



Kwas foliowy (Folacyna) w preparatach do pielęgnacji twarzy – ocena działania witaminy na komórki skóry w badaniach in vitro

■ Dr n. farm. Irena Eris ■ Dr n. biol. Renata Dębowska
Centrum Badawcze Dr Irena Eris

Wprowadzenie

Nauki biologiczne od dawna stawiają sobie za cel odkrycie możliwości zapobiegania starzeniu się komórki lub odwracania tego procesu. Kosmetologia, jako jedna z najszybciej rozwijających się dziedzin medycyny, ma do dyspozycji różne substancje aktywne i specjalne metody służące spowolnieniu lub wręcz zahamowaniu pewnych procesów związanych ze starzeniem się skóry.

Od połowy lat dziewięćdziesiątych renesans w kosmetyce przeżywają witaminy. Po wielu latach ulepszeń, prób i badań tak proste witaminy, jak witamina A, E czy C, odnoszą swe sukcesy w kosmetyce.¹⁻⁴ Pojawiły się kosmetyki z całkiem „nowymi” witaminami, np. witaminą K, wykorzystywaną w przypadku różnych problemów związanych z nieprawidłowym krążeniem krwi. Wcześniej jej właściwości przeciwkrwotoczne i zapobiegające zasinieniom wykorzystywano jedynie w medycynie (podawana doustnie lub w iniekcjach w celu przyspieszenia gojenia się wylewów skórnych po urazach i wypadkach, a także po operacjach chirurgicznych i plastycznych). Choć do dzisiaj można usłyszeć wiele głosów wątpiących w skuteczność witaminy K stosowanej w kosmetykach (wchłaniana w minimalnej ilości przez naskórek nie dociera do narządów wewnętrznych, gdzie miałyby się dopiero uaktywniać w wątrobie), to najnowsze doniesienia naukowe, prace kliniczne, a przede wszystkim obserwacje lekarzy i pa-

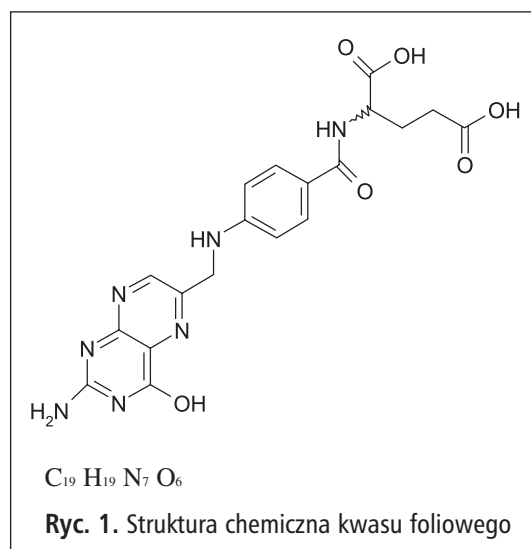
cientów jednoznacznie potwierdzają zaskakująco wysoką efektywność kremów z witaminą K.⁵⁻⁷

Kolejną „nową” witaminą znajdującą swe zastosowanie w kosmetykach jest folacyna czyli kwas foliowy (*acidum folicum*). Jest to witamina z grupy B, określana mianem witaminy Bc, B₉ lub witaminy M, która została wyodrębniona wiele lat temu z liści szpinaku i nazwę swoją wywodzi od powszechnego występowania w zielonych liściach (*folium* – liść).

Kwas foliowy jest pochodną pterydyny, kwasu glutaminowego i p-aminobenzoowego, skąd też nazwa – kwas pteroiłoglutaminowy (ryc. 1). Pterydyny są barwnikami, wywodzącymi się z układu pterydowego, występującymi w pyłku skrzydeł motyli i os. Struktura chemiczna kwasu foliowego została ustalona w 1946 roku przez Augiera. Czynną formą kwasu foliowego jest kwas foliowy – niezbędny do włączania jednowęglowych fragmentów do puryn, pirymidyn i niektórych aminokwasów (działa jako składnik koenzymów transformujących).⁸ Bierze udział w katabolizmie histydyny, spowolnieniu reakcji przekształcania metioniny w homocysteinę oraz regeneracji metioniny przy udziale witaminy B₆ i B₁₂. Kwas foliowy jest niezbędny w procesie tworzenia krwinek czerwonych i odgrywa istotną rolę w tkankach, w których zachodzą liczne podziały ko-

mórkowe (błona śluzowa przewodu pokarmowego, układ krwiotwórczy, tkanki płodu). Determinuje multiplikację szybko dzielących się komórek śluzówki jamy ustnej, dzięki czemu wykorzystywany jest do leczenia zapaleń dziąseł.

