BÜTİLPARABENİN (BUTYL 4-HYDROXYBENZOATE) PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOPATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF GENOTOXIC, HISTOPATHOLOGIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF BUTYLPARABEN (BUTYL 4-HYDROXYBENZOATE) ON PUBERTAL MALE RATS

BURCU ÖZTAŞCI

Prof. Dr. NURHAYAT BARLAS

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

BURCU ÖZTAŞCI 'nın hazırladığı "**BÜTİLPARABENİN (BÜTİL-4 HİDROKSİBENZOAT) PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Başkan

Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Danışman

Prof. Dr. Zafer AYAŞ

Üye

Prof. Dr. Arzu KOÇKAYA

Üye

Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

☑ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

☐ **Tezimin/Raporumun 05.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

06 / 07 / 2018

(imza)

Burcu ÖZTAŞCI

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gönderdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

08/06/2018

BURCU ÖZTAŞCI

ÖZET

BÜTİLPARABENİN (BÜTİL 4-HİDROKSİBENZOAT) PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOPATALOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu Öztaşcı
Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurhayat Barlas
Haziran 2018, 91 sayfa

Bu çalışmada; organik bir bileşik olan Bütilparaben (butyl 4-hidroksibenzoat)'in kozmetik ürünlerinde antibakteriyel/antifungal koruyucu olarak kullanılmasından kaynaklı oluşabilecek hasarlar ele alınmıştır. Endokrin bozucu işlevinden yola çıkılarak, Bütilparabenin pubertal dönemdeki erkek sıçanlarda genotoksik etkileri Comet testi ile ölçülmesinin yanı sıra, histopatolojik, hematolojik ve biyokimyasal analizler yapılarak da incelenmiştir.

Bu amaçla sıçanlar; pozitif kontrol (n=3), negatif kontrol (n=6) ve 6 adet doz grubu (n=6) olmak üzere sınıflandırılmış, doz grupları ile kendi içinde 14 günlük ve 28 günlük olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır.

Deney süresince hayvanların vücut ağırlıkları, günlük yem ve su tüketimleri ölçülmüştür. Deney sonlandırıldığında hayvanlardan alınan kan ve karaciğer örneklerinde Comet testi uygulanarak DNA zincir kırıklarının ölçümü amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol (mısır yağı) ve pozitif kontrol (metilmetansülfonat) gruplarıyla karşılaştırıldığında, DNA hasarının, tüm doz uygulama gruplarında kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Bununla beraber bütilparabenin bir takım genetik bozulmalara yol açabileceği sonucuna varılmıştır. Serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), glukoz, kreatinin, trigliserit ve üre analizleri yürütülmüştür. ALT-AST ve kreatinin değerlerinde gözlenen değişimler, karaciğer ve böbrek hasarıyla ilişkilendirilmiştir. Kan örneklerinde ise hematolojik analizler yapılmış ve doz gruplarına ait değerlerde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Karaciğer ve böbrek organ ağırlıkları ölçülmüş ve rölatif ağırlıkları hesaplanarak karşılaştırılmış, doku örnekleri üzerinde histolojik incelemeler yapılmıştır. Gözlenen değişimlerin negatif kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu, bütilparabenin organlardaki konjesyon ve dejenerasyonu arttırdığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bütilparaben, Genotoksisite, Comet Testi, Histopatoloji, Biyokimyasal analizler

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENOTOXIC, HISTOPATHOLOGIC AND BIOCHEMICAL EFFECTS OF BUTYLPARABEN (BUTYL 4-HYDROXYBENZOATE) ON PUBERTAL MALE RATS

Burcu Öztaşcı
Master of Science, Department of Biology
Supervisor: Prof. Dr. Nurhayat Barlas
June 2018, 91 pages

In this study, damages of using an organic compound Butylparaben (Butyl 4hydroxybenzoate) as an antifungal/antibacterial preservative in cosmetic products are being handled. Starting from the endocrine disrupting function, the genotoxic effects of butylparaben in pubertal male rats were measured by the Comet test as well as by histopathological, hematological and biochemical analyzes.
For this purpose rats divided as positive control (n=3),negative control(n=6) and 6 dose groups(n=6).Then the dose groups divided again as 14 days and 28 days.
During the experiment, animal body weights, food and water consumption were measured daily. When the experiment was ended, blood and liver specimens from animals were subjected to Comet test and measurement to detect DNA strand fractures. When the results were compared with negative control (corn oil) and positive control (methylmethanesulfonate) groups, DNA damage was observed to be increased in all dosing groups compared to the control group. With this info we concluded that butylparaben can cause a number of genetic distortions. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose, creatinine, triglyceride and urea analyzes were performed in serum samples. Changes in ALT-AST and creatinine values were associated with liver and kidney damage. Hematological analyzes were performed on blood samples and values for dose groups were increased compared to the control group. Liver and kidney organ weights were measured and relative weights were calculated and compared, histological examinations were performed on tissue samples. The comparison of the observed changes with the negative control group showed that the butylparaben increased the congestion and degeneration in the organs.

Keywords: Butylparaben, Genotoxicity, Comet Assay, Histopathology, Biochemical analysis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı destekleyen ve gerçekleşmesini mümkün kılan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne saygılarımı sunarak teşekkür ederim.

Tez çalışmamın en başından beri her aşamada bana yol gösteren ve tecrübelerine dayanarak tavsiyeler veren, yönlendiren değerli danışmanım Prof. Dr. Nurhayat Barlas'a, her danıştığımda sorularımı cevaplayan Yrd. Doç. Dr. Egemen Foto ile Araş. Gör. Dr. Fatma Zilfidar'a, elinden geldiğince her aşamada yanımda olmaya çalışan ve bana teknik bilgilerini aktaran Araş. Gör. Gözde Karabulut'a teşekkürü borç bilirim.

Bana cesaret veren ve eğitimimi sürdürmemi sonuna kadar destekleyen sevgili ailem ve özellikle babam Semih Öztaşcı'ya, her durumda yanımda oldukları, heyecanımı yenmemde başrol oynadıkları ve bana olan desteklerini asla esirgemedikleri için sevgili dostlarım Araş. Gör. Dr. Özlem Mete ve Eylül Turasan'a, ve son olarak kendisine en uzak olan konulara bile severek yetişen, en zor şartlarda bile yardımıma koşan, bir an bile bana olan inancını ve desteğini kaybetmeyen sevgili müstakbel eşim Deniz Çömezoğlu'na sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i

ABSTRACT ii

TEŞEKKÜR i

İÇİNDEKİLER iv

TABLOLAR vi

ŞEKİLLER vii

KISALTMALAR xi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. Endokrin bozucular 2

2.1.1. Parabenler 3

2.1.1.1. Kinetik veriler ve biyotransformasyon 5

2.1.1.2. Toksikolojisi 7

2.1.1.3. Kanser ile ilişkisi 9

2.1.1.4. Bütilparaben 9

2.2. DNA hasarı ölçümü ve comet analizi (mikrojel elektroforez tekniği) 14

3. MATERYAL VE YÖNTEM 16

3.1. Materyal 16

3.1.1. Kimyasal maddeler 16

3.1.2. Deney hayvanları 16

3.1.3. Laboratuvar koşulları 17

3.2. Yöntem 17

3.2.1. Deney hayvanlarının gruplandırılması 17

3.2.2. Vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları, besin ve su tüketim ölçümleri 18

3.2.3. Comet analizinin uygulanışı 19

3.2.3.1. Çözeltilerin hazırlanması 19
3.2.3.2. Lamların hazırlanması 20
3.2.3.3. Lenfosit izolasyonu 20
3.2.3.4. Hepatosit izolasyonu 20
3.2.3.5. Hücre sayımı ve canlılık testi 21
3.2.3.6. Hücrelerin lama yayılması 21
3.2.3.7. Hücrelerin lizise bırakılması 21
3.2.3.8. Alkali ile mulamele 21
3.2.3.9. Elektroforez ve nötralizasyon 21
3.2.3.10. Boyama ve değerlendirme 22
3.2.4. Histopatolojik incelemeler 22
3.2.5. Hematolojik incelemeler 22
3.2.6. Biyokimyasal incelemeler 23
3.2.7. İstatistiksel değerlendirme 23
4. SONUÇLAR 24
4.1.Vücut ve organ ağırlıkları ile besin ve su tüketimi bulguları 24
4.2. Comet analiz sonuçları 30
4.2.1. Lenfosit örneklerinde comet analizleri 30
4.2.2. Karaciğer dokusunda comet analizleri 38
4.3. Histopatolojik incelemeler 47
4.4. Hematolojik incelemeler 64
4.5. Biyokimyasal incelemeler 68
5. TARTIŞMA 72
KAYNAKÇA 84

TABLOLAR

Tablo 2.1 100 mg/kg [^{14}C] işaretli Bütilparaben verilen sıçanlarda kan/plazma radyoaktivitesinin farmakokinetik sonuçları [41] 12

Tablo 3.1 Kontrol grupları ve uygulama gruplarındaki hayvan sayıları ve uygulanan doz miktarı 18

Tablo 4.1 Yağ kontrol ve butilparaben uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlıkları ve % artış değeri (± SD) 24

Tablo 4.2 Yağ kontrol ve butilparaben uygulanan gruplara ait karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve organların rölatif ağırlıkları (± S:D) 26

Tablo 4.3 Yağ kontrol ve Butilparaben uygulama gruplarına ait günlük ortalama besin ve su tüketimi (±S:D) 29

Tablo 4.4 Lenfosit örneklerinde kontrol grupları ve 14 günlük butilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D) 31

Tablo 4.5 Lenfosit örneklerinde, kontrol grupları ve 28 günlük butilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D) 32

Tablo 4.6 14 günlük ve 28 günlük Bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerin Comet parametreleri (± S:D) 32

Tablo 4.7 Karaciğer hücrelerinde kontrol grupları ve 14 günlük Bütilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D) 38

Tablo 4.8 Karaciğer hücrelerinde kontrol grupları ve 28 günlük Bütilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D) 39

