

Parabeny jako substancje konserwujące stosowane w preparatach kosmetycznych oraz ich wpływ na apoptozę fibroblastów skóry człowieka

Parabens as preservatives used in cosmetics and their effect on the apoptosis of human dermal fibroblasts

I WSTĘP

Obecne na rynku artykuły kosmetyczne stanowią podłoże dla rozwoju bakterii, grzybów i innych organizmów. Mają często obszerny skład, związki w nich zawarte to głównie aminokwasy, białka, witaminy i inne komponenty, które dość szybko ulegają rozkładowi. W celu ochrony preparatów kosmetycznych, już od wielu lat stosuje się w recepturach substancje, mające na celu ochronę i przedłużenie „żywności”. Ogólna nazwa takich związków to konserwanty, które mają zahamować lub zapobiec rozwojowi drobnoustrojów, dodatkowo zwiększając trwałość kosmetyku, wzbogacając przy tym jego wartość. Do grupy takich substancji należą m.in.: parabeny, alkohole, fenole, aldehydy,

pochodne kwasów organicznych, substancje nieorganiczne i inne. Dodatek środków konserwujących jest konieczny, zwłaszcza dotyczy to preparatów, w których składzie znajdują się woda i związki organiczne, jako że są one bardzo podatne na wpływy mikroorganizmów i czynniki środowiskowe. W kosmetykach najczęściej stosuje się mieszanek różnych konserwantów, aby zapewnić jak najlepszą ich ochronę, ponieważ nie istnieje jeden środek o tak szerokim spektrum działania przeciwko wszystkim ustrojom. Niektóre są bardziej aktywne wobec bakterii, inne zwalczają grzyby, część z nich niszczy formy przetrwalnikowe, pozostałe jedynie wegetatywne. Zatem ważna jest kompozycja kilku substancji dla zachowania jak najlepszych właściwości

Justyna Marwicka
Kornelia Niemyska
Maja Wieczorek
Wydział Nauk o Zdrowiu
Wyższa Szkoła Ekonomii
Prawa i Nauk Medycznych
im. E. Lipińskiego
w Kielcach
ul. Jagiellońska 109 a
25-734 Kielce
T: +48 41 345 13 13
E: j.marwicka@op.pl

» 562

I STRESZCZENIE

Produkty kosmetyczne zawierają w swoim składzie związki podatne na działanie drobnoustrojów. Dodatek konserwantów ma na celu ochronę kosmetyku przed zanieczyszczeniami i rozwojem mikroorganizmów.

Parabeny to substancje konserwujące, obecnie najczęściej wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym. Wykazano, że parabeny indukują obumieranie komórek przez apoptozę w różnych typach komórek: w keratynocytach i fibroblastach skóry oraz w komórkach HepG2 wątroby ludzkiej.

Celem pracy była ocena wpływu szkodliwości czy też jej braku na organizm człowieka, wynikająca ze stosowania kosmetyków zawierających konserwanty, w tym głównie parabeny.

I ABSTRACT

Cosmetic products contain compounds that are susceptible to microorganisms. The addition of preservatives aims to protect cosmetics against contamination and development of microorganisms.

Parabens are preservatives currently used in the cosmetic industry. Parabens induce cell death by apoptosis in various cell types, namely in keratinocytes and dermal fibroblasts as well as in HepG2 human liver cells.

The aim of the study was to evaluate harmfulness or lack thereof on human body resulting from the use of cosmetics containing preservatives, mainly parabens.

otrzymano / received
17.06.2017
poprawiono / corrected
10.08.2017
zaakceptowano / accepted
12.09.2017

Słowa kluczowe: parabeny, fibroblasty, apoptoza

Key words: parabens, fibroblasts, apoptosis

konserwujących przy jednoczesnym zwróceniu uwagi na dobranie preparatów o jak najmniejszej szkodliwości dla organizmu ludzkiego. Szczególnie niebezpieczne dla kosmetyków są bakterie Gram-ujemne, gdyż są one odporne na działanie różnych grup substancji przeciwbakteryjnych. Ponadto są zdolne do przetrwania w zmiennych warunkach środowiska, ze względu na możliwości przystosowawcze. Część z nich jest bardzo aktywna metabolicznie, dzięki czemu wykorzystywać mogą nawet substancje trudno przyswajalne, takie jak węglowodory do celów rozwojowych i wzrostowych. Bakterie G(-) mają ścianę komórkową pokrytą dodatkową błoną zewnętrzną, co zwiększa ich odporność. Celem pracy była ocena wpływu szkodliwości czy też jej braku na organizm człowieka, wynikająca ze stosowania kosmetyków zawierających konserwanty w tym głównie parabeny.

| HISTORIA KONSERWANTÓW STOSOWANYCH W KOSMETYKACH

Historia konserwantów sięga starożytności, pierwsze substancje, których użyto jako konserwujące, to sól kuchenna, w późniejszym czasie alkohol etylowy. Gwałtowny rozwój nauk chemicznych w wiekach XIX i XX spowodował, że zaczęto stosować różne substancje syntetyczne w celu poprawy wyglądu, trwałości, a także właściwości aplikacyjnych artykułów kosmetycznych. Początkowo wykorzystywano takie kwasy, jak: siarkowy, sorbinowy, benzoesowy, salicylowy i pochodzące od nich ich sole. Jako środki konserwujące popularnością cieszyły się także antybiotyki, jednak ze względu na efekty uboczne, wynikające z ich stosowania, zrezygnowano z nich.

