

**Katedra i Zakład Naturalnych Surowców Leczniczych
i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu**

Monika Morąg

***OCENA WŁAŚCIWOŚCI KOSMETYCZNYCH
EKSTRAKTU Z LIŚCI SIERPIKA PIĘCIOLISTNEGO
W PIELEGNACJI SKÓRY Z PRZEBARWIENIAMI***

Rozprawa doktorska

Promotor
Prof. dr hab. farm. Gerard Nowak

Poznań 2012

*Składam serdeczne podziękowania
dla promotora pracy
prof. dr hab. farm. Gerarda Nowaka
za wyrozumiałość, cierpliwość
oraz pomoc i cenne wskazówki
w trakcie realizacji i pisania niniejszej pracy*

Słowa kluczowe:

Sierpik pięciolistny (*Serratula quinquefolia*), ekstrakt, arbutyna, przebarwienia, melanina.

Keywords:

Drepanium (*Serratula quinquefolia*), extract, arbutin, hyperpigmentations, melanin.

SPIS TREŚCI

Wstęp.....	9
I. Część teoretyczna.....	11
1. Charakterystyka rodzaju <i>Serratula</i> L.	11
1.1. Opis botaniczny	11
1.2. Naturalne związki w gatunkach <i>Serratula</i> L.	11
2. Charakterystyka <i>Serratula quinquefolia</i> M.B.	13
2.1. Systematyka gatunku	13
2.2. Opis botaniczny	13
3. Arbutyna.	16
3.1. Występowanie	16
3.2. Budowa i właściwości fizyko – chemiczne.	16
3.3. Zastosowanie lecznicze surowców roślinnych zawierających arbutynę.....	18
3.3.1. <i>Arctostaphylos uvae ursi folium</i> - <i>Arctostaphylos uva ursi</i> (L.) Sprengel, <i>Ericaceae</i>	18
3.3.2. <i>Vitis idaeae folium</i> - <i>Vaccinium vitis idaea</i> L. <i>Ericaceae</i>	20
3.4. Zastosowanie w kosmetologii	21
4. Problematyka przebarwień skóry.	32
4.1. Definicja	32
4.2. Przyczyny powstawania przebarwień skóry	33
4.2.1. Promieniowanie nadfioletowe UVA i UVB	33
4.2.2. Zmiany hormonalne i choroby układowe	34
4.2.3. Substancje chemiczne o działaniu fotoalergizującym i fitotoksycznym obecne w niektórych lekach, roślinach i kosmetykach oraz metale ciężkie	34
4.2.4. Zmiany zapalne	35
4.2.5. Urazy mechaniczne	36
4.3. Rodzaje przebarwień skóry	36
4.3.1. Krótka charakterystyka najczęściej spotykanych przebarwień skóry.....	38
4.3.1.1. Pieg (ephelides).....	38
4.3.1.2. Plamy soczewicowate (lentigines)	38
4.3.1.2.1. Plama soczewicowata starcza (lentigo sensilis, lentigo solaris).....	38
4.3.1.2.2. Plama soczewicowata złośliwa (lentigo maligna)	39
4.3.1.3. Ostuda (chloasma, melasma)	39
4.3.1.4. Melanoza Riehla (melanosis Riehl)	39

4.3.1.5. Przebarwienia okołoustne (<i>melanosis peribuccalis</i>).....	40
4.3.1.6. Przebarwienia pozapalne i po odczynach fototoksycznych.....	40
4.4. Profilaktyka przebarwień skóry	40
4.5. Diagnostyka przebarwień skóry.....	42
4.5.1. Lampa z filtrem Wood'a	42
4.5.2. Mexametr®	43
4.5.3. DermaSpectrometr®	44
4.5.4. Chromametr®	44
4.5.5. Dermatoskopia (dermoskopia, mikroskopia epiluminescencyjna).....	45
4.6. Leczenie przebarwień skóry.....	46
4.6.1. Substancje czynne wykorzystywane w zaburzeniach pigmentacji	46
4.6.1.1. Aloesyna	48
4.6.1.2. Amid kwasu nikotynowego (niacynamid)	48
4.6.1.3. Arbutyna	48
4.6.1.4. Emblica	48
4.6.1.5. Glabrydyna.....	48
4.6.1.6. Hesperydyna	49
4.6.1.7. Hydrochinon (1,4-dihydroksybenzen)	49
4.6.1.8. Hydroksykwasy.....	49
4.6.1.9. Kortykosteroidy	50
4.6.1.10. Kwas askorbowy i jego pochodne	51
4.6.1.11. Kwas azelainowy	51
4.6.1.12. Kwas kojowy	51
4.6.1.13. Kwas linolowy i kwas α -liponowy	52
4.6.1.14. Kwas retinowy (tretynoina)	52
4.6.1.15. Mekwinol	52
4.6.1.16. Melatonina	52
4.6.1.17. N-acetyl-4-cysteaminofenol (NCAP)	53
4.6.2. Metody zabiegowe w leczeniu przebarwień skóry	53
4.6.2.1. Peeling chemiczny	53
4.6.2.2. Mikrodermabrazja.....	54
4.6.2.3. Peeling kawitacyjny (peeling ultradźwiękowy).....	56
4.6.2.4. Krioterapia	56
4.6.2.5. Laseroterapia.....	56
4.6.2.6. Terapia fotodynamiczna (PDT)	58

II. Założenia i cel pracy	59
III. Część doświadczalna	61
A. Badania fitochemiczne.....	61
1. Materiał do badań	61
2. Metody izolacyjne	62
2.1. Przygotowanie wyciągów	62
2.1.1. Przygotowanie wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego do izolacji arbutyny	62
2.1.2. Przygotowanie wyciągu wodnego do testów kosmetycznych.....	62
2.2. Chromatografia kolumnowa	63
3. Metody identyfikacji.....	64
3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	64
3.2. Oznaczenie temperatury topnienia	64
3.3. Absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni (IR)	65
3.4. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	65
3.5. Rentgenowska analiza strukturalna	65
4. Chromatografia kolumnowa (CC) wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego – izoalacja związku A.....	66
5. Identyfikacja związku A.....	67
5.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	67
5.2. Oznaczenie temperatury topnienia.....	68
5.3. Spektroskopia w podczerwieni (IR).....	68
5.4. Spektroskopia NMR.....	69
5.4.1. Analiza ¹ H NMR.....	69
5.4.2. Analiza ¹³ C NMR.....	71
5.4.3. Analiza ¹ H/ ¹³ C NMR cosy	73
5.5. Rentgenowska analiza strukturalna	75
6. Oznaczanie β-arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).....	78
7. Oznaczanie zawartości β-arbutyny w wodnym wyciągu z liści sierpika pięciolistnego, przeznaczonego do badań kosmetycznych, metodą HPLC	80
B. Badania kosmetyczne	83
1. Osoby badane	83
1.1. Grupa badana	84
1.2. Grupa kontrolna	87

2. Metody.....	90
2.1. Opracowanie receptur preparatów do badań kosmetycznych	90
2.1.1. Opracowanie receptury kremu niwelującego przebarwienia	90
2.1.2. Krem bez substancji czynnej (placebo)	91
2.2. Diagnostyka przebarwień...	91
2.2.1. Badanie podmiotowe	91
2.2.2. Badanie przedmiotowe.....	92
2.2.2.1. Badanie dermatoskopowe	92
2.2.2.2. Badanie aparaturowe – ocena poziomu melaniny w miejscu przebarwienia.....	92
2.2.2.3. Testy diagnostyczne stwierdzające brak właściwości uczulających kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego.....	94
2.3. Aplikacja opracowanych kremów	95
2.4. Analiza statystyczna	96
3. Wyniki	97
3.1. Struktura grup terapeutycznych	97
3.1.1. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem wieku i klas wieku.....	97
3.1.2. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem fototypu skóry	98
3.1.3. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem rodzaju przebarwień skóry	99
3.2. Początkowy poziom melaniny w grupach terapeutycznych	100
3.3. Analiza zmiany poziomu melaniny względem czasu w grupach terapeutycznych ...	101
3.3.1. Analiza zmiany poziomu melaniny względem czasu w grupie badanej i kontrolnej u pacjentek z <i>melasmą</i> i <i>lentigo solaris</i>	103
3.4. Analiza zmiany poziomu melaniny w poszczególnych klasach wieku	106
3.5. Analiza zmiany poziomu melaniny w poszczególnych fototypach skóry, wg skali Fitzpatricka	108
3.6. Ocena zadowolenia z efektów aplikacji kremu niwelującego przebarwienia skóry	109
3.6.1. Ocena satysfakcji pacjentek z <i>melasmą</i> , z rezultatów stosowania kremu rozjaśniającego przebarwienia skóry	110
3.6.2. Ocena satysfakcji pacjentek z <i>lentigo solaris</i> , z rezultatów stosowania kremu rozjaśniającego przebarwienia skóry	112
3.7. Niepożądane działanie kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego	113
3.8. Prezentacja efektu rozjaśniającego kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego u wybranych pacjentek	113
3.8.1. Pacjentka nr 1	114

3.8.2. Pacjentka nr 2.....	115
IV. Omówienie wyników i dyskusja	117
A. Część fitochemiczna	117
B. Część kosmetyczna.....	120
V. Wnioski.....	126
VI. Streszczenie	127
VII. Summary	129
VIII. Piśmiennictwo.....	131
IX. Spis rycin.....	146
X. Spis tabel.....	148
XI. Załączniki	150
1. Załącznik nr 1	150
2. Załącznik nr 2	151
3. Załącznik nr 3	152
4. Załącznik nr 4	154
5. Załącznik nr 5	158
6. Załącznik nr 6	164

WSTĘP

Przebarwienia skóry są jednym z częstszych problemów kosmetycznych. Większość z nich to przebarwienia nabyte, powstałe wskutek zaburzeń syntezy melaniny i nieprawidłowego jej rozmieszczenia w skórze. Zmiany te mogą być następstwem działania promieniowania słonecznego, substancji fototoksycznych i fotoalergizujących, zawartych w preparatach farmaceutycznych lub kosmetycznych, jak również objawem wielu chorób ogólnoustrojowych, stanów zapalnych i zaburzeń hormonalnych. Nasilają się one w różnym wieku i stają się przyczyną obniżenia jakości życia wielu osób, przeważnie z przyczyn estetycznych oraz psychologicznych [1, 2].

Jednym z podmiotów badań współczesnej kosmetologii jest opracowanie skutecznych produktów kosmetycznych, zawierających składniki o właściwościach rozjaśniających. Jak dotąd, najchętniej wykorzystywano w tym celu hydrochinon. Posiada on udokumentowaną skuteczność w usuwaniu przebarwień skóry, jednakże ze względów bezpieczeństwa na terenie Stanów Zjednoczonych, Europy i Japonii wprowadzono liczne ograniczenia w jego stosowaniu. Dotyczą one w szczególności preparatów kosmetycznych przeznaczonych do pielęgnacji twarzy. W następstwie tego, podmiotem wielu badań prowadzonych przez kosmetologów, dermatologów, farmakologów, a także fitochemików staje się ocena skuteczności różnych substancji wybielających. Podejmowane są próby ich zastosowania w produktach kosmetycznych, przeznaczonych do pielęgnacji skóry z zaburzeniami barwnikowymi [3, 4].

Wśród związków o udokumentowanych właściwościach rozjaśniających wymienia się pochodną hydrochinonu - arbutynę (4'-hydroksyfenylo- α,β -D-glukopiranozyd). Wiele prac badawczych potwierdziło wybielający mechanizm jej działania, poprzez hamowanie aktywności tyrozynazy (E.C. 1.1.14.18.1), kluczowego enzymu procesu syntezy melaniny. W przeprowadzonych dotychczas próbach potwierdzono wysoką skuteczność arbutyny w usuwaniu przebarwień skóry. Stosowana zewnętrznie w takich zaburzeniach barwnikowych skóry jak: piegi (*ephelides*), ostuda (*melasma*), plamy soczewicowate (*lentigines*) czy znamiona barwnikowe, okazała się substancją bezpieczną, niewykazującą działania drażniącego i cytotoksycznego, w przeciwieństwie do stosowanego dotąd powszechnie hydrochinonu. Efektywność w rozjaśnianiu i wyrównywaniu barwy skóry w zaburzeniach hiperpigmentacyjnych, związanych z nadaktywnością melanocytów pozwala na szersze jej wykorzystanie jako skutecznego i bezpiecznego związku w usuwaniu przebarwień skóry [5, 6].

Arbutyna stosowana w dermokosmetykach o właściwościach rozjaśniających występuje w postaci czystego związku lub wyciągu roślinnego. Pozyskiwana może być zarówno w procesie enzymatycznych syntez, jak i bezpośrednio z surowca roślinnego. Wyróżnia się dwie anomeryczne formy arbutyny używane jako składnik kosmetyczny: α - otrzymywaną w sposób syntetyczny i β - izolowaną z części naziemnych roślin [7].

Bogatym źródłem naturalnej arbutyny są gatunki należące do różnych rodzin botanicznych. Gatunkiem szczególnie często wykorzystywanym w produkcji preparatów kosmetycznych o właściwościach rozjaśniających jest mącznica lekarska (*Arctostaphylos uva ursi* L.), będąca w Polsce gatunkiem ściśle chronionym. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nowych źródeł naturalnej arbutyny, wśród innych gatunków botanicznych.

Wstępne analizy fitochemiczne ziela sierpika pięciolistnego (*Serratula quinquefolia* M.B.) wykazały obecność arbutyny, jako związku dominującego w tym gatunku [8]. Fakt ten zachęca do podjęcia dalszych, szczegółowych badań tego gatunku pod kątem możliwości pozyskania nowego źródła naturalnej arbutyny i nowego surowca roślinnego do stosowania w formie wyciągu.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka rodzaju *Serratula* L.

1.1. Opis botaniczny

Rodzaj *Serratula* L. obejmuje od 50 do 70 gatunków roślin rozpowszechnionych na terenie Eurazji oraz Afryki Północnej. Są to rośliny wieloletnie o wzniesionej, rozgałęziającej się w górnej części łodydze, wyposażonej w nieuzbrojone liście. Kwiatostan groniasty prosty typu baldachogrona, o strukturze wiechowatej, rzadziej zwartej, z pojedynczymi lub podwójnymi główkami kwiatu. Kwiatostany na ogół z kwiatami obupłciowymi, niekiedy rozdzielнопłciowymi. Listki okrywają przeważnie bez przydatków na szczycie. W koszyczkach kwiaty rurkowate, z brakującą lub krótką nitką pręcika, na której osadzone są pylniki. Owocem mała, nieowłosiona, gładka niełupka. Powstający z kielicha kwiatowego puch kwiatowy złożony z kilku szeregów wolnych, drobnoząbkowanych lub pierzastych włosków [9, 10, 11].

Nowe badania botaniczne, fitochemiczne oraz filogenetyczne nad rodzajami *Serratula* i *Klasea* Cass. pozwalają na wyszukanie nowych cech diagnostycznych różnicujących oba rodzaje. Systematyka *Klasea* budzi liczne kontrowersje i staje się przyczyną ożywionej dyskusji prowadzonej przez botaników, z których część jest w dalszym ciągu zwolennikami tradycyjnej klasyfikacji. Jednak coraz częściej jest akceptowane nowe pojęcie rodzaju *Klasea*, uważanego wcześniej za sekcję *Serratula*, co sugeruje konieczność przeniesienia licznych gatunków, w tym także *S. quinquefolia* z rodzaju *Serratula* do rodzaju *Klasea* [8, 11, 12, 13].

1.2. Naturalne związki w gatunkach *Serratula* L.

Gatunki rodzaju *Serratula* L. są bogatym, naturalnym źródłem związków steroidowych oraz glikozydów fenolowych.

Liczne prace badawcze z zakresu fitochemii wykazały w gatunkach tego rodzaju obecność związków steroidowych, należących do grupy ekdysonów. Wśród nich wymieniane są: 20-hydroksyekdyson, integristeron A, 2-dezoksy-20-hydroksyekdyson, inokosteron α -ekdyson czy ponasteron A. Przeprowadzone do tej pory badania potwierdziły istnienie fitoekdysonów w następujących gatunkach rodzaju *Serratula* L.: *S. algida*, *S. chinensis*, *S. centauroides*, *S. coronata*, *S. inermis*, *S. komarovii*, *S. lyratifolia*, *S. procumbens*, *S. quinquefolia*, *S. sogdiana*, *S. strangulata*, *S. tinctoria*, *S. wolffii*, *S. xeranthemoides* [14].

Związki te posiadają wiele biologicznych aktywności. Są skutecznymi środkami antyoksydacyjnymi, antybakteryjnymi, przeciw pasożytniczymi, immunomodulującymi

i antykancerogennymi. Ekdysony, a wśród nich 20-hydroksyekdyson, znalazły zastosowanie jako związki farmakologiczne wykorzystywane w leczeniu zaburzeń pracy układu sercowo – naczyniowego, centralnego układu nerwowego i układu rozrodczego. Wykorzystywane są w terapii zaburzeń funkcji seksualnej oraz w celu stymulacji spermatogenezy u pacjentów ze zdiagnozowaną niepłodnością. Na podstawie testów przeprowadzonych z udziałem zwierząt laboratoryjnych udowodniono, że takie fitoekdysteroidy jak: ekdysteron, sileneozyd A, turkesteron podwyższają poziom erytrocytów i hemoglobiny we krwi, stymulują erytropoezę, a także wpływają na regenerację uszkodzonych erytrocytów. Natomiast zastosowane u szczurów z nadciśnieniem tętniczym wpływają na zmniejszenie lepkości krwi oraz wzrost stężenia fibrynogenu i agregacji erytrocytów [15, 16, 17, 18].

W gatunkach rodzaju *Serratula* L. znajdowano także związek z zupełnie innej grupy chemicznej. Z części naziemnych takich gatunków jak: *S. erucifolia*, *S. gmelini*, *S. radiata* i *S. sogdiana* wyizolowano glukozyd fenolowy – arbutynę [19, 20].

Wstępne badania wykazały, że związek ten obecny jest również w sierpiku pięciolistnym [8]. Skutkiem tego wymieniony gatunek stał się przedmiotem dalszych badań. Liście sierpika pięciolistnego zostały wybrane jako surowiec do wykonania standaryzowanego wyciągu i pozyskania arbutyny, w celu przeprowadzenia prób kosmetycznych z udziałem ochotników.

2. Charakterystyka *Serratula quinquefolia* M.B.

2.1. Systematyka gatunku

KRÓLESTWO: *Eucaryota*

PODKRÓLESTWO: *Phytobionta*

GROMADA: *Teleomorphyta (=Embryophyta)*

PODROMADA: *Magnoliophytina (=Angiospermae)*

KLASA: *Magnoliopsida (=Dicotyledones)*

PODKLASA: *Asteridae*

NADRZĄD: *Asteranae*

RZĄD: *Asterales*

RODZINA: *Asteraceae (=Compositae)*

PODRODZINA: *Linguliflorae (=Lactucoideae, Cichorioideae)*

PLEMIĘ: *Cardueae*

PODPLEMIĘ: *Centaureinae*

RODZAJ: *Serratula* (Flora USSR)

Klasea (Martens)

GATUNEK: *Serratula quinquefolia* (Species Plantarum) = *Klasea quinquefolia* (Martens)

2.2. Opis botaniczny

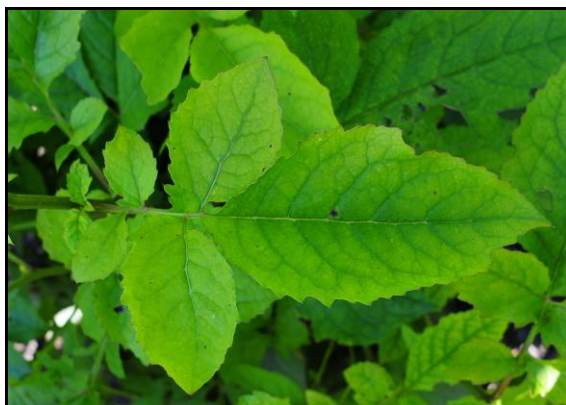
Sierpik pięciolistny (*Serratula quinquefolia*) został po raz pierwszy sklasyfikowany i opisany przez Carla Ludwiga von Willdenowa i Friedricha Augusta Marshalla von Biebersteina w "Species Plantarum" w roku 1803. Dokładniejsze opisy morfologiczne gatunku znajdujemy w piśmiennictwie dopiero w drugiej połowie XX wieku: „*Flora USSR*” (Borisova 1963) i „*Flora of European part of the former USSR*” (Tsherepanov 1994) [8, 13].

Sierpik pięciolistny roślina wieloletnia, przypominająca pokrojem gatunek *Serratula tinctoria* L., ale o znacznie większych rozmiarach. Jest byliną silnie rozgałęzioną, dorastającą do 2 metrów wysokości, średnio osiągającą wysokość od 50 do 120 cm (Ryc.1).



Rycina 1. Pokrój sierpika pięciolistnego.

Sierpik pięciolistny jest rośliną lekko omszoną lub prawie nagą, o nieparzystopierzastych, pojedynczo do podwójnie parzystych liściach złożonych z 3 do 5 listków, o kształcie jajowato – podłużnym lub podłużno – lancetowatym (Ryc.2). Dolne liście są ogonkowe, o jajowatych lub podłużnych, piłkowanych, spiczastych i szerokich blaszkach, wydłużonych ku nasadzie. Na rozgałęzieniach łodygi znajdują się nieliczne liście o blaszkach, od eliptycznych do podługowato – lancetowatych.



Rycina 2. Liście sierpika pięciolistnego.

Liczne koszyczki kwiatowe położone są na ulistnionych pędach kwiatowych, o szerokości od 1 do 1,5 cm. Łuski okrywy koszyczka liczne, ściśle i dachówkowato przylegające, obłonione, ostro zakończone, na brzegu wywinięte i orzęsione, z ciemnymi smugami od spodu, zewnętrzne jajowate, środkowe lancetowate, wewnętrzne wydłużone, na szczycie kutnerowate, niemal ząbkowane. Wnętrze koszyczka kwiatowego różowe, o długości około 17 mm. Podstawa korony jest cienko-rurkowata o długości 9 mm. Płatki wydłużone o długości 5 mm. Rurka pylnika niemal równa koronie, nitki pręcików brodawkowato omszone, dolne wyrostki pylników o długości mniejszej aniżeli 1 mm, pylniki na czubku wolne. Słupek wyższy od korony, o dwupłatkowym krótkim znamieniu (Ryc.3). Nasiona podłużne o długości około 5 mm, niemal spłaszczone, nieco zwężone ku nasadzie, na górze lekko ściągnięte, bruzdkowane. Włoski puchu lekko czerwone, opadające, trochę dłuższe od niełupki [21].



Rycina 3. Kwiatostan sierpika pięciolistnego.

Naturalnym siedliskiem występowania sierpika pięciolistnego są tereny leśne na wysokości 300 – 1000 m n.p.m., głównie na terenie Kaukazu. Gatunek ten występuje także powszechnie na terenie Armenii, Azerbejdżanu, Grecji, Iranu, Turcji i Rosji [8, 13, 21].

Kwitnienie gatunku przypada na okres od czerwca do października [21].

3. Arbutyna

3.1. Występowanie

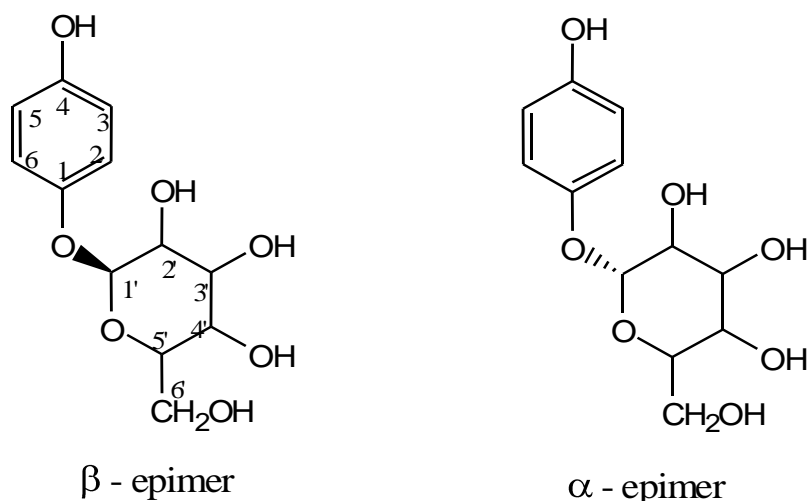
Arbutyna występuje w gatunkach roślin należących do różnych rodzin botanicznych. Związek ten znaleziono w: liściach mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva-ursi* Sprengel, *Ericaceae*), liściach bergenii grubolistnej (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch, *Saxifragaceae*), liściach borówki brusznicy (*Vaccinium vitis idaea* L., *Ericaceae*), liściach gruszy (*Pyrus communis* L., *Rosaceae*), kwiatach wrzосу (*Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Ericaceae*), liściach kaliny (*Viburnum opulus* L., *Caprifoliaceae*), zielu majeranku (*Majorana hortensis* Moench, *Lamiaceae*), zielu lebiodki (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*), owocach korkowca chińskiego (*Phellodendron chinese* C.K. Schneider, *Rutaceae*) [22, 23] oraz w wymienionych w rozdziale 1.2. (str.11) gatunkach rodzaju *Serratula* (*Asteraceae*).

Największe stężenie arbutyny odnotowano w liściach bergenii grubolistnej (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch), waha się ono między 15 a 20 % [24].

Wśród leczniczych surowców zawierających arbutynę wymieniane są: liść mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*), od 3 do 12% arbutyny, liść borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium*) od 5 do 7% arbutyny oraz rzadziej kwiat wrzосу (*Callunae flos*) z małą zawartością arbutyny, około 0,5% [22, 25].

3.2. Budowa i właściwości fizyko - chemiczne

Arbutyna (glukozyd hydrochinonu, 4'-hydroksyfenylo- α,β -D-glukopiranozyd) jest organicznym związkiem chemicznym, należącym do grupy glikozydów fenolowych. Zbudowana jest z cząsteczki D-glukozy i cząsteczki hydrochinonu połączonych wiązaniem O-glikozydowym. W jego wytworzeniu biorą udział: anomeryczny atom węgla (C¹) cząsteczki D-glukozy oraz znajdująca się przy nim grupa hydroksylowa cząsteczki hydrochinonu. Obecne w cząsteczce arbutyny wiązanie glikozydowe przybiera konfigurację α lub β (Ryc.4). Sumaryczny wzór arbutyny - C₁₂H₁₆O₇.



Rycina 4. Struktura chemiczna α,β -glukozydu hydrochinonu.

Epimery arbutyny posiadają zbliżone właściwości fizyko-chemiczne (Tab.1).

Tabela 1. Właściwości fizyko – chemiczne α - i β -arbutyny [26].

	α -arbutyna	β -arbutyna
Wzór sumaryczny	$C_{12}H_{16}O_7$	$C_{12}H_{16}O_7$
Masa cząsteczkowa (g/mol)	272,25	272,25
Punkt topnienia ($^{\circ}C$)	200 - 201	199,5 - 200
Rotacja optyczna	+ 179,8 ⁰	- 60,3 ⁰
Maksimum absorpcji UV (nm)	282	282

Arbutyna ma postać białego proszku lub krystalicznych igieł. Jest związkiem higroskopijnym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie, octanie etylu, acetonie oraz alkoholu metylowym i etylowym. Nie rozpuszcza się natomiast w chloroformie, benzenie, eterze naftowym, chlorku metylenu i heksanie. Pozostaje nietrwała w środowisku kwasowym (pH=2,0), gdzie ulega łatwo hydrolizie do hydrochinonu i D-glukozy. Optymalnym pH dla jej działania antybakteryjnego i przeciwzapalnego jest odczyn zasadowy (pH=8,0).

Komitet Naukowy ds. Produktów Konsumenckich przy Komisji Europejskiej wydał w 2008 roku opinię na temat β -arbutyny. Wykazano w niej, że β -arbutyna:

- jest nietrwała w środowisku kwasowym (pH=2,0), gdzie ulega szybkiej hydrolizie do hydrochinonu i D-glukozy;

- w produktach kosmetycznych jest związkiem trwałym, jej zawartość po upływie 6 miesięcy i 4 lat pozostaje niezmienną, a ilość hydrochinonu, powstałego w wyniku jej hydrolizy utrzymuje się na poziomie poniżej 1 ppm;
- pozostaje stabilna przy przechowywaniu w opakowaniach, wystawionych na działanie promieniowania słonecznego;
- może być wykorzystywana do formulacji kosmetyków, których pH waha się w przedziale od 4,0 do 8,0 [27].

Arbutyna jest związkiem wysoce hydrofilnym, posiadającym niski logarytm współczynnika podziału, $\log P = -1,49$ [28]. Nie wykazuje znaczącej rozpuszczalności w lipidach, wskutek czego posiada niską zdolność penetracji warstwy rogowej naskórka (*stratum corneum*), rezultatem czego jest trudność jej dostarczenia do miejsca działania – melanocytów, znajdujących się w warstwie podstawnej naskórka.

3.3. Zastosowanie lecznicze surowców roślinnych zawierających arbutynę

Wśród roślinnych surowców leczniczych, zawierających w swym składzie glikozyd fenolowy - arbutynę, są: liść mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*) i liść borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium*). Oba znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu infekcji dróg moczowych, przewlekłego zapalenia pęcherza moczowego oraz kamicy nerkowej [29, 30]. Liść mącznicy lekarskiej jest wymieniany jako środek odkażający drogi moczowe w farmakopeach narodowych wielu krajów świata [29].

3.3.1. *Arctostaphylos uvae ursi folium* - *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Sprengel, *Ericaceae*

Mącznica lekarska jest zimozieloną krzewinką, rosnącą w suchych borach sosnowych oraz na bogatych w próchnicę glebach torfowych, głównie na terenie Europy, Azji i Ameryki Północnej. Na terenie Polski gatunek ten objęty jest ścisłą ochroną. Występuje w północnej części niżu, rzadko w rejonach południowych i górskich [29, 31, 32].

Mącznica lekarska posiada długą tradycję użytkowania medycznego. Po raz pierwszy została wykorzystana jako środek ściągający już za czasów Galena. Późniejsze opisy jej właściwości leczniczych znajdujemy w starej celtyckiej księdze leczniczej *Meddygon of Myddfai* (1861). Przez wieki wykorzystywana była jako środek odkażający drogi moczowe. Współczesna medycyna zaleca ją jako środek o działaniu antyseptycznym, antibakteryjnym i przeciwzapalnym, m.in. w leczeniu infekcji dróg moczowych, przewlekłym zapaleniu pęcherza moczowego i kamicy nerkowej [29, 30].

Surowcem leczniczym są liście (*Uvae ursi folium*), zbierane późną jesienią, wysuszone w warunkach naturalnych, w cieniu i w przewiewie lub w suszarniach w temperaturze 30°C [33].

Składnikami czynnymi liści mącznicy lekarskiej są glikozydy fenolowe: arbutyna, metyloarbutyna, galoiloarbutyna oraz hydrochinon i metylohydrochinon. Według FP VI surowiec zawiera nie mniej niż 8% pochodnych hydrochinonu, w przeliczeniu na arbutynę [34].

Według innych źródeł liście mącznicy lekarskiej zawierają od 6-18% (zwykle 7-9%) pochodnych hydrochinonu, głównie w postaci arbutyny oraz małej ilości metyloarbutyny (do 4%) i piceozydu. W liściach obecne są także wolne aglikony arbutyny: hydrochinon i metylohydrochinon. Pozostałymi składnikami czynnymi o znaczeniu leczniczym są: garbniki hydrolizujące - pochodne kwasu galusowego w ilości od 6-20%; kwasy fenolowe: kwas gallusowy, p-kumarowy, syringowy w ilości około 0,25%; flawonoidy z grupy flawonoli w postaci glikozydu: kwercetyny, kemferolu i mirycetyny; triterpeny: kwas ursolowy i uwaol w ilości 0,4-0,8% [29].

W licznych badaniach *in vitro* potwierdzono właściwości antybakteryjne liści mącznicy lekarskiej. Surowiec okazał się skuteczny w zwalczaniu zakażenia spowodowanego: *Proteus viulgaris*, *Escherichia coli*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus strains*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* [29, 35, 36].

Antybakteryjne właściwości liści mącznicy lekarskiej są związane z aktywnością produktów hydrolizy arbutyny – hydrochinonu. Po spożyciu surowca arbutyna jest hydrolizowana przez β -glukozydazę do aglikonu, który tworzy z kwasem glukuronowym lub kwasem siarkowym estrowe pochodne, ulegające ponownemu rozkładowi w środowisku zasadowym moczu (pH=8). Powstałe w tym środowisku związki wykazują silne działanie antybakteryjne. Maksymalne ich działanie obserwowane jest po upływie 3-4 godzin od momentu podania surowca. Istotnym warunkiem jego skutecznego działania jest zapewnienie słabo zasadowego odczynu moczu poprzez podawanie wodorowęglanu sodu oraz stosowanie odpowiedniej diety roślinnej [29, 33].

Arbutyna wydalana jest przez nerki, głównie w postaci metabolitów: glukuronianu hydrochinonu i siarczanu hydrochinonu. Przeprowadzone badania wykazały, że metabolity przyjętej doustnie arbutyny są wydalane z organizmu zaledwie po upływie 4 godzin [36, 37]. W zależności od formy podania ekstraktu z liści mącznicy lekarskiej – w postaci tabletek lub

roztworu wodnego arbutyny, całkowite stężenie metabolitów w moczu wahało się odpowiednio w granicach 66,7% i 64,8% [38].

W późniejszych badaniach udowodniono, że zastosowana doustnie arbutyna jest usuwana z organizmu już w 50% po upływie 4 godzin, a w 75% po upływie zaledwie 24 godzin od momentu jej zażycia [37].

W badaniach *in vivo* wskazano również na działanie przeciwzapalne liści mącznicy lekarskiej. Wykazano, że arbutyna działa synergistycznie z prednizolonem, deksametazonem i indometacyną nasilając ich działanie w hamowaniu obrzęków powstałych wskutek reakcji alergicznych typu IV. W innych badaniach udowodniono, że arbutyna stosowana w małych dawkach (10 mg/kg) nie posiada właściwości przeciwzapalnych, wykorzystana natomiast w dawce (50 mg/kg) wykazuje słabą aktywność przeciwzapalną [39, 40, 41, 42].

Liście mącznicy lekarskiej jako środek leczniczy są zażywane najczęściej w postaci kruszonych liści lub pudru, naparów, maceratów, wyciągów płynnych i suchych, zawierających od 400-840 mg pochodnych hydrochinonu, w przeliczeniu na arbutynę, na dzień. Nie powinny być stosowane dłużej niż tydzień oraz nie częściej niż 5 razy w roku, ze względu na obecne w surowcu taniny (20%), które mogą powodować podrażnienie błony śluzowej żołądka, glukozurię i uszkadzać wątrobę. Liście mącznicy lekarskiej nie powinny być wdrażane w niewydolności nerek, dyspepsji, a także u kobiet w ciąży i w okresie laktacji, ze względu na potencjalne ryzyko działania toksycznego oraz mutagennego hydrochinonu [22, 29, 43, 44].

Obecnie liście mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*) są coraz częściej zastępowane przez liście borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium*), które wykazują podobne, choć nieco słabsze działanie [22].

3.3.2. *Vitis idaeae folium* - *Vaccinium vitis idaea* L. *Ericaceae*

Borówka brusznica jest zimozieloną, niską krzewinką, występującą w Europie, Azji oraz Ameryce Północnej. W Polsce rozpowszechniona jest w suchych, iglastych lasach, na wrzosowiskach oraz w górach. Wymaga stanowisk słonecznych oraz próchniczo – kwaśnej gleby [31].

Surowcem leczniczym są liście (*Vitis idaeae folium*), zbierane późną jesienią, wysuszone w cieniu i w przewiewie lub w suszarniach w temperaturze 30-60°C [33].

Liście borówki brusznicy zawierają glikozydy fenolowe, głównie arbutynę, w ilości 5-7%, kawoiloarbutynę, pirozyd oraz wolny hydrochinon (około 1%) [22, 32, 33]. Głównym składnikiem czynnym jest arbutyna. Według FP VI surowiec zawiera nie mniej niż 4% pochodnych hydrochinonu, w przeliczeniu na arbutynę [33]. Pozostałymi składnikami

czynnymi są: garbniki katechinowe w ilości około 10%; flawonoidy z grupy flawonoli w postaci glikozydu: kwercetyny i mirycetyny; triterpeny, w tym kwas ursolowy oraz sole mineralne ze znaczną zawartością magnezu [31, 33].

Liście borówki bruszniczy stosowane są w leczeniu infekcji dróg moczowych. Zawarte w nich glikozydy fenolowe, a zwłaszcza aglikon arbutyny - hydrochinon działa odkażająco na drogi moczowe, podobnie jak w liściach mącznicy lekarskiej. Wyciągi z tego surowca są wykorzystywane pomocniczo w stanach zapalnych nerek, przewodów moczowych, kamicy nerkowej i dnie moczanowej [31, 33].

Występujące w liściach borówki bruszniczy garbniki wykazują działanie ściągające, głównie na błony śluzowe układu pokarmowego, dlatego też używane są często w leczeniu nieżytów przewodu pokarmowego i biegunkach [22, 31].

Liście borówki bruszniczy, dzięki obecności tanin, posiadają również działanie antyoksydacyjne i antybakteryjne. Okazały się skuteczne w zwalczaniu infekcji wywołanych patogenami wywołującymi choroby przyzębia: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [45].

Bezpieczeństwo stosowania liści borówki bruszniczy jest takie same jak liści mącznicy lekarskiej. Długotrwałe ich użytkowanie jest przeciwwskazane ze względu na obecność hydrochinonu, który wykazuje działanie mutagenne. Aplikacja w dużych dawkach przez długi okres czasu może prowadzić do wystąpienia objawów zatrucia hydrochinonem [31].

3.4. Zastosowanie w kosmetologii

Arbutyna jest uznanym składnikiem kosmetycznym przeznaczonym do rozjaśniania przebarwień i wyrównywania barwy skóry. W licznych pracach badawczych udowodniono jej wysoką skuteczność w usuwaniu miejscowych zmian skórnych, wywołanych zmianami zapalnymi oraz wzmożoną aktywnością melanocytów. W doświadczeniach tych wykazano, że arbutyna jest związkiem wysoce bezpiecznym i efektywnym w eliminowaniu zmian barwnikowych takich jak: piegi (*ephelides*), ostuda (*melasma*) czy plamy soczewicowate (*lentigines*) [5, 6, 46, 47].

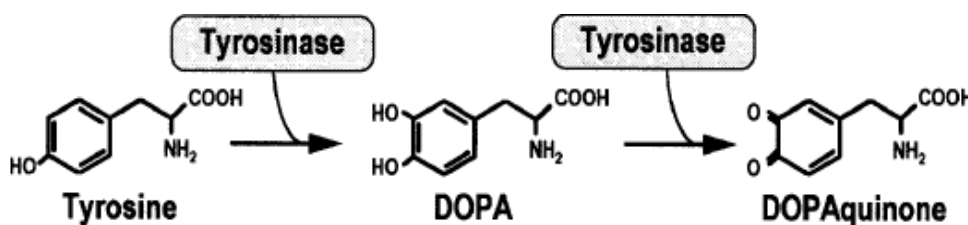
Pod koniec ubiegłego stulecia poznano szczegółowy mechanizm działania arbutyny. Początkowo sugerowano aż dwie drogi jej działania: hamowanie aktywności tyrozynazy oraz tłumienie ekspresji i syntezy tyrozynazy. Przeprowadzone później analizy wykazały jednak, że ten drugi mechanizm wpływania na przebarwienia skóry ma mniejsze znaczenie, gdyż arbutyna nie blokuje ekspresji genu tyrozynazy, ani nie zakłóca naturalnego wzrostu komórek melanocytów. Dlatego też w dalszych eksperymentach skupiano uwagę na ocenie aktywności

katalitycznej tyrozynazy. Potwierdziły one, że arbutyna hamuje jej aktywność poprzez zmniejszenie biosyntezy melaniny w melanocytach [5, 48].

Tyrozynaza (E.C.1.1.1.14.18.1) jest kluczowym enzymem procesu biosyntezy melaniny. Odpowiada ona za katalizę dwóch pierwszych reakcji syntezy:

- hydroksylację tyrozyny do 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-alaniny (DOPA),
- oksydację DOPA do dopachinonu, czyli hydroksylację monofenolu i przekształcenie *o*-difenolu do *o*-chinonu (Ryc.5) [49, 50, 51, 52].

Posiada dwa miejsca aktywne: jedno dla wiązania L-tyrozyny, drugie dla wiązania L-DOPA [5, 53]. Tyrozynaza złożona jest z trzech domen białkowych. W domenie środkowej znajduje się 6 reszt histydyny, odpowiedzialnych za wiązanie jonów miedzi. Każdy jon miedzi tworzy w miejscu aktywnym enzymu kompleksy z trzema resztami histydyny, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu reakcji enzymatycznej [54, 55].



Rycina 5. Etapy syntezy melaniny, katalizowane przez tyrozynazę [56].

Arbutyna hamuje przemianę obu substratów, zarówno L-tyrozyny, jak i L-DOPA. W badaniach związanych z oceną aktywności ludzkiej tyrozynazy wykazano, że współzawodniczy ona z L-tyroziną o miejsce katalityczne enzymu, pełniąc funkcję inhibitora kompetencyjnego. W przypadku utleniania L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny do L-dopachinonu hamuje natomiast reakcję w sposób niekompetencyjny. W obu przypadkach oddziałuje wzajemnie ze znajdującymi się w miejscu aktywnym enzymu jonami miedzi [6, 57].

Na początku lat 90-tych wybielający mechanizm działania arbutyny nie był dokładnie znany. W licznie przeprowadzonych badaniach oceniano początkowo, w jaki sposób arbutyna hamuje aktywność tyrozynazy mysiej oraz tyrozynazy z grzybów (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange)). Początkowo uzyskane wyniki badań wskazywały, że β -arbutyna (w stężeniu 24 mM) hamuje aktywność tyrozynazy z grzybów w mechanizmie inhibicji kompetencyjnej [47]. W roku 1995 zaobserwowano natomiast odmienny od poprzednio prezentowanego mechanizmu sposób hamowania aktywności tyrozynazy - inhibicję niekompetencyjną. W doświadczeniu tym, β -arbutyna unieczynniała zarówno mysia, jak i pochodzącą z grzybów

tyrozynazę (*A. bisporus*). Ustalono, że β -arbutyna (w stężeniu 8,4 mM) hamowała tyrozynazę pochodzącą z grzybów podczas gdy α -arbutyna hamowała jedynie aktywność tyrozynazy mysiej, w mechanizmie inhibicji mieszanej, 10-cio krotnie silniej aniżeli anomer β [58, 59, 60]. Obecnie przyjmuje się, że β -arbutyna działa według mechanizmu inhibicji kompetencyjnej i współzawodniczy o miejsce aktywne enzymu z substratem reakcji [5]. Dzieje się tak również w przypadku tyrozynazy ludzkiej [61, 62].

Maeda i Fukuda wskazali, że β -arbutyna hamuje utlenianie L-tyrozyny poprzez unieczynnienie tyrozynazy. Współzawodniczy o miejsce aktywne enzymu, w mechanizmie inhibicji kompetencyjnej, nie ulegając jednocześnie oksydacji [5], chociaż β -arbutyna ulega powolnemu utlenieniu, jako substrat monofenolowy, a obecność kofaktora (L-DOPA), wpływa znacząco na przyspieszenie tej reakcji. Sugerowany, rozjaśniający mechanizm działania β -arbutyny jest możliwy, gdy w komórkach melanocytów dostępność tlenu i kofaktora L-DOPA jest ograniczona [63, 64].

β -arbutyna jest naturalną, obecną w liściach różnych roślin, pochodną hydrochinonu, wykazującą właściwości wybielające. α -arbutyna jest natomiast składnikiem syntetycznym, pozyskiwanym na drodze enzymatycznych syntez z hydrochinonu i węglowodanów [7]. Efektywność α - i β -arbutyny, jako inhibitorów aktywności tyrozynazy, została potwierdzona w wielu doświadczeniach naukowych. Wyniki badań dowodzą, że α - i β -arbutyna działają hamująco m.in. na tyrozynazę: ludzką, mysią, a także na tyrozynazę z grzybów (*A. bisporus*) (Tab.2). Sekwencje aminokwasów ludzkiej tyrozynazy i tyrozynazy pochodzącej z grzybów są zgodne zaledwie w 23%, podczas gdy homologia sekwencji pomiędzy tyrozynazą mysią i ludzką wynosi aż 82% [26].

Tabela 2. Hamowanie aktywności tyrozynaz przez α - i β -arbutynę.

	Tyrozynaza ludzka	Tyrozynaza mysia	Tyrozynaza z grzybów (<i>Agaricus bisporus</i>)
α - arbutyna	+	+	+
β - arbutyna	+	+	+

Początkowo w doświadczeniach oceniano skuteczność α - i β -arbutyny, jako inhibitorów aktywności tyrozynazy mysich kultur komórek melanoma B16 i tyrozynazy pochodzącej z grzybów (*A. bisporus*) [26].

W badaniach przeprowadzonych na kulturach mysich komórek melanoma B16 dowiedziono, że β -arbutyna nie ulega hydrolizie do wolnego hydrochinonu, a mimo to

wykazuje działanie rozjaśniające. Hamuje aktywność tyrozynazy, a tym samym zmniejsza zawartość melaniny w komórkach, średnio o 39%, w porównaniu z próbą kontrolną. Nie wykazuje hamującego wpływu na wzrost mysich komórek melanoma B16 w stężeniu 5×10^{-5} M. Wyniki badania dowodzą, że β -arbutyna hamuje syntezę melaniny poprzez hamowanie aktywności tyrozynazy i nie ma wpływu na eliminację komórek mysich melanocytów. Wyniki doświadczenia sugerują także, że hydrochinon nie jest czynnikiem odpowiedzialnym za wybielający efekt działania β -arbutyny [65].