Tablo 4.9 14 günlük ve 28 günlük Bütilparaben uygulama gruplarına ait hepatositlerin Comet parametreleri (± S:D) 40

Tablo 4.10 Kontrol ve Bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer dokularının histolojik bulguları 48

Tablo 4.11 Kontrol ve Bütilparaben uygulama gruplarına ait böbrek dokularının histolojik bulguları 49

Tablo 4.12 Yağ kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları (±S:D) 65

Tablo 4.13 Yağ kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait biyokimya sonuçları (±S:D) 69

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Parabenlerin genel formülü [6] 3
Şekil 2.2 Paraben türevleri ve kimyasal yapıları [7] 4
Şekil 2.3 Uygulanan paraben dozlarına bağlı üriner metabolit seviyeleri [9] 6
Şekil 2.4 Parabenlerin insandaki metabolik yolları [15] 7
Şekil 4.1 Negatif kontrol ve bütilparaben doz gruplarının başlangıç, bitiş ağırlıkları ile kilo alım yüzdelerinin grafiği 25
Şekil 4.2 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer gerçek ağırlıkları (A) ve rölatif ağırlıkları (B) 27
Şekil 4.3 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait böbrek gerçek ağırlıkları (A) ve rölatif ağırlıkları (B) 28
Şekil 4.4 Negatif kontrol ile bütilparaben doz gruplarına ait besin ve su tüketimi grafiği . 29
Şekil 4.5 Negatif kontrol ve butilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk uzunluğu (µm) 33
Şekil 4.6 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk momenti (µm) 33
Şekil 4.7 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%) 34
Şekil 4.8 Negatif kontrol grubuna ait lenfosit 34
Şekil 4.9 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 35
Şekil 4.10 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 35
Şekil 4.11 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 36
Şekil 4.12 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 36
Şekil 4.13 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 37
Şekil 4.14 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler 37
Şekil 4.15 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk uzunluğu (µm) 40
Şekil 4.16 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk momenti (µm) 41
Şekil 4.17 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk yüzdesi (%) 41
Şekil 4.18 Negatif kontrol grubuna ait karaciğer hücreleri 42
Şekil 4.19 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..42

Şekil 4.20 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..43
Şekil 4.21 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..43
Şekil 4.22 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..44
Şekil 4.23 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..44
Şekil 4.24 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hayalet hücreleri 45
Şekil 4.25 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri..45
Şekil 4.26 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hayalet hücreleri 46
Şekil 4.27 Negatif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü..... 50
Şekil 4.28 Negatif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü..... 50
Şekil 4.29 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 51
Şekil 4.30 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 51
Şekil 4.31 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 52
Şekil 4.32 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 52
Şekil 4.33 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 53
Şekil 4.34 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 53
Şekil 4.35 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 54
Şekil 4.36 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 54
Şekil 4.37 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 55
Şekil 4.38 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 55
Şekil 4.39 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 56

Şekil 4.40 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü 56
Şekil 4.41 Negatif kontrol grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 57
Şekil 4.42 Negatif kontrol grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 57
Şekil 4.43 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 58
Şekil 4.44 14 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 58
Şekil 4.45 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 59
Şekil 4.46 14 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 59
Şekil 4.47 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 60
Şekil 4.48 14 Gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 60
Şekil 4.49. 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 61
Şekil 4.50 28 Gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 61
Şekil 4.51 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 62
Şekil 4.52 28 Gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 62
Şekil 4.53 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü 63
Şekil 4.54 28 Gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü 63
Şekil 4.55 Bütilparaben gruplarına ait lökosit (WBC), lenfosit (LYM), monosit (MİD), granülost (GRN), trombosit (PLT) ve prokalsitonin (PCT) değerlerini gösteren grafikler. 66
Şekil 4.56 Bütilparaben gruplarına ait eritrosit (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HTC), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama hemoglobin niktarı (MCH) ve ortalama hemoglobin yoğunluğu miktarı (MCHC) değerlerini gösteren grafikler 67

Şekil 4.57 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait ALT, AST, glikoz ve albümin değerleri 70
Şekil 4.58 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait kreatinin, trigliserit ve üre değerleri 71

KISALTMALAR

ADI : Zararlı etki gözlenmeden ömür boyu alınabilecek günlük doz miktarı

BP : Bütilparaben (Bütil 4-hidroksibenzoat)

ER : Östrojen reseptörü

CIR : Cosmetic Ingredient Review

FAO : Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

FDA : Food and Drug Administration

FIFRA : Federal Insecticide, Fungucide, Rodenticide Act

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LO(A)EL : (Zararlı) Etki gözlenen en düşük doz

MoS : Güvenlilik Sınırı (Margin of Safety)

NO(A)EL : (Zararlı) Etki gözlenmeyen en yüksek doz

TSCA : Toxic Substances Control Act

US-EPA : Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (United States – Environmental Protection Agency)

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (World Heath Organization)

1. GİRİŞ

Parabenler günlük yaşantımızda oldukça dikkat çeken, gıda, ilaç ve en çok kozmetik ürünlerde karşımıza çıkan antifungal ve antibakteriyel sentetik maddelerdir. Son yıllarda ortaya çıkarılan östrojen benzeri etkileri nedeniyle endokrin bozucu olarak nitelendirilmeleri, bu maddelerin güvenilirliği konusunda kamuoyunda artan bir endişeye neden olmuştur. En çok kullanılan parabenler sırasıyla; metilparaben, etilparaben, propilparaben ile bütilparabendir ve bunlar içinde östrojenik açıdan en aktif olanı bütilparabendir. Elbette parabenlerin ve bütilparabenin tek düşündürücü etkisi östrojenik etkisi değildir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, erkek bireylerde üreme sisteminde hasara, sperm sayısı ve fertilitesinde azalmaya yol açtığı, dişi bireylerde ise uterotrofik etkilere sebep olduğu gösterilmiştir. Vücutta hızlıca metabolize edilerek idrarla uzaklaştırılsa da bazı dokularda kalıntıları kaldığı gözlenmiştir. Yüksek dozlarının sindirim sisteminde rahatsızlıklara yol açtığı belirtilmiştir. Kanserli meme dokuları ile yapılan araştırmalarda karşılaşılan parabenlerin arasında bütilparaben de bulunmaktadır. Bunun yanında hem tek başına hem de başka parabenlerle kombine edildiğinde gen ekspresyonunu değiştirebildiği de saptanmıştır. Ancak bütilparabenle yapılan çalışmalar metilparaben ya da etilparabende olduğu kadar açıklayıcı değildir ve toksikoloji alanında bütilparabene ait kesin bir LOAEL ve NOAEL değeri henüz yoktur. Ayrıca parabenlerle ilgili genotoksisite çalışmaları da yetersizdir. Bu çalışmada bütilparabenle ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar gözden geçirilerek toparlanmıştır. İki farklı açıdan yürütülen 14 günlük yüksek doz ve 28 günlük düşük doz uygulamaları sonucunda farklı vücut dokularında (kan ve karaciğer) yapılan Comet testi ile bütilparabenin genotoksisitesinin araştırılması ve hematolojik, histopatolojik ve biyokimyasal analizlerle beraber etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular; yapısal benzerlikleri nedeniyle vücuttaki gerçek hormonlarla yarışarak, çekirdek reseptörlerine bağlanarak agonist veya antagonist davranarak, enzim aktivitelerini etkileyebilme, doğal hormonların biyosentez ve biyotransformasyonunu bozabilme, epigenetik seviyede davranarak kontrolsüz DNA metilasyonuna sebep olabilme veya histonlarda oluşan modifikasyonları uyararak kodlanmamış RNA'ya etki edebilme gibi farklı etki potansiyeli olan kimyasal bileşenlere denmektedir [1].

Östrojenler; düşük konsantrasyonlarda çalışan, temel görev olarak dişi üreme fonksiyonlarını düzenleyen, steroid yapılı kimyasal haberciler olarak bilinirler. Menapoz öncesi dönem boyunca ovaryumda, testosteron ve androstenodiondan sentezlenirler. Üreme dokuları dışında; kemik, beyin, karaciğer ve kardiyovasküler sistem gibi bölgelerde de etkileri görülmektedir. Canlılarda önemli hormonal sinyal görevleri olması nedeniyle diyetle beraber vücuda giren östrojen benzeri bileşikler veya östrojen ile etkileşime giren bileşikler hem erkek bireylerde hem dişi bireylerde hormonal homeostaziyi bozma potansiyeline sahiplerdir. Bu nedenle; *östrojenik etkiye sahip endokrin bozucular* olarak adlandırılırlar. Östrojenlerin, hedef hücrelerde intraselüler reseptörlere bağlanmaları ve bu şekilde transkripsiyonel faktörleri veya DNA'yı etkileyerek genomik aktivitelere yol açmaları sebebiyle; hormonal bozuklukların yanında genetik bozulmalara ve beraberinde kansere yol açma riski olduğu düşünülmektedir [2].

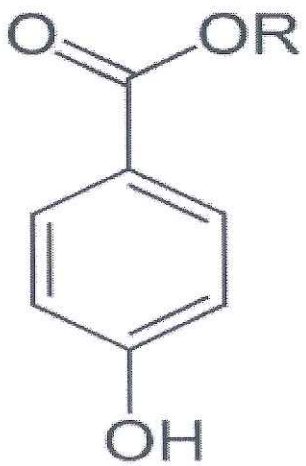
Son yıllarda görülme sıklığı artan ve çeşitlenen otoimmun rahatsızlıklardaki etkenlerden birinin de çevresel östrojenlerin ve östrojen benzeri rol oynayan yabancı maddelerin vücuda girmesi olduğu düşünülmektedir. Çevresel östrojenler ve östrojen benzeri maddeler metabolizmaya bitkisel besinler (fitoöstrojenler), hayvansal besinler (verilen ilaçlar ve hormonlar), pestisitler, plastikler, deterjanlar gibi endüstriyel ve sentetik kimyasallar (ksenoöstrojenler), ağır metaller (metalloöstrojenler) olarak veya doğum kontrol hapları, hormon tedavisi, tamoxifen vb ilaçlar çok çeşitli yollarla katılabilmektedir. Östrojen için özelleşmiş reseptörlerin bağışıklık hücrelerinin üzerinde de bulunuyor olmasından yola çıkılarak yapılan in vitro ve in vivo model çalışmalarında, bunların immünotoksik olabileceğini gösteren kanıtlar da mevcuttur [3].

