

Katarzyna Miranowicz-Dzierżawska
Jolanta Skowroń
Lidia Zapór
Lilianna Marciniak

Numer projektu **I.N.13**

Tytuł projektu: Ocena *in vitro* poziomu programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) w starzejących się komórkach pod wpływem wybranych substancji chemicznych o działaniu konserwującym stosowanych w przemyśle.

**MATERIAŁY INFORMACYJNE
NA TEMAT
ODDZIAŁYWANIA BADANYCH SUBSTANCJI KONSERWUJĄCYCH
DODAWANYCH DO KOSMETYKÓW I/LUB LEKÓW
NA STARZEJĄCE SIĘ KOMÓRKI ORGANIZMU**

W ramach projektu I.N.13 realizowanego w CIOP-PIB w latach 2017-2019 oceniono działanie cytotoksyczne oraz wpływ wybranych substancji chemicznych o działaniu konserwującym stosowanych w przemyśle kosmetycznym i/lub farmaceutycznym na proces programowanej śmierci komórkowej (apoptozy) w starzejących się ludzkich fibroblastach.

Co to jest apoptoza i czym grozi zaburzenie jej fizjologicznego przebiegu?

Apoptozę – określaną również jako śmierć programowana, samobójcza czy altruistyczna – uznaje się za aktywny proces współodpowiedzialny za precyzyjną kontrolę liczby i rodzaju komórek na równi z proliferacją, różnicowaniem i dojrzewaniem. Sprawność funkcjonowania m.in. przewodu pokarmowego, skóry czy układu odpornościowego człowieka zależy od prawidłowo przebiegającej apoptozy i zastępowaniu „zużytych” komórek nowymi. Ocenia się, że w każdej sekundzie w organizmie ludzkim powstaje około 100 000 komórek i tyleż samo umiera na drodze apoptozy (Kłyszewko-Stefanowicz, 2015).

Zachwianie równowagi pomiędzy procesami tworzenia i umierania komórek powoduje patologiczne zmiany w organizmie. I tak, przewaga podziałów nad śmiercią komórek związana jest z transformacją nowotworową.

Natomiast nadumieralność komórek jest zjawiskiem występującym w chorobach neurodegeneracyjnych i AIDS (Radziszewska i wsp., 1999).

Morfologiczne objawy apoptozy to obkurczanie się komórki, co powoduje utratę kontaktu z komórkami sąsiednimi, gęstnienie cytozolu oraz charakterystyczne formowanie przez błonę komórkową i błonę jądrową uwypukleń odrywających się od komórki i zwanych ciałkami apoptotycznymi. Biochemia procesu apoptozy wiąże się z pobudzeniem pewnych receptorów (rodzina receptorów TNF), z aktywowaniem jednych białek (np. kaspaz, białek adaptorowych, białek z rodziny bcl-2), a niszczeniem innych białek komórki (np. miozyny, aktyny, α -fodryny) oraz z ostateczną degradacją DNA przez nukleazy (Hordyjewska i Pasternak, 2005).

Jak wyglądały początki badań apoptozy?

Zainteresowanie śmiercią komórek pasjonowało badaczy od dziesiątków lat. Już w 1858 r. Rudolf Virchow zasugerował rolę śmierci komórek w rozwoju ognisk kaszowatych w naczyniach krwionośnych (ang. *atheromas*), a znaczny poziom towarzyszących procesowi zmian opisał jako degenerację, zamieranie, osłabienie i nekrozę. Natomiast pierwsze obserwacje apoptozy można przypisać Walterowi Flemmingowi, który w 1885 r. opisał postępującą degradację i znikanie jąder komórkowych w nabłonku wyścielającym zanikowe pęcherzyki jajnikowe. Badacz ten obserwował kondensację chromatyny i tworzenie tzw. „półksiężyców”, nazywając to zjawisko „chromatolizą”. Proces chromatolizy badał następnie Gräper, który amitozę traktował jako mechanizm

przeciwdziałający śmierci komórek. Na początku XX w, właśnie Gräper postulował, że fizjologiczne usuwanie komórek odbywa się poprzez chromatolizę, po której dochodzi do pochłaniania komórek przez sąsiadujące funkcjonalne komórki. Wyniki doświadczeń Glücksmanna i wsp. zwróciły uwagę na znaczenie śmierci komórek w embriologii, podkreślając, że występuje ona na specyficznych etapach rozwoju organizmu. Obserwowane formy śmierci komórek znalazły potwierdzenie morfologiczne dopiero w połowie lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia. Wtedy australijski badacz John F. Kerr wykazał, że indukcja niedokrwienia wątroby szczura w wyniku podwiązania żyły wrotnej wywoływała obkurczenie parenchymy narządu, w którym szczególnie hepatocyty

