

Винахід стосується композиції, що містить пробіотики (живі та життєздатні або інактивовані бактеріальні штами) та гіалуронову кислоту або її сіль, для застосування в попередженні, в лікуванні (терапевтичному або косметичному лікуванні) або в полегшенні щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з або викликаного старінням шкіри, або зниженням імунного захисту шкіри, або запаленням/інфекцією шкіри, наприклад, запаленням, спричиненим або викликаним УФ-променями.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Шкіра є зовнішньою оболонкою людського тіла та є першою лінією захисту організму від зовнішньої агресії, враховуючи, що вона діє як анатомічний бар'єр проти потенційних патогенів і можливих шкідливих агентів. Зміни шкіри можуть сприяти виникненню шкірних захворювань, зокрема, викликаних патогенами. Наприклад, у міру старіння шкіра стає тоншою та крихкою, що пов'язано з тим, що регенерація клітин сповільнюється та відбувається від нормального 3-4 тижнів до 4 або навіть 6 тижнів. Шкіра з плином часу зазнає структурних змін, викликаних декількома чинниками різного походження, які зумовлюють втрату зволоження шкіри, появу мікрозморшок, втрату еластичності, гіперкератоз та утворення гіперпігментованих плям.

Крім того, багатий мікробіом, який колонізує шкіру людини, виконуючи важливі та корисні функції у боротьбі з адгезією та розвитком шкірних патогенів, таких як, наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium asnes*, може зіткнутися з дисбалансом або дисбактеріозом через різні чинники.

Коли в шкірі виникає дисбактеріоз, пробіотики можуть діяти як модулятори, відновлюючи баланс на рівні мікробіоти шкіри. За останнє десятиліття використання нових технологій полегшило таксономічний аналіз мікробіоти шкіри, бактеріальна популяція якої може налічувати близько 1010 видів мікроорганізмів, що належать до понад 25 phyla (живих організмів), серед яких найбільш представленими є Actinобактерії, Firmicutes, та Proteобактерії. Різні шкірні захворювання були пов'язані зі змінами мікробіома шкіри, наприклад, *P. asnes* вважається патогенною бактерією, пов'язаною зі шкірними акне. Таким чином, підтримання гомеостазу мікробіоти шкіри або відновлення зазначеного гомеостазу після дисбактеріозу мікробіоти є основним щодо запобігання або лікування шкірних захворювань, зокрема шкірних інфекцій або запалень, особливо інфекцій або запалень, викликаних патогенними агентами, такими як бактерії або віруси, а також внаслідок опромінення шкіри УФ-променями або внаслідок впливу на шкіру несприятливих умов.

Класично до цих проблем підходять із застосуванням антибактеріальних засобів, тобто з використанням дезінфікуючих засобів та місцевих антибіотиків. З одного боку, хоча антибіотики безсумнівно ефективні, окрім знищення корисних бактерій, антибіотики створюють ризик сенсibiлізації та потенційних побічних явищ, особливо при тривалому застосуванні антибіотиків широкого спектру дії.

Крім того, традиційним підходом для запобігання проблемам пошкодження або старіння шкіри через опромінення шкіри УФ-променями є використання кремів або продуктів для шкіри, які відбивають або поглинають УФ-промені, які зазвичай називають сонячними фільтрами. Активні речовини в так званих "хімічних" сонячних фільтрах (саліцилати, циннамат, оксibenзон, октилкрилен та інші) завдяки своїй структурі здатні поглинати ультрафіолетове світло. З іншого боку, діоксид титану та оксид цинку є інертними мінеральними речовинами з сильною покривною здатністю, які фізично відбивають сонячне світло і тому входять до числа так званих фізичних екранів.

Однак зазначені сонячні фільтри дозволяють лише запобігти взаємодії УФ-променів зі шкірою, водночас вони не стимулюють підтримання гомеостазу мікробіоти шкіри та не відновлюють зазначений гомеостаз у разі дисбактеріозу, чи інфекцій, чи запалень, викликаних зазначеними УФ-променями, які можуть бути не повністю захищені сонячними фільтрами.

Після інтенсивних досліджень та розробок Заявник розглянув та вирішив вищезазначені технічні проблеми, надаючи інноваційні композиції (коротко кажучи, композиції за винаходом), що містять суміш (коротко кажучи, суміш за винаходом), що містить або, альтернативно, складається із живого та життєздатного або інактивованого штаму бактерій, що належить до виду *Lactobacillus paracasei*, ідентифікованого як *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, та гіалуронової кислоти або її солі (скорочено, НА).

СУТЬ ВИНАХОДУ

Перший аспект представленого винаходу стосується застосування композиції, що містить пробіотики та гіалуронову кислоту або її сіль, для запобігання, послаблення або лікування природного старіння шкіри або старіння шкіри, викликаного впливом зовнішніх чинників, таких як, наприклад, УФ-промені.

Другий аспект представленого винаходу стосується застосування композиції, що містить пробіотики та гіалуронову кислоту або її сіль для запобігання, послаблення або лікування щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з або викликаного зниженням імунного захисту шкіри.

Третій аспект представленого винаходу стосується застосування композиції, що містить пробіотики та гіалуронову кислоту або її сіль для запобігання, послаблення або лікування

щонайменше однієї ознаки або симптому пов'язаного з або викликаного запаленням/інфекцією шкіри.

Пробіотики, особливо прийнятні для цілей винаходу, являють собою бактерії, які належать до роду *Lactobacillus*, переважно до виду *Lactobacillus paracasei*, такого як штам *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

Заявник фактично виявив, що композиція, яка містить пробіотики, переважно бактерії, які належать до роду *Lactobacillus*, та гіалуронову кислоту, є здатною посилювати імунний захист за рахунок сприяння вивільнення антимікробних пептидів та хемокинів шкіри, посилюючи нормальний процес диференціювання та заміни клітин епідермісу, та зміцнення структури дерми.

Крім того, Заявник виявив, що застосування композиції, яка містить гіалуронову кислоту та пробіотики, переважно бактерії, які належать до роду *Lactobacillus*, є здатними чинити протизапальну дію та запобігати активації запалення, спричиненого або викликаного УФ-променями.

Зокрема, композиція та суміші за представленим винаходом є здатними:

- індукувати механізми захисту та/або загоєння шкіри, зокрема імуномодуючі механізми;
- запобігати та/або лікувати запальних або інфекційних станів шкіри, зокрема, спричиненими УФ-випромінюванням, як УФ-А, так і УФ-В;
- боротися з розмноженням патогенних для шкіри бактерій;
- підтримувати або відновлювати стан гомеостазу шкіри та/або баланс мікробіоти шкіри;
- сприяти, полегшувати, активувати та/або прискорювати процеси загоєння ран, та/або процеси реепітелізації, та/або процеси рубцювання;
- боротися та/або уповільнювати старіння шкіри.

Крім того, композиції за винаходом є здатними викликати та/або сприяти зазначеним позитивним ефектам як у короткостроковій, так і в довгостроковій перспективі.

Крім того, суміші та композиції за винаходом не мають значних несприятливих ефектів, та вони можуть вводитись всім суб'єктам, зокрема, дітям, вагітним або жінкам, які годують груддю.

Нарешті, суміші та/або композиції за винаходом є простими в отриманні та рентабельними.

Ці та інші цілі, які будуть зрозумілі з детального опису, який наводиться далі, досягаються сумішами та композиціями (які містять зазначені суміші) за представленим винаходом завдяки технічним характеристикам, заявленим в формулі винаходу, яка надається.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Винахід буде детально описано та показано нижче з посиланням на фігури, які додаються, на яких показано:

Фіг. 1 - 20х та 40х кратне збільшення зображення зрізів гістологічних тканин, оброблених відповідно сольовим розчином (А) та композицією, що містить штам LPC-S01 (В), позначений трихромною фарбою Массона;

Фіг. 2 - 20х та 40х кратне збільшення зображення зрізів гістологічних тканин, позначений трихромною фарбою Массона, оброблених відповідно композицією, яка містить гіалуронову кислоту (А), та композицією, яка містить штам LPC-S01 + гіалуронову кислоту (В);

Фіг. 3 - кількісне визначення ядерних транслокацій NFκB в тканинах, які піддалися впливу УФ-випромінювання та оброблених композицією, що містить штам LPC-S01 (P1), композицією, що містить штам LPC-S01 + гіалуронову кислоту (P2), та композицією, що містить гіалуронову кислоту (P3);

Фіг. 4 - 20х кратне збільшення зображення зрізів гістологічних тканин, оброблених відповідно сольовим розчином (А), композицією, що містить штам LPC-S01 (В), композицією, що містить гіалуронову кислоту (С), та композицією, що містить штам LPC-S01 та гіалуронову кислоту (D), через 4 години після УФ-опромінення, позначених забарвленням гематоксилін-еозином;

Фіг. 5 - 20х кратне збільшення зображення зрізів гістологічних тканин, оброблених відповідно сольовим розчином (А), композицією, що містить штам LPC-S01 (В), композицією, що містить гіалуронову кислоту (С) та композицією, що містить штам LPC-S01 та гіалуронову кислоту (D), через 24 години після УФ-опромінення, позначених забарвленням гематоксилін-еозином.

Фіг. 6a, Фіг. 6b, Фіг. 6c, Фіг. 6d - зображення, отримані під мікроскопом гістоморфологічного аналізу з допомогою фарбування H&E в моделі гомеостазу через 24 години (6a: NC через 24 години, 6b: P3-і через 24 години) та через 48 годин (6c: NC через 48 годин, 6d: P3-і через 48 годин).

Фіг. 7 - результати експресії генів (кПЛР-ПЧ (кількісна ПЛР з детектуванням в реальному часі)) через 24 години (RQ, розрахований з допомогою NC через 24 години=1; RQ<0,5 дерегулювання, RQ>2 позитивне регулювання) в моделі гомеостазу для продуктів P1-і, P2-і, P3-і.

Фіг. 8 - протокол попереднього лікування УФ-опромінення "подряпаної" тканини композиціями за винаходом, що містять інактивованій штам.

Фіг. 9 - протокол наступного лікування УФ-опромінення "подряпаної" тканини композиціями за винаходом, що містять інактивованій штам.

Фіг. 10 та Фіг. 11 - зниження життєздатності патогена *C. acnes* DMS1897, який експресується в Log10 КУО на шкірних включеннях *in vitro* в експериментальних умовах: модель виключення та конкурентна модель, відповідно.

ВИЗНАЧЕННЯ

В контексті винаходу, термін "шкіра" використовується для позначення першої лінії захисту щодо зовнішнього середовища; зокрема, захист здійснюється через дію кератиноцитів, розкиданих у зовнішньому шарі шкіри (епідермісі), де вони можуть викликати секрецію цитокінів і хемокинів, щоб передати попереджувальне повідомлення до більш глибоких шарів шкіри, викликаючи запальну реакцію.

В контексті винаходу, термін "старіння шкіри" використовується для позначення незворотного еволюційного процесу; це виражається в комплексі фізіологічних змін, які зумовлюють втрату зволоження шкіри, появу мікрозморшок, втрату еластичності, гіперкератоз і утворення гіперпигментованих плям, які називаються "старечі веснянки".

В контексті винаходу, термін "пробіотик" використовується для позначення відповідно до визначення, наданого FAO та WHO: "Live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host". Інакше кажучи, пробіотики являють собою мікроорганізми (бактеріальні штами), які виявляються здатними, якщо їх приймати у відповідних кількостях, виконувати корисні функції для організму.

В контексті представленого винаходу, вираз "гіалуринова кислота" використовується для позначення глікозаміноглікану, що складається з повторюваних одиниць глюкозаміну та глюкуронової кислоти, пов'язаних разом, альтернативно, глікозидними зв'язками $\beta 1 \rightarrow 4$ та $\beta 1 \rightarrow 3$, а також внутрішньомолекулярними водневими зв'язками, які стабілізують їх конформації.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Об'єктом представленого винаходу є композиція (скорочено, композиція за винаходом або композиція), що містить (I) суміш М, що містить, або альтернативно, що складається з бактеріального штаму, який належить до виду *Lactobacillus paracasei*, ідентифікованого та депонованого як *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (живого та життєздатного або інактивованого або його похідної) та гіалуринової кислоти або її солі; та (II) щонайменше одну прийнятну фармацевтичну, або косметичному, або харчову добавку та/або ексципієнт.

Об'єктом представленого винаходу є зазначені композиції або суміші М за винаходом, що містить або, альтернативно, що складається з бактеріального штаму, який належить до виду *Lactobacillus paracasei*, ідентифікованого та депонованого як штам *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, та гіалуринової кислоти або її солі (відповідно до будь-якого з описаних варіантів здійснення), для застосування як лікарського засобу.

Перший аспект представленого винаходу стосується композиції (композиції за винаходом), що містить пробіотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, життєздатний, або інактивованій, або його похідну), переважно пробіотичні бактерії, та гіалуринову кислоту або її сіль для застосування в лікуванні (терапевтичному або косметичному), в попередженні або полегшенні щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з або викликаного старінням шкіри (внутрішнім старінням або зовнішнім старінням, як визначається нижче).

Зазначена ознака або симптом старіння шкіри є пов'язаним із серією модифікацій, які зазвичай призводять до витончення та/або зміни структури шкіри.