Östrojen-Androjen dengesi, bütün gelişimi etkileyen hormonların merkezini oluşturur. Bu nedenle ergenlik ve ergenlik öncesi gibi kritik dönemlerde endokrin bozuculara maruziyet

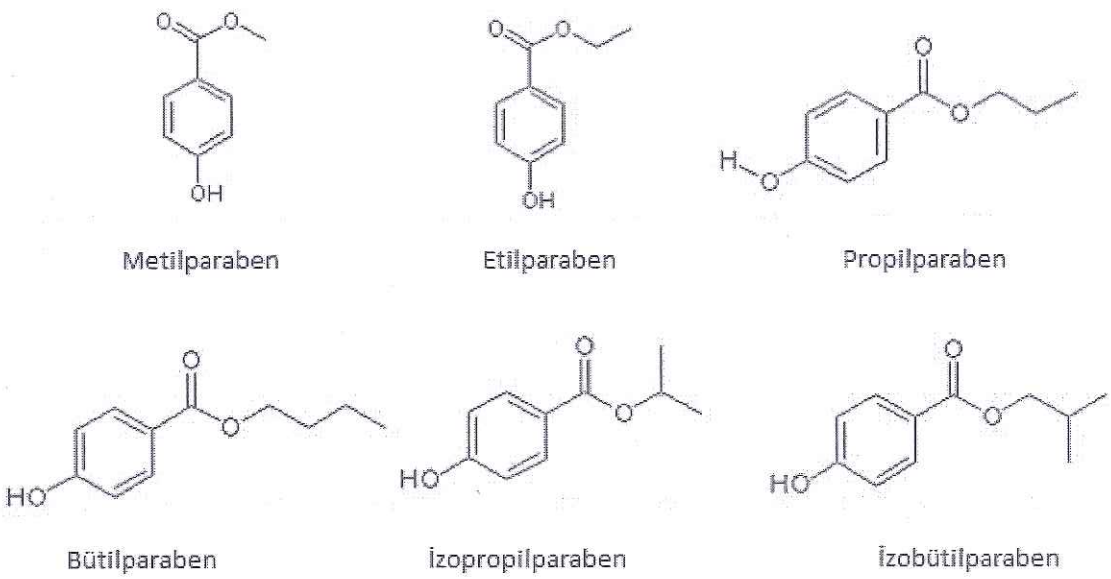
büyük önem taşımaktadır. Özellikle iki yaşına kadar olan erken çocukluk döneminde zararlı endojenler ve eksojenler olan endokrin bozucularla karşılaşmak; sinir sistemi, immun sistem, metabolizma ve endokrin sistemi olumsuz etkilediğine dair artan şüpheler ve bunları destekleyen çalışmalar hızla artmakta ve bu çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir [4].

2.1.1. Parabenler

Parabenler, organik yapılı sentetik bileşiklerdir ve p-hidroksibenzoik asitlerin (PHBA) alkil esterifikasyonuyla elde edilirler (Şekil 2.1). En çok kullanılan çeşitleri; metilparaben, etilparaben, propilparaben, bütilparaben, izopropilparaben ve izobütilparaben olarak sıralanabilir (Şekil 2.2). Metilparaben ve etilparaben doğal olarak bitkiler veya bakteriler tarafından sentezlenmektedir [5] ancak koruyucu olarak kullanılan türleri, zinciri daha uzun olması nedeniyle daha güçlü ve dayanıklı koruyucular olan propilparaben veya bütilparaben gibi türevleri de elde edilmektedir. Parabenlere insanlar, gıdalarda (E koduyla), ilaçlarda ve kozmetik ürünlerde antibakteriyel ve antifungal koruyucular olarak kullanıldıkları için sıklıkla maruz kalmaktadırlar. Antibakteriyel mekanizması; fungus ve gram pozitif bakteri türlerinin DNA ve RNA sentezini, ATPaz ve fosfotransferaz gibi enzimleri inhibe ederek, lipit tabakasını bozarak membran transport mekanizmasıyla etkileşime girerek hücre içi bileşenlerin sızmasına sebebiyet vererek çalışmaktadır [5].



Şekil 2.1 Parabenlerin genel formülü [6]

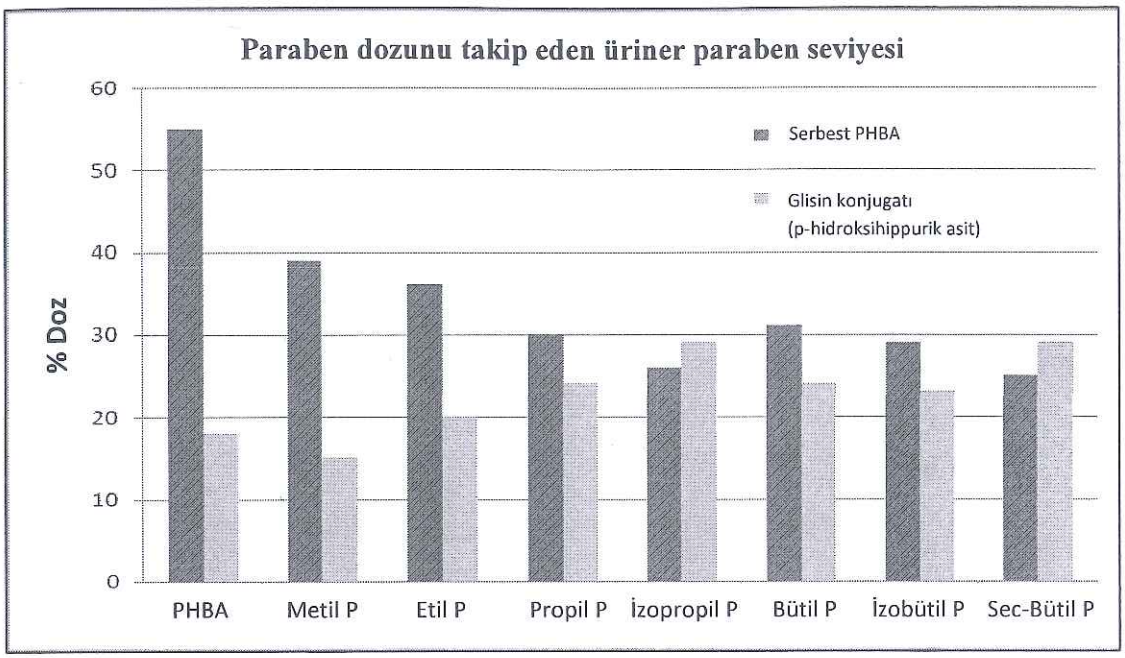


Şekil 2.2 Paraben türevleri ve kimyasal yapıları [7]

Avrupa'da kozmetiklerde kullanılan çoğu maddede olduğu gibi parabenlerin kullanımında da bir takım sınırlamalar bulunmaktadır. Tek bir paraben türü kullanılıyorsa %0,4'e kadar içeriğe katılabileceği ancak paraben karışımı şeklinde kullanılıyorsa %0,8'den fazla olamayacağı bildirilmiştir. Normal şartlarda parabenlerin gıdalarda kullanımına, sorbatlar veya sorbat ve benzoatlarla kombinlenmesi durumunda izin verilmektedir [8]. CIR Uzman Paneli'nde, parabenler için MoS değeri (Margin of Safety) yetişkinlerde günlük 1,2 mg/kg iken çocuklarda günlük 0,3 mg/kg'dır ve NOAEL değeri tüm parabenler için günlük 1000 mg/kg olarak verilmektedir. Ancak bu değerlerin sadece etilparaben ve metil paraben için doğru olduğu vurgulanmaktadır. Buna karşılık, bütilparaben, izobütilparaben ve propilparabenin zararlı etki gösteren dozlarının 1000 mg/kg'ın altında olduğu belirtilmektedir [9]. FAO, WHO ve JECFA'nın belirlediği ADI değeri ise metilparaben, etilparaben ve propilparaben için 10 mg/kg vücut ağırlığı/gün'dır. Fakat WHO tarafından 2007'de; yüksek sitotoksik etkisi sebebiyle bu üçlüden propilparaben çıkartılarak, ADI değerinin sadece etilparaben ve metilparaben için toplamda 10 mg/kg vücut ağırlığı/gün olduğu belirtilmektedir [5, 9, 10].