Kwas foliowy, podobnie jak większość witamin rozpuszczalnych w wodzie, bierze udział we wszystkich typach odwracalnych reakcji utleniania-redukcji. Uważa się go za koenzym wielu enzymów wymagających do ich uczynnienia obecności składników niebiałkowych. Z udziałem kwasu foliowego powstają substancje neurostymulacyjne – serotonina (działająca kojąco, uspokajająco) oraz noradrenalina odpowiedzialna za aktywność i dynamikę w ciągu dnia. Kwas foliowy to kolejna witamina z grupy B uczestnicząca w syntezie „hormonów szczęścia”.



Najnowsze doniesienia naukowe podają o znaczącej roli kwasu foliowego w zapobieganiu miażdżycy i walce z nowotworami błon śluzowych szyjki macicy, żołądka, jelita grubego.⁹⁻¹⁰ Wyniki badań wskazują, że podwyższony poziom homocysteiny we krwi jest związany z podwyższonym ryzykiem przedwczesnego rozwoju choroby wieńcowej, udaru mózgu, zawału serca, zakrzepów i innych groźnych dla życia chorób układu krążenia, nawet u ludzi z prawidłowym poziomem cholesterolu.¹¹⁻¹² Badania kliniczne wykazały, że kwas foliowy może obniżyć poziom homocysteiny o 25%, a witamina B₁₂ o dalsze 7%. Tym samym zażywanie obydwu witamin powinno obniżyć koszty ponoszone na leczenie osób z chorobami układu krążenia.¹³⁻¹⁵

Na całym świecie kwas foliowy stanowi dodatek do wielu soków owocowych, a także coraz częściej dodaje się go do innych artykułów spożywczych, np. mąki, pieczywa, makaronu. Kwas foliowy jest bardzo wrażliwy na temperaturę, wilgoć, tlen i światło. Nawet w skutek stosowania zwykłych metod obróbki kulinarnej (gotowanie, pasteryzacja, sterylizacja lub przechowywanie warzyw i owoców w temperaturze pokojowej) znaczna zawartość tego kwasu (70%-95%) ulega zniszczeniu.¹⁶

Korzyści z wzbogacenia diety w kwas foliowy są liczne. Zapobiega on pasożytom jelitowym i działaniu substancji trujących zawartych w żywności, wspomaga system immunologiczny, ma działanie krwiotwórcze, wpływa na metabolizm cukrów i aminokwasów, odpowiada za wzrost i likwidację uszkodzeń komórek¹⁷, przeciwdziała uszkodzeniom chromosomów¹⁸, może opóźnić wystąpienie siwizny, u osób osłabionych zwiększa apetyt i witalność, wpływa na zdrowy wygląd skóry. Niektórzy twierdzą, że działa przeciwbólowo.

Przemiany zasad purynowych i pirymidynowych mają duże znaczenie dla prawidłowej czynności układu krwiotwórczego, dlatego też niedobór kwasu foliowego prowadzi do powstania niedokrwistości (makrocytarnej i pokrewnych) oraz powoduje powstawanie zmian neurologicznych (kwas foliowy odgrywa rolę w procesach mielinizacji włókien nerwowych).¹⁹⁻²⁰ Osoby z niedoborem kwasu foliowego

stają się nadpobudliwe i mają trudności z zasypianiem. Kwas foliowy nie powinien być stosowany w leczeniu anemii o nieznanym podłożu, gdyż może maskować objawy anemii złośliwej prowadzącej do uszkodzenia układu nerwowego. Od ponad trzydziestu lat wiadomo już, że niedobory tego składnika w diecie kobiety mogą wpływać na ryzyko urodzenia przez nią dziecka dotkniętego wadą centralnego układu nerwowego.

Niedobór kwasu foliowego powoduje zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych (DNA i RNA), a co za tym idzie zahamowanie wzrostu tkanek i całego organizmu, czemu towarzyszy wypadanie włosów i powstawanie ognisk martwicy w mięśniach. Objawem niedoboru kwasu foliowego jest także osłabienie wchłaniania substancji pokarmowych z przewodu pokarmowego.

Podaje się, że dzienne zapotrzebowanie na kwas foliowy (w zależności m.in. od płci i wieku) wynosi od 300 do 600 mikrogramów. Zapotrzebowanie na kwas foliowy wzrasta w okresie ciąży, po urazach, w trakcie chorób nowotworowych, a także przy długich okresach przyjmowania doustnych środków antykoncepcyjnych. Na brak witaminy B₉ szczególnie narażeni są alkoholicy, osoby z zaburzeniami układu pokarmowego, osoby odżywiające się mało wartościowymi produktami (chrupki, hamburgery), osoby palące i stale odchudzające się, kobiety przyjmujące doustne środki antykoncepcyjne i ciężarne nie uzupełniające poziomu kwasu foliowego dawkami wspomagającymi. Źródłem kwasu foliowego są nie tylko produkty spożywcze (głównie wątroba, świeże, zielone jarzyny i owoce) – jest on także syntetyzowany przez bakterie jelitowe. Z tego też względu trudno dokładnie określić dobowe zapotrzebowanie na kwas foliowy.