Переважно зазначене старіння є внутрішнім або хронологічним старінням, яке фактично залежить від генетичних (або внутрішніх) чинників. Внутрішнє старіння, в принципі, зазвичай починається після 25 річного віку. Переважно зазначена ознака або симптом, пов'язаний з або викликаний внутрішнім старінням шкіри, вибирають зі: зморшок, в'ялості шкіри, втрати або зниження цілісності шкіри, втрати еластичності шкіри, втрати тонушу шкіри, стоншення шкіри, лущення шкіри та зневоднення шкіри, утворення темних плям або гіперпигментації шкіри, які також називають "вікові плями".

Таким чином, об'єктом представленого винаходу є косметичне застосування композицій або сумішей М за винаходом, що містить або, альтернативно, що складається з бактеріального штаму, який належить до виду *Lactobacillus paracasei*, ідентифікованого та депонованого як штам *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, та гіалуринової кислоти або її солі та, необов'язково, перша речовина та/або друга речовина (відповідно до будь-якого з описаних варіантів здійснення), для підтримування гомеостазу шкіри, та/або як засіб проти старіння шкіри, наприклад для косметичного лікування зморшок, втрати еластичності шкіри (сонячний еластоз), сухої або зневодненої шкіри, грубої шкіри, фотостаріння, почервоніння шкіри, наявності розширених капілярів на щоках, носі та/або вухах, сонячних плям, аномальної або нерівномірної пігментації або гіперпигментації шкіри, або щоб зробити шкіру яскравішою та більш природною.

Альтернативно, зазначене старіння шкіри є зовнішнім, тобто викликаним зовнішніми чинниками навколишнього середовища (зовнішнім чинників). Зовнішнє старіння, наприклад, є викликаним агресією зовнішніх агентів та/або чинниками навколишнього середовища, такими як УФ-випромінювання (відповідальне за фотостаріння), куріння сигарет, зловживання алкоголем, забруднення, постійний контакт з подразниками, холод, вітер та їх комбінації. Фотостаріння представляє особливу зацікавленість, оскільки воно пов'язане з численними захворюваннями або пошкодженнями шкіри, які також можуть призвести до серйозних захворювань, таких як пухлини шкіри.

Переважно зазначена ознака або симптом, пов'язаний з або викликаний зовнішнім старінням

шкіри, вибирають з: еритреми, сонячної пігментації або сонячних плям, кератозу, переважно гіперкератозу, почервоніння шкіри, сонячних опіків, опіків, фотостаріння, сонячного еластозу, кортикальної катаракти, птеригію, реактивації холодкових виразок, пошкодження шкіри будь-якої природи (виразка, рана або синець), переважно пошкодження губ та/або кон'юнктиви, меланоми шкіри, плоскоклітинної карциноми шкіри, базальноклітинної карциноми (базаліоми), плоскоклітинної карциноми рогівки або кон'юнктиви.

Старіння шкіри є пов'язаним зі зміною структури шкіри, що неминуче призводить до підвищення сприйнятливості до запальних захворювань та/або інфекцій.

В одному варіанті здійснення, композиція або суміш М за винаходом, що містить пробіотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, живий та життєздатний, або інактивований, або його похідну) та гіалуронову кислоту або її сіль, використовується для лікування (терапевтичного способу лікування), запобігання або послаблення щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з або викликаного зниженням імунної системи шкіри або запальними захворюваннями та/або інфекціями шкіри. Іншими словами, композиція використовується для підвищення імунного захисту шкіри.

Зазначену щонайменше одну ознаку або симптом, пов'язаний з або викликаний зниженням імунного захисту шкіри або запальними станами шкіри, вибирають з: дерматозу, переважно пов'язаного подразненням або екскоріацією, акне, гострого або хронічного дерматозу (наприклад, розацеа або купероза), шкірної інфекції, запалення шкіри, еритреми, виразки, псоріазу, atopічного дерматозу, отиту, висипання, нориці та геморою.

Ураження або захворювання шкіри можуть бути пов'язані з патогенними мікроорганізмами або викликані ними. В даному випадку патогени можуть являти собою бактерії, гриби, дріжджі, віруси та їх комбінації.

В одному варіанті здійснення, композиція або суміш М за винаходом, що містить пробіотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, життєздатний, або інактивований, або його похідну) та гіалуронову кислоту або її сіль, використовується для лікування (терапевтичного способу лікування), запобігання або послаблення щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з або викликаного запаленням/інфекцією шкіри, наприклад, пов'язаною з або викликану патогенним агентом.

Переважно зазначені патогени являють собою бактерії, переважно бактерії роду *Propionibacterium*, переважно видів *acnes* (*Propionibacterium acnes* або *Cutibacterium acnes*, скорочено *C. acnes*); *Staphylococcus*, переважно видів *epidermidis*, *aureus*, *warneri*, *pyogenes*, *mitis*; *Corynebacterium ssp*; *Pseudomonas*, переважно видів *aeruginosa*; *Acinetobacter*, переважно видів *johnsonii*; *Streptococcus*, переважно видів *pyogenes*; *Micrococcus ssp.*, *Brevibacterium ssp.*

Експериментальні дані, отримані Заявником, вказують на те, що композиція або суміш М за винаходом, що містить гіалуронову кислоту та пробіотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, живий та життєздатний, або інактивований, або його похідну) є здатними чинити протизапальну та/або імуномодулюючу дію на рівні кератиноцитів та, отже, шкіри.

Не бажаючи бути пов'язаними будь-якою теорією, застосування композиції є обумовленим протизапальною здатністю, імуномодуляцією, оновленням клітин епідермісу, диференціюванням епідермісу та покращенням структури шкіри, що забезпечується пробіотиками та гіалуроновою кислотою, що входять до складу композиції.

Зокрема, Заявник показав, що, коли шкіра піддається впливу композиції, що містить гіалуронову кислоту та пробіотики, вона є здатною посилювати процес диференціювання епідермісу, зокрема, роговий шар шкіри стає товщим. Крім того, спостерігалось, що колагенові волокна були щільнішими та більш компактними.

Крім того, композиція за винаходом, що містить пробіотики (*L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, життєздатний, або інактивований, або його похідну) та гіалуронову кислоту або її сіль, є здатною чинити імуномодулюючу (або імуностимулюючу) дію імунної системи шкіри, як видно з оцінки експресії кодуючих генів для хемокинів та дефензинів. Зокрема, збільшення експресії дефензину $\beta 2$ спостерігалось як при застосуванні пробіотиків так і при застосуванні композиції за винаходом, що містить гіалуронову кислоту та пробіотики.

В одному варіанті здійснення представленого винаходу, пробіотики (присутні в композиції за винаходом разом з гіалуроновою кислотою або її сіллю) переважно є вибраними з: бактерій, грибів, дріжджів та їх комбінацій; переважно бактерій, більш переважно бактеріального штаму, який належить до виду *Lactobacillus paracasei* та ідентифікованого як *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 (живий, інактивований або його похідну).

Відповідно до переважного аспекту винаходу, бактерії належать до щонайменше одного роду, вибраного з: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* та *Enterococcus*.

Більш переважно бактерії належать до роду *Lactobacillus*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Lactobacillus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus*

brevis, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* та їх комбінацій.

Більш переважно, лактобактерії є виду *Lactobacillus paracasei*, переважно штаму *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 та/або штаму *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760.

Обидва штами були виділені та депоновані SOFAR S.p.A.; зокрема, бактеріальний штам *L. casei* DG® (торговельна марка, зареєстрована компанією Sofar, Italy) був депонований SOFAR S.p.A. 5 травня 1995 р. в Національній колекції культур мікроорганізмів Інституту Пастера (National Collection of Cultures of Microorganisms of the Pasteur Institute) в Парижі під номером депонування CNCM I-1572. Спочатку штам мав назву *Lactobacillus casei* DG sub. *casei* (перекласифікований як *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572).

Бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 був депонований в Німецькій колекції мікроорганізмів і клітинних культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) під номером доступу DSM 26760 від 15/05/2017 SOFAR S.p.A. (дата подання заявки на перетворення депонування відповідно до Будапештського договору; дата вихідного депонування 11/01/2013).

Штами *Lactobacillus paracasei* були перекласифіковані як *Lactocaseibacillus paracasei*.

В переважному варіанті здійснення винаходу, композиція містить *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 та гіалуронову кислоту або її сіль.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Bifidobacterium* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* е *B. tsurumiense*; більш переважно вибраного з: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* е *Bacillus marinus*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Propionibacterium* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* та *P. thoenii*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Streptococcus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus перорального*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* та *Streptococcus zooepidemicus*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Lactococcus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* та *L. taiwanensis*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Aerococcus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaeequi* та *A. urinaehominis*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, бактерії роду *Enterococcus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* та *Enterococcus solitarius*.

Відповідно до наступного переважного аспекту винаходу, дріжджі належать до роду *Saccharomyces*, більш переважно видів *Saccharomyces cerevisiae* та/або *Saccharomyces boulardii*.

В суміші або композиції за представленим винаходом, пробіотики, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572 та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, використовуються (разом з гіалуроновою кислотою або її сіллю) живими, тобто, вони використовуються як пробіотики.

Альтернативно, зазначені пробіотики, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572,

та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, є мертвими, та/або інактивованими та/або тиндалізованими.

Наприклад, життєздатні бактеріальні штами (пробіотики) за представленим винаходом (наприклад, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) можуть бути інактивованими нагріванням, або тиндалізацією, або гама-опроміненням, або ультразвуком. Зазначена інактивація нагріванням або тиндалізацією можуть бути здійснені при температурі, що знаходиться в діапазоні від 50 °C до 120 °C, переважно від 65 °C до 105 °C, більш переважно від 75 °C до 95 °C, наприклад, приблизно 85 °C, протягом часу, який знаходиться в діапазоні від 30 хвилин до 120 хвилин, переважно від 45 хвилин до 85 хвилин, наприклад приблизно 60 хвилин; або, альтернативно з використанням тиндалізації. Процес нагрівання, або тиндалізації, або гама-опромінення, або ультразвуку здійснюється відповідно до методик, процедур та апаратів, відомих фахівцям в даній галузі.

Бактерії, піддані зазначеному процесу інактивації шляхом нагрівання або тиндалізації, є мертвими (контроль з використанням планшетного підрахунку та/або цитофлуориметрії), тоді як клітинна стінка залишається неушкодженою, переважно у % бактерій, що знаходиться в діапазоні від 70 % до 99.5 %, переважно від 80 % до 95 %, по відношенню до загальної кількості бактерій, що піддавались зазначеним методикам інактивації - нагріванню або тиндалізації.

В наступному варіанті здійснення, пробіотики, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572 та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, використовуються (разом з гіалуроновою кислотою або її сіллю) у вигляді лізату та/або екстракту, тобто, вони використовуються як парапробіотик.

Альтернативно, зазначені пробіотики, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572 та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, використовуються (разом з гіалуроновою кислотою або її сіллю) у вигляді бактеріальних продуктів, вибраних з: супернатанту, метаболітів, метаболічних біопродуктів, постбіотиків, клітинної стінки та їх компонентів, екзополісахариду, рибосом та глікопротеїнів, глюканів та інших полісахаридів, ліпополісахаридів та будь-якого компонента супернатанту.

Коротко, в контексті представленого винаходу, вираз "похідна/і" бактеріального штаму, або життєздатного бактеріального штаму, або пробіотиків (наприклад, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760) зазначених вище парапробіотиків (лізатів або екстрактів) або будь-яка похідна та/або компонент бактеріального штаму (супернатант, метаболіти, метаболічні біопродукти, постбіотики, клітинна стінка та їх компоненти, екзополісахарид, рибосоми та глікопротеїни, глюкани та інші полісахариди, ліпополісахариди або будь-який компонент супернатанту), які, коли вводяться (пероральним або місцевим способом) у відповідних кількостях, надають користь споживачеві людини або тварини.

В контексті представленого винаходу, термін "пробіотики", якщо не зазначається інше, вказує та включає бактеріальні штами (наприклад, *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760), живі та інактивовані, та похідні зазначених бактеріальних штамів, як визначається вище.

Загалом, зазначені пробіотики являють собою мікроорганізми або комбінації мікроорганізмів, або консорціуми, будь-яких видів мікробів, зазначених в переліку EFSA QPS.

Переважно, композиція, як описується вище, містить комбінацію штамів, зазначених вище, з іншими мікроорганізмами, як описується вище, переважно вибраними з: бактерій, грибів, дріжджів та їх комбінацій.

Пробіотики, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572 та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, є присутніми в композиції (разом з гіалуроновою кислотою або її сіллю) у мінімальній кількості, достатній для можливості тимчасово колонізувати шкіру, кишечник та/або інші ділянки організму. Переважно зазначена кількість варіює в межах концентрації, яка знаходиться в діапазоні від 1×10^6 КУО до 1×10^{12} КУО, переважно від 10^8 до 10^{12} одиниць мікроорганізмів, більш переважно від 10^9 до 10^{11} одиниць мікроорганізмів, наприклад приблизно або вище 1×10^9 КУО (колонієутворюючих одиниць), по відношенню до добового споживання (або разової дози) композиції за винаходом.

Пробіотики за представленим винаходом, переважно бактеріальний штам *L. casei* DG® CNCM I-1572 та/або бактеріальний штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, переважно вводиться в кількості, яка варіює від 10^8 до 10^{12} одиниць мікроорганізмів, більш переважно від 10^9 до 10^{11} одиниць мікроорганізмів, для кожного прийому.

Відповідно до переважного аспекту, прийом пробіотиків, переважно бактерій, здійснюється щонайменше 1-2 рази на день.