ulegały przekształceniu w małe, owalne ciała z cytoplazmą i śladową ilością piknotycznej chromatyny. Jako pierwszy zaobserwował on, że wokół tak zmienionych komórek nie występowały zmiany zapalne, typowe dla komórek nekrotycznych. Za pomocą kwaśniej fosfatazy, znacznika lizosomów, ujawniono rozrywanie komórek nekrotycznych, podczas gdy hepatocyty w niedokrwionej wątrobie miały nienaruszone lizosomy zawierające ten enzym. Ponadto, również jako pierwszy opisał on tworzenie się w umierających komórkach uwypukleń błony komórkowej i jądrowej, otaczających morfologicznie zmienione w niewielkim stopniu organelle komórkowe i

chromatynę oraz ich odrywanie się w postaci pęcherzyków, zwanych obecnie ciałkami apoptotycznymi. Taką śmierć autor opisał terminem „*shrinkage necrosis*”. Dla tej formy śmierci cytowany badacz australijski oraz naukowcy szkoccy, Andrew H. Wyllie i Alastair R. Currie, zaproponowali w 1972 r. nazwę „apoptoza”, od słowa greckiego „*apoptosis*”, oznaczającego opadanie liści czy płatków kwiatowych. Wspomniani autorzy podkreślili, że apoptoza komórek występuje podczas rozwoju wielokomórkowego organizmu, przebiega w komórkach dojrzałych organizmów i zachodzi przez całe życie (Kłyszczko-Stefanowicz, 2015).

Jak substancje konserwujące wpływają na apoptozę?

Istnieje szereg doniesień, że działanie proapoptotyczne wykazują także środki konserwujące, bez których wręcz niemożliwe wydaje się obecnie zapewnienie wymaganej czystości mikrobiologicznej przeważającej większości kosmetyków, ale także np. kropli do oczu czy wielu środków spożywczych.

W badaniach Dubey i wsp. (2017) stwierdzono, że metyloparaben (MePB) - będący jednym z obiektów badań w ramach niniejszego projektu - wykazywał zależne od dawki działanie cytotoksyczne na komórki HaCaT w testach MTT i NRU. W doświadczeniu, w którym komórki poddane działaniu MePB (25 µg/ml) ekspozycje na promieniowanie UVB (1,08 J/cm²) zaobserwowano fragmentację jąder, translokację fosfatydyloseryny, uszkodzenie DNA na poziomie 30% oceniane w teście kometowym oraz tworzenie się mikrojąder. Ponadto, stwierdzono także, że w badanym procesie apoptozy biorą udział mitochondria (poprzez regulację Bax, Apaf-1, cytochromu C i kaspazy-3), a zastosowanie wybiórczego inhibitora kaspazy Z-VAD-FMK pozwoliło również na stwierdzenie udziału kaskady kaspaz w procesie apoptozy. Uzyskane wyniki wskazują, że MePB wykazuje właściwości światłoczułe oraz powoduje uszkodzenia DNA i apoptozę (zarówno poprzez szlak mitochondrialny, jak i stres retikulum endoplazmatycznego (stres ER) (ang. *endoplasmic reticulum stress*). Ten drugi jest często pomijany, a równie ważnym mechanizmem wywołującym apoptozę, gdyż w

reakcji na ten stres, jako mechanizm samoobrony, komórka uruchamia system odpowiedzi na obecność niesfałdowanych białek (UPR) (ang. *unfolded protein response*) (Nogalska, 2015). Jego zadaniem jest zapobieganie dalszemu gromadzeniu się nieprawidłowo sfałdowanych białek w retikulum endoplazmatycznym, a w razie niepowodzenia doprowadzenie do apoptozy komórki (Mori, 2000; Roussel i wsp., 2013; Zhang and Kaufman, 2008). Herp, białko retikulum endoplazmatycznego indukowane homocysteiną (ang. *homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein*), zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego, pod wpływem stresu ER ulega najintensywniejszej ekspresji ze wszystkich białek odpowiedzi na nieprawidłowo złożone białka (Kokame i wsp., 2000; Yamamoto i wsp., 2004). Odgrywa ono istotną rolę w degradacji białek związanych z ER (ang. *ER-associated degradation, ERAD*), utrzymaniu homeostazy wapniowej i regulacji apoptozy (Chan i wsp., 2004; Hori i wsp., 2004; Yamamoto i wsp., 2004).

Szeląg i wsp. (2016) stwierdzili wpływ propyloparabenu (drugi z badanych w ramach niniejszego projektu konserwantów) w stężeniach 0,4 ng/ml, 2,3 ng/ml i 4,6 ng/ml na metabolizm energetyczny hepatocytów HepG2 i zależną od dawki parabenu intensywność apoptozy w komórkach. Propyloparaben może być toksyczny dla komórek wątroby ze względu na zwiększoną produkcję anionów nadtlennokowych, co może prowadzić do

zmniejszenia poziomu dysmutazy ponadtlenkowej *in vivo* i zaburzenia mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu. Dalsze obniżenie potencjału błony mitochondrialnej i rozprzęgnięcie łańcucha oddechowego wskutek obniżania stężenia ATP i w wyniku uszkodzenia mitochondriów może prowadzić do apoptotycznej śmierci komórek.

