

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242781 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433604**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.20**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.10.25 BUP 30/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.04.24 WUP 17/2023**

(51) MKP:

A61K 31/4166 (2006.01)

A61K 36/09 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ,
Lublin, PL

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
Lublin, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

SŁAWOMIR DRESLER, Lublin, PL

ROMAN PADUCH, Lublin, PL

MACIEJ STRZEMSKI, Lublin, PL

HANNA WÓJCIAK, Lublin, PL

IRENEUSZ SOWA, Lublin, PL

MAGDALENA WÓJCIAK, Lublin, PL

BARBARA HAWRYLAK-NOWAK, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

Maria Brodzicka, Lublin, PL

(54) Tytuł:

Wodny ekstrakt alantoiny z porostów z rodzaju *Physcia* i *Phaeophyscia* do zastosowania w leczeniu ran skóry różnej etiologii, zwłaszcza po oparzeniach, zakażeniach bakteryjnych czy grzybiczych

PL 242781 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wodny ekstrakt alantoiny z porostów z rodzaju *Physcia* i *Phaeophyscia*, w szczególności gatunków: *Physcia dubia*, *Physcia adscendens* i *Phaeophyscia orbicularis*, przedstawionych na rysunku w postaci zdjęć odpowiednio jako fig. 1, fig. 2 i fig. 3, do zastosowania w leczeniu ran skóry różnej etiologii, zwłaszcza po oparzeniach, zakażeniach bakteryjnych czy grzybiczych, a także pielęgnacji skóry w łuszczycy, trądziku czy też skóry podrażnionej, wysuszonej oraz skłonnej do stanów zapalnych.

Znane jest z opisu patentowego PL 233572 zastosowanie alantoiny jako substancji czynnej w różnego rodzaju preparatach dermatologicznych i pielęgnacyjnych w postaci maści lub zasypek służących do pielęgnacji zarówno skóry dorosłych jak i dzieci, jednakże w tym przypadku, istnieje poważne ograniczenie w dostępności surowców roślinnych będących źródłem pozyskiwania alantoiny. Alantoina stosowana jest również w kosmetyce, przykładowo do produkcji nawilżających i zmiękczających skórę emulsji płynnych, kremów, żeli pod prysznic, antyperspirantów, a także kosmetyków pielęgnacyjnych dla dzieci. Jak podaje Fedoreyev i wsp. w artykule „Production of alantoin, rabsosin and rosmarinic acid in callus cultures of the seacoastal plant *Mertensia maritima* (Boraginaceae)” (Plant Cell Tiss. Organ. Cult., 2012, 110:183–188) alantoina znalazła zastosowanie w ponad 1300 preparatach kosmetycznych.

Znanym dotychczas, innym źródłem pozyskiwania naturalnej alantoiny stosowanej w dostępnych na rynku preparatach, są rośliny z rodziny Boraginaceae takie jak, żywokost lekarski, farbownik lekarski czy różne gatunki żmijowca, które obok aktywnej substancji alantoiny, wykazują również obecność toksycznych alkaloidów pirolizydynowych, które jak podaje Wang i in. w artykule „Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids leading to phototoxicity and photogenotoxicity in myman HaCaT keratinocytes” (J. Environ. Sci. Health Environ Carcinog. Ecotoxicol. Rev., 2014, 32) obok działania heptotoksycznego mogą wykazywać działanie rakotwórcze skóry.

Celem wynalazku było pozyskanie biologicznie aktywnej substancji – alantoiny z naturalnego, ekologicznego i łatwo dostępnego surowca.

Istotą wynalazku jest wodny ekstrakt alantoiny o wysokiej zawartości alantoiny wraz z mieszaniną polifenoli, otrzymywany z porostów z rodzaju *Physcia* i *Phaeophyscia* do zastosowania w leczeniu ran skóry różnej etiologii, zwłaszcza po oparzeniach, zakażeniach bakteryjnych czy grzybiczych.

Wynalazek rozwiązuje problem techniczny w postaci pozyskania naturalnej, biologicznie aktywnej substancji znajdującej zastosowanie jako składnik różnych preparatów maści, mazideł czy emulsji mających zastosowanie w leczeniu schorzeń skóry różnej etiologii, jej regeneracji i pielęgnacji.