Як описується вище, композиція або суміш М за винаходом, містить гіалуронову кислоту або її сіль та їх комбінації. Зазначена гіалуронова кислота або її сіль (скорочено, HA), яка міститься в композиції за винаходом разом зі штамом *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 та, необов'язково, щонайменше одну додаткову першу або другу речовину (відповідно до будь-якого з описаних варіантів здійснення), переважно має середню молекулярну масу, яка знаходиться в діапазоні від приблизно 10 кДа (кілоДальтон=1000,00 Дальтон або 10^3 Дальтон) до 3000 кДа, переважно від приблизно 800 кДа до 2500 кДа, більш переважно від приблизно 1000 кДа до 2000 кДа, наприклад, приблизно 1300 кДа, 1400

кДа, 1500 кДа, 1600 кДа, 1700 кДа, 1800 кДа. В одному варіанті здійснення, сіль гіалуронової кислоти (наприклад, гіалуронат лужного або лужноземельного металу) вибирають з: натрію гіалуронату, калію гіалуронату, амонію гіалуронату, кальцію гіалуронату, магнію гіалуронату, цинку гіалуронату, кобальту гіалуронату та їх комбінацій.

Крім того, в контексті представленого винаходу, термін "гіалуронова кислота або її сіль" або "НА" або просто "гіалуронова кислота" використовується для позначення гіалуронової кислоти як такої та гідролізованої гіалуронової кислоти (наприклад, отриманої шляхом ферментації), а також солі гіалуронової кислоти (гіалуронату), як описується вище.

Коли зазначена гіалуронова кислота за винаходом являє собою біотехнологічну гідролізовану гіалуронову кислоту, отриману шляхом ферментації, вона може мати середню молекулярну масу приблизно 10 кДа. Коли зазначена гіалуронова кислота за винаходом являє собою натрію гіалуронат (наприклад, CAS N° 9067-32-7, Mw -Молекулярна маса 1000-1400 кДа або Mw 1000-1700 кДа) або калію гіалуронат, вона може мати середню молекулярну масу, яка знаходиться в діапазоні від приблизно 1000 кДа до 2000 кДа.

Крім *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 та НА, композиція за винаходом переважно додатково містить фармацевтично прийнятні ексципієнти та/або додаткові речовини (наприклад, перша речовина або друга речовина, як описується нижче) та/або носії.

Крім *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 та НА та, необов'язково, другої речовини (визначеної нижче), композиція за представленим винаходом переважно додатково містить першу речовину, вибрану з: плазми, PRP, заживляючих речовин, реепітелізуючих речовин, зволожувачів, гідратуючих агентів, пом'якшувальних агентів, адсорбуючих агентів, анальгетиків, флеботоніків, протизапальних агентів, м'язових релаксантів, антибіотиків, антибактеріальних агентів, антимікотиків, протівірусних засобів, пестицидів, пептидних та/або протеїнових речовин, та/або протеїнів, таких як колаген, речовин, які належить до сполучної тканини, таких як глікозаміноглікани, переважно хондроїтину сульфат, та/або її комбінацій.

В одному варіанті здійснення представленого винаходу, композиція є сформульованою (наприклад, у твердій, м'якій або рідкій формі) для місцевого або шкірного місцевого застосування, переважно у вигляді крему, гелю, олії, емульсії (або піни), розчинів, дисперсій (тверда речовина-рідина або рідина-рідина), суспензій, двофазних сумішей, спреїв (розпилюваних рідин), марлі, пластирів, бинтів, лосьйонів, мусів, масок (масок, які застосовуються до шкіри), мазей або паст.

В одному варіанті здійснення представленого винаходу, композиція є сформульованою для перорального введення, переважно у вигляді таблетки, капсули, батончика, гранульованого порошку, оболонки, буккальної розчинної гранули, саше або пігулки, суспензій (наприклад, прийнятих для пиття фіал) або розчинів (однофазних або двофазних).

Альтернативно, композицію отримують миттєво шляхом змішування композиції з водою.

Альтернативно, композиція отримують миттєво шляхом змішування разом двох компонентів, пробіотиків (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760) та гіалуронової кислоти або її солі, наприклад, для отримання масок, які наносяться шкіру, або суспензій для перорального застосування (прийнятні для пиття фіали). Зокрема, пристрій для миттєвого отримання композиції за винаходом може складатися з фіали, що містить водний розчин гіалуронової кислоти або її солі, та частини на одному кінці пляшки (наприклад, для герметизації фіали, такої як ковпачок), що містить бактеріальний штаб (*L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, життєздатний або інактивований або його похідну) у твердій формі порошку, гранул або таблеток; миттєве отримання композиції за винаходом відбувається шляхом вивільнення (наприклад, під тиском) бактеріального штабу в твердій формі з частини на кінці фіали до розчину гіалуронової кислоти або її солі, що міститься у фіалі.

Відповідно до переважного варіанта здійснення, окрім *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760 та НА та, необов'язково, зазначеної першої речовини, композиція за винаходом містить інші речовини (другу речовину), вибрані з: амінокислот, добавок, вітамінів, мікроелементів, таких як цинк та селен, макро- та мікроречовин, ферментів та/або пребіотичних речовин, таких як фруктоолігосахариди (FOS), галактоолігосахариди (GOS), ксилоолігосахариди (XOS), інулін, гуарова камедь або їх комбінацій.

Композиція за винаходом, що містить *L. paracasei* LPC-01 DSM 26760, НА та, необов'язково, першу або другу речовину, додатково містить зазначену (II) щонайменше одну фармацевтичну, або харчову, або косметичному добавку та/або ексципієнт, тобто речовину, позбавлену терапевтичної активності, прийнятну для фармацевтичного або харчового застосування. В контексті представленого винаходу, добавки та/або ексципієнти, прийнятні для фармацевтичного або харчового або косметичного застосування, включають усі допоміжні речовини, відомі фахівцям в даній галузі, для отримання композицій у твердій, м'якій або рідкій формі, такі як, наприклад, розріджувачі, розчинники (включаючи воду, гліцерин, етиловий спирт), солюбілізатори, підкислювачі, загусники, підсолоджувачі, підсилювачі смаку, барвники, змащуючі речовини, поверхнево-активні речовини, консерванти, буфери для стабілізації pH та їх суміші.

Композиції за винаходом, що містять штаб *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронову кислоту або її сіль та, необов'язково, першу та/або другу речовину, можуть являти собою

фармацевтичні композиції (або живі біотерапевтичні продукти), композиції медичних пристроїв, дієтичні добавки, харчові продукти, нові харчові продукти, пробіотичні продукти, композиції для харчових продуктів спеціального медичного призначення (FSMP), або косметичні композиції.

Варіанти здійснення (FRn) представленого винаходу викладені нижче:

FR1. Композиція, що містить пробіотики та гіалуронову кислоту або її сіль для застосування в лікуванні, в попередженні або в полегшенні щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з/викликаного старінням шкіри або в лікуванні, в попередженні або в полегшенні щонайменше однієї ознаки або симптому, пов'язаного з/викликаного зниженням імунної системи шкіри.

FR2. Композиція для застосування відповідно до FR1, де старіння шкіри вибирають з внутрішнього старіння шкіри та зовнішнього старіння шкіри.

FR3. Композиція відповідно до FR2, в якій зазначена щонайменше одну ознаку або симптом, пов'язаний з/викликаний внутрішнім старінням шкіри, вибирають зі: зморшок, в'ялості шкіри, втрати або зниження цілісності шкіри, втрати еластичності шкіри, втрати тонушу шкіри, стоншення шкіри, лущення шкіри та зневоднення шкіри.

FR4. Композиція для застосування відповідно до FR2, в якій щонайменше одну ознаку або симптом, пов'язаний з/викликаний зовнішнім старінням шкіри, вибирають з: еритреми, пігментації, кератозу, переважно гіперкератозу, почервоніння шкіри, опіків, кортикальної катаракти, птеригію, реактивації холодних виразок, пошкодження шкіри будь-якої природи, переважно пошкодження губ та/або кон'юнктиви, меланоми шкіри, плоскоклітинної карциноми шкіри, базальноклітинної карциноми (базаліоми), плоскоклітинної карциноми рогівки або кон'юнктиви.

FR5. Композиція для застосування відповідно до FR1, в якій щонайменше одну ознаку або симптом, пов'язаний з/викликаний зниженням імунної системи шкіри вибирають з: дерматозу, переважно пов'язаного з подразненням або екскоріацією, акне, інфекції, запалення шкіри, еритреми, виразки, псоріазу, atopічного дерматозу, отиту, висипання, нориці та геморою.

FR6. Композиція для застосування відповідно до будь-якого одного з FR1-5, в якій зазначені пробіотики переважно є вибраними з: бактерій, грибів, дріжджів та їх комбінацій, переважно вони являють собою бактерії, який належить до щонайменше одного роду, вибраного з: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* та *Enterococcus*.

FR7. Композиція для застосування відповідно до FR6, в якій бактерії роду *Lactobacillus* належать до щонайменше одного з видів, вибраних з: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amyolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* та їх комбінацій.

FR8. Композиція для застосування відповідно до FR6 або FR7, в якій бактерії є виду *Lactobacillus paracasei*, переважно штаму *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 та/або штаму *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FR9. Композиція для застосування відповідно до будь-якого одного з попередніх FR, в якій сіль гіалуронової кислоти вибирають з: натрію гіалуронату, калію гіалуронату, амонію гіалуронату, кальцію гіалуронату, магнію гіалуронату, цинку гіалуронату, кобальту гіалуронату та їх комбінацій.

FR10. Композиція для застосування відповідно до будь-якого одного з попередніх FR, в якій зазначені пробіотики є живими, та/або мертвими, та/або інактивованими, та/або тиндалізованими, та/або у вигляді лізату та/або екстракту, та/або у вигляді бактеріальних продуктів, вибраних з: супернатанту, метаболітів, метаболічних біопродуктів, постбіотиків, клітинної стінки та її компонентів, екзополісахариду, рибосом та глікопротеїнів, глюканів та інших полісахаридів, ліпополісахаридів та будь-якого компонента супернатанту.

FR11. Композиція для застосування відповідно до будь-якого одного з попередніх FR, в якій зазначені пробіотики є присутніми в кількості, яка варіює від 10^8 до 10^{12} одиниць мікроорганізму, переважно від 10^9 до 10^{11} одиниць мікроорганізму.

FR12. Композиція для застосування відповідно до будь-якого з попередніх FR у вигляді крему, гелю, олії, емульсії, спреїв, марлі, пластирів, бинтів, лосьйонів, мусів, масок, мазей, паст або рідких препаратів для миттєвого отримання.

Термін "лікування" або "терапевтичне лікування" або "спосіб лікування" в контексті представленого винаходу використовується для позначення втручання у суб'єкта, який цього потребує, що включає введення терапевтично ефективної кількості композиції або суміші М за винаходом, з метою усунення, зниження/зменшення, або запобігання патології, або захворюванню та його симптомів, або розладів.

Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості активної сполуки та/або бактеріального штаму, що викликає біологічну або медичну реакцію в тканині, системі, ссавців або

людини, яку шукає і визначає індивід, дослідник, ветеринар, лікар, інший клініцист або медичний працівник.

В контексті представленого винаходу, вираз "суб'єкти" використовується для позначення суб'єктів-людей або суб'єктів-тварин (наприклад, домашніх тварин, таких як собаки або коти або інші ссавці). Переважно, композиції за винаходом є для застосування в способах медичного лікування або для косметичного застосування у суб'єктів-людей.

В контексті представленого винаходу, термін "медичний пристрій" використовується у значенні відповідно до Legislative Decree n° 46 dated 24 February 1997, або відповідно до нового Регламенту про медичні пристрої (Medical device regulation) (EU) 2017/745 (MDR).

В контексті представленого винаходу, термін "новий харчовий продукт" використовується у значенні відповідно до Регламенту ЄС 258 від 1997 року.

Якщо не зазначається інше, вираз композиція, або суміш, або інше, що містить компонент, в кількості, що "входить в діапазон від x до y" використовується для позначення того, що зазначений компонент може бути присутнім в композиції, або суміші, або екстракті, або іншому в будь-якій кількості, присутній в зазначеному діапазоні, навіть якщо не вказано, екстремальні межі діапазону є включеними.

ПРИКЛАД

Приклад-А

Крем відповідно до винаходу, що містить штам *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронову кислоту або її сіль:

для отримання зазначеного крему, штам LPC-S01 DSM 26760 (життєздатний або інактивований) - висушений при заморожуванні у вигляді порошку або порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) - розчиняли в 13 мл крему на основі гіалуронової кислоти (скорочено, НА-крему).

Приклад композиції НА-крему (% маса/маса):

- вода (розчинник) за необхідності до 100 %;
- функціональні речовини: октокрилен (фільтр УФ-В) 2-8 % (4,5 %), капсульований BMDBM стабілізований октокриленом (фільтр УФ-В) 0,1-5 % (2 %), органічне масло ши (*butyrospermum parkii* = ши) (CAS N° 194043-92-0) 0,1-4 % (1 %), комплекс колагену та пантенол 0,1-4 % (1 %), бутилметоксибензоїлметан (фільтр УФ-А) 0,1-4 % (1 %), вітамін Е 0,01-1 % (0,3 %), стебла гарденії жасміноїдної 0,01-1 % (0,1 %), низькомолекулярна гіалуронова кислота (наприклад, CAS N° 9004-61-9) 0,005-1 % (0,05 %), середня/висока гіалуронова кислота (наприклад, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1 % (0,02 %);

- ексципієнти та добавки (2-10 % мас./мас., відповідно до технічних вимог, відомих фахівцям в даній галузі): антиоксиданти (наприклад, токоферилацетат), консерванти (наприклад, феноксіетанол, калію сорбат), поверхнево-активні речовини - емульгатори (наприклад, цетеарилглюкозид, цетиловий спирт), стабілізатор емульсії (наприклад, карбомер), розчинники (наприклад, 1,2-гександіол), абразиви (наприклад, кремнезем), зв'язуючу речовину (наприклад, PVP), зволожувач (наприклад, гліцерин), та/або засоби для кондиціонування шкіри (наприклад, диметикон, ксантанова камедь, трополон).

