

Lipout™

CareActives

Body Sculpture

PRZESZTAŁĆ SWOJĄ SYLWETKĘ

Do czynników powszechnie sprzyjających nadmiernej akumulacji tłuszczu w organizmie zaliczamy m.in. siedzący tryb życia, niebilansowaną dietę i stres. Nadmierna ilość tłuszczu jest powodem do troski dla większości populacji, zarówno kobiet i mężczyzn, w różnym wieku. Zmartwienie zwiększa się zwłaszcza wtedy, gdy musimy założyć strój kąpielowy i zdajemy sobie sprawę, że ten nieatrakcyjny tłuszcz nie zniknie natychmiast.

Tkance tłuszczowej tradycyjnie przypisuje się zdolność do wchłaniania wolnych kwasów tłuszczowych i trójglicerydów, które krążą we krwi po nadmiernym spożyciu kalorii. Przez długi czas uznawano, że są one magazynowane jako pasywny zapas energii. Dziś wiadomo jednak, że oprócz tego tkanka tłuszczowa odgrywa również aktywną rolę w regulacji metabolizmu, homeostazy i nadawaniu kształtu różnym częściom ciała.

Podskórna tkanka tłuszczowa jest również źródłem cellulitu, z którym boryka się ponad 85% kobiet w wieku powyżej 20 lat (Kruglikov, 2012) i który musi być kontrolowany jeśli chcemy zachować atrakcyjną figurę.

Pomysł pozbycia się nadmiaru tłuszczu w celu zachowania zdrowego i zrównoważonego ciała nie jest niczym nowym. W istocie, z roku na rok obserwujemy rosnące zapotrzebowanie na produkty i metody redukujące niechcianą tkankę tłuszczową.

Lipout™ to składnik kosmetyczny aktywujący proces spalania tłuszczu w podskórnej tkance tłuszczowej, redukujący jej nadmiar i remodelujący sylwetkę.

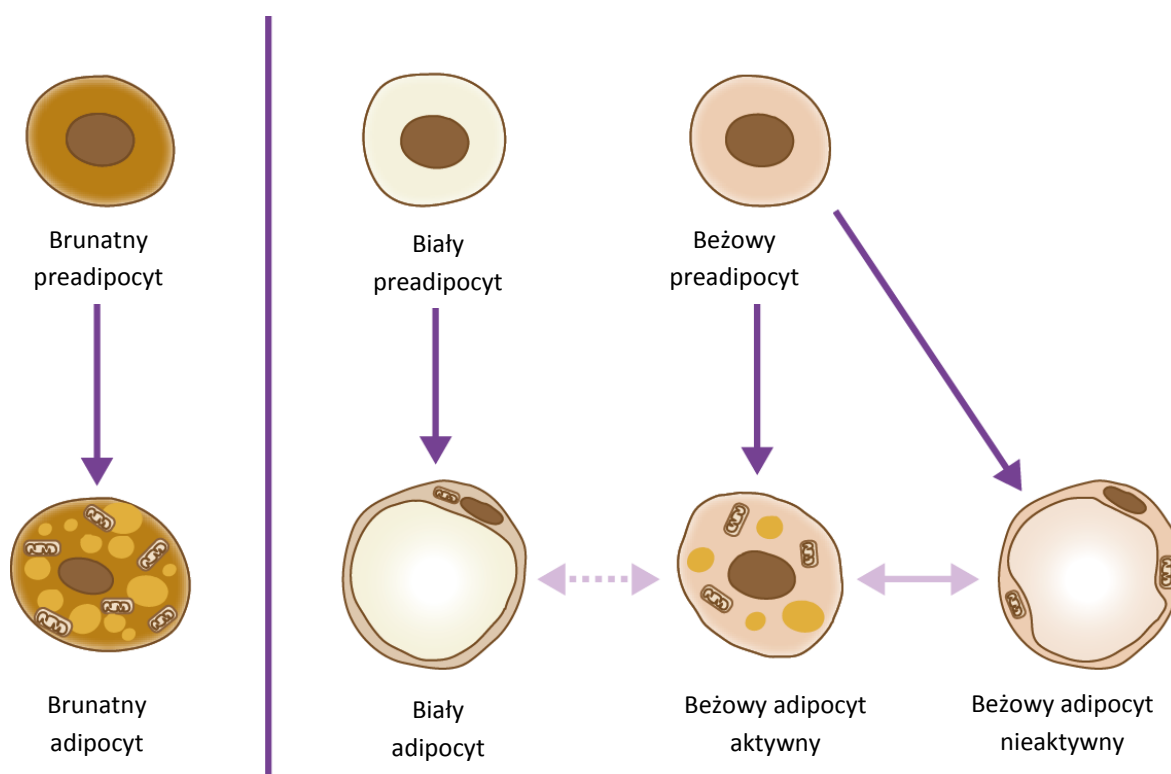


TKANKA TŁUSZCZOWA I ADIPOCYTY

Podskórna tkanka tłuszczowa jest w większości zbudowana z adipocytów, które magazynują tłuszcz w swoich cytoplazmach.

Do niedawna sądzono, że istnieją tylko dwa rodzaje adipocytów – białe i brunatne. Ostatnie badania potwierdzają jednak, że w organizmie znajduje się również trzeci typ tych komórek: **adipocyty beżowe**.

Te trzy typy adipocytów wywodzą się z różnych prekursorów (rysunek 1). Brunatne mają wspólne prekursory z komórkami mięśni szkieletowych, podczas gdy białe i beżowe pochodzą z tej samej linii, ale dzielącej się na dwie i dającej dwie różne populacje prekursorów (Rosen & Spiegelman, 2014). Oznacza to, że każdy prekursor daje wzrost konkretnej linii komórek, która nie może różnicować do innego rodzaju adipocytu (przykładowo, biały preadipocyt nie może różnicować do brunatnego adipocytu).

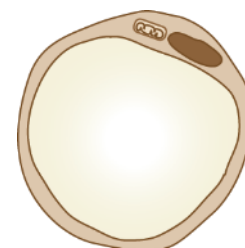


Rysunek 1. Różnicowanie trzech typów adipocytów: brunatnych, białych i beżowych.

1. BIAŁE ADIPOCYTY

Białe adipocyty są najlepiej znanym rodzajem komórek tłuszczowych; tworzą one białą tkankę tłuszczową (WAT - *white adipose tissue*) i są główną rezerwą tłuszczu w organizmie. Zlokalizowane są wokół narządów wewnętrznych i pod skórą.

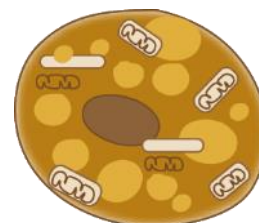
Białe adipocyty to duże komórki o niewielu mitochondriach, magazynujące lipidy pod postacią trójglicerydów w formie pojedynczej kropli (jednokomorowe).



Rysunek 2. Biały adipocyt.

2. BRUNATNE ADIPOCYTY

Brunatną tkankę tłuszczową tworzą adipocyty brunatne. Są to wielokomorowe komórki magazynujące trójglicerydy w niewielkich kroplach, rozmieszczonych równomiernie w cytoplazmie; mają one liczne mitochondria, które nadają komórkom brązowy kolor.



Rysunek 3. Brunatny adipocyt.

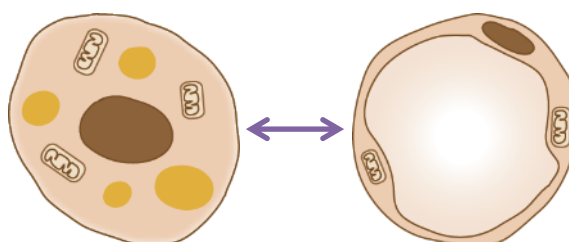
Brunatne adipocyty specjalizują się w spalaniu tłuszczu i produkcji ciepła (termogeneza).

Wyróżnia je wysoka ekspresja genów termogenicznych, z których najbardziej charakterystycznym są geny białka rozprzegającego 1 (UCP1 - *uncoupling protein 1*) i receptora β 3-adrenergicznego (ADRB3). Adipocyty brązowe są silnie aktywne metabolicznie i spalają tłuszcz, który stanowi paliwo w procesie termogenezy, choć mogą one również używać w tym celu glukozę (Wu *et al.*, 2013).

Adipocyty brunatne występują wyłącznie u dzieci w określonych częściach ciała, takich jak szyja czy obojczyk (Cannon *et al.*, 2012). Do dzisiaj nigdy nie odkryto ich w podskórnej tkance tłuszczowej osób dorosłych (Cypess, *et al.*, 2009; Van Marken *et al.*, 2009).

3. BEŻOWE ADIPOCYTY

W niedawnych badaniach zidentyfikowano trzeci rodzaj ludzkich adipocytów: beżowe. Są to komórki dwufunkcyjne, co oznacza, że mogą przybierać one formę aktywną i nieaktywną. Ekspresja genów adipocytów beżowych jest odmienna od adipocytów białych i brunatnych.

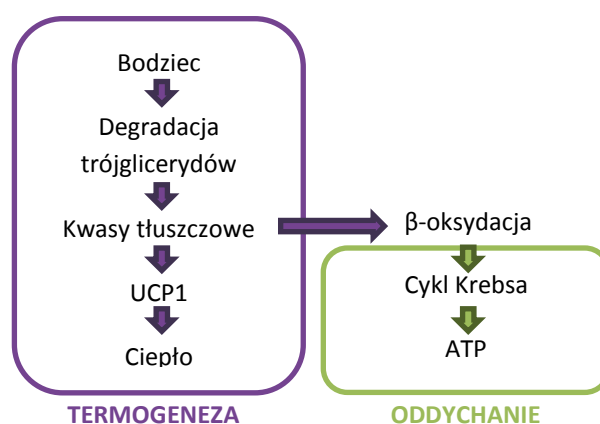


Rysunek 4. Aktywne (po lewej) i nieaktywne (po prawej) adipocyty beżowe.