Parabeny to substancje konserwujące, obecnie najczęściej wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym. Ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa została zauważona już kilkadziesiąt lat temu. Jako środki konserwujące stosowano je od lat trzydziestych XX wieku. Po raz pierwszy uzyskał je w roku 1924 Teodor Sabalitschak, który otrzymał substancję, mającą działanie przeciwdrobnoustrojowe, aktywną tylko w środowisku silnie kwaśnym. Po poddaniu procesowi estryfikacji kwasu parahydroksybenzoesowego alkoholami alifatycznymi oraz aromatycznymi zsyntezował związki o działaniu bakterioobójczym, działające w szerokim spektrum pH. Mechanizm działania, a także skutki stosowania konserwantów na organizm człowieka stanowią stale przedmiot wielu badań [1].

| OCHRONA PRZECIWDROBNOUSTROJOWA PRODUKTÓW KOSMETYCZNYCH

Konserwanty należą do grupy substancji o działaniu zatrzymującym rozwój bakterii oraz grzybów, w tym pleśni, a także drożdży, co wpływa na zwiększenie „żywności” kosmetyku, chroni przed zmianą zapachu, konsystencji, wyglądu. Substancje konserwujące dodawane są w celu zachowania jak najdłuższej trwałości preparatów kosmetycznych. Produkty kosmetyczne zawierają w swoim składzie związki podatne na wpływ drobnoustrojów. Aby utrzymać wysoką jakość wyrobów,

dodatek konserwantów jest nieunikniony. Wiadomo o ich hamującym działaniu wobec powstawania produktów przemiany materii drobnoustrojów, które mogą sprzyjać powstawaniu podrażnień skóry czy błon śluzowych człowieka.

| PARABENY JAKO KONSERWANTY PRODUKTÓW KOSMETYCZNYCH

Do najpowszechniejszych konserwantów stosowanych w produktach kosmetycznych należą tzw. parabeny, czyli estry kwasu phydroksybenzoesowego, takie jak: metyloparaben (parabeny metylu, paraben metylowy), etyloparaben (nazwy analogiczne jak dla metyloparabenu), propyloparaben, butyloparaben, benzyloparaben [2]. Parabeny w kosmetykach mogą występować także pod wieloma innymi nazwami:

- Glutaraldehyde,
- Tegosept,
- Mycocten,
- Nipasol,
- oraz oznaczeniami, takimi jak E216 (paraben propylu), E218 (paraben metylu) i inne symbole w zależności od zastosowanego parabenu.

Oprócz zastosowania w kosmetykach, używane są one również jako konserwanty w produktach żywnościowych. Parabeny są powszechnie stosowane jako środki konserwujące, ze względu na aktywność przeciwbakteryjną (ta nie jest raczej wysoka) i dużą aktywność przeciwgrzybiczą. Najczęściej stosowane są w postaci mieszanin. Są aktywne w dużym zakresie pH, mają szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego i są najbardziej skuteczne wobec drożdży i pleśni. Są aktywne zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, przy czym aktywność ta jest większa wobec tych pierwszych aniżeli wobec tych drugich. Wykazano aktywność przeciw niższym wymienionym mikroorganizmom: gronkowiec złocisty (*S. aureus*, Gram+), pałeczka okrężnicy (*E. coli*, Gram-), pałeczka ropy błękitnej (*P. aeruginosa*, Gram-), kropidlak czarny (*Aspergillus niger* Tiegh, pleśń), grzyb z rodziny drożdżaków (*Candida albicans*) [3]. Działanie przeciwbakteryjne parabenów wzmacnia się wraz ze wzrostem długości łańcucha ugrupowania alkilowego [7]. Aby zminimalizować ilość stosowanych konserwantów, stosuje się mieszaninę parabenów o różnej długości łańcucha lub mieszaninę parabenów z innymi konserwantami (np. pochodne formaldehydu) [4]. Mimo że parabeny znane są od dziesięcioleci, ich antybakteryjno-antygrzybiczy mechanizm działania nie jest do końca przebadany i często używa się ogólnego stwierdzenia, że mechanizm jest wielokierunkowy i polega na oddziaływaniu parabenów na wiele różnych procesów zachodzących w komórkach mikroorganizmów [5].

Oszacowano, że nawet około 90% produktów kosmetycznych zawiera parabeny jako substancje konserwujące. Według Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków FDA (*Food and Drug Administration*) są one obecne w ponad 22 000 receptur kosmetycznych. Dzięki nim, produkty te zachowują długotrwałą

świeżość, bez konieczności przechowywania w ściśle określonych ochronnych warunkach. Obecnie stężenia parabenów w kosmetykach to na ogół mniej niż 0,3%, ale całkowite stężenie może wynosić aż do 1% [6]. Idealny konserwant kosmetyków powinien wykazywać aktywność zabójczą lub statyczną w stosunku do możliwie szerokiego spektrum mikroorganizmów, nie modyfikować naturalnej mikroflory na skórze ludzkiej, być efektywny już w małych dawkach, być stabilnym w różnych odczynach i temperaturach, nie ulegać rozkładowi przez okres użytkowania kosmetyku, nie mieć zapachu ani barwy. Oprócz tego powinien być w 100% nietoksyczny dla organizmu ludzkiego i powinien lepiej rozpuszczać się w wodzie niż w tłuszczach – jednakże te dwa warunki nie są spełnione w przypadku parabenów. W preparatach często stosuje się sole sodowe parabenów, ze względu na lepszą rozpuszczalność w roztworach wodnych. Alternatywnym rozwiązaniem jest tworzenie i używanie w kosmetykach kompleksów parabenów z cyklodekstrynami [7]. Najczęściej stosuje się reakcję kompleksowania z cyklodekstrynami pochodzenia naturalnego, a metoda ta znana jest już od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku [8].

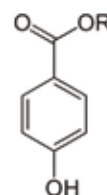
Kwestia rozpuszczalności wodnej parabenów jest szeroko badana, ponieważ konserwanty z tej grupy występują głównie w specyfikach kosmetycznych zawierających znaczne ilości wody, bowiem to w nich najłatwiej dochodzi do rozwoju mikroorganizmów, np. w szamponach, preparatach do mycia i pielęgnacji twarzy i ciała, odżywkach do włosów, lotionach.