Приклад-В

Маска відповідно до винаходу, що містить штам *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронову кислоту або її сіль:

для отримання зазначеної маски, штам LPC-S01 DSM 26760 (життєздатний або інактивований, переважно життєздатний) - висушений при заморожуванні у вигляді порошку або порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) - розчиняли у водному розчині гіалуронової кислоти або її солі, наприклад, розчині, який має компоненти, наведені в таблиці А, в якому низькомолекулярна гіалуронова кислота (наприклад, CAS N° 9004-61-9) 0,01-2 % (0,1 %) та середньо-/високомолекулярна гіалуронова кислота (наприклад, CAS N° 9067-32-7) 0,005-1 % (0,05 %) є присутніми у % як маса/маса (від загальної маси зазначеного водного розчину гіалуронової кислоти).

Таблиця А

Інгредієнт	CAS N°
вода	7732-18-5
пропандіол	504-63-2
натрію гіалуронат	9067-32-7
феноксіетанол	122-99-6
1,2-гександіол	6920-22-5
каприлілгліколь	1117-86-8
гідролізована гіалуронова кислота	9004-61-9
натрію гідроксид	1310-73-2

добавки/ексципієнти	-
---------------------	---

- Штам *L. paracasei* LPC-S01 DMS 26760, інактивований нагріванням:

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА – (1)

МОДЕЛЬ Episkin T-Skin™ (3D модель шкіри)

Episkin T-Skin™ (коротко, T-Skin або "Шкіра повної товщини" або 3D Шкіра) являє собою 3D модель шкіри, реконструйовану *in vitro*, включаючи дерму та епідерміс (модель шкіри повної товщини).

Episkin T-Skin™ являє собою *in vitro* реконструйовану шкіру, що складається зі шкіри, еквівалентної з фібробластами людини, накладеної на добре диференційований багат шаровий епідерміс, отриманий із нормальних людських кератиноцитів, культивованих на інертному полікарбонатному фільтрі.

In vitro реконструйовані моделі шкіри людини є близькими - з точки зору морфології (багат шаровий епітелій), біохімічних та фізіологічних властивостей - до *in vivo* тканин людини, та зараз вони є найбільш перспективною альтернативою тваринам, експлантам *ex vivo* та зануреним моношарам клітин щодо оцінки ефективності та безпеки місцевого застосування продуктів (Gordon et al. 2015, Zuang V. 2016).

Біологічна релевантність і прогнозованість даних моделей впливають із наявності тканини, організованої різними шарами живих клітин, що дозволяє оцінювати продукти, що застосовуються місцево, у реалістичних клінічних дозах та умовах впливу. Лікування шкіри людини продуктами місцевого застосування, такими як косметика, призводить до геномної відповіді, яка має динамічний шлях і представляє перший клітинний сигнал на рівні транскрипції, відповідальний за каскад подій. 3D тканини людини є відповідними тест-системами для вивчення механізму дії та оцінки ефективності продукту з урахуванням як прямої геномної відповіді, так і результатів клітинної та перехресної комунікації через розчинні медіатори та експресію специфічних біомаркерів.

I. ГОМЕОСТАТИЧНА МОДЕЛЬ (незапальна) на моделі Episkin T-Skin™

В *in vitro* представленому дослідженні гомеостатичної моделі на моделі Episkin T-Skin™, ефективність з точки зору переваг для гомеостазу шкіри композицій відповідно до винаходу, що містять гіалуронову кислоту (HA) та життєздатний або інактивований бактеріальний штам LPC-S01 DSM 26760, оцінювали щодо вивчення його потенціального застосування та ефективності щодо догляду за шкірою.

Метою дослідження є вивчення профілю переносимості шкірою композицій відповідно до винаходу після впливу високих концентрацій та оцінки їх ефективності при:

- посиленні самозахисту шкіри шляхом індукування антимікробних пептидів,
- стимуляції вродженої імунної відповіді кератиноцитів, епідермального оновлення та диференціювання,
- індукування позитивного оновлення епідермального та дермального відділів, діючи як засіб проти старіння.

I.1. ЖИТТЄЗДАТНИЙ бактеріальний штам – ГОМЕОСТАТИЧНА МОДЕЛЬ

I.1.1. Продукти, які аналізуються, та Контроль.

- Негативний Контроль (NC): 0,9 % сольовий розчин NaCl.
- P1: життєздатний штам LPC-S01 DSM 26760 ресуспендований в сольовому розчині;
- P2: водний розчин на основі гіалуронової кислоти (як в Прикладі-В (маска), зазначеному вище);
- P3: життєздатний штам LPC-S01 DSM 26760, ресуспендований у водному розчині на основі гіалуронової кислоти;

Для отримання P3, вміст порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) висушеного при заморожуванні життєздатного штаму LPC-S01 DSM 26760 розчиняли в 13 мл водного розчину на основі гіалуронової кислоти.

Для отримання P1 (тільки штам), вміст порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) висушеного при заморожуванні життєздатного штаму LPC-S01 DSM 26760 був ресуспендований в 13 мл сольового розчину.

I.1.2. Оцінка методології підвищення самозахисту та здатності до оновлення клітин

Підвищення здатності клітин до самозахисту та оновлення пробіотичного штаму LPC-S01 (*Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, життєздатний; P1), пробіотичного штаму LPC-S01 (життєздатний) + гіалуронова кислота (P3) та гіалуронової кислоти (P2) оцінювали на реконструйованій *in vitro* повній 3D моделі шкіри, яка відтворює відділи дерми та епідермісу, та, отже, дозволяє вивчати модифікації позаклітинного матриксу дерми та диференціювання життєздатних шарів шкіри (модель "Шкіра повної товщини").

Дослідження було зосереджено на оцінці впливу штаму LPC-S01 DSM 26760, гіалуронової кислоти та композиції, що містить штам LPC-S01 + гіалуронову кислоту, на активацію імунної відповіді, диференціювання клітин епідермісу та оновлення клітин дерми. Штам LPC-S01 DSM 26760, гіалуронову кислоту та композицію, що містить штам LPC-S01 пробіотик + гіалуронову кислоту,

наносили (30 мкл) безпосередньо на поверхню 3D моделі шкіри, інкубували протягом 8 годин та потім промивали, використовуючи сольовий розчин для видалення надлишку продукту. Тканини культивували протягом додаткових 16 годин перед аналізом, щоб імітувати реалістичний вплив маски для обличчя за 24 години.

Сольовий розчин використовувався як негативний контроль (NC).

Наступні параметри аналізували по відношенню до негативного контролю (відповідно до способів, відомих фахівцям в даній галузі):

- Гістологічний аналіз з використанням трихромного фарбування за Массоном;
- Експресія генів (кПЛР-РЧ) основних біомаркерів захисту шкіри (HBD2 та CCL27), вродженої імунної реакції (TLR2), епідермального диференціювання (KRT14, LOR та IVL), епідермального оновлення (HAS-2, CD44, колаген III, IV та XIII, KGF та EGF);
- Пошкодження клітин через кількісне вивільнення аденілаткінази (скорочено, АК) (аналіз Toxilight). Експерименти здійснювали у трьох біологічних повторях.

I.1.2.1. Гістоморфологічний аналіз з використанням трихромного фарбування за Массоном

Після закінчення обробки тканини промивали сольовим розчином та фіксували в 10 % формаліні. Зрізи тканини маркували, використовуючи набір Masson Trichrome (Abcam 150686) відповідно до інструкцій виробника. Для кожного зразка, 3 мікроскопічні дослідження проводили на 3 різних частинах зрізу. Гістологічні зразки аналізували під оптичним мікроскопом (20x та 40x кратне збільшення) та оцінювали морфологічні модифікації тканини.

I.1.2.2. ПЛР-аналіз в реальному часі

Після закінчення обробки, тканини збирали в лізисний буфер для екстракції РНК та зворотної транскрипції кДНК. Цілісність РНК оцінювали шляхом завантаження РНК, екстрагованої в 1 % агарозному гелі: були виявлені 18S та 28S рибосомні смуги. GAPDH використовувався як ендogenous контрольний ген для нормалізації введених кількостей. Аналіз отриманих даних проводили, використовуючи способи, відомі фахівцям в даній галузі.

I.1.3. Результати активації здатності клітин до самозахисту та оновлення

I.1.3.1. Результати гістоморфологічного аналізу з використанням трихромного фарбування за Массоном.

Після інкубування з сольовим розчином, негативний контроль (Фіг. 1A) не показав ніяких морфологічних та/або структурних змін як в епідермісі, так і в дермі. Розподілення колагенових волокон орієнтувалось та складалось з фібробластів.

Обробка штамом LPC-S01 DSM 26760 (життєздатним) не викликала суттєвих змін у структурі епідермісу та дерми. Колагенові волокна та їх розподілення показали зменшену товщину та знижену щільність волокон по відношенню до негативного контролю (Фіг. 1B).

Обробка гіалуроновою кислотою не викликала суттєвих змін у структурі епідермісу та дерми. Колагенові волокна показали знижену щільність в порівнянні з негативним контролем (Фіг. 2A).

Обробка пробіотичним штамом LPC-S01 DSM 26760 (життєздатні) + гіалуроновою кислотою була здатна змінити морфологію епідермісу, зокрема, рогового шару, який був тоншим, посилюючи процес диференціювання (Фіг. 2B).

I.1.3.2. Результати ПЛР у реальному часі (кПЛР-РЧ).

Таблиця 1 показує відносне кількісне визначення (RQ), по відношенню до негативного контролю, значень, отриманих з використанням ПЛР у реальному часі, тканин, оброблених LPC-S01 DSM 26760 (життєздатним), гіалуроновою кислотою та LPC-S01 DSM 26760 (життєздатним)+ гіалуроновою кислотою.

Таблиця 1

Відділ	Функція	Біомаркер	LPC-S01	Гіалуронова кислота	Гіалуронова кислота + LPC-S01
Епідерміс	Захист шкіри	Дефензин β 2 людини	5,80	0,59	2,18
		CCL27	1,12	0,87	0,96
	Вроджена імунна реакція	TLR2	1,94	0,93	1,38
	Диференціювання епідермісу	Цитокератин 14	1,11	0,96	1,23
		Лорикрин	0,59	1,35	1,68
		Інволукрин	1,50	0,98	1,30
	Структура епідермісу	Колаген XIII	0,91	1,06	0,92
		KGF	0,61	1,08	0,37

		EGF	0,95	1,09	1,61
Дерму	Клітинне оновлення, анти-старіння, клітинний матрикс	HAS-2	0,53	1,08	0,53
		CD44	1,09	1,00	1,10
		Колаген III	0,45	0,75	0,33
		Колаген IV	1,00	1,01	0,12

Обробка пробіотиком LPC-S01 DSM 26760 викликає збільшення людського дефензину $\beta 2$ (HBD2) та TLR2. Ці дані узгоджуються з імуномодуючими властивостями пробіотика, та вказують на його здатність запускати захист шкіри та посилювати вроджену імунну реакцію шкіри.

Обробка гіалуроновою кислотою не може викликати модуляцію експресії генів, що підлягають оцінці.

Обробка гіалуроновою кислотою + LPC-S01 DSM 26760 викликає збільшення експресії HBD2 в порівнянні з обробкою гіалуроновою кислотою. Спостерігалось зниження значень колагену III та HAS-2 (як це вже спостерігалось при обробці тільки пробіотиком), в той час як також спостерігалось зниження KGF.

Взагалі, отримані результати свідчать про те, що при самостійному застосуванні пробіотик LPC-S01 DSM 26760 надає позитивний вплив на шкіру, зміцнюючи її вроджений імунітет (на основі TLR2 та HBD-2).

Гіалуронова кислота, яка застосовується самостійно, не робить позитивного впливу на шкіру; навпаки, LPC-S01, введений в тому самому препараті з гіалуроновою кислотою, є здатним підтримувати свою основну активність у посиленні вродженого захисту шкіри.

I.1.3.4 Результат вивільнення аденілаткінази (аналіз Toxilight).

Рівні аденілаткінази, що вивільняються тканинами, обробленими продуктами, які досліджувалися, вказують на гарну біосумісність продуктів після 8 та 16 годин інкубування.

I.1.4. Висновки

Отримані результати показують, що обробка гіалуроновою кислотою + LPC-S01 DSM 26760 (живий та життєздатний) була найбільш перспективною, показавши позитивну ефективність щодо покращення процесу диференціювання, оновлення шкіри та в цілому зміцнення структури дермального відділу за рахунок збільшення колагенової мережі. Таким чином, комбіноване застосування гіалуронової кислоти та пробіотика LPC-S01 DSM 26760 (P3) показало синергетичний ефект у зміцненні структури дерми, впливаючи на ключові чинники диференціювання та оновлення клітин. Даний синергетичний ефект був непередбачуваним, оскільки введення гіалуронової кислоти та пробіотика LPC-S01 DSM 26760 окремо не показало значного впливу на диференціювання шкіри.