W formie nieaktywnej, morfologia adipocytów beżowych przypomina białe adipocyty (jedna kropla tłuszczu, mało mitochondriów), cechuje je niski poziom bazowy genu UCP1 i normalne oddychanie komórkowe. Jednakże na skutek działania odpowiedniego bodźca **przechodzą one proces „brunatnienia” (zwiększony poziom mitochondriów, liczne pęcherzyki tłuszczu)**. Oznacza to, że stają się one metabolicznie aktywne, ekspresja UCP1 dramatycznie rośnie i **rozpoczyna się proces termogenezy, przyspieszający spalanie kwasów tłuszczowych** w celu utrzymania zwiększonego oddychania komórkowego (rysunek 5). Po zaniknięciu bodźca, adipocyty beżowe ponownie przyjmują morfologię oraz ekspresję genów podobną do adipocytów białych i stają się nieaktywne. Proces przekształcenia z formy nieaktywnej do aktywnej może być powtarzany za pomocą odpowiedniej stymulacji (Rosenwald *et al.*, 2013).

Odkryto liczne, endogenne czynniki pobudzające proces brunatnienia, mające własne receptory na błonie komórkowej adipocytu (Harms & Seale, 2013). Przykładowo, receptor β 3-adrenergiczny, wśród wielu bodźców, ulega aktywacji w odpowiedzi na zimno i jest ważnym regulatorem procesu termogenezy w adipocytach brązowych i beżowych.

Niedawne badania potwierdziły, że adipocyty beżowe wywodzą się z beżowych preadipocytów (Wang *et al.*, 2013). Inne badania sugerują jednak, że mogą one również powstawać z dojrzałych adipocytów białych (Vitali *et al.*, 2012).



Rysunek 5. Zarys termogenezy i oddychania w brązowych i beżowych adipocytach.

Wg. najnowszych badań, beżowe adipocyty zastępują u dorosłych adipocyty brunatne (Wu *et al.*, 2012). Stwierdzono też, że w określonych warunkach mogą one występować również w podskórnych depozytach adipocytów białych (Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Rosen & Spiegelman, 2014). W badaniach na ludziach wykazano, że aktywność wspomnianych depozytów adipocytów beżowych może być zwiększana po aplikacji różnych czynników zewnętrznych, takich jak zimno lub spożycie określonego pożywienia. Zaobserwowano, że ilość i aktywność beżowej tkanki tłuszczowej spada wraz ze wzrostem wskaźnika masy ciała (BMI) oraz starzeniem, prowadząc do akumulacji tłuszczu w organizmie. Dlatego też **aktywność beżowej tkanki tłuszczowej jest niezwykle istotna, ponieważ przyczynia się ona do redukcji tłuszczu** (Yoneshiro *et al.*, 2013).



TERMOGENEZA: PROCES SPALANIA TŁUSZCZU

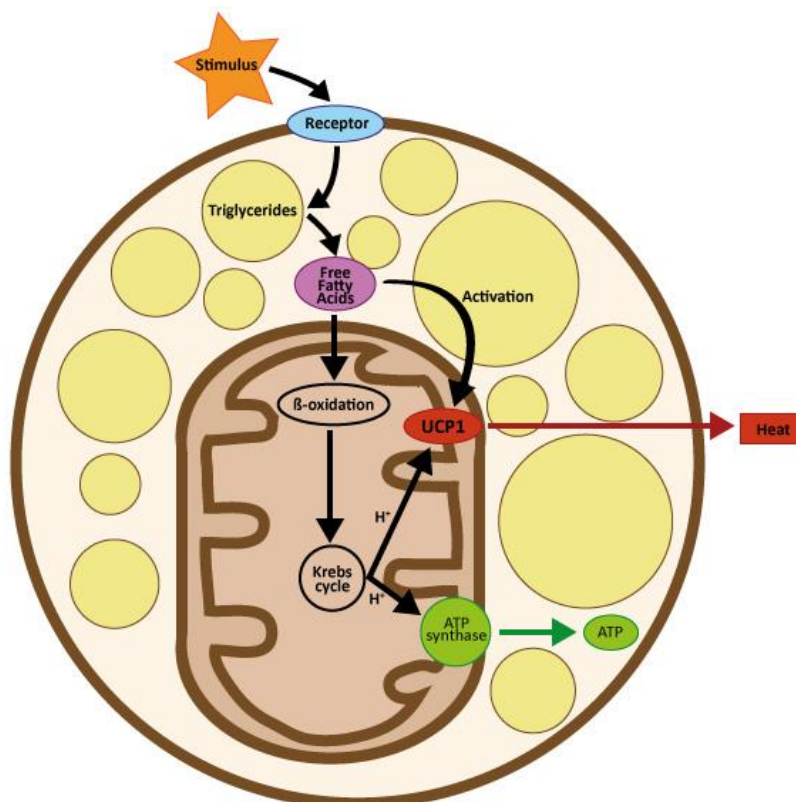
Termogeneza jest procesem, podczas którego organizm wytwarza energię ciepłą. Proces ten zachodzi równolegle z oddychaniem komórkowym i jest inicjowany w brunatnych lub beżowych adipocytach poprzez **stymulację receptorów powierzchniowych**.

Degradacja trójglicerydów jest aktywowana i uwalniane są wewnątrzkomórkowe kwasy tłuszczowe. Przeważająca większość tych kwasów wnika do mitochondriów i zasila oddychanie komórkowe (β -oksydacja, cykl Krebsa).

Niewielka porcja kwasów tłuszczowych aktywuje **UCP1**, białko występujące w wewnętrznej błonie mitochondriów beżowych i brunatnych adipocytów. Jest to nie tylko marker genetyczny tych komórek, ale przede wszystkim **element niezbędny do zajścia termogenezy**. Katalizuje on przepływ protonów przez błonę równoległą do łańcucha oddechowego, rozpraszając w ten sposób gradient elektrochemiczny generowany przez łańcuch oddechowy.

Kwasy tłuszczowe są niezbędne do aktywacji i funkcjonowania UCP1, jednak UCP1 nie utlenia ich. W istocie są one utleniane w cyklu β -oksydacji, aby zasilić oddychanie komórkowe. W komórkach, w których brakuje UCP1, gradient protonów może być rozproszony jedynie przez tworzenie ATP; protony przechodzą przez kilka kompleksów w łańcuchu oddechowym, docierając do syntazy ATP i dostarczając energii niezbędnej do produkcji ATP. Jednakże przy wysokim poziomie ATP w komórce, transport protonów przez syntazę ATP maleje i oksydacja kwasów tłuszczowych ulega zatrzymaniu. **Obecność aktywowanego UCP1** umożliwia przyspieszenie oddychania komórkowego nawet przy dużej zawartości ATP w komórce, generując **ATP** (oddychanie) i **ciepło** (termogeneza) (Wu *et al.*, 2013).

Wobec tego, samo **zwiększenie ekspresji UCP1** nie jest wystarczające do spalania tłuszczu. **Do aktywacji termogenezy niezbędna jest aktywacja tego białka**, wraz z późniejszą **stymulacją mitochondrialnego utleniania kwasów tłuszczowych** (Ouellet *et al.*, 2012). W efekcie **wzrośnie oddychanie komórkowe**, co z kolei będzie skutkowało **większym zużyciem lipidów, czyli wywołaniem efektu spalania tłuszczu**.



Rysunek 6. Proces komórkowej termogenezy i oddychania w beżowych i brunatnych adipocytach.

***Lipout™* to składnik aktywny pochodzenia morskiego, który pobudza proces brunatnienia i aktywuje termogenezę w adipocytach, dając efekt wyszczuplający i przeciwcellulitowy**

MECHANIZM DZIAŁANIA *Lipout™*

Lipout™ to alternatywa dla inwazyjnych kuracji redukujących nadmiar zgromadzonego tłuszczu, ponieważ ma on zdolność do transformowania tkanki tłuszczowej magazynującej do tkanki aktywnie spalającej tłuszcz.

Lipout™ to ekstrakt z *Tisochrysis lutea* (dawniej *Isochrysis galbana*), jednokomórkowej algi, ze standaryzowaną zawartością ksantofili i bogaty w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, które **indukują powstawanie aktywnych beżowych adipocytów**. *Lipout™* równocześnie aktywuje następujące mechanizmy:

1. **Pobudzenie ekspresji UCP1** w białych i nieaktywnych beżowych adipocytach w celu wywołania ich brunatnienia, czyli konwersji w aktywne beżowe adipocyty.
2. **Zwiększenie β -oksydacji kwasów tłuszczowych** dzięki aktywacji termogenezy, czyli dosłowne spalanie tłuszczu zgromadzonego w beżowych i białych adipocytach.

Aktywacja obu mechanizmów pozwala na skuteczne spalanie tłuszczu w procesie termogenezy, dzięki brunatnieniu podskórnej tkanki tłuszczowej.

Lipout™ aktywuje proces brunatnienia i termogenezy w adipocytach, spalając tłuszcz i poprawiając kształt sylwetki

SKŁAD

Tisochrysis lutea to jednokomórkowa mikroalga należąca do grupy *Haptophyta*. Zawiera ona ok. 37% protein i dużą ilość kwasów tłuszczowych (do 47% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych) (Sánchez *et al.*, 2000; Gouveia *et al.*, 2008).

Tisochrysis lutea zawiera też następujące pigmenty (Zapata & Garrido 1997; Obata & Taguchi 2012):

- Chlorofil *a* i *c*.
- Ksantofile takie jak fukoksantyna, diatoksantyna i diadinoksantyna.



Rysunek 7. Zdjęcie algi *Tisochrysis lutea* (powiększenie 100x) używanej do produkcji Lipout™.

Lipout™ otrzymywany jest drogą biotechnologiczną z *Tisochrysis lutea* i dzięki temu stanowi odnawialne źródło składnika aktywnego. Hodowla mikroalgi w zamkniętych fotobioreaktorach pozwala nam uzyskać wysokiej jakości produkt ze zoptymalizowaną zawartością metabolitów i pigmentów, w powtarzalnych i kontrolowanych warunkach, a także wyeliminować zanieczyszczenia oraz znacząco zredukować wpływ na środowisko.