Kwas foliowy bierze udział w procesie podziału komórek, czyli w ich odnowie. Posiada więc znaczną możliwość stosowania go w pielęgnacji osobistej i produkcji kosmetyków. Do tej pory kwas foliowy nie był stosowany w kosmetykach. Stwierdzono obecność jego niewielkich ilości tylko w preparatach kosmetycznych na bazie alg. Jako koenzym dla tzw. enzymów naprawczych (ich aktywność zależy od miejscowej dostępności kwasu fo-

liowego) umożliwia szybką naprawę uszkodzonego łańcucha DNA.

W niniejszej pracy oceniono w badaniach *in vitro* wpływ kwasu foliowego na wzrost fibroblastów skóry ludzkiej rosnących w standardowej pożywce oraz w pożywce pozbawionej składników odżywczych (FCS). Podłoże ubogie w składniki odżywcze jest pewną analogią do procesu starzenia się skóry, która z wiekiem jest gorzej odżywiana. Z dostępnych danych wynika, że kwas foliowy odgrywa istotną rolę w tkankach aktywnych podziałowo – może tym samym przejawiać właściwości regenerujące komórki skóry oraz zastępować niedobór składników odżywczych.

W dobie współczesnego rozwoju różnych technologii możliwe stało się zamykanie substancji aktywnych w specjalnych otoczkach, które z jednej strony chronią wrażliwe składniki aktywne przed rozpadem, a z drugiej strony umożliwiają penetrację przez poszczególne warstwy naskórka i stopniowe uwalnianie substancji w skórze. Technologie zamykania substancji aktywnych są bardzo różne – wielkość otoczki może być bardzo różna, także ściany otoczki mogą być zbudowane z różnych substancji. Zależy to w dużej mierze od substancji aktywnej, którą chcemy zamknąć. Badany przez nas kwas foliowy zamknięty jest w otoczkach zbudowanych głównie z kolagenu morskiego, glikoaminoglikanów i polisacharydów. Nie pękają one pod naciskiem palca i nie są widoczne gołym okiem. Uwalnianie zawartych w nich składników odbywa się na zasadzie enzymatycznej degradacji substancji budujących otoczkę. Dzięki strukturze otoczek i ich możliwości przenikania przez warstwy naskórka możemy mieć pewność, że zawarte w nich składniki aktywne działają w odpowiednim miejscu.

Materiał i Metody

In Vitro

Hodowlę fibroblastów uzyskano z wycinka zdrowej skóry, otrzymanego za zgodą pacjenta, podczas zabiegu operacyjnego (np. usunięcia znamienia) lub operacji plastycznej. Linie komórek rosły w atmosferze 5% CO₂, w temp. 37°C w standardowej



pożywce MEM (Eagle'a), (GIBCO), uzupełnionej 20% płodową surowicą cielęcą (FCS), 2 mM glutaminą i antybiotykami (100 jed./ml penicyliny, 0,25 g/ml siarczanu streptomycyny). Badania prowadzono na konfluentnych pasażach od 2 do 9.

Komórki (wysiewane w 10×10^4 /ml) rosły w obecności (próba badana) lub braku (próba kontrolna) kwasu foliowego – KF (stężenia: 0,001%; 0,005%; 0,01%) w pożywce zawierającej 10% FCS lub pozbawionej FCS. Hodowle prowadzono przez 21 dni, pożywkę zmieniano co 7 dni. Żywołność i liczbę komórek określano w kamerze Burkera.²¹

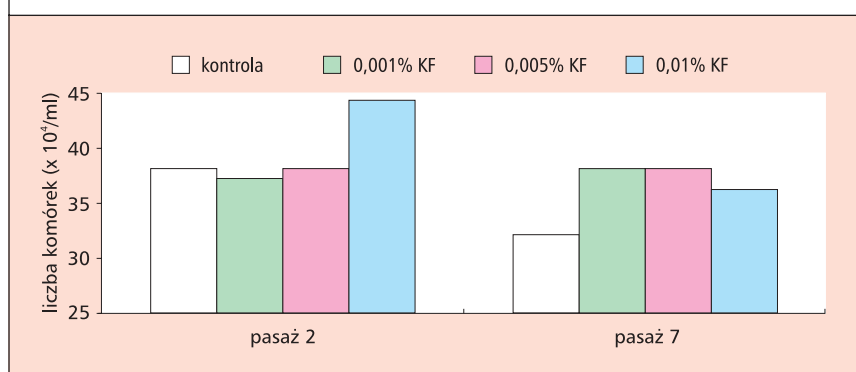
Część fibroblastów hodowano na szkiełkach nakrywkowych pokrytych 1% żelatyną w obecności lub braku 0,01% kwasu foliowego w pożywce uzupełnionej 10% FCS. Po 12 dniach hodowli komórki utrwalone w 4% paraformaldehydzie inkubowano z kompleksem Falloidyna-TRITC (SIGMA) lub z przeciwciałem monoklonalnym anti-wimentyna i z przeciwciałem drugorzędowym anti-mysim-FITC (SIGMA).²²⁻²⁴ Wielkość i kształt komórek analizowano w mikroskopie konfokalnym (LEICA TSC SP2 Spectral & Confocal Microscope).