I.2. ІНАКТИВОВАНИЙ бактеріальний штам - ГОМЕОСТАТИЧНА МОДЕЛЬ

I.2.1. Продукти, які аналізуються, та Контроль.

- негативний Контроль (NC): 0,9 % сольовий розчин NaCl;
- P1-i.: інактивованій штам LPC-S01 DMS 26760, ресуспендований в сольовому розчині (10^9 клітин/тканини), застосована концентрація 2 г LPC-S01/мл;
- P2-i.: крем на основі гіалуронової кислоти (як в Прикладі-A (крему), зазначений вище);
- P3-i.: інактивованій штам LPC-S01 DSM 26760, ресуспендований в кремі на основі гіалуронової кислоти (подібний до P2-i.) (10^9 клітин/тканини), застосована концентрація 2 г клітин/мл.

Для отримання P3-i., вміст порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) висушеного при заморожуванні інактивованого штаму LPC-S01 DSM 26760 розчиняли в кремі на основі гіалуронової кислоти.

Для отримання P1-i. (тільки штам), вміст порошкової капсули (приблизно 8×10^9 КУО) висушеного при заморожуванні інактивованого штаму LPC-S01 DSM 26760 був ресуспендований в сольовому розчині.

I.2.2. Інактивація бактеріального штаму, який аналізується.

Вихідний матеріал: життєздатні бактеріальні клітини штаму LPC-S01 DSM 26760 у висушеній при заморожуванні формі з кількістю життєздатних клітин 2×10^{11} клітин/г порошку.

За день до обробки 2 г порошку зважували та ресуспендували в 4 мл сольового розчину, щоб отримати суспензію 10^{11} бактеріальних клітин/мл сольового розчину. 30 мкл даної суспензії використовували для перевірки ефективного бактеріального навантаження з використанням підрахунку на агарі MRS.

На день обробки суспензію бактеріальних штамів, отриману в сольовому розчині, інактивували нагріванням шляхом інкубування бактеріальної суспензії при 85°C протягом 1 години. Після завершення даного періоду, бактерії розділяли на 4 пробірки Еппендорфа (по 1 мл кожна, що відповідає 10^{11} бактеріальним клітинам) та центрифугували. Пелету потім ресуспендували в:

- 1 мл сольового розчину, отримуючи P1-i.
- 1 мл крему на основі гіалуронової кислоти, отримуючи P3-i.

I.2.3. Методологія.

Продукти, які аналізуються, та негативний контроль (P1-i., P2-i., P3-i., NC: 15 мкл) наносили безпосередньо на поверхню тканин моделі T-Skin протягом 24 години та 48 години в умовах гомеостазу. Застосовуючи 15 мкл суспензії P1-i та P3-i., наносили 10^9 бактерії/тканини.

Наступні параметри аналізували по відношенню до необробленого контролю (негативний контроль, NC):

- Гістоморфологічний аналіз з фарбуванням H&E (Hematoxylin & Eosin);

- Експресія генів (з використанням кПЛР-РЧ) основних біомаркерів захисту шкіри (Людський дефензин $\beta 2$ (DEFB4)), вродженої імунної реакції (TLR2, TNF α), диференціювання та епідермального оновлення (TGMS-1, CCND1, TGF- $\beta 1$).

Експерименти здійснювали у трьох біологічних повторях.

I.2.4. Результати.

I.2.4.1. Результати гістоморфологічного аналізу H&E через 24 години та 48 годин

Три зрізи вертикальної тканини (що складаються з 3 повторів) отримують на кожному гістологічному склі; 5 мікроскопічних досліджень проводили на вибраному зрізі. Для кожного біологічного повтору повідомляється найбільший репрезентативний вибір вибраного вертикального зрізу. Середня товщина була розрахована на 5 мікроскопічних дослідженнях.

Результати повідомляються нижче:

NC через 24 години (Фіг. 6a):

- Епідерміс: повністю життєздатний та з пластинчастою структурою SC (рогового шару), що відповідає нормі;

- Зона дермального-епідермального сполучення: спостерігається цілісність структури;

- Розподілення волокон та колагену: орієнтоване та що містить багато фібробластів.

P1-i. через 24 години (не показано на фігурі):

- Епідерміс: відмінності спостерігаються в одному й тому самому повторі, ймовірно, пов'язані з неоднорідним розподіленням; багато клітин є видимими, демонструючи метаболічну активацію та проліферацію; незначна кількість пікнотичних ядер; пластинчаста структура SC, як виявляється, не є суттєво модифікованою;

P3-i. через 24 години (Фіг. 6b):

- Епідерміс: відмінності спостерігаються в одному й тому самому повторі, ймовірно, пов'язані з неоднорідним розподіленням; багато клітин є видимими, демонструючи метаболічну активацію та проліферацію; незначна кількість пікнотичних ядер; пластинчаста структура SC (рогового шару) виглядає суттєво модифікованою;

- Зона дермального-епідермального сполучення: спостерігається цілісність структури;

- Розподілення волокон та колагену: орієнтований, щільний, компактний та включає багато фібробластів.

NC через 48 годин (Фіг. 6c):

- Епідерміс: повністю життєздатний та з пластинчастою структурою SC (рогового шару), що відповідає нормі;

- Зона дермального-епідермального сполучення: спостерігається відшарування та втрата цілісності (внутрішня ламкість тканин);

- Розподілення волокон та колагену: орієнтоване та що містить багато фібробластів.

P1-i. через 48 годин (не показано на фігурі):

- Епідерміс: спостерігається повністю диференційований епідерміс; тканина показує модифікований SC - з точки зору структури та товщини - через більшу проліферацію та диференціювання.

P3-i. через 48 годин (Фіг. 6d):

- Епідерміс: відмінності спостерігаються в одному й тому самому повторі, ймовірно, пов'язані з неоднорідним розподіленням; багато клітин є видимими, демонструючи метаболічну активацію, та вони проліферують; незначна кількість пікнотичних ядер; пластинчаста структура SC (рогового шару) виглядає модифікованою через більшу проліферацію;

- Зона дермального-епідермального сполучення: спостерігається цілісність структури;

- Розподілення волокон та колагену: орієнтоване та що містить багато фібробластів; більш щільне та компактне по відношенню до негативного контролю.

Наведені вище дані демонструють, що композиція P3-i. (інактивованій штам + HA) діє за короткий час і з більшою ефективністю, ніж композиція P1-i композиція (тільки інактивованій штам), враховуючи те, що після нанесення на тканину P3-i через 24 години пластинчаста структура SC (рогового шару) виглядає модифікованою, при цьому після застосування P1-i. необхідно почекати 48 годин, перш ніж спостерігати модифікацію пластинчастої структури SC.

I.2.4.2. Результати ПЛР у реальному часі

I.2.4.2.1. Результати ПЛР у реальному часі через 24 години

На Фіг. 7 показано результати експресії генів (кПЛР-РЧ) через 24 години (RQ розрахований з допомогою NC через 24 години=1; RQ<0,5 дерегулювання, RQ>2 позитивне регулювання)

Результати відносного кількісного визначення (RQ) експресії генів (кПЛР-РЧ), отриманих в тканинах, оброблених композиціями, які аналізуються (P1-i., P2-i., P3-i.) через 24 години, є наведеними на Фіг. 7 нижче. Результати є вираженими по відношенню до негативного контролю (NC через 24 години = 1; $RQ < 0,5$ дерегулювання, $RQ > 2$ позитивне регулювання).

Загалом, неповністю однорідне застосування композицій, які аналізуються, призвело до високої біологічної варіабельності між трьома повторами.

Через 24 години після обробки:

-Інактивований пробіотичний штам, який аналізується, самостійно (P1-i) або включений в композицію, що містить НА (P3-i), індукував позитивне регулювання людського дефензину $\beta 2$ (DEFB4). Ці дані узгоджуються з імуномодуючими властивостями життєздатного штаму LPC-S01 DMS 26760, зазначеними в розділі I.1.3.1., та вони вказують на його здатність запускати захист шкіри навіть у нежиттєздатному стані. Отже, дана імуномодуюча активність може корелювати з зовнішніми елементами бактеріальної клітинної стінки.

-Композиція, що містить тільки НА (P2-i.), не модулювала людський дефензин $\beta 2$ (DEFB4): даний результат підтверджує, що позитивне регулювання DEFB4 в P3-i. (штам+НА) є пов'язане виключно з наявністю бактерії.

-композиція P3-i. (штам + НА) індукувала позитивне регулювання людського дефензину $\beta 2$ (DEFB4) через 24 години вищим (хоча й незначущим) способом у порівнянні з P1-i. (тільки штам). Значна регуляція TNF α визначалась кількісно, що вказує на індукування запальної реакції, ймовірно, через імунне розпізнавання бактерій поверхнею шкіри. Оскільки даний ефект не спостерігається в тканинах, оброблених P2-i. (тільки НА), даний результат може бути пов'язаний з високою дозою штаму LPC-S01 DMS 26760, включеного в композицію P3-i.

I.2.4.2.2. Результати ПЛР у реальному часі через 48 годин

Підтверджується індукування людського дефензину $\beta 2$ (DEFB4) інактивованим бактеріальним штамом, який аналізується (як в P1-i., так і P3-i.), зі значеннями, вищими за 24-годинну точку часу (розділ I.2.4.2.1.), що вказує на стабільну біологічну реакцію та посилення захисту шкіри, що в результаті призводить до ефективного механізму захисту.

I.2.5. Висновки.

В гомеостатичній (незапальна) моделі, композиція відповідно до винаходу P3-i. (інактивований штам + НА), що містить комбінацію інактивованого бактеріального штаму LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронової кислоти, добре переносилась в 3D моделі шкіри та була здатною стимулювати захисні сили організму та процеси диференціювання клітин у порівнянні з окремими компонентами та/або негативним контролем.

Зокрема, рівні ефективності композиції за винаходом P3-i. (інактивований штам + НА) досягаються за короткі терміни у порівнянні з бактеріальним штамом не в комбінації з гіалуроновою кислотою (P1-i.).

II. ЗАПАЛЬНА МОДЕЛЬ на моделі Episkin T-Skin™

Здатність композицій відповідно до винаходу, що містять бактеріальний штам LPC-S01 DMS 26760 (життєздатний або інактивований) та гіалуронову кислоту, зменшувати пошкодження, викликані УФ-випромінюванням, оцінювали в повній реконструйованій 3D моделі шкіри *in vitro*, яка відтворює відділи дерми та епідермісу (модель T-Skin™), таким чином, дозволяючи дослідження змін позаклітинного матриксу дерми та диференціювання життєздатних шарів (модель шкіри повної товщини).

Вказану оцінку проводили відповідно до двох моделей, моделі запалення А (попередня обробка непошкодженої тканини) та моделі запалення В (до обробки та після обробки пошкодженої тканини), про які повідомляється нижче.

II.A. МОДЕЛЬ ЗАПАЛЕННЯ А для ЖИТТЄЗДАТНОГО або ІНАКТИВОВАНОГО БАКТЕРІАЛЬНОГО ШТАМУ

II.A.1. Продукти, які аналізуються та Контролі.

- P1: життєздатний LPC-S01 DMS 26760, ресуспендований в сольовому розчині,
- P2: розчин на основі гіалуронової кислоти (дивіться I.1.1. маска);
- P3: життєздатний LPC-S01 DMS 26760, ресуспендований в розчині на основі гіалуронової кислоти,
- P1-i.: інактивований LPC-S01 DMS 26760 та ресуспендований в сольовому розчині,
- P2-i.: розчин на основі гіалуронової кислоти (дивіться I.1.1. маска);
- P3-i.: Інактивований LPC-S01 DMS 26760, ресуспендований в розчині на основі гіалуронової кислоти,
- Позитивний контроль (PC): тканини, оброблені 0,9 % сольовим розчином NaCl, очищені абразивом та які піддалися впливу УФ-випромінювання.
- Негативний контроль (NC): тканини, оброблені 0,9 % сольовим розчином NaCl без впливу УФ-випромінювання.

P1 (тільки життєздатний штам) та P3 (життєздатний штам + НА) отримували шляхом ресуспендування вмісту капсули висушеного при заморожуванні бактеріального штаму (KYO 8x10⁹) в

13 мл сольового розчину, що містить гіалуронову кислоту, відповідно.

P1-і. (тільки інактивований штам) та P3-і. (інактивований штам + НА) отримували шляхом ресуспендування вмісту капсули висушеного при заморожуванні бактеріального штаму ($KYO\ 8 \times 10^9$) в сольовому розчині та інкубували при $85\ ^\circ C$ протягом 1 години. Після завершення даного періоду бактерії центрифугували, та пелету суспендували в 13 мл сольового розчину (або крему) на основі гіалуронової кислоти, відповідно.