SKUTECZNOŚĆ *IN VITRO*

PROTOKÓŁ BADANIA *IN VITRO*

Ponieważ nadal nie ma zgodności co do faktu, czy beżowe adipocyty mogą powstawać wyłącznie z beżowych preadipocytów, czy również przemieniać się z adipocytów białych, badanie *in vitro* symulowało oba możliwe scenariusze:

- Aby ocenić potencjał **Lipout™** do pobudzania różnicowania beżowych preadipocytów do dojrzałych i aktywnych beżowych adipocytów, wykorzystaliśmy kultury **preadipocytów z ludzkiej podskórnej tkanki tłuszczowej**. Preadipocyty były inkubowane z **Lipout™** przez pierwsze 7 dni ich rozwoju, po których następował okres 7 dni inkubacji w standardowym medium różnicowania, aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości.
- Oceniliśmy również zdolność **Lipout™** do przekształcania nieaktywnych beżowych adipocytów w formę aktywną i przemieniania dojrzałych białych adipocytów w aktywne beżowe adipocyty. W tym celu kulturę **dojrzałych adipocytów przedstawiających biały fenotyp** poddaliśmy działaniu **Lipout™** przez okres 2 tygodni. Komórki zostały pozyskane z podskórnej tkanki tłuszczowej ochotników.

Aby udowodnić, że **Lipout™** aktywuje adipocyty beżowe i termogenezę, badanie *in vitro* składało się z czterech etapów, w których mierzyliśmy:

1. Ekspresję genów kluczowych dla termogenezy.
2. Ekspresję termogenicznych protein, w celu potwierdzenia pierwszego etapu.
3. Biogenezę nowych mitochondriów.
4. β -oksydację, w celu potwierdzenia funkcjonalności indukowanych zmian.

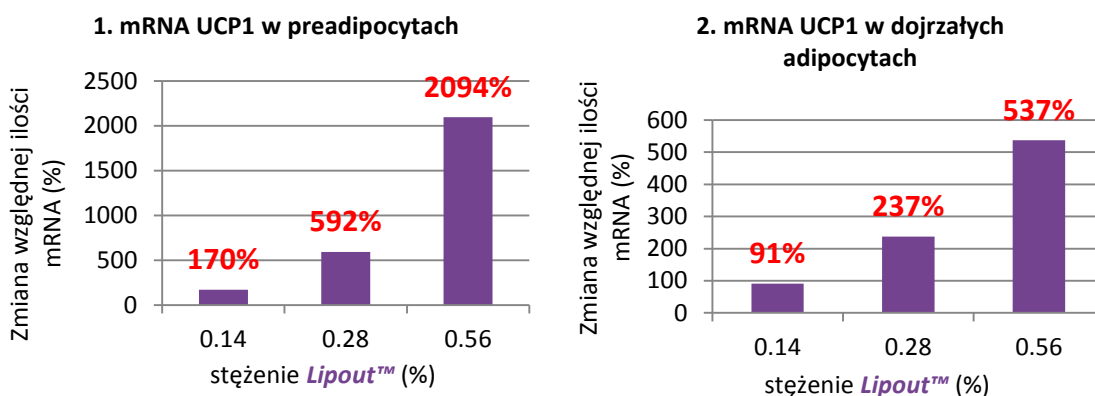
1. EKSPRESJA KLUCZOWYCH GENÓW PROCESU TERMOGENEZY

Pierwszy etap badania miał na celu potwierdzenie, czy **Lipout™** jest w stanie stymulować ekspresję kluczowego markera termogenezy - UCP1, zarówno w kulturach podskórnych preadipocytów, jak i kulturach dojrzałych *a priori* białych adipocytów. W etapie tym wykorzystano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).



Zaobserwowaliśmy spektakularny wzrost ekspresji genu UCP1 w obu typach kultur, największy przy najwyższej dawce **Lipout™**. W kulturze preadipocytów ekspresja genu wzrosła o 2094% (wykres 1), a w kulturze dojrzałych adipocytów o 537% w porównaniu z próbka kontrolną (wykres 2), przy najwyższej dawce **Lipout™** (0,56%).

Tak ekstremalnie wysokie wartości ekspresji genu były efektem niemal zerowej ekspresji UCP1 w kulturze kontrolnej.



Wykresy 1 i 2. Zmiany względnej ilości mRNA UCP1 zaobserwowane po zakończeniu inkubacji preadipocytów (po lewej) i dojrzałych adipocytów (po prawej) z **Lipout™**, w odniesieniu do próbki kontrolnej.

Wyniki wskazują, że **Lipout™** aktywuje program genetyczny beżowych adipocytów w białej tkance tłuszczowej.

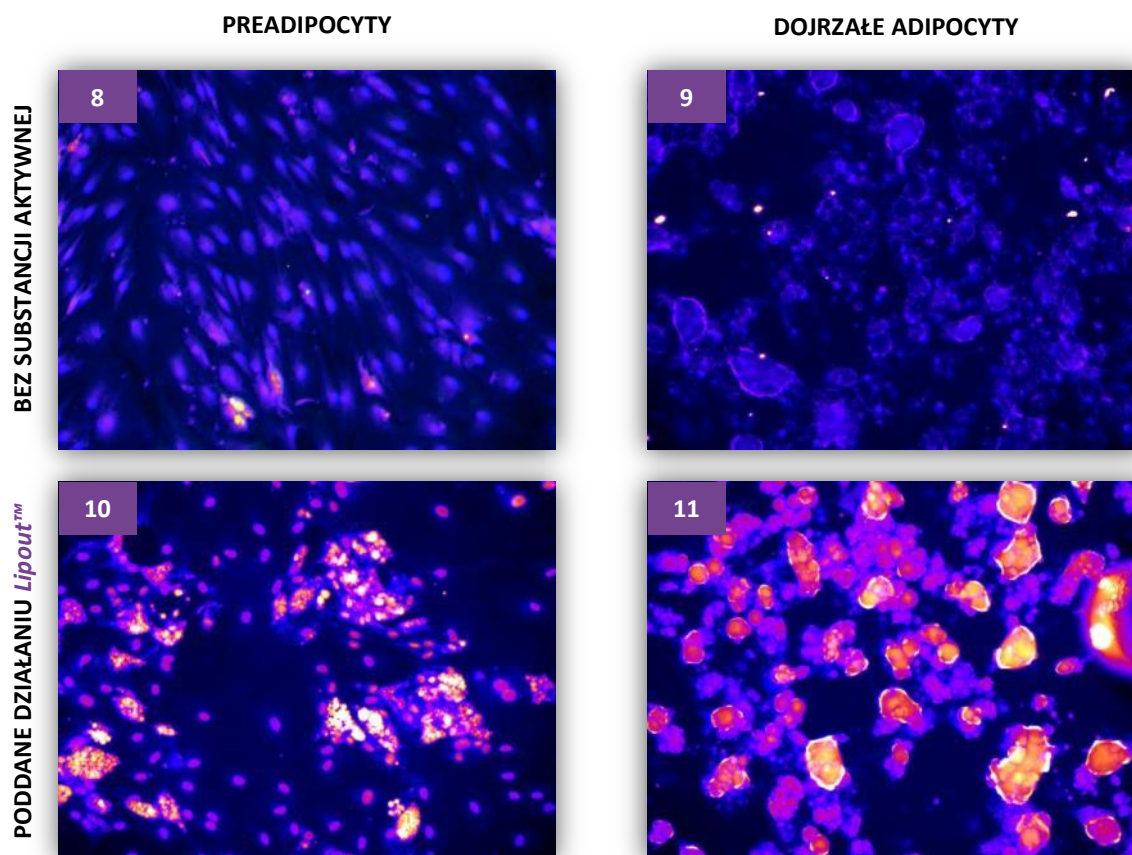
2. EKSPRESJA KLUCZOWYCH BIAŁEK TERMOGENEZY

Po pozytywnych wynikach ekspresji genów oceniliśmy, czy **Lipout™** rzeczywiście aktywuje ekspresję białka UCP1. Pomiaru dokonano za pomocą immunocytochemii. Zmierzyliśmy też ekspresję poriny mitochondrialnej VDAC (kanał anionowy zależny od napięcia), która jest wskaźnikiem biogenezy nowych mitochondriów w komórkach.

Zaobserwowaliśmy, że ekspresja obu białek **wzrosła wraz ze zwiększeniem stężenia Lipout™**: o 50% w preadipocytach i o 378% w dojrzałych adipocytach w przypadku UCP1 oraz o 22% w preadipocytach i o 139% w dojrzałych adipocytach dla VDAC.

Wzrost ekspresji UCP1 po inkubacji z **Lipout™** jest wyraźnie widoczny na zdjęciach mikroskopowych kultur adipocytów (rysunki 10 i 11), w porównaniu z kulturami nie poddanymi ekspozycji na składnik aktywny (rysunki 8 i 9).