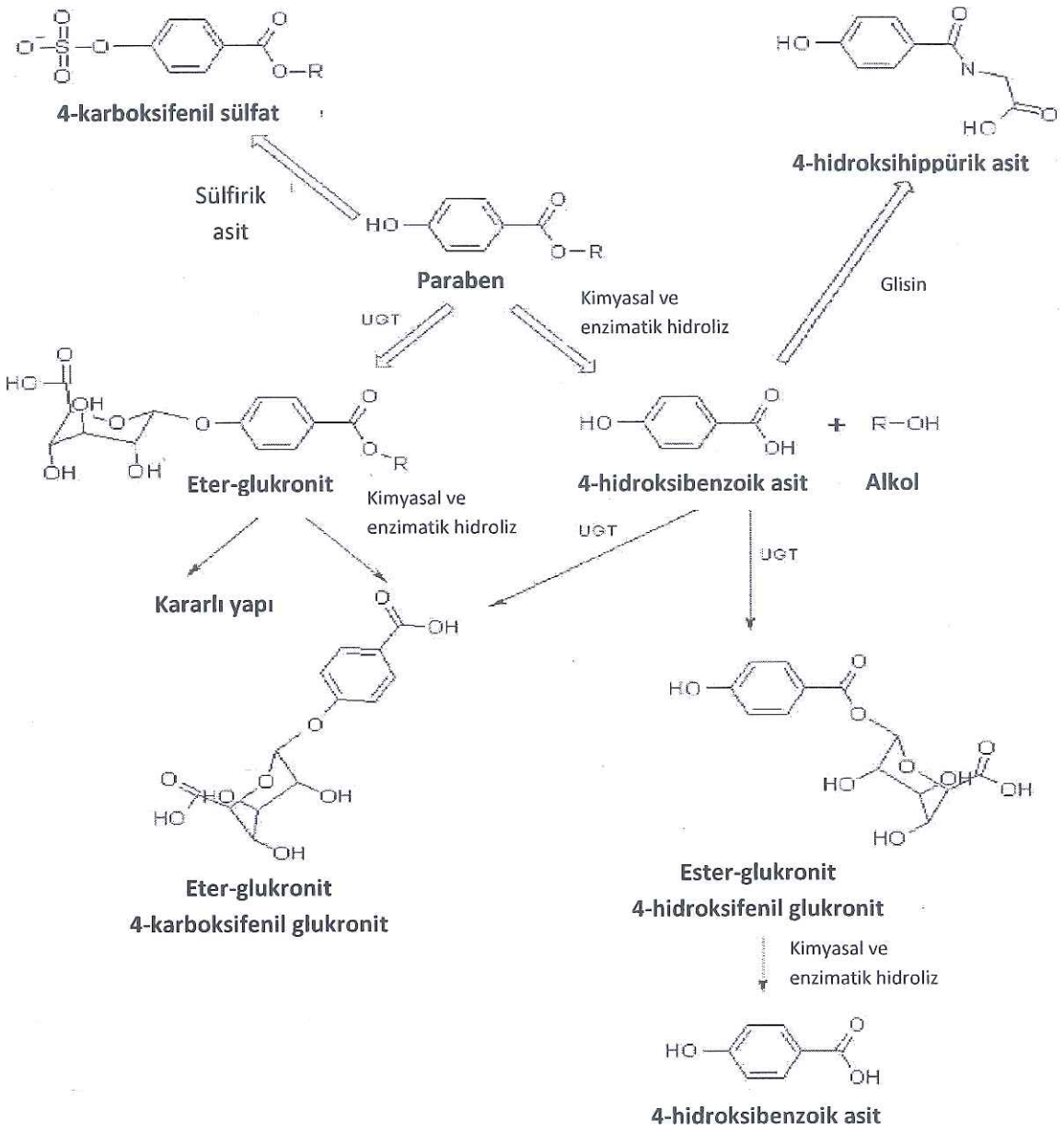
2.1.1.1. Kinetik veriler ve biyotransformasyon

Parabenler, kozmetik kremlerin deriye uygulanmasıyla veya yiyecek, içecek ve ilaçlardan oral yolla alınmasıyla dolaşıma katılırlar. Kandaki seviyeleri maruziyet derecesine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda uygulanan parabenin %90'ı vücutta metabolitlerine ayrılmış haliyle tespit edilmektedir. Vücuda alınan parabenin %50'si sülfat formunda elimine edilmektedir. En yüksek metabolit yüzdesi, serbest ve konjuge formda PHBA (parahidroksibenzoik asit)'ya aittir [11]. Genel olarak parabenler, vücutta Faz I reaksiyonunda, *p*-hidroksibezoik (pHBA) aside metabolize edilirler. Faz II reaksiyonunda ise glukronit ve sülfat konjugatları (PHHA; *p*-hidroksihippurik asit) şeklinde idrarda tespit edilirler [12]. Hidroliz işleminin karaciğer ve deride karboksilesterazlar tarafından yürütüldüğü bilinmektedir. İnsan karaciğeri mikrozomlarında, diğer sitozolik parçacıklara göre 10 kat daha hızlı parçalanan parabenlerin, sıçan karaciğerinde daha hızlı işlendiği gösterilmiştir [13]. İnsan karaciğerinde paraben hidrolizi, var olan iki tip karboksilesterazdan (hCE1 ve hCE2) birincisi olan hCE1'e bağlıdır çünkü karaciğer mikrozomlarında yüksek ekspresyona sahiptir. Kolon ve karaciğer dışındaki dokularda ise hidrolizden hCE2 sorumludur [14]. Dermal maruziyette parabenler esterazlar ile metabolize edilirler. Zincir uzunluğu arttıkça deri geçirgenliği azalsa da vücuda alınan parabenin metabolitleri kojuge edilir, idrar ve safra ile atılır. Oral yolla alımlarda ise parabenler barsak ve karaciğerde esterazlarla parçalanır, kana karışır, idrar, safra ve dışkı ile atılırlar. Bunların dışında intravenöz ya da intraduodenal olarak uygulandıklarında ise farklı bir metabolik yol izleyerek, PHBA'dan intavenöz maruziyette 2,5 kat ve intraduodenal maruziyette 5,4 kat daha fazla PHHA oluşturulmaktadır. Her ne kadar parabenlerin vücutta tamamen hidroliz edildiği belirtilse de; insan serumunda verilen paraben dozunun %0,1 kadarının bozulmadan dokularda kaldığı tespit edilmiştir [9].



Şekil 2.3 Uygulanan paraben dozlarına bağlı üriner metabolit seviyeleri [9]

Parabenler; UDP-glukronik asit kullanan UDP glukuronoziltransferazlar (UGT) katalizindeki glukuronidasyon ve esterazlar tarafından desteklenen hidroliz üzerinden metabolize edilirler. Ayrıca sülfat donörü olarak 3-fosfoadenozin 5-fosfosülfotransferazı kullanarak sülfotranseraz eşliğinde sülfokonjugatlar veya donör olarak glisini kullanan aminoasit transferaz ile 4-hidroksihippürik asit üretirler [15].



Şekil 2.4 Parabenlerin insandaki metabolik yolları [15]

2.1.1.2. Toksikolojisi

Parabenlere ilişkin toksikolojik veriler oldukça geniştir ve literatürde en çok kullanılanların genellikle düşük toksisitede olduklarından bahsedilmektedir. Bazı parabenlerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda zayıf östrojenik ve zayıf antiandrojenik aktiviteleri olduğu, endokrin bozucu bileşenler (ksenoendojen) olarak kategorize edildikleri belirtilmiştir. Uzun zincirli veya çok büyük alkil grupları taşıyanlar daha lipofilik olup östrojen reseptörlerine bağlanma konusunda daha güçlülerdir. Ancak düşük biyoakümülasyon potansiyelleri nedeniyle güvenli kabul edilmektedirler [14]. Sadece östrojen benzeri değil, glukokortikoid benzeri

aktivite gösterdikleri gözlenmişse de bu etkilerin çok düşük seviyelerde kaldığı için zararlı olmayacağı sonucuna varılmıştır [16].

Yapılan *in vivo* çalışmalarda genel olarak paraben uygulanan erkek sıçanlarda sperm sayısında ve testosteron seviyesinde doza bağımlı azalma gözlendiği için sonuçlar zararlı etki olarak değerlendirilmektedir [17, 18, 19]. Östrojenik aktivitesine dayanarak, gelişen spermatogenik hücreleri ve sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler arasındaki ektoplazmik özelleşmeyi olumsuz etkilediği saptanmıştır [20]. Tüm parabenlerin in vitro olarak spermisidal aktivitesi de gözlenmiştir. Önceleri zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne yol açtığı belirtilmişse de sonraları parabenlerin aslında mitokondrial permeabilite transportasyon (MPT) porlarını açarak mitokondrinin şişmesine neden olduğu için apoptozu indükleyebileceği sonucuna varılmıştır [21]. Ancak gebe sıçanlara uygulanan parabenlerin gelişimde herhangi bir zararlı etkisine rastlanmamıştır [22, 23]. Buna karşın, hamile kadınlardan alınan plazma numunelerinin %59'unda metilparaben, %22,2'sinde etilparaben ve %81'inde propilparaben bulunurken; kordon kanı numunelerinin %63'ünde metilparabene ve %55,6'sında ise propilparabene rastlanmıştır (n=27). Buna bağlı olarak propilparabenin kordon kanı testosteron seviyesiyle negatif ilişkili olduğu saptanmıştır [24]. Uterotrofik çalışmalarda ise metil-, etil-, propil-, bütilparaben ve PHBA ile yapılan çalışmalar sonucunda, parabenlerin uterotrofik etkisi olduğu bildirilse de her bir paraben ile ilgili çalışmanın en az birinde negatif sonuca ulaşıldığı belirtilmektedir [9]. Lemini ve arkadaşları, östradiol ile karşılaştırılan parabenlerin çeşitlerine göre 14286 ila 33333 kat daha zayıf uterotrofik aktivitede olduklarını bildirmelerinin yanında yine de aktivite potansiyellerinin yüksek olduğunu belirtmektedirler [25].

Mayalar ile yapılan testlerde metilparaben, etilparaben, propilparaben ve bütilparabenin östrojenik aktivitede pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir [26]. Parabenlerin östrojenik aktivitesi, *in vitro* çalışmalarda alkil esterlerin dallanmasıyla ve uzunluğunun artmasıyla birlikte artarken, *in vivo* çalışmalarda bu durum kesin olarak kanıtlanmamıştır [9, 27]. Parabenlerin östrojen reseptörüne bağlanma aktivitesi; 2-etilhekzilparaben > heptilparaben > benzilparaben > bütilparaben > propilparaben = etilparaben > metilparaben şeklindedir [8]. Ayrıca; hidrofobik yapı ile ER (östrtojen reseptörü) bağlanma aktivitesi arasında lineer bir korelasyonun varlığı görülmektedir. Parabenler, ER-α ve ER-β'nın ikisini de benzer şekilde indüklemekte fakat ER-α üzerinde daha kuvvetli etkileri bulunmaktadır [28]. Parabenlerin doğal östrojen etkilerini; östrojen reseptörlerine bağlanıp, ER-bağımlı hücre büyümesini ve östrojen-bağımlı genlerin ifadesinin etkisini arttırarak taklit ettiği

belirtilmiştir [29]. Östrojen aktivitesinin, kataliz sülfat konjugasyonu ve serbest östrojeni salgılayan sülfatazlar olan sulfotransferazlar (SULTs) arasındaki dengeyi kurmasına dayandırılarak; parabenlerin başka bir etkisinin de sulfotransferazların (SULT) inhibisyonu olabileceği belirtilmiştir [30]. Her ne kadar parabenlerin östrojen aktivitesini taklit ettiğiyle ilgili bulgular olsa da çeşitli çalışmalarda ER'ye karşı bağlanma affinitesinin zayıflığına dayanarak, parabenler zayıf östrojenler olarak nitelendirilmiştir [31].