Bezpieczeństwo stosowania parabenów jako konserwantów kontrolowane jest przez stosowne regulacje prawne, lecz o ile ustawy określają dopuszczalne stężenia pojedynczego związku z grupy parabenów, o tyle nie ma jest wytycznych, dotyczących sumarycznej ilości zastosowanej mieszaniny parabenów w danym specyfiku kosmetycznym. W Unii Europejskiej dopuszczalna zawartość pojedynczego związku z grupy parabenów wynosi obecnie 0,4%.

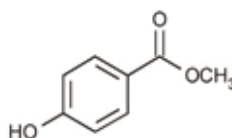
I FIZYKOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI PARABENÓW

Parabeny to związki organiczne, będące estrami kwasu phydroksybenzoesowego, różniące się rodzajem grupy alkilowej – podstawnikiem w pozycji *para* [6]. Nipaginy, czy też aseptyny, to synonimy wyrazu parabeny. Znana jest cała rodzina takich związków i wówczas w pozycji *para* występuje podstawnik metylowy, etylowy, propylowy, butylowy, heptylowy czy benzylowy. Wzór ogólny parabenów oraz struktury wybranych związków z tej grupy zestawiono wraz z nazwami na rysunkach 1 i 2. Estry kwasu phydroksybenzoesowego są ciałami stałymi, które formują się w postaci drobnych kryształów. Są bezbarwne i bezzapachowe. W powietrzu są stabilne. Chemicznie są raczej mało reaktywne, odporne na rozpad pod wpływem wody i rozcieńczonych roztworów kwasów nieorganicznych, a także organicznych. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa parabenów rośnie wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego przykładowo:

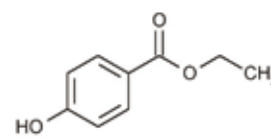
metylparaben < etylparaben < propylparaben < butylparaben.



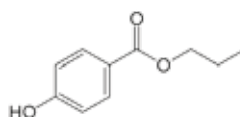
Rys. 1 Ogólna struktura parabenów



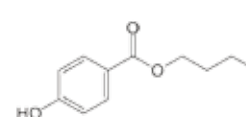
METYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan metylu
Nazwa zwyczajowa: Metylparaben



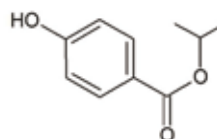
ETYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan etylu
Nazwa zwyczajowa: Etylparaben



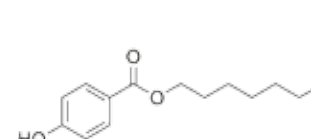
PROPYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan propylu
Nazwa zwyczajowa: Propylparaben



BUTYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan butylu
Nazwa zwyczajowa: Butylparaben



ISOPROPYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan izopropylu
Nazwa zwyczajowa: Izopropylparaben



HEPTYLPARABEN
Nazwa chemiczna:
4-hydroksybenzoesan heptylu
Nazwa zwyczajowa: Heptylparaben

Rys. 2 Struktury wybranych związków z grupy parabenów

Mimo że parabeny są strukturalnie zbliżone do kwasu salicylowego i kwasu benzoesowego, to jednak mają odmienne właściwości fizykochemiczne. Parabeny to związki lipofilowe – dobrze rozpuszczają się w tłuszczach, natomiast słabo w wodzie i roztworach wodnych. W wodzie najslabiej rozpuszcza się parahydroksybenzoesan benzylu natomiast parahydroksybenzoesan metylu najlepiej – w miarę wzrostu długości łańcucha alkilowego rozpuszczalność w wodzie maleje i wzrasta rozpuszczalność w tłuszczach. Parabeny wykazują zgodność z substancjami o charakterze anionowym i kationowym w zakresie pH 3-8. Najbardziej trwałe są roztwory parabenów o pH 4-5, ich aktywność zależy od środowiska, w jakim się znajdują. W niskich wartościach pH aktywność parabenów jest wysoka przeciwko grzybom i pleśniam.

Badanie przenikalności i zatrzymywania w skórze trzech popularnych konserwantów (metylo-, etylo- i propylparabenu) wykazało, że stopień ich przenikania w niewielkim stopniu uzależniony jest od podłoża produktu, głównie ma znaczenie rozpuszczalność i lipofilność. Po upływie ośmiu godzin od

momentu aplikacji kremów, zawierających poszczególne parabeny zbadano ich zawartość w skórze. Otrzymano wyniki, które wskazywały 80-, 40- i 20-proc. zawartość w skórze danych konserwantów (kolejno metyloparabenu, etyloparabenu oraz propyloparabenu). Podłoże kosmetyku wpływało na zatrzymanie parabenu, nie mając związku z ilością, jaka przenikała [9]. Podstawowe właściwości fizykochemiczne to dla przykładu cechy parabenu metyloowego, przedstawiające się następująco: stan skupienia i wygląd – krystaliczne ciało stałe, rozpuszczalność w wodzie 2,5 g/l w 25 °C, słabo rozpuszczalny w benzenie czterochlorku węgla, rozpuszczalny w etanolu, eterze, acetonie, metanolu, DMSO, rozpuszczalność w ciepłym glicerolu 14,3 g/l, temperatura topnienia 125-128 °C, temperatura wrzenia 270-280 °C, gęstość 1,38 g/cm³ w 20 °C, współczynnik załamania RI n_D20D 1.55 [7].