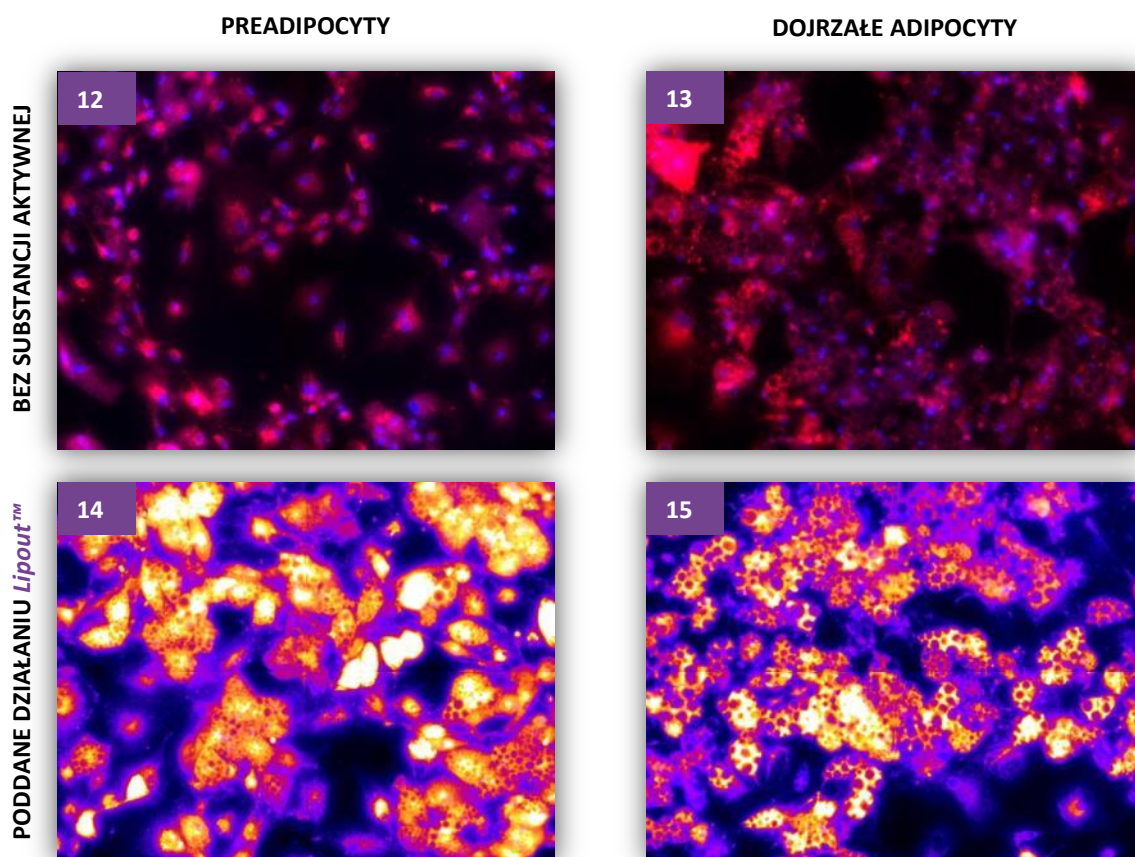
Wyniki wskazują, że wzrost ekspresji genów wywoływany przez **Lipout™** przekłada się na zwiększenie produkcji protein niezbędnych do termogenezy.



Rysunki 8-11. Zdjęcia mikroskopowe ekspresji UCP1 w kulturach preadipocytów (po lewej) i dojrzałych adipocytów (po prawej), bez substancji aktywnej (na górze) i po zastosowaniu *Lipout™* (na dole) (UCP1 widoczne jako żółto-czerwone plamy).

3. BIOGENEZA NOWYCH MITOCHONDRIÓW

Mitochondria to najważniejsze organelle w procesie oddychania i termogenezy. Używając specyficzny marker jesteśmy w stanie potwierdzić, że wzrost ekspresji białka VDAC wywołany przez *Lipout™* i zmierzony w powyższym badaniu, skutkował **znaczącym wzrostem liczby aktywnych mitochondriów w komórkach** (rysunki 14 i 15).



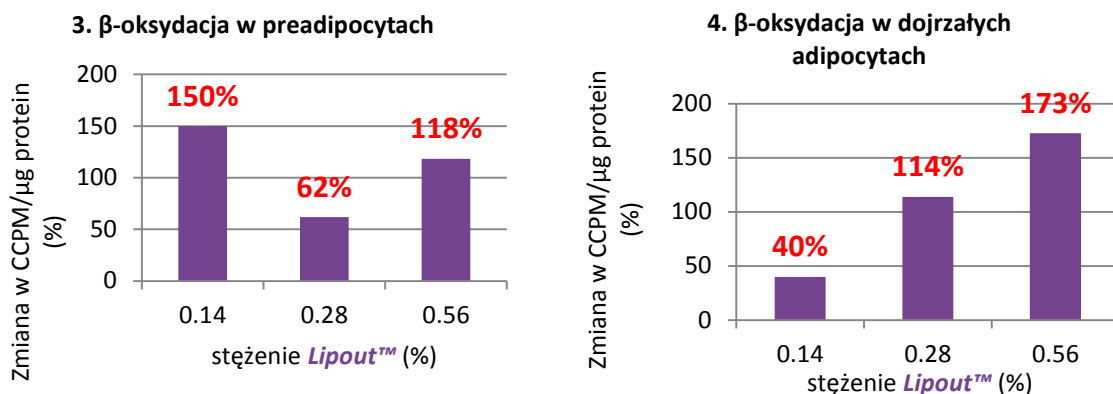
Rysunki 12-15. Zdjęcia mikroskopowe aktywnych mitochondriów w kulturach podskórnych preadipocytów (po lewej) i dojrzałych adipocytów (po prawej), bez substancji aktywnej (na górze) i po zastosowaniu *Lipout™* (na dole). Aktywne mitochondria są zabarwione specyficznym markerem MitoTracker Red. Niebieskie plamy widoczne na górnych zdjęciach to jądra komórkowe. Aktywne mitochondria widoczne są na dolnych zdjęciach jako jasnożółte plamy.

4. WZROST UTLENIANIA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Ostatecznym etapem naszego badania *in vitro* była ocena, czy inkubacja adipocytów z *Lipout™* zwiększyła utlenianie kwasów tłuszczowych.

Zastosowanie najwyższego stężenia *Lipout™* zwiększyło β -oksydację o 118% w preadipocytach (wykres 3) i o 173% w dojrzałych adipocytach (wykres 4).

Wyniki potwierdzają, że po aktywacji programu genetycznego i produkcji protein przez *Lipout™* następuje **zwiększenie eliminacji lipidów magazynowanych w białych i beżowych adipocytach.**



Wykresy 3 i 4. Wzrost utleniania kwasów tłuszczowych w *a priori* białych preadipocytach (po lewej) i *a priori* białych dojrzałych adipocytach (po prawej) poddanych działaniu *Lipout*TM, w odniesieniu do próbki kontrolnej. CCPM = corrected counts per minute.

*Lipout*TM przekształca adipocyty magazynujące lipidy w spalające tłuszcze beżowe adipocyty

SKUTECZNOŚĆ *IN VIVO*

Skuteczność *Lipout*TM w redukowaniu tkanki tłuszczowej i cellulitu została oceniona w badaniu *in vivo* z podwójną próbą ślepą, zgodnie z następującym protokołem:

- 61 ochotników, mężczyźni i kobiety w wieku od 18 do 60 lat, ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) powyżej 23 dla kobiet i powyżej 25 dla mężczyzn.
- Kremo-żel zawierający 3% *Lipout*TM został porównany z taką samą recepturą bez składnika aktywnego (placebo).
- 21 kobiet i 10 mężczyzn stosowało placebo, a 20 kobiet i 10 mężczyzn stosowało recepturę z *Lipout*TM dwa razy dziennie przez dwa miesiące.
- Kobiety nakładały produkty na brzuch, biodra i uda, co pozwoliło na ocenę efektu wyszczuplającego i przeciwcellulitowego. Mężczyźni stosowali produkty tylko na brzuchu, co umożliwiło ocenę działania wyszczuplającego.
- W trakcie trwania testu ochotnicy nie stosowali na badanych obszarach żadnego innego produktu lub kuracji kosmetycznej. Zalecono im również, aby nie zmieniali nawyków żywieniowych oraz trybu życia podczas trwania badania.
- Następujące parametry zostały zmierzone na początku (D0), po miesiącu (D28) oraz po zakończeniu aplikacji (D56):



1. Redukcja warstwy tłuszczu:
 - Pomiar obwodu ciała w centymetrach.
 - Standaryzowane zdjęcia badanych obszarów ciała.
 - Grubość podskórnej warstwy tłuszczu.
2. Redukcja cellulitu:
 - Zmniejszenie długości złącza skórno-podskórnego.
 - Chropowatość powierzchni skóry.
 - Ocena kliniczna.
3. Poprawa właściwości biomechanicznych skóry:
 - Elastyczność skóry.
 - Jędrność skóry.
4. Aktywacja termogenezy w podskórnej tkance tłuszczowej (D0 i D56).
5. Subiektywna ocena skuteczności produktu.

