

Dr n. med. Monika Paul-Samojedny

Katedra i Zakład Genetyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego z OML, SUM w Katowicach
Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Jan Kowalski

Molekularne mechanizmy starzenia się skóry

Starzenie się skóry to naturalny, postępujący proces, obejmujący zmniejszenie biologicznej aktywności komórek organizmu, spowolnienie procesów regeneracyjnych oraz utratę zdolności adaptacyjnych ustroju.

Procesowi temu towarzyszy suchość skóry (wynikająca z utraty zdolności do wiązania wody i zatrzymywania jej w naskórku), która traci dotychczasową elastyczność, ulega odwodnieniu, a naskórek staje się cieńszy i szorstki. Obserwuje się także zmniejszenie tempa namnażania keratynocytów, zmniejszenie aktywności fibroblastów oraz włókien kolagenowych i elastynowych, a także silniejsze zaznaczenie zmarszczek mimicznych. Ponadto pojawiają się drobne zmarszczki wokół kącików oczu i ust, które z czasem stają się głębokie. Dodatkowo dochodzi do niejednorodnego wydzielania melaniny i tym samym pojawiają się plamy pigmentacyjne. Widoczne mogą stać się również starcze naczyńki, plamy soczewicowate i włókniaki. Z kolei w przypadku bardziej zaawansowanego procesu starzenia się skóry mogą pojawić się zaburzenia związane z rogowaceniem, brodawki łojotokowe czy nawet stany przedrakowe, jak również, u niektórych osób, raki podstawnokomórkowe i kolczystokomórkowe.

Zależnie od czynników istotnych w procesie starzenia się skóry wyróżnia

się starzenie zewnątrzpochodne (egzogenne) uwarunkowane działaniem czynników środowiska (promieniowanie UV, narażenie na dym papierosowy, zanieczyszczenia środowiska, nieprawidłowe zabiegi pielęgnacyjne) oraz związane z wiekiem (starzenie chronologiczne), zmianami hormonalnymi, nieodpowiednią dietą czy czynnikami genetycznymi – starzenie wewnątrzpochodne (endogenne). Oba wymienione procesy starzenia nakładają się na siebie i są silnie powiązane z wytwarzaniem wolnych rodników (ROS). Stres oksydacyjny (brak równowagi pomiędzy produkcją ROS a obroną antyoksydacyjną) jest z kolei jednym z najbardziej szkodliwych czynników w starzeniu się skóry, prowadząc do utraty komórek i macierzy pozakomórkowej^[1]. U podłoża wewnątrzpochodnego i zewnątrzpochodnego starzenia się skóry leżą wspólne mechanizmy biochemiczne, biologiczne i molekularne^[2,3,4].

W przypadku starzenia wewnątrzpochodnego obserwuje się suchość i szorstkość (niekiedy z towarzyszącym świądem), obecność licznych drobnych zmarszczek, atrofię skóry nieeksponowanej na

aesthetica

promieniowanie słoneczne, nasilone rogowacenie skóry uwarunkowane zmniejszonym wydzielaniem gruczołów łojowych i potowych, bladeść skóry będącą skutkiem zmniejszenia liczby i reaktywności naczyń włosowatych oraz obecność przebarwień i plam starczych.

Z kolei starzeniu zewnątrzpochodnemu towarzyszy suchość i szorstkość skóry, obecność zmarszczek, zmian barwnikowych, teleangiektazji, małych grudek i guzków na skórze (tzw. elastozą słoneczną), ponadto dochodzi do przerostu gruczołów łojowych i rozwoju nowotworów złośliwych skóry.

Kiedy skóra się starzeje? Czynniki warunkujące starzenie się skóry

Istnieje wiele teorii próbujących wyjaśnić źródła i przyczyny starzenia się organizmu. Ogólnie można je podzielić na teorie niegenetyczne (gromadzenie się substancji szkodliwych jako przyczyna starzenia się), genetyczne (zaburzenia na poziomie DNA) i fizjologiczne (starzenie jako wynik degradacji systemów fizjologicznych). Do teorii starzenia się skóry można zaliczyć teorię programowanej śmierci komórki (teoria odpornościowa, ograniczonej liczby podziałów, samolubnego genu, genowa) oraz teorie kumulacji błędów (teoria wolnorodnikowa, zaburzeń białkowych, mitochondrialna, błonowa). W obrębie danego gatunku funkcjonuje mniej więcej jednolity model starzenia, co może przemawiać za genetycznym uwarunkowaniem tego procesu.

Starzenie się a promieniowanie UV – fotostarzenie

Spośród czynników środowiskowych najważniejszą rolę w procesie starzenia się

skóry odgrywa promieniowanie UV indukujące m.in. powstawanie wolnych rodników. Promieniowanie UV jest pochłanianie przez DNA komórkowe, co w efekcie prowadzi do powstania fotoproduktów DNA – dimerów cyklobutylowych, szczególnie dimerów pirymidyny.

Istotnym czynnikiem w procesie starzenia się skóry jest promieniowanie UVA i UVB. Promieniowanie UVA w ponad 50% przenika do warstwy siateczkowej i brodawkowej skóry właściwej (długość fali UVA1 to 340-400 nm, zaś UVA2 – 320-340 nm). 90-95% promieniowania słonecznego docierającego do powierzchni ziemi to promieniowanie UVA^[5], natomiast promieniowanie UVB (długość fali 290-320 nm) jest zatrzymywane w 90% przez warstwę rogową naskórka^[6].