Udowodniono też, że β -arbutyna w stężeniu 1×10^{-3} M nie hamuje znacząco ekspresji mRNA tyrozynazy, a wpływa na obniżenie aktywności tyrozynazy do poziomu 87%. Zastosowana w stężeniu pomiędzy 1×10^{-5} a 1×10^{-3} M nie zmniejsza żywotności komórek ludzkich melanocytów, podczas gdy w stężeniu 5×10^{-3} obniża ich żywotność do poziomu 74%. Na podstawie pomiarów poziomu eumelaniny, przeprowadzonych za pomocą elektronowego rezonansu spinowego (ESR) dowiedziono, że β -arbutyna jest odpowiedzialna za hamowanie syntezy melaniny. Blokowanie początkowych etapów melanogenezy, a ściślej mówiąc aktywności ludzkiej tyrozynazy, oparte jest, jak wcześniej wspomniano, na mechanizmie inhibicji kompetencyjnej [5].

W późniejszych badaniach przeprowadzonych na kulturach ludzkich melanocytów dowiedziono, że β -arbutyna, w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, hamuje syntezę melaniny średnio o 7 i 20%, po upływie odpowiednio 3 i 5 dni, w porównaniu z grupą kontrolną. Obniżenie poziomu syntezy melaniny koreluje z blokowaniem aktywności tyrozynazy i polimerazy DHICA (kwasu 5,6-dihydroksyindolo-2-karboksyłowego). Zaobserwowano, że aktywność tyrozynazy jest hamowana średnio o 40-50% i 70-80%, po zastosowaniu β -arbutyny, odpowiednio w stężeniu 30 i 100 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto doświadczenie wykazało, że β -arbutyna w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ nie ogranicza wzrostu kultur ludzkich melanocytów, podczas gdy w stężeniu 300 $\mu\text{g/ml}$ jest dla nich toksyczna [6].

Dalsze badania dotyczące hamującego wpływu α - i β -arbutyny na aktywność ludzkiej tyrozynazy przeprowadzono m.in. z udziałem ludzkich komórek czerniaka złośliwego, HMV II (human malignant melanoma cells). W próbie użyto L-DOPA, jako substratu reakcji katalizowanej przez tyrozynazę. Wyniki badań wykazały, że α -arbutyna działa silniej na ludzką tyrozynazę aniżeli β -arbutyna. Hamowanie aktywności tyrozynazy na poziomie 50% (IC_{50}) przez α -arbutynę obserwowano już przy stężeniu 2,1 mM, a w przypadku β -arbutyny dopiero przy stężeniu 30 mM [7]. Uzyskane wyniki doświadczenia zasugerowały, że efektywniejszym składnikiem rozjaśniającym jest α -arbutyna [66].

W badaniach oceniających hamujący wpływ na syntezę melaniny, z wykorzystaniem ludzkich komórek czerniaka złośliwego (HMV II) i trójwymiarowego modelu skóry ludzkiej wykazano, że α -arbutyna, zastosowana w stężeniu poniżej 1 mM, nie hamuje wzrostu komórek HMV II. Stosowana w stężeniu 0,5 mM przyczynia się do zmniejszenia syntezy melaniny do poziomu 76%, w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki badań sugerują, że α -arbutyna wykazuje hamujący wpływ na syntezę melaniny, w stężeniu nietoksycznym dla komórek ludzkich melanocytów (≤ 1 mM). Ponadto w badaniu zaobserwowano, że aktywność tyrozynazy w komórkach HMV II, traktowanych 0,5 mM roztworem α -arbutyny, jest obniżona do poziomu 60%, w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy ekspresja mRNA tyrozynazy nie ulega znacząco zmianie. Ponownie udowodniono, że zmniejszenie syntezy melaniny w komórkach traktowanych α -arbutyną koreluje z hamowaniem aktywności tyrozynazy, a nie z blokowaniem wzrostu komórek lub ekspresji genu tyrozynazy. W doświadczeniu przeprowadzonym na trójwymiarowym modelu skóry ludzkiej zaobserwowano, że synteza melaniny jest obniżona do poziomu 70% i 40%, w porównaniu z grupą kontrolną, po zastosowaniu α -arbutyny odpowiednio w stężeniu 125 i 250 μ g. Nie odnotowano także znaczącego obniżenia żywotności komórek po zastosowaniu α -arbutyny w stężeniu 500 μ g. Uzyskane wyniki wskazują, że α -arbutyna jest efektywnym i bezpiecznym składnikiem rozjaśniającym, możliwym do wykorzystania przez przemysł kosmetyczny [67].

Działanie arbutyny jest ściśle uzależnione od jej stężenia. Stosowana w wyższych stężeniach może doprowadzić do paradoksalnego wzrostu pigmentacji. W doświadczeniu z udziałem kultur ludzkich melanocytów wykazano, że stężenie arbutyny w zakresie 0,5-0,8 mM zwiększa ilość melaniny w melanocytach, tym samym prowadzi do nasilenia przebarwienia skóry. W badaniu tym potwierdzono, że β -arbutyna w odpowiednich stężeniach obniża aktywność ludzkiej tyrozynazy oraz liczbę melanocytów. Wyniki próby wskazują, że β -arbutyna promuje syntezę melaniny oraz protein, a wzrost produkcji melaniny jest odzwierciedleniem indukcji enzymów uczestniczących w syntezie melaniny, za wyjątkiem tyrozynazy [68].

Skuteczność α - i β -arbutyny, jako inhibitora aktywności tyrozynazy, została potwierdzona w wielu badaniach naukowych. Zaobserwowano rozmaity stopień jej specyficzności i efektywności względem tyrozynazy ludzkiej, mysiej oraz tyrozynazy pochodzącej z grzybów (*A. bisporus*). Wykazano, że α - i β -arbutyna hamuje aktywność różnych tyrozynaz na poziomie 50%, w zależności od zastosowanego stężenia (Tab.3).

Tabela 3. Stężenia α - i β -arbutyny hamujące aktywność tyrozynaz na poziomie 50% (IC_{50}) [26].

	Tyrozynaza ludzka	Tyrozynaza mysia	Tyrozynaza z grzybów (<i>Agaricus bisporus</i>)
	IC_{50} (mM)	IC_{50} (mM)	IC_{50} (mM)
α - arbutyna	2,1 ^a	0,48 ^b	>10 ^c
β - arbutyna	> 30 ^a	4,8 ^b	8,4 ^c

^a [7], ^b [69], ^c [58]

Glikozylowane pochodne arbutyny charakteryzują się większą zdolnością hamowania aktywności tyrozynazy aniżeli arbutyna. W kilku pracach badawczych porównywano skuteczność inhibicji tyrozynazy ludzkiej przez α - i β -arbutynę oraz ich glikozylowanych pochodnych. Pochodne te otrzymywano z arbutyny oraz skrobi, w wyniku reakcji transglikozylacji, katalizowanej przez glukotransferazę cyklomaltodekstrynową z *Bacillus macerans*. Produktami reakcji były: 4-hydroksyfenylo- α -maltozyd (α -Ab- α -G1) oraz 4-hydroksyfenylo- α -maltotriozyd (α -Ab- α -G2). Oba produkty reakcji wykazały się wyższą aniżeli α -arbutyna zdolnością hamowania aktywności ludzkiej tyrozynazy. Ich stałe inhibicji (K_i) wynosiły odpowiednio 0,6 i 2,8 mM w porównaniu z arbutyną (0,2 mM). Pochodne, podobnie jak arbutyna, ograniczały aktywność tyrozynazy w mechanizmie inhibicji kompetencyjnej [69].

W podobnym badaniu na drodze enzymatycznej syntezy otrzymano inne glikozylowane pochodne arbutyny: 4-hydroksyfenylo- β -maltozyd (β -Ab- α -G1) oraz 4-hydroksyfenylo- β -maltotriozyd (β -Ab- α -G2). W porównaniu z β -arbutyną wykazywały się one wyższą zdolnością hamowania aktywności ludzkiej tyrozynazy, lecz okazały się słabszymi inhibitorami reakcji w porównaniu z α -arbutyną [7].

W świetle tych badań α -arbutyna oraz jej α -glikozylowane pochodne okazały się być silniejszymi inhibitorami ludzkiej tyrozynazy aniżeli β -arbutyna. Udowodniono jednak, że β -glikozylowane pochodne arbutyny wykazują się również dużą zdolnością hamowania aktywności tyrozynazy. Pochodne te otrzymywano, z arbutyny i celobiozy, w wyniku reakcji transglikozylacji, katalizowanej przez β -glukozydazę z *Thermotoga neapolitana*. Produktami tej reakcji były: β -D-glukozylo-(1 \rightarrow 6)-arbutyna, β -D-glukozylo-(1 \rightarrow 4)-arbutyna i β -D-glukozylo-(1 \rightarrow 3)-arbutyna. Najsilniejszym inhibitorem tyrozynazy z grzybów okazała się β -D-glukozylo-(1 \rightarrow 3)-arbutyna. Hamowała ona aktywność tyrozynazy w stężeniu IC_{50} =5 mM, silniej aniżeli β -arbutyna (IC_{50} =6 mM). Pozostałe pochodne: β -D-glukozylo-

(1→6)-arbutyna, β -D-glukozylo-(1→4)-arbutyna okazują natomiast mniejszą skuteczność w hamowaniu aktywności tyrozynazy, w porównaniu z β -arbutyną [70].

W doświadczeniach, w których oceniano skuteczność hamowania tyrozynazy ludzkiej potwierdzono, że α -arbutyna blokuje tyrozynazę skuteczniej aniżeli β -arbutyna. Glikozylowane pochodne α -arbutyny mają wyższą aniżeli α -arbutyna zdolność hamowania aktywności ludzkiej tyrozynazy, podczas gdy glikozylowane pochodne β -arbutyny są słabszymi inhibitorami reakcji w porównaniu z α -arbutyną. Natomiast w odniesieniu do β -arbutyny glikozylowane pochodne β -arbutyny wykazują się wyższą zdolnością hamowania aktywności ludzkiej tyrozynazy (Tab.4). Nie mniej jednak w przemyśle kosmetycznym wykorzystywane są oba epimery arbutyny.

Tabela 4. Porównanie skuteczności hamowania tyrozynazy ludzkiej przez anomery arbutyny i ich glikozylowane pochodne.

Rok badania /autor	Anomery, glikozylowane pochodne arbutyny	Materiał	Hamowanie aktywności tyrozyny % (stężenie)	Żywotność melanocytów % (stężenie)	Synteza melaniny % (stężenie)
1996 Maeda K. Fukuda M. [5]	β -arbutyna	kultury ludzkich melanocytów	50% (5×10^{-4} M)	74% (5×10^{-3} M)	
1998 Chakraborty A.K. Funasaka Y. [6]	β -arbutyna	kultury ludzkich melanocytów	40 - 50% (30 μ g/ml) 70 – 80% (100 μ g/ml)	brak wpływu (100 μ g/ml) cytotoksyczność (300 μ g/ml)	20% (100 μ g/ml)
2003 Sugimoto K. Nishimura T. [7]	α -arbutyna β -arbutyna β -Ab- α -G1 β -Ab- α -G2	HMV II* HMV II* HMV II* HMV II*	50% (2,1 mM) 50% (>30 mM) 50% (5,7 mM) 50% (6,1 mM)		
2004 Sugimoto K. Nishimura T. [67]	α -arbutyna α -arbutyna	HMV II* model ludzkiej skóry	60% (0,5 mM)	brak wpływu (≤ 1 mM)	76% (0,5 mM) 70% (125 μ g/ml) 40% (250 μ g/ml)
2005 Sugimoto K. Nomura K. [69]	α -Ab- α -G1 α -Ab- α -G2 α -arbutyna	HMV II* HMV II* HMV II*	50% (4,9 mM) 50% (13,9 mM) 50% (2,1 mM)		

*HMV II – human malignant melanoma cell (komórki ludzkiego czerniaka złośliwego).

Inną pochodną arbutyny wykazującą skuteczność w usuwaniu przebarwień skóry jest deoksyarbutyna (dA). W testach *in vivo* przeprowadzonych na przestrzeni ostatnich lat udowodniono, że jest ona efektywnym inhibitorem ludzkiej tyrozynazy. W badaniach klinicznych z udziałem ludzi udowodniono, że po upływie 12 tygodni, obniża znacząco przebarwienia skóry u osób z jasną karnacją, natomiast w mniejszym stopniu wykazuje skuteczność u osób z ciemną karnacją [71].

Deoksyarbutyna zaprojektowana za pomocą metody QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) przejawia zdolność usuwania przebarwień skóry i hamowania aktywności tyrozynazy pochodzącej z grzybów. Używając kultur ludzkich melanocytów udowodniono, że deoksyarbutyna jest związkiem mniej toksycznym aniżeli hydrochinon. Wykazano, że nie obniża istotnie żywotności kultur ludzkich keranocytów i fibroblastów, lecz efektywnie hamuje aktywność tyrozynazy i zmniejsza ilość melaniny w melanocytach. Jest więc potencjalnie bezpiecznym i efektywnym inhibitorem tyrozynazy [72].

W badaniach *in vitro* udowodniono, że deoksyarbutyna hamuje skutecznie ludzką oraz pochodzącą z grzybów tyrozynazę. Ogranicza syntezę melaniny poprzez blokowanie jej kluczowych reakcji: hydroksylacji tyrozyny oraz utleniania DOPA. Wykazuje nieznaczny wpływ na obniżenie żywotności kultur ludzkich melanocytów, do poziomu 95% [73].

Arbutyna w połączeniu z aloesyną (2-acetylo-8- β -D-glukopiranozylo-7-hydrokso-5-metylochromon) na drodze synergistycznego działania skutecznie hamuje aktywność ludzkiej oraz pochodzącej z grzybów tyrozynazy. W badaniach wykazano, że oba związki ograniczają znacząco syntezę melaniny w mieszanym mechanizmie hamowania aktywności tyrozynazy. Arbutyna zachowuje się jak inhibitor kompetencyjny, podczas gdy aloesyna wykazuje aktywność inhibitora niekompetencyjnego. Badania wykazały, że aloesyna razem z arbutyną odpowiednio w stężeniu 0,01 i 0,03 mM hamują aktywność enzymu do poziomu 86%, w porównaniu z próbą kontrolną. Wynik badania sugeruje, że wspólne stosowanie aloesyny i arbutyny może być korzystne, ponieważ oba związki skutecznie ograniczają syntezę melaniny w melanocytach [61, 62].

W ostatnich latach dowiedziono, że działanie wybielające arbutyny jest wspomagane przez naturalną mikroflorę obecną na skórze ludzkiej. Gatunki z rodzaju *Staphylococcus*, głównie *S. aureus* i *S. epidermidis* mogą sprzyjać szybszej hydrolizie arbutyny do hydrochinonu. Tym samym mogą wzmacniać rozjaśniający efekt działania arbutyny ze względu na właściwości przeciwutleniające hydrochinonu, powstałego w wyniku jej hydrolizy [74].

Niemniej jednak w badaniach potwierdzono, że arbutyna posiada właściwości antyoksydacyjne, zbliżone do hydrochinonu. Za pomocą metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), przy wykorzystaniu fizjologicznych rodników tlenowych wykazano,

że posiada ona taką samą aktywność przeciwutleniającą, co hydrochinon. Testy komórkowe, z użyciem erytrocytów i fibroblastów skóry pokazały, że arbutyna posiada silne działanie antyoksydacyjne, porównywalne a nawet lepsze niż hydrochinon. Wyniki tych badań sugerują, że aktywność przeciwutleniająca arbutyny jest niedoceniona pomimo, że jest ona silnym antyoksydantem w skórze [75].

Arbutyna jest chętnie wykorzystywana w dermokosmetykach ze względu na jej słabe działanie drażniące w przeciwieństwie do hydrochinonu. Liczne doświadczenia przeprowadzone z udziałem zwierząt dowiodły, że 10% roztwór wodny β -arbutyny jest słabo toksyczny, nie powoduje podrażnienia skóry, ani nie posiada właściwości uczulających. Ponadto w stężeniu poniżej 0,34 mg/ml nie wykazuje właściwości mutagennych i nie indukuje aberracji chromosomowych w komórkach fibroblastów. Nie jest związkami kancerogennym i nie hamuje funkcji rozrodczych w stężeniu do 400 mg/kg/dzień [27].

Badania przeprowadzone przez Shiseido Research Center w Jokohamie, potwierdziły, że β -arbutyna stosowana w postaci 10% roztworu wodnego w ilości 50 μ l, przez okres 48 godzin, nie powoduje większych podrażnień skóry. W badaniu tym wzięło udział 43 zdrowych ochotników, w przedziale wiekowym od 25 do 47 lat. U żadnego z nich nie zaobserwowano podrażnień skóry w miejscu nałożenia β -arbutyny [27].

Podobne wyniki badań uzyskano z produktami kosmetycznymi zawierającymi w swym składzie β -arbutynę. W próbie przeprowadzonej u 47 ochotników w wieku od 19-59 lat wykazano, że produkty zawierające odpowiednio 7% i 10% β -arbutyny nie wywołują podrażnień skóry. W innych badaniach wykonanych przez Shiseido Research Center w Jokohamie, z udziałem 64 ochotników dowiedziono, że produkty zawierające β -arbutynę stosowane na górnej lub dolnej powierzchni ramion, trzy razy dziennie, przez okres 24 tygodni również nie powodują działania drażniącego na skórę. Podczas badań nie obserwowano żadnych problemów związanych z bezpieczeństwem używania produktów zawierających 7 i 10% β -arbutynę. W późniejszych testach, prowadzonych z udziałem 59 kobiet w wieku od 32-60 lat, nie zanotowano również żadnych problemów skórnych związanych z zastosowaniem produktów zawierających 10% β -arbutynę. Produkty aplikowano cztery razy dziennie, przez okres 24 tygodni [27].

Liczne badania potwierdziły, że stosowana zewnętrznie w przebarwieniach skórnych arbutyna jest substancją bezpieczną, nie wykazującą działania drażniącego skóry (Tab.5). W związku z tym wydaje się być dobrą alternatywą dla powszechnie stosowanego w dermatologii hydrochinonu, którego użytkowanie budzi w ostatnich latach wiele kontrowersji [3].

Tabela 5. Spis badań oceniających działanie drażniące β -arbutyny (Shiseido Research Center, Jokohama).

Liczba ochotników w badaniu	Przedział wiekowy	Czas trwania badania	Stężenie β -arbutyny	Obecność podrażnień w miejscu aplikacji
43	25-47 lat	48 godzin	10%	brak
47	19-59 lat	24 godziny	7%	brak
			10%	brak
64	18-53 lat	24 tygodnie	7%	brak
			10%	brak
59	32-60 lat	24 tygodnie	10%	brak

W kosmetologii wykorzystywane jest także działanie przeciwzmarszczkowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i antybakteryjne arbutyny. Stosuje się ją w leczeniu trądziku oraz stanów zapalnych skóry. Wchodzi w skład kosmetyków przeznaczonych do pielęgnacji cery trądzikowej i cery z przebarwieniami wywołanymi m.in. ekspozycją na promieniowanie słoneczne, stanami zapalnymi i zmianami hormonalnymi. Ponadto arbutyna jest naturalnym filtrem zatrzymującym promieniowanie nadfioletowe UVB.

W preparatach kosmetycznych arbutyna stosowana jest w postaci czystego związku lub wyciągów roślinnych, głównie z mącznicy lekarskiej. Udowodniono, że działanie rozjaśniające czystego związku jest skuteczniejsze aniżeli działanie wyciągu roślinnego. Arbutyna w formie czystego związku występuje w kosmetykach zwykle w stężeniu 2-5%. Według Komitetu Naukowego ds. Produktów Konsumenckich przy Komisji Europejskiej β -arbutynę można używać jako składnik rozjaśniający przebarwienia skóry w kremach i mleczkach przeznaczonych do pielęgnacji twarzy w stężeniu do 7% [27].

4. Problematyka przebarwień skóry

Przebarwienia skóry są powszechnym problemem kosmetycznym i terapeutycznym. Dotyczy on osób w każdym wieku, a zwłaszcza ludzi po pięćdziesiątym roku życia, w tym najczęściej kobiet. Według niektórych autorów pojawiające się przebarwienia na skórze dotyczą nawet 90% populacji i stają się jednym z częstszych powodów wizyt u dermatologa i kosmetologa [1]. Mogą one obejmować wiele schorzeń dermatologicznych o różnej patogenezie i lokalizacji. Występują przede wszystkim u osób z jasną karnacją, jednakże mogą pojawiać się również u osób z ciemnym fototypem skóry [76]. Wśród przyczyn powstawania przebarwień skóry wymienia się przeważnie promieniowanie nadfioletowe i fizjologiczne starzenie się skóry. Przebarwienia powstają zazwyczaj na odkrytych częściach ciała, poddawanych działaniu promieniowania słonecznego, obejmujących najczęściej twarz, szyję, dekolt, przedramiona oraz grzbiety dłoni. Przybierają kolor od jasnobrunatnego, poprzez wszystkie odcienie brązu, aż do szarego.

Przebarwienia skóry mogą stać się przyczyną obniżenia jakości życia wielu osób, zwłaszcza kobiet. Problem przebarwień stanowi głównie defekt natury estetycznej, niemniej jednak może przyczyniać się także do niskiej samooceny i rodzić czasami problemy natury psychicznej [2, 76].

4.1. Definicja

Hiperpigmentacje, zwane również hipermelanozami, są schorzeniami związanymi z ograniczonymi lub uogólnionymi zmianami barwy skóry. Powstają w wyniku zwiększenia ilości melaniny w naskórku lub w naskórku i skórze właściwej oraz jej nierównomiernego gromadzenia się w melanocytach, co skutkuje zwiększoną liczbą melanocytów lub tylko samych melanosomów [76, 77, 78, 79, 80].

Przebarwienia mogą mieć charakter zaburzeń nabytych lub wrodzonych, polegających na nasileniu fizjologicznego zabarwienia skóry. Mogą być wynikiem zmiany liczby melanocytów, biochemicznych zaburzeń biosyntezy melaniny oraz zaburzeń formowania, dojrzewania i transportu melanosomów [77]. Przebarwienia skóry są plamami barwnikowymi o różnej wielkości i nieregularnym kształcie, często niezbyt dobrze odgraniczonymi od otaczającej skóry [1].

4.2. Przyczyny powstawania przebarwień skóry

Przebarwienia skóry powstają wskutek zakłóconego mechanizmu syntezy melanin oraz ich nierównomiernego rozmieszczenia w skórze. Mogą pojawiać się pod wpływem działania czynników pochodzenia endogennego (np. hormony) i egzogennego (np. kosmetyki, perfumy, ekspozycja na promieniowanie słoneczne) [81, 82].

Ich powstawanie związane jest ze:

- wzrostem aktywności melanocytów,
- zwiększeniem liczby melanocytów,
- zwiększeniem produkcji melanosomów przez melanocyty,
- natężonym przekazywaniem melanosomów do keranocytów,
- spadkiem degradacji melaniny przez keranocyty i makrofagi [1].

Wśród czynników sprzyjających powstawaniu przebarwień skóry, najczęściej wymieniane są: promieniowanie nadfioletowe UVA i UVB, zmiany hormonalne, choroby układowe, stosowanie leków, ziół lub kosmetyków, zawierających substancje fototoksyczne lub fotoalergizujące, kontakt z niektórymi metalami, zmiany zapalne oraz urazy mechaniczne.

4.2.1. Promieniowanie nadfioletowe UVA i UVB

Nadmierna ekspozycja na działanie promieniowania słonecznego oraz lamp UV stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Obecne w promieniowaniu słonecznym promienie UVA (280-320 nm) i UVB (320-400 nm) mogą wykazywać negatywny wpływ na naskórek oraz skórę właściwą. Przyczyniają się do powstawania rumienia, rozwoju nadwrażliwości na światło, nasilenia reakcji immunologicznych, fotostarzenia się skóry, a nawet rozwoju nowotworów skóry [83, 84, 85, 86].

Promieniowanie słoneczne przyczynia się do wzmożonej aktywności melanocytów naskórka. Powstająca w mechanizmie obronnym skóry opalenizna jest wynikiem m.in. szybkiego uwalniania już istniejącej melaniny, zmian w rozmieszczeniu i transporcie melanosomów, a także zwiększenia ilości melanocytów i nasilonej biosyntezy nowej melaniny. Długotrwała ekspozycja na działanie promieniowania słonecznego przyczynia się do uszkodzenia melanocytów w skórze i nierównomiernego rozmieszczenia melanosomów w keratynocytach naskórka, a w konsekwencji do powstawania przebarwień skóry [1, 87].

Ponadto przewlekła ekspozycja na działanie promieniowania nadfioletowego UVA i UVB jest przyczyną posłonecznego starzenia się skóry. W jego przebiegu dochodzi do zmian zarówno w obrębie naskórka, jak i skóry właściwej. Zmianom tym towarzyszą m.in.:

nieprawidłowe mitozy w warstwie podstawnej naskórka, obecność komórek apoptotycznych, uszkodzenia melanocytów i naczyń włosowatych, przerost gruczołów łojowych, zmniejszenie ilości kolagenu i nagromadzenie nieprawidłowych mas elastyny [88].

4.2.2. Zmiany hormonalne i choroby układowe

Przebarwienia skóry powstają pod wpływem różnych zmian hormonalnych. Ciąża, doustna antykoncepcja, hormonalna terapia zastępcza, okres menopauzy, zaburzenia miesiączkowania oraz inne terapie hormonalne mogą przyczyniać się do wzmożonego ich powstawania [1, 89, 90].

Obecność przebarwień skóry jest rezultatem także wielu chorób układowych i chorób gruczołów wydzielania wewnętrznego. Najczęściej wymienia się tu: niewydolność nerek, cukrzycę, nadczynność tarczycy, niedoczynność nadnerczy, zapalenie przydatków i choroby wątroby [1].

Liczne przebarwienia skóry są zmianami natury hormonalnej, związanymi z nadprodukcją hormonów: ACTH i MSH. Są one charakterystyczne dla choroby Addisona, choroby Cushinga oraz gruczolaka przysadki. Przebarwienia skóry są również symptomatyczne dla niektórych chorób i zespołów uwarunkowanych genetycznie przebiegających z nadwrażliwością na słońce, takich jak porfirie, zespół Rothmunda-Thomsona czy zespół Blooma. Mogą powstawać także w przypadku chorób tkanki łącznej, np. w twardzinie skórnej ograniczonej lub układowej czy skórnej odmianie toczenia rumieniowatego [76].

4.2.3. Substancje chemiczne o działaniu fotoalergizującym i fototoksycznym obecne w niektórych lekach, roślinach i kosmetykach oraz metale ciężkie

Znaczną grupą zaburzeń pigmentacji skóry są przebarwienia polekowe, wywołane działaniem niektórych leków. Są one spowodowane stosowaniem leków o różnej budowie chemicznej i działaniu farmakologicznym. Zmiany barwnikowe skóry występują najczęściej po zastosowaniu: pochodnych fenotiazyny (chloropromazyna, stelazyna, trifluperazyna), trójcyklicznych leków antydepresyjnych (imipramina, dezypramina, amitryptylina), leków przeciwpadaczkowych (mefenytolina, fenytoina), antybiotyków tetracyklinowych (minocyklina, dezoksycyklina), leków przeciwzapalnych (paracetamol, salicylany), leków przeciwwarytmicznych (amiodaron), leków przeciwwirusowych (zidowudyna), leków przeciwmalarycznych (chlorochina, hydroksychlorochina) i leków przeciwnowotworowych (busufan, bleomycyna, cyklofosfamid) [80, 91].

Powstawanie przebarwień skóry może być również spowodowane kontaktem z pewnymi roślinami i wyciągami roślinnymi. Niektóre rośliny zawierają substancje o właściwościach fototoksycznych (np. psoraleny), które mogą wywoływać odczyny skórne. Wśród roślin tych wymienia się: pierwiosnek kubkowaty (*Primula obconica* Hance), sumak jadowity (*Rhus toxicodendron* L.), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.), karczoch zwyczajny (*Cynara scolymus* L.), werbena ogrodowa (*Werbena hybryda* Voss), bluszcz pospolity (*Hedera helix* L.), łopian lekarski (*Arctium lappa* L.), rumian rzymski (*Anthemis nobilis* L.), dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum* L.), mniszek lekarski (*Taraxacum officinale* F.H. Wigg.), złocień ogrodowy (*Chrysanthemum indicum* L.), dyptam jesionolistny (*Dictamnus albus* L.), barszcz sosnowskiego (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) oraz wiele innych roślin ozdobnych i hodowlanych [92].

Do powstawania przebarwień skóry przyczyniają się także obecne w perfumach i kosmetykach substancje fotouczulające. Wśród nich najczęściej wymienia się olejek bergamotowy (*Bergamottae aetheroleum*) pozyskiwany z gatunku *Citrus bergamia*. Powstające przebarwienia skóry w obrębie bocznych powierzchni szyi, karku i dekoltu, zwane *Berloque dermatitis*, są konsekwencją nasilonego procesu melanogenezy, wywołanego promieniowaniem UV oraz bergaptenem obecnym w olejku bergamotowym [22, 77, 81].

Liczne związki chemiczne, np. leki zawarte w roślinach i kosmetykach mogą zwiększać wrażliwość na światło oraz działają fotoalergiczne. Mechanizmy te są odpowiedzią na szkodliwe działanie promieniowania nadfioletowego, głównie UVA. Promieniowanie to przyczynia się do uszkodzenia struktur komórkowych za pośrednictwem singletowego tlenu oraz wolnych rodników. Objawia się to m.in. powstawaniem rumienia, pęcherzy i kolejnych przebarwień skóry [83].

W skórze mogą być osadzone również pewne ilości jonów metali ciężkich. Przyczyniają się one do tworzenia przebarwień o różnych odcieniach koloru niebieskiego i szarego. Do metali ciężkich wywołujących skórne hiperpigmentacje zalicza się: srebro, złoto, żelazo, rtęć, ołów, bizmut oraz arsenik [91].

4.2.4. Zmiany zapalne

Przebarwienia pozapalne są patofizjologiczną odpowiedzią skórną na endo- i egzogenne czynniki zapalne. Wiele chorób skórnych takich jak: trądzik, atopowe zapalenie skóry, alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, łuszczyca, liszaj płaski, toczeń rumieniowaty układowy, twardzina i wiele innych prowadzi do powstawania przebarwień pozapalnych. Powstają one w wyniku wzmożonej sekrecji melaniny i jej transportu do keranocytów,

a także poprzez znaczący wzrost liczby melanocytów. Przebarwienia pozapalne powstają wskutek stymulacji biosyntezy melaniny poprzez interleukinę 1 (IL-1), która pobudza uwalnianie hormonów: adrenokortykotropowego (ACTH) i melanotropowego (MSH) w ośrodkowym układzie nerwowym oraz wzmacnia ekspresję receptora dla MSH na powierzchni melanocytów. Obszar przebarwień jest ograniczony do miejsc objętych stanem zapalnym lub wcześniej uszkodzonych. Ustępują samoistnie, po dłuższym lub krótszym czasie, lub po ustaniu czynnika przyczynowego [1, 77, 93, 94].

4.2.5. Urazy mechaniczne

Przebarwienia skóry mogą powstawać także w wyniku urazów mechanicznych. Najczęściej wymieniane są tu: stałe ocieranie się skóry o części bielizny (np. pasek, biustonosz), uszkodzenia naskórka oraz miejsca styku z opatrunkiem gipsowym [1].

4.3. Rodzaje przebarwień skóry

Zaburzenia pigmentacji skóry – przebarwienia, dzielimy, w zależności od lokalizacji i głębokości umiejscowienia barwnika na:

- naskórkowe - związane z kumulacją melaniny w naskórku,
- skórne - związane z umiejscowieniem melaniny w warstwie brodawkowej skóry właściwej,
- mieszane - posiadające cechy przebarwień naskórkowych i skórnych,

gdzie zwiększenie zawartości melaniny jest wynikiem wzrostu liczby melanocytów oraz nasileniem syntezy melaniny, przebiegającej bez zmiany ilości melanocytów [95, 96].

W przypadku zaburzeń barwnikowych hiperpigmentacyjnych wykorzystywany jest także podział kliniczny (Tab.6). Według niego przebarwienia dzielone są na:

- miejscowe - wywołane działaniem czynników mechanicznych, chemicznych, fizycznych, zapalnych, a także lekami i hormonami,
- rozsiane - rozwijające się w przypadku chorób układowych [1].

W klasyfikacji zaburzeń barwnikowych brany jest pod uwagę jeszcze jeden podział, zależny od koloru. Według niego przebarwienia dzielimy na:

- brązowe:
 - rozsiane, np. hemochromatoza, choroba Wilsona, porfiria, niewydolność wątroby, choroba Addisona, twardzina układowa, choroba Whipple'a,

- miejscowe, np. piegi, plamy soczewicowate, plamy typu café-au-lait, znamię melanocytowe, pokrzywka barwnikowa, ostudy, fitotoksyczne zapalenie skóry, przebarwienia pozapalne i polekowe,
- szare lub niebieskie:
 - rozsiane, np. hemochromatoza, ochronoza układowa,
 - miejscowe, np. znamię Oty, plama mongolska, skrobiawica plamista, znamię błękitne, ochronoza zewnątrzpochodna [79].

Tabela 6. Klasyfikacja zaburzeń barwnikowych hiperpigmentacyjnych [96].

Lokalizacja przebarwienia	Cechy kliniczne	Przebarwienia miejscowe	Przebarwienia rozsiane
naskórkowe	melanocytoza ^a	plamy soczewicowate, plamy soczewicowate starcze, plamy soczewicowate złośliwe, zespół Peutza-Jeghersa, melasma	zespół Leoparda, zespół Carney`a, zespół znamion dysplastycznych,
	melanoza ^b	melanoza Riehla, piegi, erytromelanosia follicularis et colli, przebarwienia pozapalne, przebarwienia polekowe	porfirię skórną późną, chorobę Addisona nadczynność tarczycy, niewydolność nerek, choroby wątroby, hemochromatoza
skórne	melanocytoza ^c	znamię Oty, znamię błękitne, plama mongolska	

^a - wzrost liczby melanocytów

^b - wzrost zawartości melaniny w naskórku, bez zwiększanie ilości melanocytów

^c - działanie/funkcjonowanie melanocytów w skórze właściwej.

W praktyce dermatologicznej najczęściej spotykanymi przebarwieniami skóry są: piegi (*ephelides*), plamy soczewicowate (*lentigines*), plamy soczewicowate starcze (*lentigines sensilis*, *lentigines solaris*), ostuda (*chloasma*, *melasma*), melanoza Riehla (*melanosis Riehl*),

przebarwienia okołoustne (*melanosis peribuccalis*), przebarwienia pozapalne i przebarwienia po odczynach fototoksycznych [77, 80].

4.3.1. Krótka charakterystyka najczęściej spotykanych przebarwień skóry

4.3.1.1. Piegi (*ephelides*)

Są niewielkimi, dyskretnymi, kilkumilimetroowymi plamkami w kolorze żółtym lub ciemnobrązowym. Są ogniskową hiperpigmentacją wywołaną ekspozycją na promieniowanie słoneczne, pojawiającą się i znikającą wraz z porami roku. Piegi są najczęściej rozsiane, umiejscowione na odkrytych częściach ciała, głównie na twarzy. Są charakterystyczne dla osób rudowłosych i z jasną karnacją skóry. Pojawiają się głównie w dzieciństwie, utrzymują się w ciągu całego życia, ale są mniej nasilone w starszym wieku. Mają charakter genetyczny. Dziedziczone są jako cecha autosomalna dominująca. Istotą tych przebarwień jest miejscowe zwiększenie szybkości syntezy i ilości wytwarzanej melaniny, bez zwiększenia liczby melanocytów [77, 79, 80, 97, 98].

4.3.1.2. Plamy soczewicowate (*lentigines*)

Nabyte, ostro odgraniczone przebarwienia, o nieregularnym lub owalnym kształcie, jednolicie zabarwione, w kolorze jasno- lub ciemnobrązowym. Są większe od piegów, ciemniejsze, nie związane z nasłonecznieniem. Pod wpływem słońca ciemnieją, natomiast podczas zimy ich zabarwienie staje się mniej intensywne. Występują od dzieciństwa, zwykle na skórze twarzy, szyi, przedramionach oraz w okolicy barku. Ponadto mogą być wywołane ostrymi poparzeniami słonecznymi. Istotą tych przebarwień jest zwiększona liczba melanocytów, wzmożona synteza i dystrybucja melaniny do naskórka oraz do chromatoforów zlokalizowanych w skórze właściwej. W obrazie histologicznym obserwowana jest zwiększona liczba komórek barwnikowych na połączeniu skórno-naskórkowym [77, 79, 80, 97, 98].

4.3.1.2.1. Plama soczewicowata starcza (*lentigo sensilis, lentigo solaris*)

Obserwowana u osób dorosłych, najczęściej po 40 roku życia, w okolicach skóry narażonych na długotrwałą ekspozycję promieniowania słonecznego, głównie w okolicy twarzy, dekoltu, przedramion oraz grzbietów dłoni. Plamy mają zwykle średnicę od kilku mm do kilku cm i ciemnobrązowe zabarwienie. Ich liczba oraz wielkość ulegają zwiększeniu

w miarę upływu czasu. Istotą plam soczewicowatych starczych jest zwiększenie liczby i przerost melanocytów [77, 98].

4.3.1.2. Plama soczewicowata złośliwa (*lentigo maligna*)

Jest formą wstępną złośliwego czerniaka skóry. Występuje u ludzi starszych pod postacią pojedynczego ogniska, przeważnie na twarzy. Jest nieregularną, częściowo ostrą, częściowo nieostrą ograniczoną plamą o niejednorodnej pigmentacji. W obrazie histologicznym obserwuje się śródskórkowe namnażanie nietypowych melanocytów [98].

4.3.1.3. Ostuda (*chloasma, melasma*)

Nabyte, rozległe, symetryczne, o nieregularnym kształcie, ostro ograniczone plamy bez oznak zapalenia. Najczęściej w kolorze brązowym lub niebieskim odcieniu, często centkowane. Zlokalizowane w centralnej części twarzy, na policzkach, nad górną wargą, na nosie, czole i brodzie. Jest pospolitym przebarwieniem występującym w obrębie twarzy. Dotyczy mężczyzn (w ok. 10% przypadków), jednak jest problemem dotyczącym głównie kobiet, o ciemnym fototypie (ponad 90% przypadków). Czynniki wywołującymi lub sprzyjającymi powstawaniu ostudy są: promieniowanie UV, czynniki genetyczne, ciąża (*chloasma gravidarum*), zaburzenia miesiączkowania, doustne środki antykoncepcyjne, zaburzenia hormonalne, zapalenie przydatków, zaburzenia wewnątrzwydzielnicze (tarczycy, nadnerczy), choroby wątroby, stosowanie kosmetyków zawierających środki światłouczulające, np. olejek bergamotowy (*chloasma cosmeticum*), niektóre leki (*chloasma medicamentosum*), stan wyniszczenia (*chloasma cachecticorum*). Zmiany te mogą ustępować samoistnie, np. po porodzie, po zakończeniu leczenia hormonalnego, po odstawieniu wywołujących je leków. W ogniskach przebarwień obserwuje się zarówno zwiększenie liczby melanocytów, jak i podwyższenia ich aktywności. W obrazie histologicznym obserwowany jest wzrost melaniny w naskórku, skórze właściwej lub obu jednocześnie [77, 80, 94, 96, 97, 98, 99, 100].

4.3.1.4. Melanoza Riehla (*melanosis Riehl*)

Zaburzenia pigmentacyjne nabyte, przyjmujące charakterystyczne siatkowate kształty w obrębie twarzy i szyi. Początkowo są one koloru czerwonego lub niebiesko-fioletowego, szybko przyjmują zabarwienie brązowe. Mają charakter przewlekły. Pojawiają się u kobiet w okresie około menopauzalnym. Etiologia melanozy Riehla pozostaje nie do końca

określona. Może być ona rezultatem kontaktu ze związkami chemicznymi obecnymi w kosmetykach, działaniem promieniowania UV lub niedoborów witaminowych i pokarmowych. W obrębie ognisk przebarwienia obserwuje się obrzęk w naskórku, wzmożoną aktywność melanocytów oraz wielowarstwową blaszkę podstawną. Sugeruje się, że czynniki drażniące powodują obrzęk w obrębie naskórka, niszcząc naturalną barierę ochronną skóry oraz aktywację melanocytów i wzrost syntezy melaniny [77, 94].

4.3.1.5. Przebarwienia okołoustne (*melanosis peribuccalis*)

Brunatno-czerwone przebarwienia ogniskowe, obejmujące pasy skóry wokół ust, czasami bardziej rozległe, szerzące się na okolice kątów żuchwy i skronie. Przebarwienia o charakterze rozlanym lub o lokalizacji symetrycznej, typowe dla kobiet w średnim wieku, pojawiające się zazwyczaj pod wpływem działania promieniowania UV oraz stosowania kosmetyków zawierających związki fotodynamiczne [77].

4.3.1.6. Przebarwienia pozapalne i po odczynach fototoksycznych

Opisano w punkcie 4.2.3. oraz 4.2.4 (str. 34 i 35).

Znacznie rzadziej występującym przebarwieniem skórny są tzw. plamy koloru kawy z mlekiem (plamy *café au lait*). Są odgraniczonymi, nieregularnymi, jednorodnymi, jasnobrązowymi lub brązowymi plamami, wielkości od 1,5 do 10 cm. W obrazie histologicznym to naskórkowe przebarwienie powstaje w wyniku zwiększenia ilości barwnika w warstwie podstawnej, przy normalnej liczbie melanocytów z olbrzymimi melanosomami. Plamy *café au lait* obecne są zwykle od urodzenia i mogą występować w znacznej liczbie w zespołach wad rozwojowych, np. w nerwiakowłókniałości (*neurofibromatosis*) [79, 98].

4.4. Profilaktyka przebarwień skóry

Podstawową metodą zapobiegawczą powstawania większości przebarwień skóry jest skuteczna ochrona przeciwsłoneczna. Obejmuje ona: ograniczenie ekspozycji na promieniowanie słoneczne, zwłaszcza w okresie najsilniejszego działania - pomiędzy godziną 10.00 a 15.00, noszenie odzieży chroniącej ciało i okularów z filtrem przeciwsłonecznym, stosowanie preparatów podwyższających barierę ochronną skóry na promieniowanie UV. Dzięki jej systematycznemu stosowaniu możliwe jest ograniczenie szkodliwych skutków

promieniowania słonecznego, takich jak: zwiększona częstość występowania skórnych zmian nowotworowych, przyspieszenie procesu fotostarzenia się skóry oraz uszkodzeń DNA [83, 101, 102, 103, 104].

Ze względu na znaczny wzrost zachorowalności na nowotwory skóry rekomenduje się stosowanie preparatów dopasowanych do fototypu skóry, o wysokim współczynniku ochrony przeciwsłonecznej (SPF >15) oraz szerokim spektrum ochrony, zarówno przed promieniowaniem UVB, jak i UVA. Zabezpieczenie skóry wyłącznie przed szkodliwym wpływem promieniowania UVB może okazać się niewystarczające, gdyż jak wiadomo promieniowanie UVA odpowiada m.in. za zmiany równowagi kolagenu w macierzy zewnątrzkomórkowej skóry [104, 105, 106].

Stosowane w kosmetyce substancje promieniochronne (filtry UV) dzielimy ze względu na zakres absorbowanego promieniowania na filtry UV-A i UV-B oraz filtry szerokozakresowe UV-A+B. Ponadto filtry grupujemy na naturalne i syntetyczne oraz organiczne i nieorganiczne [107]. Nowoczesne produkty promieniochronne są wodoodporne, nietoksyczne, niedrażniące, wysoce fotostabilne oraz zawierają zwykle kilka różnych filtrów UV. W produktach kosmetycznych wykorzystuje się najczęściej filtry:

- nieorganiczne (fizyczne) – działają jak ekrany, posiadają zdolność rozpraszania promieniowania UV, chronią skórę przed szkodliwym promieniowaniem UVA i UVB, są substancjami fotostabilnymi, nietoksycznymi, nie powodującymi podrażnień skóry; wśród najczęściej wykorzystywanych nieorganicznych substancji promieniochronnych wymienia się: tlenek cynku, ditlenek tytanu, tlenki żelaza, kaolin oraz bentonit [102, 107, 108, 109].
- organiczne (chemiczne) – posiadają zdolność selektywnego absorbowania promieniowania UV, są substancjami fotostabilnymi, nietoksycznymi, chronią skórę przed promieniowaniem UVA/UVB, stosowane są zwykle w postaci mieszanin filtrów specyficznych dla wąskich zakresów fal promieniowania elektromagnetycznego:
 - UVA – np. pochodne dibezoilemetanu, kwasu antranilowego, bezofenony,
 - UVB – np. pochodne kwasu 4-metoksycynamonowego, kwasu salicylowego kwasu 4-aminobenzoowego oraz kamfory [108, 109, 110].

W produktach kosmetycznych substancje promieniochronne są łączone z przeciwutleniaczami. Stosowane pojedynczo nie zabezpieczają skóry w 100% przed negatywnymi skutkami promieniowania UVA/UVB. Obecne w kosmetykach przeciwutleniacze pełnią rolę m.in. blokerów wtórnych procesów biochemicznych,

wyzwalanych w wyniku absorpcji promieniowania UV, a tym samym uzupełniają działanie ochronne filtrów UV [106].

4.5. Diagnostyka przebarwień skóry

Do diagnozowania zmian pigmentacyjnych skóry w dermatologii, kosmetologii lekarskiej i medycynie estetycznej wykorzystywane są nieinwazyjne techniki optyczne. Są one szybkimi i wygodnymi metodami diagnostycznymi. Rynek dzięki szybkiemu rozwojowi w dziedzinie diagnostyki optycznej dysponuje coraz to szerszym asortymentem aparatów do analizy zmian pigmentacyjnych. Na przykład do oceny poziomu melaniny w miejscu przebarwienia skóry stosowane są różnego typu spektrofotometry (np. Mexametr, DermaSpectrometr). Równie chętnie wykorzystywane są starsze urządzenia diagnostyczne, np. lampa z filtrem Wood'a. Za jej pomocą możliwa jest ocena m.in. głębokości przebarwienia skóry. W wielu przypadkach diagnostyka zmian skórnych opiera się na wykonaniu biopsji fragmentu skóry zmienionej chorobowo i analizie histopatologicznej. Jednym z przeciwwskazań do przeprowadzenia biopsji jest podejrzenie u pacjenta czerniaka skóry. Wówczas wykorzystywana jest rutynowa metoda diagnostyczna - dermatoskopia.

