (*Citrus reticulata*). Naryngenina, nadająca gorzki smak owocom, jest obecna w grejpfrutach (*Citrus paradisi*) w 70%. Niewielkie jej stężenia wykryto także w pomidorach i ich przetworach.

Do kierunków aktywności farmakologicznej naryngeniny i jej pochodnych należą: działanie estrogenne (Le Bail J.C. i in.: Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Life Sci.* 2001, 68, 751; Miksicek R.J.: Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* 1993, 44, 37), obniżające poziom cholesterolu (Borradaile N.M. i in.: Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: Enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 2002, 43, 1544), przeciwzapalne (Erlund I.: Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr. Res.* 2004, 24, 851), przeciwwrzodowe (Martin M.J., Motilva V., De la Lastra A.: Quercetin and naringenin: effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytother. Res.* 1993, 7, 150), rozkurczowe (18, 19), ochronne na skórę (Bonina F. i in.: Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *Int. J. Pharm.* 1996, 145, 87; Saija A. i in.: Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.* 1998, 175, 85) i przeciwnowotworowe (Totta P. i in.: Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: Involvement of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  signaling. *IUBMB Life* 2004, 56, 491).

Bonina i in. udowodnili w warunkach *in vitro* ochronne działanie na skórę naryngeniny przed promieniowaniem UV. Mechanizm procesu obejmuje hamowanie utleniania fosfatydylocholino w błonach liposomów i zmniejszenie produkcji dialdehydu malonowego (MDA). Naryngenina obniżała ilość MDA w zależności od zastosowanego stężenia. Naryngenina wykazuje słabsze działanie antyrodnikowe, lecz ze względu na lepszą absorpcję i właściwość penetracji do głębszych warstw skóry stanowi bardziej korzystny składnik preparatów ochronnych.

Istnieje doniesienie mówiące o tym, że naryngenina wspomaga proces melanogenezy w modelu doświadczalnym tego procesu w komórkach nowotworowych mysich B16 poprzez stymulację aktywności enzymu tyrozynazy, głównego enzymu w szlaku powstawania pigmentu (Ohguchi i. in. Stimulation of Melanogenesis by the Citrus Flavonoid Naringenin in Mouse B16 Melanoma Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (6), 1499–1501, 2006).

Jednak nie jest oczywiste, że to działanie może mieć miejsce w przypadku bielactwa, gdyż komórki barwnikowe są albo dysfunkcyjne, albo ich nie ma w tkance.

Istniała zatem potrzeba opracowania skutecznych środków mogących poprawiać kondycję skóry pacjentów cierpiących na bielactwo.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że naryngenina znacząco poprawia wygląd i kondycję skóry osób cierpiących na bielactwo.

Wynalazek dotyczy zastosowania naryngeniny w skutecznej ilości do spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielactwych skóry.

Korzystne jest zastosowanie, w którym stosuje się naryngeninę w ilości od 0,0001% do 1%, korzystnie od 0,001% do 0,01%, najkorzystniej od 0,01% do 0,1%.

Wynalazek dotyczy także preparatu zawierającego jako substancję czynną naryngeninę w skutecznej ilości oraz kosmetycznie dopuszczalne zaróbki, nośniki i substancje dodatkowe, do stosowania do spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielactwych skóry.

Korzystne jest stosowanie preparatu, który zawiera naryngeninę w ilości od 0,0001% do 1% wagowych, korzystnie od 0,001% do 0,01% wagowych, najkorzystniej od 0,01% do 0,1% wagowych w przeliczeniu na całość preparatu.

Korzystne jest stosowanie preparatu w postaci kremu, balsamu, lotionu, aerozolu, żelu, fluidu, korektora, emulsji O/W i W/O, toniku, żeli myjących, szamponów, pianek, a także mleczek, galaretek, past, maści, plastrów i systemów transdermalnych.

Wynalazek dotyczy również sposobu spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielactwych skóry polegającego na tym, że skórę traktuje się skuteczną ilością naryngeniny zdefiniowanej powyżej i/lub preparatu zdefiniowanego powyżej.

Kompozycja zawierająca naryngeninę znajduje zastosowanie w pielęgnacji skóry z bielactwem, w przypadku której pod wpływem różnych czynników stresogennych zewnątrz- bądź wewnątrzkomórkowych, dochodzi do dysfunkcji komórek barwnikowych – melanocytów, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania produkcji barwnika i powstania plam bielactwych.

Kompozycję naryngeniny można podawać w połączeniu z kosmetycznie dopuszczalnymi nośnikami lub rozcieńczalnikami w wielu różnych postaciach dawkowanych do stosowania miejscowo. Można je łączyć z wieloma różnymi kosmetycznie dopuszczalnymi, chemicznie obojętnymi nośnikami, w postaci kremu, balsamu, lotionu, żelu, emulsji O/W i W/O, żeli myjących, itp., zgodnie ze standardową praktyką kosmetyczną.

Kremy i żele można np. formułować z wodnym lub oleistym podłożem, z dodatkiem odpowiednich środków zagęszczających i/lub żelujących i/lub rozpuszczalników. Takie podłoża mogą zawierać np. wodę i/lub olej, taki jak ciekła parafina lub dowolny olej roślinny, albo rozpuszczalnik, taki jak glikol polietylenowy. Do środków zagęszczających i środków żelujących, które można stosować w zależności od charakteru podłoża, należą miękka parafina, stearynian glinu, alkohol cetostearylowy, glikole polietylenowe, tłuszcz z wełny, wosk pszczeli, karboksypolimetylen i pochodne celulozy i/lub monostearynian glicerylu i/lub niejonowe środki emulgujące.