Wyniki

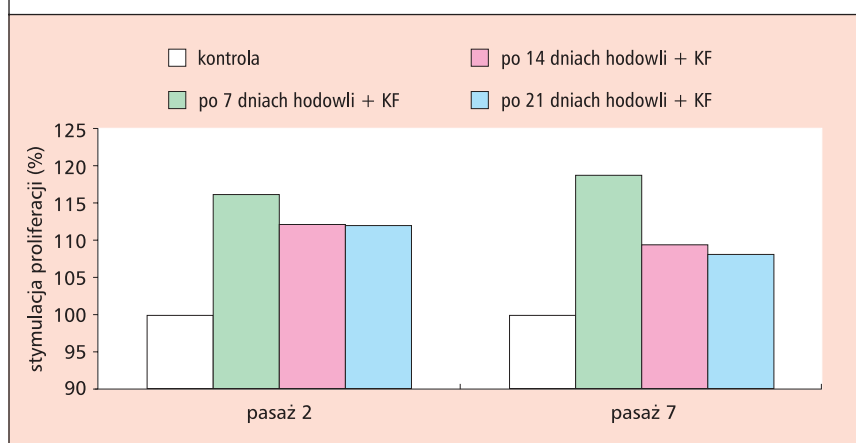
■ Wpływ kwasu foliowego na proliferację fibroblastów

Kwas foliowy wpływał korzystnie na komórki hodowane w obecności składników odżywczych FCS. Liczba fibroblastów w ciągu 7 dni hodowli w pożywce zawierającej 0,01% kwasu foliowego wzrosła w stosunku do kontroli o blisko 16% (pasaż 2) i o 12,5% (pasaż 7), Ryc.2. Komórki w pasażu 7 wykazywały podobne zdolności proliferacyjne w obecności różnych stężeń KF (18-12% stymulacji), natomiast komórki w pasażu 2 dzieliły się intensywnie tylko w obecności 0,01% kwasu foliowego. Wyższe stężenia KF nie miały wpływu na zwiększenie stopnia proliferacji komórek. Zdolności podziałowe fibroblastów w pasażu 2 rosłych w obecności 0,01% KF utrzymywały się przez 21 dni hodowli, natomiast w pasażu 7 intensywność podziałów była najwyższa w pierwszej fazie hodowli (7 dni), Ryc. 3.

Ryc. 2. Proliferacja fibroblastów hodowanych przez 7 dni w pożywce zawierającej 10% FCS w obecności różnych stężeń kwasu foliowego (KF)



Ryc. 3. Proliferacja fibroblastów rosnących w pożywce zawierającej 10% FCS w obecności 0,01% kwasu foliowego



Bardzo wysoką stymulację proliferacji fibroblastów rosnących w obecności kwasu foliowego zaobserwowano w hodowli pozbawionej FCS, Ryc. 4. O ile stymulacja proliferacji komórek w pasażu 2 w obecności różnych stężeń KF była podobna, to w przypadku komórek w pasażu 7 wraz ze wzrostem stężenia KF obserwowano większą intensywność podziałów. Zdolności proliferacyjne komórek rosnących w obecności 0,01% kwasu foliowego utrzymywały się przez 14 dni hodowli, po czym gwałtownie obniżały się, Ryc. 5.

■ Wielkość i kształt komórek poddanych działaniu kwasu foliowego

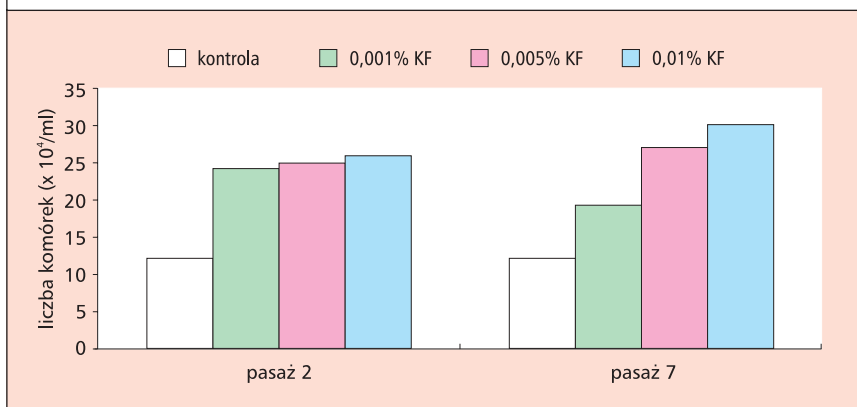
Przeprowadzono obserwacje morfologii komórek nie poddanych i poddanych działaniu kwasu foliowego. W tym celu przeprowadzono lokalizację dwóch rodzajów filamentów

tworzących cytoszkielet komórki: mikrofilamentów aktynowych i filamentów pośrednich wimentynowych.