1. REDUKCJA WARSTWY TŁUSZCZU

Pomiar obwodu ciała w centymetrach

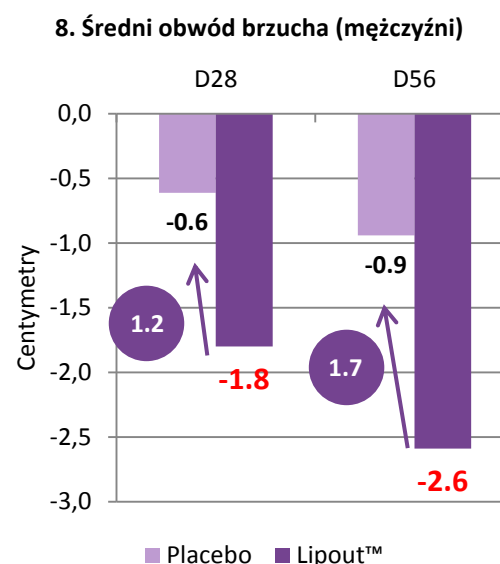
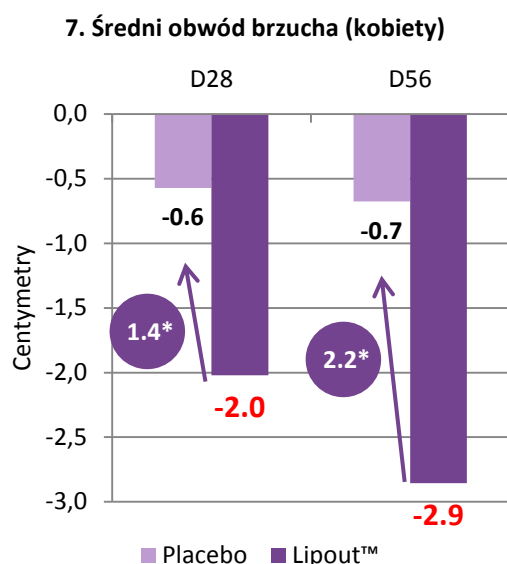
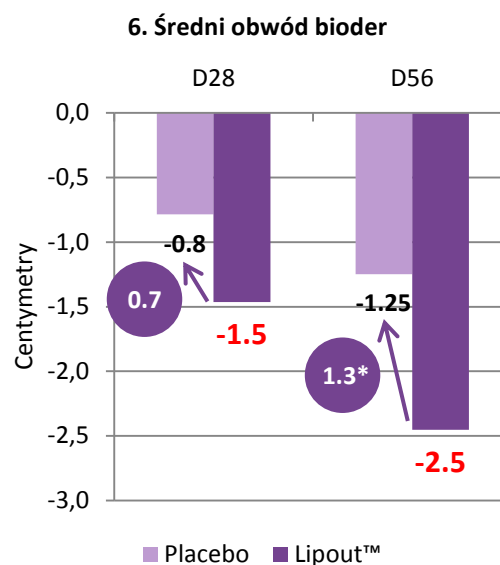
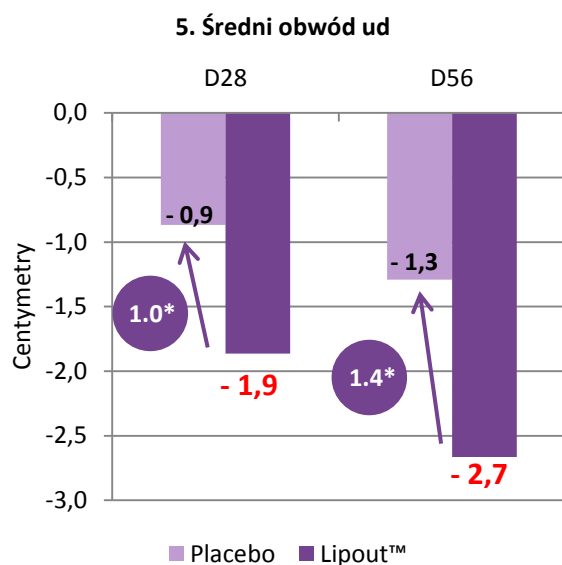
Obwód bioder i ud u kobiet oraz brzucha u kobiet i mężczyzn został zmierzony elastyczną miarą.

Aplikacja **Lipout™** spowodowała redukcję rozmiaru wszystkich badanych obszarów w porównaniu z placebo (wykresy 5-8):

- **Uda:** średnia redukcja o **1,0 cm** w D28 i o **1,4 cm** w D56 (wykres 5), z maksymalną redukcją na poziomie **5,7 cm**.
- **Biodra:** średnia redukcja o **0,7 cm** po miesiącu (D28) i o **1,3 cm** po dwóch miesiącach (D56) stosowania (wykres 6), z maksymalną redukcją **5,5 cm**.

• **Brzuch:**

- **Kobiety:** średnia redukcja o **1,4 cm** w D28 i o **2,2 cm** w D56 (wykres 7), maksymalna redukcja o **5,0 cm**.
- **Mężczyźni:** średnia redukcja o **1,2 cm** po 28 dniach i o **1,7 cm** po 56 dniach aplikacji (wykres 8), maksymalna redukcja o **10,4 cm**.



Wykresy 5-8. Średnie wartości redukcji obwodu ud, bioder i brzucha wyrażone w centymetrach, uzyskane po miesiącu (D28) i dwóch miesiącach (D56) stosowania *Lipout™* i placebo. Różnica w centymetrach między *Lipout™* a placebo przedstawiona jest we fioletowych kołach. Większość różnic jest statystycznie istotna (* $P < 0.05$).

Standaryzowane zdjęcia badanych obszarów ciała

W celu wizualnej oceny wpływu testowanych produktów na różne obszary ciała, wykonano standaryzowane zdjęcia ud i bioder ochotniczek oraz brzucha (kobiety i mężczyźni).

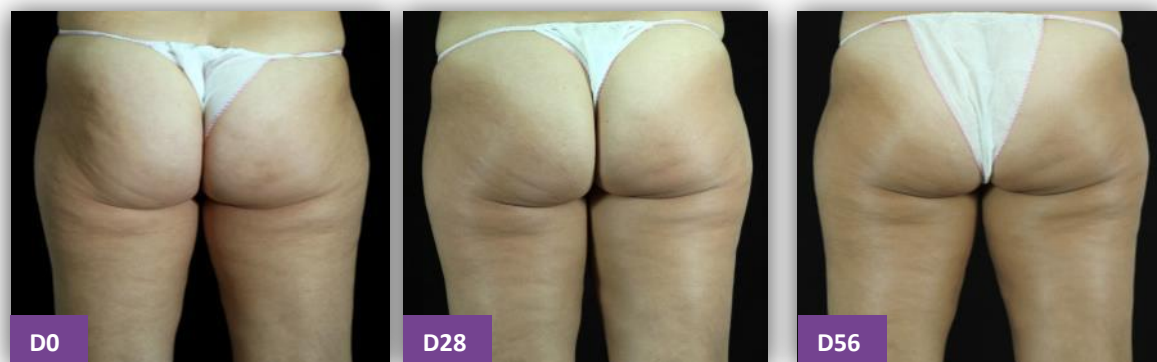
Utrata objętości ciała jest widoczna na zdjęciach zarówno u mężczyzn, jak i kobiet (rysunki 16 i 17), dodatkowo wystąpiła też ogólna poprawa wyglądu skóry (rysunek 18).



Rysunek 16: Standaryzowane zdjęcia brzucha jednego z ochotników, przedstawiające redukcję podskórnej tkanki tłuszczowej po miesiącu (D28) i dwóch miesiącach (D56) stosowania *Lipout™*.



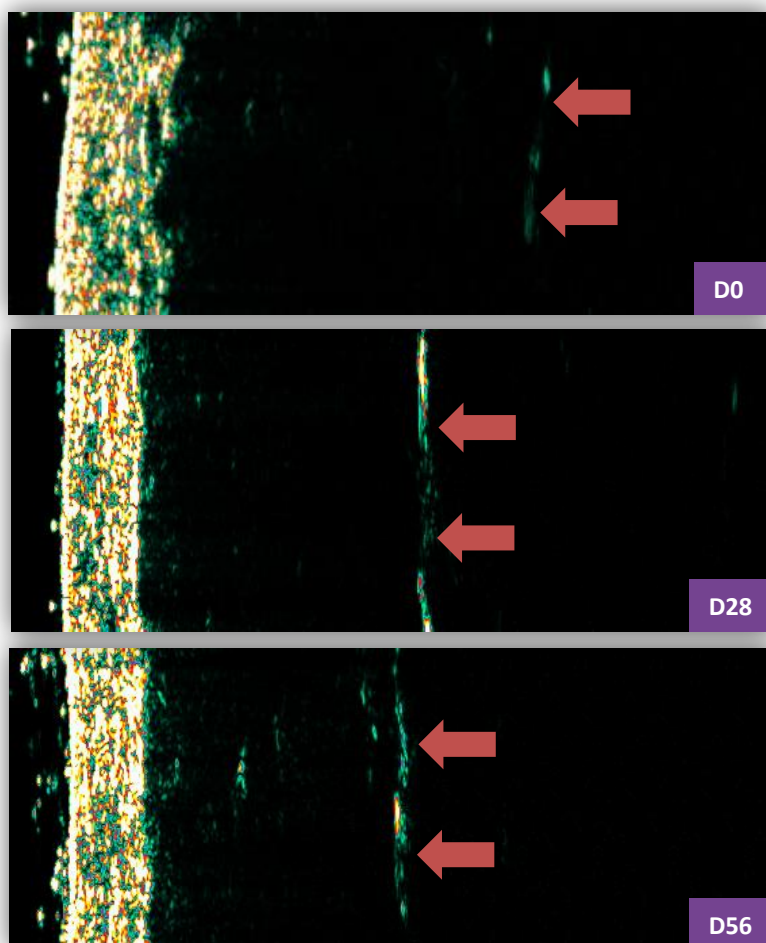
Rysunek 17: Standaryzowane zdjęcia brzucha jednej z ochotniczek, przedstawiające redukcję podskórnej tkanki tłuszczowej po miesiącu (D28) i dwóch miesiącach (D56) stosowania *Lipout™*.



Rysunek 18: Standaryzowane zdjęcia ud i bioder jednej z ochotniczek, na których widoczna jest zarówno redukcja podskórnej tkanki tłuszczowej, jak i poprawa wyglądu skóry po miesiącu (D28) i dwóch miesiącach stosowania (D56) *Lipout™*.

Grubość podskórnej warstwy tłuszczu

Podskórna tkanka tłuszczowa przyczynia się do niepożądanych zmian sylwetki. Grubość warstwy podskórnej została zmierzona za pomocą ultrasonografu (Dermascan C ultrasound system), a przykładowe wyniki przedstawia rysunek 19:



Rysunek 19. Zdjęcia z ultrasonografu przedstawiające podskórną tkankę tłuszczową lewego biodra jednej z ochotniczek w D0, D28 i D56. Czerwonymi strzałkami zaznaczono krawędź tkanki tłuszczowej. Widoczna jest progresywna redukcja grubości warstwy tłuszczowej.

Grubość podskórnej warstwy tłuszczowej znacząco spadła na wszystkich badanych obszarach poddanych działaniu *Lipout™*, w porównaniu z placebo:

- **Uda:** 13,6% redukcji w D28 i **25,5% (0,8 mm)** redukcji w D56.
- **Biodra:** 30,9% redukcji w D28 i **49,9% (1,0 mm)** redukcji w D56.
- **Brzuch:**
 - **Kobiety:** 13,1% redukcji w D28 i **29,3% (1,5 mm)** redukcji w D56.