Emulsje W/O i O/W zawierają fazę wodną, fazę tłuszczową i środek powierzchniowo czynny lub mieszaninę środków powierzchniowo czynnych (emulgatorów), które umożliwiają powstanie emulsji. Stosunek ilościowy zależy od wymaganej konsystencji, od właściwości składników fazy tłuszczowej i właściwości emulgatora. Można je formułować poprzez połączenie fazy wodnej z fazą olejową z odpowiednimi emulgatorami. Faza wodna może zawierać ekstrakty roślinne wodne lub/i alkoholowe, faza olejowa – oleje roślinne naturalne (oleinowy, linolowy, linolenowy), parafinowe (wazelinowe, białe, mineralne, płynne parafiny), masła, oleje syntetyczne.

Lotiony można formułować z użyciem wodnego lub olejowego podłoża, np. etanolu lub alkoholu oleilowego.

W razie potrzeby środki kosmetyczne do stosowania zgodnie z wynalazkiem można buforować przez dodanie odpowiednich środków buforujących.

Zazwyczaj preparaty zawierają również jeden lub większą liczbę środków emulgujących, stabilizatorów, środków dyspergujących, środków zagęszczających, środków barwiących, substancji zapachowych, środków konserwujących środków nawilżających, itp.

Nośniki odpowiednie do stosowania zgodnie z wynalazkiem obejmują stałe rozcieńczalniki lub wypełniacze, ośrodki wodne i różne nietoksyczne rozpuszczalniki organiczne i nieorganiczne.

Poniżej przedstawiono przykładowe ramowe receptury środków kosmetycznych oraz preparatów do stosowania zgodnie z wynalazkiem.

#### Receptura ramowa kremu na noc do twarzy i ciała

Nazwa składnika	Maksymalnie %
emolienty (oleje roślinne, mineralne, silikonowe), woski	20
środki emulgujące	10
środki wiążące wilgoć (np. gliceryna, glikol propylenowy, glikol butylenowy)	30
składniki zagęszczające (np. karbomer, eter celulozy, estry poliolo kwasu tłuszczowego, kopolimery kwasu akrylowego i alkilometakrylanu, galactoarabinian, polyacrylamid)	5
środki konserwujące	2
naryngenina (składnik czynny)	1
woda	do 100

## Receptura ramowa kremu na dzień do twarzy i ciała

Nazwa składnika	Maksymalnie %
emolienty (oleje roślinne, mineralne, silikonowe), woski	10
środki emulgujące	5
środki wiążące wilgoć (np. gliceryna, glikol propylenowy)	7
składniki zagęszczające (np. karbomer, eter celulozy, estry poliolo kwasu tłuszczowego, kopolimery kwasu akrylowego i alkilometakrylanu )	12
środki konserwujące	1,6
filtry UV (oktokrylen, 2,2'-metyleno-bis(6(2H-benzotriazol-2-ilo)-4-(1,1,3,3-tetrametylo-butyl)fenol (nano), 2,4,6 trianilino-(p-karbo-2'etyloheksylo-1'oksy)-1,3,5-triazyna, dwutlenek tytanu, dwutlenek tytanu(nano))	25
naryngenina (składnik czynny)	1
woda	do 100

Poniżej przedstawiono przykłady ilustrujące przedmiot wynalazku. W tabelach podano składy preparatów do stosowania zgodnie z wynalazkiem zawierających naryngeninę.

Przykłady

P r z y k ł a d 1 – Receptura szczegółowa brązującego kremu na noc do twarzy i ciała:

Nazwa Składnika (INCI)	Funkcja	Ilość [%]
Dimetikon/dimetikon winylowy	absorbent	0,925
krzemionka	wypełniacz	0,075
cyklopentasiloksan	emolient	1,63
PEG/PPG-18/18 Dimetikon	środek emulgujący	0,07
Poliakrylan sodu	środek zapewniający konsystencję	1,82
Tridecet-6	środek powierzchniowo czynny	0,42
gliceryna	środek wiążący wilgoć	23,4
Naryngenina	składnik czynny	0,098
Glikol butylenowy	środek wiążący wilgoć	0,18
Metylparaben, fenoksyetanol	środek konserwujący	0,46
woda	rozpuszczalnik	do 100

P r z y k ł a d 2 – Receptura szczegółowa kremu na dzień do twarzy i ciała:

Nazwa Składnika (INCI)	Funkcja	Ilość [%]
Hydrogen dimetikonu	środek przeciwbrylający	0,072
naryngenina	składnik czynny	0,098
Lauret-7	środek powierzchniowo czynny	0,31
hydroksyaceton	środek konserwujący	0,5
1,2-Hexanediol	rozpuszczalnik	1,5
Dwutlenek tytanu (nano)	filtr UV	1,512
Cetyl potasowo-fosforowy	środek emulgujący	2
Alkohol cetylowy	środek zapewniający konsystencję	2,5
Cetiol CC	emolient	4
Oktokrylen	filtr UV	5
woda	rozpuszczalnik	do 100

Produkty zgodne z niniejszym wynalazkiem zawierające naryngeninę działają ochronnie, spowalniają i przeciwdziałają pojawianiu się plam bielaczych.

Nie wiążąc się z żadną teorią wydaje się, że zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów mogą powodować dysfunkcje i uszkodzenia melanocytów i w konsekwencji prowadzić do zahamowania produkcji barwnika.