Stosunkowo duża zawartość alantoiny wraz z mieszaniną polifenoli w tak pozyskanym ekstrakcie, w znacznym stopniu powoduje usuwanie tkanki martwiczej skóry, oczyszcza rany, a także pobudza regenerację naskórka i wszelkie procesy naskórkowania.

Zarówno wynalazek jak i jego skutki działania w leczeniu dermatologicznym przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1.

Sposób otrzymywania ekstraktów według wynalazku.

Piechy porostów z poszczególnych gatunków *Physcia dubia*, *Physcia adscendens* i *Phaeophyscia orbicularis*, oczyszczono, oddzielono od kory drzew, wysuszono, zmielono i przesiano przez sito o średnicy oczek 1,6 mm. Poszczególne próbki o wadze 10 g zwilżono alkoholem etylowym, a po odparowaniu alkoholu zalano 50 ml wody destylowanej i homogenizowano w porcelanowym moździerzu. Po procesie kawitacji z użyciem łaźni ultradźwiękowej o mocy ultradźwięków 240 W oraz częstotliwości 35 kHz, przeprowadzano ekstrakcję każdej z próbek w ciągu ok. 30 minut, w temperaturze 50°C. Następnie, części stałe homogenatu oddzielano od roztworu poprzez wirowanie i przesączenie przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm. Metodą elektroforezy kapilarnej określano zawartość alantoiny na poziomie 0,148 g; 0,280 g; oraz 0,160 g w 100 g wodnego ekstraktu odpowiednio w *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia dubia* oraz *Physcia adscendens*, w odniesieniu do wzorca alantoiny o czystości ≥98%. Wyliczoną średnią z trzech pomiarów zawartość alantoiny w wybranych gatunkach porostów z rodzaju *Physcia* i *Phaeophyscia* przedstawiono w poniższej tabeli 1.

Tabela 1.

Gatunek	Zawartość alantoiny (% s.m.)
<i>Phaeophyscia orbicularis</i>	0,74%
<i>Physcia dubia</i>	1,40%
<i>Physcia adscendens</i>	0,80%

Przykład 2.

Wpływ ekstraktów według wynalazku na żywotność komórek skóry.

Wodne ekstrakty otrzymane w przykładzie 1. *Physcia dubia*, *Physcia adscendens* i *Phaeophyscia orbicularis* o różnych, stężeniach alantoiny zawierających się w granicach 25–250 µg/ml wykorzystano do eksperymentów opartych o analizy toksyczności wyrażonych jako stabilność błon komórkowych (metoda Neutral Red uptake) i wpływu na aktywność enzymu dehydrogenazy bursztynianowej związanej z metabolizmem komórkowych (metoda MTT). Badania przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich fibroblastów skóry właściwej. Komórki hodowano w płynie RPMI 1640 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej. Inkubację komórek a następnie badanie prowadzono w temperaturze 37°C w atmosferze zawierającej 5% przepływ CO₂. Zasadniczą analizę przeprowadzono w sterylnych płytkach 96-dółkowych, stosując gęstość komórek wynoszącą 1 × 10⁵ komórek/ml (1 × 10⁴ komórek/dółek). Inkubację komórek z badanymi ekstraktami prowadzono przez 24 godziny.

Wpływ różnych stężeń ekstraktu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej żywych komórek oraz stabilność błon komórkowych ludzkich fibroblastów skóry właściwej, przeanalizowano z użyciem metod spektrofotometrycznych – MTT opartej na ocenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej żywych komórek oraz NR oceniającej stabilność błon komórkowych.