4.5.1. Lampa z filtrem Wood'a

Wynaleziona w roku 1903 przez fizyka Roberta W. Wood'a, w Baltimore. Po raz pierwszy zastosowana w praktyce dermatologicznej w 1925 roku. Lampa z filtrem Wooda'a wykorzystywana obecnie w dermatologii, kosmetologii lekarskiej i medycynie estetycznej przede wszystkim w diagnostyce wybranych chorób skóry, m.in. grzybicy, łupieżu pstrego i rumieniowego, bielactwie oraz chorobach nowotworowych. Ponadto wykorzystuje się ją w diagnostyce fotodynamicznej, diagnostyce zaburzeń metabolizmu porfiryn oraz do analizy głębokości skórnych zmian pigmentacyjnych [111, 112, 113, 114, 115].

Lampa z filtrem Wood'a emituje długofalowe promieniowanie ultrafioletowe (UV), zwane światłem Wood'a, generowane przez wyładowania w parach rtęci o wysokim ciśnieniu. Znajdujący się w lampie filtr zbudowany jest z krzemianu baru z dodatkiem 9% tlenku niklu. Pasma jego przepuszczalności wynosi od 320 do 400 nm i osiąga maksymalną wartość przy długości fali 365 nm [111, 112].

Diagnoza za pomocą lampy z filtrem Wood'a oparta jest na zjawisku fluorescencji. Melanina obecna w naskórku i skórze właściwej pochłania emitowane przez lampę promieniowanie nadfioletowe, a fluorescencja tkanki obserwowana jest głównie dzięki

obecności kolagenu, aminokwasów aromatycznych, składników elastyny, prekursorów i produktów rozpadu melaniny, a także dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD). W normalnych warunkach fluorescencja skóry jest bardzo słaba, a jej spektrum może ulegać zmianie pod wpływem długotrwałej ekspozycji na działanie promieniowania słonecznego [111, 112].

W celu uniknięcia ryzyka błędnej diagnozy podczas badania należy pamiętać o kilku podstawowych zasadach. Badanie należy przeprowadzać za pomocą rozgrzanej lampy, w zaciemnionym pomieszczeniu, po uprzednim oczyszczeniu skóry pacjenta z wszelkich pozostałości kosmetyków i detergentów [111].

Lampa z filtrem Wood'a wykorzystywana jest do określania położenia melaniny w skórze. W jej świetle łatwo obserwowane są wszelkie zmiany pigmentacji naskórka, podczas gdy zmiany barwnikowe skóry właściwej są znacznie mniej wyraźne. Diagnoza zmian pigmentacyjnych za pomocą lampy z filtrem Wood'a jest także utrudniona u osób z jasną karnacją (fototyp I) oraz u osób z ciemnym fototypem skóry (V, VI). W świetle lampy z filtrem Wood'a wszelkie zmiany hipopigmentacyjne lub depigmentacyjne dają niebiesko-białą fluorescencję [111].

4.5.2. Mexametr®

Jest aparatem diagnostycznym wykorzystywanym w kosmetologii do określania barwy skóry. Dzięki niemu możliwy jest nie tylko pomiar zawartości melaniny w skórze, ale także pomiar ilości hemoglobiny w rumieniu powstałym w wyniku podrażnienia skóry przez promieniowanie słoneczne.

Mexametr® jest aparatem emitującym za pomocą szesnastu diod światło, o trzech specyficznych długościach fal: zielone (568 nm), czerwone (660 nm) i podczerwone (870 nm). Jednorazowo badaniu może być poddawany obszar skóry o średnicy 5 mm (powierzchni 0,20 cm²). Powierzchnia głowicy aparatu wynosi 1,54 cm² i wywiera nacisk na badaną skórę o sile 91 g/cm² [116].

Mexametr® jest aparatem bazującym na zasadzie absorpcji/refleksji. Za pomocą fotodetektora dokonywane są pomiary światła odbijanego przez skórę. W związku z tym, że ilość emitowanego przez aparat światła jest mierzalna, możliwe jest obliczenie ilości światła wchłoniętego przez skórę. Wskaźnik poziomu zawartości melaniny w skórze określany jest na podstawie pomiaru światła pochłoniętego i odbitego w zakresie dwóch długości fal: 660 i 880 nm. Natomiast poziom rumienia mierzony jest w zakresie 568 i 660 nm. Rezultat pomiaru widoczny jest natychmiast w postaci indeksu liczbowego [116].

Podczas badania urządzeniem Mexametr® należy pamiętać o tym, aby skóra pacjenta była sucha i czysta oraz aby pomiary wykonywane były w zbliżonych warunkach wilgotności względnej i temperatury oraz aby nie przeprowadzać ich w bezpośrednim świetle słonecznym lub świetle lampy.

Aparat Mexametr® jest urządzeniem wystarczająco czułym, aby wykrywać nawet najmniejsze różnice w kolorystyce skóry, dlatego też jest bardzo chętnie wykorzystywany do badań diagnostycznych w kosmetologii [117].

4.5.3. DermaSpectrometr®

Aparat o podobnej funkcji i mechanizmie działania co Mexametr®. Diody tego aparatu emitują światło o dwóch długościach fal: zielone (568 nm) i czerwone (655 nm). Jednorazowo badaniu poddawany jest obszar skóry o średnicy 6 mm (powierzchni 0,28 cm²). Powierzchnia głowicy aparatu wynosi 3,46 cm² i wywiera nacisk na badany fragment skóry o sile 158 g/cm² [116].

Identycznie jak w aparacie Mexametr® pomiar światła odbitego przez skórę mierzony jest za pomocą fotodetektora. Podobnie na podstawie pomiaru światła pochłoniętego i odbitego przez skórę określana jest zawartość zarówno melaniny jak i hemoglobiny, odpowiednio w zakresie długości fal dla światła zielonego (568 nm) i czerwonego (655 nm) [116].

4.5.4. Chromametr®

Jest kompaktowym kolorymetrem wykorzystywanym do pomiaru zawartości melaniny w skórze. Analiza oparta jest na pomiarze promieni emitowanych przez lampę ksenonową i promieni odbitych od powierzchni skóry, w zakresie długości fal: 450 nm (niebieska), 560 nm (zielona) i 600 nm (czerwona). Zabarwienie badanej skóry określane jest na podstawie wartości liczbowej kontrastu pomiędzy skórą zdrową a skórą ze zmianą barwnikową. Urządzenie wykorzystuje system pomiarowy kolorów L* a* b* określony przez CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). Kolor wyrażany jest w trójwymiarowym układzie współrzędnych, gdzie oś L* wyraża jasność koloru, od całkowicie czarnego (L*=0) do całkowicie białego (L*=100), oś a* przedstawia udział barwy zielonej i czerwonej, a oś b* żółtej i niebieskiej. Przyjmuje się, że odcienie koloru zielonego i niebieskiego mają wartość ujemną (-60), a czerwonego i żółtego wartość dodatnią (+60) [116, 118, 119].

Jednorazowo badaniu może być poddawany obszar skóry o średnicy 8 mm (powierzchni 0,50 cm²). Powierzchnia głowicy aparatu wynosi 1,77 cm² i wywiera nacisk na badaną skórę

o wartości 91 g/cm². Za pomocą pojedynczego pomiaru aparatem Chromametr® możliwa jest dokładna analiza barwy skóry [116].

4.5.5. Dermatoskopia (dermoskopia, mikroskopia epiluminescencyjna)

Jest nieinwazyjną metodą badawczą, umożliwiającą diagnostykę różnicową skórnych zmian barwnikowych oraz czerniaka. Stosuje się ją w celu odróżnienia zmian melanocytowych od naczyniowych, raka podstawnocomórkowego oraz włókniaka skórno, a także w celu odróżnienia znamion dysplastycznych lub atypowych znamion melanocytowych od czerniaków. Dermatoskopia jest prostą i szybką techniką optyczną pozwalającą na ocenę powierzchniowych warstw skóry, uwidaczniającą zmiany morfologiczne rozmieszczenia pigmentu w obrębie zmian barwnikowych [120, 121].

Twórcą dermatoskopii był Johann Saphier (1920 r.). Technikę tą wykorzystał po raz pierwszy Goldmann do analizy melanocytowych zmian skórnych, dermatoz oraz guzów w 1951 roku. Pod koniec lat 80-tych wykazano jej niezwykłą przydatność kliniczną. Obecnie dermatoskopia jest jedną z częściej wykorzystywanych metod diagnostycznych w dermatologii. Dzięki niej możliwa jest obserwacja zmian w obrębie naskórka, granicy skórno – naskórkowej, warstwy brodawkowatej oraz górnych powłok warstwy siateczkowatej skóry. Obraz uzyskiwany jest po zastosowaniu immersji, dzięki użyciu płynów immersyjnych pozwalających zminimalizować efekt odbijania, rozpraszania i pochłaniania promieni świetlnych przez badaną tkankę [120, 122].

Istotą badania dermatoskopowego jest rozpoznanie charakterystycznych elementów strukturalnych, takich jak: obraz siatki pigmentu, kolor, obecność i rozmieszczenie smug gałązkowatych, punkty barwnikowe, kropki. Klasyfikacja zmian barwnikowych skóry oparta jest na tzw. regule ABCD, gdzie ocenie poddawane są takie parametry jak: asymetria, brzeg, kolor i zróżnicowanie struktury. Każdy z nich jest przemnażany przez odpowiedni współczynnik, tak aby ostatecznie otrzymać całkowity wynik oceny dermatoskopowej - TDS (total dermatoscopy score) [122, 123, 124].

$$\text{TDS} = \text{asymetria} \times 1,3 + \text{brzeg} \times 0,1 + \text{kolor} \times 0,5 + \text{komponenty strukturalne} \times 0,5.$$

W celu oceny zmian barwnikowych wykorzystywana jest także skala 7 FFM (7 features of melanoma). Jest ona często stosowanym algorytmem rozpoznawczym we współczesnej dermatologii. Na liście 7 punktów jej oceny znajdują się: atypowa siatka barwnika i układ naczyń, biało-niebieskie zamglenie oraz nieregularne smugi, punkty, ciałka barwnikowe, plamy i ogniska zaniku [122, 123].

Ocena znamion barwnikowych odbywa się przy użyciu dermatoskopu ręcznego lub cyfrowego. Wideodermoskop posiada znacznie większe możliwości powiększenia obrazu aniżeli dermatoskop ręczny, a ponadto opcję rejestracji i przechowywania wyników badań. Pozwala to na porównywanie skórnych zmian u pacjenta na przestrzeni długiego okresu czasu [122].

4.6. Leczenie przebarwień skóry

W terapii zaburzeń pigmentacyjnych skóry wykorzystywane są liczne substancje czynne, przyczyniające się do hamowania wieloetapowego procesu tworzenia melaniny i rozjaśnienia miejsc objętych hiperpigmentacją. Zmiany barwnikowe skóry mogą być również usuwane w sposób mechaniczny, za pośrednictwem rozmaitych technik inwazyjnych. Wybór odpowiedniej metody terapeutycznej uzależniony jest m.in. od rozległości, lokalizacji, głębokości i przyczyny powstania przebarwienia skóry. Zabiegi terapeutyczne, jak i substancje wybielające, mogą być stosowane pojedynczo lub w terapii łączonej, jednakże w celu uzyskania pożądanego efektu terapeutycznego zaleca się stosowanie terapii skojarzonej.

4.6.1. Substancje czynne wykorzystywane w zaburzeniach pigmentacji

Kosmetologia dysponuje szerokim asortymentem substancji rozjaśniających przebarwienia skóry. Substancje te testowane są w licznych badaniach *in vivo* i *in vitro*. Ocenie poddawane są nie tylko skuteczność, ale także potencjalne ich zastosowanie w produktach kosmetycznych, przeznaczonych do pielęgnacji cery z zaburzeniami barwnikowymi. Substancje rozjaśniające wykazują się szerokim spektrum działania. Odpowiedzialne są za hamowanie różnych etapów syntezy melaniny. Sklasyfikowano je w kilka kategorii, według mechanizmów działania (Tab.7).

Wyciągi roślinne są bogatym źródłem substancji biologicznie czynnych, posiadających lepsze właściwości wybielające, w porównaniu z kwasem kojowym, hydrochinonem czy arbutyną [125]. Wśród wyciągów roślinnych, którym przypisuje się właściwości rozjaśniające najczęściej wymieniane są ekstrakty z:

- liścia mącznicy (*Uvae ursi folium extractum*),
- liścia borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium extractum*),
- liścia aloesu drzewiastego (*Aloe arborescens extractum*),
- korzenia lukrecji (*Liquiritiae radix extractum*),
- korzenia żeń-szenia (*Ginseng radix extractum*),

- koszyczków rumianku (*Chamomillae anthodium extractum*),
- ziela krwawnika (*Millefolii herba extractum*),
- owoców morwy (*Mori fructus extractum*),
- kory brzozy (*Betulae cortex extractum*),
- korzenia tarczycy bajkalskiej (*Scutellariae radix extractum*),
- liście herbaty zielonej (*Camelliae sinensis folium extractum*).

Tabela 7. Klasyfikacja substancji rozjaśniających [126, 127].

Hamowanie syntezy melaniny	Nazwa substancji rozjaśniającej
<u>przed synteza melaniny</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ transkrypcja tyrozynazy 	tretynoina
<u>podczas syntezy melaniny</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ hamowanie tyrozynazy 	arbutyna, aloesyna, galangina, glabrydyna, hesperydyna, hydrochinon, kwasy: azelainowy, elagowy, ferulowy, galusowy, kojowy, kumarowy oraz kwercetyna i rezweratrol
<ul style="list-style-type: none"> ▪ hamowanie peroksydazy 	fenole, katechole
<ul style="list-style-type: none"> ▪ redukcja produktów barwnych 	kwask askorbowy, hydrokumaryny, palmitynian askorbylu
<ul style="list-style-type: none"> ▪ wychwytywanie wolnych rodników towarzyszących melanogenezie 	glabrydyna, hydrokumaryny, kwas askorbowy, palmitynian askorbylu, α -tokoferol
<u>po syntezie melaniny</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ rozpad tyrozynazy 	kwask linolowy, kwas α - linolenowy
<ul style="list-style-type: none"> ▪ hamowanie transferu melanosomów 	amid kwasu nikotynowego, ekstrakt z nasion soi, neoglikoproteiny, pektyny
<ul style="list-style-type: none"> ▪ działanie keratolityczne 	kwasky: glikolowy, linolenowy, mlekowy, retinowy i likwirytna

4.6.1.1. Aloesyna

2-acetonylo-8-β-D-glukopiranozylo-7-hydroksy-5-metylochromon jest związkiem pozyskiwanym z liści aloesu (*Aloe sp.*). Moduluje syntezę melaniny poprzez kompetencyjne hamowanie aktywności tyrozynazy ludzkiej, mysiej oraz z grzybów. Badania wykazały, że aloesyna w zależności od stężenia hamuje zarówno hydroksylację tyrozyny, jak i utlenianie DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny). Zastosowana w dawce 50 i 100 mg/g obniża odpowiednio o 25 i 40% syntezę melaniny wywołanej działaniem promieniowania UV [125, 128, 129, 130, 131]. Udowodniono, że wspólnie z arbutyną na drodze synergistycznego działania hamuje aktywność tyrozynazy ludzkiej oraz tyrozynazy pochodzącej z grzybów (opis mechanizmu w punkcie 3.4, str. 21).

4.6.1.2. Amid kwasu nikotynowego (niacynamid)

Amidowa postać witaminy B₃, odpowiedzialna za hamowanie transportu melanosomów z melanocytów do keranocytów naskórka. Udowodniono, że stosowany w stężeniu 5% blokuje transfer melanosomów o 35-68%, zmniejsza przebarwienia skóry, prowadząc do znacznego ich rozjaśnienia, zaledwie po 4 tygodniach stosowania [57, 64, 125, 127, 132, 133, 134].

4.6.1.3. Arbutyna

Mechanizm wybielający arbutyny opisano w punkcie 3.4 niniejszej pracy (str.21).

4.6.1.4. Emblica

Substancja czynna wyizolowana z ziela „garbnikowego” (*Phyllanthus emblica*), gatunku drzewa pochodzącego z Azji. Jest związkiem hamującym aktywność tyrozynazy poprzez chelatowanie atomów żelaza oraz miedzi, kluczowych kofaktorów enzymu. Wykazuje właściwości rozjaśniające przebarwienia skóry wywołane działaniem promieniowania UV, w stężeniu 1% [64].

4.6.1.5. Glabrydyna

Izowflawan - składnik czynny frakcji hydrofobowej wyciągu z korzenia lukrecji (*Liquiritiae radix extractum*) wykazuje właściwości przeciwzapalne. Odpowiada za hamowanie aktywności tyrozynazy w kulturach mysich komórek melanoma B16, w stężeniu od 0,1 do 1,0 μg/ml, nie wykazując przy tym wpływu na syntezę DNA. Stosowana w stężeniu

0,5% zmniejsza pigmentację wywołaną promieniami UVB. Jest związkiem rozjaśniającym zmiany barwnikowe skuteczniej, aniżeli hydrochinon. W porównaniu z wyciągiem z korzenia lukrecji działa natomiast mniej efektywnie [125, 127, 135, 136].

4.6.1.6. Hesperydyna

Falwonoid: 7-rutynozyd hesperyny, występujący w owocni pomarańczy (*Citrus aurantium*) oraz liściach mięty pieprzowej (*Mentha piperita*). Moduluje syntezę melaniny poprzez hamowanie aktywności tyrozynazy ludzkich melanocytów oraz mysich kultur komórek melanoma B16, nie wykazując przy tym właściwości cytotoksycznych. Ponadto chroni fibroblasty i keratynocyty przed szkodliwym działaniem promieniowania UVA [125, 137].

4.6.1.7. Hydrochinon (1,4-dihydroksybenzen)

Związek fenolowy będący jedną z najbardziej efektywnych cząsteczek w leczeniu zaburzeń pigmentacyjnych skóry. Moduluje syntezę melaniny poprzez hamowanie aktywności tyrozynazy w mechanizmie inhibicji kompetencyjnej [138, 139, 140]. Stosowanie hydrochinonu budzi jednak w ostatnich latach sporo kontrowersji [3, 141]. Istnieją doniesienia na temat jego cytotoksycznego wpływu na melanocyty oraz hamującego oddziaływania na syntezę DNA i RNA [142]. Badania toksykologiczne z udziałem zwierząt sugerują, że może on posiadać właściwości kancerogenne i fetotoksyczne. Jak dotąd wyniki tych badań nie znalazły potwierdzenia w testach z udziałem ludzi. Pomimo tego ograniczono znacznie jego zastosowanie jako składnika preparatów kosmetycznych [94, 138]. Wykazano, że w wyższych stężeniach (> 5%) działa drażniąco na skórę, powoduje kontaktowe zapalenia skóry, wybiela zdrowe fragmenty skóry oraz jest przyczyną egzogennej ochronozy [4, 136, 143, 144, 145]. Stosowany zwykle w stężeniach 2-5%, przynosi efekty terapeutyczne już po 5-7 tygodniach od momentu rozpoczęcia leczenia [132]. Ze względu na małą trwałość hydrochinonu oraz jego słabą penetrację przez naskórek wykorzystuje się go najczęściej w terapii przebarwień skóry w połączeniu ze steroidami, retinoidami lub kwasem glikolowym [132].

4.6.1.8. Hydroksykwasy

Są kwasami organicznymi wykorzystywanymi powszechnie w kosmetyce, zarówno jako środki złuszczące (peeling chemiczny) i składniki wyrobów kosmetycznych. Mechanizm ich działania opiera się na normalizacji procesu keratynizacji i zmniejszenia adhezji

keranocytów. Pełnią funkcję promotorów przejścia naskórkowego. Stosowane pojedynczo lub w połączeniu z innymi środkami wybielającymi, np. hydrochinonem czy kwasem kojowym [77, 146, 147]. Najczęściej używanymi hydrokyskami są:

- *kwas glikolowy*: α -hydrokysk, występujący z trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum* L.), uniwersalny środek złuszczający, stosowany w stężeniu 20-70%, w leczeniu zmian barwnikowych takich jak przebarwienia pozapalne, melasma i plamy soczewicowate [148]. Wyniki badań dowodzą, że odgrywa on kluczową rolę w procesie złuszczenia keranocytów barwnikowych oraz przyczynia się do wzrostu zawartości kolagenu i substancji śluzowych w skórze [64, 149]. Rozjaśniający mechanizm jego działania wiąże się m.in. ze wzmożonym obrotem naskórkowym, a także modulacją syntezy melaniny poprzez hamowanie aktywności tyrozyazy [150]. Kwas glikolowy może być stosowany w pojedynkę lub w połączeniu z innymi związkami rozjaśniającymi (np. hydrochinonem, kwasem mlekowym) [150, 151];
- *kwas mlekowy*: występujący w kwaśnym mleku α -hydrokysk, o podobnym do kwasu glikolowego mechanizmie działania. Zastosowany w stężeniu 5-20% niszczy połączenia pomiędzy korneocytami powodując intensywne złuszczenie naskórka. Z przeprowadzonych dotąd badań wynika, że w stężeniu 5% odpowiada za zmiany wyłącznie w obrębie naskórka, podczas gdy w stężeniu 12%, zarówno za zmiany w obrębie naskórka, jak i skóry właściwej [152];
- *kwas salicylowy*: kwas ortohydroksybenzoesowy, β -hydrokysk, w stężeniu 3-5% stosowany jako czynnik zwiększający penetrację innych związków czynnych. Wykorzystywany zwykle w terapii łączonej, ze względu na słabe właściwości złuszczające [148]. Z licznych badań wynika, iż w stężeniu 20-30% jest skuteczny w leczeniu m.in. ostudy, trądziku pospolitego i przebarwień pozapalnych u pacjentów z V i VI fototypem skóry [153].

4.6.1.9. Kortykosteroidy

Grupa leków o udokumentowanych właściwościach wybielających, lecz nie wyjaśnionym mechanizmie hamowania syntezy melaniny [127]. Kortykosteroidy, np. hydrokortyzon, triamcinolon, betametazon, deksametazon są stosowane w leczeniu przebarwień skórnych najczęściej w połączeniu z innymi substancjami rozjaśniającymi. Pozwala to na zwiększenie efektywności ich działania oraz obniżenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych [127].

4.6.1.10. Kwas askorbowy i jego pochodne

Hamują syntezę melaniny poprzez oddziaływanie z jonami miedzi w miejscu aktywnym tyrozynazy, prowadząc tym samym do zmniejszenia aktywności enzymu. Początkowo stosowany wyłącznie w połączeniu z ekstraktem z soi lub lukrecji [3]. Późniejsze badania udowodniły, że w stężeniu 5% wykazuje silne właściwości rozjaśniające i może być wykorzystywany również w monoterapii [154]. Kwas askorbowy jest mało trwały w roztworach wodnych, dlatego też w terapii przebarwień skóry wykorzystywany jest głównie jako - fosforan askorbylu magnezowego (MAP), chroniący skórę przed działaniem promieniowania UVB [132].

4.6.1.11. Kwas azelainowy

Jest kwasem dikarboksylovym, wyizolowanym z drożdżaka *Pityrosporum ovale*. Z przeprowadzonych badań *in vitro* wynika, że hamuje kompetencyjnie aktywność tyrozynazy, kilku mitochondrialnych oksydoreduktaz oraz syntezę DNA. Wpływa antyproliferacyjnie i cytotoksycznie na melanocyty [94, 127, 142]. Stosowany w stężeniu 20% wykazuje bardzo dobre efekty terapeutyczne u pacjentów z ostudą i pozapalnymi zmianami barwikowymi, wywołanymi trądzikiem oraz chorobami charakterystycznymi dla zwiększonej ilości melanocytów [136, 155]. Wyniki badań potwierdzają, że 20% kwas azelainowy jest równie skuteczny w leczeniu ostudy jak 4% hydrochinon [156], natomiast w porównaniu z 2% hydrochinonem, wykazuje znacznie lepsze efekty terapeutyczne [157]. Stosowany w połączeniu z 0,05% tretynoiną lub 15-20% kwasem glikolowym posiada wysoką skuteczność w usuwaniu przebarwień skóry [132].

4.6.1.12. Kwas kojowy

(5-hydroksy-2-hydroksymetylo-4-piron), jest naturalnym związkiem hydrofilowym, produkowanym przez gatunki rodzaju *Acetobacter*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Hamuje aktywność tyrozynazy poprzez wiązanie jonów miedzi w miejscu aktywnym enzymu oraz wykazuje właściwości antyoksydacyjne [158]. Stosowany jest często u pacjentów nietolerujących hydrochinonu lub innych terapii. Udowodniono, że blokuje syntezę melaniny w stężeniu od 1 do 4% [64, 132]. Wyniki badań potwierdzają, że 2% kwas kojowy, w połączeniu z 2% hydrochinonem, jest znacznie bardziej efektywny w usuwaniu zmian barwnikowych, aniżeli 10% kwas glikolowy, w połączeniu z 2% hydrochinonem [159]. Wykazano, że kwas kojowy może wywoływać rumień i stany zapalne skóry [160], a w niektórych przypadkach działać nawet mutagennie [3, 127].

4.6.1.13. Kwas linolowy i kwas α -liponowy

Kwasy tłuszczowe odpowiedzialne za rozjaśnianie przebarwień skóry wywołanych działaniem promieniowania UV. W badaniach wykazano, że modulują melanogenezę m.in. poprzez nasilenie proteolitycznej degradacji tyrozynazy oraz zwiększenie obrotu naskórkowego warstwy rogowej skóry, nie wpływając cytotoksycznie na melanocyty [127, 161, 162, 163].

4.6.1.14. Kwas retinowy (tretynoina)

Jest związkiem redukującym zmiany pigmentacyjne skóry. Hamuje transkrypcję tyrozynazy, normalizuje proces dojrzewania i różnicowania keranocytów oraz nasila złuszczenie się korneocytów. Zastosowany w stężeniu 0,05-0,1% wykazuje skuteczność w usuwaniu pozapalnych zmian pigmentacyjnych, plam soczewicowatych oraz ostudy. W porównaniu z innymi związkami fenolowymi, np. z hydrochinonem działa jednak znacznie wolniej [132, 164, 165, 166, 167]. W celu poprawy skuteczności tretynoiny łączy się ją z hydrochinonem lub innymi substancjami wybielającymi, np. kortykosteroidami [136]. Najczęściej spotykanymi działaniami niepożądanymi podczas terapii tretynoina są: rumień, świąd, złuszczenie oraz suchość skóry [3, 132].

4.6.1.15. Mekwinol

4-hydroksyanizol, pochodna hydrochinonu posiadająca właściwości wybielające. Odpowiada za niszczenie komórek barwnikowych poprzez wytwarzanie chinonów – związków wysoce cytotoksycznych dla melanocytów. Stosowany w stężeniu 2%, w połączeniu z 0,01% tretynoina, w terapii plam soczewicowatych [3, 64, 127, 132].

4.6.1.16. Melatonina

Jest hormonem wydzielanym przez szyszynkę w odpowiedzi na światło słoneczne [168]. W badaniach *in vitro* wykazano, że hamuje melanogenezę w sposób zależny od dawki. Nie potwierdzono natomiast, aby wpływała na aktywność tyrozynazy. Sugeruje się, że może być odpowiedzialna za hamowanie procesów zależnych od cAMP (cyklicznego 3'-5'-adenozynomonofosforanu) w komórkach barwnikowych [64].

4.6.1.17. N-acetyl-4-cysteaminofenol (NCAP)

Analog tyrozyny, odpowiedzialny za modulowanie syntezy melaniny poprzez hamowanie aktywności tyrozynazy. Jest związkiem fenolowym bardziej trwałym i mniej drażniącym, w porównaniu z hydrochinonem. Zastosowany w stężeniu 4% wykazuje silne właściwości wybielające. Rozjaśniający mechanizm działania NCAP związany jest ze zmniejszeniem liczby melanocytów i obniżeniem liczby melanosomów przekazywanych w obrębie jednostki melanocytarnej [64, 96, 132, 169].

4.6.2. Metody zabiegowe w leczeniu przebarwień skóry

W leczeniu przebarwień skóry stosowane są rozmaite techniki zabiegowe. Najczęściej wykorzystywane są nieinwazyjne zabiegi, jak np. mikrodermabrazja czy peelingi, powodujące poprawę stanu naskórka, a także skóry właściwej. Zabiegom tym towarzyszy zwykle złuszczenie powierzchniowych warstw naskórka.

Wśród stosowanych metod zabiegowych wymienia się najczęściej: peelingi chemiczne, mikrodermabrazję, krioterapię, laseroterapię i terapię fotodynamiczną [77].

4.6.2.1. Peeling chemiczny

Zastosowany w praktyce dermatologicznej po raz pierwszy pod koniec XIX wieku (P.G. Unna, 1882) [170]. Polega na kontrolowanym uszkodzeniu skóry, prowadzącym do wymiany części lub całości naskórka oraz zapoczątkowaniu procesu przebudowy kolagenu. Wykorzystywany zwykle w usuwania objawów uszkodzenia posłonecznego, zaburzeń barwnikowych, zmarszczek oraz zbliznowaceń [171].

W zależności od głębokości zranienia wytworzonego przez peeling dzielimy go na:

- peeling powierzchniowy (uszkodzenie wyłącznie warstwy naskórka),
 - peeling średniej głębokości (uszkodzenie naskórka i warstwy brodawkowatej skóry właściwej),
 - peeling głęboki (uszkodzenie aż do poziomu warstwy siateczkowatej skóry właściwej)
- [149, 172, 173, 174].

Peeling chemiczny nie wywołuje większych powikłań. Pojawiające się skutki uboczne takie jak pieczenie skóry, rumień czy obrzęki wokół oczu mają charakter przemijający i nie wymagają dodatkowego postępowania medycznego. Zabiegi te wykonywane są zwykle w seriach (4 – 6 zabiegów), w okresie zmniejszonego nasłonecznienia (jesienią, zimą i wiosną), średnio co 2, 3 lub 4 tygodnie. U osób z tendencją do przebarwień skóry unika się wykonywania tego typu zabiegów między majem a wrześniem. Peeling chemiczny wymaga

zwykle wcześniejszego przygotowania pacjenta. W zależności od rodzaju stosowanego peelingu zalecana jest terapia wstępna preparatami m.in. z kwasem pirogronowym, glikolowym, migdałowym, azelainowym lub retinowym, na minimum dwa tygodnie przed planowanym zabiegiem. Poprzedzający zabieg okres leczenia wstępnego pozwala na właściwe przygotowanie skóry pacjenta do peelingu i zmniejszenia grubości naskórka. Dobrze zaplanowane i przeprowadzone leczenie poprzedzające zwiększa u pacjenta przyszłe korzyści z wykonanego zabiegu oraz zmniejsza ryzyko wystąpienia hiperpigmentacji pozapalnej [149, 170].

Najczęściej wykorzystywanymi substancjami w peelingu chemicznym są:

- pojedyncze substancje peelingujące tj. kwas trichlorooctowy (TCA), mlekowy, glikolowy, migdałowy, salicylowy, pirogronowy;
- składniki peelingsów złożonych jak np. arbutyna, rezorcynol, arginina, retinol, kwas retinowy, azelainowy, fitowy, askorbowy, tioglikolowy [170, 171].

Peeling chemiczny jest jedną z najskuteczniejszych metod leczenia przebarwień skóry. Dzięki chemicznemu uszkodzeniu naskórka możliwe jest skuteczne oddzielenie i złuszczenie wielu warstw komórek, a w konsekwencji efektywne działanie preparatów rozjaśniających, hamujących produkcję melaniny [170]. W leczeniu przebarwień zaleca się łączenie peelingu chemicznego z zewnętrznymi preparatami rozjaśniającymi oraz preparatami blokującymi promieniowanie słoneczne [149].

Najskuteczniejszym znanym zabiegiem wybielającym jest peeling złożony - *Cosmelan*. Zawiera on czynniki rozjaśniające o małym działaniu drażniącym i silnym działaniu hamującym syntezę melaniny (kwas kojowy, fitowy, askorbowy, palmitynian retinyli, arbutyna). *Cosmelan* jest skuteczną terapią odpowiednią dla każdego fototypu skóry, pozwalającą na usunięcie zmian barwnikowych o różnej etiologii, w okresie 2-3 miesięcy. Dodatkowym atutem zabiegu *Cosmelan* jest także ogólna poprawa wyglądu skóry, regulacja wydzielania łoju, zwężenie porów i stymulacja odnowy kolagenu [170].

Peeling chemiczny stosowany jest w terapii skojarzonej, w połączeniu z innymi zabiegami wykorzystywanymi w leczeniu przebarwień skóry takimi jak: dermabrazja, mikrodermabrazja, laseroterapia i dermasanding [149, 175].

4.6.2.2. Mikrodermabrazja

Prosty, nieinwazyjny zabieg polegający na mechanicznym usuwaniu powierzchniowych warstw naskórka, najczęściej warstwy rogowej, w którym wykorzystuje się kryształy trące tj. tlenek glinu, chlorek sodu czy tlenek magnezu [176]. Zastosowano go po raz pierwszy we Włoszech w 1985 roku (Marini, Lo Brutto) [177]. Zabieg pozwala na uzyskanie dobrych

efektów terapeutycznych w usuwaniu m.in. objawów fotostarzenia się skóry, powierzchownych przebarwień skóry, zaskórników, blizn potrądzikowych oraz korekcji drobnych nierówności naskórka [178, 179, 180]. Stanowi doskonałą alternatywę, a także uzupełnienie dla powierzchownych peelingów chemicznych i nieinwazyjnych metod laserowych [181]. Jest doskonałym zabiegiem przygotowawczym do takich zabiegów kosmetycznych jak mezoterapia, jonoforeza czy peeling chemiczny. Może być stosowany u osób ze wszystkimi fototypami skóry, w ciągu całego roku. Uszkodzenie naskórka w efekcie zabiegu mikrodermabrazji staje się impulsem do proliferacji fibroblastów, zwiększenia syntezy kolagenu i elastyny [176, 182, 183]. W trakcie zabiegu usuwane są stare i martwe komórki naskórka wraz ze zgromadzonymi w nich złogami barwnika, prowadząc tym samym do redukcji powierzchownych przebarwień oraz usunięcia drobnych niedoskonałości skóry. Dzięki zmniejszeniu grubości warstwy rogowej naskórka umożliwiona jest także łatwiejsza penetracja rozmaitych substancji aktywnych w głąb skóry. Pojawiające się rzadko objawy uboczne mają charakter przemijający. Obejmują niewielką bolesność podczas zabiegu, uczucie pieczenia i zwiększoną wrażliwość na promieniowanie UV [177].

Obecnie stosowane są dwie podstawowe techniki mikrodermabrazji:

- *mikrodermabrazja z użyciem kryształów korundu* (tlenku glinu), wyrzucanych pod wysokim ciśnieniem w obrębie głowicy zabiegowej zasysającej naskórek, uderzających w powierzchnię skóry, w wyniku czego następuje osłabienie połączeń międzykomórkowych, odrywanie komórek i złogów łojowych od powierzchni skóry. Intensywność zabiegu regulowana jest m.in. przez zmianę ciśnienia zasysania naskórka oraz szybkość przesuwu głowicy. Najczęściej stosowana siła ssąca mieści się w zakresie od 10 do 80 mm Hg [177];
- *mikrodermabrazja diamentowa*, wykorzystuje się głowice diamentowe, różniące się między sobą rozmiarem ziarenek diamentowych i gęstością rozmieszczenia. W zależności od wielkości kryształków diamentu, siły ssącej aparatu i nacisku głowicy osiągane są różne stopnie złuszczenia naskórka. Zabieg ten jest mniej bolesny i równie efektywny, co zabieg mikrodermabrazji z użyciem kryształów trących. Wykonywany jest zwykle w seriach 5-10 zabiegów, w odstępach 1-2 tygodniowych [177].

Przeciwwskazaniem do zabiegu mikrodermabrazji jest trądzik różowaty, kruchość naczyń krwionośnych, rumień skóry, infekcje bakteryjne, grzybicze i wirusowe, toczeń rumieniowaty, łuszczyca i cukrzyca młodzieńcza [177].

Technika mikrodermabrazji jest metodą nieustannie rozwijającą się. Nowymi odmianami tej metody są: hydrabrazja (środkiem trącym jest strumień powietrza i sterylny roztwór soli fizjologicznej) oraz hydradermabrazja (łącząca w sobie elementy klasycznej mikrodermabrazji, z jednoczesnym zastosowaniem substancji aktywnych) [177].

4.6.2.3. Peeling kawitacyjny (peeling ultradźwiękowy)

Zabieg oczyszczania skóry za pomocą aparatu wytwarzającego fale ultradźwiękowe. Powstająca na wilgotnej skórze fala kawitacyjna umożliwia złuszczenie i usunięcie martwych komórek warstwy rogowej naskórka, a także nadmiaru sebum, zaskórników i wągrów. Pozwala na głęboką regenerację skóry, poprawę mikrokrążenia, zwiększenie penetracji substancji aktywnych w głąb skóry, a także rozjaśnienia przebarwień skóry. Stosowany jest jako zabieg poprzedzający inne zabiegi kosmetyczne takie jak sonoforeza, jonoforeza czy eksfoliacja kwasami.

4.6.2.4. Krioterapia

Technika wykorzystywana w leczeniu różnych zmian skórnych, w tym przebarwień skóry [184]. Skuteczna w terapii plam soczewicowatych słonecznych (*lentigo solaris*) i plam soczewicowatych złośliwych (*lentigo maligna*). Zabieg oparty jest na zamrażaniu ciekłym azotem miejsc objętych hyperpigmentacją [184, 185, 186, 187, 188]. Melanocyty wrażliwe na zimno niszczone są w temperaturze od -4°C do -7°C [185]. Powstające po zabiegu odbarwienie nie jest równoznaczne z brakiem aktywnych melanocytów, lecz związane jest z deficytem melanosomów w keranocytach [186]. Krioterapia jest bezpiecznym i skutecznym zabiegiem zapewniającym dobre efekty terapeutyczne. Wykorzystywana jest jako metoda alternatywnego leczenia plam soczewicowatych złośliwych [187, 188].

4.6.2.5. Laseroterapia

Stanowi jedną z najbardziej skutecznych metod usuwania naturalnych przebarwień skóry, tj. plam soczewicowatych, plam pozapalnych, polekowych, przebarwień powstałych w wyniku zmian hormonalnych, piegów oraz wytworzonych w sposób sztuczny - tatuaży [189, 190]. Wykorzystywana jest do usuwania przebarwień umiejscowionych w skórze właściwej i naskórku [77]. Skuteczność laseroterapii, w stosunku do znamion barwnikowych, ostudy i plam soczewicowatych złośliwych, nie została w sposób jednolity ustalona, a zróżnicowanie otrzymanych wyników leczenia nie pozwala uznać jej za standardową metodę leczniczą w wyżej wymienionych przypadkach [190].

Laseroterapia jest metodą leczniczą opartą na niszczeniu melanosomów. Struktury zawierające barwnik są niszczone drogą cieplną, jak również w wyniku rozchodzenia się fali uderzeniowej powstałej przy nagrzaniu tkanki [190].

Melanina jako chromofor posiada szerokie spektrum pochłaniania światła, dlatego też w terapii przebarwień skóry wykorzystywane są m.in.:

- *pulsacyjny laser barwnikowy (PDL)* – emitujący zielone światło o długości fali 510 nm, powodując fototermolizę barwnika obecnego w naskórku. Stosowany w usuwaniu plam soczewicowatych, piegów, brodawek łojotokowych oraz plam typu café-au-lait. Nie wykazuje skuteczności w usuwaniu zmian barwnikowych zlokalizowanych w skórze właściwej, tj. plamy pozapalne i polekowe [189, 190, 191];
- *laser rubinowy typu Q-Switch* - emitujący światło czerwone o długości fali 694 nm, wybiórczo absorbowane przez melaninę. Stosowany w usuwaniu zmian barwnikowych zlokalizowanych w obrębie naskórka i skóry właściwej. Zmiany barwnikowe takie jak plamy pozapalne i ostuda reagują nieco słabiej na światło lasera rubinowego typu Q-Switch, podczas gdy u pacjentów z plamami soczewicowatymi obserwowana jest wysoka skuteczność terapii [191, 192, 193];
- *laser Nd:YAG typu Q-Switch* – wytwarzający promieniowanie podczerwone o długości fali 1064 nm, o krótkim czasie trwania impulsu (10-20 ns) i wysokiej gęstości energii. Stosowany do usuwania zmian barwnikowych położonych w głębszych warstwach skóry, np. znamię Oty, a także do eliminacji zmian naskórkowych, przy wykorzystaniu światła o długości fali 532 nm. Udowodniono, że jest skuteczny w usuwaniu plam soczewicowatych i piegów u pacjentów z fototypem skóry typu IV [193]. Mechanizm działania lasera Nd:YAG typu Q-Switch oparty jest o fototermolizę melanocytów [189, 191];
- *laser aleksandrytowy typu Q-Switch* – wytwarzający falę świetlną o długości 755 nm. Wykazuje zbliżoną skuteczność w usuwaniu zmian barwnikowych do lasera rubinowego typu Q-Switch. Efektywny w usuwaniu plam typu café-au-lait oraz plam soczewicowatych. Zmiany barwnikowe położone głębiej takie jak ostuda czy zmiany pozapalne reagują zdecydowanie słabiej na naświetlanie laserem aleksandrytowym typu Q-Switch [190];
- *intensywne światło pulsacyjne (IPL)* – emitowane przez urządzenia o podobnym mechanizmie działania do laserów. Wytwarzane przez nie światło o długości fali 515-1200 nm umożliwia skuteczne usuwanie zmian barwnikowych, zarówno naskórkowych, jak i umiejscowionych w skórze właściwej [189]. Wykazano, że IPL

jest wysoce efektywne w usuwaniu plam soczewicowatych oraz piegów [194, 195, 196].

Fototyp skóry pacjenta, a także głębokość usytuowania przebarwienia skóry są czynnikami decydującymi o wyborze odpowiedniego rodzaju lasera i właściwej długości fali. Zabiegów nie wykonuje się u osób z czynną infekcją wirusem opryszczki zwykłej (HVS), opaloną skórą i stosujących doustną terapię retinoidami.

4.6.2.6. Terapię fotodynamiczną (PDT)

Jest nieinwazyjną metodą leczniczą wykorzystującą substancje światłouczulające, tlen oraz światło widzialne, do uszkodzenia i zniszczenia komórek zmienionych chorobowo. Nasilenie efektu fotodynamicznego uzależnione jest od stężenia i dystrybucji substancji światłouczulającej w tkankach zmienionych chorobowo, a także od energii światła zaabsorbowanej przez fotosensybilizatory [77]. Obecnie w zabiegach wykorzystywany jest 20% roztwór kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) i rozmaite lasery, i źródła światła [188]. Wykazano, że zastosowanie PDT, w połączeniu z niebieskim światłem, w leczeniu przebarwień skóry stanowi dobrą alternatywę dla metod leczenia zewnętrznego [79]. Udowodniono, że terapia fotodynamiczna jest skuteczną i trwałą metodą terapeutyczną w leczeniu *melasmy* [196].

Leczenie przebarwień skóry jest procesem długotrwałym. Wymaga regularnego stosowania środków rozjaśniających i wykonywania serii zabiegów terapeutycznych. Powinno być odpowiednio dobrane do lokalizacji, rozległości i przyczyny powstawania przebarwienia skóry. Terapia powinna być wdrażana z rozwagą i uwzględniać również działania profilaktyczne. W celu zwiększenia skuteczności terapeutycznej leczenie powinno być prowadzone wielokierunkowo i z uwzględnieniem stosowania terapii skojarzonej.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W oparciu o analizę danych źródłowych z piśmiennictwa wiadomo, że arbutyna, naturalny glikozyd hydrochinonu, posiada właściwości rozjaśniające przebarwienia skóry i jest związkiem bezpiecznym, i mniej cytotoksycznym, w porównaniu z hydrochinonem, wykorzystywanym dotychczas w kosmetyce. Dlatego właśnie znajduje ona coraz szersze zastosowanie w leczeniu przebarwień skóry [199].

Duże zainteresowanie naturalnymi preparatami kosmetycznymi, przeznaczonymi do pielęgnacji skóry z zaburzeniami barwnikowymi stwarza potrzebę ciągłego doskonalenia i opracowywania nowych receptur kosmetycznych. Ponadto liczne kontrowersje jakie budzi bezpieczeństwo terapii hydrochinonem wymusza konieczność eliminacji tego składnika z receptur kosmetycznych i zastępowania go alternatywnymi związkami.

Zważywszy na obecny stan wiedzy na temat mechanizmu działania arbutyny oraz roli jaką pełni w hamowaniu aktywności tyrozynazy i procesu syntezy melaniny wydaje się być ona dobrym materiałem badawczym. Dlatego też w ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę opracowania i przetestowania oryginalnego produktu kosmetycznego, przeznaczonego do pielęgnacji skóry z zaburzeniami barwnikowymi, zawierającego w swoim składzie arbutynę. Zrealizowane do tej pory prace badawcze prowadzone były w dużej mierze z wykorzystaniem arbutyny syntetycznej. Planowane badania mają na celu ocenę przydatności kosmetycznej wyciągu roślinnego, bogatego w arbutynę, w pielęgnacji skóry z przebarwieniami. Jest to pionierskie badanie nieznanego dotąd surowca roślinnego. Jako materiał badawczy wybrano liście sierpika pięciolistnego (*Serratulae quinquefoliae folium*), surowca nie stosowanego dotychczas w preparatach kosmetycznych. Jego wstępne analizy fitochemiczne wykazały, że arbutyna jest tutaj związkiem dominującym i prawdopodobnie występuje w dużym stężeniu [8]. W związku z tym liście sierpika pięciolistnego stały się przedmiotem dalszych badań fitochemicznych zaprezentowanych w niniejszej pracy. Wyżej wymieniony gatunek, uprawiany w ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UM w Poznaniu, wydaje się być równie interesujący z kosmetycznego punktu widzenia. Może bowiem stanowić alternatywne źródło pozyskania naturalnej arbutyny i zastąpić dotychczas stosowaną w tym celu mącznicę lekarską, jak wspomniano, gatunku w Polsce chronionego.