Parabeny syntezowane są na drodze reakcji estryfikacji kwasu 4-hydroksybenzoesowego przy zastosowaniu nadmiaru alkoholu (odpowiedni alkohol ze względu na docelową grupę alkilową) w środowisku kwaśnym (np. w obecności kwasu H₂SO₄). Znane są jednak również alternatywne drogi syntezy parabenów, na przykład reakcja 4-hydroksybenzoesanu sodu z chlorkiem benzylu prowadzi do powstania parabenu benzylu. Inny przykład to synteza w warunkach wzbudzenia mikrofalowego [10] czy zastąpienie kwasu siarkowego bardziej ekoprzyjaznymi katalizatorami, np. montmorillonitem K10.

I PARABENY W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Mechanizm działania substancji o właściwościach konserwujących polega w głównej mierze na denaturacji białek drobnoustrojów lub dezaktywacji enzymów mikroorganizmów, koniecznych do prawidłowego funkcjonowania komórek bakterii. Proces ten nie został jednak do końca wyjaśniony. Najprawdopodobniej parabeny to inhibitory powstawania kwasów nukleinowych DNA (*deoxyribonucleic acid*) oraz RNA (*ribonucleic acid*). Nipaginy działają również przez zakłócanie procesów transportu błonowego [11]. Prowadzą do migracji składników wewnątrzkomórkowych, w tym RNA. Dodatkowo zatrzymują dostęp aminokwasów (tj. seryna, alanina) do pęcherzyków membran komórek bakterii, nie wpływając na transport glukozy.

Podsumowując, mechanizm działania substancji konserwujących ma na celu:

- uszkodzenie ściany komórkowej, np. przez zmniejszenie jej przepuszczalności (plazmoliza lub denaturacja);
- ingerencję w strukturę genetyczną, np. przez jej uszkodzenie (działanie mutagenne);
- inaktywację danych enzymów (np. redukcja siarczynów do wiązań dwusiarczkowych enzymów);
- inaktywację metabolitów potrzebnych do wzrostu drobnoustrojów (witaminy, aminokwasy).

Bezpieczeństwo stosowania kosmetyków, w których składzie znajdują się parabeny, jest kwestią dyskusyjną, nad którą w ostatnich latach pochylał się organ doradczy Komisji Europejskiej, Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*). Z kolei Amerykańska Agencja Żywności i Leków FDA zaklasyfikowała wybrane parabeny (m.in. metyloparaben i propyloparaben) jako „substancje uznane za bezpieczne” i obecnie znajdują się na tzw. liście GRAS (*Generally Recognised As Safe*), co oznacza, że mogą być stosowane zarówno w produktach żywnościowych, lekach, jak i kosmetykach.

Wątpliwości co do bezpieczeństwa stosowania w kosmetykach tej grupy konserwantów opierają się na aspekcie rakotwórczym, alergicznym oraz estrogennym. Oszacowano, że dla osoby o przeciętnej masie ciała dzienna dawka pochłoniętych parabenów jest równa około 76 mg, z czego aż 50 mg pochodzi z kosmetyków [12]. Ujawniono, że źródłami parabenów, które powodują przedostawanie się tych związków do organizmu, są przede wszystkim kremy do opalania i kosmetyki do pielęgnacji włosów, ale także pianki do golenia, pasty do zębów, mydła, dezodoranty, kremy do twarzy, kosmetyki do pielęgnacji ciała, a nawet perfumy. Aspekty toksykologiczne przedstawiono jako zestawienie stężeń powodujących cytotoxycność 50% komórek, na przykładzie parabenu metyloowego. IC₅₀: *Amaranthus hypochondriacus*: IC₅₀ = 23 μM, *Xanthine dehydrogenase*: IC₅₀ >50 μM (człowiek); KB: IC₅₀ >200 μM (człowiek).

Obecnie parabeny uważane są za substancje bezpieczne dla organizmu człowieka i zawarte są na liście konserwantów dopuszczonych do użytku w kosmetykach. Przeprowadzono badania, dotyczące metabolizmu parabenów na szczurach. Doustnie aplikowano metylo- i propyloparaben w dawce 100 mg. Wyniki wykazały, że parabeny po wchłonięciu do organizmu są hydrolizowane przez enzymy do kwasu p-hydroksybenzoesowego [13].

Tabela 1 Charakterystyka wybranych estrów kwasu p-hydroksybenzoesowego

	Metyloparaben	Etyloparaben	Propyloparaben
Nazwa chemiczna	Ester metyloowy kwasu p-hydroksy-benzoesowego	Ester etyloowy kwasu p-hydroksy-benzoesowego	Ester n-propyloowy kwasu p-hydroksy-benzoesowego
Symbol substancji	E 218	E 214	E216
Numer wg Europejskiego Spisu Substancji Chemicznych	243-171-5	204-399-4	202-307-7
Wzór chemiczny	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Masa cząsteczkowa	152,15	166,80	180,21
Opis	Prawie bezwonne, drobne, bezbarwne kryształki lub biały krystaliczny proszek	Prawie bezwonne, drobne, bezbarwne kryształki lub biały krystaliczny proszek	Prawie bezwonne, drobne, bezbarwne kryształki lub biały krystaliczny proszek
Zakres temperatur topnienia	125-128 °C	115-118 °C	95-97 °C po suszeniu przez 2 h w temp. 80 °C

Źródło: Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 kwietnia 2004 roku, nr 59, poz. 530

Związek ten jest mniej toksyczny od podanych związków i jest on wydalany z organizmu wraz ze swoimi pochodnymi z moczem. Przy aplikacji na powierzchnię skóry znaczna część parabenów pozostaje niewchłonięta. Wraz ze wzrostem łańcucha alkilowego parabenu jego wchłanianie przez skórę maleje. W 1998 r. wyciągnięto pewne wnioski, płynące z badań przeprowadzonych na szczurach. Wykazano, że parabeny wykazują słabe działanie estrogenopodobne, oznacza to, że są w stanie pobudzać wrażliwy na dany hormon receptor, co w konsekwencji może sprzyjać rozwojowi nowotworu estrogenozależnego, tj. rak piersi, macicy, jajników lub jąder. Potwierdzone jest słabe działanie estrogenopodobne. Badania *in vivo* wskazują na niskie stężenie parabenów w organizmie w stosunku do ich metabolitów.