Warto zauważyć, że oba parabeny badane w ramach niniejszego projektu (metyloparaben oraz propyloparaben) były wykrywane w moczu u ludzi w stężeniach odpowiednio 43,9 i 9,05 ng/ml (Ye i wsp., 2006).

Carvalho i wsp. (2012) stwierdzili, że propyloparaben charakteryzował się silniejszym działaniem cytotoksycznym dla wczesnych pasaży (nr 4 ÷ 6) ludzkich fibroblastów skórnych (HDF) niż paraben metyloowy oraz fenoksyetanol (trzeci badany w niniejszym projekcie związek) - IC_{50} dla parabenu propyloowego w teście NRU wyznaczono na poziomie 0,25%, podczas gdy dla parabenu metyloowego wartość ta wynosiła 2,35%, natomiast dla fenoksyetanolu 1,09%. Przy stężeniu badanych konserwantów wynoszącym 1% stwierdzono także wysokie wartości apoptozy (bliskie 95%) dla fenoksyetanolu, parabenu metyloowego i propyloowego (w niższych stężeniach: 0,1; 0,01 i 0,001% wartość ta ulegała znacznemu obniżeniu).

Zang i wsp. (2017) obserwowali statystycznie istotne zmiany przeżywalności komórek nabłonka spojówkowego po narażeniu na chlorek benzalkonium (BAC) (czwarty z badanych w niniejszej pracy konserwantów) w stężeniach 0,0005 ÷ 0,001% przez 30 min. Obserwowano również uszkodzenia DNA, co wiązano ze stresem oksydacyjnym i wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), choć dyskusyjne wydaje się, że chlorek benzalkonium w stężeniu 0,001% generował mniej ROS niż w stężeniu 0,0005%.

Zanotowano również obniżenie potencjału błony mitochondrialnej i apoptozę komórek.

Wyniki testu TUNEL (badanie fragmentacji DNA *in situ*) przeprowadzonego przez Ulker i wsp. (2013) wykazywały również, że chlorek benzalkonium (BAC) w dawce 10, 25 i 50 µg/ml powodował znaczne uszkodzenie DNA.

Chlorek benzalkonium w stężeniach wyższych niż 0,0001% powodował nekrotyczną śmierć komórek linii Jurkat (ludzkie komórki nowotworowe z linii limfoblastycznej chłoniaka T komórkowego), podczas gdy w stężeniu 0,00001 ÷ 0,0001% (0,28 ÷ 2,8 µM) wywoływał niewielkiego stopnia apoptozę. Mediana apoptozy komórkowej po 48 godzinach narażenia znacząco wzrastała z 8,3% w grupie kontrolnej do 17% w grupie eksponowanej na chlorek benzalkonium w stężeniu 0,0001% (2,8 µM). BAC w stężeniu niższym niż 0,00001% nie powodował śmierci komórek żadnego typu (Pozarowska i Pozarowski, 2011).

Wielu badaczy (Adams i wsp., 1996; Nicosia i wsp., 1995; Usami i wsp., 1997) uważa, że apoptoza związana z wiekiem odgrywa istotną rolę w procesie starzenia się tkanek.

Wagner i wsp. (2001) w badaniach nad procesem apoptozy zaobserwowali, że starzejące się komórki śródbłonka pępowiny (HUVEC) wykazują z wiekiem znaczny wzrost poziomu spontanicznej apoptozy, podczas gdy diploidalne fibroblasty izolowane z napletka noworodka były bardziej odporne na apoptozę związaną ze starzeniem, chociaż występowały znaczące różnice fragmentacji DNA w komórkach młodych (23 PDL) i starych (56 PDL) (zawartość frakcji sub-G1 wzrastała z 0,5% przy 23 PDL do 3,7 w 56 PDL).

Badania Yeo i wsp. (2000) wykazały również, że fragmentacja DNA w hodowanych ludzkich fibroblastach wzrasta do około 3% w miarę seryjnego pasażowania. Dlatego wydaje się, że część normalnych ludzkich fibroblastów ulega *in vitro* apoptozie z wiekiem.

Jakie badania wykonano w ramach projektu?

Badania wykonano na dwóch starzejących się liniach komórkowych zakupionych w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych: linii diploidalnych fibroblastów płucnych CCD-8Lu (ATCC[®] CCL-201[™]) oraz linii diploidalnych fibroblastów skórnych CCD-1136Sk (ATCC[®] CRL-2697[™]).