2.1.1.3. Kanser ile ilişkisi

Parabenlerin, kemirgen uterus dokusu ve MCF7 meme kanser hücrelerindeki östrojen reseptörlerine bağlandıklarına ve östrojen duyarlı haberci genler ile progesteron reseptörünün ekspresyonunu düzenlediği bilgisine ulaşılmıştır. İncelenen meme tümörlerinde maruziyet şekli, yaşam tarzı ve alınan paraben seviyesine bağlı paraben birikimlerine rastlanmasının ardından, parabenlerin meme kanseri için potansiyel bir tehdit olabileceği belirtilmiştir. İnsan meme tümörlerinde; kozmetik (antiperspirantlar), gıda ve ilaçlarda bulunan parabenlerin absorbe edilerek vücut dokusunda hidroliz edilmeden biriktiği belirtilmiştir. Tümör örneklerinde paraben yoğunluğu sırasıyla; metilparaben, propilparaben, bütilparaben, etilparaben ve izobütilparaben şeklinde tespit edilmiştir [27], [32].

Paraben maruziyetine cevap olarak, ER-α ekspresyonu artmaktadır. Birçok meme kanseri vakasında, ER-α ifadesi, hastalığın ilerleyişine katkıda bulunmaktadır. Diğer yandan, sağlıklı hücrelerde de paraben maruziyetine bağlı ER-α artışının gözlenmesi, meme kanseri riskini arttırabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Parabenlerin aromataz inhibitörü olduğu da düşünülmektedir. Endokrin bozucu bileşenler, aromatazlara bağlanıp inhibisyona neden olduklarında, testosteronun östrojene dönüşümü azalmakta, bu da beraberinde anti-östrojenik etkiyi ortaya çıkarmaktadır. İnsan plasentasından izole edilmiş mikrozomlara uygulanan metilparaben, etilparaben, bütilparaben, izopropilparaben ve izobütilparabenin, aromataz enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir. Aromataz aktivitesinin inhibisyonunda ise %55'lik bir oranla bütilparaben önde gelmektedir [33].

2.1.1.4. Bütilparaben

Bütilparaben; p-hidroksibenzoik asitin (pHBA) 1-butanol ile sülfürik asit gibi bir asit katalizörü eşliğinde meydana gelen esterifikasyon ile hazırlanır. Kristal, pudra şeklinde, ufak, renksiz/beyaz renkli ve kokusuz olup 68-69°C'de erir. Suda çözünürlüğü ise düşüktür. Aseton, alkol, eter, kloroform ve gliserinde biraz daha fazla çözünür. Diğer parabenler gibi,

bazı yiyeceklerde, içeceklerde, kozmetik ürünlerde ve ilaç formülasyonlarında koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Düşük iyonik kuvvetli salinler gibi solüsyonlarda (LISS) çözdürülerek ticari olarak hazırlanır. Mikrobiyal gelişimi geciktirir. Bu anlamda en iyi etkiyi küf ve mantar oluşumuna karşı gösterir. Bakteriyel oluşumlara karşı aktifliği daha düşüktür. Diğer parabenlerle karşılaştırıldığında, bütilparaben, en iyi antifungal ajan olarak nitelendirilir.

Bütilparaben'in kullanımı, TSCA ve FIFRA altında US-EPA tarafından düzenlenmektedir. FDA tarafından da kontrol edilmekte ve sentetik koruyucular olarak ürünlerde kullanılacakları miktarlar sınırlandırılmaktadır. Ayrıca, 1998 yılında pestisit statüsünün iptal edilmesiyle tatlandırıcı ve koruyucu olarak bugün hala oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. EFSA; ADI değerinin 10 mg/kg/gün olmasını, metilparaben, etilparaben ve bunların sodyum tuzlarının NOAEL değerlerinin 1000 mg/kg olmasından ötürü kabul etmiş ancak bütilparaben ve propilparaben hakkında net bir NOAEL değeri olmadığı için ADI değerini belirleyememiştir [10, 34].

2003'de JECFA tarafından, bütilparabenin koruyucu ajan olarak düşük seviyelerde kullanılabilirliği açıklanmış, bunun üzerine Japonya'da yiyeceklere ve biraya mikrobiyal büyümeyi engellemek üzere eklenmeye başlanmıştır. Tayvan'da yapılan incelemelerde sirke (102 µg/ml'ye kadar), soya sosu (243 µg/ml), turşu suyu (209 µg/ml) ve balık soslarının (163 µg/ml) içinde bütilparabenin çoğunlukla bulunduğu, ayrıca diğer bir çok parabenin varlığı da saptanmıştır [35]. Bütilparabenin en yüksek değerleri; sağlık içeceklerinde 106,8 µg/ml (549,8 µM) ve tonik içeceklerde 120,1 µg/ml (618,3 µM) şeklindedir ve koruyucular için belirlenen 100 µg/ml'lik limiti aşmaktadır [36].

Bütilparaben, ürünlerde tek başına kullanılabileceği gibi bir paraben karışımı içerisinde de temsil edilebilmektedir. Aslında karışım şeklindeki haline, kişisel bakım ürünlerinde daha sık rastlanmaktadırlar. En çok rastlanılanlar; Phenonip (%60-80 fenoksietanol içeren paraben karışımı) ve LiquaPar Oil (%30 Bütilparaben, %30 İzoBütilparaben ve %40 İzopropilparaben)'dir [8]. 1981'de FDA, Bütilparabenin 693 kişisel bakım ürününde %5'lik konsantrasyonlara kadar kullanıldığını bildirmiştir. Bu ürünler arasında; bebek losyonları, banyo ürünleri, makyaj malzemeleri, saç boyaları, manikür-pedikür ürünleri, traş kremleri, cilt bakım losyonları, güneş yağı ve kremleri, kişisel hijyen ürünleri, bebek ürünleri ve kokular bulunmaktadır [37]. 2005'de yayınlanan toksikolojik raporda ise, tüm kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin %48'inin propilparaben ve metilparaben, %13'ünün ise

bütilparaben içerdiği ve konsantrasyonunun >%0,1-%1 aralığında olduğu belirtilmektedir [8]. Günümüzde piyasaya sürülen ürünlerde parabensiz ifadelerine rastlanmasına karşın birçoğunun doğru etiket olmadığı, belirtilen limitlerin altında olsa da paraben içermeye devam ettiği bildirilmiştir. Avrupa Birliği'nde kişisel bakım ürünlerinde en fazla %0,8 oranında paraben içermesine izin verilmektedir. Buna bağlı olarak, LiquaPar yağı karışımı kullanılan bir üründe %0,24 oranında bütilparabene rastlanmıştır. Ancak, LiquaPar yağının %0,3-0,6 oranında eklenmesi tavsiye edilir ki bu da bütilparaben aralığının ürünlerde %0,09-0,18 civarında olması demektir. Danimarka'daki market ürünlerinin %77'sinde ölçülen paraben seviyesi %0,01-0,87 civarındadır ve bu ürünlerde rastlanan maksimum bütilparaben konsantrasyonu ise %0,07'dir [38]. Bütilparabene kişisel bakım ürünlerinden kaynaklı maruziyet, günlük ≤260 µg/kişi/gün'dür. Japonya'da ise izin verilen maksimum paraben konsantrasyonu %1'dir. Dolayısıyla; paraben karışımı içeren ürünlerde bütilparaben konsantrasyonu %0,3'tür.

Bütilparabene maruziyet, ürün kullanımında bebek ve çocuklarda, yetişkinlerden 1,5 kat daha fazladır [39]. Paraben içeren cilt bakım ürünlerinin prematüre bebeklere uygulanmasıyla ortaya çıkan maruziyet, tamamlanmamış epidermal gelişim ve deri absorbsiyon bariyerinin yetersizliği nedeniyle, beklenenden daha fazla olmaktadır. Bütilparaben, tek başına veya metilparaben ve/veya propilparabenle beraber ilaçlarda kullanılabilir. Reçetesiz merhemlerde, dıştan kullanılan antibiyotiklerde ve antiseptik spreylerde koruyucu olarak kullanılır. Solunum yoluyla alındığında irritasyon, öksürük ve nefes darlığına yol açtığı, yüksek dozlarda oral yolla alındığında gastrointestinal yolda irritasyona neden olduğu, göze ve cilde temasında irritasyon, kırmızılık, acı ve kaşıntıyla beraber alerjik reaksiyonlara sebebiyet verdiği belirtilmiştir [8].

Kişisel bakım ürünleri dışında, sprey ve aerosol gibi ev ürünlerinin birkaçının bütilparaben içerdiği, bununla beraber ev içi hava ve toz partiküllerinde de bütilparabene rastlandığı belirtilmiştir. Özellikle pudra ve aerosoller, evlerdeki tozlarda rastlanan yüksek konsantrasyonlu bütilparabenin başlıca nedenidir (yüksek konsantrasyon olarak 0,2 ppm'in üzeri kabul edilmiştir). Bir diğer nedeni ise, bütilparaben içeren ürünlerin uygulandığı vücut veya saç derisinde meydana gelen döküntülerdir [40].