II.A. Спосіб оцінки зниження пошкодження від УФ

Зниження пошкодження від УФ з використанням пробіотичного штаму LPC-S01 DSM 26760 (живий та життєздатний або інактивований) оцінювали на моделі "Шкіра повної товщини", як описується вище. В дослідженні розглядали вплив штаму LPC-S01, гіалуронової кислоти та композиції, що містить штам LPC-S01 DSM 26760 + гіалуронову кислоту, на морфологію тканин, мічених гематоксилін-еозином та на активацію інфламасоми у відповідь на УФ-опромінення. Штам LPC-S01 DSM 26760, гіалуронову кислоту та композицію, що містить пробіотичний штам LPC-S01 DSM 26760 + гіалуронову кислоту наносили безпосередньо на поверхню 3D моделі шкіри, інкубували протягом ночі та потім промивали, використовуючи сольовий розчин для видалення надлишку продукту (стадія попередньої обробки). Тканину злегка очищали абразивом та потім піддавали впливу 1 MED (мінімальна еритемогенна доза) УФ, щоб імітувати нормальне сонячне опромінення. Активацію запалення досліджували через 4 та 24 години після впливу УФ-променів. Тканину, оброблену сольовим розчином та піддану впливу УФ-променів використовували як позитивний контроль. Тканину, оброблену сольовим розчином та яку не піддавали впливу УФ використовували як негативний контроль.

Оцінку ефективності композицій, які аналізуються, щодо зменшення пошкодження, викликаного УФ-променями, аналізували відповідно до способів, відомих фахівцям в даній галузі, з використанням:

- способу імунофарбування NFkB;
- гістоморфологічного аналізу із фарбуванням гематоксилін/еозином (H&E); та
- способу кількісного визначення IL-1 β (тільки для життєздатного штаму).

II.A.3. Результати зниження пошкодження від УФ (Модель запалення А)

II.A.31. Результати імунофарбування NFkB

Фіг. 3 узагальнює результати кількісного визначення транслокації NFkB через 4 години після впливу УФ-променів (композиції, які аналізуються, що містять життєздатні штами).

Через 4 години після опромінення, позитивний контроль (PC) показав велику кількість транслокацій NFkB, особливо в надбазальному шарі епідермісу.

Обробки LPC-S01 DSM 26760 (P1), штамом LPC-S01 DSM 26760 та гіалуроною кислотою (P2) та гіалуроною кислотою (P3) в значній мірі інгібують ядерну транслокацію NFkB по відношенню до позитивного контролю.

Обробка пробіотиком LPC-S01 DSM 26760, LPC-S01 DSM 26760 + гіалуроною кислотою та гіалуроною кислотою показала здатність запобігати активації запалення шляхом інгібування транслокації NFkB в ядрі клітин, що піддавались впливу УФ-променів.

Крім того, Таблиця 2 показує напівкількісні дані ядерної транслокації NFkB, визначені для попередньої обробки протягом 16 годин (довготривалої) композиціями, які аналізуються, що містять життєздатні штами (P3) або інактивовані штами (P3-і), та оцінка параметрів через 4 години після впливу УФ-променів, є корисною для оцінки ефективності довготривалого лікування.

Біологічна релевантність та відтворюваність зазначеної інфламасомної моделі (вплив УФ-випромінювання при 1 MED, мінімальна еритемна доза) підтверджувалась збільшенням транслокації NFkB в ядрі клітини в опромінених зразках (позитивний контроль) у порівнянні з неопроміненими зразками (негативний контроль).

Відносне збільшення транслокації NFkB (відсоткова різниця) у дослідженні з композицією P3-і з інактивованими штамми (+ 70,7 %, $w=0,01$) є співставимим з кількісно визначеним у дослідженні з композицією P3 з життєздатними штамми (+83,7, $w=0,01$).

Таблиця 2

		транслокація NFkB (середнє значення $\pm$ ст.відх.)	
Негативний контроль	NC	11,0 $\pm$ 2,1	25,7 $\pm$ 8,3
Позитивного контроль	PC	18,8 $\pm$ 4,8 (+70,7 % $w=0,01$)	47,2 $\pm$ 6,2 (+83,7 $w=0,01$)
Обробка		16h (ON)	16h (ON)
Штам (життєздатний) + НА	P3	-	29,6 $\pm$ 6,3 (-37,3 % $w=0,00$)
Штам (інактивований) + НА	P3-і	16,0 $\pm$ 3,2 (+14,8)	-

Крім того, через 24 години P3 показав зниження вмісту NFkB в цитоплазмі у порівнянні з

позитивним контролем (дані не виміряні для P3-i).

II.A.3.2. Гістоморфологічні результати з фарбуванням H&E.

Фіг. 4 та Фіг. 5 показують тканини оброблених сольовим розчином (позитивного контроль) (A), пробіотиком LPC-S01 DSM 26760 (B), гіалуроновою кислотою (C) та LPC-S01 DSM 26760 (життєздатні) + гіалуроновою кислотою (D) відповідно через 4 та 24 години після ураження УФ-променями (гістоморфологія з фарбуванням H&E).

Як може бути видно на обох фігурах, обробка гіалуроновою кислотою та обробка пробіотиком LPC-S01 DSM 26760 не здатні зменшити пошкодження, спричинені УФ-променями. Зокрема, ознаки сонячних опіків, викликаних УФ-променями є видимими в базальному шарі та в остистому шарі епідермісу. Крім того, зона дермального-епідермального сполучення пошкоджується УФ-променями, та епідерміс не повністю прилягає до дерми, що є ознакою зміненої структури шкіри (Фіг. 4A, Фіг. 4B, Фіг. 5A та Фіг. 5B).

Обробка гіалуроновою кислотою + пробіотиком LPC-S01 DSM 26760 є здатними зменшити пошкодження, викликаних УФ-променями через 4 та 24 години після індукування пошкодження. Зокрема, структура як дерми, так і епідермісу є більш щільною у порівнянні з обробкою гіалуроновою кислотою та пробіотиком LPC-S01 DSM 26760, що вводяться окремо. Крім того, структура зони дермального-епідермального сполучення краще підтримується, що сприяє кращому прилягання епідермісу до дерми (Фіг. 4D та Фіг. 5D).

Даний синергетичний ефект спільного введення гіалуронової кислоти та пробіотика LPC-S01 DSM 26760 був непередбачуваним, враховуючи, що ні гіалуронова кислота, ні пробіотик, які вводяться самостійно не є здатними зменшити "вивільнення" епідермісу з дерми, та отже, не можуть підтримувати фізіологічну структуру шкіри.

II.A.3.3. Результати кількісного визначення IL-1 β

IL-1 β визначали кількісно через 4 години для композиції відповідно до винаходу P3, що містить життєздатний штам та гіалуронову кислоту, щодо негативного контролю та позитивного контролю (Таблиця 3). Результати не можуть вважатися кількісними даними, враховуючи, що сигнал був нижче обмеження виявлення набору (обмеження 3,91 пг/мл). Результати вказують на глобальну тенденцію.

Таблиця 3

	NC	PC	P3a
IL-1 β (пг/мл)	2,12	2,74	1,84

II.A.4. Висновки

Експериментальна модель на T-Skin™ (загальній товщині шкіри) на основі шляхів запалення, викликаних УФ-променем A + УФ-B (1 доза MED), використовувалась для оцінки ефективності композицій відповідно до винаходу P3 та P3-i, що містить бактеріальний штам LPC-S01 DMS 26760 (життєздатний або інактивований, відповідно) та гіалуронову кислоту, коли застосовуються перед індукуванням інфламасомного стресу (попередня обробка).

Композиції відповідно до винаходу P3 (життєздатний штам + HA) та P3-i (інактивований штам + HA) показав гарну ефективність щодо зниження транслокації NF κ B при довготривалій попередній обробці (16 годин).

Крім того, композиція відповідно до винаходу P3 (життєздатний штам + HA) показала гарну здатність захищати структуру зони дермального-епідермального сполучення від УФ-променів при гістоморфологічному дослідженні з фарбуванням H&E.

II.B. МОДЕЛЬ ЗАПАЛЕННЯ В для ІНАКТИВОВАНОГО ШТАМУ

Експериментальна модель на T-Skin™ (загальній товщині шкіри) на основі шляхів запалення, викликаних УФ-променями A + УФ-B (1 доза MED) використовувалась для оцінки ефективності композицій відповідно до винаходу P3-i., що містить інактивований бактеріальний штам LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронову кислоту, коли застосовуються до пошкодженої тканини перед або після індукування інфламасомного стресу (попередня обробка або після обробки щодо УФ-опромінення).

Композиції, які аналізуються (дивіться II.B.1), оцінювали, використовуючи високу концентрацію інактивованого бактеріального штаму, який аналізується (10^7 або 10^9 клітин/тканини) з метою вивчення їх потенційного застосування та ефективності на моделі запалення T-Skin відповідно до 2 протоколів:

V.I. ПРОТОКОЛ ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ: Т-шкіра стирається через механічне навантаження на поверхню епідермісу та попередньо обробляється протягом 45 хвилин або 4 годин досліджуваними композиціями, потім піддається опроміненню УФ-A та УФ-B (1 MED). Через 4 години після зазначеного опромінення (після інкубування), тканини збирали для аналізу.

V.II. ПРОТОКОЛ ПІСЛЯ ОБРОБКИ: Т-шкіра стирається механічним впливом на поверхню епідермісу та піддається опроміненню УФ-A та УФ-B (1 MED), потім обробляється протягом 45 хвилин

або 4 годин досліджуваними композиціями та негайно збирається для аналізу.

Метою дослідження було вивчення ефективності бактеріального штаму в аналізі, інактивованого у високих дозах (самостійно або в суміші з НА) щодо модулювання активації та транслокації NFκB в ядрі.

II.B.1. Композиції, які аналізуються, та Контролі.

- P3-i.-10⁹: Інактивований LPC-S01 DMS 26760 (10⁹ клітин/тканини), ресуспендований в кремі на основі гіалуронової кислоти (дивіться I.2.1.), що відповідає 30 % кінцевої композиції;

- P3-i.-10⁷: інактивований LPC-S01 DMS 26760 (10⁷ клітин на тканину), ресуспендований в кремі на основі гіалуронової кислоти (дивіться I.2.1.), що відповідає 0,03 % кінцевої композиції;

- Позитивний контроль (PC): тканини, оброблені 0,9 % сольовим розчином NaCl, очищені абразивом та які піддалися впливу УФ-випромінювання.

- Негативний контроль (NC): тканини, оброблені 0,9 % сольовим розчином NaCl без впливу УФ-випромінювання.

P3-i. (інактивований штаму + НА) отримували шляхом ресуспендування вмісту висушеної при заморожуванні капсули бактеріального штаму (КУО 10⁹) в сольовому розчині та інкубували при 85 °C протягом 1 години. Після завершення даного періоду бактерії центрифугували та пелету суспендували в 13 мл крему на основі гіалуронової кислоти.

II.B.2. Дизайн дослідження

II.B.2.1. Отримання композицій, які аналізуються

Інактивований штаму, який аналізується у висушеній при заморожуванні формі, який має кількість клітин, що становила $2 \cdot 10^{11}$ клітин/г порошку, зважували та ресуспендували у відповідних розчинниках наступним чином:

- 2 г в 4 мл крему на основі НА (дивіться I.2.1.), отримуючи P3-10⁹. 10⁹ бактерій/тканину наносили, застосовуючи 15 мкл суспензії.

- 0,02 г в 4 мл крему на основі НА (дивіться I.2.1.), отримуючи P3-10⁷. 10⁷ бактерій/тканину наносили, застосовуючи 15 мкл суспензії.

II.B.2.2. Індукування та обробка інфламасомної Т-шкіри

II.B.2.2.1. Протокол попередньої обробки

Дизайн експерименту є узагальненням на Фіг. 8: у день експерименту тканини були пошкоджені незначним механічним навантаженням (Algerbrush n мазків = 2) та оброблені 15 мкл композиції, яка аналізується (P3-i.), яку наносили безпосередньо та рівномірно на тканини T-Skin™ та інкубували протягом 45 хвилин або 4 годин.

Згодом тканини опромінювали 1 MED (еквівалент 0,025 Дж/см²) в PBS з використанням сонячного симулятора Oriel 1KW з ксеноновою дугою та еритемним фільтром Irradiance WG320 [мВт/см²] (0,035 мВт/см², відповідно до сертифіката калібрування № 16121, виданого Opto.Cal GmbH). Після індукування інфламасоми, тканини пост-інкубували в умовах гомеостазу протягом 4 години та потім фіксували в формаліні та вводили в парафін (FFPE) для імунофарбування NFκB. Тканини також збирали для подальшого аналізу кПЛР-РЧ. Носії збирали та зберігали при -20 °C.

II.B.2.2.2. Протокол після обробки

Дизайн експерименту є узагальненням на Фіг. 9: у день експерименту тканини були пошкоджені незначним механічним навантаженням (Algerbrush n мазків = 2) та опромінені 1 MED (еквівалент 0,025 Дж/см²), в PBS. Після індукування інфламасоми, тканини обробляли 15 мкл композицій, які аналізуються, та інкубували протягом 45 хвилин або 4 години. Одразу після обробки тканини збирали та фіксували в формаліні для імунофарбування NFκB. Тканини також збирали для подальшого аналізу кПЛР-РЧ.

II.B.3. Результати імунофарбування NFκB

Таблиця 4 нижче показує результати транслокації NFκB (виражені як загальна кількість ядер, виявлених у 3 біологічних повторях) щодо негативного контролю по відношенню до позитивних контролів кожного протоколу. Як повідомляється в таблиці 4, індукування інфламасомної моделі підтверджувалось збільшенням транслокації NFκB в клітинних ядрах в опромінених зразках по відношенню до негативного контролю.

Однак у цій партії Т-шкіри після опромінення спостерігалася більш рання активація NFκB, хоча транслокація спостерігалася в кожній точці часу. Зокрема, найвище індукування NFκB спостерігається через 45 хвилин після опромінення.