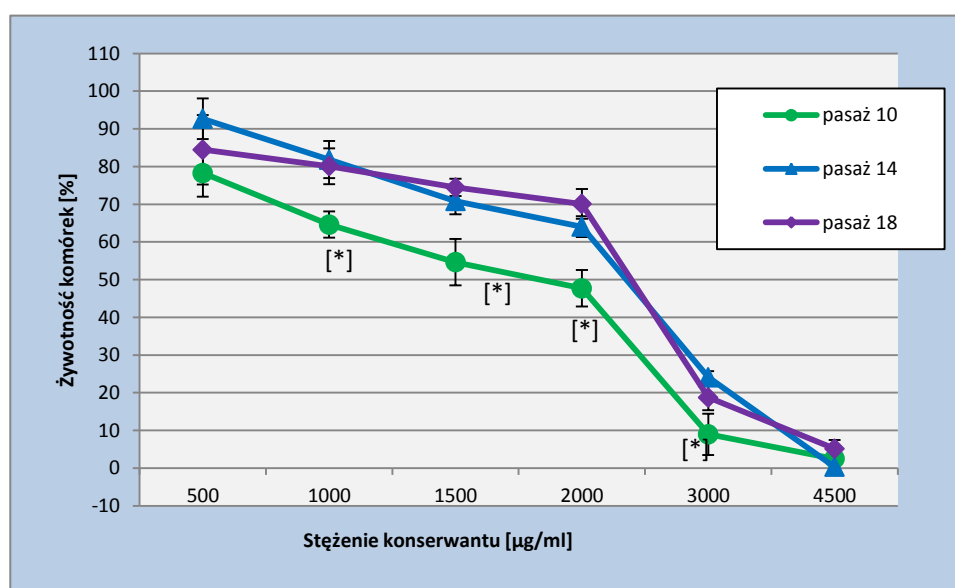
Komórki narażano na: chlorek benzalkoniowy (BAC) (CAS 63449-41-2), 2-fenoksyetanol (FenEtOH) (CAS 122-99-6) oraz dwa estry kwasu p-hydroksybenzoesowego: metyloparaben (MePB) (CAS 99-76-3) i propyloparaben (PrPB) (CAS 94-13-3).

Ocenę cytotoksycznego działania badanych związków przeprowadzono na podstawie testu redukcji bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu w mitochondriach, który określa aktywność metaboliczną komórek (test MTT) oraz testu pochłaniania czerwieni obojętnej oceniającego integralność błon komórkowych (test NRU). Na ich podstawie porównano wartości IC_{50} wyznaczone przy użyciu czytnika mikroplitek SYNERGY 2 dla każdej z badanych substancji i określono przebieg krzywych zależności żywotności komórek od stężenia konserwantu dla kolejnych pasażi diploidalnych fibroblastów skórnych oraz płucnych.

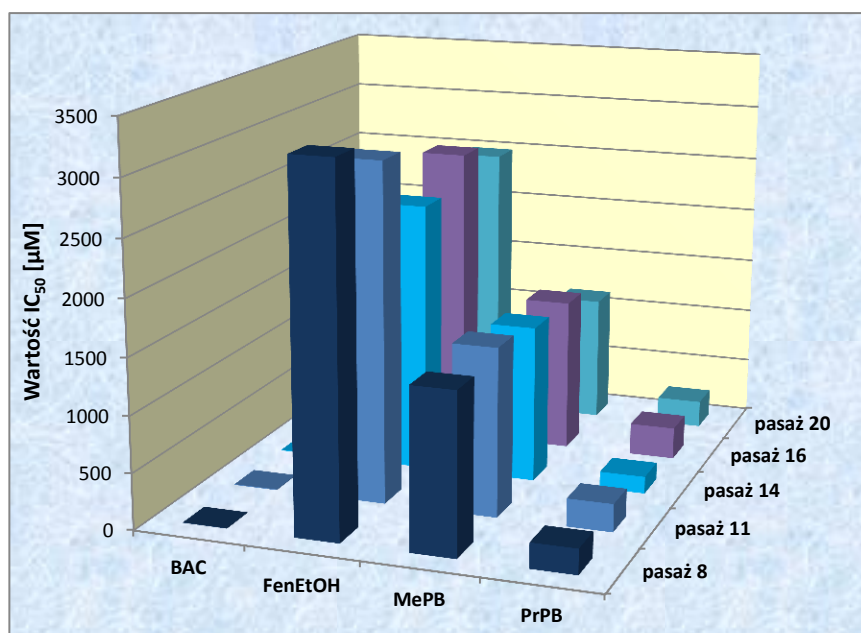
Do oceny procesu apoptozy zastosowano pomiar wiązania znakowanego fluorescencyjnie białka Aneksyny V sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny-FITC, który pozwala na wykrycie zmian konformacyjnych błony komórek i utraty asymetrii w rozmieszczeniu lipidów błonowych związanej z translokacją fosfatydyloseryny (główny składnik fosfolipidów błony) do zewnętrznej warstwy błony bez naruszania jej integralności, oraz oznaczanie aktywności enzymatycznej kaspaz-3/7 metodą FLICA (Fluorochrome Labeled Inhibitors of Caspases). Komórki narażano na badane związki w stężeniach odpowiadających podwielokrotnościom (1/4 i 1/10 dla MePB, PrPB i FenEtOH oraz 1/40 i 1/100 dla BAC) wartości IC_{50} wyznaczonych dla badanych związków. Badania te wykonano przy użyciu cytometru obrazowego z wbudowanym mikroskopem fluorescencyjnym NucleoCounter NC-3000 oraz systemu do przyżyciowej analizy komórek w czasie rzeczywistym tzw. „real-time” IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System.