Wyniki badań dokumentujących działanie naryngeniny przedstawiono na załączonych figurach, przy czym:

na Fig. 1. przedstawiono wpływ naryngeniny na aktywność kanału  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  obecnego w mitochondriach ludzkich fibroblastów. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  przy różnych potencjałach w układzie symetrycznego roztworu (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych (200  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ), po obniżeniu poziomu wapnia (1  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ) oraz po dodaniu naryngeniny (10  $\mu\text{M}$ ). Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz;

na Fig. 2. przedstawiono wyniki analizy prądowo-napięciowej wykonanej na podstawie rejestracji zmian przepływu jonów przez kanał  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  w warunkach kontrolnych (200  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ) („■”) oraz po podaniu 10  $\mu\text{M}$  naryngeniny („▼”);

na Fig. 3. przedstawiono wyniki analizy prawdopodobieństwa otwarć kanału  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  przy różnych potencjałach w układzie symetrycznego roztworu (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych (200  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ) („■”), po obniżeniu poziomu wapnia (1  $\mu\text{M Ca}^{2+}$ ) („▲”) oraz po dodaniu naryngeniny (10  $\mu\text{M}$ ) („▼”);

na Fig. 4. przedstawiono wpływ naryngeniny na aktywność kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich fibroblastów. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał przy potencjale -60 mV w symetrycznym układzie stężeń (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 30  $\mu\text{M}$  naryngeniny. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz;

na Fig. 5. przedstawiono prawdopodobieństwa otwarć kanału  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  przy stałym napięciu wynoszącym -60 mV w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 30  $\mu\text{M}$  naryngeniny;

na Fig. 6. przedstawiono wpływ naryngeniny na poziom mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej – SOD2 w komórkach nie naświetlanych i po naświetlaniu UVA. Wykonano 3 niezależne doświadczenia;

na Fig. 7. przedstawiono przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego SOD2 i aktywny (wewnętrzna kontrola – ilościowe nałożenie prób);

na Fig. 8. podano sekwencje starterów, a także wykazano na wykresach, że oba geny *Per1* i *Bmal1* w obu powtórzeniach doświadczenia mają obniżoną ekspresję po naryngenie w porównaniu z kontrolą.

#### Badania biologiczne

##### Przygotowanie komórek do doświadczeń

W niniejszym badaniu wykorzystano linię komórkową fibroblastów pierwotnych (ATCC, PCS-201-012, USA). Model doświadczalny wybrano na podstawie wiedzy, że komórki skóry jak fibroblasty, melanocyty i keratynocyty wpływają na swoje wzajemne funkcjonowanie (Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *J Infect.* 2015 Oct; 71 (4): 413–21). Również mitochondria w różnych typach komórek skóry funkcjonują w ten sam sposób. Wysokocukrowa pożywka hodowlana DMEM (Lonza, Szwajcaria) zawierała dodatkowo: 10% FBS (ang. *fetal bovine serum*, Lonza), 100 j/ml penicyliny i streptomycyny (Lonza), 1 g/l pirogrogrianu sodu (Lonza) oraz 2 mM/ml L-glutaminy (Lonza). Komórki po 24 h inkubacji z 0,01% naryngeniną (DKSH, Szwajcaria), naświetlano w PBS promieniami UVA 8 J/cm<sup>2</sup> (komórki kontrolne bez naświetlania były w tym czasie inkubowane także w PBS), usuwano PBS i inkubowano 15 minut we właściwym medium. Następnie komórki były poddawane testom.

##### Protokół izolacji mitochondriów z fibroblastów

Zebrane komórki odwirowano w 800 g/10 min, po czym przeprowadzono w zawiesinę w 2 ml roztworu do izolacji mitochondriów (250 mM sacharoza, 5 mM HEPES, pH = 7,2), i homogenizowano używając szklanego homogenizatora. Homogenat następnie odwirowano w 9200 g przez 10 min. Zdekantowano supernatant, a grudkę przeprowadzono w zawiesinę w 1 ml roztworu do izolacji mitochondriów. Zawiesinę wirowano ponownie w 770 g przez 10 min. Supernatant umieszczono w nowej próbówce i wirowano w 9200 g przez 10 min. Odwirowane mitochondria przeprowadzono w zawiesinę w buforze 150 mM KCl, 10 mM HEPES, p = 7,2 i wirowano w 9200 g przez 10 min. Po końcowym wirowaniu mitochondria przeprowadzono w zawiesinę w 0,3 ml 150 mM KCl, 10 mM HEPES, p = 7,2 i stosowano w dalszych doświadczeniach.

### Eksperymenty patch-clamp i analiza danych

Mitoplasty (pęcherzyki wewnętrznej błony mitochondrialnej) przygotowano z uprzednio wyizolowanych mitochondriów przez dodanie do mitochondriów roztwory hypotonicznego (5 mM HEPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,2) przez 45 sek. w celu rozbicia zewnętrznej błony mitochondrialnej. Następnie dodano roztwór hipertoniczny (750 mM KCl, 30 mM HEPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, p = 7,2), w celu utrzymania środowiska izotonicznego. Do testów patch-clamp używa się pipety ze szkła borosilikonowego połączonego z pullerem Flaming/Brown. Pipetę wypełniono roztworem izotonicznym (150 mM KCl, 10 mM HEPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, p = 7,2). Roztwór ten też użyto jako kontrolę do wszystkich prezentowanych wyników. Modulatory kanałów dodano jako rozcieńczenia od roztworu izotonicznego. Roztwór gradientowy składa się z 450 mM KCl, 10 mM HEPES i 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH = 7,2. Obieg był monitorowany przy użyciu wzmacniacza (Axopatch 200B, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Badanie aktywności kanałów mitochondrialnych zgodnie z metodą Toczyłowska-Mamińska i in. 2014 (Toczyłowska-Mamińska R, Olszewska A, Laskowski M, Bednarczyk P, Skowronek K, Szewczyk A.: Potassium channel in the mitochondria of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2014 Mar; 134 (3): 764–72).