Biologiczne skutki oddziaływania promieniowania UV na skórę są zależne od jego natężenia oraz długości fali. Mogą być wynikiem reakcji wczesnych i mieć postać rumienia, oparzenia słonecznego oraz reakcji odległych, związanych z uszkodzeniem skóry na poziomie molekularnym i biochemicznym. Zmiany wywołane działaniem na skórę promieniowania UVB są widoczne głównie w obrębie naskórka. Wiadomo, że promieniowanie UVB oddziałuje głównie na keratynocyty i komórki Langerhansa, i jest odpowiedzialne za hiperkeratozę ogniskową, pojawienie się cech atypii oraz uszkodzenie bariery lipidowej skóry. Zaś promieniowanie UVA wywiera nieodwracalny negatywny wpływ przede wszystkim na skórę właściwą (oddziałując na fibroblasty, komórki dendrytyczne skóry, komórki śródbłona naczyń, limfocyty T, komórki tuczne i granulocyty), w której dochodzi do pogrubienia i skracania włókien sprężystych. Ma również miejsce degradacja włókien kolagenowych i elastycznych uwarunkowana

działaniem elastazy i kolagenazy. Dodatkowo w obrębie skóry właściwej upośledzeniu ulega mikrokrażenie i dochodzi do zaburzeń angiogenezy. Ponadto promieniowanie UVA wzmacnia działanie promieniowania UVB w obrębie naskórka^[6,7]. Promieniowanie UV może także odpowiadać za powstanie stanu zapalnego, będącego wynikiem fragmentacji i rozpadu włókien kolagenowych. Ponadto odpowiada za stymulację przebudowy struktury tkanki łącznej poprzez pobudzenie stresu oksydacyjnego i indukcję aktywności receptorów dla czynników wzrostu i cytokin oraz zwiększanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activating protein 1*), co z kolei pobudza aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs)^[8].

Fotostarzenie skóry może być nasilane przez inne czynniki środowiskowe (np. palenie tytoniu, zanieczyszczenie powietrza, brak snu, niewłaściwą dietę), czynniki hormonalne oraz niektóre choroby. Jedną z bardzo charakterystycznych cech fotostarzenia jest zjawisko elastozy, czyli gromadzenia się nieprawidłowych mas elastyny^[9], co wiąże się z degradacją fibryliny (białka sieciującego włókna elastynowe) na granicy skórno-naskórkowej i w efekcie z tworzeniem się zbitych konglomeratów elastyny w skórze właściwej. Wykazano, że enzymem najsilniej degradującym włókna elastynowe jest należąca do lizosomalnych proteaz katepsyna K^[10], której aktywność jest indukowana przez promieniowanie UVA^[11].

Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nad molekularnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za fotostarzenie się skóry pozwalają na sformułowanie teorii zakładającej, że pod wpływem promieniowania UV zostają uruchomione swoiste reakcje immunologiczne, których skutkiem jest uszkodzenie tkanki łącznej.

Uważa się także, że mutacje mitochondrialnego DNA (mtDNA) są także znaczące w procesie starzenia się^[12,13], a wyniki najnowszych badań wykazują, że mutacje w mtDNA są istotne w procesie fotostarzenia. Wiadomo, że w przypadku przewlekłej ekspozycji skóry na promieniowanie UV obserwuje się zwiększenie częstości występowania mutacji mtDNA, w przeciwieństwie do skóry niepoddanej jego działaniu^[14,15].

Ustalono także, że promieniowanie UV odpowiada za aktywację EGF (ang. *epidermal growth factor*). Ponadto stwierdza się także aktywację różnego typu kinaz mogących regulować ekspresję czynnika transkrypcyjnego AP-1. Ponadto promieniowanie to pobudza stres oksydacyjny oraz indukując aktywność receptorów dla czynników wzrostu i cytokin, zwiększa ekspresję czynnika transkrypcyjnego AP-1 (ang. *activating protein 1*). Z kolei jednym z efektów aktywacji ekspresji AP-1 jest indukcja aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), których udział w procesie starzenia się skóry zostanie omówiony w niniejszym opracowaniu.

Wiadomo również, że promieniowanie UV ma zdolność aktywowania NF- κ B^[16], stymulującego z kolei ekspresję cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α)^[17].

Wyniki innych badań wskazują również, że promieniowanie UV może także odpowiadać za stymulowanie produkcji nadtlenu wodoru w skórze, aczkolwiek mechanizm tego działania nie został do końca poznany^[18]. Ustalono, że powstające w wyniku działania promieniowania UV metabolity tlenowe ingerują w metabolizm kolagenu, prowadząc do uszkodzenia jego cząsteczki. Ponadto odpowiadają za inaktywację tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs), stymulując

jednocześnie syntezę MMPs (m.in. MMP-1, degradującej kolagen typu I i III, MMP-3 i MMP-9, niszczących kolagen rozszczepiony przez MMP-1). Promieniowanie UV zakłóca również syntezę kolagenu, zmniejszając ekspresję prokolagenu typu I i III^[19].

Mitochondrialna teoria starzenia

Jedną z teorii starzenia się skóry jest teoria mitochondrialna, zgodnie, z którą starzenie się organizmu może być spowodowane akumulacją mutacji somatycznych mitochondrialnego DNA i zaburzeniami gospodarki energetycznej komórek. Wiadomym jest, że mitochondrialny DNA charakteryzuje się wyższą częstotliwością mutacji (nawet 10-krotnie) w porównaniu z DNA jądrowym. Zgodnie z niniejszą teorią z wiekiem maleje liczba, aktywność i wydolność energetyczna mitochondriów, czego konsekwencją jest upośledzenie zdolności regeneracyjnych komórek. Wiadomo także, że dochodzi do redukcji liczby cząsteczek ATP i obniżenia poziomu fosforylacji oksydacyjnej w ludzkich fibroblastach oraz do upośledzenia zdolności regeneracyjnych komórek i zahamowania proliferacji^[15,20,21]. Proces związany z zatrzymaniem proliferacji komórek jest nazywany komórkową senescencją^[22].

Wolne rodniki a starzenie się skóry

Jak wspomniano wcześniej, głównymi czynnikami przyspieszającymi endogenne starzenie się skóry są oksydacyjne uszkodzenia DNA powodowane przez wolne rodniki (ROS). Teoria wolnorodnikowa została ogłoszona w 1960 r. przez D. Harmana.