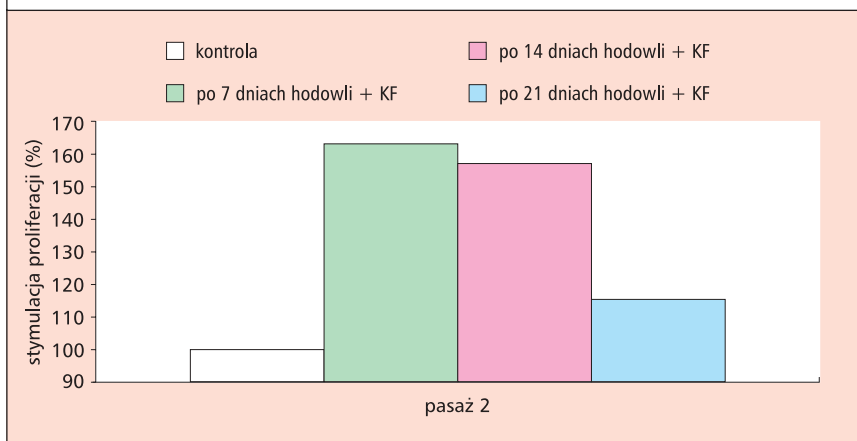
Mikrofilamenty aktynowe są najcieńszym elementem cytoszkieletu komórki, mają średnicę ok. 6 nm; powstają na skutek polimeryzacji globularnego białka aktyny. Są obecne we wszystkich typach komórek zwierzęcych tworząc sieć włókienek naprężeniowych zakotwiczone w błonie komórkowej poprzez złożone kompleksy białkowe zwane płytkami przylegania. Włókienka te odpowiadają nie tylko za transport organelli i pęcherzyków na terenie komórki, ale także za procesy egzocytozy, endocytozy, tworzenie filopodiów i migrację komórek.²⁵⁻²⁶

Filamenty pośrednie wimentynowe o średnicy ok. 8-10 nm utworzone przez białko wimentynę (54 kDa) są charakterystyczne dla komórek pochodzenia mezenchymatycznego (fibroblastów, leukocytów, komórek en-

Ryc. 4. Proliferaacja fibroblastów hodowanych przez 7 dni w pożywce nie zawierającej FCS w obecności różnych stężeń kwasu foliowego (KF)



Ryc. 5. Proliferaacja fibroblastów rosnących w pożywce nie zawierającej FCS w obecności 0,01% kwasu foliowego



dotelium). Filamenty pośrednie warunkują utrzymanie trójwymiarowej struktury komórki, odpowiadają za zakotwiczenie cytoszkieletu w błonie komórkowej oraz zachowanie prawidłowej pozycji jądra komórkowego i pozostałych organelli.²⁵⁻²⁶

Lokalizacja mikrofilamentów aktywnych

We wszystkich preparatach widoczne były liczne grube włókna naprężeniowe przebiegające wzdłuż komórki. W wielu miejscach zauważono płytki przylegania – kompleksy białkowe kotwiczące filamenty aktywne do błony komórkowej. Przebieg włókien naprężeniowych pozwolił na obserwację kształtu komórek. Komórki nie poddane działaniu kwasu foliowego (kontrola) były szerokie, gęsto łączące

się ze sobą licznymi wypustkami. Kształt wskazuje na komórki stacjonarne z dużym obszarem cytoplazmy (tab. I). Są to prawdopodobnie fibrocyty.

Komórki poddane działaniu 0,01% kwasu foliowego były liczne, niewielkie o małej objętości cytoplazmy, wrzecionowatego kształtu, wąskie, często leżące bardzo blisko siebie, zwrócone do siebie bokami – prawdopodobnie bezpośrednio po zakończeniu podziału mitotycznego (tab. I). Niewielki rozmiar komórek wskazuje, że są to komórki intensywnie dzielące się.

Lokalizacja wimentyny

Filamenty wimentynowe tworzyły gęstą sieć wypełniającą całą cytoplazmę komórek. Często obserwowano siateczkę otaczającą jądro komórkowe. Filamenty wimentynowe two-

rzy również cytoszkielet wypustek, którymi komórki w wielu miejscach łączyły się ze sobą.

Zauważono, że komórki nie poddane działaniu kwasu foliowego (kontrola) miały typowo gwiaździsty kształt z szerokim obszarem cytoplazmy, w większości widoczne było pojedyncze jądro komórkowe. Obserwowano głównie komórki nie dzielące się, wytwarzające do podłoża inhibitory kontaktowe, gigantyczne i jednojądrowe – prawdopodobnie na skutek degeneracji (tab. II).