Kolejnym zagadnieniem skłaniającym do podjęcia pracy badawczej jest zawartość arbutyny w preparatach kosmetycznych. Wyniki badań z 1988 roku dowodzą, że jej 3% stężenie w kosmetykach znacząco zmniejsza intensywność przebarwień skóry [200]. W projektowanym badaniu przewidziane jest użycie zbliżonego stężenia arbutyny,

mianowicie 2,5%. Duże stężenie arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego, skłania do przeprowadzenia analiz ich przydatności w pielęgnacji skóry z przebarwieniami. W świetle danych z piśmiennictwa wydaje się, że opracowywany preparat, zawierający standaryzowany na zawartość arbutyny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego, powinien przynieść zamierzone efekty kosmetyczne. Efektywne, standaryzowane na zawartość arbutyny wyciągi z tego surowca, stanowiłyby podstawę do wprowadzenia na rynek kosmetyczny preparatu z tańszą i łatwiej dostępną niż dotychczas stosowaną w przebarwieniach, substancją aktywną.

W celu realizacji powyższych założeń postanowiono:

- wyizolować arbutynę z liści sierpika pięciolistnego,
- stwierdzić absolutną strukturę izolowanego związku,
- podjąć próbę opracowania skutecznej metody otrzymywania arbutyny, jako głównego związku występującego w liściach sierpika pięciolistnego,
- przygotować wyciąg z liści sierpika pięciolistnego do prób kosmetycznych,
- określić zawartość arbutyny w wyciągu metodą HPLC,
- opracować recepturę preparatu zawierającego wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego,
- wykorzystać opracowany preparat w ocenie efektywności i przydatności kosmetycznej wyciągu z liści sierpika pięciolistnego, w testach aplikacyjnych z udziałem probantów.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

A. BADANIA FITOCHEMICZNE

1. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły liście sierpika pięciolistnego (*Serratulae quinquefoliae folium*), zebrane w czerwcu i wrześniu 2010 roku. Sierpik pięciolistny uprawiany był w Ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu od 2007 roku, pod numerem katalogowym 162/89.

Surowiec suszono w suszarni z nawiewem, w temperaturze około 40⁰C, a następnie rozdrobniono. Uzyskano: 250g surowca do badań fitochemicznych oraz 427g do prób kosmetycznych.

2. Metody izolacyjne

2.1. Przygotowanie wyciągów

Z wysuszonych i rozdrobnionych liści sierpika pięciolistnego przygotowano dwa rodzaje wyciągów:

- metanolowy – przeznaczony do izolacji arbutyny,
- wodny – do testów kosmetycznych.

2.1.1. Przygotowanie wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego do izolacji arbutyny

Wysuszony i rozdrobniony surowiec, o masie 250g, poddano trzykrotnej maceracji alkoholem metylowym, w temperaturze pokojowej. Zebrane ekstrakty metanolowe przesączono i połączono, a następnie zagęszczono na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze około 40°C. Otrzymano 16g suchego wyciągu, który stanowił materiał do izolacji arbutyny.

2.1.2. Przygotowanie wyciągu wodnego do testów kosmetycznych

Wysuszony i rozdrobniony surowiec, o masie 427g poddano ekstrakcji oczyszczoną wodą, w temperaturze 90-100⁰ C. Prowadzono trzystopniową, wyczerpującą ekstrakcję, zużywając 9500 g rozpuszczalnika (stosunek surowca do ekstrahenta 1 : 22,2).

Zebrane eluaty połączono uzyskując 7100g wyciągu, który następnie zagęszczono do 580g. Do wyciągu dodano 0,2% sorbinianu potasu i dalej zagęszczano. Otrzymano 220g ekstraktu, który poddano analizie mikrobiologicznej i ilościowej (Zał.1, str.150). W sumie uzyskano 160g gęstego, czystego mikrobiologicznie wyciągu, zawierającego 9,3% (m/m) arbutyny, stanowiącego materiał do testów kosmetycznych, z udziałem probantów.

Wyciąg przygotowano i zanalizowano w laboratorium fitochemicznym Phytopharm Kłęka S.A. w Nowym Mieście nad Wartą.

2.2. Chromatografia kolumnowa (CC)

Chromatografię kolumnową zastosowano w celu izolacji arbutyny zawartej w wyciągu metanolowym z liści sierpika pięciolistnego. Rozdział chromatograficzny prowadzono w szklanej kolumnie chromatograficznej, wypełnionej żelom krzemionkowym firmy Merck (Silicagel 60, Art. 107733.5000), zawieszonym w chlorku metylenu, stosując odpowiednio dobrane fazy ruchome (Tab.8).

Tabela 8. Fazy rozwijające stosowane w chromatografii kolumnowej.

Skład fazy rozwijającej	Proporcje rozpuszczalników (V/V)
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	15 : 1
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	10 : 1
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	8 : 1
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	6 : 1
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	5 : 1
chlerek metylenu : metanol (CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH)	4 : 1

Rozdział składników wyciągu i badanych frakcji na kolumnie kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, stosując jako fazę rozwijającą mieszaninę rozpuszczalników podanych w Tab. nr 9.

3. Metody identyfikacji

3.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Technikę chromatografii cienkowarstwowej wykorzystano do:

- analizy frakcji z rozdziału kolumnowego,
- oceny stopnia czystości otrzymanej arbutyny,
- identyfikacji arbutyny.

W metodzie TLC zastosowano płytki aluminiowe pokryte żelazem krzemionkowym f-my Merck, o grubości warstwy absorbentu 0,25 mm (25 DC - Alufolien, Kieselgel 60, Art. 5553). Do oceny składu jakościowego wyciągów wykorzystano wzorzec β -arbutyny firmy Fluka AG, Buchs S.C., o numerze katalogowym 151833.

Płytki chromatograficzne rozwijano techniką wstępującą, jednokierunkową, w temperaturze pokojowej, przy ciśnieniu atmosferycznym, wykorzystując komory szklane z odpowiednią mieszaniną rozpuszczalników (Tab.9). Uzyskane chromatogramy suszono i wywoływano poprzez spryskiwanie 0,5% odczynnikiem anyżowym¹. Następnie płytki ogrzewano 3 min. w temperaturze 110°C. Wywołane chromatogramy obserwowano w świetle dziennym oraz świetle lampy UV ($\lambda=366$ nm).

Tabela 9. Fazy rozwijające stosowane w chromatografii cienkowarstwowej.

Skład fazy rozwijającej	Proporcje rozpuszczalników (V/V)
chlerek metylenu : metanol (CH_2Cl_2 : CH_3OH)	4 : 1
chlerek metylenu : aceton (CH_2Cl_2 : $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$)	1 : 2
heksan : octan etylu : metanol (C_6H_{14} : ETOAc : CH_3OH)	2 : 1 : 2

3.2. Oznaczenie temperatury topnienia

Temperaturę topnienia analizowanego związku A określano za pomocą aparatu Büchi B-540 f-my BÜCHI. W celu określenia średniej temperatury topnienia analizowanego związku wykonano trzy kolejne pomiary.

¹ Odczynnik anyżowy: 0,5 cm³ aldehydu anyżowego, 50 cm³ kwasu octowego, 1 cm³ stężonego kwasu siarkowego.

3.3. Absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni (IR)

Spektroskopię w podczerwieni (IR) wykorzystano do ustalenia obecnych w związku A wiązań i grup funkcyjnych. Analizę przeprowadzono w Zakładzie Fizyki Chemicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Widmo badanego związku A rejestrowano spektrometrem FT-IR (spektrometr podczerwieni z transformacją Fouriera) Nicolet, Magna IR-560.

3.4. Spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Do określenia struktury związku A wykorzystano spektroskopię NMR. Widma ^1H NMR, ^{13}C NMR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR zostały zarejestrowane na spektrofotometrze Varian 600 MHz, przy częstotliwości 600 MHz. Widma wykonano we współpracy z pracownią NMR Wydziału Chemii Uniwersytetu im A. Mickiewicza w Poznaniu. Interpretację widm przeprowadzono samodzielnie. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) oraz stałe sprzężenia (J) oceniono na podstawie widm protonowych i węglowych.

3.5. Rentgenowska analiza strukturalna

Strukturę krystaliczną i molekularną związku A określono metodą rentgenowskiej analizy strukturalnej w Zakładzie Fizyki Kryształów Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Refleksy dla monokryształów zebrano za pomocą monokrystalicznego dyfraktometru rentgenowskiego KUMA KM-4, wyposażonego w lampę rentgenowską Mo K_λ (promieniowanie Mo K_λ o długości fali $\lambda=0.71069 \text{ \AA}$), monochromator grafitowy, goniometr 4-kołowy geometrii kappa oraz detektor powierzchniowy typu CCD, metodą skanowania refleksów ω w temperaturze 293(2) K.

4. Chromatografia kolumnowa (CC) wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego – izolacja związku A

Na kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym o grubości ziaren 35-70 mesh, zawieszonym w chlorku metylenu naniesiono 16g wyciągu metanolowego. Kolumnę eluowano początkowo chlorkiem metylenu, a następnie mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w proporcji 15:1, zwiększając polarność układu poprzez wzrastające stężenie metanolu (Tab.8). Z kolumny chromatograficznej zebrano eluaty o poj. 8 ml. W wyniku chromatografii otrzymano 5 frakcji (Tab.10).

Tabela 10. Chromatografia kolumnowa wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego.

Numer frakcji	Liczba plam	Układ rozwijający	Barwa plam	R _f
1	2	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH	ciemnozielona	0,94
		10 : 1	purpurowa	0,89
2	2	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH	szara	0,63
		8 : 1	szara	0,52
3	1 smugi	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH 7 : 1	żółta	0,37
4	1	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH 5 : 1	brunatna	0,28
5	1	CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH 4 : 1	brunatna	0,32

Dwie pierwsze frakcje, oznaczone numerem 1 i 2, zawierały słabo wybarwiający się na chromatogramach kontrolnych związek. We frakcji numer 3 wykryto metodą TLC związek w postaci smugi. Natomiast frakcje numer 4 i 5 okazały się jednoplanowe, zawierały związek wybarwiający się na chromatogramie na kolor brunatny. Oznaczono go symbolem A. Frakcje numer 4 i 5 połączono oraz zagęszczono, a następnie pozostawiono do krystalizacji w temperaturze około 5⁰C. Uzyskano w ten sposób kremową, bezpostaciową substancję, którą oczyszczano poprzez ponowne rozpuszczanie w 99,8% metanolu i dodanie dwukrotnej objętości chloroformu. Roztwór pozostawiono w temperaturze 5⁰C. Po 48 godzinach otrzymano krystaliczną substancję w postaci długich, białych igieł. Razem pozyskano 5013,3 mg związku A.

5. Identyfikacja związku A

5.1. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Układ rozwijający:

- CH_2Cl_2 : CH_3OH (4:1), $R_f = 0,32$
- CH_2Cl_2 : $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (1:2), $R_f = 0,18$
- C_6H_{14} : ETOAc : CH_3OH (2:1:2), $R_f = 0,76$

Barwa w świetle dziennym: brunatna.

Barwa w świetle UV ($\lambda = 366 \text{ nm}$): brązowa.

Obserwowana na chromatogramie brunatna plama związku A oraz jej R_f w trzech wymienionych wyżej układach, jest zgodna z wzorcem β -arbutyny. Ryc. nr 6 przedstawia dokumentację jednego z nich.



Objaśnienia chromatogramu:

- 1 – związek A
- 2 – wyciąg metanolowy z liści sierpika pięciolistnego
- 3 – wzorzec β -arbutyny
- S – start
- F – meta

Adsorbent: żel krzemionkowy

Układ rozwijający:

chlorek metylenu– metanol (4:1)

Wywoływacz: odczynnik anyżowy

Rycina 6. Chromatogram związku A i wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego, wobec wzorca β -arbutyny.

5.2. Oznaczanie temperatury topnienia

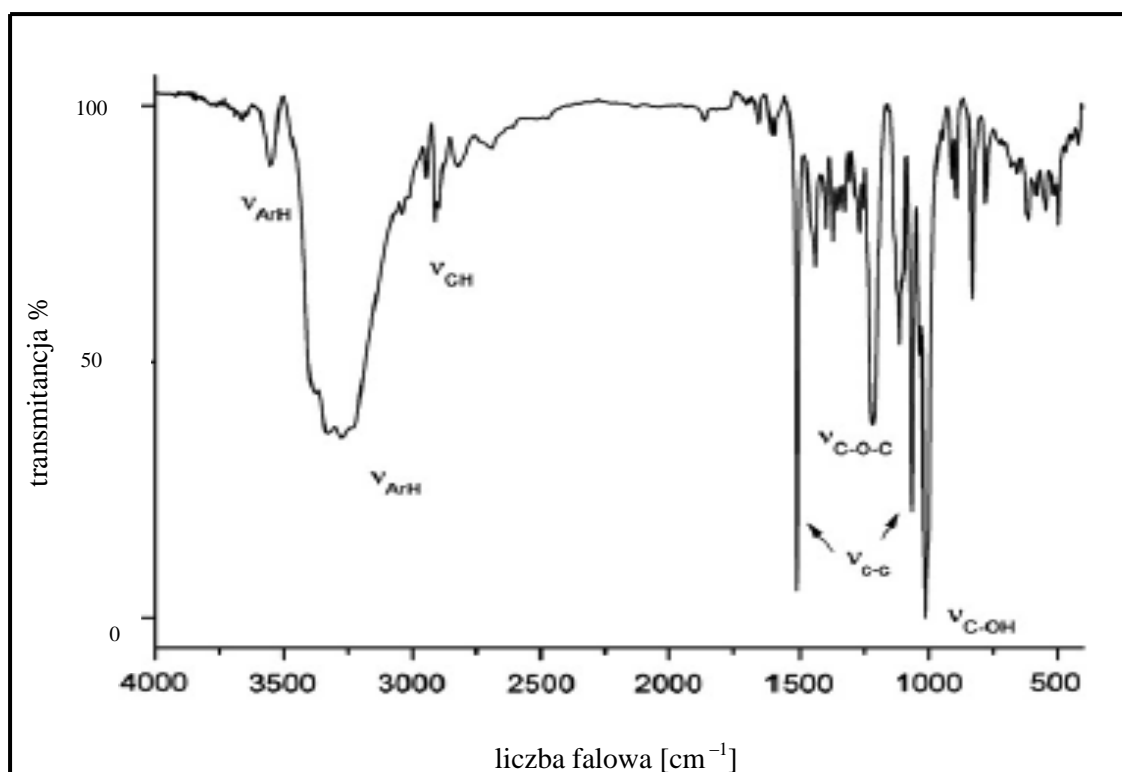
Temperaturę topnienia zmierzono aparatem Büchi B-540. Badany związek A topi się natychmiast i całkowicie w temp. $199,5^{\circ}\text{C}$, co jest zgodne z temperaturą topnienia β -arbutyny [27].

5.3. Spektroskopia w podczerwieni (IR)

Strukturę badanego związku A określono metodą spektroskopii w podczerwieni. Do pomiarów wykorzystano próbki związku A, przygotowane w postaci pastylek z KBr. Widmo FT-IR związku A wykonano przy rozdzielczości 1 cm^{-1} , w obszarze liczb falowych $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$.

Na widmie FT-IR związku A (Ryc.7) zaobserwowano pasma absorpcji w zakresach:

- 3552 cm^{-1} , odpowiadające drganiom licznym grup $-\text{OH}$,
- 3332 cm^{-1} i 3275 cm^{-1} - drgania rozciągające wiązań C-H,
- 1652 cm^{-1} i 1601 cm^{-1} oraz 1513 cm^{-1} i 1113 cm^{-1} - drgania rozciągające między C-C w pierścieniu fenylowym,
- 1291 cm^{-1} i 1066 cm^{-1} - wiązanie eterowe (R -O- R),
- 1014 cm^{-1} , C-OH.



Rycina 7. Widmo FT-IR związku A.

5.4. Spektroskopia NMR

Identyfikację związku A przeprowadzono spektroskopią NMR (^1H NMR, ^{13}C NMR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR cosy). Próbki związku A rozpuszczano w metanolu.

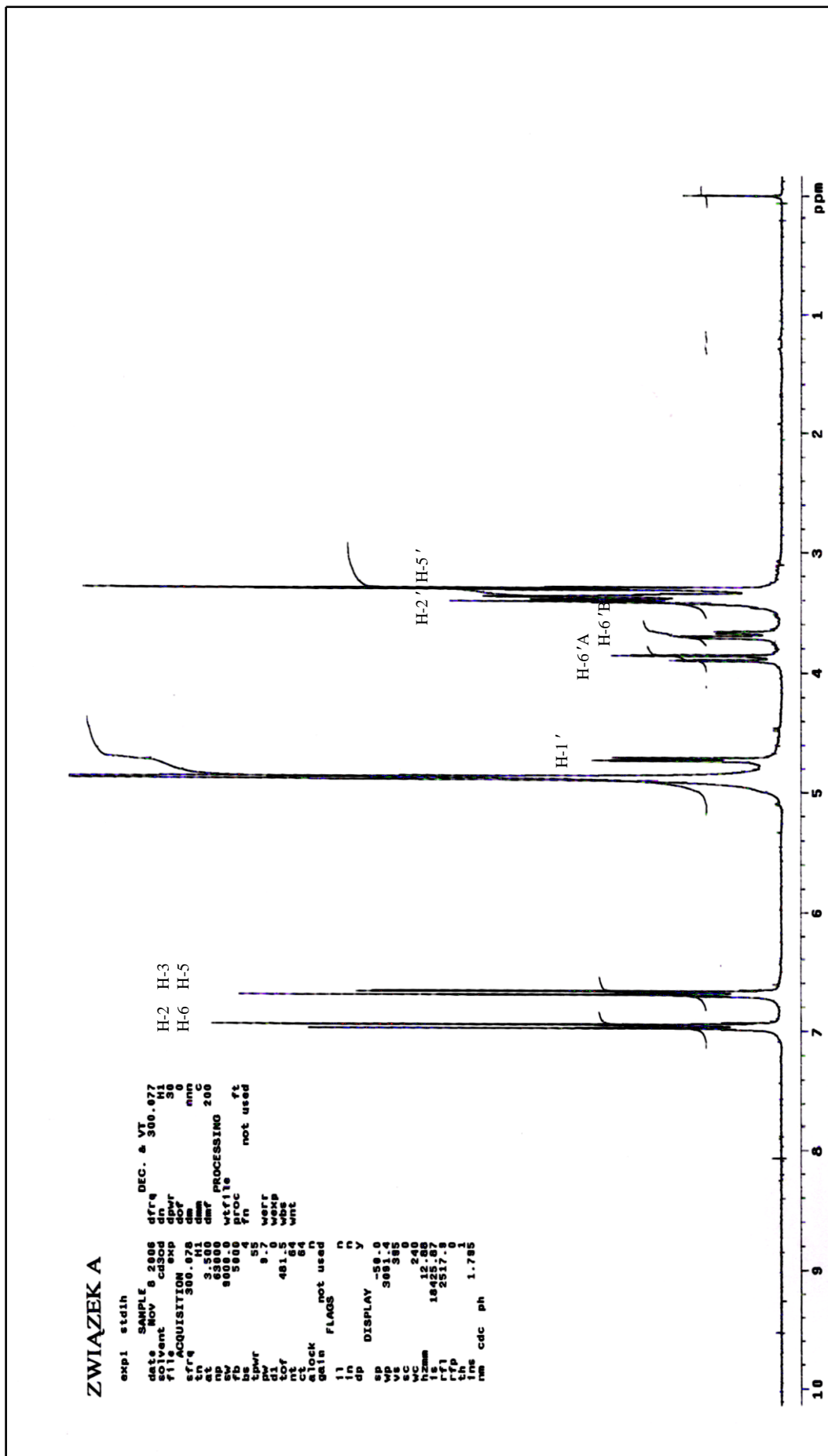
5.4.1. Analiza ^1H NMR

Na widmie ^1H NMR (Ryc.8, Tab.11) widoczne były sygnały protonów H-2, H-6, H-3 oraz H-5, pochodzących od węgli z wiązaniem podwójnym (*d* przy 6,98 ppm i 6,84 ppm). Świadczy to, o obecności pierścienia benzenowego w badanym związku A. Brak sygnałów od protonów, przy węglach C-1 i C-4, sugeruje natomiast o obecności podstawników przy wyżej wymienionych węglach. Na widmie ^1H NMR widoczne były również sygnały pomiędzy 3 i 5 ppm, charakterystyczne dla cząsteczki glukozy (ugrupowanie CH-OH). Sygnał protonu przy 4,72 ppm (*d*), przy stałej sprzężenia $J=7,7$ Hz świadczy o położeniu α protonu przy węglu C1', co wskazuje, że związek A jest β -epimerem. Na widmie protonowym widoczne były także charakterystyczne sygnały (*dd* 3,86 ppm i *dd* 3,71 ppm), świadczące o obecności ugrupowania CH_2OH w glukozie.

Tabela 11. Przesunięcia chemiczne δ (ppm) oraz stałe sprzężenia (J) związku A.

proton	związek A ^1H NMR / CD_3OD , 600 MHz	
	[ppm]	[Hz]
H-2, H-6	6,98 <i>d</i>	$J = 9,1$
H-3, H-5	6,84 <i>d</i>	$J = 9,1$
H- 1'	4,72 <i>d</i>	$J_{1'2'} = 7,7$
H-6'A	3,86 <i>dd</i>	$J_{6'A6'B} = 12,4$ $J_{6'A4'} = 5,6$
H-6'B	3,71 <i>dd</i>	$J_{6'B6'A} = 12,4$ $J_{6'B5'} = 2,0$
H-2' - H-5'	3,53 – 3,25 <i>m</i>	

Objaśnienia tabeli: *d* – dublet, *dd* – dublet dubletów, *m* – multiplet, J – stała sprzężenia



Rycina 8. Widmo ¹H NMR związku A.

5.4.2. Analiza ^{13}C NMR

Wysokie wartości ppm, odpowiednio 153,7 i 152,3 na widmie ^{13}C NMR (Ryc.9, Tab.12), potwierdziły obecność węgla czwartorzędowych C-1 i C-4, z podstawnikiem tlenowym w szkielecie benzenowym. Sygnały przy 119,3 ppm (C-2, C-6) i 116,6 ppm (C-3, C-5) potwierdziły obecność wiązań podwójnych w pierścieniu benzenowym. Ponadto sygnały przy 62,0 ppm (C-6') i 103,6 ppm (C-1') jednoznacznie wskazywały o obecności cząsteczki glukozy w związku A i charakterystycznych dla niej połączeń węgla trzeciorzędowych: C-3' (78,07 ppm), C-5' (78,02 ppm), C-2' (75,0 ppm) i C-4' (71,5 ppm). Na widmie ^{13}C NMR zaobserwowano także sygnał pochodzący od węgla drugorzędowego C-6' (62,0 ppm), wskazujący na połączenie CH_2OH przy węglu szóstym glukozy.

Tabela 12. Przesunięcia chemiczne δ (ppm) związku A.

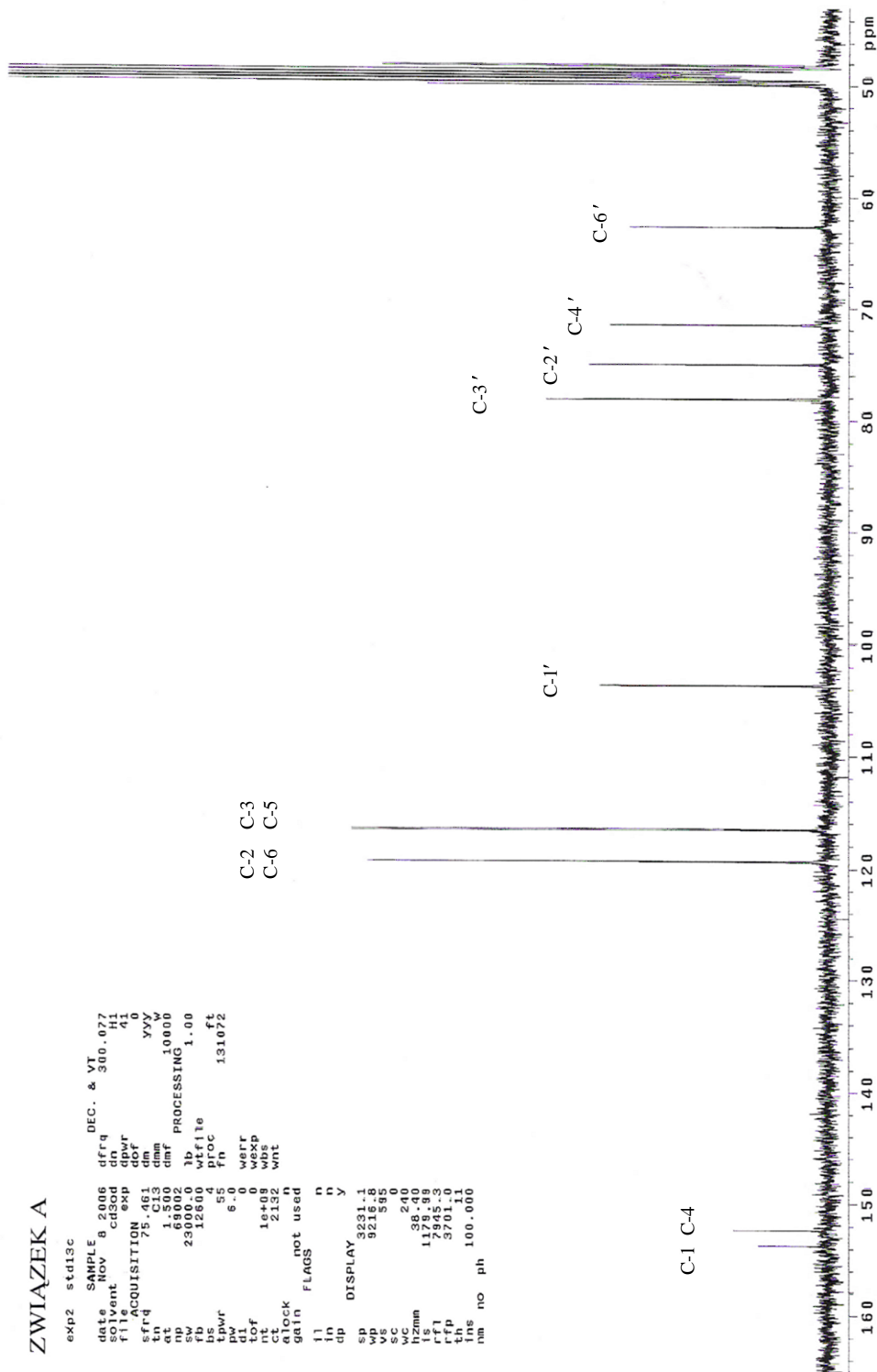
węgiel	związek A ^{13}C NMR / CD_3OD , 600 MHz [ppm]
C-1	153,7
C-4	152,3
C-2, C-6	119,3
C-3, C-5	116,6
C-1'	103,6
C-3'	78,07
C-5'	78,02
C-2'	75,0
C-4'	71,5
C-6'	62,0

ZWIĄZEK A

```

exp2 std13c
date SAMPLE 8 2006
solvent Nov cd3od
F1 ACQUISITION exp
SFRQ 75.461
IN 1.503
NU 69002
SW 23000.0
AQ 12600
RG 55
FID 131072
DEC. & VT
dfrq 300.077
dn H1
dof 40
xyy
dm
dmm 10000
cmr PROCESSING
lb 1.00
wflte
fr c
tpwr 6.0
wrt
to 0
nt 1e+09
ct 2132
wnt
lock
gain not used
F1 11
F2 11
F3 11
F4 11
F5 11
F6 11
F7 11
F8 11
F9 11
F10 11
F11 11
F12 11
F13 11
F14 11
F15 11
F16 11
F17 11
F18 11
F19 11
F20 11
F21 11
F22 11
F23 11
F24 11
F25 11
F26 11
F27 11
F28 11
F29 11
F30 11
F31 11
F32 11
F33 11
F34 11
F35 11
F36 11
F37 11
F38 11
F39 11
F40 11
F41 11
F42 11
F43 11
F44 11
F45 11
F46 11
F47 11
F48 11
F49 11
F50 11
F51 11
F52 11
F53 11
F54 11
F55 11
F56 11
F57 11
F58 11
F59 11
F60 11
F61 11
F62 11
F63 11
F64 11
F65 11
F66 11
F67 11
F68 11
F69 11
F70 11
F71 11
F72 11
F73 11
F74 11
F75 11
F76 11
F77 11
F78 11
F79 11
F80 11
F81 11
F82 11
F83 11
F84 11
F85 11
F86 11
F87 11
F88 11
F89 11
F90 11
F91 11
F92 11
F93 11
F94 11
F95 11
F96 11
F97 11
F98 11
F99 11
F100 11
nm no ph
  
```

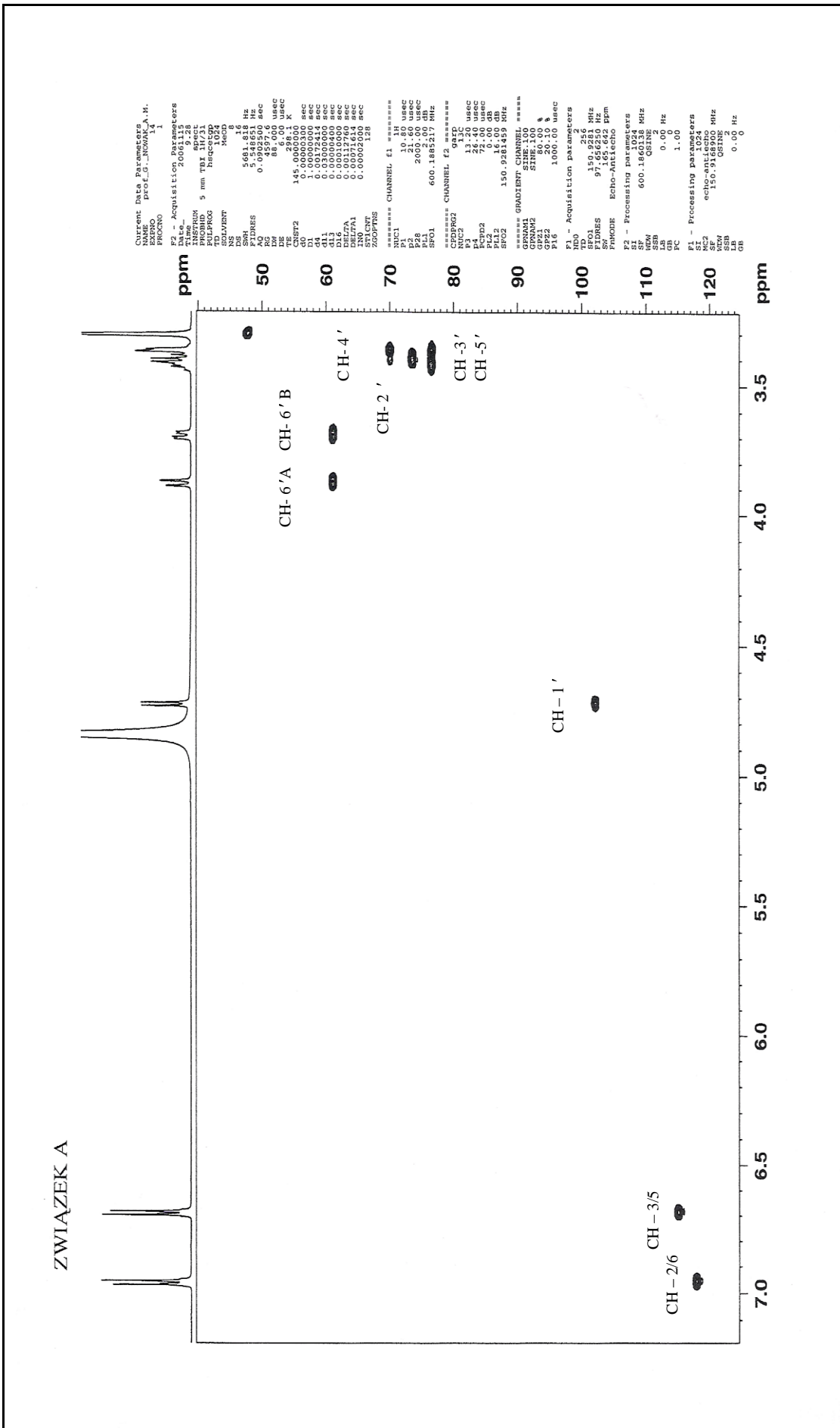
C-2 C-3
C-6 C-5



Rycina 9. Widmo ^{13}C NMR związku A.

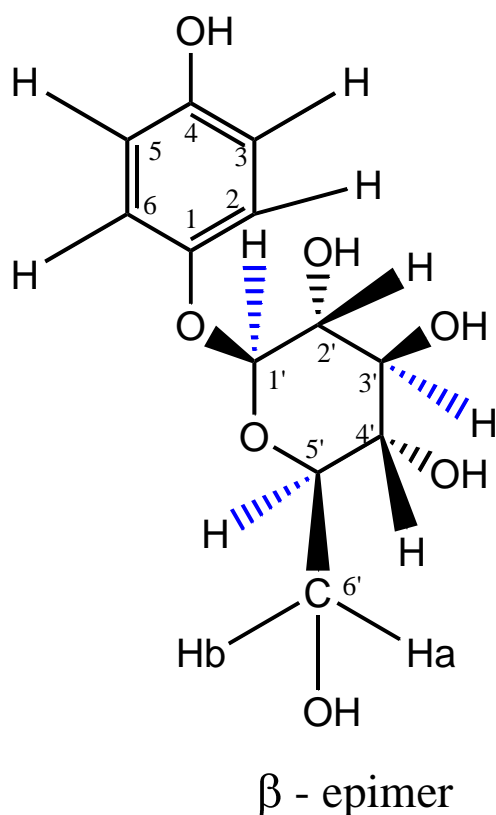
5.4.3. Analiza $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR cosy

Interpretacja widma protonowego i węglowego została potwierdzona poprzez wykreślenie widma korelacyjnego $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR cosy (Ryc.10), na którym bardzo łatwo można było przyporządkować zidentyfikowane protony odpowiednim atomom węgla.



Rycina 10. Widmo ¹H/¹³C NMR cosy związku A.

Na podstawie interpretacji widm ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR cosy można stwierdzić, że otrzymanym związkiem A jest 4'-hydroksyfenylo- β -D-glukopiranozyd (β -arbutyna) (Ryc.11).



Rycina 11. Wzór strukturalny β -arbutyny.

5.5. Rentgenowska analiza strukturalna

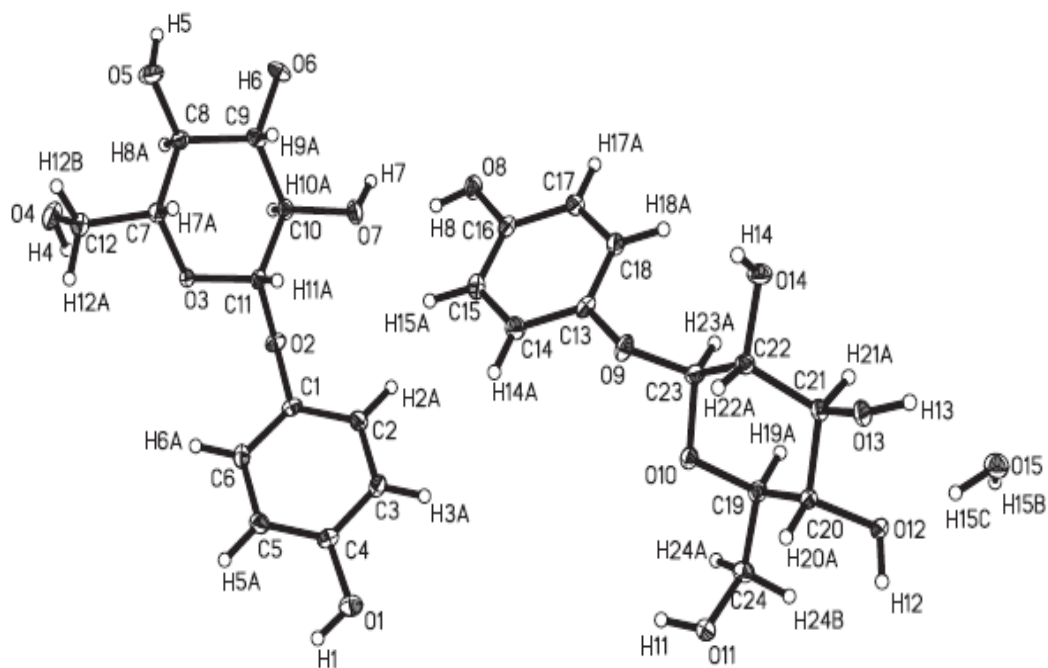
Kryształ związku A, który otrzymano w wyniku krystalizacji (metanol/chloroform) w laboratorium Katedry (Ryc.12), schłodzono zimnym strumieniem suchego azotu i poddano analizie za pomocą monokrystalicznego dyfraktometru rentgenowskiego KUMA KM-4. Zarejestrowano natężenia rentgenowskich refleksów dyfrakcyjnych oraz sprawdzono stabilność wiązki promieniowania rentgenowskiego podczas zbierania danych. Nie zaobserwowano żadnych zmian w ich natężeniu.



Rycina 12. Kryształy związku A.

W celu uzyskania przybliżonego modelu struktury związku A w obliczeniach wykorzystano metodę ciężkiego atomu, a następnie anizotropowo udokładniono położenie atomów nie wodorowych, stosując metodę najmniejszych kwadratów, opartą o F^2 (kwadrat czynnika struktury). Atomy wodoru założono w sposób geometryczny, z odległościami 0.95 Å od odpowiednich atomów węgla i udokładniono je jako „ruchome” (ang. riding model), traktując przesunięcie w obrębie takiego modelu, w ten sam sposób jak przesunięcie atomu, z którym jest on związany. Wielkość izotropowych czynników atomów wodoru określono jako 1.2 ekwiwalentnych czynników temperaturowych atomów, z którymi są związane. Obliczono analityczną korekcję na czynnik absorpcyjny w oparciu o kształt kryształu używając pakietu programów RED167 (Oxford Diffraction 2000). Ważony czynnik zgodności (wR) oraz dobroć dopasowania (S) oparte zostały o F^2 , natomiast konwencjonalny czynnik (R) na F (czynnik struktury). Do obliczeń wykorzystano programy SHELXS97, SHELXL97 oraz SHELXTL [201].

Na podstawie obliczeń otrzymano wykres struktury cząsteczkowej analizowanego związku A (Ryc.13).



Rycina 13. Wykres struktury cząsteczkowej związku A [201].

6. Oznaczanie β -arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

Oznaczenie zawartości arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego wykonano we współpracy z laboratorium fitochemicznym Phytopharm Kłęka S.A. w Nowym Mieście nad Wartą, metodą HPLC.

Oznaczenia arbutyny wykonano według monografii dla liści mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*), opisanej w Farmakopei Europejskiej 6.1 (04/2008:1054) [202].

Widmo β -arbutyny rejestrowano aparatem LaChrom Elite firmy VWR-Hitachi.

Warunki chromatografowania:

- kolumna chromatograficzna HyperClone 5 BDS C18 o wymiarach 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex),
- szybkość przepływu eluentu ($w=1,2$ ml/min),
- temperatura pracy kolumny 25⁰C,
- długość fali detekcji ($\lambda=280$ nm),
- objętość nastrzyku: 20 μ l,
- tabela gradientu: faza ruchoma: A: CH₃OH,
faza ruchoma: B: H₂O, pH=2,6 (Tab.13),
- czas analizy 20 min.

Tabela 13. Tabela gradientu fazy ruchomej zastosowanej w HPLC.

czas [min]	udział % A	udział % B	przepływ [ml/min]
0,0	10	90	1,2
8,0	10	90	1,2
8,1	20	80	1,2
15,0	20	80	1,2
15,1	10	90	1,2
20,0	10	90	1,2

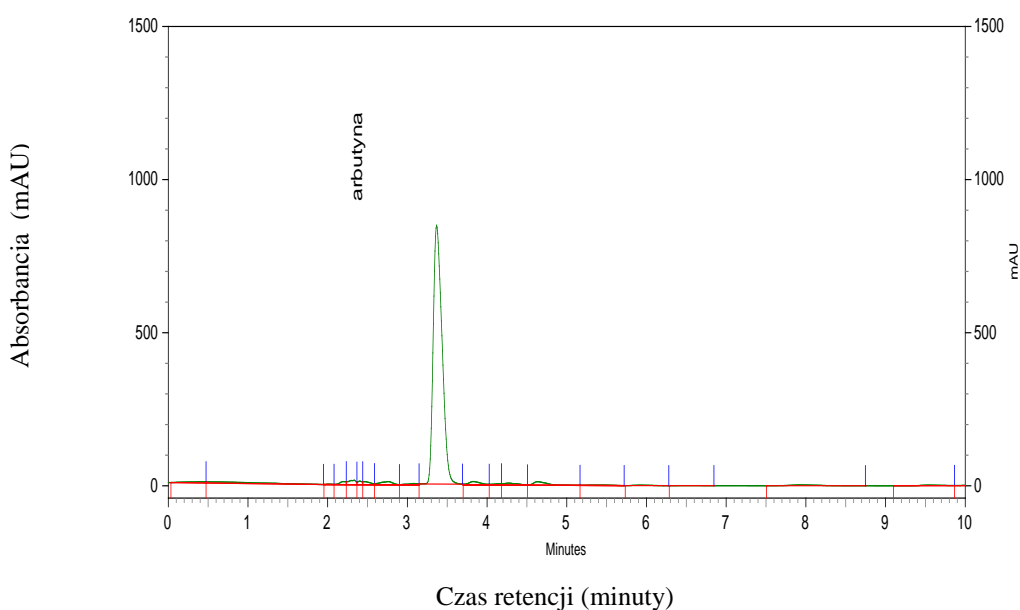
Do oznaczenia użyto następujących wzorców:

- β -arbutyna CRS (czystość 93,5%, stężenie wzorca, $c=0,976$ (mg/ml),
- hydrochinon >99% (Fluka),
- wzorzec SST: arbutyna, $c=0,244$ (mg/ml), hydrochinon, $c=0,1415$ (mg/ml).

Przygotowanie roztworu próby badanej:

Do kolby miarowej poj. 50ml odważono około 0,4g wysuszonych liści sierpika pięciolistnego. Następnie do kolby dodano 30ml 10% (v/v) metanolu i wstawiono na 5 min. do łaźni ultradźwiękowej. Całość wymieszano i dopełniono rozpuszczalnikiem. Powstały roztwór przesączono przez strzykawkowy filtr membranowy 0,45 μ m (Schleicher&Schüell).

Wykonano dwa kolejne oznaczenia zawartości β -arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego, zebranych i wysuszonych w czerwcu 2010 roku. Otrzymane w wyniku rozdziału piki chromatograficzne o czasie retencji, $t_R=3,36$ w pierwszym i $t_R=3,37$ w drugim oznaczeniu, zidentyfikowano jako widmo β -arbutyny. Ryc. nr 14 przedstawia dokumentację jednego z pomiarów.



Rycina 14. Chromatogram β -arbutyny z liści sierpika pięciolistnego.

Analiza metodą HPLC wykazała, że średnia zawartość β -arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego wynosi 6,86% (według pierwszego oznaczenia 6,81% i drugiego 6,91%).

Wykonano także pomiar zawartości β -arbutyny w ziele sierpika pięciolistnego, zebranego i wysuszonego w sierpniu 2010 roku. Przy zastosowaniu identycznych warunków pomiaru jakich użyto przy oznaczeniach przedstawionych wyżej wykazano, że znajduje się w nim 6,71% β -arbutyny.

Uzyskane wyniki sugerują, że jest to stała zawartość tego związku w częściach nadziemnych sierpika pięciolistnego.

7. Oznaczanie zawartości β -arbutyny w wodnym wyciągu z liści sierpika pięciolistnego, przeznaczonych do badań kosmetycznych, metodą HPLC

Oznaczenie zawartości arbutyny w wyciągu wodnym z liści sierpika pięciolistnego wykonano, jak poprzednio, we współpracy z laboratorium fitochemicznym Phytopharm Kłęka S.A., metodą HPLC.

Oznaczenia zawartości arbutyny wykonano według monografii dla liści mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*), opisaney w Farmakopei Europejskiej 6.1 (04/2008:1054).

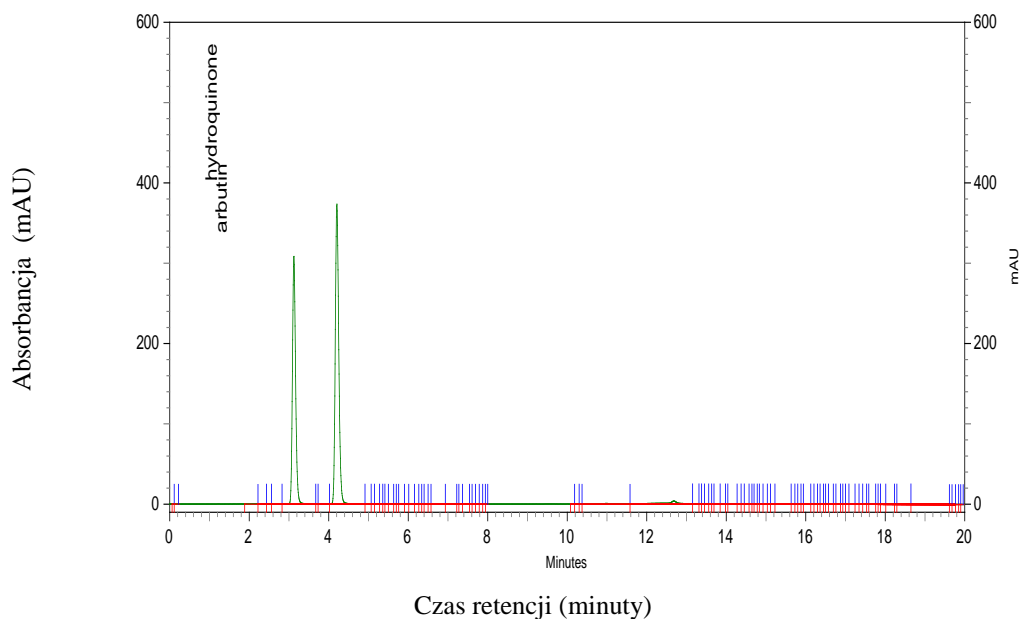
Widmo β -arbutyny rejestrowano przy użyciu aparatu LaChrom Elite firmy VWR-Hitachi. Zastosowano identyczne, jak poprzednio, warunki chromatografowania:

- kolumna chromatograficzna HyperClone 5 BDS C18, o wymiarach 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex),
- szybkość przepływu eluentu ($w=1,2$ ml/min),
- temperatura pracy kolumny 25⁰C,
- długość fali detekcji ($\lambda=280$ nm),
- objętość nastrzyku: 20 μ l,
- tabela gradientu: faza ruchoma: A: CH₃OH,
faza ruchoma: B: H₂O, pH=2,6 (Tab.13),
- czas analizy 20 min.