Wolne rodniki (główne: tlen singletowy, ozon, anionorodnik ponadtlenko-

wy, nadtlenek wodoru oraz rodniki wodoronadtlenkowe i alkilonadtlenkowe) są produkowane nie tylko w mitochondriach (wyniki wielu badań sugerują, że większość wewnątrzkomórkowego wytwarzania ROS jest pochodną mitochondriów^[23] podczas naturalnych procesów zachodzących w naszym organizmie, ale wiele czynników zewnętrznych (np. promieniowanie wysokoenergetyczne, temperatura, środki przeciwpasożytnicze, benzopireny, nieprawidłowa dieta, papierosy, alkohol, współistniejące choroby narządów wewnętrznych, przebieg infekcji bakteryjnej) może przyspieszać ich powstawanie. Wiadomo na przykład, że zwiększona ilość pożywienia w diecie powoduje nasilenie peroksydacji lipidów i glikozylacji, prowadząc także do powstawania wolnych rodników działających negatywnie nie tylko na błony komórkowe, ale także na materiał genetyczny komórek, nasilając w efekcie proces starzenia^[2,4].

Wolne rodniki odpowiadają za uszkodzenia na poziomie metabolicznym (kwasy tłuszczowe, lipidy, kwasy nukleinowe, aminokwasy, białka) oraz na poziomie komórkowym (uszkodzenia błon komórkowych i utrata ich funkcji, uszkodzenia DNA), co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Wiadomo co prawda, że istnieją systemy ochrony komórek przed działaniem wolnych rodników (katalaza, peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa; glutation, witamina C i E, magnez, selen, cynk, flawonoidy, β -karoteny, retinol i kwas moczowy), jednak działają one coraz mniej sprawnie wraz ze starzeniem się organizmu. Wolne rodniki nie ulegają wówczas procesowi neutralizacji przez antyoksydanty, a w przypadku nadmiernej ich produkcji powstaje stan

nierównowagi metabolicznej – tzw. stres oksydacyjny.

Jak obronić skórę przed wolnymi rodnikami?

Mechanizmy obronne i regeneracyjne skóry można wspomóc, stosując antyoksydanty, które mają zdolność łączenia się z wolnymi rodnikami i uniemożliwiają im reakcję ze strukturami komórkowymi^[24]. Antyoksydanty mogą być przyjmowane doustnie lub stosowane miejscowo. Wiadomo, że do powierzchni skóry dociera mniej niż 1% antyoksydantów przyjmowanych doustnie^[25], stąd w przypadku skóry skuteczniejsze będzie ich miejscowe stosowanie^[26].

Do grupy związków zapobiegających fotostarzeniu się skóry należą m.in. wita-

mina A, C, E, antyoksydanty pochodzenia roślinnego, retinoidy.

Witamina C zapobiega fotostarzeniu się skóry, ma zdolność stymulowania produkcji kolagenu. Jest niezbędnym kofaktorem reakcji enzymatycznych związanych z produkcją tkanki łącznej^[27]. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań wskazują, że miejscowe stosowanie witaminy C warunkuje naprawę tkanki łącznej i w widoczny sposób neutralizuje skutki fotostarzenia się skóry^[28]. Udowodniono również, że witamina C wspomaga system immunologiczny skóry, wykazując bezpośrednie działanie przeciwzapalne oraz pośrednio poprzez hamowanie aktywności czynników odpowiedzialnych za produkcję cytokin przeciwzapalnych. Ponadto witamina C pośredniczy w biosyntezie katecholamin i hormonów nadnerczowych. Wiadomo



również, że wspomaga cykl przemian witaminy E. Wyniki badań przeprowadzonych na grupie kobiet w okresie menopauzy wykazały, że miejscowe stosowanie kwasu L-askorbinowego powoduje wzrost produkcji kolagenu typu I i III. Zaś w innych badaniach zaobserwowano wzrost liczby i aktywności fibroblastów produkujących nowe włókna kolagenu^[27]. Skuteczność działania witaminy C warunkuje jej odpowiednie stężenie, które powinno w stosowanych preparatach wynosić przynajmniej 10%.

Witamina E (termin wspólny dla 8 naturalnie występujących odmian) – antyoksydant rozpuszczalny w tłuszczach, zapewnia ochronę przed wolnorodnikowym uszkodzeniem lipidów błon komórkowych (usuwanie rodników lipidowo-nadtlenkowych). Wykazuje również działanie przeciwzapalne i warunkuje zwiększenie możliwości wiązania wilgoci w skórze^[29]. Wyniki badań naukowych wskazują na fotoprotekcyjne działanie witaminy E w przypadku stosowania miejscowego. Zaobserwowano m.in. ograniczenie objawów ostrej reakcji skórnej o cechach obrzęku, rumienia czy oparzenia słonecznego, jak również eliminowanie przewlekłej reakcji w postaci zmarszczek czy protekcyjne działanie przeciwnowotworowe w przypadku takiego stosowania witaminy E. Natomiast niewiele nadal wiadomo na temat biodostępności w skórze tego antyoksydantu po podaniu doustnym^[30,31]. Głównym źródłem witaminy E są świeże warzywa, oleje roślinne, zboża i orzechy. Znane są także antyoksydanty pochodzenia roślinnego (hamujące działanie tlenu atomowego i aktywnych rodników tlenowych, takich jak aniony nadtlenkowe, rodniki hydroksylowe, rodniki nadtlenkowo-lipidowe i wodoronadtlenki), z których niektóre są wyjątkowo skuteczne w przy-

padku zastosowania u człowieka^[32]. Większość antyoksydantów roślinnych to flawonoidy, karotenoidy i polifenole. Do grupy antyoksydantów pochodzenia roślinnego skutecznych u człowieka należą katechiny występujące w zielonej herbacie, oleuropeina występująca w liściach oliwek, liczne polifenole zawarte w soi, pyknogenol (kora sosny) oraz ekstrakt z pestek winogron. Działanie zapobiegające fotostarzeniu skóry wykazują także: owoc granatu, czarna herbata, jeżówka, awokado i czosnek^[33].