Natomiast komórki rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego były liczne i bardzo regularne w kształcie (okrągłe), co wskazuje, że wiele z nich zakończyło podział mitotyczny (tab. II). Często obserwowano fibroblasty w trakcie podziałów: po kariokinezie i po cytokinezie (tab. III). Po zakończeniu podziału widoczne były komórki oddalone od siebie. Po podziale fibroblasty hodowane w obecności kwasu foliowego przyjmowały typowo wrzecionowaty kształt, często leżały obok siebie w szeregach (tab. II).

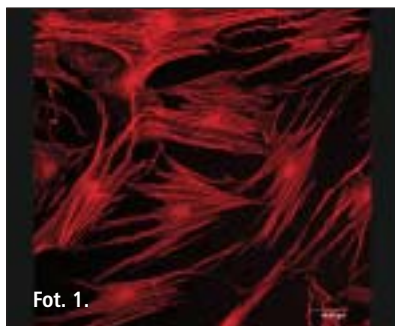
Omówienie wyników

Kwas foliowy w zakresie stężenia 0,001-0,01% stymulował podziały fibroblastów w pasażu 2 i w pasażu 7, rosnących zarówno w korzystnych warunkach hodowlanych, jak i w niedobrze składników odżywczych. Można go więc uznać za czynnik ułatwiający regenerację komórek skóry, szczególnie tych źle odżywianych. Komórki „młodsze” w pasażu 2 rosnące w pożywce pozbawionej substancji odżywczych, prawdopodobnie na skutek większej liczby aktywnych receptorów i większej łatwości przekazywania sygnałów, reagowały zwiększeniem stopnia proliferacji już na bardzo niskie stężenia kwasu foliowego (0,001%) i zdolności te utrzymywały dłużej niż komórki w pasażu 7 (“starsze”). Fibroblasty w pasażu 7, hodowane w pożywce ubogiej w składniki odżywcze, potrzebowały większej ilości kwasu foliowego do uzyskania maksymalnej zdolności proliferacyjnej.

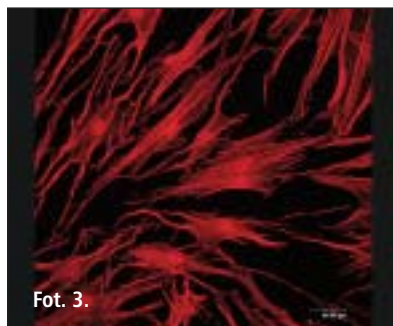
Intensywność podziałów komórek w pasażu 7 hodowanych w obecności składników odżywczych była mniejsza w porównaniu do komórek



Tablica I.



Fot. 1.

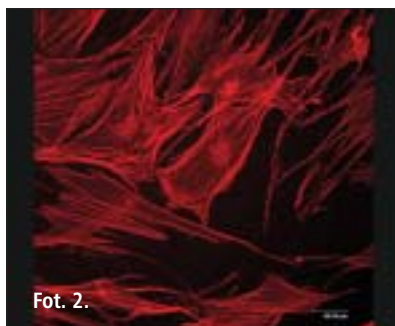


Fot. 3.



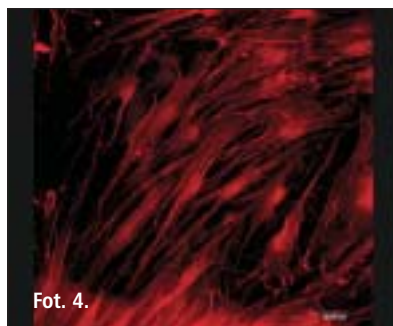
Fot. 5.

Fot. 1, 3, 5. Fibroblasty nie poddane działaniu kwasu foliowego (komórki stacjonarne, z obszerną cytoplazmą, prawdopodobnie fibrocyty). Pow. x 40



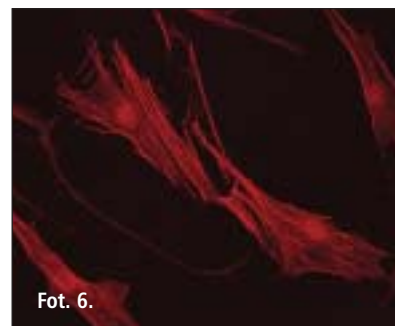
Fot. 2.

Fot. 2. Komórki rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (fibroblasty w trakcie podziału – kariokineza). Pow. x 40



Fot. 4.

Fot. 4. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (liczne, wrzecionowate, wąskie, leżące blisko siebie). Pow. x 40



Fot. 6.