Co stwierdzono?

Porównując wartości IC_{50} uzyskane na fibroblastach CCD-8Lu dla badanych ksenobiotyków stwierdzono, że spośród badanych konserwantów najbardziej toksyczny dla komórek tej linii był chlorek benzalkonium, natomiast najmniej toksyczny okazał się 2-fenoksyetanol, na którego cytotoksyczne działanie komórki starsze (pasaż 14 i 18) stały się mniej wrażliwe niż komórki najwcześniejszego pasażu (pasaż 10). Zjawisko to zaobserwowano dla tego konserwantu zarówno w teście MTT, jak i NRU (ryc. A). Podobnie jak w stosunku do fibroblastów płucnych także w przypadku linii CCD-1136Sk komórkowej najmniej toksyczny okazał się FenEtOH, zaś najbardziej toksyczny BAC (ryc. B).



Ryc. A. Porównanie wpływu 2-fenoksyetanolu na żywotność kolejnych pasażi komórek CCD-8Lu (ATCC® CCL-201™) w teście NRU.



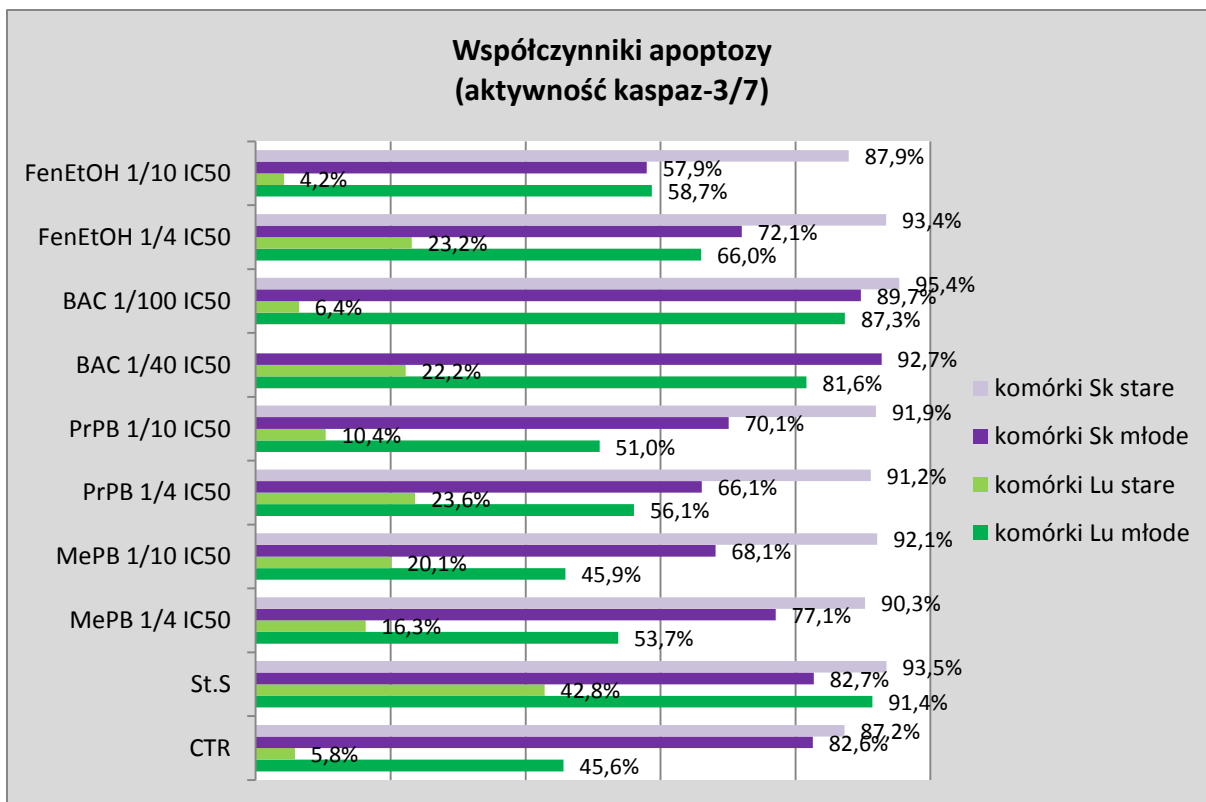
Ryc. B. Wartości IC_{50} wyznaczone dla badanych konserwantów na kolejnych pasażach komórek CCD-1136Sk (ATCC® CRL-2697™) w teście MTT.