Wyniki w postaci % żywotności komórek zadawanych ekstraktami według wynalazku (oznaczone metodą NR) i % metabolizmu komórkowego (oznaczony metodą MTT), w porównaniu z próbą kontrolną – czyste komórki skóry, przedstawiono w tabelach 2, 3 i 4. Otrzymane wyniki żywotności oparte o metodę MTT wskazują, że badane ekstrakty nie ograniczają metabolizmu mitochondrialnego, a nawet przy zastosowaniu stężeń powyżej 200 µg/ml aktywność dehydrogenazy bursztynianowej wzrastała w porównaniu do kontroli. Przeprowadzona obserwacja wskazuje, że komórki poddane działaniu badanych ekstraktów utrzymują lub zwiększają swój metabolizm, co może sugerować pozytywny wpływ badanych ekstraktów na ewentualne ich wykorzystanie nie tylko jako czynniki użyteczne kosmetycznie lecz również lecznicze. Wynik taki jest odzwierciedleniem pozytywnego wpływu preparatu na zwiększenie żywotności komórek badanych fibroblastów, co pośrednio świadczy o terapeutycznych właściwościach preparatu w zakresie regeneracji uszkodzonej skóry. Wyniki testu NR nie wykazują istotnego wpływu preparatu na stabilność błon komórkowych, co potwierdza fakt braku toksycznych właściwości preparatu. Ponadto, ekstrakt z *Physcia adscendens* pobudza podziały komórkowe, o czym świadczy wzrost uzyskanych wyników, a tym samym ilości komórek do wartości przekraczających 6% w stosunku do kontroli przy zastosowaniu stężenia ekstraktu wynoszącym 225 µg/ml. Wynik ten wskazuje na pozytywny wpływ badanego ekstraktu na potencjalne pobudzenie własności regeneracyjnych skóry, której istotnym składnikiem są fibroblasty tkanki łącznej.

Dodatkowo, wykonano obserwację komórek ludzkich fibroblastów potraktowanych ekstraktem *Physcia dubia* pod mikroskopem z wykorzystaniem metody May-Grünwald-Giemsa. Zdjęcia mikroskopowe, oznaczone na rysunku jako fig. 4 – obraz kontrolny – bez zastosowania preparatu według wynalazku, fig. 5 – komórki ludzkich fibroblastów potraktowane roztworem ekstraktu *Physcia dubia* o stężeniu – 25 µg/ml, fig. 6 – komórki ludzkich fibroblastów potraktowane roztworem ekstraktu *Physcia dubia* o stężeniu – 125 µg/ml, a fig. 7 – komórki ludzkich fibroblastów potraktowane roztworem ekstraktu *Physcia dubia* o stężeniu 225 µg/ml, uwidaczniają jądra komórkowe jako najciemniejsze obszary, zaś jaśniejsze wokół nich to cytoplazma.

Wizualizacja efektu działania preparatu na zdrowe komórki ludzkich fibroblastów nie wykazała istotnych różnic w morfologii tych komórek w stosunku do kontroli.

Zastrzeżenie patentowe

1. Wodny ekstrakt alantoiny z porostów z rodzaju *Physcia* i *Phaeophyscia* do zastosowania w leczeniu ran skóry różnej etiologii, zwłaszcza po oparzeniach, zakażeniach bakteryjnych czy grzybiczych.