### Metodyka badawcza

#### Technika Western Blot

Komórki wysiano na szalki o średnicy 150 mm. W części szalek komórki traktowano przez 24 h naryngeniną (0,01%), pozostałe hodowano w warunkach kontrolnych. Po 24 h medium hodowlane zastąpiono roztworem PBS (37°C). Następnie szalki podzielono na dwie grupy, z których jedną poddano naświetlaniu promieniami UV A (8 J/cm<sup>2</sup>). W tym samym czasie komórki na szalkach z grupy kontrolnej inkubowano w roztworze PBS z jonami Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> w temperaturze pokojowej przez czas naświetlania. Następnie we wszystkich szalkach wymieniono roztwór PBS na medium hodowlane i odstawiano do inkubatora na 15 minut. Po tym czasie komórki poddano trypsynizacji, przepłukano zimnym roztworem PBS, a następnie poddano wirowaniu (250 x g/3 min). Po usunięciu supernatantu, osad komórek przeprowadzono w zawiesinę w buforze lizującym RIPA zawierającym inhibitory proteaz i fosfataz (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) w temperaturze 4°C i inkubowano przez 20 min. Następnie komórki poddano wirowaniu (8600 x g/30 min/ 4°C) i w supernatancie oznaczono stężenie białka metodą Bradford (Bradford MM (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248–54). Do lizatów dodano buforu obciążającego (Tris-HCl (0,5 M), SDS (2,3%), merkaptoetanol (5%) (obj.), glicerol (12,5%) (obj.); pH 6,8).

Do badania poziomu dysmutazy ponadtlenkowej SOD2 w mitochondriach wykorzystano metodę Western Blot. Odpowiednie objętości próbek zawierające określoną ilość białka poddano elektroforezie SDS-PAGE, a następnie przeprowadzono transfer na błonę nitrocelulozową. Błonę tę inkubowano w buforze blokującym (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Ne, USA). Następnie błonę nitrocelulozową poddano inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi w w/w roztworze z dodatkiem 0,01% Tween 20, przepłukano trzykrotnie roztworem TBST i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z barwnikiem IRDye. Po ponownym przepłukaniu błony nitrocelulozowej roztworem TBST dokonano wizualizacji sygnału za pomocą Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

#### Badanie ekspresji genów hPer1 i hBmal1

Zbadano również ekspresję dwóch genów, tzw. genów zegara Per1 i Bmal1 i genu referencyjnego EF2 w fibroblastach S38 (linia pierwotna ze skórnej biopsji od osoby w wieku lat 38). Udokumentowano, że wyciszenie ekspresji obu tych genów wpływa na rozpoczęcie produkcji barwnika w mieszczkach włosowych i keratynocytach (J. A. Hardman, D. J. Tobin, I. S. Haslam, Y. Al-Nuaimi, B. Grimaldi, Ralf Paus.: A novel chronobiological control of pigmentation: Molecular clock proteins regulate melanogenesis and melanocyte functions in human hair follicles and epidermis. *ESDR*, wrzesień 2014, Kopenhaga).

Fibroblasty wysiewano na 6-studzienkowe płytki, po uzyskaniu kofluencji traktowano komórki 0,001% naryngeniną przez 24 godziny. Po tym czasie komórki zbierano w celu wyizolowania RNA. RNA izolowano przy użyciu Trizol Reagent (Ambion – cat nb: 15596–018) metodą Chomczyskiego (Masuda N., Ohnishi T., Kawamoto S., Monden M., Okubo K., 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Research*, 1999. Vol. 27, No. 22, 4436–4443). Do zbadania aktywności genów posłużył model urządzenia do qPCR – CFX96 Touch C1000 Real Time PCR Detection System, Biorad.

Na Fig. 8. podano sekwencje starterów. Ponadto, przedstawiono wykresy, z których wynika, że oba geny Per1 i Bmal1 w obu powtórzeniach doświadczenia mają obniżoną ekspresję po naryngeninie względem kontroli (K – komórki w samym medium, K-N – komórki w rozpuszczalniku służącym do rozpuszczania naryngeny).

### Badania z udziałem ludzi

Do badania zakwalifikowano 38 osób chorujących na bielactwo w wieku od 10 do 72 lat (średnia wieku 39 lata), 34 kobiety i 4 mężczyzn. Badanie ukończyło 28 osób. Próbkę produktu według wynalazku do badań (krem na noc z Przykładu 2) dostarczono w opakowaniach z tworzywa sztucznego (typu tuba z kaniulą) opatrzonych etykietami informacyjnymi zawierającymi nazwę i numer wyrobu.

Przed nałożeniem testowanego produktu (badanie wstępne) wyznaczono 3 obszary badawcze, tj. 3 plamy bielacze. Testy prowadzono z wypełnieniem następujących warunków:

- naświetlanie NB-UVB – wykonane u 31 pacjentów;
- badany preparat – wykorzystany w przypadku 38 pacjentów;
- badany preparat + naświetlanie NB-UVB – wykonane u 36 pacjentów.

W dniu badania wstępnego oraz po 84 dniach (wizyta IV kończąca 3-miesięczną sesję stosowania badanego preparatu i naświetlania) dokonano oceny klinicznej stanu skóry pacjentów na obszarze badanym ze szczególnym uwzględnieniem: tolerancji stosowania produktu i stopnia repigmentacji wg. skali VASI (Vitiligo Area Scoring Index) zamieszczonej w karcie pacjenta, stopnia suchości i elastyczności skóry w 10-punktowej skali analogowej oraz wykonano dokumentację fotograficzną wyznaczonych obszarów.