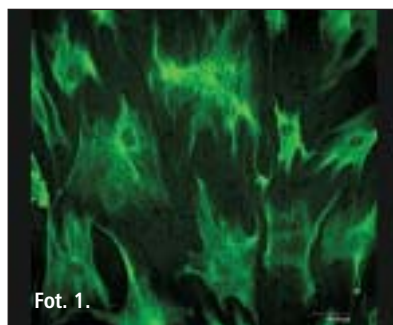
Fot. 6. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (komórki po zakończonym podziale mitotycznym). Pow. x 54

w pasażu 2, co było związane z utratą przez nie zdolności proliferacyjnych w trakcie hodowli.

Obserwacje mikroskopowe potwierdziły korzystny wpływ kwasu foliowego na wzrost i kondycję fibroblastów. Komórki hodowane w obecności KF były liczne, drobne, intensywnie dzielące się, z małym obszarem cytoplazmy. Po zakończeniu podziału leżały blisko siebie w szeregach przybierając typowo wrzecionowaty kształt. Natomiast komórki kontrolne hodowane w standardowej pożywce nie zawierającej kwasu foliowego były duże, z obszerną cytoplazmą, sporadycznie obserwowano podziały mitotyczne. Większość z nich to prawdopodobnie fibrocyty – komórki stacjonarne, nie dzielące się. Część widocznych olbrzymich i jednojądrowych komórek to fibroblasty degenerujące.

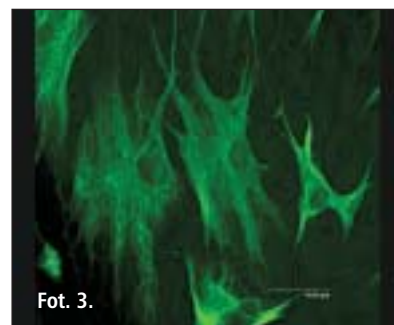
Wyniki badań *in vitro* są cennym narzędziem w produkcji skutecznych preparatów kosmetycznych. Właściwie każda z „odmłodzonych” witamin, w kosmetykach końca wieku znalazła się dzięki nowoczesnym badaniom ich wpływu na skórę ludzką. Badania takie umożliwiają też poznanie mecha-

Tablica II.

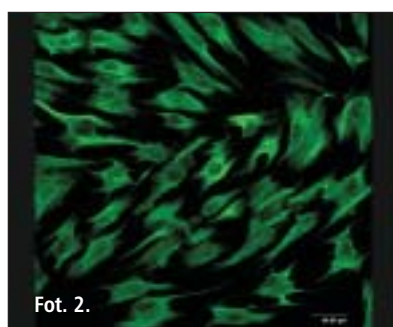


Fot. 1.

Fot. 1, 3. Fibroblasty nie poddane działaniu kwasu foliowego (komórki gigantyczne, jednojądrowe, z dużym obszarem cytoplazmy). Pow. x 40, x 66

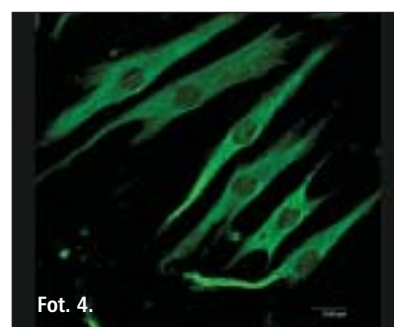


Fot. 3.



Fot. 2.

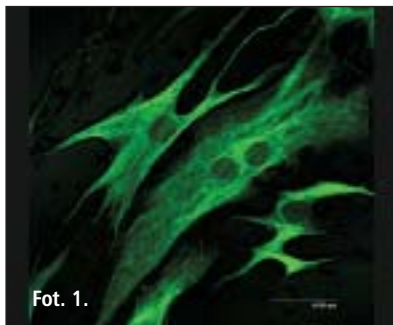
Fot. 2. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (liczne, okrągłe, intensywnie dzielące się). Pow. x 40



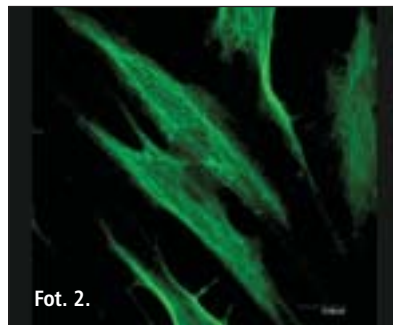
Fot. 4.

Fot. 4. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (komórki drobne, wrzecionowatego kształtu, leżące blisko siebie w szeregach, po podziale mitotycznym). Pow. x 93

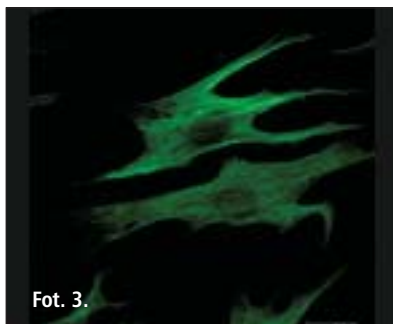
Tablica III.