Chlorek benzalkonium (BAC) okazał się także związkiem, który wywierał najsilniejsze działanie proapoptotyczne. Niemal wszystkie komórki CCD-8Lu narażone na ten związek w stężeniach odpowiadających 1/40 i 1/100 wartości IC_{50} (były to stężenia dziesięciokrotnie niższe niż pozostałych konserwantów) wykazywały cechy komórek późnoapoptotycznych w obu testach: oceniającym translokację fosfatydyloseryny oraz oceniającym aktywność enzymatyczną kaspaz efektorowych 3 i 7.

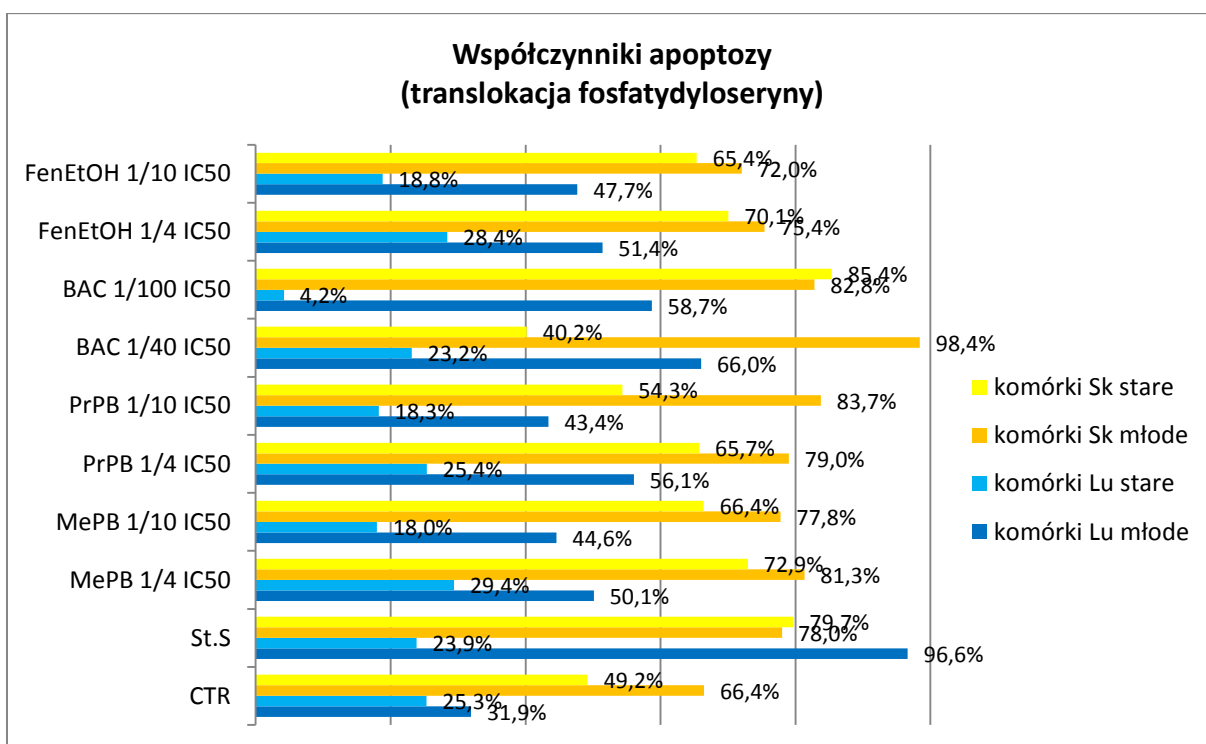
Porównując wpływ badanych konserwantów na starzejące się ludzkie fibroblasty linii komórkowej wyprowadzonej z płuc z fibroblastami wyprowadzonymi ze skóry stwierdzono, że fibroblasty skórne CCD-1136Sk już jako takie (nienarażone) wykazują znacznie wyższą aktywność kaspaz-3/7 niż fibroblasty płucne CCD-8Lu – różnica ta była szczególnie widoczna przy porównaniu komórek starych obu linii. Ponadto, obserwowane zmniejszenie w trakcie starzenia się wrażliwości komórek CCD-8Lu na apoptozę wyrażoną aktywnością kaspaz-3/7 było zjawiskiem odwrotnym niż prawidłowość zanotowana w przypadku narażenia na te same substancje konserwujące fibroblastów skórnych CCD-1136Sk, kiedy to stwierdzono większą wrażliwość komórek starych (w porównaniu z młodymi) na apoptozę wyrażoną aktywnością kaspaz efektorowych 3 i 7, zachodzącą pod wpływem badanych konserwantów w analogicznych warunkach narażenia (ryc. C).

Stare komórki zarówno fibroblastów wyprowadzonych z płuc, jak i ze skóry, były bardziej odporne na apoptozę ocenianą na podstawie stopnia translokacji błonowej fosfatydyloseryny niż komórki młode. Zjawisko to obserwowano zarówno w komórkach jako takich (nienarażanych), jak i w komórkach narażonych na wszystkie stężenia wszystkich badanych konserwantów (z wyjątkiem narażenia komórek CCD-1136Sk na chlorek benzalkonium w niższym z badanych stężeń), chociaż istniały różnice ilościowe pomiędzy poziomem apoptozy w obu rodzajach komórek – w fibroblastach skórnych była ona znacznie bardziej nasiloną niż w fibroblastach płucnych (ryc. D).