### Procedura naświetlania

Naświetlanie wykonywane było lampą NB-UVB 311 nm (prototyp wykonany w firmie InPhoTech) zgodnie ze schematem:

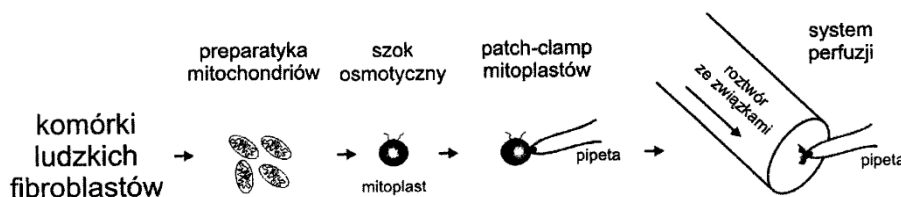
Dawka początkowa	Kontynuacja leczenia	Uwagi
70% MED (minimalna dawka rumienia)	Zwiększana o 100 mJ/cm <sup>2</sup> (lub o 20-30%) co dwa tygodnie	Zalecana częstość naświetlań 3 razy na tydzień (dopuszczalne: 2-4 razy na tydzień)
200 mJ/cm <sup>2</sup> (I-II fototyp) 300 mJ/cm <sup>2</sup> (III-IV fototyp)	(przy pojawieniu się niebolesnego rumienia dawki nie należy zwiększać, bolesny rumień powoduje konieczność przerwania terapii do czasu ustąpienia dolegliwości, ponowne leczenie należy rozpocząć od maks. 50% ostatniej dawki)	w przypadku naświetlań konieczność 3 wizyt w tygodniu, co oznacza do 36 naświetlań w ciągu 3 miesięcy badania.

### Wyniki badań

#### Badanie aktywacji kanałów mitochondrialnych

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany przez Ca<sup>2+</sup> (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>).

W badaniach wykorzystywano technikę patch-clamp. Przedstawione poniżej wyniki zostały otrzymane z wykorzystaniem techniki elektrofizjologicznej, pozwalającej na rejestrację prądów jonowych płynących przez pojedyncze białka kanałowe obecne w wewnętrznej błonie mitochondrialnej – metodę patch-clamp w konfiguracji oderwanej łątki. Mitoplasty (pęcherzyki wewnętrznej błony mitochondrialnej) otrzymywane były z wyizolowanych, aktywnych biologicznie, mitochondriów ludzkich fibroblastów. Mitochondria uzyskiwane były na podstawie opracowanego protokołu wykorzystującego wirowania różnicowe. Na schemacie 1 poniżej przedstawiono uproszczoną procedurę postępowania.



Schemat 1. Uproszczony schemat metodyki stosowanej w badaniach kanałów jonowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej fibroblastów.

W wyniku przeprowadzonych badań określających wpływ naryngeniny (NAR) na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego o dużym przewodnictwie regulowanego przez wapń (kanał mitoBK<sub>Ca</sub>) stwierdzono, że naryngenina jest aktywatorem kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach niskiego stężenia jonów wapnia (Fig. 1).

Aktywność kanału mitoBK<sub>Ca</sub> po stronie napięć dodatnich wzrasta po podaniu 10 μM naryngeniny. Prawdopodobieństwo otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> w warunkach niskiego stężenia jonów wapnia (1 μM Ca<sup>2+</sup>) wzrasta z poziomu około 10% do około 75% (fig. 3).

Dodatkowo, przewodnictwo kanału zmienia się z wartości 280 pS do 255 pS (fig. 2).

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany przez ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>). W wyniku przeprowadzonych badań określających wpływ naryngeniny na aktywność mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez ATP (kanał mitoK<sub>ATP</sub>) stwierdzono, że naryngenina jest aktywatorem kanału mitoK<sub>ATP</sub> (fig. 4).

Aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub> wzrasta po podaniu 30 μM naryngeniny. Prawdopodobieństwo otwarć kanału wzrasta z poziomu około 25% do około 75% (fig. 5).

Pomiary bioenergetycznych parametrów komórki

Poziom SOD2

Zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po naświetlaniu promieniowaniem UVA poziom SOD2 w komórkach traktowanych naryngeniną wzrasta odpowiednio o 99% (± 36%, P < 0,001) i 127% (± 47%, P < 0,01) odpowiednio w odniesieniu do komórek kontrolnych (fig. 6 i fig. 7).

Badania z udziałem ludzi

Ocena kliniczna stanu skóry pacjenta

Klinicznej oceny stanu skóry pacjenta dokonano w dniu rozpoczęcia badania (D0) dla 38 pacjentów i w dniu 84 badania (D84) dla 28 pacjentów. Poniżej przedstawiono wyniki badania:

Kliniczna ocena stanu skóry pacjenta (tylko w obrębie stosowania produktu, bez naświetlania)	D0 (n=38)	D84 (n=28)	Różnica (% zmiany)
Suchość skóry	7,13	5,57	-1,56 (redukcja suchości o 22%)
Elastyczność skóry	6,29	7,18	0,9 (wzrost elastyczności o 14%)

Stopień repigmentacji

Oznaczenia dotyczące stopnia repigmentacji skóry pacjenta od 0 do 100 (%) według skali VASI (Vitiligo Area Scoring Index):

- Całkowita repigmentacja (100%),
- Bardzo duży stopień repigmentacji (76%–99%),
- Duży stopień repigmentacji (51%–75%),
- Średni stopień repigmentacji (26%–50%),
- Minimalny stopień repigmentacji (1%–25%),
- Brak repigmentacji (0%),
- (-) brak oceny w danym obszarze,
- „rumień” – stadium poprzedzające repigmentację.