I WCHŁANIANIE I METABOLIZM

Wykazano, że efekt okluzji (wytworzenie na skórze warstwy zmniejszającej lub hamującej odparowywanie wody z naskórka) sprzyja przenikaniu przezskórnemu [14]. W trakcie wchłaniania przez skórę dochodzi do metabolizowania parabenów, wskutek aktywności, jaką wykazują enzymy z grupy esteraz. Zdolność metabolizowania parabenów przez enzymy zawarte w skórze i adsorpcja tych związków do krwiobiegu zostaje zmniejszona do minimum [15].

Parabeny wchłaniają się przez skórę bardzo szybko i już po godzinie od zastosowania kosmetyku, w którym taki konserwant występuje, można je wykryć we krwi. Ponadto konserwanty te wykryto w próbkach moczu u blisko 90% przebadanych osób, a także we krwi 60% osób z ogólnej populacji, w mleku karmiących matek, a nawet męskim nasieniu. Po zażyciu doustnym parabeny dobrze, szybko i prawie całkowicie wchłaniają się z przewodu pokarmowego. W wątrobie i w nerkach są hydrolizowane do kwasu p-hydroksybenzoesowego, będącego ich podstawowym metabolitem. Metabolity w czasie około 30 minut są już wykrywalne w moczu. Oznacza to, że błyskawiczny metabolizm powoduje, że parabeny nie biokumulują się, co za tym idzie – nie są toksyczne dla organizmu. W niewielu przypadkach istnieje ryzyko kumulacji parabenów w tkance tłuszczowej, co ma związek z wysoką wartością współczynnika podziałów. Naukowcy sugerują, że powszechne występowanie parabenów w organizmie ludzkim wynika właśnie ze stosowania ich jako konserwantów w kosmetykach [16].

I TOKSYCZNOŚĆ, NOWOTWORY

Parabeny wywołują negatywne efekty na gospodarkę estrogenu w organizmie [5]. W latach 90. odkryto, że parabeny to związki o działaniu ksenoestrogennym. Zidentyfikowano śladowe ilości parabenów w tkankach zmienionych nowotworowo. Badania przeprowadzono na grupie 20 pacjentek [17]. Przekonująca jest zależność występowania parabenów w dezodorantach ze związkiem występowania raka piersi, jako że wiele nowotworów rozwija się w okolicy dołów pachowych. Sama obecność parabenów w tkankach zmienionych nowotworowo nie stanowi dowodu na ich udział w rozwoju procesu nowotworzenia i aktualnie trwają prace, mające na celu udowodnienie lub obalenie tej hipotezy [18].

Mianowicie wielokrotnie dementowano i komentowano informację na temat rakotwórczości parabenów, ostatecznie wykluczono możliwość występowania korelacji pomiędzy parabenami a nowotworzeniem. Ustalono, że u każdej pacjentki z pierwotnym rakiem piersi, która przeszła mastektomię, dało się zidentyfikować jeden lub więcej związków z grupy. Co więcej, związki te były obecne w postaci estrowej, co jednoznacznie sugeruje, że do organizmu dostały się przez skórę, a nie drogą układu pokarmowego, gdyż wówczas estry uległyby dalszym przemianom w wątrobie. Im większa jest rozpuszczalność parabenu w tłuszczach, tym większa penetracja przez naskórek [7]. Testy *in vitro* udowodniły, że aktywność estrogenowa parabenów może powodować proliferację komórek nowotworowych. Ponadto, estrogenowe działanie parabenów może wpływać feminizująco na dzieci płci męskiej, zwłaszcza w wieku niemowlęcym, a także u młodych chłopców [19].

Oprócz bezpośredniego wpływu na organizm ludzki udowodniono, że parabeny w różnoraki sposób mogą oddziaływać z innymi składnikami kosmetyków i wówczas wywierają negatywny wpływ na zdrowie. Glikol propylenowy, glikol polietylenowy, monogliceryd kwasu laurynowego czy glikol butylenowy, często występujące w kosmetykach, mogą wzmacniać wchłanianie innych składników kosmetyków, w tym parabenów. Mechanizm tego wzmocnienia opiera się na rozluźnianiu struktury tkankowej.

Mimo dotychczas wskazanych faktów nie ma zgody wobec wpływu parabenów na gospodarkę hormonalną człowieka.

I PARABENY JAKO ALERGENY KONTAKTOWE

W przypadku stosowania parabenów jako składnika kosmetyków jednym z najczęściej obserwowanych negatywnych efektów na zdrowie człowieka jest reakcja alergiczna, tzw. alergia kontaktowa po zastosowaniu kosmetyku [5]. Łatwo wchłaniają się one do krwi i limfy z szyi, piersi, narządów płciowych i klatki piersiowej. Na podstawie obserwacji klinicznych, stwierdzono, że parabeny nie są silnymi alergenami, ale ze względu na powszechność ich stosowania w różnorodnych produktach kosmetycznych, reakcje alergiczne spowodowane ich aktywnością są dość częste [20]. Alergia na parabeny objawia się między innymi wysypką, zaczerwienieniem skóry, pokrzywką. Alergii towarzyszy świąd. Reakcja alergiczna może być dodatkowo wzmocniona przez działanie promieni słonecznych.