Rysunki

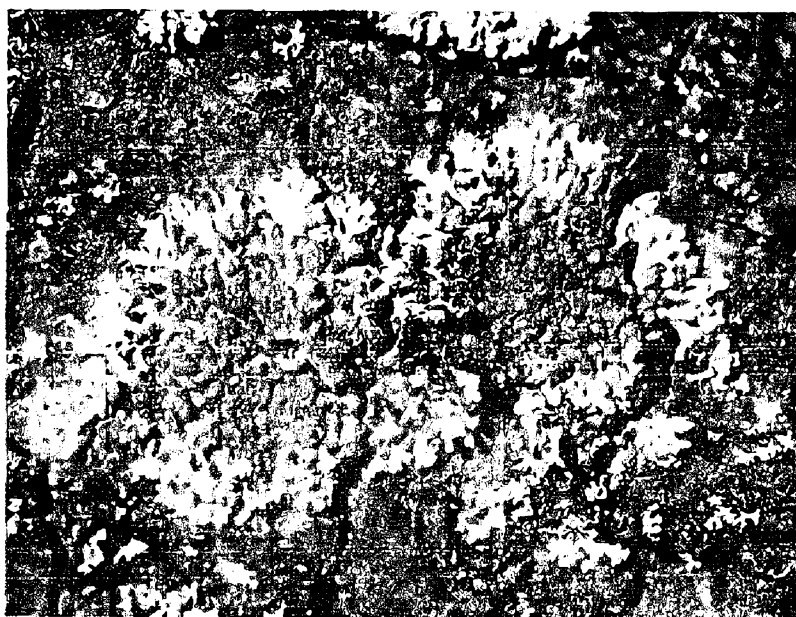


fig.1

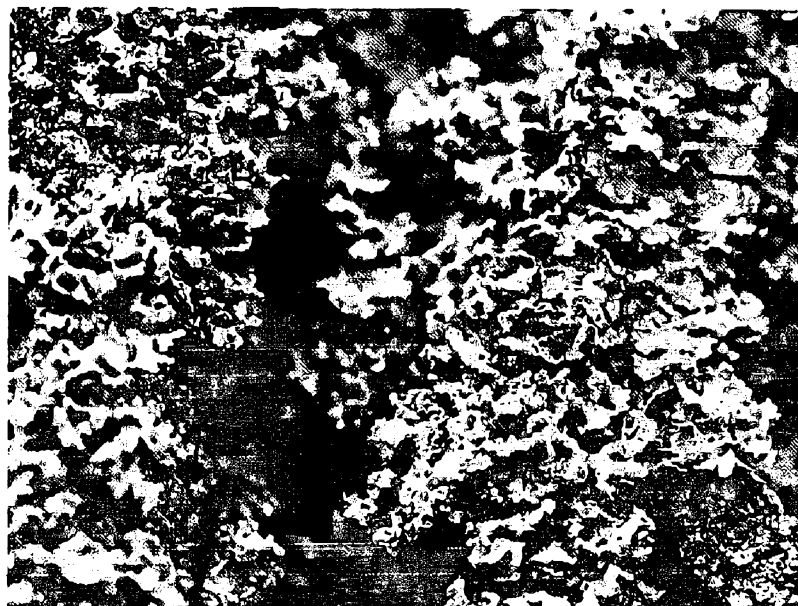


fig. 2



fig. 3

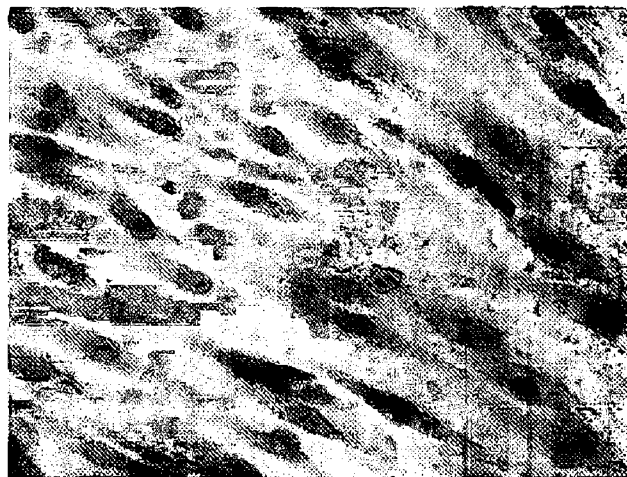


fig. 4

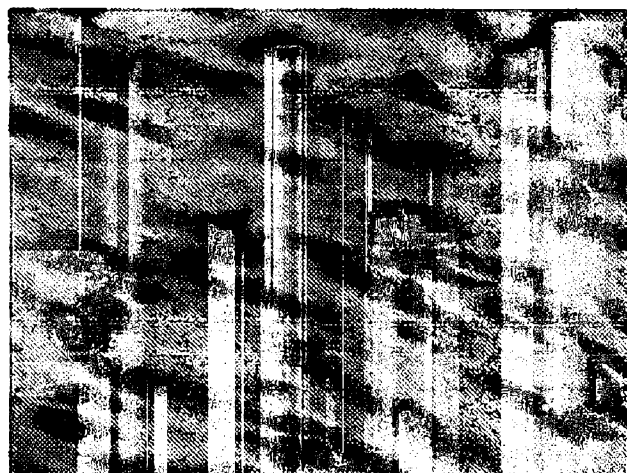


fig. 5

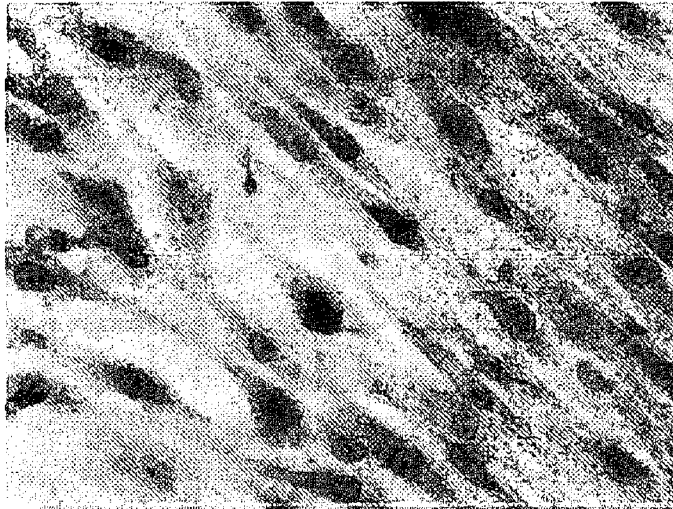


fig. 6

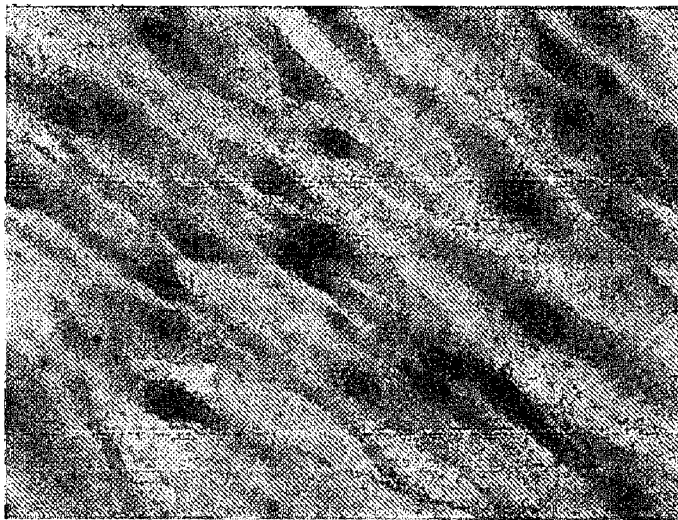


fig. 7

Tabela 2.

Stężenie ekstraktu <i>Phycia dubia</i> (μg/ml)	% żywotności metabolizm komórkowy (metoda MTT)	% żywotności stabilność błon komórkowych (metoda NR)
25	101,83±0,72%	95,33±3,50%
50	100,37±0,73%	97,67±1,50%
75	100,73±1,82%	90,0±2,96%
100	102,20±2,51%	99,33±2,24%
125	104,03±2,11%	97,33±2,29%
150	101,10±1,75%	96,0±2,33%
175	101,10±0,72%	94,0±3,55%
200	104,40±,46%	98,67±2,13%
225	108,42±2,03%	101,0±2,96%
250	105,13±3,14%	102±2,0%
Kontrola 0	100±0,97%	100±3,29%

Tabela 3.