Oznaczenie pacjenta	NB-UVB	Krem na noc	Krem na noc + NB-UVB
	Dzień 84		
V-21	0%	0%	rumień
V-22	0%	0%	rumień
V-27	0%	rumień	rumień
V-30	-	0%	10%
V-31	0%	0%	rumień
V-32	0%	0%	rumień
V-36	0%	0%	rumień
V-02	0%	0%	30%
V-04	0%	0%	10%
V-05	10%	0%	30%
V-07	15%	0%	60%
V-10	0%	0%	50%
V-12	10%	20%	40%
V-13	10%	5%	10%
V-18	10%	0%	30%
Podsumowanie	5 pacjentów na 18 pacjentów stosujących naświetlanie (28% badanych) Średnia repig. 11%	3 pacjentów na 28 pacjentów stosujących krem (11% badanych) Średnia repig. 12,5%	15 pacjentów na 28 pacjentów stosujących krem w połączeniu z naświetlaniem (53% badanych) Średnia repig. 30%

#### Podsumowanie i wnioski

W badaniach biologicznych wykazano, że naryngenina wpływa na poprawę kondycji skóry osób cierpiących na bielactwo.

Nie wiążąc się z żadną teorią, w przyczynach degradacji melanocytów i rozwoju bielactwa nabytego upatruje się zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów. U pacjentów z bielactwem zaobserwowano zaburzoną równowagę w ilości antyoksydantów (np. katalazy czy dysmutazy ponadtlenukowej) związaną z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu, zaburzenia w potencjale transbłonowym oraz wzrost ilości komórek apoptycznych. Dysfunkcje wskazują na zaburzenia w funkcjonowaniu energetycznego metabolizmu mitochondrialnego, co wywołuje pre-apoptyczny profil komórek.

Protekcyjne działanie naryngeniny wydaje się polegać na obniżeniu poziomu RTF, prawdopodobnie przez wzrost poziomu mitochondrialnego enzymu antyoksydacyjnego – dysmutazy ponadtlenukowej – MnSOD (SOD2). Enzym ten jest jednym z enzymów tzw. „pierwszej linii obrony” i przekształca anionorodnik ponadtlenukowy do nadtlenuku wodoru.

Naryngenina aktywuje także kanały potasowe w mitochondriach  $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$  oraz  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ . Kanały te utrzymują homeostazę jonową w mitochondriach, odpowiedzialne są za zmiany objętości mitochondrialnych, a także biorą udział w regulacji potencjału błonowego oraz gradientu pH między macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki.

Naryngenina hamuje również ekspresję genów zegara  $\text{Bmal1}$  i  $\text{Per1}$ , których aktywacja związana jest z obniżeniem produkcji melaniny.

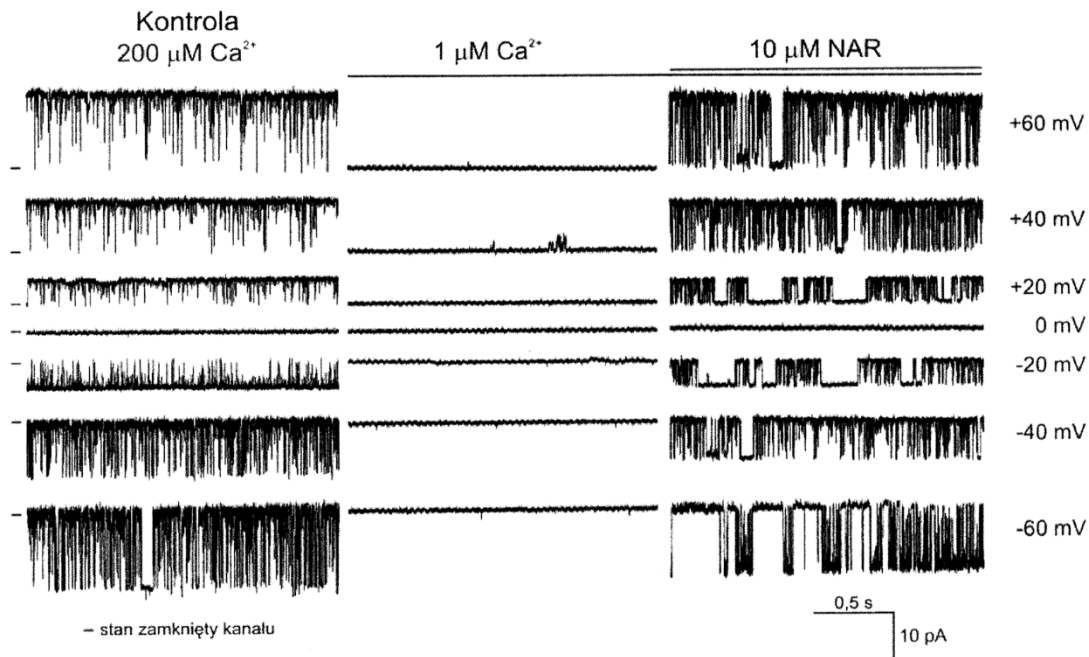
W badaniach z udziałem ludzi, stosujących krem według receptury kremu na noc, również wykazano repigmentację u 50% badanych w ciągu 84 dni, w miejscu stosowania kremu w połączeniu z naświetlaniem NB-UVB. Wykazano, że naryngenina znacząco poprawia wygląd i kondycję skóry osób cierpiących na bielactwo.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie naryngeniny w skutecznej ilości do spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielactwych skóry.

2. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stosuje się naryngeninę w ilości od 0,0001% do 1%, korzystnie od 0,001% do 0,01%, najkorzystniej od 0,01% do 0,1%.
3. Preparat zawierający jako substancję czynną naryngeninę w skutecznej ilości oraz kosmetycznie dopuszczalne zarobki, nośniki i substancje dodatkowe, do stosowania do spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielących skóry.
4. Preparat według zastrz. 3, przy czym preparat zawiera naryngeninę w ilości od 0,0001% do 1% wagowych, korzystnie od 0,001% do 0,01% wagowych, najkorzystniej od 0,01% do 0,1% wagowych w przeliczeniu na całość preparatu.
5. Preparat według zastrz. 3, przy czym stosuje się ten preparat w postaci kremu, balsamu, lotionu, aerozolu, żelu, fluidu, korektora, emulsji O/W i W/O, toniku, żeli myjących, szamponów, pianek, a także mleczek, galaretek, past, maści, plastrów i systemów transdermalnych.
6. Sposób spowalniania, przeciwdziałania i zapobiegania procesowi powstawania plam bielących skóry, **znamienny tym**, że skórę traktuje się skuteczną ilością naryngeniny zdefiniowanej w zastrz. 1 i/lub preparatu zdefiniowanego w zastrz. 3.