Do oznaczenia użyto następujących wzorców:

- β -arbutyna CRS (czystość 93,5%, stężenie wzorca, $c=0,976$ (mg/ml)),
- hydrochinon >99% (Fluka),
- wzorzec SST: arbutyna, $c=0,244$ (mg/ml), hydrochinon, $c=0,1415$ (mg/ml).

Na Ryc. nr 15 przedstawiono przykładowy chromatogram zastosowanych wzorców SST: roztworu arbutyny i hydrochinonu.

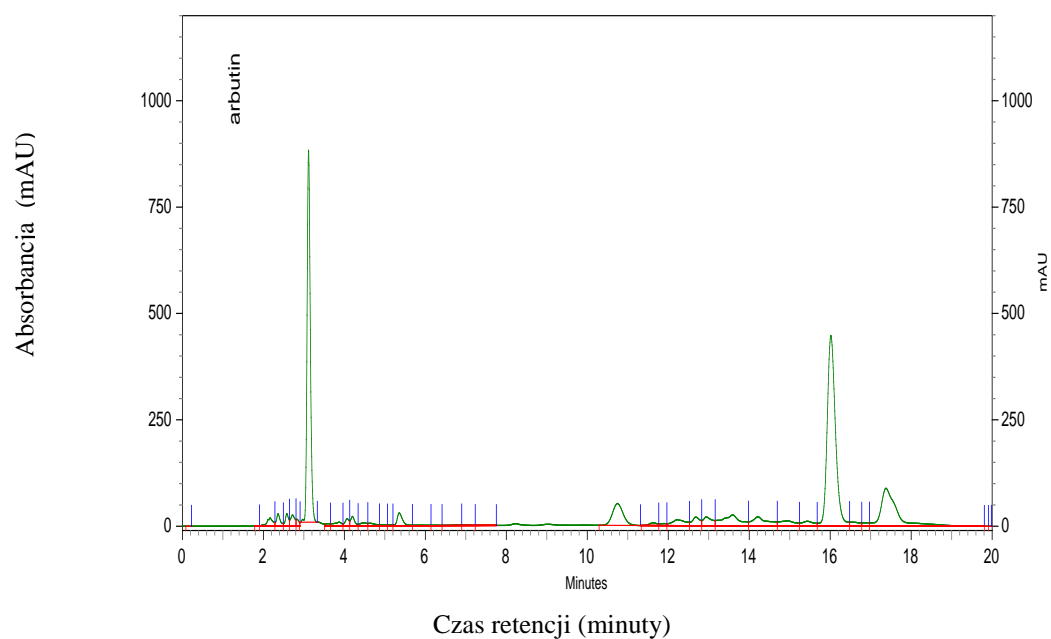


Rycina 15. Chromatogram roztworu wzorcowego arbutyny SST i hydrochinonu.

Przygotowanie roztworu wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego:

Do kolby miarowej poj. 50ml odważono około 0,4g wyciągu z liści sierpika pięciolistnego. Następnie do kolby dodano 30ml 10% (v/v) metanolu i wstawiono na łaźnię ultradźwiękową na 5 min. Całość wymieszano i dopełniono rozpuszczalnikiem. Powstały roztwór przesączono przez strzykawkowy filtr membranowy 0,45 μ m (Schleicher&Schüell).

Otrzymany w wyniku rozdziału pik chromatograficzny zidentyfikowano jako widmo β -arbutyny. Na chromatogramie wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego nie stwierdzono obecności hydrochinonu (Ryc.16).



Rycina 16. Chromatogram wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego.

Analiza metodą HPLC wykazała, że w wodnym wyciągu z liści sierpika pięciolistnego, przeznaczonego do testów kosmetycznych z udziałem probantów, zawartość β -arbutyny wynosi 9,3% (m/m) (Zał.1, str.150).

B. BADANIA KOSMETOLOGICZNE

Projekt badawczy, po uzyskaniu akceptacji Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Uchwała nr 43/09 (Załącznik 2, str.151), zrealizowano w latach 2009 – 2012. Obejmował on dwa etapy:

- etap I - opracowanie receptury kremu o spodziewanym działaniu rozjaśniającym przebarwienia skóry; preparat w swym składzie zawierał standaryzowany na zawartość arbutyny wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego,
- etap II - ocena efektywności i przydatności kosmetycznej kremu, w testach aplikacyjnych z udziałem probantów.

Pierwszy etap projektu zrealizowano w Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, drugi wykonano przy współpracy z Centrum Diagnostyki Znamion przy ul. Ogrodowej 10, w Poznaniu.

1. Osoby badane

Wszyscy uczestnicy projektu przed jego rozpoczęciem zostali poinformowani o celu i zasadach badania. Uzyskali wyczerpujące odpowiedzi na nurtujące ich pytania oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie (formularz świadomej zgody – Załącznik 3, str.152). Każdy probant otrzymał na własność pisemny, szczegółowy opis badania.

Uczestnicy projektu zostali objęci polisą ubezpieczeniową, wystawioną przez HDI Asekuracja Towarzystwo Ubezpieczeń S.A. (numer 390/1399916/14004/0/0).

Na podstawie konsultacji lekarskiej przeprowadzonej w Centrum Diagnostyki Znamion w Poznaniu do badania zakwalifikowano łącznie 102 kobiety, ze zmianami pigmentacyjnymi skóry, w wieku 26-55 lat.

Testami nie objęto pacjentek z pozytywnym wywiadem rodzinnym w kierunku czerniaka lub innego nowotworu skóry oraz dodatnim wynikiem testu płatkowego (rozdz. 2.2.2.3, str.94).

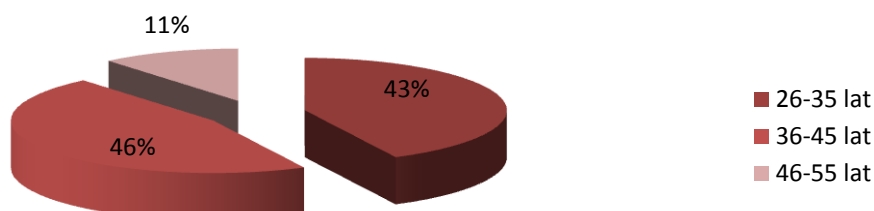
Badanie kosmetyczne z udziałem probantów miało charakter randomizowanej, kontrolowanej z użyciem placebo, podwójnie ślepej próby.

Uczestniczki biorące udział w badaniu przydzielono losowo do jednej z dwóch grup:

- grupa badana – stosująca krem, ze standaryzowanym na zawartość arbutyny, wodnym wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego,
- grupa kontrolna – stosująca podłoże kremowe, bez substancji aktywnej (placebo).

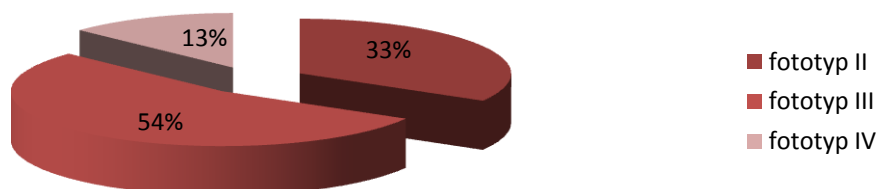
1.1. Grupa badana

Do grupy badanej zakwalifikowano finalnie 54 kobiety ze zmianami barwnikowymi skóry. Średni wiek probantek wynosił 37,26 lat (min. 26 – max. 55), a poszczególne klasy wieku kształtowały się następująco: 26-35 lat (n=23), 36-45 lat (n=25) i 46-55 lat (n=6) (Ryc.17).



Rycina 17. Podział grupy badanej ze względu na klasy wieku.

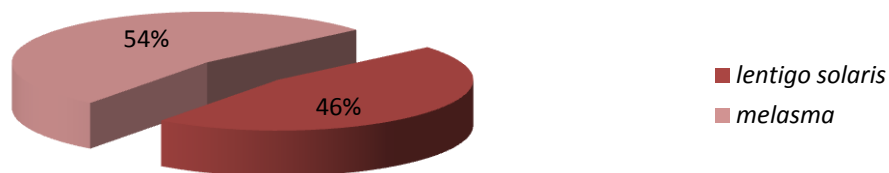
Badaniami objęto ochotniczki z fototypem skóry II – IV, wg skali Fitzpatricka [204]: fototyp II (n=18), fototyp III (n=29) i fototyp IV (n=7) (Ryc.18).



Rycina 18. Podział grupy badanej ze względu na fototyp skóry.

Pacjentki charakteryzowały się ogólnie dobrym stanem zdrowia i posiadały zmiany pigmentacyjne skóry, które podczas wizyty lekarskiej zdiagnozowano jako:

- słoneczne plamy soczewicowate (*lentigo solaris*), n=25,
- ostudy (*melasma*), n=29 (Ryc.19).



Rycina 19. Rodzaj zaburzeń pigmentacji skóry występujących w grupie badanej.

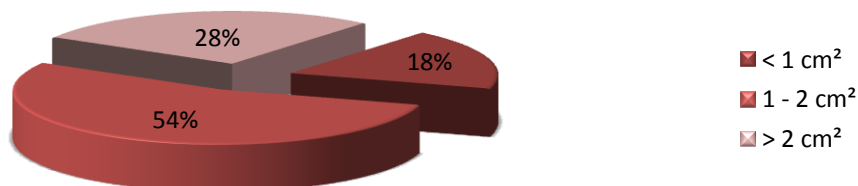
Występujące u pacjentek zaburzenia barwnikowe skóry miały charakter zmian nabytych, a średni czas ich występowania wynosił 4,5 roku. Ww. zaburzenia pigmentacji skóry zlokalizowane były w obrębie twarzy pacjentek (Tab.14).

Tabela 14. Lokalizacja przebarwień (grupa badana).

Lokalizacja	Liczba (n)	%
czoło	12	22,22
policzek	26	48,14
nos	4	7,40
górną wargą	6	11,12
broda	6	11,12

Powierzchnia analizowanych przebarwień skóry kształtowała się następująco:

- < 1 cm² (n=10),
- 1 – 2 cm² (n=29),
- > 2 cm² (n=15) (Ryc.20).

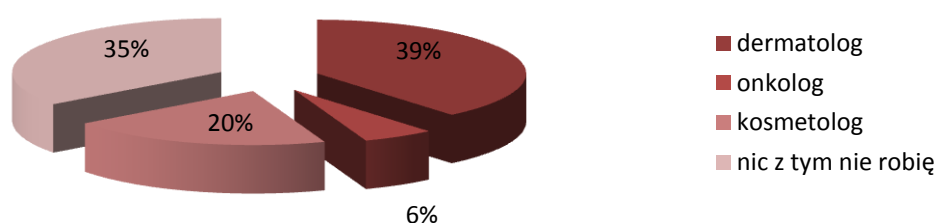


Rycina 20. Powierzchnia przebarwień skóry w grupie badanej.

Na podstawie wywiadu lekarskiego ustalono, że 81,48% ochotniczek biorących udział w badaniu we wcześniejszych latach wykorzystywało ochronę przeciwsłoneczną codziennie (54,55%), podczas gdy pozostałe stosowały ją wyłącznie podczas opalania (45,45%). Zaledwie 18,52% probantek nie używało kremów z filtrem UV w ogóle.

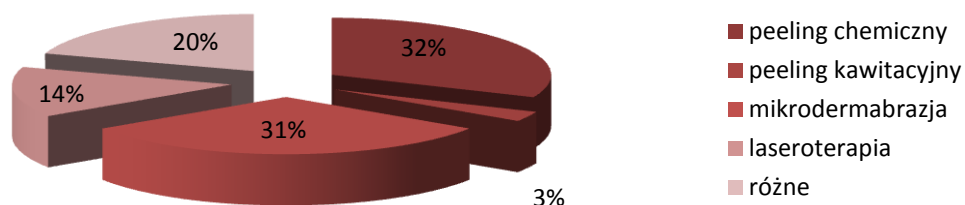
Wśród pacjentek grupy badanej aż 35,19% uległo w przeszłości poparzeniu słonecznemu.

Przed udziałem w badaniu ochotniczki odbywały konsultacje m.in. z dermatologiem (n=21), onkologiem (n=3) i kosmetologiem (n=11), a 19 z nich nic do tej pory z tym nie robiło (Ryc.21).



Rycina 21. Konsultacje ze specjalistami (grupa badana).

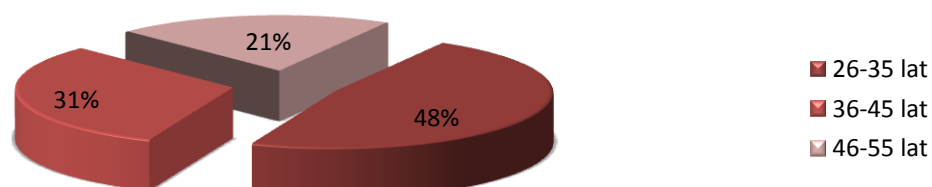
Pacjentki korzystały także uprzednio z zabiegów rozjaśniających przebarwienia skóry (64,81%). Wśród wymienianych pojawiały się m.in.: peeling chemiczny (n=11), peeling kawitacyjny (n=1), mikrodermabrazja (n=11) i laseroterapia (n=5). Pozostałych 7 pacjentek deklarowało wykonanie kilku różnych zabiegów: mikrodermabrazji, peelingu chemicznego, peelingu kawitacyjnego i laseroterapii (Ryc.22).



Rycina 22. Zabiegi wykorzystywane do rozjaśnienia zmian pigmentacyjnych skóry (grupa badana).

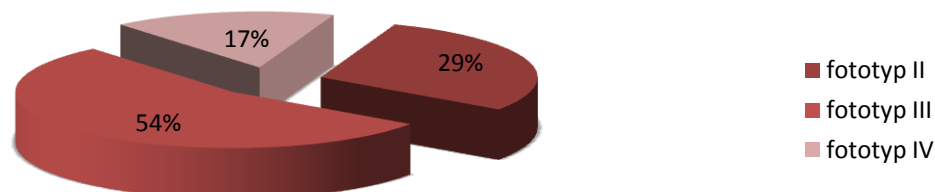
1.2. Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano łącznie 48 kobiet ze zmianami barwnikowymi. Średni wiek probantek wynosił 38,14 lat (min. 28 – max. 54), a poszczególne klasy wieku kształtowały się następująco: 26-35 lat (n=23), 36-45 lat (n=15) i 46-55 lat (n=10) (Ryc.23).



Rycina 23. Podział grupy kontrolnej ze względu na klasy wieku.

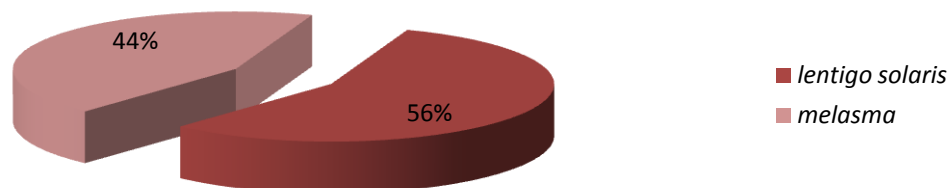
Badaniami objęto ochotniczki z fototypem skóry II – IV wg, skali Fitzpatricka [204]: fototyp II (n=14), fototyp III (n=26) i fototyp IV (n=8) (Ryc.24).



Rycina 24. Podział grupy kontrolnej ze względu na fototyp skóry.

Pacjentki charakteryzowały się ogólnie dobrym stanem zdrowia i posiadały zmiany pigmentacyjne skóry, które podczas wizyty lekarskiej zdiagnozowano jako:

- słoneczne plamy soczewicowate (*lentigo solaris*), n=27,
- ostudy (*melasma*), n=21 (Ryc.25).



Rycina 25. Rodzaj zaburzeń pigmentacji skóry występujących w grupie kontrolnej.

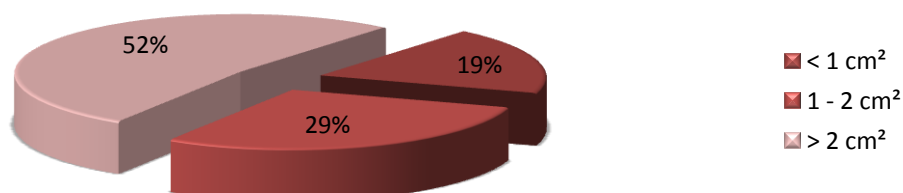
Występujące u pacjentek zaburzenia barwnikowe skóry miały charakter zmian nabytych, a średni czas ich występowania wynosił 6 lat. Ww. zaburzenia pigmentacji skóry zlokalizowane były w obrębie twarzy pacjentek (Tab.15).

Tabela 15. Lokalizacja przebarwień (grupa kontrolna).

Lokalizacja	Liczba (n)	%
czoło	16	33,33
policzek	19	39,58
nos	4	8,34
górną wargę	5	10,41
broda	4	8,34

Powierzchnia analizowanych przebarwień skóry kształtowała się następująco:

- < 1 cm² (n=9),
- 1 – 2 cm² (n=14),
- > 2 cm² (n=25) (Ryc.26).

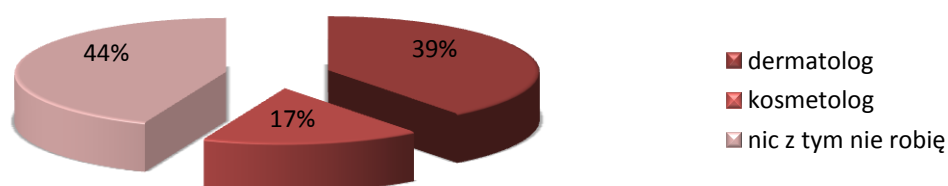


Rycina 26. Powierzchnia przebarwień skóry w grupie kontrolnej.

Na podstawie wywiadu lekarskiego ustalono, że 95,84% ochotniczek biorących udział w badaniu we wcześniejszych latach wykorzystywało ochronę przeciwsłoneczną codziennie (21,74%), podczas gdy pozostałe stosowały ją wyłącznie podczas opalania (78,26%). Zaledwie 4,16% probantek nie używało kremów z filtrem UV w ogóle.

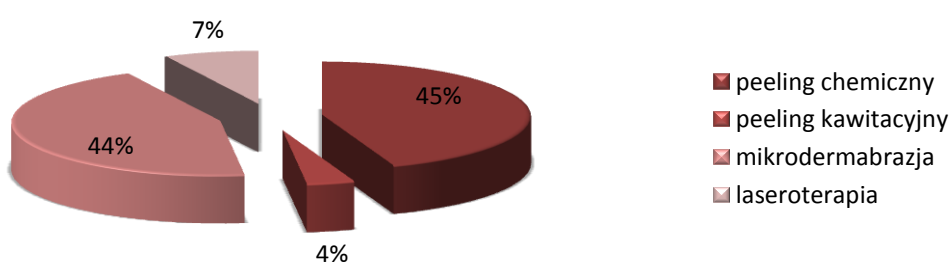
Wśród pacjentek grupy kontrolnej aż 47,92% uległo w przeszłości poparzeniu słonecznemu.

Przed udziałem w badaniu ochotniczki odbywały konsultacje m.in. z dermatologiem (n=19) i kosmetologiem (n=8), a 21 z nich nic do tej pory z tym nie robiło (Ryc.27).



Rycina 27. Konsultacje ze specjalistami (grupa kontrolna).

Pacjentki korzystały także uprzednio z zabiegów rozjaśniających przebarwienia skóry (56,25%). Wśród wymienianych pojawiały się m.in.: peeling chemiczny (n=12), peeling kawitacyjny (n=1), mikrodermabrazja (n=12) i laseroterapia (n=2) (Ryc.28).



Rycina 28. Zabiegi wykorzystywane do rozjaśnienia zmian pigmentacyjnych skóry (grupa kontrolna).

2. Metody

2.1. Opracowanie receptur preparatów do badań kosmetycznych

Do badań aplikacyjnych z udziałem probantów przygotowano dwa rodzaje kremów:

- krem rozjaśniający przebarwienia skóry, ze standaryzowanym na zawartość arbutyny, wodnym wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego,
- krem bez substancji czynnej (placebo).

2.1.1. Opracowanie receptury kremu niwelującego przebarwienia skóry

Do przygotowania kremu niwelującego zmiany pigmentacyjne skóry wykorzystano wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego (opis wykonania – część fitochemiczna, rozdz.2.1.2, str.62) oraz podłoże maściowe o nazwie handlowej „Lekobaza” firmy Pharma Cosmetic K.M. Adamowicz S.J. (Zał.4, str.154).

Przy opracowywaniu receptury kremu uwzględniono właściwości fizyko-chemiczne głównej substancji aktywnej kremu – arbutyny (rozdz.3.2, str.16). Ze względu na jej wysoką hydrofilność i niską penetrację przez warstwę rogową naskórka zdecydowano się na wybór ww. podłoża.

Według danych producenta Lekobaza (*Cremor basalis*) jest amfifilowym podłożem maściowym, wykorzystywanym do wytwarzania kremów o delikatnej konsystencji oraz płynnych emulsji. Lekobaza emulguje znaczne ilości wody oraz wodnych roztworów substancji leczniczych, tworząc trwałe emulsje typu o/w oraz w/o. Jest podłożem łatwo rozsmarowującym się i szybko wchłanianym z powierzchni skóry. Intensywnie nawilża i natłuszcza skórę. Dzięki powyższym właściwościom znalazła szerokie zastosowanie w dermatologii i kosmetyce [203].

Receptura kremu niwelującego przebarwienia skóry [100 g]:

- podłoże „Lekobaza” 74,0 g
- wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego 26,0 g.

Według obliczeń, wykonanych na podstawie świadectwa analizy wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego (Zał.1, str.150), krem niwelujący przebarwienia skóry zawierał 2,5% arbutyny. Każdy z probantów grupy badanej otrzymał 15,0 g kremu.

Wykonanie kremu [15,0 g]:

1. Do parownicy odważono 11,0 g podłoża.
2. Odważone podłoże stopiono na łaźni wodnej w temperaturze 25⁰C, uzyskując półpłynną konsystencję.
3. Odważono 4,0 g wyciągu z liści sierpika pięciolistnego.
4. Odważony wyciąg dodawano porcjami do stopionego podłoża, ciągle mieszając.
5. Całość homogenizowano do ostygnięcia.
6. Uzyskany krem rozważono do sterylnych opakowań.

2.1.2. Krem bez substancji czynnej (placebo)

Do przygotowania kremu, bez substancji aktywnej (placebo), wykorzystano podłoże o nazwie handlowej „Lekobaza” firmy Pharma Cosmetic K.M. Adamowicz S.J. (Załącznik 4, str.154).

Każdy z probantów grupy kontrolnej otrzymał 15,0 g kremu, bez substancji czynnej, zawierającego wyłącznie podłoże kremowe. Krem wykonano poprzez odważenie 15,0 g podłoża do sterylnych opakowań.

2.2. Diagnostyka przebarwień

2.2.1. Badanie podmiotowe

Od wszystkich ochotniczek biorących udział w badaniu (zarówno grupy badanej, jak i kontrolnej) zebrano wywiad dermatologiczny na temat przebarwień skóry. Zadano pytania dotyczące m.in. czasu trwania przebarwień, ich lokalizacji, prawdopodobnych przyczyn powstania, stosowania ochrony przeciwsłonecznej, metod dotychczasowego postępowania terapeutycznego (zabiegów rozjaśniających przebarwienia i kosmetyków lub leków je niwelujących) i ich skuteczności. Zebrano wywiad na temat występowania podobnych objawów u pozostałych członków rodziny i zachorowalności na czerniaka lub innego raka skóry, a także skłonności do poparzeń słonecznych i ich zaistnienia w przeszłości.

Wśród ochotniczek przeprowadzono dwa badania ankietowe. Pierwsza ankieta była elementem wywiadu dermatologicznego (Załącznik 5, str.158), druga dotyczyła przebiegu samego badania i subiektywnej oceny skuteczności działania stosowanego kosmetyku (Załącznik 6, str.164).

2.2.2. Badanie przedmiotowe

Badanie przedmiotowe obejmowało:

- badanie dermatoskopowe,
- badanie aparaturowe - oceniające barwę skóry,
- testy diagnostyczne, stwierdzające brak własności uczulających zastosowanego kremu.

2.2.2.1. Badanie dermatoskopowe

Badanie dermatoskopowe obszaru skóry dotkniętego zmianą barwnikową wykonano przy użyciu wideodermatoskopu DermoGenius firmy LINOS, w Centrum Diagnostyki Znamion w Poznaniu.

Badanie wykonywano każdorazowo w takich samych, w pełni porównywalnych warunkach, po uprzedniej kalibracji urządzenia. Fragment skóry objęty przebarwieniem pokrywano olejkim immersyjnym i za pomocą wideokamery obserwowano. Powstały obraz cyfrowy przetwarzano i przechowywano. Zmiany barwnikowe oceniano w 20– stokrotnym powiększeniu, dwukrotnie: przed rozpoczęciem aplikacji kremu oraz po jej zakończeniu. Podczas badania dermatoskopowego oceniano rozmieszczenie pigmentu w obrębie zmian barwnikowych skóry. Oceniono czy przebarwienie umiejscowione jest w naskórku, w warstwie brodawkowej skóry właściwej, czy też ma charakter zmiany mieszanej.

2.2.2.2. Badania aparaturowe - ocena poziomu melaniny w miejscu przebarwienia

W badaniach oceniających barwę skóry probantek, wykorzystano aparat MPA 9 Courage - Khazaka Electronic GmbH. Pomiaru melaniny w miejscu przebarwienia dokonano za pomocą sondy Mexametr® MX18.

Pomiary wykonywano w zbliżonych warunkach wilgotności względnej ($\pm 42\%$) i temperatury ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), w zaciemnionym pomieszczeniu, po uprzednim oczyszczeniu i wysuszeniu skóry probanta. Odczyty wszystkich pomiarów wykonano za pomocą skali numerycznej (0-999), w postaci wartości średniej z 5-ciu kolejnych pomiarów.

W trakcie trwania całego badania dokonywano 4- krotnego pomiaru poziomu melaniny u każdej z probantek, odpowiednio przed rozpoczęciem aplikacji kremu oraz po 1, 4 i 8 tygodniu aplikacji kremu.

Fototyp skóry ochotniczek biorących udział w badaniu określono dodatkowo na podstawie 6- ciostopniowej skali Fitzpatricka (Tab.16), ponieważ pomiary uzyskiwane za

pomocą sondy Mexametr® MX18 okazały się niewystarczające. Pokrywające się zakresy zawartości melaniny nie pozwalały na jednoznaczne ustalenie fototypu skóry ochotniczek (Tab.17).

Tabela 16. Fototypy skóry, wg skali Fitzpatricka [204].

Fototyp	Oparzenia słoneczne, występowanie opalenizny	Opalenizna po ekspozycji na promieniowanie nadfioletowe (natychmiastowa)	Opalenizna po ekspozycji na promieniowanie nadfioletowe (opóźniona)	Kolor skóry
I	skóra łatwo ulegająca poparzeniom, nigdy nie opalająca się	brak	brak	kość słoniowa
II	skóra łatwo ulegająca poparzeniom, minimalnie i trudno opalająca się	słaba	minimalna do słabej	biały
III	skóra umiarkowanie ulegająca poparzeniom, umiarkowanie i równomiernie opalająca się	umiarkowana	umiarkowana	biały
IV	skóra minimalnie ulegająca poparzeniom, łatwo opalająca się	średnia	średnia	jasnobrązowy, oliwkowy
V	skóra rzadko ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się	mocna (brąz)	mocna, intensywny brąz	umiarkowany brąz
VI	skóra nie ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się	mocna (ciemny brąz)	mocna, intensywny brąz	ciemny brąz lub czarny

Tabela 17. Fototypy skóry sonda Mexametr® MX18 (wg danych producenta).

Fototyp	Opis	Średni poziom melaniny
I	<i>Typ celtycki:</i> bardzo jasna, blada skóra, zielone oczy, dużo piegów, brak opalenizny, natychmiastowe i poważne oparzenia słoneczne	0 – 150
II	<i>Typ biały kaukaski:</i> nieco ciemniejsza skóra, mało piegów, włosy od jasno blond do brązu, niebieskie, szare lub zielone oczy, słaba opalenizna, częste i bolesne poparzenia słoneczne	50 – 250
III	<i>Typ mieszany:</i> skóra jasno brązowa, rzadkie piegi, włosy od ciemnego blond do brązu, zielone lub brązowe oczy, dobra opalenizna, rzadkie oparzenia słoneczne	100 – 350
IV	<i>Typ śródziemnomorski:</i> brązowa skóra, brak piegów, włosy ciemnobrązowe do czarnych, brązowe oczy, szybka opalenizna i niemal brak oparzeń słonecznych	150 – 500
V	Skóra azjatycka / indyjska	150 – 650
VI	Skóra czarna	600 - 999

2.2.2.3. Testy diagnostyczne stwierdzające brak właściwości uczulających kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego

Do stwierdzenia braku właściwości uczulających kremu wykorzystano testy diagnostyczne w postaci naskórkowych testów płatkowych [205, 206]. Testy przeprowadzono wśród wszystkich pacjentek ze zdiagnozowanymi zaburzeniami pigmentacji skóry. Wykonano je przy użyciu hipoalergicznym i wodoszczelnym komór testowych IQ-Ultimate firmy Chemotechnique Diagnostics.

Bezpośrednio przed aplikacją plastrów na plecy pacjentek w komorach testowych umieszczano odpowiednio:

- 25 µl wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego, zawierającego 2,5 % arbutyny,
- 2 mg podłoża kremowego.

Plastry naklejono następnie na skórę pleców pacjentek (w odległości 2-4 cm od linii pośrodkowej, w okolicy międzyłopatkowej) na okres 48 godzin. Podczas trwania testu zalecono pacjentkom unikania ekspozycji na promieniowanie słoneczne i zażywania leków sterydowych. Po upływie 48 godzin plastry usunięto i dokonano pierwszego odczytu testu po upływie 30 minut, wykorzystując w tym celu płytki IQ Ultimate® Reading Plate. Ponowne odczyty przeprowadzono po upływie kolejnych 24 i 48 godzin, odpowiednio w 72 i 96 godzinie po aplikacji plastra z alergenami. Interpretację wyników prowadzono w oparciu o zalecenia ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) (Tab.18).

Tabela 18. Interpretacja i zapis wyników testu plątkowego, wg ICDRG [207].

Zapis	Interpretacja	Opis - wygląd
-	negatywny	brak reakcji
? ⁺	odczyn wątpliwy	subtelny rumień
+	słaby odczyn	rumień, naciek, ewentualne grudki
++	silny odczyn	rumień, naciek, grudki, pęcherzyki
+++	odczyn skrajnie nasilony	pęcherze lub owrzodzenia
IR	podrażnienie	odczyn odgraniczony od miejsca przylegania substancji, wygasający od momentu usunięcia testu, możliwe wybroczyny, krostki, brak grudek i pęcherzyków

2.3. Aplikacja opracowanych kremów

Przygotowane wg autorskich receptur kremy niwelujące przebarwienia skóry aplikowano 8 tygodni (aplikacja punktowa w miejscu przebarwienia, 2 razy dziennie – rano i wieczorem).

Wszystkim ochotniczkom biorącym udział w badaniu zalecono unikania ekspozycji miejsc dotkniętych przebarwieniem na promieniowanie słoneczne i wizyt w solarium.

Zarekomendowano codzienne stosowanie kremów z wysokim wskaźnikiem ochrony SPF 50+.

W trakcie aplikacji kremu probantki nie używały dodatkowych dermokosmetyków niwelujących przebarwienia skóry oraz nie wykonywały zabiegów je rozjaśniających.

2.4. Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 10.0.

Podczas analizy cech ilościowych typu ciągłego tj. wiek pacjenta i poziom melaniny wzięto pod uwagę: liczbę pacjentek (n), średnią arytmetyczną (\bar{x}), zakres zmienności (Min.–Max.) oraz odchylenie standardowe (σ). Przy cechach porządkowych tj. klasa wieku, fototyp skóry i stopień zadowolenia uwzględniano natomiast: liczbę pacjentek (n), zakres zmienności (Min.–Max.), wartość pierwszego i trzeciego kwartyła (Q1,Q3) oraz medianę (Me).

Istotność różnic analizowanych cech, w grupie badanej i kontrolnej, weryfikowano stosując analizę wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami oraz test t-Studenta. Do analizy cech porządkowych użyto nieparametrycznego testu U – Manna Whitney'a.

Wszystkie hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

3. Wyniki

3.1. Struktura grup terapeutycznych

Podczas analizy cech ilościowych typu ciągłego wzięto pod uwagę: liczbę pacjentek (n), średnią arytmetyczną (\bar{x}), zakres zmienności (Min.–Max.) i odchylenie standardowe (σ). Przy cechach porządkowych uwzględniano natomiast: liczbę pacjentek (n), zakres zmienności (Min.–Max.), wartość pierwszego i trzeciego kwartyla (Q1,Q3) oraz medianę (Me).

Zgodność rozkładu analizowanych cech, w grupie badanej i kontrolnej, sprawdzano stosując analizę wariancji, z powtarzanymi pomiarami, test t–Studenta, a w przypadku cech porządkowych test U – Manna Whitney’a.

3.1.1. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem wieku i klas wieku

W badaniu wzięły udział 102 pacjentki z przebarwieniami skóry w wieku 26–55 lat. Średni wiek probantek wynosił 37,67 lat. Przydzielono je losowo do grupy badanej lub kontrolnej. W grupie badanej średni wiek pacjentek wynosił 37,26 lat, natomiast w grupie kontrolnej 38,14 lat. Przeciętna wieku w obu grupach terapeutycznych była zbliżona (Tab.19).

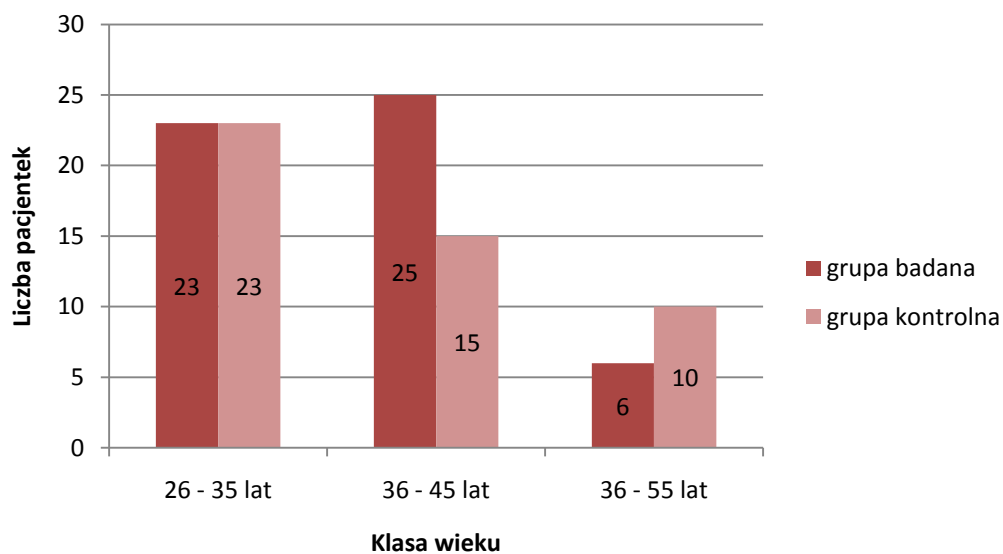
Pomiędzy grupą badaną i kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych ($p=0,555$).

Tabela 19. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem wieku.

Zmienna	Liczba pacjentek		Średnia arytmetyczna (\bar{x})	Odchylenie standardowe (σ)	
	Minimum	Maksimum			
Grupa badana					
wiek	54	26	55	37,26	7,41
Grupa kontrolna					
wiek	48	28	54	38,14	7,73

Badania prowadzono w trzech klasach wieku: 26-35 lat, 36-45 lat oraz 46-55 lat. Zróznicowanie grup terapeutycznych pod względem liczebności w odrębnych klasach wieku przedstawia Ryc. nr 29. W grupie badanej, jak i kontrolnej znalazły się przedstawicielki poszczególnych klas wieku, jednakże wśród uczestniczek przeważały pacjentki dwóch klas wieku: 26–35 lat i 36–45 lat.

Pomiędzy grupą badaną i kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych ($p=0,319$).

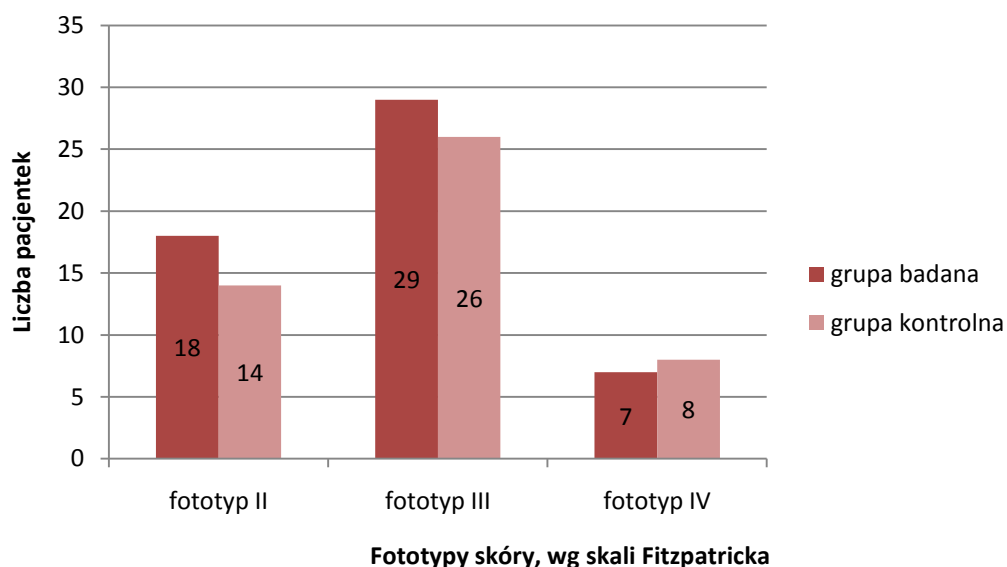


Rycina 29. Rozkład liczby pacjentek w odrębnych klasach wieku w grupie badanej i kontrolnej.

3.1.2. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem fototypu skóry

Badaniami objęto pacjentki z fototypem skóry II – IV, wg skali Fitzpatricka. Zróżnicowanie grup terapeutycznych pod względem fototypu skóry było na stałym poziomie. Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej znalazły się pacjentki posiadające fototyp skóry II, III i IV. Nie mniej jednak zdecydowanie najliczniejszą grupę pacjentek stanowiły kobiety z fototypem skóry III (Ryc.30).

Pomiędzy grupą badaną i kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych ($p=0,912$).



Rycina 30. Rozkład liczby pacjentek z poszczególnymi fototypami skóry w grupie badanej i kontrolnej.

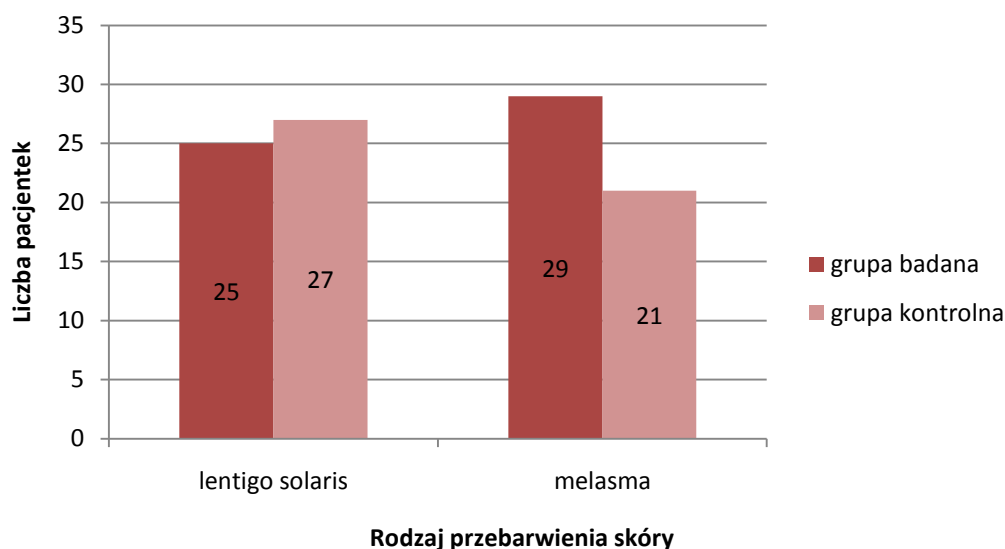
3.1.3. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem rodzaju przebarwień skóry

Pacjentki biorące udział w badaniu posiadały dwa rodzaje przebarwień skóry:

- słoneczne plamy soczewicowate (*lentigo solaris*),
- ostudy (*melasma*).

W badanej grupie kobiet zanotowano 52 przypadki *lentigo solaris* i 50 przypadków *melasmy*. Rozkład liczby pacjentek z poszczególnymi zaburzeniami pigmentacyjnymi w grupie badanej i kontrolnej był zbliżony (Ryc.31).

Pomiędzy grupą badaną i kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych ($p=0,389$).



Rycina 31. Rozkład zaburzeń pigmentacji skóry w grupie badanej i kontrolnej.

3.2. Początkowy poziom melaniny w grupach terapeutycznych

Przy użyciu testu t – Studenta dla zmiennych niezależnych analizowano, czy początkowy poziom melaniny w obu grupach terapeutycznych był podobny. W obliczeniach wzięto pod uwagę: liczbę pacjentek w grupie badanej i kontrolnej (n), średnie wartości melaniny i graniczny poziom prawdopodobieństwa testowego (p). Za wartość statystycznie znamiennej przyjęto $p \leq 0,05$.

W wyniku testowania otrzymano, że u pacjentek grupy badanej średni początkowy poziom melaniny wynosił 182,60 i był wyższy, aniżeli w grupie kontrolnej, gdzie średni poziom melaniny równy był 158,90. Różnice te były istotne statystycznie ($p=0,002$).

Jak już zaznaczono pacjentki biorące udział w badaniu posiadały dwa rodzaje przebarwień skóry: *lentigo solaris* i *melasma*. Podobnie jak powyżej, testowano czy początkowy poziom melaniny w obu grupach terapeutycznych dla poszczególnych rodzajów przebarwień skóry był podobny.

U pacjentek posiadających przebarwienia skóry typu *melasma* średni początkowy poziom melaniny w grupie badanej równy był 184,72, podczas gdy w grupie kontrolnej kształtował się na poziomie 148,71. Różnice te były istotne statystycznie ($p=0,002$).

U pacjentek posiadających przebarwienia skóry typu *lentigo solaris* średni początkowy poziom melaniny w grupie badanej wynosił 180,12, a w grupie kontrolnej kształtował się na poziomie 166,82. Różnice te były nieistotne statystycznie ($p=0,172$).

3.3. Analiza zmiany poziomu melaniny względem czasu w grupach terapeutycznych

Weryfikowano hipotezę o nieistotności różnic poziomów melaniny dla grupy badanej i kontrolnej oraz zależności tego procesu w czasie. Wykorzystano w tym celu analizę wariancji ANOVA, z powtarzanymi pomiarami.

W Tab. nr 20 przedstawiono zmianę poziomu melaniny w miejscu przebarwienia względem czasu w grupie badanej i kontrolnej. W testowaniu uwzględniono: zakres zmienności poziomu melaniny (Min.–Max.), odchylenie standardowe (σ) oraz średnią arytmetyczną (\bar{x}) poziomu melaniny z kolejnych pomiarów. Pomiary przeprowadzono 4 – krotnie: przy włączeniu pacjentek do badania (początkowy poziom melaniny) oraz po 1, 4 i 8 tygodniu kuracji kremem niwelującym przebarwienia skóry (rozdz. 2.2.2.2, str.96).

Zaobserwowano, że rozrzut poziomu melaniny w grupie badanej i kontrolnej kształtuje się na zbliżonym poziomie we wszystkich punktach obserwacyjnych (Tab.20).

Tabela 20. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia względem czasu, w obu grupach terapeutycznych.