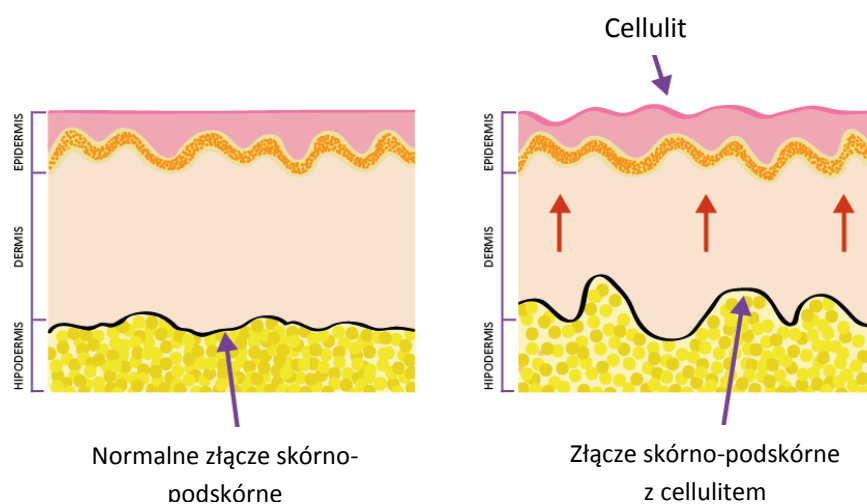
- **Mężczyźni: 52,0%** redukcji w D28 i **66,5% (1,4 mm)** redukcji w D56.

Lipout™ wyraźnie redukuje obwód ciała u kobiet i mężczyzn, zmniejszając grubość podskórnej tkanki tłuszczowej

2. REDUKCJA CELLULITU

Zmniejszenie długości złącza skórno-podskórnego

Pomiar złącza skórno-podskórnego jest jedną ze standardowych metod oceny stanu skóry z cellulitem, ponieważ dezorganizacja złącza jest jednym z czynników towarzyszących jego powstawaniu. Jest to również czynnik bezpośrednio wywołujący efekt skórki pomarańczowej. Ocena odbywa się na podstawie obliczenia długości linii oddzielającej skórę właściwą od tkanki podskórnej; im dłuższa linia, tym bardziej zaawansowany jest stopień cellulitu (rysunek 20).



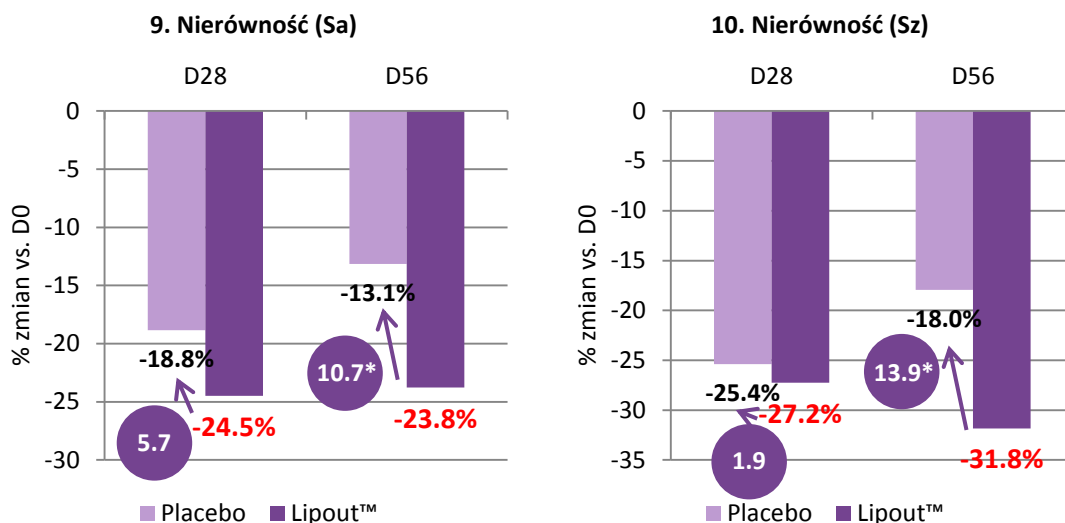
Rysunek 20. Schematyczne przedstawienie związku między zwiększoną długością złącza skórno-podskórnego i zaawansowaniem cellulitu.

Lipout™ znacząco zredukował długość złącza skórno-podskórnego (o 21,7%) w porównaniu z placebo.

Chropowatość powierzchni skóry

Chropowatość powierzchni skóry jest jednym z głównych symptomów cellulitu i może być oceniona za pomocą projekcji prążków (PRIMOS 3D). W celu oszacowania nierówności skóry na pośladkach kobiecych, które są obszarem zwykle najbardziej dotkniętym przez cellulit, zmierzono dwa parametry:

- **Sa**, będący średnią arytmetyczną głębokości pofałdowania badanej powierzchni skóry.
- **Sz**, wyrażający średnią głębokość pięciu największych zagłębień i wysokość pięciu najwyższych wierzchołków na badanym odcinku skóry.

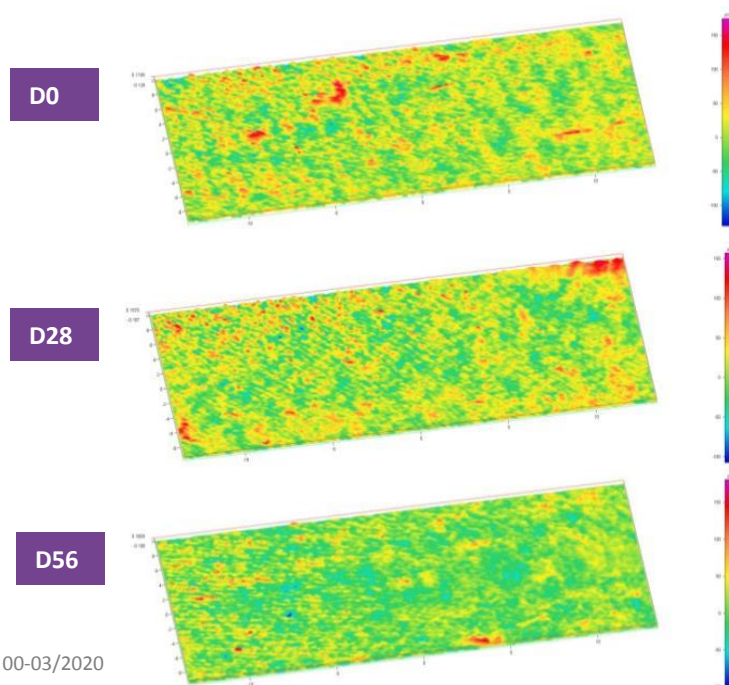


Wykresy 9 i 10. Zmiany w chropowatości powierzchni skóry (parametry Sa i Sz) uzyskane po aplikacji *Lipout™* i placebo w D28 i D56.

Aplikacja *Lipout™* zmniejszyła chropowatość powierzchni skóry, wyrażoną jako Sa, o 5,7% po miesiącu stosowania i o 10,7% po dwóch miesiącach, z istotną różnicą względem placebo (wykres 9).

Aplikacja *Lipout™* zmniejszyła chropowatość powierzchni skóry, wyrażoną jako Sz, o 1,9% po miesiącu stosowania i o 13,9% po dwóch miesiącach, z istotną różnicą względem placebo (wykres 10).

Poniżej przedstawiono trójwymiarowe obrazy skóry wykonane przez system PRIMOS 3D; widoczna jest wyraźna gładkość skóry w D56:



Rysunek 21. Obrazy chropowatości powierzchni skóry wykonane przez PRIMOS w D0, D28 i D56, wykorzystujące skalę kolorów (czerwony = najwyższy region lub wierzchołek; niebieski = najgłębszy region lub zagłębienie; zielony = region o neutralnej głębokości).



Ocena kliniczna

Podczas poszczególnych etapów badania, stopień zaawansowania cellulitu był oceniany przez dermatologa za pomocą dwóch skali klinicznych: skali Nürnbergera-Müllera oraz skali Cellulite Severity Scale (CSS). Obie metody używane są do oceny cellulitu na podstawie cech charakterystycznych skóry dotkniętej tą przypadłością, takich jak liczba widocznych zagłębień i ich głębokość, wygląd morfologiczny skóry czy stopień jej zwiotczenia.

Wyniki oceny klinicznej potwierdziły wcześniejsze rezultaty, które wykazały zdolność **Lipout™** do redukowania cellulitu:

	Skala Cellulite Severity Scale	Skala Nürnbergera-Müllera
Placebo	-4%	-6%
Lipout™	-19%	-19%

Tabela 1. Średnia procentowa zmiana wartości uzyskanych w klinicznej ocenie skóry ochotników po zakończeniu badania (D56).

Lipout™ znacząco zredukował cellulit o 19% po dwóch miesiącach, w obu ocenach klinicznych.