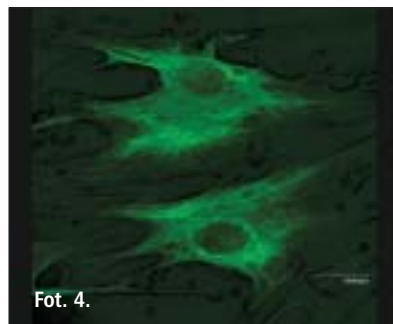
Fot. 1. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (komórki po kariokinezie). Pow. x 74



Fot. 2. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (komórki po kario- i cytokinezie). Pow. x 40



Fot. 3, 4. Fibroblasty rosnące w obecności 0,01% kwasu foliowego (komórki po zakończonym podziale mitotycznym). Pow. x 115



nizmów działania i wykorzystanie nowych substancji nie stosowanych dotąd w kosmetologii (np. kwas foliowy). Po uzyskaniu obiecujących wyników wpływu kwasu foliowego na komórki skóry ludzkiej można było przystąpić do opracowania receptury preparatu kosmetycznego i sprawdzenia skuteczności jego działania metodą *in vivo*. Przy efektywnej współpracy medycyny i dermatologii z kosmetologią stosowane obecnie w kosmetykach witaminy mogą i działają zupełnie inaczej niż ich witaminowi poprzednicy sprzed lat.

Centrum Badawcze Dr Irena Eris istnieje od 2001 roku. Przeprowadza się w nim wielokierunkowe badania i doświadczenia w zakresie kosmetologii, prowadzone pod kierunkiem lekarzy dermatologów, alergologów, biologów i biologów molekularnych.

Adres do korespondencji:
Centrum Badawcze Dr Irena Eris, ul. Puławska 107 A, 02-595 Warszawa, e-mail: renata.debowska@eris.pl

Piśmiennictwo

- Shapiro SS, Saliou C. Role of vitamins in skin care. *Nutrition* 2001; 17: 839-844.
- Peus D, Meves A, Pott M, Beyerle A, Pittelkow MR. Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30: 425-432.
- Offord E i wsp. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32: 1293-1303.
- Trivedi JS, Krill SL, Fort JJ. Vitamin E as a human skin penetration enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995; 3: 241-243.
- Zamecki S, Noszczyk M, Eris I. Ocena kliniczna skuteczności miejscowego stosowania witaminy K w przypadkach wylewów podskórnych. *Polish Journal of Cosmetology* 2000; 2: 121-125.
- Lou WW, Quintana AT, Geronemus RG, Grossman MC. Effects of topical vitamin K and retinol on laser-induced purpura on non-lesional skin. *Dermatol Surg* 1999; 25: 942-944.
- Elson ML, Nacht S. Treatment of periorbital hyperpigmentation with topical vitamin K / vitamin A. *Cosmetic Dermatology* 1999; 32-34.
- Krupińska J, Jańca W. *Farmakodynamika*. PZWI. Warszawa 1990; wyd. II.
- Lashner BA, Provencher KS, Seidner DL, et al. The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 112: 29-32.
- Kato I, Dnistrian AM, Schwartz M, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *Br J Cancer* 1999; 79: 1917-21.
- Genest JJ Jr, McNamara JR, Salem DN. Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 1114-9.
- Coull BM, Malinow MR, Beamer N. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 1990; 21: 572-6.
- Ubbink JB, Vermaak WJH, van der Merwe A, Becker PJ. Vitamin B12, vitamin B6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53.
- Dierkes J, Kroesen M, Pietrzik K. Folic acid and vitamin B6 supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68: 98-103.
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, i wsp.. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999; 340: 1449-14454.
- Hoffmann- La Roche. *Vitamins Basics*. 1994.
- Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG: Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997 Jan; 65(1): 46-52.
- Blount BC, Mack MM, Wehr CM: Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3290-5.
- Kruman I i wsp. Folic Acid Deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2002; 22: 1752-1762.
- Ramaekers VT, Reul J, Kusenbach G. Central pontine myelinolysis associated with acquired folate depletion. *Neuropediatrics* 1997; 28: 126-30.
- Carini M, Aldini G, Piccone M, facino RM. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *IL Farmaco* 2000; 55: 526-534.
- Safiejko-Mroccka B, Bell P. Reorganization of the actin cytoskeleton in the protruding lamellae of human fibroblasts. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2001; 50: 13-32.
- Pixley SK, Kobayashi Y, de Vellis J. A monoclonal antibody against vimentin: characterization. *Brain Research* 1984; 317: 185-199.
- Su YX. Isolation, purification and antibody preparation of vimentin. *Chinese Journal of Pathology* 1989; 18: 3-30.
- Alberts B, Bray D, Johnson A i wsp. *Podstawy biologii komórki*. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 1999.
- Kłyszajko-Stefanowicz L. *Biochemia niektórych struktur komórkowych*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2002.