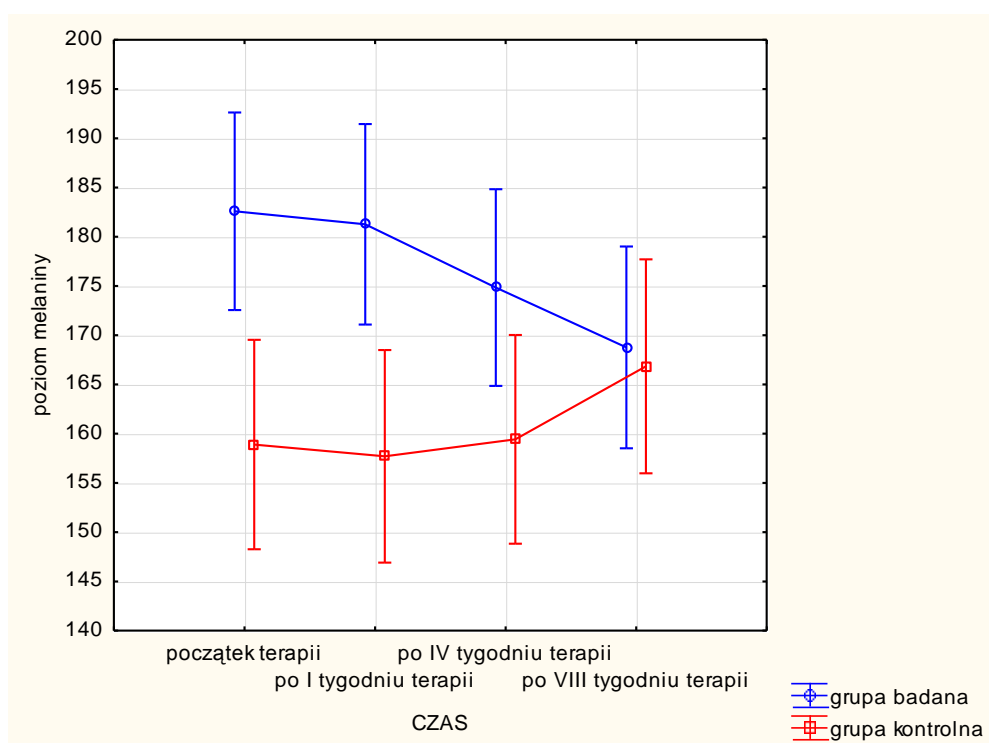
Zmienna	Liczba		Średnia arytmetyczna (\bar{x})	Odchylenie standardowe (σ)
	pacjentek (n)	Minimum Maksimum		
Grupa badana				
Początkowy poziom melaniny	54	115,00 301,40	182,60	39,41
Poziom melaniny po 1 tygodniu	54	109,80 287,20	181,26	39,63
Poziom melaniny po 4 tygodniach	54	103,80 268,20	174,84	35,25
Poziom melaniny po 8 tygodniach	54	91,00 275,20	168,76	36,30
Grupa kontrolna				
Początkowy poziom melaniny	48	86,80 218,40	158,90	34,41
Poziom melaniny po 1 tygodniu	48	86,40 223,40	157,70	35,42
Poziom melaniny po 4 tygodniach	48	85,00 271,40	159,43	38,89
Poziom melaniny po 8 tygodniach	48	92,40 261,20	166,84	39,72

Po 8- tygodniowej aplikacji kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego w grupie badanej zanotowano spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia średnio o 13,84, podczas gdy w grupie kontrolnej zaobserwowano wzrost jej poziomu o 7,94. Zauważono, że poziom melaniny spada już od pierwszych tygodni aplikacji kremu i trend ten utrzymuje się do zakończenia terapii (Ryc.32).

Inną tendencję dostrzeżono natomiast w grupie kontrolnej, aplikującej krem bez substancji aktywnej (placebo). Po upływie pierwszych 4 tygodni stosowania kremu poziom melaniny u osób biorących udział w badaniu wzrastał i trend ten utrzymywał się do końca stosowania preparatu (Ryc.32).

Grupa badana i kontrolna różniły się istotnie pod względem przeciętnego poziomu melaniny w miejscu przebarwienia ($p=0,022$).

Zmiany przeciętnych poziomów melaniny w czasie przebiegały istotnie różnie w obu grupach terapeutycznych ($p=0,000$).



Rycina 32. Zależność zmiany poziomu melaniny w czasie w obu grupach terapeutycznych.

Każda z uczestniczek badania po zakończeniu aplikacji kremu wypełniła ankietę numer II (Załącznik 6, str.164). Wśród pytań ankietowych znalazło się jedno, dotyczące subiektywnej oceny skuteczności kuracji w czasie: „Po jakim czasie zauważalne były efekty aplikacji kremu ?”

W grupie badanej, aplikującej krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego, 31 pacjentek zauważyło skuteczność terapii. W grupie tej 74,20% pacjentek odpowiedziało, że efekty kuracji były zauważalne po 8 tygodniach, podczas gdy 25,80% zaobserwowało tę zmianę już po upływie 4 tygodni.

W grupie kontrolnej zaledwie 4 pacjentki zaobserwowały minimalne rozjaśnienie przebarwienia, po upływie 8 tygodni kuracji kremem.

Odpowiedzi pacjentek na ww. pytanie odzwierciedlają wyniki, które otrzymano podczas pomiarów poziomu melaniny. Zarówno subiektywna ocena uczestniczek, jak i wyniki

pomiarów melaniny wskazują, że przebarwienia skóry ulegają rozjaśnieniu po upływie 8 tygodni aplikacji kremu.

3.3.1. Analiza zmiany poziomu melaniny względem czasu w grupie badanej i kontrolnej u pacjentek z *melasma* i *lentigo solaris*

Podobną weryfikację hipotezy, o nieistotności różnic poziomu melaniny dla dwóch grup terapeutycznych i zależności tego procesu w czasie, przeprowadzono w rozróżnieniu na rodzaje przebarwień skóry: *lentigo solaris* i *melasma*.

W Tab. nr 21 i 22 przedstawiono zmianę poziomu melaniny w miejscu przebarwienia względem czasu w grupie badanej i kontrolnej, w rozróżnieniu na rodzaje przebarwień: *lentigo solaris* i *melasma*. W testowaniu uwzględniono analogicznie: zakres zmienności poziomu melaniny (Min.–Max.), odchylenie standardowe (σ) i średnią arytmetyczną (\bar{x}) poziomu melaniny z kolejnych pomiarów.

Zaobserwowano, że rozrzut poziomu melaniny wewnątrz grupy badanej i kontrolnej kształtuje się na zbliżonym poziomie we wszystkich punktach obserwacyjnych (Tab.21, 22).

Tabela 21. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu u pacjentek z *melasma*.

Zmienna	Liczba		Średnia arytmetyczna (\bar{x})	Odchylenie standardowe (σ)	
	pacjentek (n)	Minimum			Maksimum
Grupa badana					
Początkowy poziom melaniny	29	115,00	301,40	184,72	40,91
Poziom melaniny po 1 tygodniu	29	109,80	287,20	186,63	43,76
Poziom melaniny po 4 tygodniach	29	103,80	268,20	175,58	39,70
Poziom melaniny po 8 tygodniach	29	91,00	275,20	168,32	42,27
Grupa kontrolna					
Początkowy poziom melaniny	21	86,80	215,40	148,71	36,89
Poziom melaniny po 1 tygodniu	21	86,40	193,80	142,70	31,87
Poziom melaniny po 4 tygodniach	21	85,00	192,00	142,80	30,53
Poziom melaniny po 8 tygodniach	21	92,40	234,80	151,71	37,33

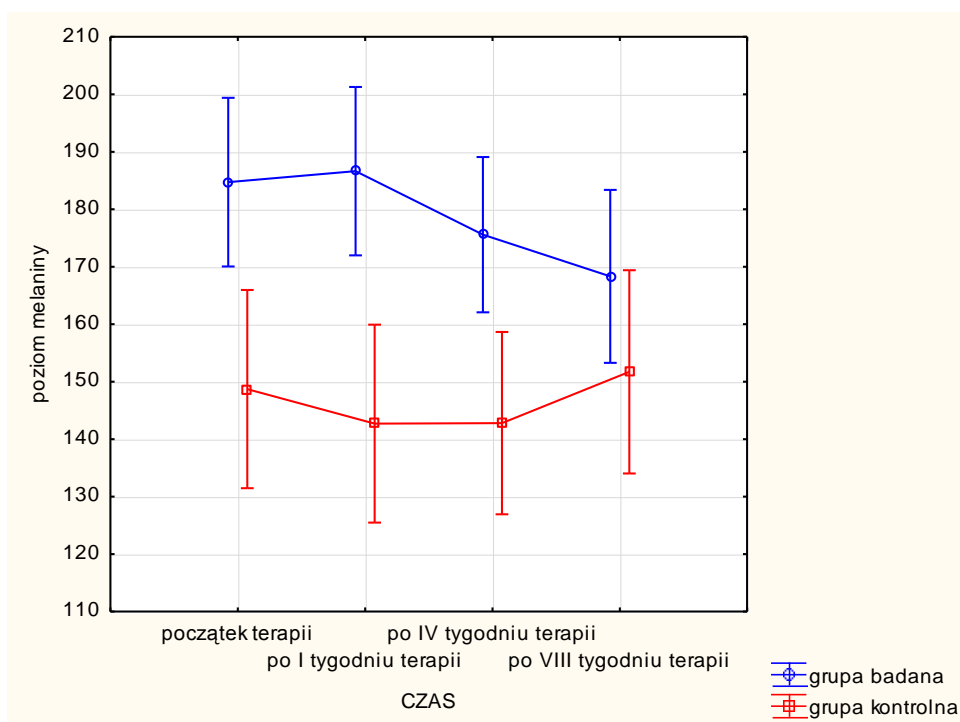
W grupie pacjentek z *melasmą*, przynależnych do grupy badanej, aplikujących krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego zanotowano spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia po 8- tygodniowej kuracji średnio o 16,40, natomiast u pacjentek z *melasmą* w grupie kontrolnej takiego efektu nie odnotowano. Zaobserwowano u nich nieznaczny wzrost poziomu melaniny o 3,00 (Ryc.33).

U pacjentek grupy badanej, posiadających przebarwienia typu *melasma* zauważono, że poziom melaniny spada już po 4 tygodniach kuracji kremem z wyciągiem, a także że tendencja ta utrzymuje się w dalszych tygodniach aplikacji kremu (Ryc.33).

U pacjentek z *melasmą* grupy kontrolnej stwierdzono, że poziom melaniny po upływie pierwszych 4 tygodni kuracji pozostaje mniej więcej na stałym poziomie i nieznacznie wzrasta w kolejnych tygodniach aplikacji placebo (Ryc.33).

Grupa badana i kontrolna różniły się istotnie pod względem przeciętnego poziomu melaniny w miejscu przebarwienia ($p = 0,004$).

Zmiany przeciętnych poziomów melaniny w czasie przebiegały istotnie różnie w obu grupach terapeutycznych ($p = 0,000$).



Rycina 33. Zależność zmiany poziomu melaniny u pacjentek z *melasmą* w czasie, w obu grupach terapeutycznych.

Tabela 22. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu u pacjentek z *lentigo solaris*.

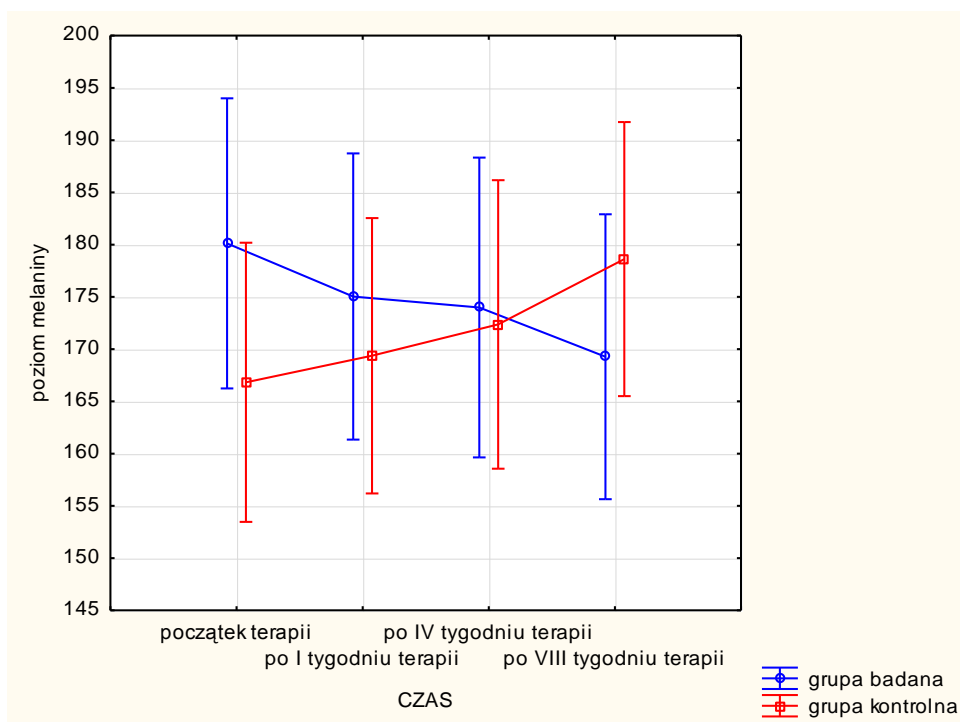
Zmienna	Liczba		Średnia arytmetyczna (\bar{x})	Odchylenie standardowe (σ)	
	pacjentek (n)	Minimum			Maksimum
Grupa badana					
Początkowy poziom melaniny	25	115,20	251,40	180,12	38,28
Poziom melaniny po 1 tygodniu	25	125,00	236,60	175,03	34,06
Poziom melaniny po 4 tygodniach	25	126,40	234,20	173,98	30,06
Poziom melaniny po 8 tygodniach	25	114,60	224,80	169,27	28,73
Grupa kontrolna					
Początkowy poziom melaniny	27	114,60	218,40	166,82	30,73
Poziom melaniny po 1 tygodniu	27	116,20	223,40	169,37	34,12
Poziom melaniny po 4 tygodniach	27	94,60	271,40	172,36	40,24
Poziom melaniny po 8 tygodniach	27	130,20	261,20	178,62	38,10

W przypadku pacjentek z *lentigo solaris* zaobserwowano analogiczny trend, jak u pacjentek z *melasmą*. W grupie pacjentek z *lentigo solaris*, przynależnych do grupy badanej, aplikujących krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego zauważono spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia po 8- tygodniowej kuracji średnio o 10,85, podczas gdy u kobiet z *lentigo solaris* grupy kontrolnej takiego efektu nie zanotowano. Stwierdzono natomiast wzrost poziomu melaniny o 11,80 (Ryc.34).

U pacjentek grupy badanej, z przebarwieniami typu *lentigo solaris* zauważono, że poziom melaniny spada już w pierwszych tygodniach kuracji kremem oraz, że tendencja ta utrzymuje się aż do końca aplikacji preparatu (Ryc.34).

U pacjentek z *lentigo solaris* grupy kontrolnej stwierdzono, że poziom melaniny po upływie pierwszych 4 tygodni aplikacji wrasta i trend ten utrzymuje się w kolejnych tygodniach stosowania placebo (Ryc.34).

Grupa badana i kontrolna nie różniły się istotnie pod względem przeciętnego poziomu melaniny w miejscu przebarwienia ($p=0,748$). Jakkolwiek zmiany przeciętnych poziomów melaniny w czasie przebiegały istotnie różnie w obu grupach terapeutycznych ($p=0,000$).



Rycina 34. Zależność zmiany poziomu melanimy u pacjentek z *lentigo solaris* w czasie, w obu grupach terapeutycznych.

3.4. Analiza zmiany poziomu melanimy w poszczególnych klasach wieku

Oceniano zmianę poziomu melanimy w miejscu przebarwienia w poszczególnych klasach wieku oraz zależność tego procesu w czasie, w obu grupach terapeutycznych. Analizę prowadzono w klasach wieku: 26-35 lat, 36-45 lat oraz 46-55 lat, uwzględniając: średnią arytmetyczną (\bar{x}) poziomu melanimy z kolejnych pomiarów (Tab.23).

Tabela 23. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu w obu grupach terapeutycznych, w poszczególnych klasach wieku.

	Początkowy poziom melaniny (\bar{x})	Poziom melaniny po 1 tygodniu terapii (\bar{x})	Poziom melaniny po 4 tygodniu terapii (\bar{x})	Poziom melaniny po 8 tygodniu terapii (\bar{x})
Grupa badana				
Klasa wieku 26 – 35 lat	182,90	187,19	184,30	175,49
Klasa wieku 36 – 45 lat	178,58	175,28	168,30	164,94
Klasa wieku 46 – 55 lat	198,12	183,47	165,80	158,90
Grupa kontrolna				
Klasa wieku 26 – 35 lat	159,24	160,65	159,74	165,65
Klasa wieku 36 – 45 lat	165,52	161,07	167,20	183,08
Klasa wieku 46 – 55 lat	148,17	145,88	147,05	145,24

U pacjentek w przedziale wiekowym 26–35 lat, stosujących krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego, stwierdzono spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia średnio o 7,41, podczas gdy w grupie kontrolnej zanotowano jej wzrost o 6,41. Tendencję spadkową poziomu melaniny w grupie badanej obserwowano po upływie 8 tygodni terapii kremem niwelującym przebarwienia skóry.

Podobny trend zauważono u pacjentek w przedziale wiekowym 36–45 lat. U kobiet aplikujących krem z wyciągiem zaobserwowano spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia średnio o 13,64, natomiast w grupie kontrolnej wzrost o 17,56. Jednakże odmiennie niż w poprzednim przedziale wiekowym tendencja spadkowa poziomu melaniny w grupie badanej była widoczna już po upływie 4 tygodni terapii (obniżenie o 10,28) i utrzymywała się do jej zakończenia (spadek o kolejne 3,36).

Porównując grupy kontrolne ww. klas wieku zauważono, że większy wzrost poziomu melaniny wystąpił u pacjentek w przedziale wiekowym 36–45 lat.

Po 8- tygodniowej kuracji kremem z wyciągiem u pacjentek w wieku 46–55 lat zanotowano znaczący spadek poziomu melaniny, średnio o 39,22. Tendencja ta była dostrzegalna już po upływie 1 tygodnia terapii (obniżenie o 14,65) i utrzymywała się w kolejnych tygodniach, spadek o 17,67 i 6,90, odpowiednio po 4 i 8 tygodniu terapii.

W grupie kontrolnej, w odróżnieniu od innych klas wieku, stwierdzono natomiast niewielki spadek poziomu melaniny (o 2,93).

3.5. Analiza zmiany poziomu melaniny w poszczególnych fototypach skóry, wg skali Fitzpatricka

Oceniano zmiany poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, w poszczególnych fototypach skóry oraz zależność tego procesu w czasie, w obu grupach terapeutycznych. Analizę prowadzono w fototypach skóry: II, III i IV, uwzględniając: średnią arytmetyczną (\bar{x}) poziomu melaniny z kolejnych pomiarów (Tab.24).

Tabela 24. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu w obu grupach terapeutycznych, w poszczególnych typach skóry, wg skali Fitzpatricka.

	Początkowy poziom melaniny (\bar{x})	Poziom melaniny po 1 tygodniu terapii (\bar{x})	Poziom melaniny po 4 tygodniu terapii (\bar{x})	Poziom melaniny po 8 tygodniu terapii (\bar{x})
Grupa badana				
Typ skóry II	189,57	179,02	167,50	159,72
Typ skóry III	169,13	168,87	169,08	162,94
Typ skóry IV	220,40	238,37	217,60	216,14
Grupa kontrolna				
Typ skóry II	138,54	138,70	133,63	151,26
Typ skóry III	172,93	171,73	175,88	174,92
Typ skóry IV	148,90	145,36	151,11	167,90

Po 8-tygodniowej kuracji kremem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego u pacjentek z fototypem skóry II zaobserwowano spadek poziomu melaniny średnio o 29,85, podczas gdy w grupie kontrolnej zanotowano wzrost jej poziomu o 12,72. Tendencja spadkowa poziomu melaniny w grupie badanej była widoczna już po upływie 1 tygodnia terapii (obniżenie o 10,55) i utrzymywała się w kolejnych tygodniach, spadek o 11,52 i 7,78, odpowiednio po 4 i 8 tygodniu terapii.

U pacjentek z fototypem skóry III, aplikujących krem z wyciągiem, stwierdzono natomiast, że poziom melaniny po 8-tygodniowej kuracji spada średnio o 6,19, podczas gdy w grupie kontrolnej utrzymuje się mniej więcej na stałym poziomie (wzrost o 1,99).

Podobny trend zauważono u pacjentek z fototypem skóry IV. U kobiet stosujących krem z wyciągiem stwierdzono spadek poziomu melaniny średnio o 4,26, z kolei w grupie kontrolnej aplikującej placebo wzrost o 19,00.

Porównując grupy kontrolne ww. fototypów skóry należy podkreślić, że u pacjentek z fototypem skóry IV nastąpił znaczący wzrost poziomu melaniny w miejscu przebarwienia.

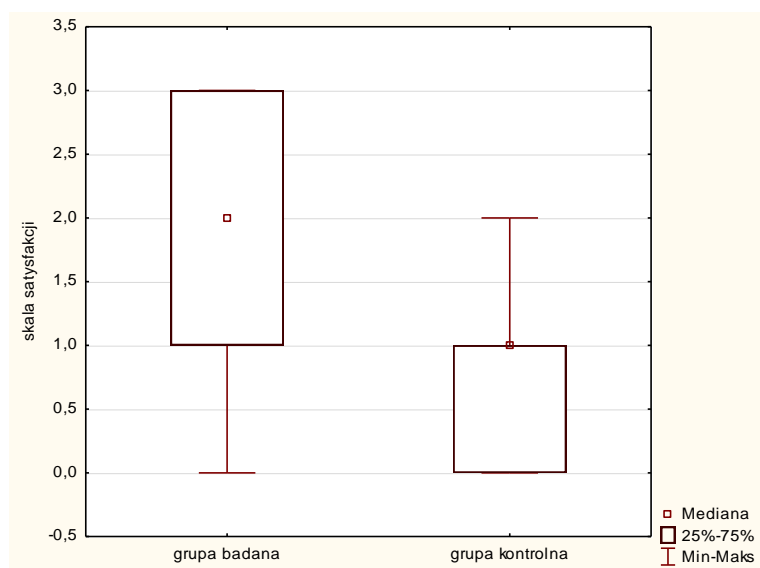
3.6. Ocena zadowolenia z efektów aplikacji kremu niwelującego przebarwienia skóry

Narzędziem, które wykorzystano do oceny zadowolenia pacjentek z efektów aplikacji kremu rozjaśniającego przebarwienia skóry była ankieta II (Załącznik 6, str.164). W wymienionej ankiecie zamieszczono 4- stopniową skalę satysfakcji. Składała się ona z następujących odpowiedzi:

- 0 – pogorszenie
- 1 – brak poprawy
- 2 – minimalna poprawa
- 3 – zdecydowana poprawa.

Do zbadania zależności statystycznej stopnia zadowolenia pacjentów z rezultatu aplikacji kremu niwelującego przebarwienia w dwóch grupach terapeutycznych wykorzystano test U - Manna – Whitney'a. Za wartość statystycznie znaczącą przyjęto $p \leq 0,05$.

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice ($p=0,000$) w stopniu zadowolenia z efektu stosowania kremu na przebarwienia pomiędzy grupą badaną i kontrolną (Ryc.35).



Rycina 35. Zadowolenie z rezultatu stosowania kremu niwelującego przebarwienia, w obu grupach terapeutycznych.

Analizując obie grupy terapeutyczne stwierdzono, że grupa badana, stosująca krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego była bardziej zadowolona z aplikacji kremu, aniżeli grupa kontrolna (stosująca krem bez substancji czynnej - placebo). Mediana odpowiedzi padających w grupie badanej kształtowała się na poziomie 2 (minimalna poprawa), podczas gdy w grupie kontrolnej na poziomie 1 (brak poprawy). Rozkład udzielanych przez pacjentki odpowiedzi obrazuje Ryc. nr 35 i Tab. nr 25.

Tabela 25. Rozdział udzielanych przez pacjentki odpowiedzi w obu grupach terapeutycznych.

Skala satysfakcji	Grupa badana		Grupa kontrolna	
	Liczba pacjentek	%	Liczba pacjentek	%
0	8	14,81	15	31,25
1	15	27,78	29	60,41
2	9	16,67	4	8,34
3	22	40,74	0	-

Ponad 40% pacjentek aplikujących krem z wyciągiem zauważyło zdecydowaną poprawę po zakończeniu kuracji, podczas gdy w grupie kontrolnej taka odpowiedź nie padła ani razu. Kolejnych, ponad 16% pacjentek grupy badanej zaobserwowało minimalną poprawę w miejscu przebarwienia, natomiast w grupie kontrolnej zaledwie 8%.

W grupie kontrolnej najczęściej padały odpowiedzi: „*brak poprawy*” i „*pogorszenie*” (odpowiednio 60,41% i 31,25%).

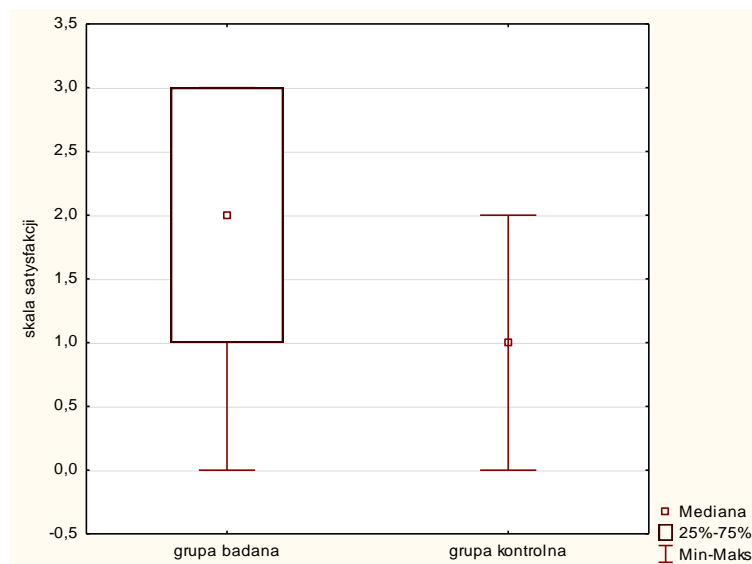
Udzielane przez pacjentki odpowiedzi, po raz kolejny, potwierdziły wyniki, które otrzymano podczas ostatecznych, obiektywnych pomiarów poziomu melaniny. Zmiany pigmentacyjne skóry ulegają rozjaśnieniu po upływie 8 tygodni aplikacji kremu.

3.6.1. Ocena satysfakcji pacjentek z *melasmą*, z rezultatów stosowania kremu rozjaśniającego przebarwienia skóry

Podobną analizę zależności statystycznej stopnia zadowolenia z efektu aplikacji kremu niwelującego przebarwienia przeprowadzono w grupie pacjentek z *melasmą*. Wykorzystano, jak poprzednio, test U - Manna – Whitney'a i przyjęto za wartość statystycznie znamiennej $p \leq 0,05$.

Analogicznie analiza statystyczna wykazała istotne różnice ($p=0,000$) w stopniu zadowolenia z rezultatu stosowania kremu na przebarwienia pomiędzy grupą badaną i kontrolną (Ryc.36).

Analizując obie grupy terapeutyczne stwierdzono, że pacjentki z *melasmą* w grupie badanej były bardziej zadowolone z aplikacji kremu, aniżeli grupa kontrolna. Mediana odpowiedzi padających w grupie badanej kształtowała się na poziomie 2 (minimalna poprawa), podczas gdy w grupie kontrolnej na poziomie 1 (brak poprawy). Rozkład udzielanych przez pacjentki odpowiedzi obrazuje Ryc. nr 36 i Tab. nr 26.



Rycina 36. Zadowolenie z efektu stosowania kremu niwelującego przebarwienia u pacjentek z *melasmą*.

Tabela 26. Rozdział udzielanych odpowiedzi przez pacjentki z *melasmą*.

Skala satysfakcji	Grupa badana		Grupa kontrolna	
	Liczba pacjentek	%	Liczba pacjentek	%
0	2	6,90	5	23,80
1	7	24,14	13	61,90
2	7	24,14	3	14,30
3	13	44,82	0	-

Prawie 45% pacjentek, posiadających przebarwienia skóry typu *melasma*, aplikujących krem z wyciągiem z liści z sierpika pięciolistnego, zauważyło zdecydowaną poprawę po zakończeniu kuracji, podczas gdy w grupie kontrolnej taka odpowiedź nie padła ani razu. Ponad 24% pacjentek grupy badanej zaobserwowało minimalną poprawę w miejscu przebarwienia, natomiast w grupie kontrolnej zaledwie 14%.

W grupie kontrolnej najczęściej padały odpowiedzi: „*brak poprawy*” i „*pogorszenie*” (odpowiednio 23,80% i 61,90%).

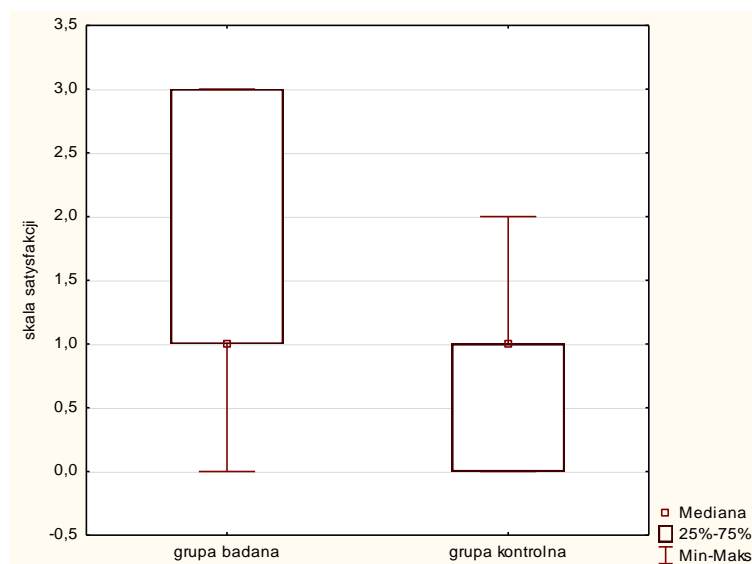
Udzielane przez pacjentki odpowiedzi po raz kolejny odzwierciedliły wyniki, które otrzymano podczas ostatecznych pomiarów poziomu melaniny. Zarówno subiektywna ocena uczestniczek, jak i wyniki pomiarów wykazały, że zmiany pigmentacyjne skóry typu *melasma* ulegają rozjaśnieniu po upływie 8 tygodni aplikacji kremu.

3.6.2. Ocena satysfakcji pacjentek z *lentigo solaris*, z rezultatów stosowania kremu rozjaśniającego przebarwienia skóry

Podobną analizę zależności statystycznej stopnia zadowolenia z efektu aplikacji kremu niwelującego przebarwienia przeprowadzono w grupie pacjentek z *lentigo solaris*. Tak jak poprzednio, wykorzystano test U - Manna – Whitney'a i przyjęto za wartość statystycznie znamiennej $p \leq 0,05$.

Analogicznie analiza statystyczna wykazała istotne różnice ($p=0,009$) w stopniu zadowolenia z rezultatu stosowania kremu na przebarwienia pomiędzy grupą badaną i kontrolną (Ryc.37).

Analizując obie grupy terapeutyczne stwierdzono, że pacjentki z *lentigo solaris* w grupie badanej były bardziej zadowolone z aplikacji kremu, aniżeli grupa kontrolna. Nie mniej jednak mediana odpowiedzi padających w grupie badanej i kontrolnej kształtowała się na poziomie 1 (brak poprawy). Rozkład udzielanych przez pacjentki odpowiedzi obrazuje Ryc. nr 37 i Tab. nr 27.



Rycina 37. Zadowolenie z efektu stosowania kremu niwelującego przebarwienia u pacjentek z *lentigo solaris*.

Tabela 27. Rozdział udzielanych odpowiedzi przez pacjentki z *lentigo solaris*.

Skala satysfakcji	Grupa badana		Grupa kontrolna	
	Liczba pacjentek	%	Liczba pacjentek	%
0	6	24,00	10	37,05
1	8	32,00	16	59,25
2	2	8,00	1	3,70
3	9	36,00	0	-

Pacjentki posiadające przebarwienia typu *lentigo solaris*, aplikujące krem z wyciągiem z liści z sierpika pięciolistnego zauważyły zdecydowaną poprawę lub minimalną poprawę po zakończeniu kuracji (44%), podczas gdy w grupie kontrolnej odpowiedź „*minimalna poprawa*” padła zaledwie u 3,70% ankietowanych, a „*zdecydowana poprawa*” - ani razu.

Znacznie częściej w grupie kontrolnej, aniżeli w grupie badanej padały odpowiedzi: „*brak poprawy*” i „*pogorszenie*” (odpowiednio 59,25% i 32% oraz 37,05% i 24%).

3.7. Niepożądane działanie kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego

Podczas aplikacji kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego nie obserwowano żadnych objawów podrażnienia skóry, takich jak: rumień, świąd, wysypka czy obrzęk. Ani jedna pacjentka, zarówno z grupy badanej, jak i kontrolnej nie zgłosiła w ciągu trwania całej 8- tygodniowej terapii jakichkolwiek podrażnień skóry, związanych z aplikacją kremu.

Podobnie, w czasie wykonywania testów diagnostycznych, w postaci naskórkowych testów płatkowych, nie zanotowano ani jednego przypadku działania drażniącego, spowodowanego naklejeniem plastra z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego i podłożem kremowym.

3.8. Prezentacja efektu rozjaśniającego kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego u wybranych pacjentek

U wszystkich pacjentek biorących udział w badaniu obserwowano za pomocą pomiarów aparaturowych i dokumentacji fotograficznej postępy kuracji wybielającej. U kilku pacjentek stwierdzono znaczny efekt rozjaśnienia miejsc dotkniętych przebarwieniem, po zastosowaniu kremu z wyciągiem.

3.8.1. Pacjentka nr 1

Kobieta w wieku 35 lat, z przebarwieniami skóry, trafiła do Centrum Diagnostyki Znamion w Poznaniu. Podczas wizyty lekarskiej rozpoznano u niej ostudę (*melasmę*). W czasie wywiadu ustalono, że zmiana ta powstała u pacjentki dwa lata temu, w trakcie stosowania hormonalnych środków antykoncepcyjnych.

Przebarwienia zlokalizowane były na czole pacjentki. Obraz kliniczny przebarwienia przedstawia Ryc. nr 38.

Pacjentka posiadała fototyp skóry II, wg klasyfikacji Fitzpatricka; uległa w przeszłości poparzeniu słonecznemu, a w jej rodzinie nie odnotowano przypadków zachorowań na czerniaka lub inny nowotwór skóry.

Podczas wizyty ustalono, że pacjentka stosuje kremy z filtrem SPF 30+ i SPF 15+ wyłącznie podczas opalania.

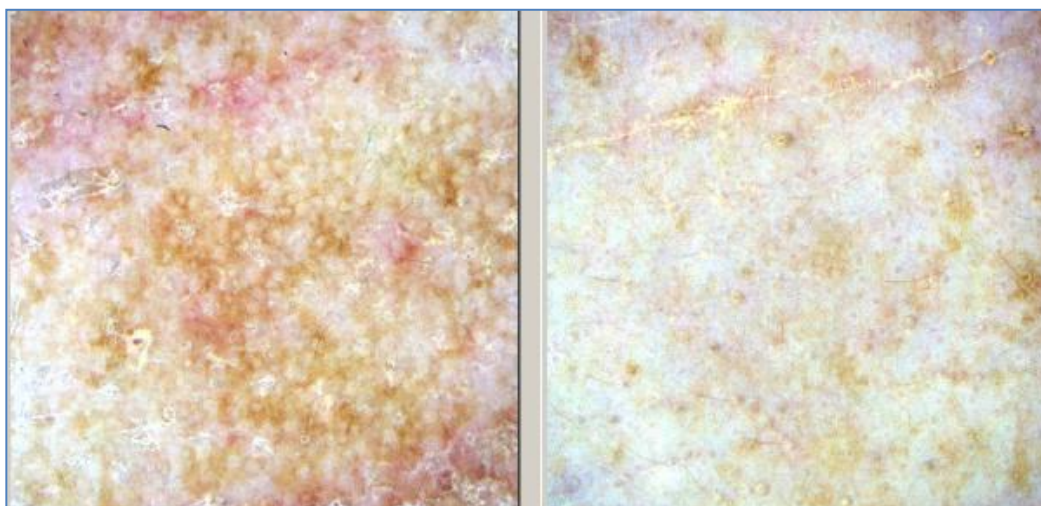
Wcześniej wykonywała zabiegi rozjaśniające przebarwienia skóry m.in. peeling kawitacyjny i mikrodermabrazję. Zabiegi te przynosiły rezultaty czasowo, a kolejne ekspozycje na promieniowanie słoneczne powodowały nawrót przebarwień skóry. Pacjentka nie stosowała uprzednio żadnych kosmetyków niwelujących przebarwienia skóry.

Zaproponowano jej kurację kremem rozjaśniającym przebarwienia skóry, zawierającym w swoim składzie wyciąg z liści sierpika pięciolistnego. Przed rozpoczęciem aplikacji kremu przeprowadzono u pacjentki pomiary poziomu melaniny w miejscu dotkniętym przebarwieniem, a następnie powtarzano je, odpowiednio po upływie 1, 4 i 8 tygodni terapii (Tab.28).

Tabela 28. Poziom melaniny w miejscach przebarwień u pacjentki 1.

	Początkowy poziom melaniny	Poziom melaniny po 1 tygodniu	Poziom melaniny po 4 tygodniu	Poziom melaniny po 8 tygodniu
Lokalizacja: czoło	209,60	207,40	194,80	183,40

Analizując spadek poziomu melaniny u pacjentki, w obrębie przebarwienia, zanotowano spadek o 26,20. Powyższe pomiary odzwierciedlają obraz, który otrzymano także podczas badań dermatoskopowych (Ryc.38).



Rycina 38. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego na czole pacjentki 1 (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).

3.8.2. Pacjentka nr 2

Kobieta w wieku 41 lat, z przebarwieniami skóry, trafiła do Centrum Diagnostyki Znamion w Poznaniu. Podczas wizyty lekarskiej rozpoznano u niej ostudę (*melasmę*). W czasie wywiadu ustalono, że zmiana ta powstała u pacjentki podczas ciąży ponad 10 lat temu.

Przebarwienia były zlokalizowane na twarzy, w obrębie prawego i lewego policzka pacjentki. Obraz kliniczny ww. przebarwienia przedstawia odpowiednio Ryc. nr 39 i 40.

Pacjentka posiadała fototyp skóry II, wg klasyfikacji Fitzpatricka. Nie uległa w przeszłości poparzeniu słonecznemu, a w jej rodzinie nie odnotowano przypadków zachorowań na czerniaka lub inny nowotwór skóry.

Podczas wizyty ustalono, że pacjentka stosuje codziennie kremy z filtrem SPF 50+, jednakże dopiero od momentu powstania przebarwienia.

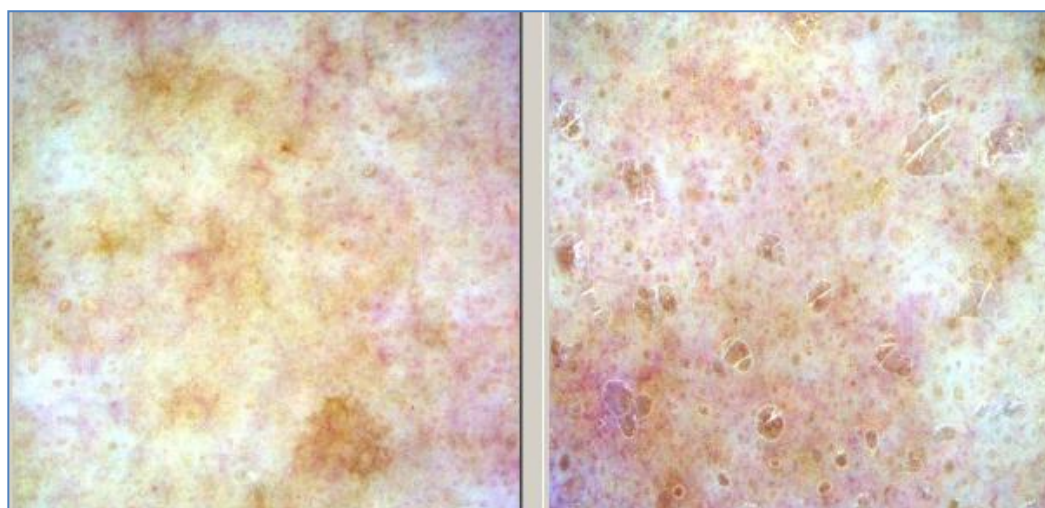
Wcześniej wykonywała zabiegi rozjaśniające przebarwienia m.in. peeling chemiczny kwasem glikolowym w stężeniach 20-50%. Zabiegi te przynosiły rezultaty czasowo, a kolejne ekspozycje na promieniowanie słoneczne powodowały nawrót przebarwień skóry. Pacjentka nie stosowała wcześniej żadnych kosmetyków niwelujących przebarwienia skóry.

Zaproponowano jej kurację kremem rozjaśniającym przebarwienia skóry, zawierającym w swoim składzie wyciąg z liści sierpika pięciolistnego. Przed rozpoczęciem aplikacji kremu przeprowadzono u pacjentki pomiary poziomu melaniny w miejscu dotkniętym przebarwieniem, a następnie powtarzano je, odpowiednio po upływie 1, 4 i 8 tygodni terapii (Tab.29).

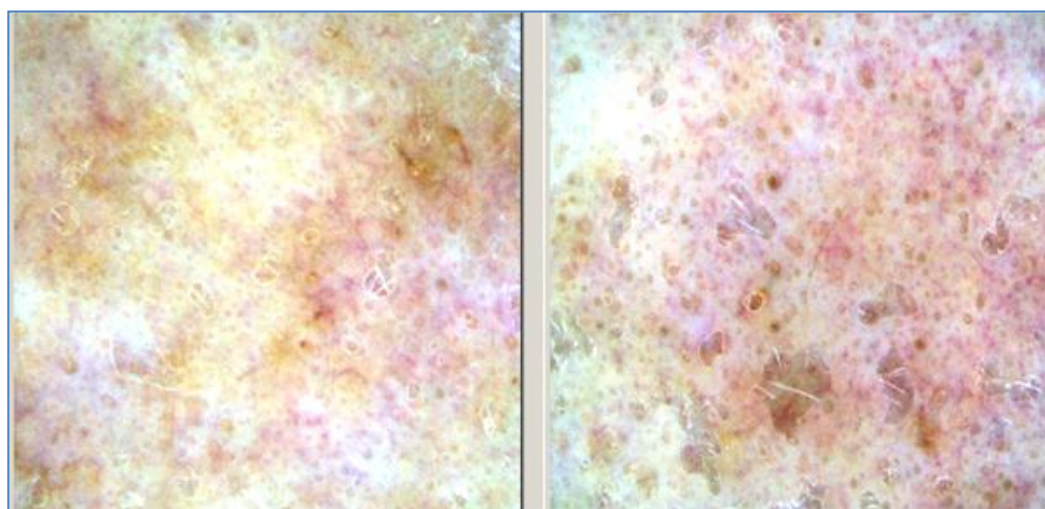
Tabela 29. Poziom melaniny w miejscach przebarwień u pacjentki 2.

	Początkowy poziom melaniny	Poziom melaniny po 1 tygodniu	Poziom melaniny po 4 tygodniu	Poziom melaniny po 8 tygodniu
Lokalizacja: prawy policzek	163,20	163,40	148,40	135,20
Lokalizacja: lewy policzek	177,80	171,00	160,80	131,40

Analizując spadek poziomu melaniny u pacjentki, w obrębie przebarwienia na prawym policzku zanotowano spadek o 28,00, a na lewym policzku aż o 46,40. Powyższe pomiary odzwierciedlają obraz, który otrzymano także podczas badań dermatoskopowych (Ryc.39 i 40).



Rycina 39. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego w obrębie prawego policzka (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).



Rycina 40. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego w obrębie lewego policzka (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DyskusJA

A. CZĘŚĆ FITOCHEMICZNA

Materiałem do analiz fitochemicznych były liście sierpika pięciolistnego (*Serratulae quinquefoliae folium*), występującego w warunkach naturalnych na terenach m.in. Rosji, Turcji, Iranu i Armenii. Na potrzeby powyższych badań gatunek ten był uprawiany w Ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, pod numerem katalogowym 162/89.

Pierwszym etapem pracy było przygotowanie wyciągu do izolacji i identyfikacji związków zawartych w liściach sierpika pięciolistnego. 250g wysuszonego i rozdrobnionego surowca zalano alkoholem metylowym. Po trzykrotnej maceracji rozpuszczalnik oddestylowano, pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 25g gęstego syropu (16g suchego wyciągu). Metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), skontrolowano jego skład chemiczny, stosując jako adsorbent aluminiowe płytki chromatograficzne, pokryte żelem krzemionkowym oraz odczynnik anyżowy, jako wywoływacz plam na chromatogramie. Wśród nich wyróżniał się jeden, o brązowej barwie, oznaczony symbolem A – zdecydowanie dominujący. Wydzielono go w postaci jednorodnej substancji metodą chromatografii kolumnowej, na żelu krzemionkowym. Do rozdziału jako fazę wymywającą z kolumny wybrano mieszaninę chlorku metylenu z metanolem. Eluację rozpoczęto stosując odpowiednio proporcję 15:1, a następnie zwiększano polarność układu poprzez stopniowe zwiększanie ilości metanolu. Zbierano frakcje o poj. 8 ml, które kontrolowano metodą TLC. Związek A, obecny we frakcjach 4 i 5 wymywano z kolumny mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w proporcji 6:1. Pozostałe frakcje zawierały substancje w bardzo małych ilościach, nie nadających się do dalszych analiz.

Otrzymany związek A krystalizował z mieszaniny eluującej w postaci bezbarwnych oraz białych do kremowych igieł. Zanieczyszczenia barwnymi substancjami usunięto przez rekrytalizację i przemywanie kryształów mieszaniną chlorku metylenu i metanolu w proporcji 4:1. Otrzymano łącznie 5013,13 mg białych igieł (Ryc.12, str.76), o temperaturze topnienia 199,5⁰C, łatwo rozpuszczalnych w octanie etylu, acetonie, metanolu oraz wodzie, a nierozpuszczalnych w chlorku metylenu, chloroformie, eterze naftowym i heksanie.

Otrzymany związek okazał się chromatograficznie jednorodny w trzech wybranych do kontroli układach: chlorek metylenu - metanol (4:1), heksan - octan etylu - metanol (2:1:2) i chlorek metylenu - aceton (1:2) (Ryc.6, str.67). Na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym obserwowano go w postaci brunatnej plamy, w świetle dziennym oraz

fluoryzującej na brązowo plamy przy długości fali 366 nm. Kolory plamy i wartości R_f były zgodne z wzorcem β -arbutyny.

Związek A identyfikowano metodami: chromatograficznymi, spektralnymi (IR, NMR) i krystalograficznymi.