W zapobieganiu i leczeniu zmian związanych z procesem starzenia się skóry zastosowanie znajdują także retinoidy – naturalnie powstające pochodne β -karotenu o najlepiej udokumentowanym działaniu antystarzeniowym. Grupa ta obejmuje retinol, retinal, estry retinylu i kwas retinowy. Odpowiadają za wychwytywanie i stabilizację reaktywnych form tlenu, chroniąc tym samym błony komórkowe przed uszkodzeniem z następowym uszkodzeniem i rozpadem komórek^[34,35]. Retinoidy, a szczególnie kwas retinowy, odpowiadają ponadto za stymulację proliferacji i aktywności fibroblastów w skórze właściwej, czego efektem jest zwiększenie produkcji glikozaminoglikanów, kolagenu typu I, III i VII oraz fibryliny. Działanie takie warunkuje poprawę nawilżenia, wzrost grubości i elastyczności skóry. Wiadomo także, że retinoidy mogą stymulować powstawanie nowych naczyń krwionośnych w skórze, a także hamować aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Udowodniono, że podawanie β -karotenu w dawce 30 mg/dobę przez 10 tyg. Warunkuje m.in. zmniejszenie rumienia po ekspozycji na promieniowanie UV w porównaniu z grupą placebo^[36]. Wiadomo, że wymieniona dawka β -karotenu redukuje ryzyko wystąpienia oparze-

nia słonecznego poprzez zwiększanie zdolności absorpcji promieni słonecznych przez skórę. Pierwszym retinoidem, jaki wykorzystano do leczenia objawów starzenia się skóry była tretinoina (naturalna aktywna forma witaminy A), której miejscowe zastosowanie warunkowało zwiększenie syntezy kolagenu typu I i III oraz pobudzenie elastyny. Efektem takiego działania było wygładzenie zmarszczek, zlikwidowanie szorstkości skóry i poprawa jej kolorytu. Podobne działanie zaobserwowano także w przypadku izotretinoiny, jednak z uwagi na występowanie działań niepożądanych w postaci rumienia i złuszczenia się skóry niemożliwe było jej wykorzystanie. Spośród karotenoidów dużym zainteresowaniem cieszy się likopen - węglowodór nienasycony o budowie podobnej do kauczuku naturalnego. Jest to jeden z najlepszych przeciwutleniaczy, który - w przeciwieństwie do β -karotenu - nie ulega konwersji do retinolu po wchłonięciu w jelicie, a więc nie jest substratem dla cynkozależnej dioksygenazy jak inne karotenoidy. Dużą zawartością likopenu charakteryzują się pomidory i niektóre czerwone owoce (arbuz, czerwony grejpfrut, owoce dzikiej róży). Z uwagi na dobrą rozpuszczalność w tłuszczach jest najlepiej przyswajany przez człowieka np. w postaci przetworzonej przez podgrzanie z oliwą (ketchup, sos pomidorowy itp.). Wyniki badań wskazują, że likopen i β -karoten wykazują działanie synergistyczne w obronie skóry przed promieniowaniem UV i charakteryzują się największym potencjałem antyoksydacyjnym^[37,38].

Czy geny mają znaczenie?

Wiadomo, że wewnątrzpochodny mechanizm starzenia się może być zależ-

ny od określonych genów, natomiast ekspresja tych genów może podlegać modyfikacji także przez czynniki zewnętrzne.

Genetycznie uwarunkowaną cechą charakterystyczną dla ludzi jest tzw. najdłuższy możliwy czas trwania życia (MLS, ang. *maximum life span*), który w przypadku człowieka wynosi około 110-120 lat. Dzięki obserwacjom prowadzonym na zamrożonych przez 30 lat ludzkich fibroblastach odmrażanych partiami ustalono, że komórki te charakteryzuje nie tylko pamięć komórkowa, ale także zakodowany w nich termin końca życia.

Jak już wspomniano, starzenie się to proces pozostający pod złożoną kontrolą m.in. czynników genetycznych i jest związany ze znacznymi zmianami w ekspresji genów. Okazuje się, że proces ten może być modulowany na poziomie molekularnym, ponieważ znane są mutacje pojedynczych genów, które wydłużały długość życia organizmów modelowych. Dotychczas nie wskazano jednego genu, który byłby zaangażowany w mechanizm starzenia się skóry. Ustalono natomiast, że w niektórych przypadkach komórki skóry mogą tracić tzw. „pamięć komórkową”, co wiąże się z upośledzeniem ich funkcjonowania, spowolnieniem wytwarzania włókien podporowych i znacznym osłabieniem zdolności regeneracyjnych naskórka. Zmniejsza się ekspresja genów zaangażowanych w proces proliferacji komórek, co prowadzi do zahamowania wzrostu i regeneracji oraz dominacji procesów zanikowych. Udowodniono także, że w przypadku osób starszych zwiększa się aktywność genów supresorowych hamujących wzrost komórek^[39].

Teoria genowa starzenia się skóry zakłada, że w komórkach jądrzastych skóry regulacji podlega aktywność ge-

aesthetica

nów warunkujących charakter i szybkość procesu starzenia. Udowodniono, że w starzejących się komórkach zmiane ulega stopień acetylacji, fosforylacji i metylacji DNA, wzrasta liczba aberracji chromosomowych i niepodlegających naprawie mutacji genowych. Z kolei takie nagromadzenie mutacji wpływa na ekspresję wielu różnych genów i powoduje obniżenie zdolności DNA do replikacji. Wykazano także, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy długowiecznością a aktywnością systemu odpowiedzialnego za naprawę DNA – okazuje się, że długo żyjące ssaki mają bardziej skuteczny układ enzymów systemów naprawy DNA w porównaniu do krótko żyjących zwierząt.