Stężenie ekstraktu <i>Physcia adscendens</i> (μg/ml)	% żywotności metabolizm komórkowy (metoda MTT)	% żywotności stabilność błon komórkowych (metoda NR)
25	102,93±2,53%	101,09±1,79%
50	100,37±1,09%	98,90±0,36%
75	104,03±3,82%	99,27±3,27%
100	105,13±3,85%	97,80±2,54%
125	107,32±4,15%	98,17±2,82%
150	103,30±2,85%	98,90±2,55%
175	103,66±1,11%	99,63±0,36%
200	106,23±2,51%	104,02±2,11%
225	112,82±2,06%	106,59±2,51%
250	110,99±5,57%	104,40±4,56%
Kontrola 0	100±1,83%	100±2,56%

Tabela 4.

Stężenie ekstraktu <i>Phaeophyscia orbicularis</i> (μg/ml)	% żywotności metabolizm komórkowy (metoda MTT)	% żywotności stabilność błon komórkowych (metoda NR)
25	100,1±2,0%	96,67±3,55%
50	98,67±2,22%	98,33±1,46%
75	97,33±2,24%	99,33±2,92%
100	97,33±2,96%	97,67±2,26%
125	101,0±3,81%	99,33±2,34%
150	96,67±1,53%	97,33±2,29%
175	99,33±2,13%	96,67±3,62%
200	104,33±2,24%	102,0±1,50%
225	102,33±2,17%	98,0±3,0%
250	106,33±2,34%	99,67±1,57%
Kontrola 0	100±2,0%	100±3,33%