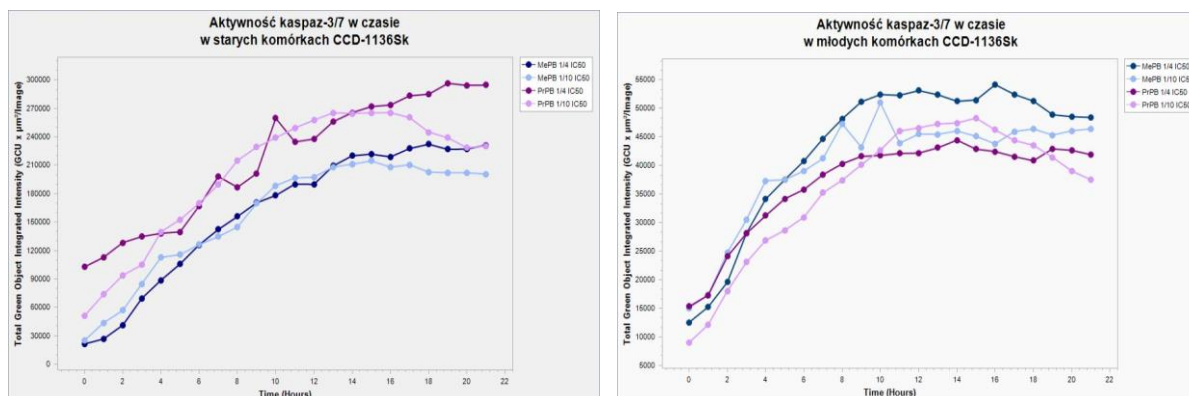
Oceniając na podstawie aktywności kaspaz-3/7 w czasie rzeczywistym (przy użyciu systemu IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System) działanie dwóch badanych parabenów stwierdzono, że propyloparaben (PrPB) wywierał nieco większe działanie proapoptotyczne na stare fibroblasty skórne w porównaniu z metyloparabenem (MePB). Działanie takie było obserwowane jedynie w starych fibroblastach (ryc. E) (w komórkach młodych działanie obu parabenów było porównywalne).



Ryc. D. Porównanie współczynników apoptozy wyznaczonych dla fibroblastów płucnych (CCD-8Lu) i skórnych (CCD-1136Sk) na podstawie aktywności enzymatycznej kaspaz-3/7 w młodych i starych komórkach po narażeniu na substancje konserwujące.



Ryc. E. Porównanie współczynników apoptozy wyznaczonych dla fibroblastów płucnych (CCD-8Lu) i skórnych (CCD-1136Sk) na podstawie wiązania Aneksyny V w młodych i starych komórkach po narażeniu na substancje konserwujące.



Ryc. C. Porównanie wpływu metyloparabenu i propyloparabenu na aktywność kaspaz-3/7 oznaczanych w czasie za pomocą IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System w młodych i starych komórkach CCD-1136Sk.

Jakie wnioski wynikają z przeprowadzonych badań?

Otrzymane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż badane substancje konserwujące mogą nasilać fizjologiczny proces programowanej śmierci komórkowej poprzez wpływ na kaskadę kaspaz oraz translokację błonowej fosfatydyloseryny.

Spośród badanych substancji konserwujących największe zagrożenie dla komórek *in vitro* stanowił chlorek benzalkonium, który (mimo zastosowania 10-krotnych rozcieńczeń w stosunku do pozostałych konserwantów) w dalszym ciągu wywierał najsilniejsze działanie proapoptotyczne na starzejące się ludzkie komórki linii wyprowadzonych z płuc oraz skóry.

Badane diploidalne ludzkie fibroblasty skórne charakteryzują się znacznie większym poziomem programowanej śmierci komórkowej ocenianej translokacją błonowej fosfatydyloseryny oraz aktywnością kaspaz efektorowych 3 i 7 niż diploidalne ludzkie fibroblasty płucne (tak wyjściowo, jak i po narażeniu na badane substancje konserwujące), co wskazywałoby na większą podatność na apoptozę komórek skóry niż układu oddechowego.

Starzejące się fibroblasty różnego pochodzenia (skóra *versus* płuca) reagują odmiennie na apoptozę wyrażoną aktywnością kaspaz-3/7, zachodzącą pod wpływem badanych konserwantów – fibroblasty wyprowadzone ze skóry stają się z wiekiem bardziej wrażliwe, podczas gdy fibroblasty płucne w miarę starzenia stają się bardziej odporne na wzrost aktywności kaspaz-3/7 pod wpływem substancji konserwujących, co może wskazywać, że większe zagrożenie dla zatrudnionych w kontakcie z nimi pracowników w starszym wieku będzie związane z narażeniem dermalnym.