Прийняті протоколи ґрунтуються на зчитуванні після УФ-опромінення в моделі після обробки та зчитуванні після пост-інкубування в моделі попередньої обробки, враховуючи те, що метою є оцінка ефективності продуктів щодо відновлення від гострого запального процесу.

Таблиця 4

Негативний контроль	0
---------------------	---

Позитивний контроль 45 хв. попередньої обробки + 4 години після УФ інкубування	7
Позитивний контроль 4 години попередньої обробки + 4 години УФ інкубування	5
Позитивний контроль 45 хвилин після УФ опромінення	9
Позитивний контроль 4 години після УФ опромінення	4

А) 45-хвилинна попередня обробка

В таблиці 5 представлено напівкількісний аналіз ядерної транслокації NFkB (вираженої як загальна кількість ядер, виявлених у всіх біологічних повторах) протягом 45-хвилинної попередньої обробки + 4 годинного інкубування після УФ-опромінення.

Таблиця 5

*композиція відповідно до винаходу

Негативний контроль	NC	0
Позитивний контроль	PC	7
Інактивовані штаб 10 ⁹ +НА*	P3-i.(10 ⁹)	1
Інактивовані штаб 10 ⁷ +НА *	P3-i.(10 ⁷)	5

В) 4-годинна попередня обробка

В таблиці 6 представлено напівкількісний аналіз ядерної транслокації NFkB (виражений як загальна кількість ядер, виявлених у всіх біологічних повторах) протягом 4-годинної попередньої обробки + 4- годинного інкубування після УФ-опромінення.

Таблиця 6

*композиція відповідно до винаходу

Негативний контроль	NC	0
Позитивний контроль	PC	5
Інактивовані штаб 10 ⁹ +НА*	P3-i.(10 ⁹)	1
Інактивовані штаб 10 ⁷ +НА *	P3-i.(10 ⁷)	2

Аналіз результатів Таблиці 5 та 6:

- При застосуванні як попередньої обробки, композиція P3-i., що містить інактивованій штаб LPC-S01 DMS 26760 та гіалуронову кислоту, була здатна зменшити транслокацію NFkB в ядрі, що вказує на превентивну ефективність у захисті шкіри від запального стресу, викликаного УФ-променями.

- При концентрації 10⁹ штабу, в 45-хвилинній моделі попередньої обробки, композиція P3-i. (інактивованій штаб+НА) був здатний сильно знижувати транслокацію NFkB в ядрі, що вказує на синергетичний та/або високоефективний ефект між інактивованим штабом LPC-S01 DMS 26760 та гіалуроновою кислотою.

- Реакція тканин на попередню обробку композиціями, P3-i.(10⁹) та P3-i.(10⁷) при 2 різних концентраціях інактивованого LPC-S01 DMS 26760 свідчить про механізм залежності від дози: менше позитивних ядер NFkB було виявлено при зростанні концентрації штабу в композиції.

С) через 45- хвилин після обробки

В таблиці 7 представлено напівкількісний аналіз ядерної транслокації NFkB (виражений як загальна кількість ядер, виявлених у всіх біологічних повторах) протягом 45-хвилинної попередньої обробки після УФ-опромінення.

Таблиця 7

*композиція відповідно до винаходу

Негативний контроль	NC	0
Позитивного контроль	PC	9
Інактивованій штаб 10 ⁹ +НА*	P3-i.(10 ⁹)	3
Інактивованій штаб 10 ⁷ +НА *	P3-i.(10 ⁷)	0

Д) через 4 години після обробки

В таблиці 8 представлено напівкількісний аналіз ядерної транслокації NFkB (виражений як загальна кількість ядер, виявлених у всіх біологічних повторах) протягом 4-годинної попередньої

*композиція відповідно до винаходу

Негативний контроль	NC	0
Позитивного контроль	PC	4
Інактивованій штам 10^9 +НА*	P3-i.(10^9)	1
Інактивованій штам 10^7 +НА *	P3-i.(10^7)	9

- Композиція P3 (Інактивованій штам + НА) продемонструвала швидке та ефективне відновлення базальних рівнів NFKB, особливо в короткостроковій перспективі (коли запальна відповідь досягає максимального рівня), що свідчить про покращення синергізму/ефекту в комбінації інактивованого штаму LPC-S01 DMS 26760 + гіалуронової кислоти для відновлення гомеостазу запалених тканин.

II.B.4. Висновок

Дані результати підтверджують, що композиція P3-i, що містить комбінацію інактивованого LPC-S01 DMS 26760 + гіалуронової кислоти, є ефективною як при гомеостатичних станах (дивіться розділ I.2.), так і в умовах запалення шкіри (наприклад, викликаного УФ-випромінюванням), особливо в гострій фазі запалення, враховуючи, що особливо ефективною є у короткостроковому періоді розвитку запалення.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА (2)

Оцінка адгезії *Cutibacterium acnes* DSM 1897 до 3D моделі "Шкіра повної товщини" в присутності композиції відповідно до винаходу (штам *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 та гіалуронова кислота)

1. Мета дослідження.

Метою дослідження було оцінити здатність пробіотичного штаму *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, самостійно та/або в комбінації з гіалуроновою кислотою (НА), боротися з адгезією *C. acnes* in-vitro в моделі "шкіра повної товщини".

Cutibacterium acnes (скорочено *C. acne*, також відомий як *Propionibacterium acnes* або *P. acne* (Douglas et Günter, 1946)) являє собою грампозитивну анаеробну бактерію, яка повільно росте, пов'язана з деякими шкірними захворюваннями, такими як акне; це також може бути причиною блефариту та ендодальміїту.

Для оцінки різних можливих інфекційних ситуацій було реалізовано конкурентну модель та модель виключення на основі адаптації способу, описаного Coman et al. в 2015.

2. Дизайн експеримента.

Штам *C. acnes* DSM 1897 використовувався для імітації уражень в 3D-моделі "Шкіра повної товщини", придбаної в загальній кількості 30 вставок, від Phenion (Henkel).

Дослідження здійснювали, розглядаючи різні умови лікування, наведені нижче:

1) ніякого лікування, щоб оцінити ефективну адгезійну здатність *C. acnes* DSM1897 в 2 моделях виключення та конкуренції;

2) профілактичне або супутнє лікування *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 протягом 24 годин;

3) профілактичне або супутнє лікування 0,5 % гіалуроновою кислотою протягом 24 годин (Sigma-Aldrich 41897);

4) профілактичне або супутнє лікування гомогенною сумішшю гіалуронової кислоти та *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 протягом 24 годин;

5) профілактичне або супутнє лікування бензоїлпероксидом протягом 24 години (Benzac 10 %, позитивний контроль).

Отримували суспензію штаму *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, та 50 мкл суспензії приводили в контакт з поверхнею вставки.

Отримували 0,5 % суспензію гіалуронової кислоти, та 50 мкл суспензії приводили в контакт зі вставками.

Крім того, 50 мкл штаму *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 змішували з 0,25 мг гіалуронової кислоти, щоб отримати комбінований препарат пробіотик + гіалуронова кислота, в тій самій концентрації гіалуронової кислоти (0,5 %) та при тому самому початковому завантаженні, використовувався для досліджень з окремими речовинами.

50 мкл гелю Benzac 10 % (бензоїлпероксид) приводили в контакт зі вставками як позитивний контроль.

Всі 5 наведених вище умов досліджували в двох повторях, та 10 вставок інкубували протягом 24 годин при 37 °C в присутності CO₂.

2.a. Виконання дослідження виключення

Дослідження виключення передбачало попередню обробку вставок пробіотичним штамом (або гіалуроновою кислотою або сумішшю з двох), подальше зараження патогеном та подальшу перевірку можливого зниження % адгезії патогена до вставки по відношенню до ідеального стану інфекції (модель in-vitro профілактичного лікування пробіотиками).

2.b. Виконання конкурентного дослідження

Конкурентне дослідження передбачало супутнє лікування вставок пробіотичним штамом (або гіалуроновою кислотою або сумішшю з двох) та патогеном, та подальшу перевірку можливого зниження % адгезії патогена до вставки по відношенню до ідеального стану інфекції (модель in-vitro лікування пробіотиком під час перебігу інфекції).

3. Результати

3.1 Дослідження виключення

Фіг. 10 показує зниження життєздатності патогена *C. acnes* DMS1897, виражене в Log10 KYO, тоді як Таблиця 9 показує таку саму ситуацію як відсоткове зниження (%) життєздатності патогена в різних умовах дослідження.

Таблиця 9

Досліджувана умова	% зниження патогена
LPC-S01	19,1
LPC-S01 + гіалуронова кислота	19,5
Гіалуронова кислота	0,8
Benzac	17,0

Як може бути видно з повідомляються результати, лікування, здійснені Benzac 10 %, LPC-S01 DSM 26760 та комбінацією з LPC-S01 DSM 26760 в присутності 0,5 % гіалуронової кислоти зменшує життєздатну кількість *C. acnes* DSM1897 на приблизно 1,0-1,4 Log10, що відповідає до приблизно 20 % зниженню життєздатності патогена. Лікування 0,5 % гіалуроновою кислотою самостійно, як видно, не є здатним знизити життєздатність патогена будь-яким чином.

3.2. Конкурентне дослідження

Фіг. 11 та Таблиця 10 показують діаграми кількостей життєздатних, виражених як логарифм зменшення logKYO *C. acnes* DSM1897 на вставку, середнє значення, отримане для дублікату кожного досліджуваного стану, та як відсоток зниження, отриманий в конкурентному дослідженні.

Таблиця 10

Досліджувана умова	% зниження патогена
LPC-S01	18,0
LPC-S01 + гіалуронова кислота	17,3
Гіалуронова кислота	0,0
Benzac	15,3

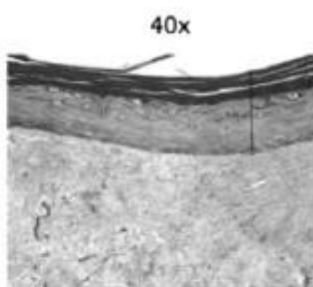
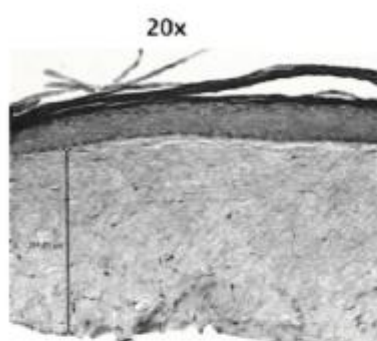
На основі представлених даних підтверджується, що лікування, здійснені Benzac 10 %, LPC-S01 DSM 26760 та комбінацією LPC-S01 DSM 26760 в присутності 0,5 % гіалуронової кислоти знижує життєздатну кількість *C. acnes* DSM1897 на 1,0-1,3 Log10 KYO. Як і в дослідженні виключення, лікування 0,5 % гіалуроновою кислотою самостійно, як видно, не є здатним знизити життєздатність патогена.

4. Висновок

Всі проведені дослідження in-vitro продемонстрували ефективність позитивного контролю Benzac 10 % в стримуванні інфекції *C. acnes*, із % зниженням життєздатності популяції патогена від 15 % до 23 %.

Дослідження виключення та конкурентне дослідження показали, що лікування, здійснені комбінацією LPC-S01+0,5 % гіалуронової кислоти (композиції відповідно до винаходу), зменшують інфекцію *C. acnes* DSM1897 приблизно на 18-19 %.

A



B

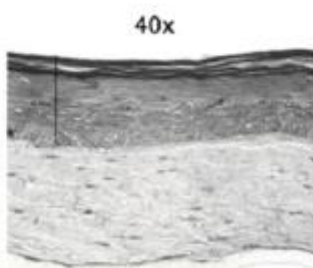
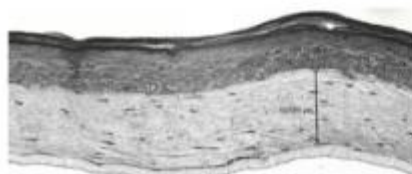
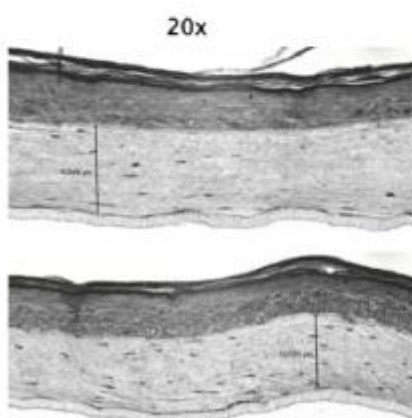
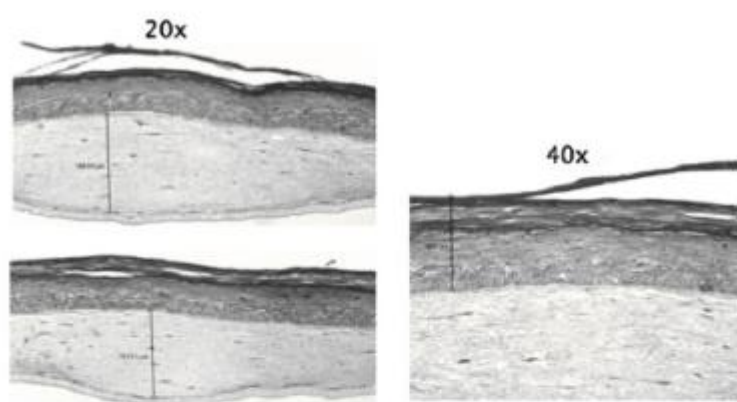
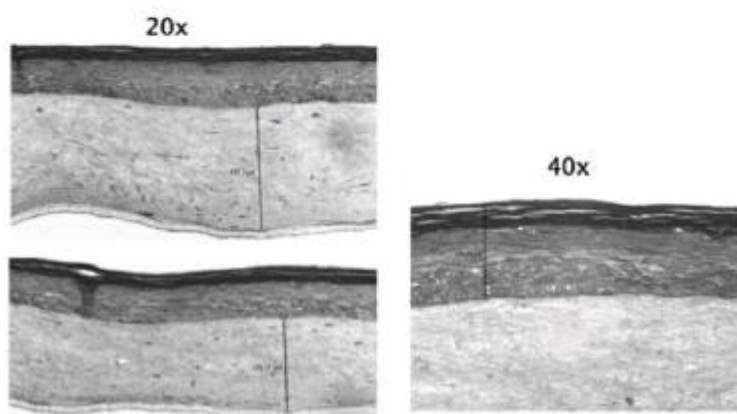