Aplikacja **Lipout™** zmniejszyła długość złącza skórno-podskórnego, powodując istotną redukcję nierówności skóry i widoczny spadek cellulitu

3. POPRAWA WŁAŚCIWOŚCI BIOMECHANICZNYCH SKÓRY

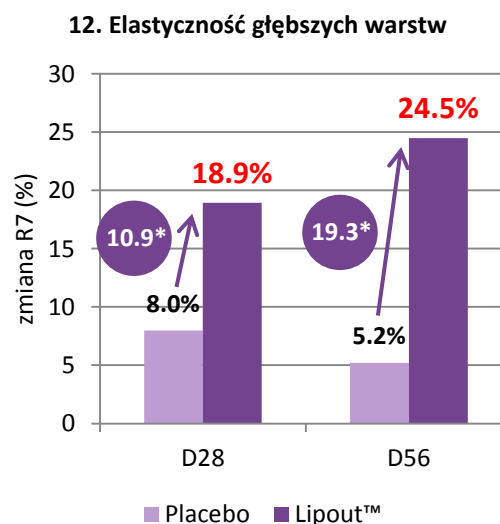
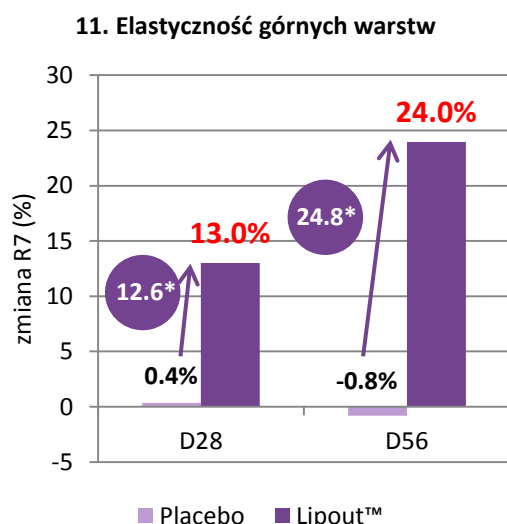
Właściwości biomechaniczne skóry zostały zmierzone za pomocą urządzenia Cutometer®. Wykorzystanie sond o różnych rozmiarach umożliwiło ocenę wierzchnich i głębszych warstw skóry.

Elastyczność skóry

Elastyczność skóry jest zdolnością skóry do powrotu do pierwotnej pozycji po zastosowaniu podciśnienia. Wśród wielu parametrów możliwych do wyznaczenia przez Cutometer®, R7 jest najbardziej właściwym miernikiem elastyczności skóry.

Stwierdzono statystycznie istotną poprawę elastyczności skóry po 28 dniach aplikacji **Lipout™**. Występowała ona na wszystkich badanych obszarach ciała, zarówno w powierzchniowych, jak i głębszych warstwach skóry.

- Po zastosowaniu **Lipout™**, elastyczność górnej warstwy skóry wzrosła o 12,6% w D28 i o 24,8% w D56 w porównaniu z placebo (wykres 11).
- **Lipout™** zwiększył również elastyczność głębszych warstw skóry, o 10,9% w D28 oraz o 19,3% w D56, różnica statystycznie istotna względem placebo (wykres 12).

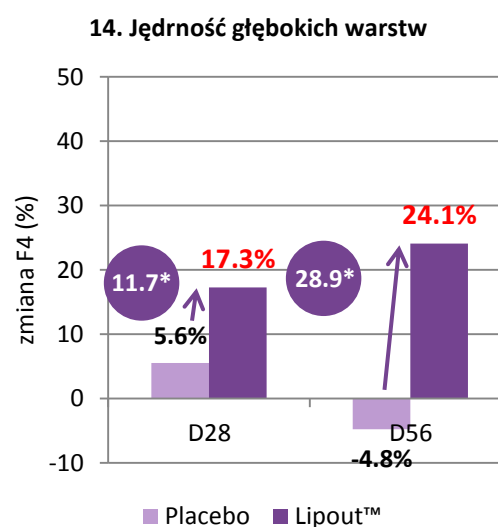
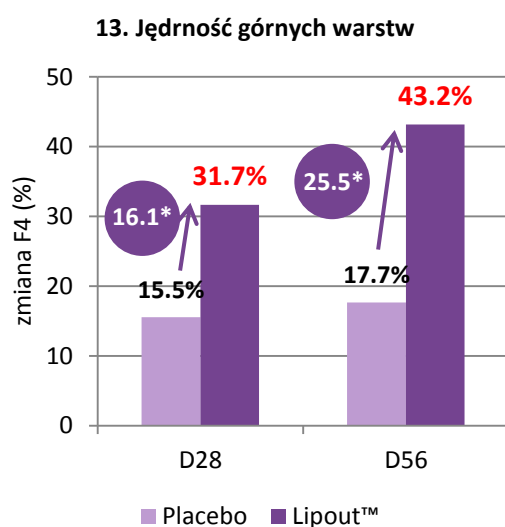


Wykresy 11 i 12. Zmiany elastyczności górnych i głębszych warstw skóry (%), uzyskane z **Lipout™** i placebo w D28 i D56 (koniec badania) względem D0 i placebo. (*) Różnica statystycznie istotna ($P < 0.05$).

Jędrność skóry

Jędrność to odporność skóry na działanie podciśnienia. Właściwość ta została zmierzona za pomocą urządzenia Cutometer®, wykorzystując parametr F4 (im niższy odczyt, tym większa jędrność skóry).

Stwierdzono statystycznie istotny spadek parametru F4 po 28 i 56 dniach aplikacji **Lipout™**, w wierzchnich i głębokich warstwach skóry (wykresy 13 i 14). Oznacza to, że **jędrność skóry znacząco wzrosła dzięki zastosowaniu Lipout™**, w porównaniu z placebo. Po miesiącu jędrność zwiększyła się o 16,1% w warstwach wierzchnich i o 11,7% w warstwach głębszych, a po dwóch miesiącach stosowania **Lipout™** o 25,5% w warstwach wierzchnich i o 28,9% w warstwach głębokich.

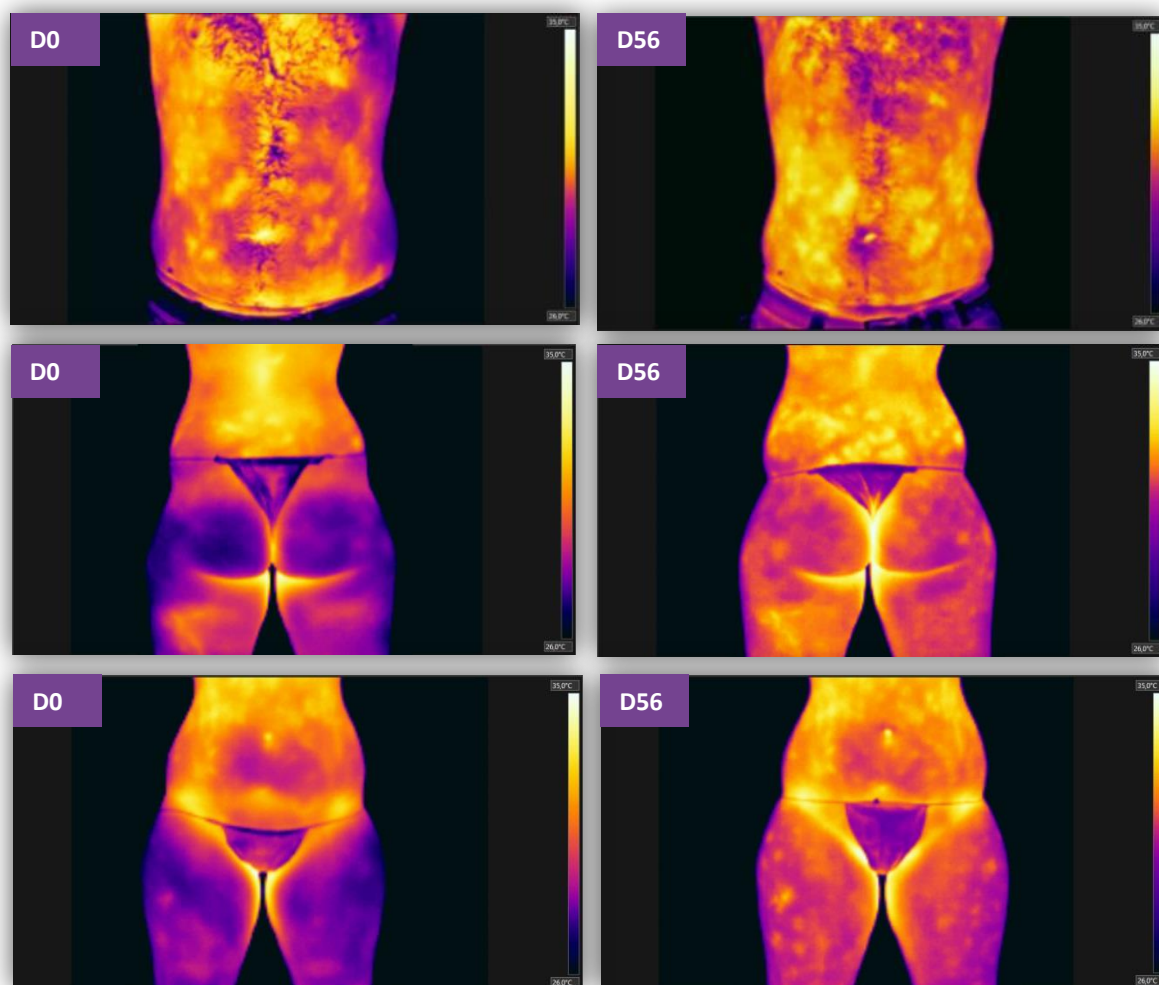


Wykresy 13 i 14. Zmiany jędrności wierzchnich i głębokich warstw skóry (%), uzyskane z *Lipout™* i placebo w D28 i D56 (koniec badania) względem D0 i placebo. (*) Różnica statystycznie istotna ($P < 0.05$).

Lipout™ poprawia kondycję skóry, zmniejszając cellulit

4. AKTYWACJA TERMOGENEZY W PODSKÓRNEJ TKANCE TŁUSZCZOWEJ

Biorąc pod uwagę, że *Lipout™* aktywuje zasadniczy mechanizm pobudzający termogenezę w tkance tłuszczowej, dokonano oceny, czy aplikacja *Lipout™* skutkuje wzrostem temperatury skóry, co odzwierciedla aktywność spalania tłuszczu. Temperatura skóry została określona za pomocą termografii w D0 i D56, pomiarów dokonano na stosownych obszarach ciała: brzuch u mężczyzn i kobiet oraz biodra i uda u kobiet.