Z kolei w miarę starzenia się, zarówno fibroblasty wyprowadzone tak z płuc, jak i ze skóry, stawały się bardziej odporne na apoptozę ocenianą na podstawie stopnia translokacji błonowej fosfatydyloseryny. Może to wskazywać, że mechanizm nasilonej apoptozy w komórkach organizmu pracowników-seniorów będzie związany raczej ze wzrostem aktywności enzymatycznej kaspaz wykonawczych, a nie zmianami konformacyjnymi błon komórkowych.

Bibliografia

- Adams J.D., Mukherjee S.K., Klaidman L.K., Chang M.L., Yasharel R. Apoptosis and oxidative stress in the aging brain Ann. N.Y. Acad. Sci., 1996, 786:135-151. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb39058.x>
- Carvalho CM, Menezes PF, Letenski GC, Praes CE, Feferman IH, Lorencini M. In vitro induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. Int. J. Cosmet. Sci. 2012, 34: 176–182. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00698.x>

- Chan, S.L., Fu W., Zhang P., Cheng A., Lee J., Kokame K., Mattson M.P. Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2004, 279, 28733-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404272200>
- Dubey D., Chopra D., Singh J., Srivastav A.K., Kumari S., Verma A., Ray R.S. Photosensitized methyl paraben induces apoptosis via caspase dependent pathway under ambient UVB exposure in human skin cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 108 A:171-185.
- Hordyjewska A., Pasternak K. Apoptotyczna śmierć komórki. *Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 3, 545–554.
- Hori, O., Ichinoda F., Yamaguchi A., Tamatani T., Taniguchi M., Koyama Y., Katayama T., Tohyama M., Stern D.M., Ozawa K., Kitao Y., Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes Cells* 2004, 9, 457-69. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00735.x>
- Kłyszajko-Stefanowicz L. *Cytobiochemia*. PWN, Warszawa, 2015.
- Kokame, K., Agarwala K.L., Kato H., Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2000, 275, 32846-53.
- Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000, 101, 451-4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80855-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80855-7)
- Nicosia S.V., Diaz J., Nicosia R.F., Saunders B.O., Muro-Cacho C. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1995, 25: 143-157.
- Nogalska A. Rozprawa habilitacyjna "Rola stresu retikulum endoplazmatycznego w patogenezie wrętowego zapalenia mięśni". Katedra i Zakład Biochemii, Gdański Uniwersytet Medyczny, 2015.
- Pozarowska D., Pozarowski P. Benzalkonium chloride (BAK) induces apoptosis or necrosis, but has no major influence on the cell cycle of Jurkat cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2011, 49 (2): 225–230. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0031>
- Radziszewska E. Regulacja cyklu komórkowego a starzenie się i śmierć komórki. *Kosmos*, 1999. 48; 2 (243): 245-253.
- Roussel, B. D., Kruppa A.J., Miranda E., Crowther D.C., Lomas D.A., Marciniak S.J. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol.* 2013, 12: 105-18. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70238-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70238-7)
- Szeląg S., Zabłocka A, Trzeciak K., Drozd A., Baranowska-Bosiacka I., Kolasa A., Goschorska M., Chlubek D., Gutowska I. Propylparaben-induced disruption of energy metabolism in human HepG2 cell line leads to increased synthesis of superoxide anions and apoptosis. *Toxicology in Vitro* 2016, 31: 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.011>
- Ulker Z., Alpsoy L. and Mihmanli A. Assessment of cytotoxic and apoptotic effects of benzaldehyde using different assays. *Human and Experimental Toxicology* 2013, 32(8) 858–864. <https://doi.org/10.1177/0960327112470271>
- Usami S., Takumi Y., Fujita S., Shinkawa H., Hosokawa M. Cell death in the inner ear associated with aging is apoptosis? *Brain Res.*, 1997, 747: 147-150. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01243-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01243-7)
- Wagner M., Hampel B., Bernhard D., Hala M., Zwerschke W., Jansen-Durr P. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis, *Exp. Gerontol.* 2001, 36: 1327–1347. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00105-X](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00105-X)
- Yamamoto, K., Yoshida H., Kokame K., Kaufman R.J., Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem* 2004, 136, 343-50. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh122>
- Ye X., Bishop A.M., Reidy J.A., Needham L.L., Calafat A.M. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114 (12): 1843-1846. <https://doi.org/10.1289/ehp.9413>
- Yeo E.J., Hwang Y.C., Kang C.M., Choy H.E., Park S.C. Reduction of UV-induced cell death in the human senescent fibroblasts, *Mol. Cells* 2000, 10:415–422.

Zang H. Wu H., Yang J., Ye J. Sodium perbarate and benzalkonium chloride induce DNA damage in Chang conjunctival epithelial cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 2017, 1: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1080/15569527.2017.1291664>

Zhang, K., Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008, 454: 455-62. <https://doi.org/10.1038/nature07203>

Opracowano na podstawie wyników IV etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.