Fig. 1

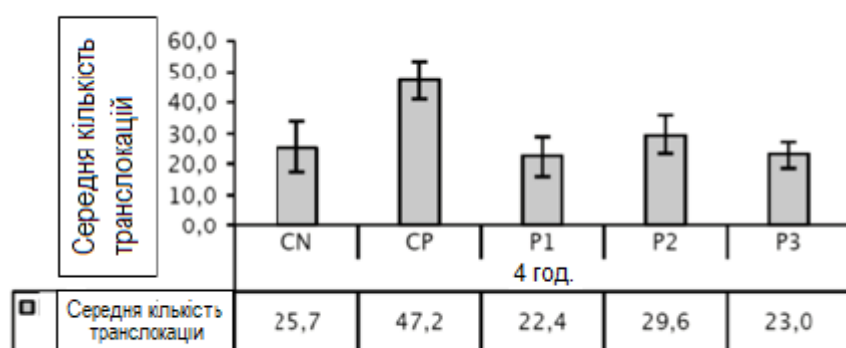
A



B



Фиг. 2



Фиг. 3

A



B



C



D

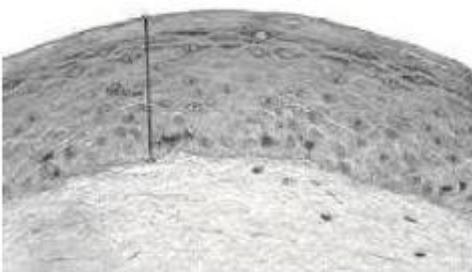
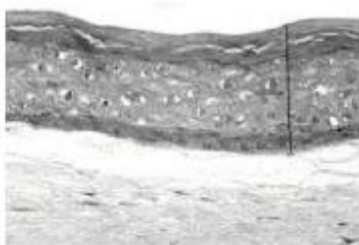
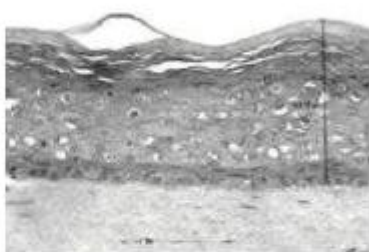


Fig. 4

A



B



C



D

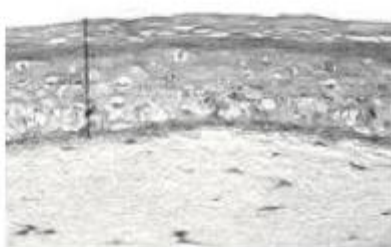


Fig. 5

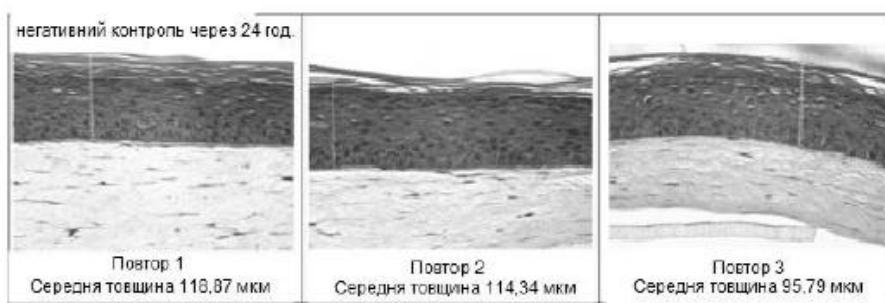
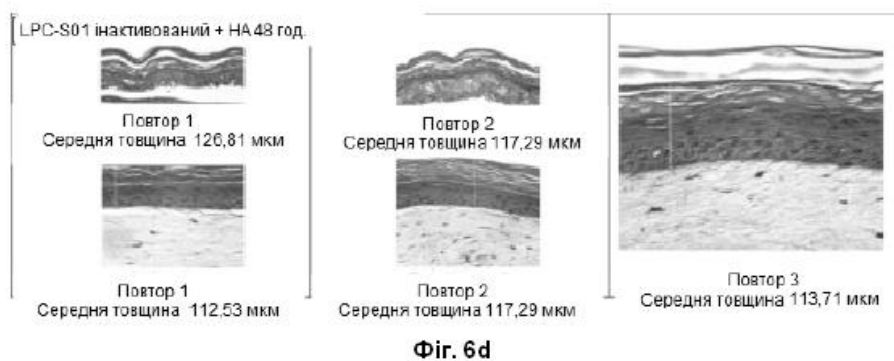
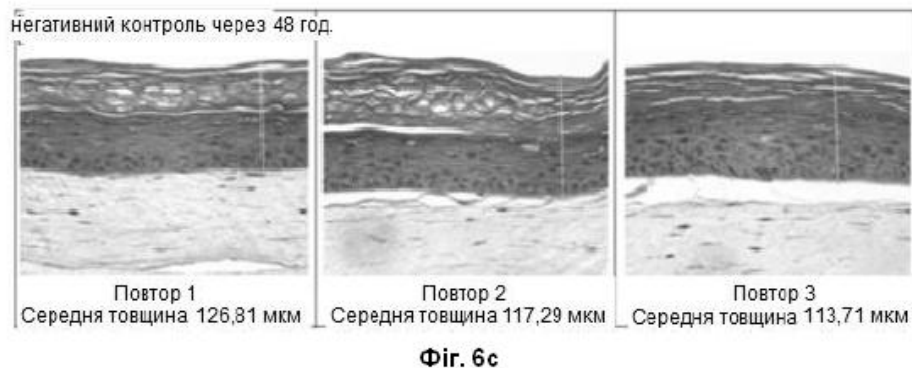
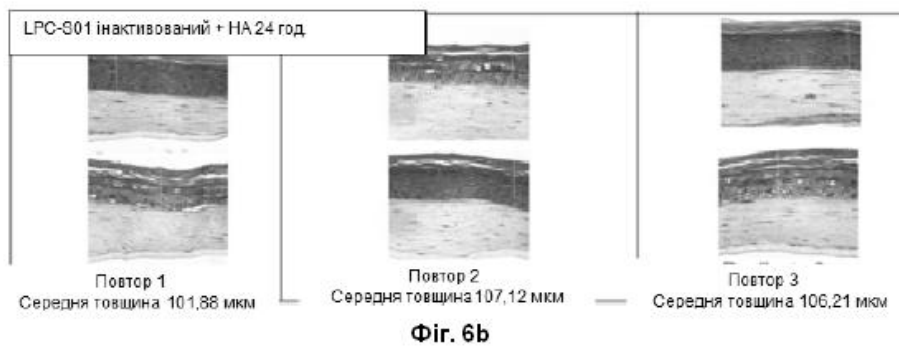
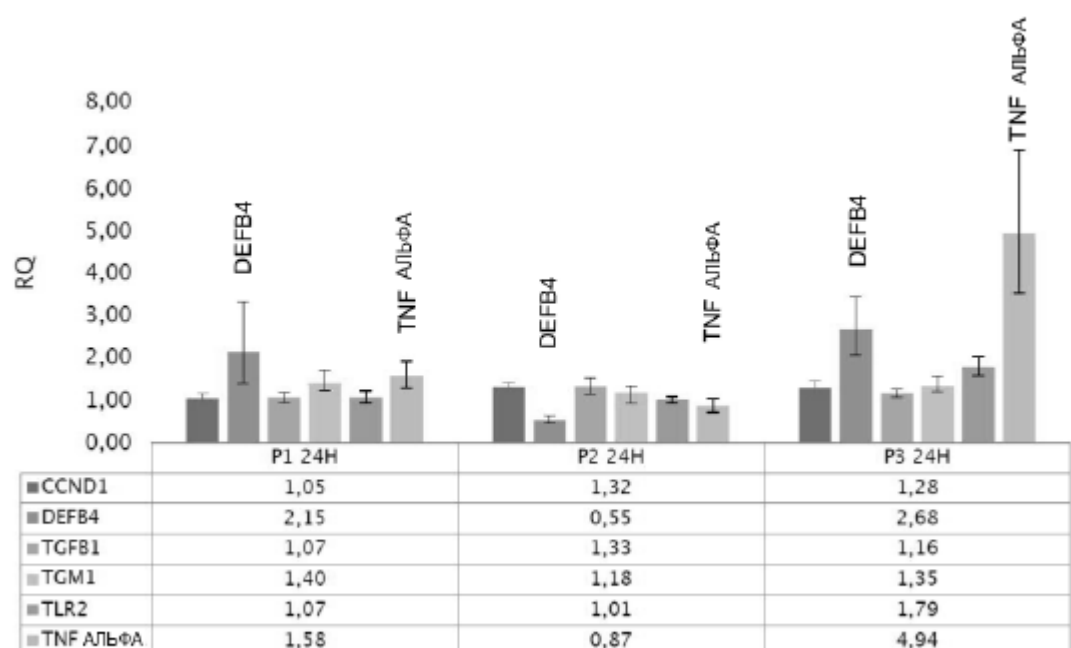


Fig. 6a





Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

Зменшення життєздатної кількості *C. acnes*

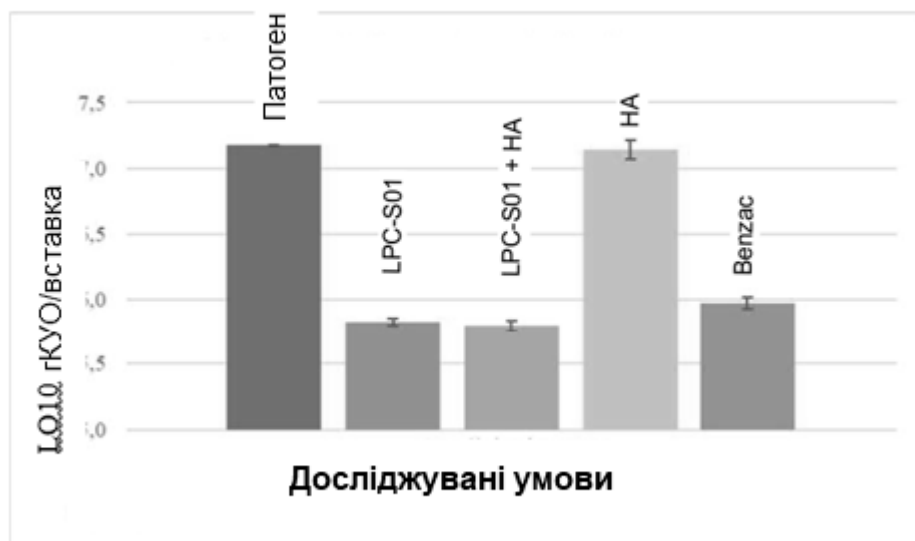


Fig. 10

Зменшення життєздатної кількості *C. acnes*

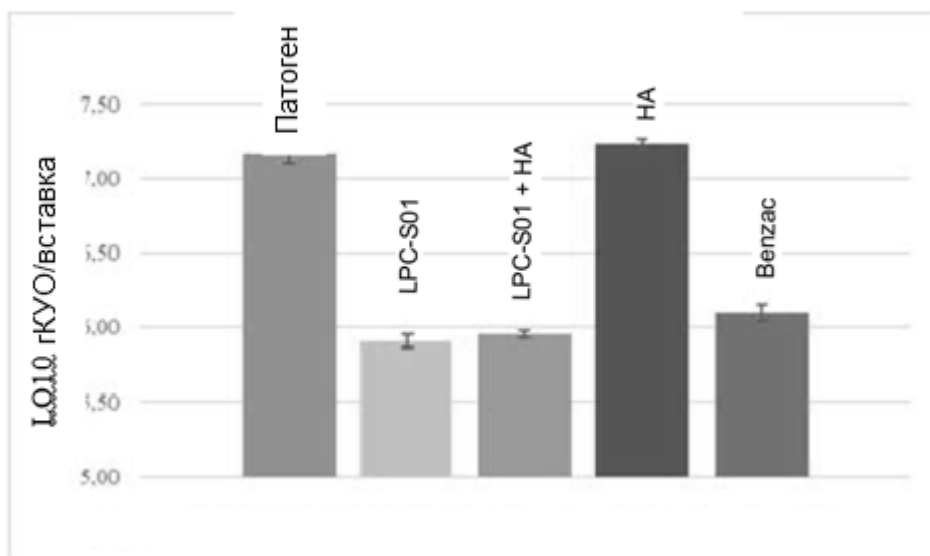


Fig. 11