Analiza IR wykazała, że jest on związkiem aromatycznym (1652 cm^{-1} i 1601 cm^{-1} oraz 1513 cm^{-1} i 1113 cm^{-1}) i, że w swojej strukturze posiada grupy hydroksylowe - szerokie pasmo przy 3552 cm^{-1} , potwierdzone sygnałem przy 1014 cm^{-1} , wskazującym na grupę fenolową (Ryc.7, str.68).

Widmo protonowego rezonansu jądrowego (Ryc.8, str.70) wykazało sygnały symetrycznych węgli charakterystycznych dla pierścienia benzenowego (dublety przy 6,98 ppm i 6,84 ppm) i obecność glukozy - charakterystyczne pasma przy 4,72 ppm - 3,25 ppm. Wśród izolowanych sygnałów był dublet o przesunięciu chemicznym 4,72 ppm, ze stałą sprzężenia J wynoszącą 7,7 Hz. Takie wartości wskazywały na konfigurację α protonu przy C1', węglu łączącym poprzez tlen, aglikon (tu pierścień benzenu) z częścią cukrową. Oznaczało to, że ten tlen przy C1' ma konfigurację β , a to wskazuje, że cały związek jest epimerem β . Dwa dublety dubletów przy 3,71 ppm i 3,86 ppm wskazywało też, że część cukrową stanowi glukoza w formie pierścienia piranozydowego.

Analiza widma węglowego (Ryc.9, str.72) potwierdziła obecność dwóch węgli IV-rzędowych, a ich wartości ppm świadczyły o występowaniu w analizowanym związku dwóch podstawników tlenowych przy podwójnym wiązaniu ($153,7\text{ ppm}$ i $152,3\text{ ppm}$). Jednym z nich musiała być grupa fenolowa (hydroksylowa połączona z pierścieniem benzenu) co już wykazało widmo IR, a drugim glukoza - wcześniej pokazało to widmo ^1H NMR. Widmo węglowe potwierdziło też obecność symetrycznych węgli przy podwójnym wiązaniu charakterystycznych dla pierścienia benzenowego ($119,3\text{ ppm}$ i 116 ppm) i sygnałów węgli glukozy w formie pierścienia piranozydowego (sygnały węgli III rzędowych: 71 ppm - 79 ppm i sygnał węgla II rzędowego: $62,0\text{ ppm}$).

Widmo dwuwymiarowe (Ryc.10, str.74) jednoznacznie wykazało połączenia protonów do odpowiednich węgli i potwierdziło rozwiązanie struktury związku A, jako 4'-hydroksyfenylo- β -D-glukopiranozyd zwanego β -arbutyną (Ryc.11, str.75).

Efektownie krystalizująca substancja (Ryc.12, str.76) skłaniała do wykonania analizy rentgenograficznej celem uzyskania ostatecznego dowodu na konfigurację przestrzenną i strukturę atomową związku A. Badania krystalograficzne otrzymanego związku A wykonano w Zakładzie Fizyki Krysztalów Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Wykazano połączenia przestrzenne i wielkości kątów między atomami wchodzącymi w skład struktury arbutyny z liści sierpika pięciolistnego (Ryc.13, str.77).

Sierpik pięciolistny (*Serratula quinquefolia*) był na przełomie lat 60 i 70 poddany analizie fitochemicznej, w której miano wykazać obecność ekdysonów, związków steroidowych charakterystycznych dla rodziny *Asteraceae* i rodzaju *Serratula*. Jednak nie potwierdzono tego zastosowanymi w niniejszej pracy metodami izolacyjnymi.

Arbutyna była dotychczas izolowana z gatunków z rodzin: *Ericaceae* (liście mącznicy lekarskiej, liście borówki brusznicy), *Lamiaceae* (ziele lebiodki pospolitej, ziele majeranku ogrodowego) i *Rosaceae* (liście gruszy ogrodowej). Jednak opisywano ją również w innych gatunkach rodzaju *Serratula* (*Asteraceae*) takich jak: *S. erucifolia*, *S. gmelinii* i *S. sogdiana*.

Kolejnym etapem pracy było oznaczenie zawartości zidentyfikowanej w liściach sierpika pięciolistnego β -arbutyny. Surowiec zebrano w czerwcu 2010 r., wysuszono w temperaturze ok. 40°C i następnie rozdrobniono. Analizy wykonano we współpracy z laboratorium fitochemicznym Phytopharm Klęka S.A., metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Oznaczenia arbutyny wykonano według monografii dla liści mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*), opisanej w Farmakopei Europejskiej 6.1 (04/2008:1054) [202].

Wykonano dwa oznaczenia zawartości dominującego związku w liściach sierpika pięciolistnego. Pojawiający się pik o czasie retencji 3,36 w pierwszym oznaczeniu i 3,37 w drugim, jednoznacznie został zidentyfikowany jako arbutyna. Okazało się, że jej zawartość w wysuszonych liściach sierpika pięciolistnego wynosiła 6,86% (średnia z dwóch oznaczeń). Jest to wartość porównywalna ze stężeniem arbutyny w liściach mącznicy lekarskiej, stosowanych dotychczas w preparatach kosmetycznych, ale były też surowce z tej rośliny, które zawierały tylko 2% tego związku.

B. CZĘŚĆ KOSMETOLOGICZNA

Zaburzenia pigmentacji skóry – przebarwienia, powstałe wskutek zaburzeń syntezy melaniny oraz nieprawidłowego jej rozmieszczenia w skórze stanowią popularny problem kosmetyczny i terapeutyczny. Wzrastające zainteresowanie produktami kosmetycznymi, przeznaczonymi do pielęgnacji skóry z przebarwieniami, skłoniło do opracowania receptury nowego kremu niwelującego przebarwienia skóry oraz do jego przetestowania wśród ochotników.

Do testów aplikacyjnych z udziałem probantów wykorzystano wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego oraz gotową bazę kremową. Wyciąg przygotowano z 427g wysuszonych i rozdrobnionych liści sierpika. Otrzymano 160g ekstraktu gęstego (*Extractum spissum*), o wysokiej czystości mikrobiologicznej, zawierającego 9,3% β -arbutyny, oznaczonej metodą HPLC.

Jako bazę kremową wybrano uniwersalne podłoże maściowe – Lekobazę, stosowane powszechnie w dermatologii i kosmetologii. Przy wyborze podłoża kremowego kierowano się właściwościami fizyko-chemicznymi arbutyny, która jako związek wysoce hydrofilny ma niską zdolność penetracji do warstwy podstawnej naskórka (*stratum basale*). Problem ten rozwiązano poprzez dobór odpowiedniego podłoża kremowego, posiadającego możliwości emulgacji znacznych ilości roztworów wodnych.

Przygotowano dwa rodzaje kremów: krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego, zawierającym 2,5% arbutyny oraz krem bez substancji czynnej (placebo).

Kremy testowano u 102 pacjentek, posiadających przebarwienia skóry typu: *melasma* i *lentigo solaris*, przez okres dwóch miesięcy (aplikacja punktowa – 2 razy dziennie).

Pacjentki włączano do badania na podstawie diagnozy lekarskiej, określającej rodzaj zaburzenia pigmentacji skóry, a następnie przydzielano losowo do jednej z dwóch grup: badanej lub kontrolnej.

Z badania wykluczono pacjentki z dodatnim wynikiem testu płatkowego oraz dodatnim wywiadem w kierunku raka skóry.

Grupy terapeutyczne, biorące udział w badaniu, miały podobną strukturę pod względem: wieku, fototypu skóry, płci oraz rodzaju przebarwienia. Pomędzy obiema grupami nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych.

W badaniu wzięły udział kobiety w wieku 26–55 lat. Badanie prowadzono w obrębie trzech klas wieku: 26–35, 36–45 i 46–55 lat. Wśród uczestniczek przeważały pacjentki z dwóch pierwszych klas wieku (Ryc.29, str.198). Stanowiły one najliczniejsze i zrównoważone pod względem liczebności klasy w obrębie obu grup terapeutycznych.

Podobnie wyglądał rozkład fototypów skóry pacjentek. W badaniu wzięły udział osoby posiadające fototyp skóry II, III i IV. Liczebności w obu grupach terapeutycznych były na podobnym poziomie (Ryc.30, str.99), jednakże dominowały w nich kobiety z fototypem skóry III.

Grupy terapeutyczne nie różniły się również znacząco pod względem posiadanych przez pacjentki przebarwień skóry. W obu grupach rozkład liczebności pacjentek z zaburzeniami pigmentacji typu: *melasma* i *lentigo solaris* był zbliżony (Ryc.31, str.100).

Grupa badana i kontrolna różniły się natomiast średnim początkowym poziomem melaniny. W grupie badanej średni wyjściowy poziom melaniny wynosił 182,60, podczas gdy w grupie kontrolnej 158,90. Różnica ta była znamienna statystycznie ($p=0,002$).

Podobnie pacjentki grupy badanej i kontrolnej, posiadające przebarwienia skóry typu *melasma* różniły się średnim wyjściowym poziomem melaniny. W grupie badanej poziom ten wynosił 184,72, a w grupie kontrolnej 148,71. Różnice te były istotne statystycznie ($p=0,002$).

Pomiędzy początkowymi poziomami melaniny u pacjentek grupy badanej i kontrolnej, z przebarwieniami skóry typu *lentigo solaris*, nie stwierdzono z kolei istotnych różnic statystycznych ($p=0,172$). W grupie badanej średni wyjściowy poziom melaniny był równy 180,12, natomiast w grupie kontrolnej 166,82.

Podczas przydziału pacjentek do każdej z grup terapeutycznych skupiono się na wieku pacjentek oraz cechach klinicznych takich jak: rodzaj zaburzenia pigmentacji skóry i fototyp skóry.

Po dwumiesięcznej aplikacji kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego w grupie badanej zaobserwowano spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia skóry średnio o 13,84, podczas gdy w grupie kontrolnej zanotowano wzrost jej poziomu o 7,94 (Ryc.32, str.102). Trend spadkowy poziomu melaniny u pacjentek grupy badanej był widoczny od pierwszych tygodni aplikacji kremu. Krem hamował proces syntezy melaniny i prowadził do rozjaśnienia przebarwień oraz wyrównania barwy skóry. Codzienna pielęgnacja kremem z wyciągiem spowodowała poprawę wyglądu skóry pacjentek. Zdaniem ponad 40% pacjentek grupy badanej terapia przyniosła zamierzony efekt oraz nastąpiła zdecydowana poprawa wyglądu skóry w miejscu przebarwienia (Tab.25, str.110, Ryc.35, str.109). Opinię pacjentek potwierdzono badaniem dermatoskopowym oraz ostatecznym pomiarem poziomu melaniny w miejscu przebarwienia.

Pacjentki grupy kontrolnej, stosujące krem bez substancji czynnej (placebo), nie zauważyły natomiast żadnej poprawy. Ponad 60% z nich po zakończeniu aplikacji kremu

uznało, że terapia nie przyniosła zamierzonego efektu, a ponad 30% zaobserwowało u siebie pogorszenie wyglądu skóry w miejscu przebarwienia (Tab.25, str.110, Ryc.35, str.109).

Pacjentki grupy badanej posiadające przebarwienia skóry typu: *melasma* zauważyły, że 8- tygodniowa aplikacja kremu przyniosła także zamierzony efekt. Zmiany pigmentacyjne zostały rozjaśnione, a barwa skóry uległa wyrównaniu. Pielęgnacja skóry pacjentek kremem z wyciągiem spowodowała spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia średnio o 16,40, podczas gdy w grupie kontrolnej stosującej placebo, takiego efektu nie zaobserwowano (Ryc.33, str.104, Tab.21, str.103). Trend spadkowy poziomu melaniny u pacjentek grupy badanej był widoczny już po 4 tygodniach aplikacji kremu i tendencja ta utrzymywała się do końca terapii. Codzienna pielęgnacja kremem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego spowodowała zadaniem pacjentek poprawę wyglądu skóry (Ryc.36, str.111). Prawie 69% pacjentek z *melasmą* grupy badanej stwierdziło, że terapia przyniosła zamierzony efekt. Około 45% z nich zauważyło zdecydowaną poprawę wyglądu przebarwienia skóry, a ponad 24% minimalną jego poprawę (Tab.26, str.111). Spostrzeżenia pacjentek, biorących udział w badaniu znalazły odzwierciedlenie w ostatecznych pomiarach poziomu melaniny i obrazie klinicznym przebarwienia. Krem z wyciągiem okazał się dobrym środkiem pielęgnacyjnym dla pacjentek posiadających przebarwienia skóry typu: *melasma*. W niniejszej pracy zaprezentowano dwa najciekawsze przypadki kliniczne pacjentek z *melasmą*, u których efekt terapeutyczny był znaczący (Ryc.38, str.115, Ryc.39 i Ryc.40, str.116). 8- tygodniowa pielęgnacja kremem z wyciągiem pozwoliła u nich na istotne rozjaśnienie przebarwień oraz wyrównanie barwy skóry.

Pacjentki grupy kontrolnej, aplikujące krem bez substancji aktywnej nie stwierdziły natomiast żadnej poprawy. Prawie 62% z nich po zakończeniu aplikacji kremu uznało, że terapia nie przyniosła oczekiwanego efektu, a ponad 23% zaobserwowało u siebie pogorszenie wyglądu skóry w miejscu przebarwienia (Tab.26, str.111). Po upływie 4 tygodni terapii średni poziom melaniny pozostawał u nich na stałym poziomie oraz nieznacznie wzrastał w kolejnych tygodniach terapii (Ryc.33, str.104).

W przypadku pacjentek grupy badanej, posiadających przebarwienia skóry typu: *lentigo solaris* stwierdzono także, że średni poziom melaniny w miejscu przebarwienia skóry spada o 10,85, podczas gdy w grupie kontrolnej, aplikującej placebo poziom jej wrasta o 11,80 (Ryc.34, str.106). Podobnie, jak w przypadku pacjentek z *melasmą*, pielęgnacja skóry kremem z wyciągiem przyniosła zamierzone efekty terapeutyczne (Ryc.37, str.112). Skóra pacjentek z *lentigo solaris* uległa rozjaśnieniu w miejscu przebarwienia. Aż 44% pacjentek zauważyło poprawę wyglądu skóry po zakończeniu 8- tygodniowej aplikacji kremu (Tab.27, str.113). Trend spadkowy poziomu melaniny u pacjentek grupy badanej był widoczny już od

pierwszych tygodni stosowania kremu (Ryc.34, str.106). Krem hamował proces syntezy melaniny przez cały okres jego trwania.

U pacjentek z *lentigo solaris* grupy kontrolnej, aplikującej krem bez substancji aktywnej zaobserwowano odmienny trend niż w grupie badanej. Stwierdzono, że poziom melaniny od pierwszego tygodnia kuracji wrasta i stan ten utrzymuje się w do samego jej zakończenia (Ryc.34, str.106).

Zmiany przeciętnych poziomów melaniny przebiegały istotnie różnie w obu grupach terapeutycznych.

W ramach niniejszej pracy nie przeprowadzono szczegółowych analiz statystycznych, związanych ze zmianą poziomu melaniny w czasie, w poszczególnych klasach wieku oraz fototypach skóry. Zbyt małe liczebności poszczególnych klas wieku oraz fototypów skóry nie pozwoliły na przeprowadzenie rzetelnych analiz statystycznych. Nie mniej jednak analiza zmiany poziomu melaniny w poszczególnych klasach wieku oraz fototypach skóry, uwzględniająca średnią arytmetyczną poziomu melaniny z kolejnych pomiarów była interesująca. Analizując odrębne klasy wieku pacjentek zauważono, że najlepsze efekty terapeutyczne występują u pacjentek w przedziale wiekowym 46–55 lat. Średni spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, w grupie badanej wynosił 39,22. Tendencja spadkowa poziomu melaniny w grupie badanej była dostrzegalna już po upływie 1 tygodnia terapii (obniżenie o 14,65) i utrzymywała się w kolejnych tygodniach - spadek o 17,67 i 6,90, odpowiednio po 4 i 8 tygodniu terapii.

Podobnie, lecz nie tak efektywnie, reagowały na terapię kremem z wyciągiem pacjentki w przedziale wiekowym 36-45 lat. Stwierdzono u nich spadek poziomu melaniny w miejscu przebarwienia średnio o 13,64. Jednakże tendencja spadkowa poziomu melaniny była u nich widoczna dopiero po upływie 4 tygodni aplikacji kremu.

Relatywnie najslabiej na terapię zareagowały pacjentki w przedziale wiekowym 26–35 lat. Zanotowano u nich spadek poziomu melaniny o 7,41.

Nadmienić należy, że w każdej z klas wieku, u pacjentek grupy kontrolnej zauważono wzrost poziomu melaniny w miejscu przebarwienia. Porównując grupy kontrolne odrębnych klas wieku ustalono, że najwyższy wzrost poziomu melaniny występuje u kobiet w przedziale wiekowym 36–45 lat.

Uzyskane wyniki wydają się zachęcające i skłaniają do dalszej ich weryfikacji na większej populacji kobiet.

Analizując poszczególne fototypy skóry pacjentek zaobserwowano, że najlepsze efekty terapeutyczne występują u pacjentek z fototypem skóry II. Po 8-tygodniowej kuracji kremem z wyciągiem średni poziom melaniny w miejscu przebarwienia spada o 29,85, a tendencja

spadkowa była widoczna już po upływie 1 tygodnia terapii (obniżenie o 10,55) i utrzymywała się w kolejnych tygodniach, spadek o 11,52 i 7,78, odpowiednio po 4 i 8 tygodniu terapii.

Znacznie słabiej na terapię zareagowały kobiety z fototypem skóry III i IV. Stwierdzono u nich odpowiednio spadek poziomu melaniny o 6,19 i 4,26, jednakże spadki te nie były tak istotne, jak w przypadku Pań z fototypem skóry II.

Analogicznie jak poprzednio zarejestrowano wzrost poziomu melaniny u pacjentek grupy kontrolnej, w każdym z fototypów skóry. Porównując grupy kontrolne ww. fototypów skóry zauważono, że u pacjentek z fototypami skóry III i IV nastąpił znaczący wzrost poziomu melaniny w miejscu przebarwienia.

Uzyskane wyniki u kobiet z fototypem skóry II wydają się obiecujące i skłaniają do dalszej ich weryfikacji na większej populacji kobiet.

Zaprezentowane wyniki badań potwierdzają efektywność i przydatność kosmetyczną kremu z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego w pielęgnacji skóry z przebarwieniami. Aplikowanie kremu z wyciągiem roślinnym okazało się skuteczną metodą rozjaśniania przebarwień skóry typu: *melasma* i *lentigo solaris*, a wcześniejsze doniesienia literaturowe na temat skuteczności arbutyny w usuwaniu różnego rodzaju zaburzeń pigmentacyjnych skóry znalazły odzwierciedlenie w prezentowanych powyżej wynikach badań.

Ponadto ponownie udowodniono, że stosowana zewnętrznie arbutyna jest substancją bezpieczną i nie wykazującą działania drażniącego skóry. Żadna z uczestniczek badania podczas całej 8-tygodniowej terapii kremem nie zaobserwowała jakichkolwiek podrażnień skóry. Krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego wydaje się być zatem dobrą alternatywą dla stosowanego dotąd powszechnie w dermatologii hydrochinonu, którego bezpieczeństwo stosowania jest kwestionowane.

Wykorzystana w opracowanym przeze mnie kremie taka ilość standaryzowanego wyciągu roślinnego, która równoważyła 2,5% arbutyny, okazała się skuteczna w zmniejszaniu intensywności przebarwień skóry. Krem z niebadanym dotąd wyciągiem roślinnym może być dobrym wyborem pielęgnacyjnym dla pacjentek z przebarwieniami skóry, ponieważ stosowane dotychczas powszechnie kosmetyki z arbutyną zawierały zwykle syntetyczne jej postaci (α -arbutyna), przeciętnie w stężeniu 2%.

Duża zawartość naturalnej β -arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego okazuje się być również interesująca pod względem ekonomicznym. Po raz pierwszy na rynku kosmetycznym pojawiłby się preparat ze standaryzowanym wyciągiem roślinnym na zawartość efektywnie działającej arbutyny, który stanowiłby tańszą i łatwiej dostępną alternatywę stosowanej dotąd substancji aktywnej.

Przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań potwierdzają, że codzienna pielęgnacja skóry z przebarwieniami kremem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego pozwala na rozjaśnienie przebarwień skóry typu: *melasma* i *lentigo solaris*, a także na wyrównanie barwy skóry. Może stanowić cenne uzupełnienie zabiegów rozjaśniających przebarwienia skóry, prowadzonych na co dzień w gabinetach dermatologicznych oraz gabinetach medycyny estetycznej.

Podjęto decyzję o kontynuacji badań na zwiększonej populacji osób celem porównania efektywności wyciągu roślinnego i arbutyny w postaci czystego związku, wyizolowanej z liści sierpika pięciolistnego, w usuwaniu zaburzeń pigmentacyjnych skóry.

V. WNIOSKI

1. *Serratulae quinquefoliae folium* (liść sierpika pięciolistnego) można uznać za surowiec arbutynowy. Średnia zawartość tego związku w ww. surowcu, oznaczona metodą HPLC, wynosi 6,86%.
2. Profil fitochemiczny tego surowca (niemal jednoskładnikowy) stwarza możliwości standaryzacji preparatów w oparciu o związek czynny. Zawartość β -arbutyny w wodnym wyciągu z liści sierpika pięciolistnego wynosi 9,3%.
3. Badania kosmetologiczne z udziałem ochotników wykazały, że krem z wyciągiem z liści z sierpika pięciolistnego jest skutecznym kosmetykiem, rozjaśniającym przebarwienia skóry. Efekt rozjaśnienia i wyrównania barwy skóry zaobserwowano u 36 osób, co stanowiło 66,67% włączonych do grupy badanej osób.
4. Krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego można uznać za kosmetyk pierwszego wyboru w pielęgnacji skóry z przebarwieniami typu: *melasma* i *lentigo solaris*. Preparat okazał się efektywny u 22 pacjentek z przebarwieniami typu: *melasma* (75,86% grupy badanej) i u 14 pacjentek z przebarwieniami typu: *lentigo solaris* (56% grupy badanej).
5. Krem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego nie wykazuje działania drażniącego skóry.
6. Uzyskane wyniki badań upoważniają do rozważenia wszczęcia procedury rejestracji kosmetyku w oparciu o wyciąg z liści sierpika pięciolistnego, jako substancji aktywnej.

VI. STRESZCZENIE

Zaburzenia pigmentacji skóry powstałe w wyniku działania różnorodnych czynników, stanowią częsty problem kosmetyczny i terapeutyczny, a także są przyczyną obniżenia jakości życia wielu osób. Większość z nich to przebarwienia nabyte, będące rezultatem zaburzeń syntezy melaniny oraz nieprawidłowego jej rozmieszczenia w skórze.

W terapii zaburzeń pigmentacyjnych skóry – przebarwień, wykorzystywane są liczne metody terapeutyczne oraz substancje czynne, hamujące wieloetapowy proces syntezy melaniny. Ich wybór uzależniony jest przede wszystkim od: rozległości, lokalizacji, głębokości i przyczyny powstania przebarwień skóry.

Celem niniejszej pracy była ocena fitochemiczna oraz określenie przy zastosowaniu nowoczesnych metod badań klinicznych właściwości kosmetycznych standaryzowanego na zawartość β -arbutyny, ekstraktu z liści sierpika pięciolistnego w pielęgnacji skóry z przebarwieniami.

Z wyżej wymienionego surowca roślinnego przygotowano dwa rodzaje wyciągów roślinnych: metanolowy – przeznaczony do izolacji i identyfikacji związków zawartych w liściach sierpika pięciolistnego oraz wodny – przeznaczony do oceny efektywności kosmetycznej, w testach aplikacyjnych z udziałem probantów.

Badania fitochemiczne wykazały, że wyizolowana z liści sierpika pięciolistnego i zidentyfikowana nowoczesnymi metodami analitycznymi (magnetyczny rezonans jądrowy i krystalografia) β -arbutyna jest związkiem dominującym w tym surowcu. Jej stężenie, oznaczone metodą HPLC, wynosi 6,86%.

Przygotowany wodny wyciąg z liści sierpika pięciolistnego, o wysokiej czystości mikrobiologicznej, zawierającym aż 9,3% β -arbutyny, wykorzystano jako substancję aktywną w kremie zawierającym 2,5% arbutyny, który przeznaczono do testów kosmetycznych z udziałem probantów.

Badaniami objęto 102 kobiety, w przedziale wiekowym 26-55 lat. Pacjentki posiadały zdiagnozowane przebarwienia skóry typu: *melasma* i *lentigo solaris*. Przydzielono je losowo do jednej z dwóch grup terapeutycznych: badanej lub kontrolnej. W ich skład wchodziły osoby, które miały zbliżoną strukturę pod względem: wieku, fototypu skóry i rodzaju przebarwienia.

Z badań wyłączono kobiety z dodatnim wynikiem testu płatkowego oraz dodatnim wywiadem w kierunku raka skóry.

Pacjentki włączone do badania aplikowały krem w miejscu przebarwienia przez okres 8 tygodni (aplikacja punktowa – 2 razy dziennie).

Po dwumiesięcznej aplikacji kremu z wyciągiem stwierdzono, że poziom melaniny w miejscu przebarwienia skóry obniżył się, prowadząc do rozjaśnienia przebarwień oraz wyrównania barwy skóry. Ponadto zdaniem ponad 40% pacjentek systematyczna pielęgnacja kremem z wyciągiem z liści sierpika pięciolistnego spowodowała poprawę wyglądu ich skóry i przyniosła zamierzony efekt kosmetyczny. Krem okazał się skuteczny zarówno u pacjentek z przebarwieniami skóry typu: *melasma*, jak i *lentigo solaris*. W badaniach stwierdzono także, że nie posiada on działania drażniącego skóry.

W związku z powyższym można przyjąć, że opracowany przeze mnie preparat jest dobrym sposobem pielęgnacji skóry z przebarwieniami i cennym uzupełnieniem zabiegów rozjaśniających przebarwienia skóry, wykonywanych w gabinetach dermatologicznych oraz gabinetach medycyny estetycznej.

VII. SUMMARY

The evaluation of the cosmetic properties of *Serratula quinquefolia* extract in hyperpigmented skin care

The disorders of skin pigmentation caused by various factors are a common cosmetic and therapeutic issue. They are also the cause of decreasing quality of many people's lives. Most of the pigmentation irregularities are acquired hyperpigmentations, resulting from disorders and abnormalities in the synthesis and the distribution of melanin in their skin.

In the treatment of cutaneous hyperpigmentations - stains - numerous methods of therapy and active ingredients are used. They inhibit the multi-step process of melanin formation. Their choice depends primarily on: the extent, location, depth and the reasons for the discoloration of the skin.

The purpose of this study, using the modern methods of clinical research, was to determine the phytochemical and the cosmetic properties of the standardized β -arbutin content of *Serratula quinquefolia* extract in treating skin pigmentation disorders.

From the above-mentioned plant material, two kinds of extracts were prepared: a methanol-based - for the isolation and the identification of the compounds contained in the leaves of *Serratula quinquefolia* and a water-based one - designed to evaluate the effectiveness of cosmetic application in tests involving the test subjects.

Phytochemical studies have shown that the β -arbutin, isolated and identified with modern analytical methods (nuclear magnetic resonance and crystallography), found in the leaves of *Serratula quinquefolia* is the dominant compound of the raw material. The concentration, determined by HPLC, is 6.86%.

The prepared high microbiological purity aqueous extract of *Serratula quinquefolia* leaves, containing up to 9.3% of β -arbutin, was used as the active ingredient in a cream containing 2.5% arbutin, which was used on cosmetologic test subjects.

The study involved 102 women aged 26-55 years. Patients were diagnosed with two kinds of hyperpigmentary diseases: *melasma* and *lentigo solaris*. They were randomly assigned to one of two treatment groups: the test group or the control group. The groups contained people who had similar properties in terms of age, skin phototype and the type of discoloration.

The study excluded women with a positive patch test and the history of skin cancer.

Patients included in the study applied the cream in the place of discoloration for a period of 8 weeks (point application – twice a day).

After two months of cream application, the level of melanin in the skin pigmentation spot decreased, leading to the lightening of hyperpigmentation and general skin tone adjustment.

Moreover, according to more than 40% of the subjects, the systematic care using the cream with the extracts from the *Serratula quinquefolia* leaves improved the appearance of their skin and resulted in a desired cosmetic effect. The cream was effective in patients with both types of skin hyperpigmentation: *melasma* and *lentigo solaris*.

The tests also showed that the cream causes no skin irritation.

Therefore, we can assume that I have developed a product that is a good way to treat skin pigmentation disorders and a valuable complement to the range of skin discoloration treatments that are performed in dermatological and aesthetic surgery.

VIII. PIŚMIENICTWO

1. Urbańska A.: Zaburzenia barwnikowe hiperpigmentacyjne jako problem kosmetyczny. *Nowa Medycyna* 1/2003; zeszyt 120: 18-23.
2. Balkrishnan R., Kelly A.P., McMichael A., Torok H.: Improved quality of life with effective treatment of facial melasma: the pigment trial. *J. Drugs Dermatol.* 2004; 3(4): 377-381.
3. Draelos Z.D.: Skin lightening preparations and hydroquinone controversy. *Dermatol. Ther.* 2007; 20(3): 308-313.
4. Kanthraj G.R.: Skin-lightening agents: New chemical and plant extracts – ongoing search for the holy grail! *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2010; 76(1): 3-6.
5. Maeda K., Fukuda M.: Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 1996; 276(2): 765-769.
6. Chakraborty A.K., Funasaka Y., Komoto M., Ichihashi M.: Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 1998; 11(4): 208-212.
7. Sugimoto K., Nishimura T., Nomura K., Sugimoto K., Kuriki T.: Syntheses of arbutin- α -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α -arbutin and arbutin on human tyrosinase. *Chem. Pharm. Bull.* 2003; 51(7): 798-801.
8. Nowak G., Nawrot J., Latowski K.: Arbutin in *Serratula quinquefolia* M.B. (Asteraceae). *Acta Soc. Bot. Pol.* 2009; 78(2): 137-140.
9. Martins L., Hellwig F.H.: Phylogenetic relationships of the enigmatic species *Serratula chinensis* and *Serratula forrestii* (Asteraceae – Cardueae). *Pl. Syst. Evol.* 2005; 255: 215-224.
10. Canzon J.F.M., Marchall J.B.: *Serratula* L. W: Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. [red.]. *Flora Europaea*. University Press, Cambridge 1976; 4: 250.
11. Martins L.: Systematic position of genera *Serratula* and *Klasea* within Centaureinae (Cardueae, Asteraceae) inferred from ETS and ITS sequence data and new combinations in *Klasea*. *Taxon* 2005; 54(3): 632-638.
12. Cantó P.: New combinations in the *Klasea intergrifolia* group (Asteraceae). *Ann. Bot. Fennici* 2009; 46: 435-438.
13. Martins L.: Systematics and biogeography of *Klasea* (Asteraceae-Cardueae) and a synopsis of the genus. *Bot. J. Linn. Soc.* 2006; 152(4): 435-464.

14. Vorob'eva A.N., Rybin V.G., Zarembo E.V., Boltenkov E.V., Verbitskii G.A.: Systematics and biogeography of *Klasea* (Asteraceae-Cardueae) and a synopsis of the genus. Chem. Nat. Comp. 2004; 40(5): 492-495.
15. Kokoska L., Janovska D.: Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: a review. Phytochemistry 2009; 70(7): 842-855.
16. Mirzaev I.R., Syrov V.N., Khrushev S.A., Iskanderova S.D.: Effect of ecdystene on parameters of the sexual function under experimental and clinical conditions. Eksp. Klin. Farmakol. 2000; 63(4): 35-37.
17. Plotnikov MB., Aliev Ol., Vasil'ev A.S., Maslov MIu., Dmitruk S.E., Krasnov E.A.: Effect of *Rhaponticum carthamoides* extract on hemorheological properties of blood in rats with arterial hypertension. Eksp. Klin. Farmakol. 2001; 64(6): 45-47.
18. Syrov V.N., Nasyrova S.S., Khushbaktova Z.A.: The results of experimental study of phytoecdysteroids as erythropoiesis stimulators in laboratory animals. Eksp. Klin. Farmakol. 1997; 60(3): 41-44.
19. Yatsyuk Y.K., Lyashenko S.S., Batyuk V.S.: The content of arbutin in some species of the genus *Serratula*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii 1968; 4: 54.
20. Zatsny I.L., Gorovits M.B., Abubakirov N.K.: Arbutin in *Serratula sogdiana*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii 1973; 3: 437-438.
21. Borisova A.G.: *Serratula L.* W: Bobrov E.G., Tsherepanov S.K [red.]. Flora SSSR. Izdatielstvo Akademii Nauk SSSR, Mockva-Leningrad 1963; 28: 294-296.
22. Kohlmünzer S.: Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. PZWL, Warszawa 2003; 226-227.
23. Yan C., Wang Y., Hao X.: Water-soluble chemical constituents from fruits of *Phellodendron chinense var. glabriusculum*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2009; 34(22): 2895-2897.
24. Pop C., Vlase L., Tamas M.: Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia (L.) Fritsch* acclimated in Romania. Not. Bot. Agrobot. Cluj 2009; 37(1): 129-132.
25. Wichtl M.: Teedrogen und Phytopharmaka. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH., Stuttgart 1997.
26. Sugimoto K., Nishimura T., Kuriki T.: Development of α - arbutin: production at industrial scale and application for skin lightening cosmetic ingredient. Trends Glycosci. Glycotechnol. 2007; 19(110): 235-246.
27. SCCP (Scientific Committee on Consumer Products). Opinion on β -arbutin, 15 april 2008.

28. Wen A.H., Choi M.K., Kim D.D.: Formulation of liposome for topical delivery of arbutin. Arch.Pharm.Res. 2006; 29(12): 1187-1192.
29. Blumenthal M., Goldberg A., Brinckmann J.: Herbal medicine: expanded Commission E monographs. Thieme, Stuttgart – New York 2000; 389-391.
30. Weiss R.F.: Weiss's Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart – New York 2001; 223-224.
31. Strzelecka H., Kowalski J: Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa. PWN, Warszawa 2000; 326-327.
32. Piękoś - Mirkowa H., Mirek Z.: Flora Polski. Atlas Roślin Chronionych. Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2003.
33. Nawrot J.: Fitoterapia układu moczowego. [w:] Nowak G. (red.): Leki pochodzenia roślinnego. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2012; 251-262.
34. Farmakopea Polska VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002.
35. Moskalenko S.: Preliminary screening of far-eastern ethnomedical plants for antibacterial activity. J. Ethnopharm. 1986; 15(3): 231-259.
36. Ng T.B., Ling J.M., Wang Z.T., Cai J.N., Xu G.J.: Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. Gen. Pharmac. 1996; 27(7): 1237-1240.
37. Quintus J., Kovar K.A., Link P., Hamacher H.: Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts. Planta Med. 2005; 71(2): 147-152.
38. Schindler G., Patzak U., Brinkhaus B., Niciecki A., Wittig J., Krämer N.: Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva-ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. J. Clin. Pharmacol. 2002; 42(8): 920-927.
39. Kubo M., Ito M., Nakata H., Matsuda H.: Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. I. Combined effect of 50% methanolic extract from *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (bearberry leaf) and prednisolone on immuno-inflammation. Yakugaku Zassi 1990; 110(1): 59-67.
40. Matsuda H., Nakata H., Tanaka T., Kubo M.: Pharmacological study on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. II. Combined effects of arbutin and prednisolone or dexamethazone on immuno-inflammation. Yakugaku Zassi 1990; 110(1): 68-76.
41. Matsuda H., Tanaka T., Kubo M.: Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. III. Combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflammation. Yakugaku Zassi 1991; 111(4-5): 253-258.

42. Matsuda H., Nakamura S., Tanaka T., Kubo M.: Pharmacological studies on leaf of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. V. Effect of water extract from *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (bearberry leaf) on the antiallergic and antiinflammatory activities of dexamethasone ointment. *Yakugaku Zasshi* 1992; 112(9): 673-677.
43. Yarnell E.: Botanical medicines for the urinary tract. *World J. Urol.* 2002; 20(5): 285-293.
44. Dog T.L.: The use of botanicals during pregnancy and lactation. *Altern. Ther. Health Med.* 2009, 15(1): 54-58.
45. Ho K.Y., Tsai C.C., Huang J.S., Chen C.P., Lin T.C., Lin C.C.: Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis – idaea* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53(2): 187-191.
46. Sugai T.: Clinical effects of arbutin in patients with chloasma. *Skin Res.* 1992; 34: 522-529.
47. Tomita K., Fukuda M., Kawasaki K.: Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use. *Fragrance* 1990, 6: 72-77.
48. Yang Z.Q., Wang Z.H., Tu J.B., Li P., Hu X.Y.: The mixture of aloesin and arbutin can significantly inhibit the tyrosinase activity and melanogenesis of cultured human melanocytes. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004; 20(5): 369-371.
49. Robb D.A.: Tyrosinase. W: Lontie R. [red.]. *Cooper Proteins and Cooper Enzymes*, vol. II. CRC Press, Florida 1984; 207-240.
50. Kubo I., Kinst-Hori I., Chaudhuri S.K., Kubo Y., Sanchez Y., Ogura T.: Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 2000; 8(7): 1749-1755.
51. Pérez – Gilabert M., Garcia – Carmona F.: Dimethyl sulfide, a volatile flavor constituent, is a slow – binding inhibitor of tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285(2): 257-261.
52. Shin N.H., Ryu S.Y., Choi E.J., Kang S.H., Chang I.M., Min K.R. et al.: Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 243(3): 801-803.
53. Hearing V.J., Tsukamoto K.: Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991; 5: 2902-2909.
54. Kim Y.J., Uyama H.: Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62(15): 1707-1723.

55. Tripanthi R.K., Hearing V.J., Urabe K., Aroca P., Spritz R.A.: Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(33): 23707-23712.
56. Kobayashi T., Vieira W.D., Potterf B., Sakai Ch., Imokawa G., Hearing V.J.: Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell Sci.* 1995; 108: 2301-2309.
57. Lin J.W., Chiang H.M., Lin Y.Ch., Wen K.Ch.: Natural products with skin – whitening effects. *J. Food Drug Anal.* 2008; 16(2): 1-10.
58. Funayama M., Arakawa H., Yamamoto R., Nishino T., Shin T., Murao S.: Effects of alpha- and beta- arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995; 59(1): 143-144.
59. Parvez S., Kang M., Chung H.S., Bae H.: Naturaly occuring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* 2007; 21(9): 805-816.
60. Nihei K., Kubo I.: Identification of oxidation product of arbutin in mushroom tyrosinase assay system. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 2003; 13(14): 2409-2412.
61. Jin Y.H., Lee S.J., Chung M.H., Park J.H., Park Y.I.: Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* 1999; 22(3): 232-236.
62. Yang Z.Q., Wang Z.H., Tu J.B., Li P., Hu X.Y.: The effects of aloesin and arbutin on cultured melanocytes in a synergetic method. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2004; 20(5): 369-371.
63. Hori I., Nihei K., Kubo I.: Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytother. Res.* 2004; 18(6): 475-479.
64. Parvez S., Kang M., Chung H.S., Cho C., Hong M.C., Shin M.K. et al.: Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* 2006; 20(11): 921-934.
65. Akiu S., Suzuki Y., Asahara T., Fujinuma Y., Fukuda M.: Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 1991; 101(6): 609-613.
66. Wang Z.X., Shi X.X., Chen G.R., Ren Z.H., Luo L., Yan J.: A new synthesis of α -arbutin via Lewis acid catalyzed selective glycosylation of tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl trichloacetimidate with hydroquinone. *Carbohydr. Res.* 2006; 341(11): 1945-1947.

67. Sugimoto K., Nishimura T., Nomura K., Kuriki T.: Inhibitory effects of alfa-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(4): 510-514.
68. Nakajima M., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H.: Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity. *Pigment Cell Res.* 1998; 11(1): 12-17.
69. Sugimoto K., Nomura K., Nishimura T., Kiso T., Sugimoto K., Kuriki T.: Syntheses of alpha-arbutin-alpha-glycosides and their inhibitory effects on human tyrosinase. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 99(3): 272-276.
70. Jun S.Y., Park K.M., Choi K.W., Jang M.K., Kang H.Y., Lee S.H. et al.: Inhibitory effects of arbutin- β -glycosides synthesized from enzymatic transglycosylation for melanogenesis. *Biotechnol. Lett.* 2008; 30(4):743-748.
71. Boissy R.E., Visscher M., DeLong M.A.: DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp. Dermatol.* 2005; 14(8): 601-608.
72. Hamed S.H., Sriwiriyanont P., deLong M.A., Visscher M.O., Wickett R.R., Boissy R.E.: Comparative efficacy and safety of deoxyarbutin, a new tyrosinase-inhibiting agent. *J. Cosmet. Sci.* 2006; 57(4): 291-308.
73. Chawla S., Delong M.A., Visscher M.O., Wickett R.R., Manga P., Boissy R.E.: Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. *Br. J. Dermatol.* 2008; 159(6): 1267-1274.
74. Bang S.H., Han S.J., Kim D.H.: Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effects on antioxidant activity. *J. Cosmet. Dermatol.* 2008; 7(3): 189-193.
75. Takebayashi J., Ishii R., Chen J., Matsumoto T., Ishimi Y., Tai A: Reassessment of antioxidant activity of arbutin: Multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic. Res.* 2010; 44(4): 473-478.
76. Czuwara J.: Przebarwienia skóry. Uciążliwy defekt kosmetyczny. *Beauty Forum Polska* 2008; 10: 40-42.
77. Miękoś - Zydek B., Czyż P., Kaszuba A.: Zaburzenia pigmentacji skóry – przebarwienia. [w:] Adamski Z., Kaszuba A. (red.): *Dermatologia dla kosmetologów*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008; 232-238.
78. Kim N., Pandaya A.: Pigmentary diseases. *Med. Clin. North Am.* 1998; 82(1): 1185-1207.
79. Sterry W., Paus R., Burgdorf W. (red.), Placek W. (red. pol. wyd.): *Dermatologia*. Czelej, Lublin 2009; 275-284.

80. Wolska H.: Zaburzenia barwnikowe. [w:] Błaszczyk - Kostanecka M., Wolska H. (red.): Dermatologia w praktyce. PZWL, Warszawa 2009; 118-122.
81. Peréz - Bernal A., Munoz – Peréz M.A., Camacho F.: Management of facial hyperpigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2000; 1(5): 261-268.
82. Rigopoulos D., Gregoriou S., Katsambas A.: Hyperpigmentation and melasma. *J. Cosmet. Dermatol.* 2007; 6(3): 195-202.
83. Taylor Ch.R., Sober A.J.: Sun exposure and skin disease. *Annu. Rev. Med.* 1996; 47: 181-191.
84. Soter N.A.: Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Semin. Dermatol.* 1990; 9(1): 11-15.
85. Matsumura Y., Ananthaswamy H.N.: Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 195(3): 298-308.
86. Young A.R.: Cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: cancer and photoaging. *Semin. Dermatol.* 1990; 9(1): 25-31.
87. Fistarol S.K., Itlin P.H.: Disorders of pigmentation. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2009; 8(3): 187-202.
88. Raszeja – Kotelba B., Wilk M., Zakrzewska K., Adamski Z.: Starzenie się skóry. [w:] Adamski Z., Kaszuba A. (red): Dermatologia dla kosmetologów. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008; 232-238.
89. Errickson C.V., Matus N.R.: Skin disorders of pregnancy. *Am. Fam. Physician* 1994; 49(3): 605-610.
90. Pełka M., Broniarczyk - Dyla G.: Wpływ menopauzy na strukturę i procesy fizjologiczne skóry. *Przegląd Menopauzalny* 2008; 6: 319-322.
91. Granstein R.D., Sober A.J.: Drug- and heavy metal-induced hyperpigmentation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1981; 5(1): 1-18.
92. Dziewulska B.: Zmiany skórne po kontakcie z roślinami. *Służba zdrowia* 2000; 57-60: 2950-2953.
93. Epstein J.H.: Postinflammatory hyperpigmentation. *Clin. Dermatol.* 1989; 7(2): 55-65.
94. Lynde C.B., Kraft J.N., Lynde C.W.: Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett.* 2006; 11(9): 1-6.
95. Cayce K.A., Feldman S.R., McMichael A.J.: Hyperpigmentation: a review of common treatment options. *J. Drugs Dermatol.* 2004; 3(6): 668-673.
96. Jimbow K., Minamitsuji Y.: Topical therapies form melasma and disorders of hyperpigmentation. *Dermatol. Ther.* 2001; 14: 35-45.

97. Jabłońska S., Majewski S.: Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. PZWL, Warszawa 2008; 434-437.
98. Kardynał A., Rudnicka L.: Znamiona melanocytowe nabyte. [w:] Rassner G. (red.), Silny W. (red. pol. wyd.): Dermatologia. Podręcznik i atlas., Urban & Partner, Wrocław 2004; 168-175.
99. Grimem P.E.: Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. Arch. Dermatol. 1995; 131(12): 1453-1457.
100. Miot L.D., Miot H.A., Silva M.G., Marques M.E.: Physiopathology of melasma. An. Bras. Dermatol. 2009; 84(6): 623-635.
101. English D.R., Armstrong B.K., Kricger A., Fleming C.: Sunlight and cancer. Cancer Causes Control. 1997; 8(3): 271-283.
102. Maier T., Korting H.C.: Sunscreens –which and what for? Skin Pharmacol. Physiol. 2005; 18(6): 253-262.
103. Palm M.D., O'Donoghue M.N.: Update on photoprotection. Dermatol. Ther. 2007; 20(5): 360-376.
104. Schroeder P., Calles C., Benesova T., Macaluso F., Krutmann J.: Photoprotection beyond ultraviolet radiation-effective sun protection has to include protection against infrared a radiation-induced skin damage. Skin Pharmacol. Physiol. 2010; 23(1): 15-17.
105. Scherschun L., Lim H.W.: Photoprotection by sunscreens. Am. J. Clin. Dermatol. 2001; 2(3): 131-134.
106. Krutmann J.: Actives. A central component of modern light protection. Hautarzt. 2009; 60(4): 294-300.
107. Molski M.: Chemia piękna. PWN, Warszawa 2009; 210-214.
108. Serpone N., Dondi D., Albini A.: Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. Inorg. Chim. Acta 2007; 360(3): 794-802.
109. Rastogi S.Ch.: UV filters in sunscreen products – a survey. Contact Dermatititis. 2002; 46(6): 348-351.
110. Serpone N., Salinaro A., Emeline A.V., Horikoshi H., Zhao J.: An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. Photochem. Photobiol. Sci. 2002; 1(12): 970-981.
111. Asawanonda P., Taylor Ch.R.: Wood's light in dermatology. Int. J. Dermatol. 1999; 38(11): 801-807.