Jak dotąd znanych jest około 100 różnych genów zaangażowanych w proces starzenia się skóry. Do grupy tej należą geny istotne dla podziałów komórkowych czy też procesów energetycz-

nych komórek, jak również geny związane z komórkową odpowiedzią na stres. Geny te podzielono na trzy grupy:

- 1) geny zaangażowane w odpowiedź organizmu na stres (geny obrony przeciwoksydacyjnej (SOD2); geny mutatorowe (geny naprawy DNA, helikazy DNA), geny supresorowe nowotworów (P53);
- 2) geny związane z energetyką komórki (metabolizm insuliny, regulacja wzrostu);
- 3) geny związane z podziałami komórkowymi (telomeraza).

Znana jest także teoria katastrofy błędów Orgela [<http://longevity-science.org/orgel.html>] uzasadniająca związek pomiędzy zaburzeniami w przekazywaniu informacji genetycznej a procesem starzenia się. Wiadomo, że przepływ informacji genetycznej nie jest w pełni dokładny, co wiąże się z pojawianiem się błędów w strukturze białek enzymatycznych czy



regulatorowych, co w konsekwencji prowadzi do dysfunkcji i śmierci komórek.

Starzenie się jest więc zależne nie tylko od zewnątrzpochodnych mutacji, ale również od hamowania procesów naprawy DNA jądrowego. Uważa się, że kluczową rolę w procesie starzenia się odgrywają prawdopodobnie endogenne uszkodzenia jądrowego DNA. Bezpośrednie dowody mówiące o uszkodzeniu struktury DNA i zaburzeniu mechanizmów naprawczych mających istotne znaczenie w procesie starzenia pochodzą z badań nad takimi jednostkami chorobowymi, jak choroba Hutchinsona-Gilforda (HGP), zespół Wernera czy Cockayne'a^[40,41,42].

Uważa się, że uszkodzenie DNA, zwłaszcza oksydacyjne, stymuluje proces starzenia. Uszkodzenia DNA prowadzić mogą także zaburzeń na poziomie epigenetycznym, które mogą być także istotne dla procesu starzenia się komórek^[3,43].

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują na istnienie związku pomiędzy przedwczesnym starzeniem się w przypadku zespołu Hutchinsona-Gilforda (HGP) czy progerii a normalnym wewnątrzpochodnym procesem starzenia i fotostarzeniem. W przypadku HGP mutacja genu kodującego laminę A – białko otoczki jądrowej powoduje, że powstaje nieprawidłowe białko – progerin, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu jądra komórkowego i tym samym do zaburzeń naprawy DNA^[44]. Białko progerin, jest odpowiedzialne za przyspieszone zmiany w wielu narządach, w tym również zmiany w skórze^[45]. Progerin, jak wykazano, jest także wytwarzany przez normalne komórki osób starszych^[46], co sugeruje, że naruszenie otoczki jądrowej ma związek z normalnym procesem starzenia.

Francuscy naukowcy, badając homeostazę i onkogenezę naskórka i różnego typu czynniki komórkowe zaangażowane w te procesy, zwrócili uwagę na cząsteczkę o nazwie CD98hc, znaną już z interakcji z receptorami uczestniczącymi w procesie starzenia się skóry. Wykazano, że wraz z wiekiem dochodzi do zakłócenia aktywności transportera CD98hc i receptorów integrynowych, jednak jak dotąd nie ustalono mechanizmu odpowiedzialnego za niniejsze zjawisko.

Inną cząsteczką budzącą zainteresowanie w aspekcie procesu starzenia się skóry jest jedna ze składowych proteasomu – PSMD8. Wiadomo bowiem, że nieprawidłowe funkcjonowanie proteasomów jest związane ze starzeniem się skóry u ludzi. Zainteresowanie badaczy dotyczy także białek RING1 (białko z aktywnością ligazy ubikwitynowej E3, której celem jest lizyna 119 histonu H2A^[47] i MOV10 wchodzących w skład kompleksu białek Polycomb, odpowiedzialnego za kontrolowanie długości życia ludzkich fibroblastów^[48]). Istotną rolę w procesie starzenia się skóry przypisuje się także metaloproteinazom macierzy zewnątrzkomórkowej.

Udział metaloproteinaz w starzeniu się skóry

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej uczestniczące w starzeniu zewnątrzpochodnym to enzymy o właściwościach proteolitycznych należące do endopeptydaz i tworzące grupę liczącą 26 enzymów podzielonych na grupy w zależności od substratów, na które działają. Wyróżnia się: kolagenazy (MMP-1, 8 i 13) rozkładające kolagen typu I, II, III, VI i X; żelatynazy (MMP-2 – żelatynaza A oraz MMP-9 – żelatynaza B)

oddziałujące na żelatynę i kolagen typu IV; stromielinazy/stromielizyny (MMP-3, MMP-10 i MMP-11), dla których substratami są kolagen i fibronektyna; matrylizyny (MMP-7 i MMP-26) rozkładające fibronektynę, kolagen IV i fibrynogen; metaloproteinazy typu przezbłonowego (membran – type MMPs – MT-MMPs) – MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 i MMP-25 odpowiedzialne za aktywację innych metaloproteinaz; pozostałe metaloproteinazy – MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-27 i MMP-28.

MMPs degradują składniki macierzy zewnątrzkomórkowej – przede wszystkim kolagen. Zwiększonej aktywności MMPs towarzyszy niszczenie włókien kolagenowych w skórze, co w konsekwencji prowadzi do utraty jej jędrności i powstawanie głębokich zmarszczek. Zniekształceniu ulegają także włókna elastynowe, co prowadzi do elastozy (nagromadzenie się mas elastyny w skórze właściwej), objawiającej się zmianami przerostowymi o charakterze grudek i guzków na skórze. Włókna kolagenowe są niszczone przez MMP-1 i MMP-2, z kolei włókna elastynowe przez MMP-2 i MMP-9.