Należy zauważyć, że reakcje alergiczne wywołują nie tylko parabeny, ale i wiele innych związków, stosowanych jako konserwanty w kosmetykach, m.in. aldehyd glutarowy, alkohol fenyletylowy, kwas sorbowy, p-chloro-m-krezol. Na uwagę zasługuje efekt, znany w literaturze jako „paradoks parabenów”. U pewnej grupy osób wykazujących reakcję alergiczną na parabeny zawarte w lekach zastosowania zewnętrznego, nie występują objawy alergiczne w przypadku stosowania kosmetyków zewnętrznych, w których parabeny są również obecne. Efekt ten został wyjaśniony w literaturze na podstawie różnic w wchłanianiu się parabenów przez skórę zdrową i zmienioną chorobowo [21]. Trwałe i regularne stosowanie kosmetyków z parabenami skutkuje rozszerzeniem naczyń krwionośnych

i wywołuje wysięk okołonaczyniowy. To z kolei może doprowadzić do rozwoju dermatozy okołoustnej i trądziku różowatego, szczególnie u osób z już istniejącymi problemami skórnymi.

Badania dotyczące alergii kontaktowej, wywołanej wskutek naniesienia na skórę substancji kosmetycznych zawierających środki konserwujące ujawniły, że najczęściej alergizującymi substancjami były: timerosal oraz formaldehyd, nieco mniej Euksyl K 400. Zdecydowanie najsłabsze działanie alergizujące powodowała mieszanka parabenów. Obserwacji zostały podane miejsca i rodzaj powstałych zmian skórnych u badanych osób. Zauważono zmiany zapalne skóry twarzy w niektórych przypadkach z rozsianymi swędzącymi plamami rumieniowymi i grudkami na powierzchni tułowia i kończynach [22].

Wiele przeprowadzonych badań nie udowodniło szkodliwego wpływu parabenów na organizm ludzki. Zaakceptowano więc używanie metylo-, etylo-, propylo- i butyloparabenów jako dodatków do kosmetyków, w celu zapewnienia właściwości konserwujących. Obecnie znaczna ilość produktów zmywalnych i tych do stosowania miejscowo na powierzchnię skóry ma w składzie parabeny. Częstość występowania alergii na nie ocenia się na ok. 0,2-1,2% badanych [23].

Dotychczasowo przeprowadzone badania dotyczące alergii na kosmetyki wykazały, że substancje konserwujące są czynnikiem uczulającym. Znaczna ilość doniesień naukowych wskazuje przyczynę alergicznego kontaktowego zapalenia skóry przez parabeny wskutek rozwoju reakcji alergicznej na uszkodzonej czy przerwanej powierzchni ciągłości skóry. Reakcja następuje, po ponownym naniesieniu preparatu zawierającego w swym składzie dany konserwant. Powtórne zaaplikowanie nipaginy skutkuje wytworzeniem się odporności mikroorganizmów na środek konserwujący. Na skutek hydrolizy parabenów przez drobnoustroje dochodzi do wytworzenia produktów, które mogą wywoływać reakcje alergiczne [24].

Kwestia wpływu parabenów na organizm jest bardzo kontrowersyjna. Znane są prace, które klasyfikują konserwanty jako całkowicie bezpieczne, praktycznie nietoksyczne, nie rakotwórcze, genotoksyczne bądź teratogenne.

I WPLYW PARABENÓW ZAWARTYCH W KOSMETYKACH NA PROCES APOPTOZY FIBROBLASTÓW SKÓRY LUDZKIEJ

Pod pojęciem fibroblastów rozumie się najbardziej popularne komórki tkanki łącznej w skórze właściwej, które wywodzą się one z mezodermy, czyli środkowej warstwy komórek zarodka. Fibroblasty to komórki odpowiadające za wytwarzanie kolagenu, elastyny, włókien istoty międzykomórkowej, kwasu hialuronowego czy proteoglikanów. Wszystkie produkty fibroblastów mają bardzo istotne znaczenie dla prawidłowej budowy i funkcjonowania skóry. Ich funkcje replikacyjne, produkcyjne i metaboliczne łatwo zakłócić, dlatego też komórki te są w centrum uwagi producentów kosmetyków. Powszechnie uważa się, że utrata aktywności komórek fibroblastów skutkuje w procesie starzenia się skóry [25]. Skóra właściwa to warstwa, w której znajdują się

naczynia, krwionośne, zakończenia nerwowe, torebki włosowe i wydzielnicze części gruczołów potowych i łojowych, składa się z licznych włókien kolagenowych i elastynowych, produkowanych przez fibroblasty. To one nadają skórze odpowiednie właściwości mechaniczne, elastyczność, są współodpowiedzialne za proces termoregulacji, jak i za wiele innych funkcji. Zaburzenie produktywności fibroblastów skutkuje osłabieniem procesu odnowy skóry właściwej, a w konsekwencji staje się wiotka i podatniejsza na zranienia. Wiele uwagi przykładają się do stosowania odpowiednich kosmetyków, które mają za zadanie utrzymać właściwą aktywność fibroblastów (lub też jeśli jest już za późno dostarczyć do skóry produkty fibroblastów – np. popularne w ostatnich latach produkty zawierające kwas hialuronowy). Należy zaznaczyć, że niektóre produkty kosmetyczne mogą przyczynić się do dalszego osłabienia funkcji fibroblastów.

Apoptoza jest ważnym naturalnym procesem zaprogramowanej śmierci komórki. Niezaburzona czynnikami zewnętrznymi jest procesem pozytywnym dla organizmu wielokomórkowego, gdyż prowadzi do usunięcia z organizmu komórek zbyt licznych, szkodliwych lub uszkodzonych [26]. Inną drogą, prowadzącą do śmierci komórki, jest nekroza, czyli martwica, która zachodzi wskutek różnych nieprawidłowości lub czynników wewnętrznych.

W przeważającej większości apoptoza jest procesem fizjologicznym, w którym komórki, stanowiące balast lub zagrożenie dla organizmu (np. ich przeżycie grozi organizmowi rozwojem nowotworu), są usuwane. Ponadto apoptoza może być wywołana zarówno przez bodźce fizjologiczne, jak i patologiczne.