Bütilparaben, diğer tüm parabenler gibi, oral mukozadan pasif olarak hızlıca emilir ve gastrointestinal yola geçer. Bağırsak ve karaciğerde esterazlarla *p*-hidroksibenzoik aside hidroliz edilir ve glisin, glukronit veya sülfat konjugatları şeklinde bağlanarak hızlıca idrar,

safra ve dışkı ile atılır. Kronik çalışmalarda da vücutta akümüle olmaz ve hızlıca kandan temizlenir [9, 12]. Tavşanlara oral olarak verilen Bütilparabenin esterlerinin %0,2-0,9'u 24 saatte atılmaktadır. %25-39'u 4-HBA, %15-29'u p-diroksihippürikasit, %5-8'i p-karboksifenil glukronit, %10-18'i p-hidroksibenzoil glukronit ve %7-12'si p-karboksifenil sülfat olarak elde edilmektedir [8]. Dermal uygulamadan 6 saat sonra kandaki maksimum seviyesine ulaşan Bütilparabenin 22 –24 saat sonra, oral gavaj uygulamasından 30 dakika sonra kandaki maksimum seviyesine ulaşarak 12 saat sonra kandan tamamen temizlendiği bildirilmiştir. 24 saat içinde idrarla vücuttan uzaklaştırılan Bütilparaben miktarı erkek sıçanlarda %76 iken dişi sıçanlarda %69,6'dır. Subkutan uygulamada ise kandaki maksimum seviyesine erkek sıçanlarda 2 saatte, dişi sıçanlarda 4 saatte ulaşmaktadır ve 12 saat sonunda ise kandan tamamen temizlenmektedir [41].

Tablo 2.1 100 mg/kg [^{14}C] işaretli Bütilparaben verilen sıçanlarda kan/plazma radyoaktivitesinin farmakokinetik sonuçları [41]

Uygulama	Cinsiyet	C_{max} (ng eq/mL)	t_{max} (h)	AUC_{0-t} (ng eq h/mL)
Oral	D	15229	0,5	73585
Oral	E	21040	0,5	99336
Dermal	D	986	1	12216
Dermal	E	614	8	9760
Subkutan	D	6501	2	52033
Subkutan	E	12190	4	88917

C_{max}: bütilparabenin kanda ulaştığı maksimum konsantrasyon, t_{max}: bütilparabenin kandaki maksimum konsantrasyona ulaşma süresi, AUC_{0-t}: bütilparaben vücuttan tamamen atılıncaya kadar gözlenen toplam konsantrasyonu

Genel olarak parabenlerin düşük endokrin bozucu etkilerinden bahsedilse de yüksek dozlarda maruziyet sonucunda toksik etkilere yol açtığı belirtilmektedir. Fare, sıçan ve köpeklerde Bütilparabenin akut toksisitesi düşüktür. Ana etkisi, akut miyokardial çöküntüye eşlik eden geçici hipotansiyondur. Farelerde, ölümcül olmayan dozlarda, 30 dakika içinde toparlama görülürken yüksek ve ölümcül dozlarda 1 saat içinde ölüm gözlenmektedir. Gönüllü insanlarla yapılan testlere göre ise; %5 oranında Bütilparabenin beş günlük ve üç haftalık uygulamaları herhangi bir irritasyona neden olmamaktadır. Farelere kronik olarak uygulanan yüksek doz Bütilparabenin erkek bireylerin %45'inde, dişi bireylerin ise %27'sinde dalak, timus, lenfoid dokularda ve lenf nodüllerinde atrofi gözlenmiştir. Karaciğer parankimasında ise multifokal dejenerasyona ve nekrozlara rastlanmış, 78. haftadan sonra ise tömüre bağlı ölümler gözlenmiştir [8]. İzole edilen sıçan hepatositlerine uygulanan Bütilparaben, hücrelerin %88'inin ölümüne ve neredeyse hücresel ATP'nin

tamamının tükenmesine, adenin nükleotit havuzunun ve mitokondriyal membran potansiyelinin %60'lara kadar düşmesine sebebiyet vermiştir. Bütilparabenin *in vitro* olarak tromboksen (TXB2) sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiği ve platelet fonksiyonunu baskıladığı belirtilmiştir. Uyarılmış periferal insan lenfositlerinde test edilen parabenler arasında lizozomal enzimlerin inhibisyonunu sağlayan en aktif bileşik Bütilparaben olarak tespit edilmiştir [42].

Parabenlerin potansiyel olarak etki ettiği endokrin sinyallerinin adiposit dokuda farklılaşmaya yol açabileceğini hipotez eden bir çalışmada; Bütilparabenin doza bağlı bir şekilde adiposit farklılaşmasını stimüle ettiği gözlenmiştir. Endokanabionid enzim FAAH'ı inhibe ederek gerçekleştirdiği bu etkinin obeziteye yol açma potansiyelinin olduğu bildirilmiştir [43].

Bütilparaben, tüm paraben türevleri arasında östrojenik aktivitesi en yüksek olan bileşiktir. Ancak Bütilparabenin östrojenik etkisi, doğal östrojen 17β-Estradiol tarafından sağlanan östrojenik etki ile karşılaştırıldığında 5 kat daha zayıf etki gösterir [23]. Mayalarda yapılan *in vitro* östrojen testlerinde Bütilparaben zayıf östrojen olarak çıkmasına karşın diğer kısa zincirli parabenlere göre en aktif olandır [26]. Sütten kesilmiş yavru erkek sıçanlara 8 hafta boyunca diyetle verilen Bütilparaben, kaudal epididimal sperm rezervinde, testiste günlük sperm üretiminde ve serum testosteron konsantrasyonunda azalmaya neden olmuştur [19]. Farelere 10 hafta boyunca diyetle uygulanan Bütilparaben ise, epididimis ağırlığında artışa, serum testosteron konsantrasyonunda düşüşe, seminifer tübüllerde yuvarlak ve uzamış spermatit sayısında azalmaya neden olduğu ve bu sayım içinde en büyük azalma oranının uzamış spermatitlerde görüldüğü belirtilmiştir [17]. Olgunlaşmadan kısırlaştırılmış dişi sıçanlara 3 gün boyunca enjeksiyonla subkutan verilen Bütilparaben, uterus ağırlığında artışa neden olmuştur [44].

Gebe sıçanlara uygulanan Bütilparaben, doğumdan 21 gün sonraki testlerde doza bağlı olarak ER-α ve ER-β ekspresyonunu azaltırken, 90 gün sonraki testlerde arttırmıştır. Bunun nedeninin de PND 49 ve 70. günlerdeki gen ifade düzeninin farklı olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. PND70'de ise ER-α iki dozda da artmış, ER-β iki doz grubunda ise azalmıştır [45]. MCF-7 hücrelerinde parabenler ile yapılan gen ekspresyonu testlerinde, alkil zincir uzunluğunun artması parabenin gen ekspresyonu aktivitesini artırdığı belirtilmiştir. Bütilparabenin (R=0,60) propilparaben (R=0,74) ile benzerlik göstererek metilparaben ve etilparabene göre daha fazla gen ekspresyonuna etki ettiği gözlenmiştir [46].

Salmonella typhimurium suşlarında yapılan Ames testlerinde 1000 mg'a kadar uygulanan Bütilparabenden negatif sonuçlar alınmıştır [8]. Japonya'da yapılan çalışmalarda *Salmonella* için Bütilparabenin mutajenik etkisinin olmadığı ancak *Bacillus subtilis'in* iki suşu ve *Escherichia coli'nin* bir suşu için mutajenik olduğu sonucu elde edilmiştir. Buna ek olarak, Bütilparabenin; *E.coli* ve *B.subtilis'te* DNA, RNA ve protein formasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir [47]. Çin hamster hücreleriyle yapılan *in vitro* bir çalışmada Bütilparabenin poliploid hücre üretimini %1-3 oranda arttırdığı; bununla beraber kromatid kırıklarını ve boşluklarını, kromozomal değişimleri ve halka formasyonunu içeren bozukluklara neden olduğu belirtilmiştir. Çin hamsterinden izole edilen hücre hattı, CHO-Ki ovaryum hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise mutajenik olmadığı sonucuna varılmıştır [8].

Yapılan bir *in vivo* çalışmada, akut olarak uygulanan Bütilparabenin mide, kolon, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliğinde yapılan Comet (SCGE) tekniği ile DNA hasarı belirteci olarak kuyruk göçüne bakılmış ve herhangi bir arttırıcı etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır [48]. Bir diğer *in vivo* çalışmada ise 28 günlük Bütilparaben uygulamasının testis, epididimis, kuyruk ve spermde DNA metilasyonuna etkisi incelenmiştir. DNA metilasyonu dokuya özgü transkripsiyonun düzenlenme mekanizmasını da içeren birçok hücresel işlemi kontrol etmektedir. Metilasyonun engellenmesi; sperm döllenme yeteneğinde azalmaya, embriyonik gen ekspresyonunun değişmesine ve implantasyon öncesi embriyo kaybının artmasına yol açmaktadır. Çalışma sonucunda Bütilparabene maruz kalan örneklerde sperm DNA'sında hipermetilasyon gözlenmiştir ancak hiçbir dokuda ve spermde metilasyon azalmasına yol açmamıştır. DNA'da hipermetilasyonun ER-α ekspresyonu artışıyla ilişkili olduğu düşünülürse, genetik hasar ve östrojenik aktiviteye uzanan bulgular akla gelmektedir. Bununla beraber, Bütilparabenin sıçan epididimal sperm DNA'sı üzerinde epigenetik etkisi olduğu kanıtlanmış ve indüklediği DNA hipermetilasyonunun DNA hasarıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür [49].

Bu verilerden yola çıkılarak çalışmamızda, Bütilparabenin yüksek dozlarda 14 ve 28 günlük uygulama sonunda DNA zincir kırıklarına etkisi olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. DNA hasarı belirteci olarak kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk DNA yüzdesi seçilmiştir.