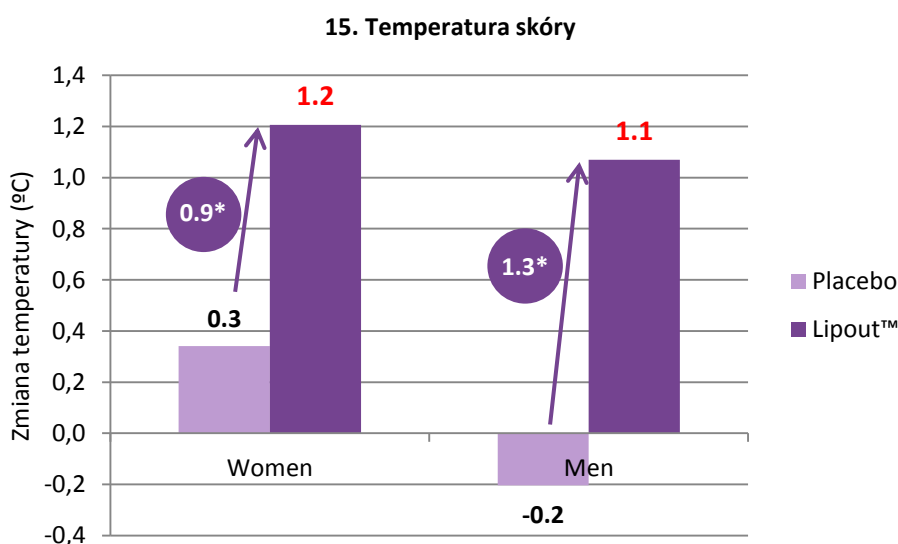


Rysunek 22. Obrazy termograficzne uzyskane przed (D0) i po dwóch miesiącach (D56) stosowania *Lipout™*. Na górnych zdjęciach przedstawiono obszar brzucha u mężczyzny, na środkowych zdjęciach tył ciała jednej z ochotniczek, a na dolnych przednią część ciała ochotniczki.

Wpływ **Lipout™** na temperaturę skóry jest wyraźnie widoczny na zdjęciach termograficznych (rysunek 22). Na zdjęciach wykonanych w dniu rozpoczęcia badania zauważalne są obszary o niższej temperaturze (kolor fioletowy), zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Wskazuje to na obecność tkanki tłuszczowej nieaktywnej termogenicznie (magazynowanie tłuszczu). Po dwóch miesiącach stosowania **Lipout™**, obszary fioletowe zostały wyparte przez pomarańczowo-czerwone, co wskazuje na **znaczący wzrost aktywności termogenezy i spalania tłuszczu**. Wyniki potwierdzają, że **Lipout™** **pobudza termogenezę *in vivo*, oraz jak wcześniej wykazano *in vitro***.

Lipout™ znacząco zwiększył temperaturę skóry (wykres 15):

- U kobiet, aplikacja **Lipout™** spowodowała różnicę **0,9°C** względem placebo w D56.
- U mężczyzn, aplikacja **Lipout™** dała różnicę **1,3°C** względem placebo w D56.

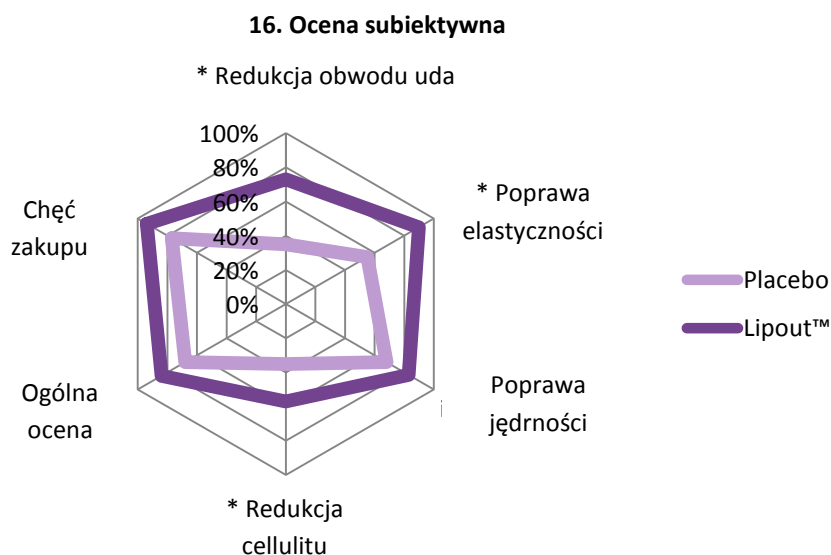


Wykres 15. Zmiany temperatury skóry uzyskane po dwóch miesiącach aplikacji **Lipout™** i placebo.

Lipout™ zwiększa temperaturę skóry, co potwierdza wzrost aktywności termogenicznej w podskórnej tkance tłuszczowej

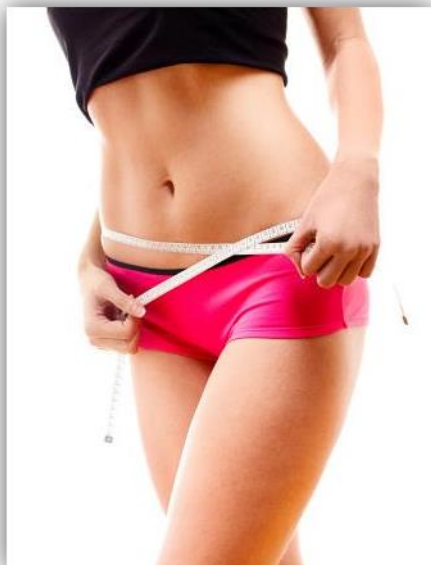
5. SUBIEKTYWNA OCENA SKUTECZNOŚCI PRODUKTU

Skuteczność **Lipout™** została subiektywnie oceniona przez ochotników w ankiecie, która wypełniona została przez nich na początku i po zakończeniu badania (wykres 16).



Wykres 16. Ocena placebo i **Lipout™** przez ochotników, wyrażająca odsetek badanych, którzy na pytania zadane w ankiecie odpowiedzieli "Zgadzam się" i "W pełni się zgadzam". (*) Różnica statystycznie istotna między wynikami uzyskanymi w grupie **Lipout™** i placebo ($P < 0.05$).

WNIOSKI



Lipout™ pobudza proces brunatnienia białych adipocytów dzięki zawartości ksantofili i nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Oznacza to, że **Lipout™** indukuje różnicowanie **beżowych preadipocytów w dojrzałe beżowe adipocyty**. Przekształca on również tkankę tłuszczową magazynującą tłuszcz w tkankę spalającą tłuszcz, aktywując nieaktywne beżowe adipocyty i przemieniając adipocyty białe w beżowe.

Wykazując wzrost β -oksydacji kwasów tłuszczowych w badanych kulturach potwierdziliśmy, że beżowe adipocyty pobudzone przez **Lipout™** aktywnie **spalają tłuszcze dzięki zwiększonej termogenezie**. Zdolność **Lipout™** do wywoływania termogenezy została też potwierdzona *in vivo* na podstawie

wzrostu temperatury skóry ochotników stosujących **Lipout™**.

Powyższe wyniki wskazują, że **Lipout™** jest składnikiem aktywnym zdolnym do pobudzania brunatnienia adipocytów, aktywowania termogenezy i spalania tłuszczu, co powoduje redukcję grubości podskórnej tkanki tłuszczowej u kobiet i mężczyzn.

Lipout™ znacząco redukuje tłuszcz, zwiększa elastyczność i jędrność skóry oraz działa przeciwcellulitowo, łagodząc różne objawy tej przypadłości

APLIKACJE KOSMETYCZNE

- Produkty wyszczuplające i poprawiające sylwetkę.
- Prewencja i zwalczanie cellulitu.
- Działanie uzupełniające w przeciwstarzeniowych produktach do ciała.



ZALECANE DOZOWANIE

Zalecane dozowanie wynosi od 1% do 3%.

BIBLIOGRAFIA

Barbe P, Stich V, Galitzky K, et al. *In Vivo Increase in β -Adrenergic Lipolytic Response in Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Subjects Submitted to a Hypocaloric Diet*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1997, 82(1):63-69.

Cannon B, Nedergaard J. *Yes, even human brown fat is on fire!* The Journal of Clinical Investigation. 2012, 122(2): 486-9.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. *Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans*. N Engl J Med. 2009, 360(15): 1509–1517.

Gouveia L, Coutinho C, Mendonça E. *Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana**. J Sci Food Agric. 2008, 88:891–896.

Harms M, Seale P. *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nature Medicine. 2013, 19(10):1252-1263.

Kruglikov I. *The Pathophysiology of Cellulite: Can the Puzzle Eventually Be Solved?**Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications. 2012, 2:1-7.

Obata M, Taguchi S. *The xanthophyll-cycling pigment dynamics of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) during light–dark transition*. Plankton Benthos Res. 2012, 7(3): 101–110.

Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, et al. *Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans*. The Journal of Clinical Investigation. 2012, 122(2):545-552.

Rosensend ED, Spiegelman BM. *What We Talk About When We Talk About Fat*. Cell. 2014, 156(1):20-44.

Rosenwald M, Perdikari A, Rülcke T, et al. . *Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes*. Nature Cell Biology. 2013, 15:659-667.

Sánchez S, Martínez ME, Espinola F. *Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium*. Biochemical Engineering Journal. 2000, 6:13–18.



- Vitali A, Murano I, Zingaretti MC *et al.* *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes.* Journal of Lipid Research. 2012, 53:619–629.
- Van Marken WD, Smulders NM, Kemerink GJ, *et al.* *Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men.* The New England Journal of Medicine. 2009, 360(15):1500-1508.
- Wang QA, Tao C, Gupta RK *et al.* *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration.* Nature Medicine. 2013, 19:1338-1344.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, *et al.* *Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human.* Cell. 2012, 150(2):366-376.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. *Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown?* Genes & Development. 2013, 27:234–250.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, *et al.* *Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans.* The Journal of Clinical Investigation. 2013, 123(8):3404-3408.
- Zapata M, Garrido JL. *Ocurrence of phytylated chlorophyll c in Isochrysis galbana and Isochrysis sp. (clone T/ISO) (Prymnesiophyceae).* Journal of Phycology. 1997, 33(2):209-214.



weareprovital.com