Mechanizm apoptozy opiera się na:

- sygnalizowaniu śmierci,
- etapie efektorowym, czyli nieodwracalnej inicjacji śmierci,
- zmianach strukturalnych,
- usunięciu pozostałości komórki i ciałek apoptotycznych [26].

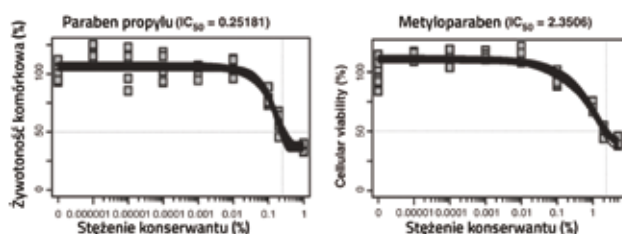
Określone sygnały apoptozy prowadzą do aktywacji odpowiednich genów, odpowiedzialnych za inicjację wewnątrzkomórkowych białek, proteaz cysteinowych, czyli kaspaz [27]. Kaspazom przypisuje się kluczowe znaczenie dla przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy, która polega między innymi na degradacji białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Ponadto cechą charakterystyczną komórek apoptotycznych jest fragmentacja DNA przez endonukleazy, które katalizują rozrywanie wiązań internukleosomalnych. Prawie równolegle dochodzi do zmian morfologicznych (np. zmiana symetrii błony komórkowej, kondensacja i agregacja chromatyny) i innych zmian biochemicznych, np. translokacja fosfatydyloseryny PS, wydzielenie cytochromu C i czynnika AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) czy wreszcie zużycie energii zgromadzonej w ATP (adenozynotrifosforan) [7]. Zaburzenia procesu apoptozy komórek mogą mieć kluczowe znaczenie dla dobra całego organizmu. Przykładem zaburzenia procesu apoptozy fibroblastów jest choroba, zwana twardziną (*scleroderma*), w której pewne czynniki blokują apoptozę fibroblastów lub ją w znacznym stopniu obniżają. Udowodniono, że zasadowy czynnik wzrostu

fibroblastów bFGF umożliwia fibroblastom z już rozpoczętym procesem apoptozy powrót do normalnego życia [28]. Taka sytuacja prowadzi do znacznego nagromadzenia kolagenu w skórze właściwej i w konsekwencji stwardnienia skóry.

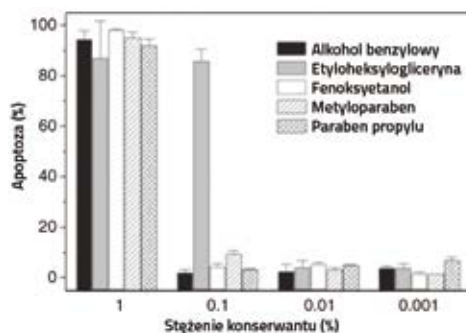
Wykazano, że paraben indukuje śmierć komórek przez apoptozę w różnych typach komórek, mianowicie w keratynocytach i fibroblastach skóry oraz w komórkach HepG2 wątroby ludzkiej [5, 6, 8] czy w szczurzych komórkach nadnerczy PC12 [10]. We wszystkich tych badaniach przeprowadzono jednak testy przy użyciu dużych dawek parabenów w zakresie 100 μ M lub więcej. Te wartości są znacznie powyżej stężeń parabenów mierzalnych w ludzkich tkankach. Ostatnie prace wykazały, że na niższym poziomie dawki parabenów, w przedziale 10 nM do 1 μ M, metylparaben ma nawet odwrotny wpływ na apoptozę komórek nabłonka [12].

Wprawdzie paraben penetrują warstwę rogową skóry, jednak metabolizm parabenów zachodzi w żywej warstwie skóry właściwej, co sprawia, że prawdopodobnie tylko 1% parabenów wnika do głębi organizmu. Udowodniono, że paraben metylowy znacząco zredukował frakcję apoptotycznych komórek, a metylparaben spowodował obniżenie (średnia redukcja wynosiła 38%) zgromadzonych endogennych reaktywnych form tlenu ROS (Reactive Oxygen Species) w komórkach [16].

Ilość danych eksperymentalnych dotyczących wpływu parabenów na procesy apoptozy fibroblastów jest niewielka. Ujawniono, że na komórki fibroblastów wpływają różne środki konserwujące, w tym paraben [29]. Na rysunkach 3 i 4 przedstawiono analizę cytotoksyczną, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w apoptozie i nekrozie komórek fibroblastów. Dawka IC50 w przypadku metylparabenu jest około dwukrotnie większa niż w przypadku propylparabenu.



Rys. 3 Wartości cytotoksyczności po 24 godzinach narażenia na osiem różnych stężeń parabenów i określenie odpowiedniego IC50. Wartości są wyrażone w procentach (średnia z sześciu eksperymentów) Źródło [30]



Rys. 4 Wartości apoptozy mierzone cytometrią przepływową po 24 godzinach narażenia na różne stężenia pięciu środków konserwujących, w tym parabenów. Wartości są wyrażone w procentach (średnia z trzech eksperymentów) Źródło: [29]

I ZAKOŃCZENIE

Nie ma jednoznacznych danych na temat wpływu parabenów na proces apoptozy komórek fibroblastów. Literatura sugeruje jedynie, że zależność taka istnieje, natomiast autorzy nie znaleźli informacji o szczegółach tego oddziaływania i jego mechanizmie. Dlatego przeprowadza się liczne badania na parabenach, w celu jednoznacznego uzyskania odpowiedzi odnośnie do ich szkodliwości.