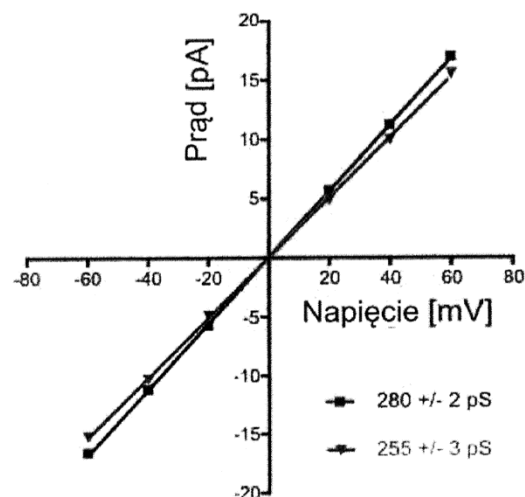
## Rysunki



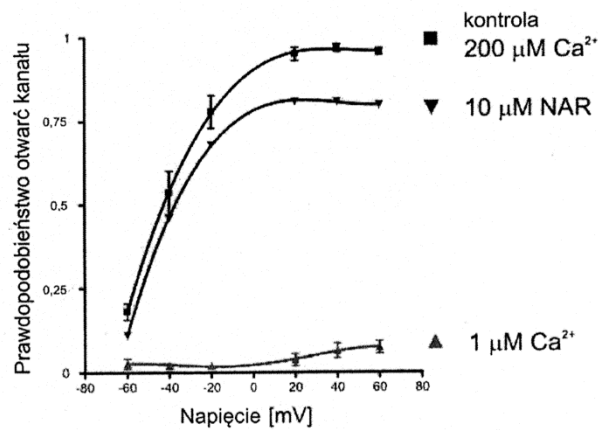
**Fig. 1.** Wpływ naryngeniny na aktywność kanału mitobK<sub>Ca</sub> obecnego w mitochondriach ludzkich fibroblastów. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał mitobK<sub>Ca</sub> przy różnych potencjałach w układzie symetrycznego roztworu (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych (200 μM Ca<sup>2+</sup>), po obniżeniu poziomu wapnia (1 μM Ca<sup>2+</sup>) oraz po dodaniu naryngeniny (10 μM).

„—” oznacza stan zamknięty kanału.

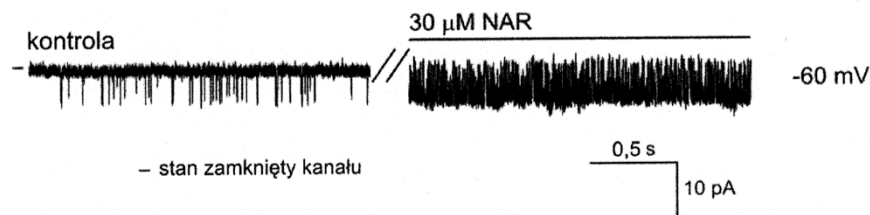
Sygnal filtrowano z częstotliwością 1 kHz.



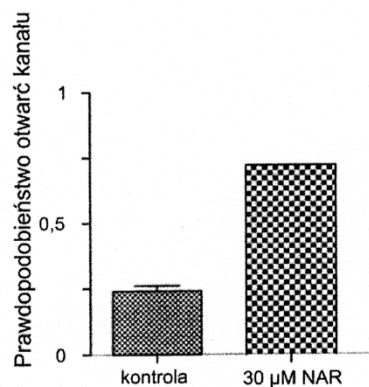
**Fig 2.** Analiza prądowo-napięciowa wykonana na podstawie rejestracji zmian przepływu jonów przez kanał mitobK<sub>Ca</sub> w warunkach kontrolnych (200 μM Ca<sup>2+</sup>) („■”) oraz po podaniu 10 μM naryngeniny („▼”).



**Fig. 3.** Analiza prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoBK<sub>Ca</sub> przy różnych potencjałach w układzie symetrycznego roztworu (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych (200 μM Ca<sup>2+</sup>) („■”), po obniżeniu poziomu wapnia (1 μM Ca<sup>2+</sup>) („▲”) oraz po dodaniu naryngeni (10 μM) („▼”).

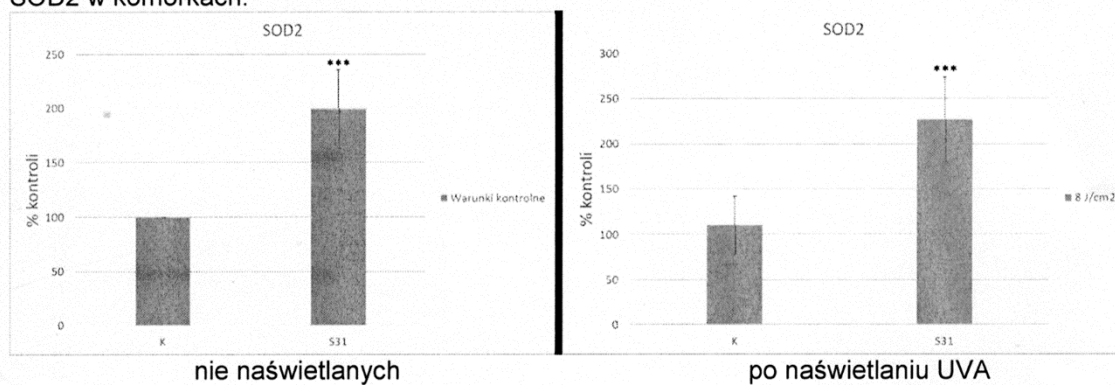


**Fig. 4.** Wpływ naryngeni na aktywność kanału mitoK<sub>ATP</sub>a obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ludzkich fibroblastów. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał przy potencjale -60 mV w symetrycznym układzie stężeń (150 mM KCl) w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 30 μM naryngeni. „-” oznacza stan zamknięty kanału. Sygnał filtrowano z częstotliwością 1 kHz.