Dostępne są wyniki badań ekspresji genów kodujących MMPs w komórkach niepoddanych (kontrola) i poddanych działaniu promieniowania UV. W przypadku komórek niepoddanych działaniu promieniowania UV nie wykryto transkryptów MMP-8, MMP-10, MMP-12, MMP-20 i MMP-26, natomiast liczba kopii pozostałych transkryptów MMPs pozostawała na granicy detekcji (około 1000-krotnie niższa od kontroli), zaś ekspresja mRNA dla MMP-14 była około 35 razy wyższa od innych wykrytych MMPs. Spośród 19 MMPs obecnych w ludzkiej skórze ekspresja tylko trzech:

MMP-1, MMP-3 i MMP-9 była znacząco indukowana w odpowiedzi na promieniowanie UV. Ustalono również, że głównym źródłem MMPs w skórze poddanej działaniu promieniowania UV *in vivo* są keratynocyty. Z kolei wyniki badań przeprowadzonych na hodowlach komórkowych oraz modelu ludzkiej skóry (w warunkach *in vitro*) wskazują, że głównym źródłem MMPs syntetyzowanych w odpowiedzi na działanie promieniowania UV są fibroblasty pochodzące ze skóry właściwej. Przyczyna rozbieżności wyników wymienionych badań nie jest jasna. Sugeruje się, że komórki skóry właściwej mogą pośrednio odgrywać istotną rolę w syntezie MMPs w naskórku poprzez uwalnianie czynników wzrostu i cytokin stymulujących wytwarzanie metaloproteinaz w keratynocytach.

Regulacja aktywności MMPs i czynniki wzrostu stosowane w kosmologii

Za hamowanie zwiększonej ekspresji MMPs odpowiadają cztery grupy inhibitorów występujące w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz płynach ustrojowych. Aktywność proteolityczna MMPs może być hamowana dzięki tworzeniu kompleksów pomiędzy ich aktywnymi formami a tkankowymi inhibitorami – TIMPs. Najczęściej występującymi TIMPs w tkankach są TIMP-1 i TIMP-2. Dodatkowo aktywność MMPs może być hamowana przez $\alpha 2$ – makroglobulinę (proteina produkowana w wątrobie). Obok TIMPs znane są inne inhibitory o działaniu zbliżonym do nich – są to substancje pochodzenia naturalnego – np. ekstrakty roślinne (ekstrakt ze skórki owoców liczi, ekstrakt z liści jeżyny czy dyni zwyczajnej). Do grupy tej należą

także peptydy – Tripeptyd-2 (hamuje aktywność elastazy i MMP-1) czy Myristoyl Tetrapeptide-20 (hamuje aktywność MMP-1) oraz Acetyl Hexapeptide-20 (hamuje aktywność MMP-1, MMP-2 i MMP-9). Udowodniono np., że ekstrakt z dyni zwyczajnej zabezpiecza włókna elastyny i kolagenu, hamując w warunkach *in vitro* syntezę katepsyny L i MMP-1 odpowiednio o 86% i 99%. Zmniejsza ponadto aktywność MMP-2 oraz sprzyja prawidłowej organizacji sieci włókien elastycznych i kolagenowych drogą zwiększania syntezy kolagenu typu I oraz pobudzania ekspresji cząsteczek tworzących macierz zewnątrzkomórkową [Silab®. Elastonyl® Anti-striae ctive ingredient preserves the elastic capital of the skin. 2004].

Istotną rolę odgrywają także czynniki wzrostu (substancje o budowie peptydowej) będące mediatorami wielu różnych procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych mających zdolność stymulowania innych komórek do podziałów, wzrostu bądź różnicowania się. Ich pleiotropowe działanie zapewnia im kluczową rolę w procesach immunologicznych oraz podczas naprawy tkanek. Udowodniono, że mogą mieć istotne znaczenie nie tylko we wspomaganie leczenia ran, ale także w profilaktyce starzenia się skóry. Na chwilę obecną w medycynie estetycznej wykorzystuje się dwa rodzaje czynników wzrostu – czynniki wzrostu produkowane przez systemy bakteryjne oraz czynniki wzrostu pozyskiwane z osocza bogatopłytkowego. Do czynników wzrostowych zawartych w produktach do pielęgnacji skóry należy czynnik wzrostu naskórka (EGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF) i płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF).

Telomerowa teoria starzenia

Zgodnie z teorią telomerową starzenie się komórek jest uwarunkowane skracaniem się telomerów, czyli końcowych fragmentów chromosomów eukariotycznych ograniczających liczbę podziałów komórkowych.

Immunologiczna teoria starzenia

Teoria ta zakłada, że podłoże starzenia się organizmu stanowi pogłębiająca się z wiekiem obniżona aktywność układu immunologicznego. U ludzi starszych obserwuje się zaburzenia odpowiedzi immunologicznej zarówno humoralnej, jak i komórkowej. Ponadto mogą pojawiać się białka o zmienionej strukturze, które są traktowane przez organizm jako antygeny. Nasileniu ulegają także reakcje autoimmunologiczne.

Teoria ograniczonej liczby podziałów komórki – teoria Hayflicka

Inną z wymienianych teorii jest teoria ograniczonej liczby podziałów komórkowych, zgodnie z którą komórka może podzielić się określoną liczbą razy. W myśl tej teorii wraz z wiekiem zmniejsza się aktywność telomerazy – enzymu odpowiedzialnego za utrzymywanie stałej długości telomerów, czyli struktur niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania i stabilności materiału genetycznego komórek eukariotycznych. Teoria ta zakłada zatem, że komórki ludzkie dzielą się określoną liczbą razy, a potem umierają. Uważa się, że czynnik dziedziczny jest odpowiedzialny zaledwie w 30% za starzenie się organizmu^[49,50].

Teoria zaburzeń białkowych

Wśród teorii starzenia się wymienia na jest także teoria zaburzeń białkowych, zgodnie z którą starzeniu towarzyszy zmniejszanie syntezy białka, upośledzające prawidłowe funkcjonowanie komórek. Wiadomym jest, że wraz z wiekiem maleje o 20-80% możliwość syntezy białek, co prowadzi do upośledzenia sprawnego funkcjonowania organizmu^[2,39].