I LITERATURA

- H. Bojarowicz, M. Wnuk, A. Bucirski: *Efektywność i bezpieczeństwo stosowania parabenów*. Problemy Higieny i Epidemiologii, 93, 2012, 647-653.
- S.C. Rastogi, A. Schouten, N. de Kruijff, J.W. Weijland: *Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products*. Contact Dermatitis, 32, 1995, 28-30.
- I.F. Nes, T. Eklund: *The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol., 54, 1983, 237-242.
- B. Er, B. Demirhan, F.K. Onurdağ, S.Ö. Özgacar, A.B. Öktem: *Antimicrobial and anti-biofilm effects of selected food preservatives against Salmonellaspp. isolated from chicken samples*. Poultry Sci., 93, 2014, 695-701.
- H. Bojarowicz, M. Wojciechowska, J. Gocki: *Substancje konserwujące stosowane w kosmetykach oraz ich działania niepożądane*. Problemy Higieny i Epidemiologii, 89 2008, 30-33.
- A.L. Cashman, E.M. Warshaw: *Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties*. Dermat. Contact Atopic Occup. Drug., 16, 2005, 57-66.
- F. Giordano, R. Bettini, C. Donini, A. Gazzaniga, M.R. Caira, G.G.Z. Zhang, D.J.W. Grant: *Physical properties of parabens and their mixtures: Solubility in water, thermal behavior, and crystal structures*. J. Pharm. Sci., 88, 1999, 1210-1216.
- H. Matsuda, K. Ito, Y. Sato, D. Yoshizawa, M. Tanaka, A. Taki, H. Sumiyoshi, T. Utsuki, F. Hirayama, K. Uekama: *Inclusion complexation of p-hydroxybenzoic acid esters with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrins. On changes in solubility and antimicrobial activity*. Chem. Pharm. Bull., 41, Tokyo 1993, 1448-1452.
- S. Pedersen, F. Marra, S. Nicoli, P.Santi: *In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations*. Int. J. Cosmet. Sci., 29, 2007, 61-67.
- X. Liao, G.S.V. Raghavan, V.A. Yaylayan: *A novel way to prepare n-butylparaben under microwave irradiation*. Tetrahedron Lett., 43, 2002, 45-48.
- F. Fujita, T. Moriyama, T. Higashi, et al.: *Methyl p-hydroxybenzoate causes pain sensation through activation of TRPA1 channels*. Br J Pharmacol, 151, 2007, 134-141.
- M.G. Kirshhof, G.C. de Gannes: *The health controversies of parabens*. Skin Ther. Lett., 18, 2013, 5-7.
- S. Oishi: *Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats*. Toxicology and Industrial Health, 17(1), 2001, 31-39.
- S.E. Cross, M.S. Roberts: *The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles*. J Invest Dermatol, 115, 2000, 914-918.
- R. Golden, J. Gandy, G. Vollmer: *A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health*. Crit Rev Toxicol, 35, 2005, 435-458.
- M. Fisher, S. MacPherson, J.M. Braun, R. Hauser, M. Walker, M. Feeley, R. Mallick, R. Bérubé, T.E. Arbutckle: *Paraben Concentrations in Maternal Urine and Breast Milk and Its Association with Personal Care Product Use*. Environ. Sci. Technol., 51, 2017, 4009-4017.
- P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope: *Concentrations of parabens in human breast tumours*. J. Appl. Toxicol. JAT, 24, 2004, 5-13.
- P.D. Darbre, P.W. Harvey: *Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status*. J. Appl. Toxicol., 34, 2014, 925-938.
- L. Renz, C. Volz, D. Michanowicz, K. Ferrar, C. Christian, D. Lenzner, T. El-Hefnawy: *A study of parabens and bisphenol A in surface water and fish brain tissue from the Greater Pittsburgh Area*. Ecotoxicol. Lond. Engl., 22, 2013, 632-641.
- M. Wojciechowska, J. Gocki, Z. Bartuzi: *Alergia na kosmetyki*. Pol. Merkuriusz Lek., 2008, 87-89.
- A.A. Fisher: *Paraben dermatitis due to a new medicated bandage: The paraben paradox*. Contact Dermatitis, 5, 1979, 273-274.
- M. Kieć-Świerczyńska, B. Kręciś, D. Świerczyńska-Machura: *Uczulenie kontaktowe na środki konserwujące zawarte w kosmetykach*. Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. Medycyna Pracy, Łódź 2006, 57.
- W. Uter, J. Hegewald, W. Aberer, F. Ayala, A. Bircher, J. Brasch, et al.: *The European standard series in 9 European countries. 2000/2000 – First results of the European Surveillance System on Contact Allergies*. Contact Dermatitis, 53, 2005, 136-145.
- A. Cashman, E. Warshaw: *Parabens. A review of epidemiology, structure, allergenicity and hormonal properties*. Contact Dermatitis, 2005, 57-66.
- S.C. Rastogi, A. Schouten, N. de Kruijff, J.W. Weijland: *Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products*. Contact Dermatitis, 32, 1995, 28-30.
- I.F. Nes, T. Eklund: *The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol., 54, 1983, 237-242.
- I. Gradzka: *Mechanizmy i regulacja programowanej śmierci komórek*. Postępy Biochem., 52, 2006, 157-165.
- B. Er, B. Demirhan, F.K. Onurdağ, S.Ö. Özgacar, A.B. Öktem: *Antimicrobial and anti-biofilm effects of selected food preservatives against Salmonellaspp. isolated from chicken samples*. Poultry Sci., 93, 2014, 695-701.
- C.M. de Carvalho, P.F.C. Menezes, G.C. Letenski, C.E.O. Praes, I.H.S. Feferman, M. Lorenzini: *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., 34, 2012, 176-182.
- A. Sip, R. Jusik: *Wprowadzanie substancji przeciwdrobnoustrojowych do opakowań*. Opakowanie, 1, 2009, 42-47.