2.2. DNA hasarı ölçümü ve Comet testi (mikrojel elektroforez tekniği)

DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin kullanıldığı testlerden en sık başvurulan Sister Chromatid Exchange (SCE) ve Microel Electrophoresis (MGE) olarak da adlandırılan

Comet Assay yöntemidir. Bu yöntemle DNA tek ya da çift sarmal kırıklarının saptanması için kullanılan, oldukça hassas ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Comet yönteminin, yaşlanmadan, genotoksisiteye, ekogenotoksisiteye ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji alanında uygulamaları vardır. Comet yönteminde teknik olarak agarozda süspanse edilen hücreler lam üzerine yayılır, yüksek tuz ve deterjanla lize edilir ve böylece hücrelerin DNA'yı barındıran çekirdekleri kalır. Ardından elektroforeze tabi tutulur. Eğer DNA hasarlıysa ve kırıklar içeriyorsa, çekirdekler anoda doğru göç ederek bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Bu nedenle hasarlı hücrelere "Comet" adı verilmiştir. İşlem sonunda akridin oranj, etidyum bromid gibi DNA bağlayıcı floresan boyalarla DNA'nın süper-sarmal hali açılarak boyanır ve Comet gözlenir. Düşük maliyeti ve uygulama kolaylığı nedeniyle son zamanlarda sıklıkla tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir [50, 51, 52].

Alkali ve nötr olmak üzere iki versiyonu mevcut olan Comet Testi'nde pH değişiminin zincir kırıklarını tespit etme hassasiyetine bir etkisi yoktur. Alkali yöntemin özelliği, oluşan kuyruğun daha belirgin olması ve daha net ölçüm yapılmasını sağlamaktır. Nötr yöntemde ise hasar ölçüm genişliği artarken çift zincir kırıkları ölçülebilir hale gelmektedir ancak hassaslık azalmaktadır [52].

DNA hasarı ölçümlerinde birçok parametre bulunmaktadır. Bütilparaben ile ilgili yapılan tek in vivo çalışmada hasar ölçümü için kuyruk DNA göçü parametresi ele alınmıştır [48]. Bu çalışmada ise OECD *in vivo* Comet Assay test yönteminin izlenmesi nedeniyle; DNA hasarının ölçümü için kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yüzdesi parametrelerini kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan %99 saflıkta Bütilparaben (Bütil 4-hidroksibenzoat) Sigma firmasından temin edilmiştir. MS9-5 veteriner amaçlı kan sayım cihazı ile uyumlu kit kullanılarak hematolojik analizler yapılmıştır. Biyokimyasal analizler Spinreact Diagnostic (İspanya) firmasından temin edilen ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz), Üre, Albümin, Trigliserit, Kreatinin ve Glikoz kitleri kullanılarak yapılmıştır. Comet testi için kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar ise aşağıdadır;

- DMSO (Sigma aldrich)
- NaCl (Sigma aldrich)
- NaOH (Sigma aldrich)
- HCl (J.T.Baker)
- Histopaque 1077 (Sigma aldrich)
- Etidyum Bromide (Sigma aldrich)
- Triton-X 100 (Sigma aldrich)
- EDTA (Sigma aldrich)
- Trizma Baze (Tris) (Sigma aldrich)
- Yüksek Erime Dereceli Agaroz (YEDA) (Sigma aldrich)
- Düşük Erime Dereceli Agaroz (DEDA) (Sigma aldrich)
- Fosfat Tambon Tabletleri (PBS) (Sigma aldrich)
- Tripan Blue çözeltisi (Sigma aldrich)
- Saf Etanol (Sigma aldrich)
- Metilmetansülfonat (MMS) (Sigma aldrich)

3.1.2. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, pubertal dönemdeki erkek sıçanların Bütilparabene (Bütil 4-hidroksibezoat) maruziyeti sonucu meydana gelebilecek genotoksik, histopatolojik ve biyokimyasal etkilerin incelenmesi amacı ile kullanılacak 6 haftalık Wistar albino (*Rattus norvegicus*) sıçanlar, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden, Hacettepe Üniversitesi

Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan B.30.2.HAC.0.05.0.6.00/132 sayılı izniyle temin edilmiştir.

3.1.3. Laboratuvar Koşulları

Deney süresince; laboratuvar sıcaklığı ortalama 22,4±1,6°C, nisbi nemi 47,2±1 olarak ayarlanmıştır. Fotoperiyot 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde, zaman ayarlayıcı ile sabitlenmiştir. Çalışmada, boyutları 20x40x22 cm olan ızgara kapaklı, temiz, polikarbonat, otoklavlanabilir kafesler kullanılmıştır. Çalışma süresince hayvanlara içme suyu olarak günlük 500 ml çeşme suyu ve 250 g standart sıçan yemi verilmiştir. Günlük olarak yem ve su tüketimleri ölçülerek kaydedilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Hayvanlarını Gruplandırılması

Bu çalışmada 489 Nolu OECD Test Modeli izlenmiştir [53]. 45 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmış ve sıçanlar, her grupta 6 adet erkek sıçan olacak şekilde, gruplara rastgele dağıtılmıştır. Bütilparaben; 80 µl %10'luk etanol içinde çözdürülerek 1 ml mısır yağı içinde süspanse edilmiş (kontrol grubu da dahil) ve gavaj yoluyla verilmiştir. Sıçanlar, her grupta 6 adet (MMS grubunda 3 adet) erkek sıçan olacak şekilde rastgele dağıtılmıştır. Gavaj yoluyla sadece mısır yağı verilen 14 günlük negatif kontrol grubu, diseksiyondan 24 saat öncesinde intraperitonal yolla genotoksik bir ajan olan metilmetansülfonat (MMS) enjeksiyonu (60 mg/kg) yapılan pozitif kontrol grubu, 200 mg/kg/gün, 400 mg/kg/gün ve 800 mg/kg/gün uygulama dozlarında 14 gün ve 100 mg/kg/gün, 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün uygulama dozlarında 28 gün boyunca her gün aynı saatte (aydınlık periyodun ilk yarısından sonra) gavaj yoluyla mısır yağında çözdürülmüş Bütilparaben uygulaması yapılan 6 adet uygulama grubuyla birlikte toplam 8 grup belirlenmiştir (Tablo 3.1). Uygulama grupları için belirtilen dozlar, artan dozlarda etki derecelerini göstermek için, daha önce yapılan benzer çalışmalar ve kimyasalların toksikokinetik özellikleri göz önüne alınarak seçilmiştir. Lenfosit ve karaciğer hücreleri üzerindeki genotoksik etkiyi gözlemlemek için OECD 489 Nolu Test Metodundaki tablodan yararlanılmış ve MMS seçilmiştir. MMS için genotoksik etki görülen doz, önceki çalışmalar referans alınarak 60 mg/kg olacak şekilde uygulanmıştır.

Tablo 3.1 Kontrol grupları ve uygulama gruplarındaki hayvan sayıları ve uygulanan doz miktarı

Gruplar	N	Dozlar
14 Gün		
Negatif Kontrol Grubu (Mısır Yağı)	6	1 ml
Pozitif Kontrol Grubu (MMS)	3	60 mg/kg
14 Gün		200 mg/kg/gün
Bütilparaben (BP)	6	400 mg/kg/gün
		800 mg/kg/gün
28 Gün		100 mg/kg/gün
Bütilparaben (BP)	6	200 mg/kg/gün
		400 mg/kg/gün

N: Hayvan sayısı
MMS: Metilmetansülfonat

Karaciğer hücrelerinin yenilenme sürecinin ve lenfositlerin ömrünün genotoksisiteye etkilerinin gözlemlenebilmesi için 14 ve 28 günlük iki ana doz grubu belirlenmiştir. Dozların birbirlerinin iki katı olarak değişmesinin sebebi ise 14 günlük yüksek doz maruziyetinin etkileri ile 28 günlük düşük doz maruziyetinin etkilerinin gözlenmesi ve karşılaştırılmasının amaçlanmasıdır. Kandaki lenfositlerin 14 gün ömrünün olmasının ve karaciğerin de rejenerasyon yeteneğinin göz önüne alınarak, etkilerin değerlendirilebilmesi için 14 ve 28 gün uzunluğunda deney grupları belirlenmiştir [54, 55].

3.2.2. Vücut Ağırlıkları, Organ Ağırlıkları, Besin ve Su Tüketim Ölçümleri

Hayvanların yem ve su tüketimine bir sınırlama konulmamış, her gün aynı saatte tükettikleri yem ve su miktarları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Hayvanların vücut ağırlıkları günlük olarak tartılmıştır. Deney sonunda eter ile bayıltılan hayvanlara servikal dislokasyon yöntemi uygulanarak deney sonlandırılmıştır. Karaciğer ve böbrek alınarak üzerlerindeki kan, kurutma kağıdı ile temizlendikten sonra tartılıp yaş ağırlıkları kaydedilmiştir. Rölatif organ ağırlıkları, vücut ağırlıklarına oranlanarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Comet Yönteminin Uygulanışı

Önceki çalışmalardan yola çıkılarak gruplandırılan ve uygulama yapılan sıçanların kalbinden steril enjektörle deney sonunda alınan kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinden izole edilen lenfositlere ve karaciğerin sağ lateral bölgesinden alınan örnek dokudan izole edilen karaciğer hücrelerine Alkali Comet Testi uygulanmıştır.

3.2.3.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

5 M NaOH Stok Çözeltisi: 100 g NaOH, distile suyla 500 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiş, 2 haftada bir değiştirmiştir.

0.2 M EDTA Stok Çözeltisi: 37,2 g EDTA, distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiş, 2 haftada bir değiştirilmiştir.

5 N HCl Stok Çözeltisi: 91.25 mL HCl (%37'lik), distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

0.8 M Tris çözeltisi: 97 g Trizma, distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

PBS (Fosfat Tampon çözeltisi) : 1 adet PBS tableti, 200 mL distile suda çözülmüş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Etidyum Bromür çözeltisi: 5 mg etidyum bromür 50 mL distile su ile çözülüp, 100 µg/mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti 25 mL'lik kısımlar halinde +4°C'de karanlıkta saklanmıştır. Çalışma çözeltisi olarak stok etidyum bromür çözeltisi, distile su ile 1/5 oranında seyreltilmiş ve 20 µg/mL konsantrasyonda kullanılmıştır.

Lizis Çözeltisi: 146,1 g NaCl (2,5 M), 37,2 g EDTA (100 mM), 1,2 g Trizma (10 nM), 800 mL distile suda çözülmüştür. 5 M NaOH çözeltisi ile çözelti pH'ı 10'a getirilmiş ve stok çözeltinin hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Çalışma çözeltisi olarak her şale için 62,3 mL stok lizis çözeltisine; 7 mL dimetilsülfoksit (DMSO), 0,7 mL Triton-X ilave edilmiş ve aynı gün kullanılmıştır.