112. Gupta L.K., Singli M.K.: Wood's lamp. *Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol.* 2004; 70(2): 131-135.
113. Wigger-Alberti W., Elsner P.: Fluorescence with Wood's light. Current applications in dermatologic diagnosis, therapy follow-up and prevention. *Hautarzt.* 1997; 48(8): 523-527.
114. Gilchrest B.A., Fitzpatrick T.B., Anderson R.R., Parrish J.A.: Localization of melanin pigmentation in the skin with Wood's lamp. *Br. J. Dermatol.* 1997; 96(3):245-248.
115. Paraskevas L.R., Halpern A.C., Marghoob A.A.: Utility of the Wood's light: five cases from a pigmented lesion clinic. *Br. J. Dermatol.* 2005; 152(50): 1039-1044.
116. Clarys P., Alewaeters R., Lambrecht R., Barel A.O.: Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin Res. Technol.* 2000; 6(4): 230-238.
117. Park E.S., Na J.I., Kim S.O., Huh C.H., Youn S.W., Park K.C.: Application of pigment measuring device - Mexameter® - for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. *Skin Res. Technol.* 2006; 12(4): 298-302.
118. Yoshimura K., Harii K., Masuda Y., Takahashi M., Aoyama T., Iga T.: Usefulness of a Narrow-Band Reflectance Spectrophotometer in Evaluating Effects of Depigmenting Treatment. *Aesthetic Plast. Surg.* 2001; 25(2): 129-133.
119. Fullerton A., Keiding J.: A comparison between a tristimulus colorimeter (Minolta ChromaMeter CR-200) and two spectrophotometers (Minolta Spectrophotometer CM-508i and CM-2002). Quantification of UV-B induced erythema in a hairless guinea pig model. *Skin Res. Technol.* 1997; 3(4): 237-241.
120. Carli P., De Gorgi V., Soyer H.P., Stante M., Mannone B., Gianotti B.: Dermatoscopy in the diagnosis of pigmented skin lesions: a new semiology for the dermatologist. *JEADV* 2000; 14(5) : 353-369.
121. Stolz W., Schiffner R., Burgdorf W.: Dermatoscopy for facial pigmented skin lesions. *Clin. Dermatol.* 2002; 20(3): 276-278.
122. Fedorowicz T., Adamski Z.: Zaburzenia barwnikowe skóry. [w:] Adamski Z., Kaszuba A. (red.): *Dermatologia dla kosmetologów.* Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008; 96-109.
123. Kardynał A., Rudnicka L.: Znamiona melanocytowe nabyte. [w:] Włodarkiewicz A.: *Dermatochirurgia.* Cornetis, Wrocław 2009; 168-176.
124. Nachbar F., Stolz W., Merkle T., Coggnetta A.B., Voght T.: The ABCD rule of dermatoscopy: High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994; 30(4): 551-559.

125. Zhu W., Gao J.: The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2008; 13(1): 20-24.
126. Briganti S., Camera E., Picardo M.: Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 2003; 16(2): 101-110.
127. Petit L., Piérard G.E.: Skin-lightening products revisited. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2003; 25(4): 169-181.
128. Jones K., Hughes J., Hong M., Jia Q., Orndorff S.: Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 2002; 15(5): 335-340.
129. Choi S., Lee S.K., Kim J.E., Chung M.H., Park Y.I.: Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. *Clin. Exp. Dermatol.* 2002; 27(6): 513-515.
130. Wang Z., Li X., Yang Z., He X., Tu J., Zhang T.: Effect of aloesin on melanogenesis in pigmented skin equivalents. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2008; 30(2): 121-130.
131. Yagi A., Kanbara T., Morinobu N.: Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* 1987; 53(6): 515-517.
132. Bandyopadhyay D.: Topical treatment of melasma. *Indian J. Dermatol.* 2009; 54(4): 303-309.
133. Greatens A., Hakozaiki T., Koshoffer A., Epstein H., Schwemberger S., Babcock G. et al: Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. *Exp. Dermatol.* 2005; 14(7): 498-508.
134. Hakozaiki T., Minwalla L., Zhuang J., Chhoa M., Matsubara A, Miyamoto K. et al: The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br. J. Dermatol.* 2002; 147(1): 20-31.
135. Yokota T., Nishio H., Kubota Y., Mizguchi M.: The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 1998; 11(6): 355-361.
136. Halder R.M., Richards G.M.: Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett.* 2004, 9(6): 1-3.
137. Proteggente A.R., Basu-Modak S., Kuhnle G., Gordon M.J., Youdim K., Tyrrell R. et al: Hesperetin glucuronide, a photoprotective agent arising from flavonoid metabolism in human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 2003; 78(3): 256-261.
138. Nordlund J.J., Grimes P.E., Ortonne J.P.: The safety of hydroquinone. *JEADV* 2006; 20(7): 781-787.

139. Arndt K.A., Fitzpatrick T.B.: Topical use of hydroquinone as a depigmenting agent. *JAMA* 1965; 194(9): 965-967.
140. Palumbo A., d'Ischia M., Misuraca G., Prota G.: Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochem. Biophys. Acta* 1991; 1073(1): 85-90.
141. Hu Z.M., Lei T.C., Ding S.F., Xu S.Z.: Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxydation: biosafety as skin whitening agents. *J. Dermatol. Sci.* 2009; 55(3): 179-184.
142. Jimbow K., Obata H., Pathak M.A., Fitzpatrick T.B.: Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J. Invest. Dermatol.* 1974; 62(4): 436-439.
143. DeCaprio A.P.: The toxicology of hydroquinone – relevance to occupational and environmental exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 1999; 29(3): 283-330.
144. Jordann H.F., van Niekerk D.G.: Transepidermal elimination in exogenous ochronosis: a report of two cases. *Am. J. Dermatopathol.* 1991; 13(4): 418-424.
145. Zawar V.P., Mhaskar S.T.: Exogenous ochronosis following hydroquinone for melasma. *J. Cosmet. Dermatol.* 2004; 3(4): 234-236.
146. Green B.A., Yu R.J., Van Scott E.J.: Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.* 2009; 27(5): 495-501.
147. Tung R.C., Bergfeld W.F., Vidimos A.T., Remzi B.K.: Alpha-hydroxy acid-based cosmetic procedures. Guidelines for patient management. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2000; 1(2): 81-88.
148. Murad H., Shamban A.T., Premo P.S.: The use of glycolic acid as a peeling agent. *Dermatol. Clin.* 1995; 13(2): 285-307.
149. Brody H.J. (red.), Placek W. (red. pol. wyd.): *Peelingi i resurfacing skóry*. Czelej, Lublin 2001; 7-25, 171-178.
150. Usuki A., Ohashi A., Sato H., Ichihashi M., Funasaka Y.: The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 2003; 12(2): 43-50.
151. Guevara I.L., Pandaya A.G.: Safety and efficacy of 4% hydroquinone combined with 10% glycolic acid, antioxidants and sunscreen in the treatment of melasma. *Int. J. Dermatol.* 2003; 42(12): 43-50.
152. Smith W.P.: Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; 35(3): 388-391.
153. Grimes P.E.: The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups. *Dermatol. Surg.* 2001; 25(1): 18-22.

154. Espinal – Perez L.E., Moncada B., Castanedo – Cazares J.P.: A double – blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *Int. J. Dermatol.* 2004; 43(8): 604-607.
155. Nazzaro-Porro M.: Azelaic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1987; 17(6): 1033-1041.
156. Balina L.M., Graupe K.: Treatment of melasma 20% azelaic acid versus 4% hydroquinone cream. *Int. J. Dermatol.* 1991; 30(12): 893-895.
157. Verallo-Rowell V.M., Verallo V., Graupe K., Lopez-Villafuerte L., Garcia-Lopez M: Double-blind comparison of azelaic acid and hydroquinone in the treatment of melasma. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 1989; 143: 58-61.
158. Burdock G.A., Soni M.G., Carabin I.G.: Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2001; 33(1): 80-101.
159. Lim J.: Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol. Surg.* 1999; 25(4): 282-284.
160. Nakagawa M., Kawai K., Kawai K.: Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis.* 1995; 32(1): 9-13.
161. Ando H., Oka M., Mishima Y, Ischihashi M.: Protein kinase C and linoleic acid-induced inhibition of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 1990; 3(4): 2000-2006.
162. Ando H., Funasaka Y., Oka M., Ohashi A., Furumura M., Matsunaga J. et al.: Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J. Lipid Res.* 1999; 40(7): 1312-1316.
163. Ando H., Ryu A., Hashimoto A., Oka M., Ischihashi M: Linoleic acid and α -linoleic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 1998; 290(7): 375-381.
164. Pathak M.A., Fitzpatrick T.B., Icaus E.W.: Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1986; 15(4): 894-899.
165. Griffiths C.E.M., Finkel L.J., Ditre C.M., Hamilton T.A., Ellis C.N., Voorhees J.J: Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma, a vehicle-controlled clinical trial. *Br. J. Dermatol.* 1993; 129(4): 415-421.
166. Kimbrough-Green C.K., Griffiths C.E., Finkel L.J., Hamilton T.A., Bulengo-Ransby S.M., Ellis C.N. et al.: Topical retinoic acid (tretinoin) for melasma in black patients. *Arch. Dermatol.* 1994; 130(6): 727-733.
167. Kasraee B., Handjani F., Asani F.S.: Enhancement of the depigmenting effect of hydroquinone and 4-hydroxyanisole by all-trans-retinoic acid (tretinoin): the impairment of glutathione-dependent cytoprotection. *Dermatol.* 2003; 206(4): 289-291.

168. Chakraborty A., Slominski A., Ermak G., Hwang J, Pawelek J.: Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105(5): 655-659.
169. Ferguson J., Rogers P.M., Kelland L.R., Robins D.J.: Synthesis and antimelanoma activity of sterically congested tertiary amide analogues of N-acetyl-4-S-cysteaminylphenol. *Oncol. Res.* 2005; 15(2): 87-94.
170. Chlebus E.: Peelingi medyczne. [w:] Włodarkiewicz A.: *Deramtochirurgia*. Cornetis, Wrocław 2009; 329-346.
171. Zakopoulou N., Kontochristopoulos G.: Superficial chemical peels. *J. Cosmet. Dermatol.* 2006; 5(3): 246-253.
172. Matarasso S.L., Glogau R.G.: Chemical face peels. *Dermatol. Clin.* 1991; 9(1): 131-150.
173. Monheit G.D., Chastain M.A.: Chemical peels. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 2001; 9(2): 239-255.
174. Landau M.: Chemical peels. *Clin. Dermatol.* 2008; 26(2): 200-208.
175. Kisner A.M.: Microdermabrasion with chemical peel. *Aesthet. Surg. J.* 2001; 21(2): 191-193.
176. Shpall R., Beddingfield F.C., Watson D., Lask G.P.: Microdermabrasion: a review. *Facial Plast. Surg.* 2004; 20(1): 47-50.
177. Tobała J.: Mikrodermabrazja. [w:] Włodarkiewicz A.: *Dermatochirurgia*. Cornetis, Wrocław 2009; 375-380.
178. Freeman M.S.: Microdermabrasion. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* 2001; 9(2): 257-266.
179. Grimes P.E.: Microdermabrasion. *Dermatol. Surg.* 2005; 31(9): 1060-1065.
180. Spencer J.M.: Microdermabrasion. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2005; 6(2): 89-92.
181. Shim E.K., Barnette D., Hughes K., Greenway H.T.: Microdermabrasion: a clinical and histopathologic study. *Dermatol. Surg.* 2001; 27(6): 524-530.
182. Freedman B.M., Rueda – Pedraza E., Waddell S.P.: The epidermal and dermal changes associated with microdermabrasion. *Dermatol. Surg.* 2001; 27(12): 1031-1034.
183. Alkhawam L., Alam M.: Dermabrasion and microdermabrasion. *Facial Plast. Surg.* 2009; 25(5): 301-310.
184. Graham G.F., Barham K.L.: Cryosugery. *Curr. Prob. Dermatol.* 2003; 15(6): 229-250.
185. Hexsel D.M., Mazzuco R., Bohn J., Borges J., Gobbato D.O.: Clinical comparative study between cryotherapy and local dermabrasion for the treatment of solar lentigo on the back of the hands. *Dermatol. Surg.* 2000; 26(5): 457-462.

186. Burge S.M., Bristol M., Millard P.R., Dawber P.R.: Pigment changes in human skin after cryotherapy. *Cryobiology* 1986; 23(5): 422-432.
187. Kuflik E.G., Gage A.A.: Cryosurgery for lentigo maligna. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994; 31(1): 75-78.
188. Moraes A.M., Pavarin L.B., Herreros F., de Aquir Michelman F., Velho P.E., Souza E.M: Cryosurgical treatment of lentigo maligna. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2007; 5(6): 477 –480.
189. Pytrus-Sędłak B., Zub K.: Zastosowanie laserów i intensywnego źródła światła w dermatologii estetycznej i dermatochirurgii. [w:] *Dermatochirurgia*. Cornetis, Wrocław 2009; 381-400.
190. Wheeland R.G., Marmur E.S.: Zmiany barwnikowe i tatuaże. [w:] Goldberg D.J., Rohrer T.E. (red.), Kaszuba A. (red. pol. wyd.): *Lasery i światło*. Tom 1. Seria Dermatologia Kosmetyczna. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2009; 29-52.
191. Lanigan S.W.: *Lasery w dermatologii*. Czelej, Lublin 2005, s. 37-45.
192. Kopera D., Hohenleutner U., Landthaler M.: Q-switched ruby laser application is safe and effective for the management of actinic lentigo (topical glycolic acid is not). *Acta Derm. Venereol.* 1996; 76(6): 461-463.
193. Rashid T., Hussain I., Haider M., Haroon T.S.: Laser therapy of freckles and lentigines with quasi-continuous, frequency-doubled, Nd:YAG (532 nm) laser in Fitzpatrick skin type IV: a 24-month follow-up. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2002; 4(3-4): 81-85.
194. Kawada A., Shiraishi H., Asai M., Kameyama H., Sangen Y., Aragane Y. et al: Clinical improvement of solar lentigines and ephelides with an intense pulsed light source. *Dermatol. Surg.* 2002; 28(6): 504-508.
195. Konishi N., Kawada A., Kawara S., Oiso N., Endo H., Yoshinaga E. et al.: Clinical effectiveness of a novel intense pulsed light source on facial pigmentary lesions. *Arch. Dermatol. Res.* 2008; 300(1): 65-67.
196. Bjerring P., Christiansen K.: Intense pulsed light source for treatment of small melanocytic nevi and solar lentigines. *J. Cosmet. Laser Ther.* 2000; 2(4): 177-181.
197. Gold M.H.: Terapia fotodynamiczna – aspekty kosmetyczne. [w:] Goldberg D.J., Rohrer T.E. (red.), Kaszuba A. (red. pol. wyd.): *Lasery i światło*. Tom 1. Seria Dermatologia Kosmetyczna. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2009; 115-131.
198. Marcus L.: Treatment of hyperpigmentation - melasma with photodynamic therapy. *J. Drugs Dermatol.* 2006; 5(2): 9-11.

199. Hu Z.-M., Zhou Q., Lei T.-Ch., Ding S.-F., Xu S.-Z.: Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: biosafety as skin whitening agents. *J. Dermatol. Sci.* 2009; 55: 179-184.
200. Maeda K., Fukuda M.: In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991; 42: 361-368.
201. Nycz J.E., Małecki G., Morąg M., Nowak G., Ponikiewski Ł., Kusz J. et al.: Arbutin: isolation, X-ray structure and computational studies. *J. Mol. Struct.* 2010; 980(1-3): 13-17.
202. European pharmacopoeia. Suppl. 6.1. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasburg, 2008.
203. Protokół dostępu: <http://www.pharma-cosmetic.com.pl/?strona.doc,pol,glowna,1342,0,236,1,1342,ant.html>; [03.04.2012]
204. Sachdeva S.: Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2009; 75:93-96.
205. Raszeja-Kotelba B., Adamski Z.: Objawy niepożądanego działania kosmetyków. [w:] Adamski Z., Kaszuba A. (red.): *Dermatologia dla kosmetologów*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2008; 219-228.
206. Kacalak-Rzepka A., Bielecka-Grzela S., Różewicka-Czabańska M., Maleszka R., Klimowicz A.: Nadwrażliwość kontaktowa na wybrane składniki kosmetyków oraz inne alergenów wśród kosmetyczek i studentek kosmetologii. *Post. Dermatol. Alergol.* 2010; XXVII, 5: 400-405.
207. Ivens U., Serup J., O'goshi K.: Allergy patch test reading from photographic images: disagreement on ICDRG grading but agreement on simplified tripartite reading. *Skin Res. Tech.* 2007; 13(1): 110-113.

IX. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Pokrój sierpika pięciolistnego.
- Rycina 2. Liście sierpika pięciolistnego.
- Rycina 3. Kwiatostan sierpika pięciolistnego.
- Rycina 4. Struktura chemiczna α , β - glukozydu hydrochinonu.
- Rycina 5. Etapy syntezy melaniny, katalizowane przez tyrozynazę [56].
- Rycina 6. Chromatogram związku A i wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego, wobec wzorca β -arbutyny.
- Rycina 7. Widmo FT-IR związku A.
- Rycina 8. Widmo ^1H NMR związku A.
- Rycina 9. Widmo ^{13}C NMR związku A.
- Rycina 10. Widmo $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR cosy związku A.
- Rycina 11. Wzór strukturalny β - arbutyny.
- Rycina 12. Kryształy związku A.
- Rycina 13. Wykres struktury cząsteczkowej związku A [201].
- Rycina 14. Chromatogram β -arbutyny z liści sierpika pięciolistnego.
- Rycina 15. Chromatogram roztworu wzorcowego arbutyny SST i hydrochinonu.
- Rycina 16. Chromatogram wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego.
- Rycina 17. Podział grupy badanej ze względu na klasy wieku.
- Rycina 18. Podział grupy badanej ze względu na fototyp skóry.
- Rycina 19. Rodzaj zaburzeń pigmentacji występujących w grupie badanej.
- Rycina 20. Powierzchnia przebarwień skóry w grupie badanej.
- Rycina 21. Konsultacje ze specjalistami (grupa badana).
- Rycina 22. Zabiegi wykorzystywane do rozjaśniania zmian pigmentacyjnych skóry (grupa badana).
- Rycina 23. Podział grupy kontrolnej ze względu na klasy wieku.
- Rycina 24. Podział grupy kontrolnej ze względu na fototyp skóry.
- Rycina 25. Rodzaj zaburzeń pigmentacji skóry występujących w grupie kontrolnej.
- Rycina 26. Powierzchnia przebarwień skóry w grupie kontrolnej.
- Rycina 27. Konsultacje ze specjalistami (grupa kontrolna).
- Rycina 28. Zabiegi wykorzystywane do rozjaśnienia zmian pigmentacyjnych skóry (grupa kontrolna).
- Rycina 29. Rozkład liczby pacjentek w odrębnych klasach wieku w grupie badanej i kontrolnej.

- Rycina 30. Rozkład liczby pacjentek z poszczególnymi fototypami skóry w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 31. Rozkład zaburzeń pigmentacji skóry w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 32. Zależność zmiany poziomu melaniny w czasie, w obu grupach terapeutycznych.
- Rycina 33. Zależność zmiany poziomu melaniny u pacjentek z *melasmą* w czasie, w obu grupach terapeutycznych.
- Rycina 34. Zależność zmiany poziomu melaniny u pacjentek z *lentigo solaris* w czasie, w obu grupach terapeutycznych.
- Rycina 35. Zadowolenie z rezultatu stosowania kremu niwelującego przebarwienia, w obu grupach terapeutycznych.
- Rycina 36. Zadowolenie z efektu stosowania kremu niwelującego przebarwienia u pacjentek z *melasmą*.
- Rycina 37. Zadowolenie z efektu stosowania kremu niwelującego przebarwienia u pacjentek z *lentigo solaris*.
- Rycina 38. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego na czole pacjentki 1 (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).
- Rycina 39. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego w obrębie prawego policzka (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).
- Rycina 40. Obraz kliniczny przebarwienia zlokalizowanego w obrębie lewego policzka (lewa strona – początek kuracji, prawa strona – po 8 tygodniach kuracji kremem).

X. SPIS TABEL

- Tabela 1. Właściwości fizyko – chemiczne α - i β -arbutyny.
- Tabela 2. Hamowanie aktywności tyrozynaz przez α - i β -arbutynę.
- Tabela 3. Stężenia α - i β - arbutyny hamujące aktywność tyrozynaz na poziomie 50% (IC₅₀).
- Tabela 4. Porównanie skuteczności hamowania tyrozynazy ludzkiej przez anomery arbutyny i ich glikozylowane pochodne.
- Tabela 5. Spis badań oceniających działanie drażniące β -arbutyny (Shiseido Research Center, Jokohama).
- Tabela 6. Klasyfikacja zaburzeń barwnikowych hiperpigmentacyjnych.
- Tabela 7. Klasyfikacja substancji rozjaśniających.
- Tabela 8. Fazy rozwijające stosowane w chromatografii kolumnowej.
- Tabela 9. Fazy rozwijające stosowane w chromatografii cienkwarstwowej.
- Tabela 10. Chromatografia kolumnowa wyciągu metanolowego z liści sierpika pięciolistnego.
- Tabela 11. Przesunięcia chemiczne δ (ppm) oraz stałe sprzężenia (J) związku A.
- Tabela 12. Przesunięcia chemiczne δ (ppm) związku A.
- Tabela 13. Tabela gradientu fazy ruchomej zastosowanej w HPLC.
- Tabela 14. Lokalizacja przebarwień (grupa badana).
- Tabela 15. Lokalizacja przebarwień (grupa kontrolna).
- Tabela 16. Fototypy skóry, wg skali Fitzpatricka [204].
- Tabela 17. Fototypy skóry sonda Mexametr® MX18.
- Tabela 18. Interpretacja i zapis wyników testu płatkowego, wg ICDRG.
- Tabela 19. Porównanie grupy badanej i kontrolnej względem wieku.
- Tabela 20. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia względem czasu, w obu grupach terapeutycznych.
- Tabela 21. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu u pacjentek z *melasma*.
- Tabela 22. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu u pacjentek z *lentigo solaris*.
- Tabela 23. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu w obu grupach terapeutycznych, w poszczególnych klasach wieku.
- Tabela 24. Zmiana poziomu melaniny w miejscu przebarwienia, względem czasu w obu grupach terapeutycznych, w poszczególnych typach skóry, wg skali Fitzpatricka.
- Tabela 25. Rozdział udzielanych przez pacjentki odpowiedzi w obu grupach terapeutycznych.

Tabela 26. Rozdział udzielanych odpowiedzi przez pacjentki z *melasma*.

Tabela 27. Rozdział udzielanych odpowiedzi przez pacjentki z *lentigo solaris*.

Tabela 28. Poziom melaniny w miejscach przebarwień u pacjentki 1.

Tabela 29. Poziom melaniny w miejscach przebarwień u pacjentki 2.

XI. ZAŁĄCZNIKI

1. Załącznik nr 1

Phytopharm Kleka S.A.
Kleka 1, 63-040 Nowe Miasto nad Wartą
Tel. (061) 2868000
Fax. (061) 2874070

Nazwa artykułu: Wodny ekstrakt z sierpika	
Nr serii:	101191 próba

ŚWIADECTWO ANALIZY NR: 1963/10

		limit	wynik	
A. Wymagania jakościowe (metoda badania)				
1.	Sucha pozostałość (Ph. Eur. 2.8.16)	%(m/m)	-	61,9
2.	Zawartość arbutyny (PRZ/001/12/2010)	%(m/m)	-	9,3
B. Czystość mikrobiologiczna				
1.	Ogólna liczba bakterii	cfu/ml	max. 5 x 10 000	330
2.	Ogólna liczba grzybów	cfu/ml	max. 5 x 100	<10
3.	Drobnoustroje z rodz. Enterobacteriaceae i in. pałeczki Gram-ujemne	cfu/ml	max. 100	<10
4.	Escherichia coli	-	nieobecne w 1ml	nieobecne
5.	Staphylococcus aureus	-	nieobecne w 1ml	nieobecne
6.	Salmonella	-	nieobecne w 10ml	nieobecne
Ogólny wynik analizy:				
Aldona Krawczyk		Data: 15.12.2010		
Kierownik Kontroli Jakości				

Data wydania świadectwa: 15.12.2010

2. Załącznik nr 2



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 43/09

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 590); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2000r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierujące się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 08 stycznia 2009 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

Prof. UM dr hab. Gerard Nowak

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Zakładzie Naturalnych Surowców Leczniczych
i Kosmetycznych UM w Poznaniu**

Główny badacz: **mgr Monika Morąg**

Członkowie zespołu

badawczego: **Prof. UM dr hab. Gerard Nowak
lek. med. Małgorzata Wilk**

Temat

badania: **"Badanie właściwości kosmetycznych arbutyny w przebarwieniach skóry".**

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

3. Załącznik nr 3

Formularz świadomej zgody na udział w badaniu

Imię:.....

Nazwisko:.....

Data urodzenia:.....

PESEL:.....

Adres zamieszkania:.....

Numer telefonu:.....

Ja niżej podpisany/a oświadczam, że:

1. Przeczytałem/am i zrozumiałem/am wszelkie informacje dotyczące celu i zasad badania na temat: ***Ocena właściwości kosmetycznych ekstraktu z liści sierpika pięciolistnego w pielęgnacji skóry z przebarwieniami.***
2. Otrzymałem/am zadowalające odpowiedzi na wszystkie zadane przeze mnie pytania.
3. Wyrażam dobrowolnie zgodę na udział w tym badaniu i jestem świadomy/a możliwości odstąpienia od udziału w badaniu na każdym etapie jego trwania, bez podania przyczyny.
4. Zgadzam się na udział w wyżej wymienionym badaniu i na wykonanie wymaganych w nim procedur.
5. Zostałem/am poinformowany/a o spodziewanych korzyściach i grożących mi ujemnie skutkach oraz prawdopodobieństwie ich powstania.
6. Zostałem/am poinformowany/a, że administratorem danych związanych z badaniem będzie placówka, w której prowadzony jest eksperyment. Przed podpisaniem dokumentu zostałem/am poinformowany/a o sposobie przetwarzania danych pochodzących z badania oraz że dane te, zbierane są wyłącznie w celach analizy naukowej.
7. Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych na potrzeby wyżej wymienionego badania, zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (*Ustawą z dnia 29.08.1997 o Ochronie Danych Osobowych Dz. Ust. nr 133 poz. 83*).
8. Wyrażam zgodę na udział w tym badaniu.
9. Otrzymałem/am kopię niniejszego oświadczenia opatrzoną czytelnym podpisem i datą.

Załącznik nr 3

Ochotnik:

.....

Czytelny podpis ochotnika

.....

Data

Osoba przyjmująca formularz zgody:

Ja niżej podpisany/a oświadczam, że zgodnie z moją najlepszą wiedzą, badanie zostało w pełni i dokładnie omówione z ochotnikiem/czką podpisującym/ą niniejszy formularz zgody oraz, że ochotnik/czka jest świadomy/a istoty badania, zagrożeń oraz korzyści związanych z udziałem w tym badaniu.

.....

Czytelny podpis lekarza

.....

Data

.....

Czytelny podpis badacza

.....

Data

4. Załącznik nr 4



Lekobaza

Sporządzono n/p karty charakterystyki producenta substancji: 02.06.2009
Aktualizowano: okresowy przegląd dokumentacji odbywa się co roku; jeśli Pharma Cosmetic nie poinformuje odbiorcy o wprowadzonych zmianach, należy rozumieć, że informacje zawarte w karcie są aktualne.

Strona 1 z 4

KARTA CHARAKTERYSTYKI PREPARATU

1. Identyfikacja substancji chemicznej i przedsiębiorstwa

1.1 Identyfikacja substancji

Nazwa handlowa: **Lekobaza**

1.2 Zastosowanie substancji

Do receptury aptecznej.

1.3 Identyfikacja przedsiębiorstwa

Wytwórca-konfektor: **Pharma Cosmetic K.M. Adamowicz S.J.**
ul. Pasternik 26
31-354 Kraków
tel.: 0048-12-6383160
faks: 0048-12-6383166

1.4 Telefon alarmowy: 0048-12-4119999 – Klinika Toksykologii w Krakowie (informacja dla lekarzy 24 h)

2. Identyfikacja zagrożeń

Nie jest klasyfikowany jako substancja chemicznie niebezpieczna.

3. Skład i informacja o składnikach

Charakterystyka chemiczna

Krem hydrofilowy o słabym zapachu zmywalny ze skóry.

4. Pierwsza pomoc

Po kontakcie z oczami: spłukać obficie wodą przy otwartych powiekach
Po połknięciu: wypić dużą ilość wody, wywołać wymioty. Wezwać lekarza.

5. Postępowanie w przypadku pożaru

Odpowiednie środki gaśnicze

Zależne od otoczenia.

Zagrożenia specjalne

Przy powstawaniu dymu używać środków ochrony osobistej.

Dodatkowe dane

Substancja niepalna.

6. Postępowanie w przypadku niezamierzonego uwolnienia do środowiska

Usuwać w stanie suchym. Nie dopuścić do przedostania się do kanalizacji.

Pharma Cosmetic - Karta charakterystyki substancji /preparatu niebezpiecznego



Lekobaza

Sporządzono n/p karty charakterystyki producenta substancji: 02.06.2009
Aktualizowano: okresowy przegląd dokumentacji odbywa się co roku; jeśli Pharma Cosmetic nie poinformuje odbiorcy o wprowadzonych zmianach, należy rozumieć, że informacje zawarte w karcie są aktualne.

Strona 2 z 4

7. Postępowanie z substancją i magazynowanie

Postępowanie z substancją

Nie ma żadnych specjalnych wymagań w stosunku do użytkowania, bezpiecznego obchodzenia się z substancją oraz żadnych wskazań co do ochrony pożarowej, zabezpieczenia przed eksplozją.

Wymagania dotyczące pomieszczeń magazynowych i opakowań

Pojemniki przechowywać szczelnie zamknięte w suchym miejscu, w temperaturze pokojowej (od 15 – 25 °C).

8. Kontrola narażenia i środki ochrony indywidualnej

Środki ochrony indywidualnej

Produkt nie zawiera składników wymagających kontrolowania wartości granicznych. Stosować środki ostrożności przewidziane przy obchodzeniu się z chemikaliami.

Dróg oddechowych

Nie jest wymagana.

Rąk

Nie jest wymagana.

Oczu

Zalecane okulary ochronne.

9. Właściwości fizyczne i chemiczne

Postać:	pastą
Kolor:	biało- żółty
Zapach:	bez zapachu
Temperatura topnienia:	nie określona
Temperatura wrzenia:	nie określona
Punkt zapłonu:	nie dotyczy
Gęstość:	nie określona
Rozpuszczalność :	miesza się z wodą

10. Stabilność i reaktywność

Substancja nie rozkłada się przy normalnym użytkowaniu. Substancji, których należy unikać to mocne oksydanty. Niebezpieczne reakcje nie są znane. Niebezpieczne produkty rozkładu to produkty uboczne rozkładu wazeliny.

11. Informacje toksykologiczne

Gwałtowna toksyczność: LD 50 > 5000 mg/kg doustnie
Pierwotne działanie drażniące: brak
Dodatkowe informacje: przy prawidłowym obchodzeniu się i zastosowaniu nie są znane żadne szkodliwe działania dla zdrowia.

12. Informacje ekologiczne

Produkt łatwo i szybko rozkładalny. Mimo to nie należy go usuwać do kanałów ani ścieków. Niebezpieczny dla wód. W przypadku przedostanie się do wód wykazuje zagrożenie dla ryb: LC50 > 100 mg/l
zagrożenie dla bakterii EC50 > 100 mg/l

Pharma Cosmetic - Karta charakterystyki substancji /preparatu niebezpiecznego



Lekobaza

Sporządzono n/p karty charakterystyki producenta substancji: 02.06.2009
Aktualizowano: okresowy przegląd dokumentacji odbywa się co roku; jeśli Pharma Cosmetic nie poinformuje odbiorcy o wprowadzonych zmianach, należy rozumieć, że informacje zawarte w karcie są aktualne.

Strona 3 z 4

13. Postępowanie z odpadami

Nie gromadzić wspólnie z odpadami komunalnymi. Nie wylewać do wód ani kanalizacji. Usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi. Stosować ogólne zasady postępowania z odpadami.

Postępować zgodnie z Ustawą z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach (Dz. U. Nr 62, poz. 628) z późn. zmianami oraz Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów (Dz. U. Nr 112, poz. 1206).

14. Informacje o transporcie

Nie jest to produkt niebezpieczny w rozumieniu przepisów ADR. Nie jest objęty specjalnymi przepisami transportowymi.

15. Informacje dotyczące przepisów prawnych

Klasa zagrożenia dla wody: WGK 1 (kwalifikacje własna): słabe zagrożenie dla wody

Obowiązujące przepisy prawne:

- Dyrektywa UE Nr 1999/45/EG, 67/548/EEC oraz 88/379/EEC.
- Ustawa o substancjach i preparatach chemicznych z dnia 11.01.01r. (Dz.U. Nr 11, poz. 84; Dz.U. Nr 100 poz.1085; Dz.U. Nr 123 poz.1350; Dz.U. Nr 125 poz.1367 ze zmianą z dnia 5 lipca 2002r. (Dz.U. 142, poz.1187), Dz.U. Nr 135, poz. 1145 z 2002 r., Dz.U. Nr 189, poz. 1852 z 2003 r., Dz.U. Nr 11, poz. 94 z 2004 r., Dz.U. Nr 96, poz.959 z 2004 r., Dz.U. Nr 121, poz. 1263 z 2004 r.)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2007r. w sprawie karty charakterystyki substancji niebezpiecznej i preparatu niebezpiecznego (Dz.U. Nr 215 poz.1588 z dnia 16 listopada 2007 r.)
- Rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobu klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych (Dz.U. Nr 171, poz. 1666 z dnia 2 października 2003 r., Dz.U. Nr 243, poz. 2440 z dnia 15 listopada 2004 r.)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie oznakowania opakowań substancji niebezpiecznych i preparatów niebezpiecznych (Dz.U. Nr 173, poz. 1679 z dnia 6 października 2003 r., Dz.U. Nr 260, poz. 2595 z dnia 8 grudnia 2004 r.)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 28 września 2005 r. w sprawie wykazu substancji niebezpiecznych wraz z ich klasyfikacją i oznakowaniem (Dz.U. Nr 201, poz. 1674 z dnia 14 października 2005 r.)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 8 lipca 2004 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego (Dz.U. Nr 168, poz. 1763 z 2004 r.)
- Rozporządzenie Ministra Infrastruktury z dnia 20 lipca 2002 r. w sprawie realizacji obowiązków dostawców ścieków przemysłowych oraz warunków wprowadzania ścieków do urządzeń kanalizacyjnych (Dz.U. Nr 129, poz. 1108 z 2002 r.)
- Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach (Dz.U. Nr 62, poz.628 z 2001 r., Dz.U. Nr 41, poz.365 z 2002 r., Dz.U. Nr 113, poz. 984 z 2002 r., Dz.U.Nr 199, poz. 1671 z 2002 r., Dz.U. Nr 7, poz.78 z 2003 r., Dz.U. Nr 96, poz. 959 z 2004 r., Dz.U. Nr 116, poz.1208 z 2004 r., Dz.U. Nr 191, poz.1956 z 2004 r., Dz.U. Nr 90, poz.758 z 2005 r., Dz.U. Nr 130, poz. 1087 z 2005 r., Dz.U. Nr 175, poz.1458 z 2005 r.)
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów (Dz.U Nr 112, poz. 1206)



Lekobaza

Sporządzono n/p karty charakterystyki producenta substancji: 02.06.2009

Aktualizowano: okresowy przegląd dokumentacji odbywa się co roku: jeśli Pharma Cosmetic nie poinformuje odbiorcy o wprowadzonych zmianach, należy rozumieć, że informacje zawarte w karcie są aktualne.

Strona 4 z 4

- Ustawa z dnia 28 października 2002 r. o przewozie drogowym towarów niebezpiecznych (Dz.U. Nr 199, poz.1671 z dnia 28 listopada 2002 r., Dz.U. Nr 96, poz.959 z 2004 r., Dz.U. Nr 97, poz. 962 z 2004 r., Dz.U. Nr 173, poz.1808 z 2004 r., Dz.U. Nr 90 poz.757 z 2005 r., Dz.U. Nr 141, poz. 1184 z 2005 r)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 14 sierpnia 2002 r. w sprawie obowiązku dostarczenia karty charakterystyki niektórych preparatów nie zaklasyfikowanych jako niebezpieczne (Dz. U. 142, poz. 1194)
- Norma PN-ISO 11014-1:1998 „Bezpieczeństwo chemiczne – Karta charakterystyki bezpieczeństwa produktów chemicznych”
- Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Socjalnej z dnia 29 listopada 2002 r. (Dz.U. Nr 217 poz.1833) i zmiana z dnia 10 października 2005 r. (Dz.U. Nr 212, poz. 1769) w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 21 sierpnia 1997 r. (Dz. U. Nr 105, poz. 671) i zmiana z dnia 18 lutego 1999 r. (Dz. U. Nr 26, poz. 241)w sprawie substancji chemicznych stwarzających zagrożenie dla zdrowia i życia
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 01 grudnia 2004 r. (Dz. U.nr 280, poz. 2771) i zmiana z dnia 10 sierpnia 2005 r (Dz. U. Nr 160, poz. 1356) w sprawie substancji, preparatów, czynników lub procesów technologicznych o działaniu rakotwórczym lub mutagennym w środowisku pracy
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 czerwca 2002 r. (Dz.U.87 poz.796) w sprawie dopuszczalnych poziomów niektórych substancji w powietrzu, alarmowych poziomów niektórych substancji w powietrzu oraz marginesów tolerancji dla dopuszczalnych poziomów niektórych substancji
- Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 21 października 1998r. (Dz.U.145 poz.942) i zmiana 5 marca 2001 (Dz.U.22 poz.251) w sprawie szczegółowych zasad, usuwania wykorzystywania i unieszkodliwiania odpadów niebezpiecznych
- Klasyfikacja materiałów niebezpiecznych według Umowy Europejskiej dotyczącej Międzynarodowego Przewozu Materiałów Niebezpiecznych ADR z dn. 30. września 1957 r. (Załącznik do Dz. U. 194. poz. 1629 z dnia 14 listopada 2002 r.)

16. Inne informacje

Powyższe dane opierają się na dzisiejszym stanie wiedzy naszej (konfekcjonera substancji) oraz producenta substancji, jednak nie mogą być one przyjmowane jako gwarancja właściwości produktów i nie stanowią podstawy jakichkolwiek umownych stosunków prawnych.

5. Załącznik nr 5

ANKIETA I

KOD PACJENTA

1. PŁEĆ

- kobieta
- mężczyzna

2. WIEK

- 18-25
- 26-35
- 36-45
- 46-55
- 56-65

3. TYP SKÓRY WEDŁUG KLASYFIKACJI FITZPATRICKA

- I (blada, biała skóra, łatwo ulegająca poparzeniom, nigdy nie opalająca się)
- II (biała skóra, łatwo ulegająca poparzeniom, minimalnie i trudno opalająca się)
- III (ciemniejsza biała skóra, umiarkowanie opalająca się, po początkowym poparzeniu)
- IV (jasna, brązowa skóra, ulegająca minimalnym poparzeniom, łatwo opalająca się)
- V (brązowa skóra, rzadko ulegająca poparzeniom, łatwo i mocno opalająca się)
- VI (ciemnobrązowa/czarna skóra, nie ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się).

Załącznik nr 5

4. OKOLICA CIAŁA DOTKNIĘTA PRZEBARWIENIEM

- twarz
 - czoło
 - nos
 - policzek lewy
 - policzek prawy
 - górna warga
 - broda
- szyja
 -
- dekolt
 -
- plecy
 -
- kończyna górna
 -
- kończyna dolna
 -
- inna, jaka
-

5. POWIERZCHNIA PRZEBARWIENIA SKÓRY

- średnica poniżej 1 cm² (< 1 cm)
- średnica 1 – 2 cm²
- średnica powyżej 2 cm² (> 2 cm)

Załącznik nr 5

6. POCHODZENIE PRZEBARWIENIA SKÓRY

- wrodzone
- nabyte
 - promieniowanie UV
 - lecznicze
 - kosmetyczne
 - zmiany hormonalne (ciąża, menopauza, preparaty antykoncepcyjne)
 - inne zaburzenia endokrynologiczne
 - leki
 - zmiany zapalne skóry
 - urazy mechaniczne
 - inne, jakie
- nie pamiętam

7. CZAS TRWANIA ZMIAN:

- od urodzenia
- od miesiąca
- od 2 miesięcy
- od 6 miesięcy
- od roku
- odlat
- odroku życia

Załącznik nr 5

8. CZY W RODZINIE WYSTĘPOWAŁY PRZYPADKI ZACHOROWAŃ NA CZERNIAKA
LUB INNE NOWOTWORY SKÓRY?

- tak
- nie

9. ILOŚĆ ZNAMION BARWNIKOWYCH NA CIELE

- poniżej 50 (<50)
- powyżej 50 (>50)

10. CZY ULEGL PAN/PANI POPARZENIU SŁONECZNEMU?

- tak
- nie

11. CZY STOSUJE PAN/PANI OCHRONĘ PRZECIWSŁONECZNAŁ?

- tak
- nie

12. JAK CZĘSTO PAN/PANI JĄ STOSUJE?

- codziennie
- wyłącznie podczas opalania
- rzadko
- w ogóle

Załącznik nr 5

13. W JAKI SPOSÓB PAN/PANI RADZI SOBIE Z PROBLEMEM PRZEBARWIEŃ SKÓRY?

- nic z tym nie robię
- konsultacje z kosmetologiem
- konsultacje z dermatologiem
- konsultacje z onkologiem
- inne, jakie.....

14. CZY KORZYSTA PAN/PANI Z ZABIEGÓW ROZJAŚNIAJĄCYCH PRZEBARWIENIA SKÓRY?

- tak
- nie

15. JAKIE ZABIEGI WYKONYWANE BYŁY W TYM CELU?

- peeling chemiczny
- peeling kawitacyjny
- mikrodermabrazja
- krioterapia
- laseroterapia
- terapia fotodynamiczna
- inne, jakie.....

16. CZY STOSUJE PAN/PANI KOSMETYKI LUB LEKI NIWELUJĄCE PRZEBARWIENIA SKÓRY?

- tak
- nie

Załącznik nr 5

17. JAK CZĘSTO PAN/PANI JE STOSUJE?

- 2 razy dziennie
- raz dziennie
- kilka razy w tygodniu
- raz w tygodniu
- rzadziej

18. CZY TERAPIA PRZYNOSI POŻĄDANY EFEKT?

- tak
- nie

19. PO JAKIM CZASIE BYŁY ZAUWAŻALNE EFEKTY TERAPII?

- po 2 tygodniach stosowania
- po miesiącu stosowania
- po kilku miesiącach stosowania, ilu ?
- nie było zauważalnych efektów

Dziękuję za udział w ankiecie

6. Załącznik nr 6

ANKIETA II

KOD PACJENTA

1. CZY W TRAKCIE BADANIA STOSOWAŁ/A PAN/PANI ZALECANĄ OCHRONĘ PRZECIWSŁONECZNAŁ (SPF 50+)?

- tak
- nie
- jeżeli inną, to jaką.....

2. CZY W TRAKCIE BADANIA EKSPONOWAŁ/A PAN/I OKOLICĘ CIAŁA DOTKNIĘTĄ PRZEBARWIENIEM NA PROMIENIOWANIE SŁONECZNE?

- tak
- nie

3. CZY ULEGŁ/A PAN/PANI POPARZENIU SŁONECZNEMU W TRAKCIE TRWANIA BADANIA?

- tak
- nie

4. W JAKIEJ STREFIE KLIMATYCZNEJ PAN/I PRZEBYWAŁA?

- strefa umiarkowana chłodna
- strefa umiarkowana ciepła
- strefa podzwrotnikowa
- strefa zwrotnikowa

Załącznik nr 6

5. CZY KORZYSTAŁ/A PAN/PANI Z INNYCH ZABIEGÓW ROZJAŚNIAJĄCYCH PRZEBARWIENIA SKÓRY W TRAKCIE BADANIA?

- tak
- nie

6. JAKIE ZABIEGI BYŁY WYKONYWANE?

- peeling chemiczny
- peeling kawitacyjny
- mikrodermabrazja
- krioterapia
- laseroterapia
- terapia fotodynamiczna
- inne, jakie.....

7. CZY STOSOWAŁ/A PAN/PANI INNE KOSMETYKI LUB LEKI NIWELUJĄCE PRZEBARWIENIA SKÓRY W TRAKCIE BADANIA?

- tak, jakie.....
- nie

8. CZY UDZIAŁ W BADANIU PRZYNIÓSŁ OCZEKIWANE REZULTATY?

- tak
- nie

Załącznik nr 6

9. EFEKT ROZJAŚNIENIA MIEJSC DOTKNIĘTYCH PRZEBARWIENIEM PO APLIKACJI KREMU NIWELUJĄCEGO PRZEBARWIENIA SKÓRY (SKALA NUMERYCZNA):

- 0 - pogorszenie
- 1 – brak poprawy
- 2 – minimalna poprawa
- 3 – zdecydowana poprawa

10. PO JAKIM CZASIE ZAUWAŻALNE BYŁY EFEKTY APLIKACJI KREMU?

- po 2 tygodniach stosowania
- po 4 tygodniach stosowania
- po 6 tygodniach stosowania
- po 8 tygodniach stosowania

11. CZY PODCZAS APLIKACJI DERMOKOSMETYKU POJAWIŁY SIĘ PODRAŻNIENIA SKÓRY TYPU:

- rumień
 - tak
 - nie
- obrzęk
 - tak
 - nie
- wysypka
 - tak
 - nie?

Dziękuję za udział w ankiecie