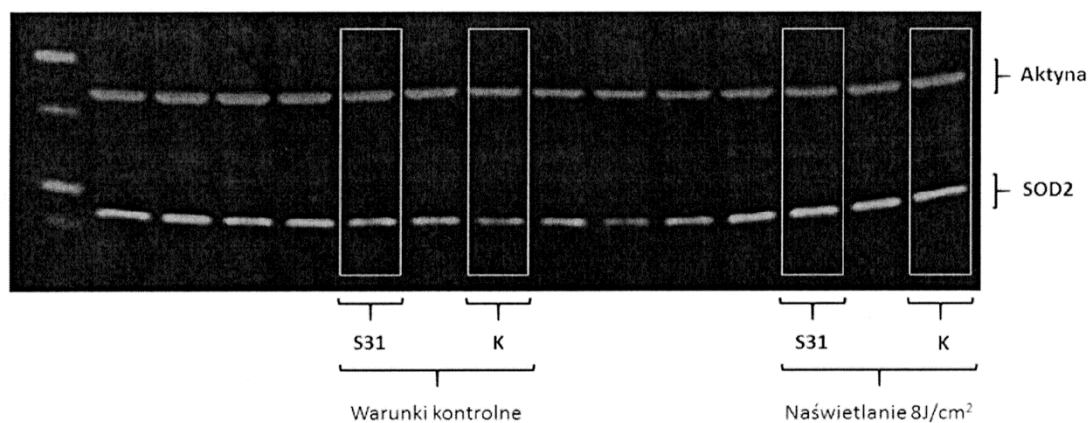


**Fig. 5.** Prawdopodobieństwa otwarć kanału mitoK<sub>ATP</sub>a przy stałym napięciu wynoszącym -60 mV w warunkach kontrolnych oraz po podaniu 30 μM naryngeni.

SOD2 w komórkach:



**Fig. 6.** Wpływ naryngeniny na poziom mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej – SOD2 w komórkach nie naświetlanych i po naświetlaniu UVA. Wykonano 3 niezależne doświadczenia.



**Fig. 7.** Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego SOD2 i aktyny (wewnętrzna kontrola - ilościowe nałożenie prób).

**Fig. 8****Sekwencje starterów:**

Per1:

F: 5'-AGGAAGGAGACAGCCACTGA-3'

R: 5'-TATACCCTGGAGGAGCTGGA-3'

Bmal1

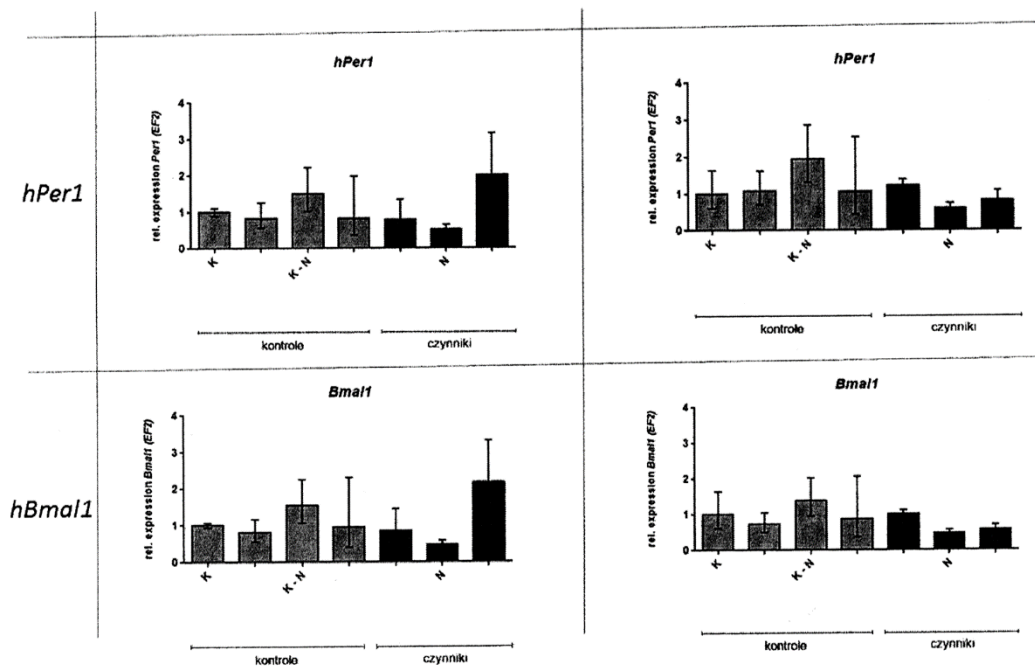
F: 5-CCAGAGGCCCTAACTCCTC-3

R: 5-TGGTCTGCCATTGGATGATCT-3

EF2:

F: 5-GACATCACCAAGGGTGTGCAG-3

R: 5-TTCAGCACACTGGCATAGAGGC-3



Oba geny Per1 i Bmal1 w obu powtórzeniach doświadczenia mają obniżoną ekspresję po naryngenie względem kontroli.

K – komórki w samym medium,

K-N – komórki w rozpuszczalniku służącym do rozpuszczania naryngeny