Fale radiowe

Jedną z najbardziej efektywnych metod odmładzania skóry jest zastosowanie fal radiowych warunkujących stymulację syntezy kolagenu i elastyny, spłykanie zmarszczek i poprawę owalu twarzy. Dzięki zastosowaniu fal radiowych skóra zyskuje elastyczność, odpowiednią gęstość i blask. Zastosowanie fal radiowych warunkuje nie tylko znoszenie efektów starzenia się skóry (zmarszczki, utrata elastyczności), ale również działa zapobiegawczo drogą odnowy struktury kolagenowej i poprawy krążenia krwi. W trakcie trwania zabiegu z zastosowaniem fal radiowych ich energia jest zamieniana w ciepło, co prowadzi do miejscowego podgrzania tkanki podskórnej do ponad 40°C. Działanie takie zapewnia zwiększenie się ukrwienia i lepsze odżywienie komórek. Fibroblasty zostają tą drogą pobudzone do produkcji kolagenu i elastyny, co z kolei warunkuje jędrność, elastyczność i gładkość skóry. Jak się okazuje, działanie fal radiowych jest także skuteczne w zmniejszaniu woreczków tłuszczowych pod oczami, likwidacji obwisłych policzków, podbródka i szyi. Jest to możliwe dzięki oddziaływaniu fal radiowych na adipocyty (komórki tłuszczowe) i rozpuszczaniu ich.

Teoria błonowa (membranowa)

Z kolei inna z teorii – teoria błonowa zakłada, że z wiekiem dochodzi do zmiany składu błony komórkowej i wzrostu zawartości lipidów (kosztem wody), co utrudnia transport przez błony komórkowe i prowadzi do gromadzenia substancji toksycznych (m.in. lipofuscyny). Ponadto obserwuje się nieodwracalny wzrost lepkości i sztywności błon komórkowych. Uważa się, że istotne znaczenie może mieć także glikoproteina – tzw. „antygen starości” pojawiająca się w błonie komórkowej wraz z wiekiem^[2].

Teoria neuroendokrynną

Znana jest także teoria sieciowania – „cross-linking”. Proces sieciowania polega na zwiększaniu się wraz z wiekiem liczby dodatkowych wiązań poprzecznych w przypadku cząsteczek o długim okresie półtrwania. Za zjawisko to odpowiadają wolne rodniki tlenowe powstające w mitochondriach oraz produkty peroksydacji lipidów. Sieciowanie może dotyczyć zarówno białek, jak i kwasów nukleinowych i wpływa na ich funkcjonalność, zmniejsza elastyczność, upośledza także transport komórkowy i zmniejsza albo hamuje proces replikacji DNA.

Karnozyna w kosmetologii

Ciekawą substancją stosowaną w kosmetologii z uwagi na mały rozmiar cząsteczki jest niewątpliwie L-karnozyna (dipeptyd złożony z beta-alaniny i L-histydyny). Wiadomo, że wykazuje właściwości antyutleniające, przeciwdziała glikozylacji, posiada zdolności buforowania pH, a także może chelatować metale ciężkie (w szczególności jony miedzi). Istotne znaczenie w odniesieniu do przydatności

karnozyny w pielęgnacji skóry ma jej zdolność do zapobiegania glikozylacji białek. Glikozylacja białek polega na nieenzymatycznym tworzeniu połączeń krzyżowych pomiędzy białkami i cukrami (kompleksy białkowe AGE). Efektem glikozylacji jest zwiększenie liczby wiązań krzyżowych pomiędzy cząsteczkami kolagenu, co powoduje zwiększenie sztywności włókien kolagenowych, zmniejszenie ich rozpuszczalności oraz zwiększenie podatności na trawienie enzymatyczne, co utrudnia regenerację włókien kolagenowych. Wykazano, że karnozyna zapobiega tworzeniu się grup karbonylowych, chroniąc tym samym komórki. W przypadku zastosowania wysokiego stężenia karnozyny może nawet mieć miejsce odwracanie aldehydowo-białkowych połączeń krzyżowych i naprawa uszkodzeń. Karnozyna cechuje się zdolnością łączenia ze zdenaturowanymi strukturami AGE i doprowadzaniem do ich rozkładu. Ponadto karnozyna wykazuje właściwości antyoksydacyjne, działając synergistycznie z witaminą E i uczestnicząc w redukcji uszkodzeń DNA komórki, wywołanych stresem oksydacyjnym. Jej antyoksydacyjna aktywność wiąże się także ze zdolnością chelatowania jonów metali. Udowodniono także, że karnozyna może warunkować odmłodzenie komórek zbliżających się do senescencji, poprzez wydłużenie okresu ich życia (o około 10%, jak wynika z przeprowadzonych dotychczas badań) oraz chroni DNA komórki i chromosomy przed stresem oksydacyjnym akumulującym się z wiekiem^[51,52].

Podsumowanie

Różnorodność teorii starzenia się skóry i wielokierunkowość towarzyszących temu procesowi zmian pozwala

założyć, że ich zrozumienie może okazać się pomocne w opracowaniu odpowiednich metod ingerencji, które pozwolą znacznie spowolnić lub nawet zahamować ten proces.

Piśmiennictwo:

1. Beckman K.B., Ames B.N.: The free radical theory of aging matures. *Physio Rev.* 1998; 78:547-81.
2. Gilchrist B.A.: Skin aging 2003: recent advances and current concepts. *Cutis* 2003; 72:5-10.
3. Guinot C., Malvy D., Tenenhaus M. i wsp.: Relative contribution of intrinsic vs extrinsic to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch. Dermatol.* 2002; 138:1454-1460.
4. Yaar M., Gilchrist B.A.: Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clin. Geriatr. Med.* 2001; 17: 617-630.
5. Miller S.A., Hamilton S.L., Wester U.G., Cyr W.H.: An analysis of UVA emissions from sunlamps and the potential importance for melanoma. *Photochem Photobiol* 1998; 68:63-70.
6. Rougier A.: Czy promieniowanie UVA jest niebezpieczne? *Postępy Dermatologii* 1999; XVI: 351-7.
7. Wolska H.: Zewnętrzne środki chroniące przed światłem. *Dermatologia Estetyczna* 1999; 1:20-7.
8. Galus R., Zandecki, Antyszko M., Borowska K., Zabielski S.: Fotostarzenie się skóry. *Pol. Merk. Lek.* XXII, 2007; 580.
9. Dalziel K.: Aspects of cutaneous aging. *Clin Exp Dermatol* 1991; 16:315-23.
10. Chapman HA., Riese RJ., Shi GP.: Emergine roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:63-88.
11. Codriansky K., Quintanilla-Dieck M., Gan S. i wsp.: Intracellular degradation of elastin by cathepsin k in skin fibroblasts - a possible role in photoaging. *Photochem Photobiol* 2009; 85:1356-63.
12. Wallace D.C.: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992; 256:628-32.
13. Ames BN., Shigenaga MK.: Hagen T.M. Mitochondria decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271:161-70.
14. Yang J.H., Lee H.C., Wei Y.H.: Photoaging-associated mitochondria DNA length mutation in human ageing skin. *Arch Dermatol Res* 1995; 287:641-8.
15. Berneburg M., Gattermann N., Stege H. i wsp.: Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondria DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol* 1997; 66:271-5.
16. Sentfleben U., Karin M.: The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med* 2002; 30 (1 Suppl): 18-26.
17. Yamamoto Y., Gaynor R.B.: Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin In-*

- vest 2001; 17:135-42.
18. Fisher GJ., Kang S., Varani J., i wsp.: Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; 138:1462-70.
19. Chung KY., Agarwal A., Uitto J., Mauviel A.: An AP-1 binding sequence is essential for regulation of human alpha2 (I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 1996; 271:3272-8.
20. Stöckl P., Hütter E., Zwierschke W., Jansen-Durr P.: Sustained inhibition of oxidative phosphorylation impairs cell proliferation and induces premature senescence in human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 2006; 41:674-82.
21. Ghadially R., Brown B.E., Sequeira-Martin S.: The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in human and senescent murine model. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:2281-2290.
22. Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M.: Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* 2011; 10:146-52.
23. Chance B., Sies H., Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59:527-605.
24. Cutler RG., Packer L., Bertram J., Mori A.: Oxidative Stress and Aging. *Molecular Biology Updates*, Birkhauser Verlag: Basel, Boston, Berlin: 1995.
25. Thiele J. and Elsner P.: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology. *Curr Probl Dermatol* 2001; 29:157-164.
26. Ichihashi M., Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T.: UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003 Jul; 189(1-2):21-39.
27. Nusgens BV, Humbert P., Rougier A., Colige AC., Haftek M., Lambert CA., Richard A., Creidi P., Lapiere CM.: Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. *J Invest Dermatol.* 2001; 116(6):853-9.
28. Fitzpatrick RE., Rostan EF.: Double-blind, half-face study comparing topical vitamin C and vehicle for rejuvenation of photodamage. *Dermatol Surg.* 2002; 28(3):231-6.
29. Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol.* 2001; 29:26-42.
30. Baschong W., Artmann C., Hueglin D., Roeding J.: Direct evidence for bioconversion of vitamin E acetate into vitamin E: an ex vivo study in viable human skin. *J Cosmet Sci* 2001; 52:155-61.
31. Fuchs J., Groth N., Herrling T.: In vivo measurement of oxidative stress status in human skin. *Methods Enzymol* 2002; 352:333-9.
32. Chiu A, Kimball AB.: Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *Br J Dermatol.* 2003; 149(4):681-91.
33. Draelos ZD., Dover JS.: Kosmeceutyki. Urban & Partner, Wrocław 2005; 29-51.
34. Boelsma E., Hendriks HF., Roza L.: Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:853-64.
35. Rosinska A., Niestrata Z., Cichy W.: Wpływ składników pokarmowych na stan fizykochemiczny skóry. *Przegl Dermatol* 2006; 3: 325-31.
36. Gollnick HP., Hopfenmüller W., Hemmes C. i wsp.: Systemic beta carotene plus topical UV sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *Eur J Dermatol* 1996; 6:200-5.
37. Heinrich U., Wiebusch M., Tronnier H.: Photoprotection from ingested carotenoids. *Cosm Toilet* 1998; 113: 61-70.
38. Heber D., Qing-Yi L.: Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med* 2002; 227: 920-3.
39. Gilhar A., Ullmann Y., Karry R. i wsp. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis. Fas and telomerase. *Br. J. Dermatol.* 2004; 150:56-63.
40. Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H. i wsp.: Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272:258-262.
41. Beauregard S., Gilchrist B.A.: Syndromes of premature aging. *Dermatol. Clin.* 1987; 5:109-111.
42. Troelstra C., van Gool A., de Wit J., Vermeulen W., Bootsma D.: ERCC6, a member of a family of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 1992; 7:939-941.
43. Sinclair D.A., Oberdoerffer P.: The ageing epigenome: Damaged beyond repair? *Ageing Res Rev.* 2009; 8:189-98.
44. Eriksson M., Brown WT., Gordon LB. i wsp.: Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; 423:293-8.
45. Scaffidi P., Misteli T.: Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 2006; 312:1059-63.
46. McClintock D., Ratner D., Lokue M. i wsp.: The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One* 2007 2:e1269.
47. Cao R., Tsukada Y., Zhang Y.: Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 2005; 20:845-854.
48. Itahana K., Zou Y., Itahana Y., Martinez JL., Beausejour C., Jacobs JJ., Van Lohuizen M., Band V., Campisi J., Dimri G.P.: Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(1):389-401.
49. Vaziri H., Benchimol S.: From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA - damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* 1996; 31:295-298.
50. Hadshiew I., Eller M., Gilchrist B.: Age-associated decrease in human DNA repair capacity: implications for the skin. *Age* 1999; 22:45-48.
51. Leibovitz G.: The biochemical powers of carnitine. *Muscular Development* 1989; 26(10):19-20.
52. Parkhouse W., McKenzie D.: Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *Journal Applied Physiology* 1985; 58:14-17.