Parçalama (Mincing) Çözeltisi: 2,5 mL (0,2 M) EDTA, 2,5 mL DMSO, PBS ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Karaciğer örnekleri alınmadan önce, deney günü taze olarak hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Deney sırasında buz aküsünde bekletilerek 0°C'ye getirilmiştir.

Yüksek erime dereceli agaroz (YEDA) çözeltisi : %1'lik YEDA çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlanmış, mikro dalga fırında ısıtılmıştır.

Düşük erime dereceli agaroz (DEDA) çözeltileri : %0,75'lik EDTA çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır. Çözelti deney esnasında mikrodalga fırında çözülmüş ve 37°C'ye getirilerek kullanılmıştır. Az miktarlarda, taze olarak hazırlanmıştır.

Elektroforez tamponu: 36 mL 5 M NaOH çözeltisi, 3 mL 0,2 M EDTA çözeltisi ile beraber distile suyla 600 mL'ye tamamlanmıştır ve aynı gün kullanılmıştır.

Nötralizasyon tamponu: 97 g Tris, 1000 mL dH_20'da çözdürülür ve çözelti, 5 N HCl çözeltisi ile pH 7.5 değerine getirilmiştir. Ardından 1:1 oranında dH_2O ile seyreltilerek (0.4 M Tris) +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Lamların Hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce, %1'lık YEDA, ısıtılarak eritilmiştir. Sıvı haldeki agaroza batırılan lamların tek yüzleri kaplanmış, oda sıcaklığında bir gece bekletilerek kurutulmuştur.

3.2.3.3. Lenfosit İzolasyonu

Sıçan kalplerinden alınan taze kan, 1:1 oranında PBS ile sulandırılmıştır. Boş steril falkon tüp içine kan-PBS çözeltisinin hacmi kadar Histopaque-1077 solüsyonu eklenmiş ve üzerine kan-PBS karışımı yavaşça konulmuştur. Tüpler 25°C'de, 2300 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üç ayrı tabaka meydana gelmiştir. En alt tabakada lökositler, eritrositler, trombositler ve diğer şekilli elemanlar, orta tabakada lenfositlerin içinde yüzdüğü Histopaque solüsyonu, en üst tabakada ise plazma bulunmaktadır. Orta tabakada biriken lenfositler 1 mL'lik pipetler yardımıyla boş bir falkon tüpe alınmıştır. Histopaque solüsyonunu uzaklaştırmak için lenfosit içeren Histopaque üzerine pH'sı 7.4 olan 5 mL 1M tuzlu fosfat tamponu (PBS) ilave edilip karıştırıldıktan sonra 25°C'de 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatan atılmış ve lenfosit pelleti elde edilmiştir. PBS ile yıkama işlemi iki defa tekrarlanmıştır.

3.2.3.4. Hepatosit izolasyonu

Karaciğerden alınan ufak bir parça, 1 mL soğuk (0-4°C) parçalama solüsyonu içeren tüpe bırakılmıştır. 5-10 dakika bekletildikten sonra fazla kandan kurtulmak için solüsyon 2 defa yenisiyle değiştirilmiştir. Karaciğer parçası, makas veya pens yardımıyla tüp içinde büyük parçalara ayrıldıktan sonra 5-10 dakika daha bekletilmiş ve ardından solüsyon yenisiyle değiştirilmiştir. Doku artık mekanik olarak ufak parçalara ayrıldığı için, kalıntıların çökerek hücre süspansiyonunu üstte bırakması için buzdolabında 20 dakika kadar dinlendirilmiştir.

3.2.3.5. Hücre sayımı ve canlılık testi

İzole edilen hücre süspansiyonları ile tripan mavisi boyası (%0.4) 1:1 oranında karıştırılmıştır. 5 dakika inkübasyon süresinden sonra, boyanmış hücrelerden bir damla lam üzerine konulmuş ve üzerine lamel kapatılarak süspansiyonun yaydırılması sağlanmıştır. Işık mikroskobu altında boyanmamış canlı hücreler sayılmıştır. Lam üzerinde 25 mm^2'ye düşen hücreler sayılarak toplam hücre sayısı belirlenmiştir.

Toplam hücre sayısı = 10^4 x mL x lamdaki hücre sayısı x dilüsyon katsayısı

3.2.3.6. Hücrelerin lama yayılması

Her bir örnek, 37°C'de 1:10 oranında olacak şekilde %0.5'lik düşük erime dereceli agaroz (DEDA) ile pipetaj yapılarak karıştırılmış ve bir gece önceden %1'lik yüksek erime dereceli agaroz (YEDA) ile kaplanan lamlara, her birinde yaklaşık $5x10^3$-$1x10^4$ hücre/µL hücre olacak şekilde 75 µL kadar hücre-agar karışımı konularak üzerlerine lamel kapatılmıştır. Buzdolabında 5 dakika, agaroz katılaşana kadar bekletilmiştir. Daha sonra lameller hafifçe kaydırılarak kaldırılmıştır. Hücre-agar katmanının üzerine koruyucu tabaka olması amacıyla 45 °C'de ısıtılmış 80 µL %1'lik erimiş düşük dereceli agaroz (DEDA) konulmuş ve tekrar lamel ile kapatılarak 5-7 dakikalığına buzdolabına kaldırılmıştır.

3.2.3.7. Hücrelerin lizise bırakılması

Bozdolabından alınan lamların lamelleri kaydırılarak nazikçe kaldırılmış ve bir gece boyunca (15-16 saat), ışık geçirmeyen şalelerde, +4°C'de lizis çözeltisi tamponu içinde bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra, örneklerin UV kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlıkta tutulmasına dikkat edilmiştir.

3.2.3.8. Alkali ile mulamele

İşlem için öncelikle elektroforez tankının volt ve amper ayarları kontrol edilmiş, tankın geometrisine uygun olarak sabit 25 V, 300 mA olacak şekilde elektroforez tamponunun hacmi ayarlanmıştır. Ardından karanlıkta lizis çözeltisinden çıkarılan lamlar, distile suya batırılıp çıkartılarak fazla lizisten arındırılmış, +4°C'de elektroforez çözeltisi ile doldurulmuş elektroforez tankı içerisinde alkali muamele için 20 dakika bekletilmiştir. Tankın etrafına ve üzerine buz aküleri konularak sıcaklığı +4°C'de tutulmuştur.

3.2.3.9. Elektroforez ve nötralizasyon

DNA göçü katottan anoda olacak şekilde elektroforez tankına yerleştirilen lamlar, 20 dakika sonunda 30 dakika boyunca sabit 25 V, 300 mA'da elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektrik akımı sayesinde, negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda göç etmesi

sağlanmıştır. Stabilize etmek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla örnekler, nötralizasyon tamponu içerisinde +4°C'de 3 defa olmak üzere 5'er dakika bekletilmiştir. Boyama öncesinde lamlar nötralizasyon tamponundan alınmış, birkaç defa distile suya batırılıp çıkarıldıktan sonra 5 dakika %70'lik alkole bırakılmıştır. Alkolden alınan lamlar kurulanarak boyamaya hazır hale getirilmiştir.

3.2.3.10. Boyama ve değerlendirme

Her bir lam, 35 µL etidium bromür ile DNA'nın floresan renk vermesi amaçlanarak boyanmıştır. Lamların üzeri lamel ile kapatılmış, buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir. Örnekler, aynı gün içinde değerlendirilmiştir. İnceleme için Olympus BX50 floresan eklentili mikroskop ve 400x büyütme kullanılmıştır. Her birey için 100'er tane lenfosit ve hepatosit sayılmış, DNA hasarının ölçülmesi ve puanlamaları için Comet Assay IV programı kullanılmıştır. Puanlamalarda, her bir grup için kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Histopatolojik incelemeler

14 ve 28 günlük sürenin sonunda, hayvanlara servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır. Karaciğer ve böbrek çıkartılmıştır. Çıkarılan organlar kurulanıp tartıldıktan sonra uygun boyutlarda kesilerek Bouin ve %10 formolin fiksatiflerinde tespit edilmiştir. Sırasıyla %70'lik, %80'lik, %95'lik ve %100'lük alkol ve ardından ksilen serisinden geçirildikten sonra parafine gömülerek bloklar yapılmıştır. Bloklar miktrotomda (Leica RM2125RT) 5µm kalınlığında kesilerek preparat haline getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar, Hematoksilen & Eosin boyasıyla boyanarak Olympus BX51 ışık mikroskobunda incelenmiş ve Bab Bs200prop programı kullanılarak gözlenen histopatolojik bulgular fotoğraflanmıştır.

3.2.5. Hematolojik incelemeler

Deneyin sonunda, deney gruplarındaki sıçanların kalplerinden steril enjektör ile alınan kanın 1 mL'si, plazma elde etmek amacıyla, pıhtılaşmayı önlemek için kullanılan K2 EDTA'lı tüplere konulmuştur. EDTA'lı örnekler aynı gün, MS 9-5 otomatik kan sayım cihazında test edilmiş; eritrosit, hemoglobin, hematokrit, lökosit, % lenfosit, % monosit, MCH (ortalama eritrosit hemoglobini), MCHC (ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu), MCV (ortalama eritrosit hacmi), trombosit ve trombosit hacmi parametrelerini içeren kan tablosu elde edilmiştir.

3.2.6. Biyokimyasal incelemeler

Deney sonunda, steril enjektörle sıçanların kalbinden alınan kanın bir kısmı serum analizi için jelli vakumlu biyokimya tüplerine aktarılmıştır. Ardından kan örnekleri, 3000 rpm'de 25 dakika süreyle +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ayrılan serum kısmı, mikropipet ile çekilerek biyokimyasal analizler için ependorf tüplere konulmuş, -80°C'de saklanmıştır. Analiz yapılacağı gün çıkarılarak oda sıcaklığında eritilen örneklerde; kitler kullanılarak, ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz), üre, trigliserit, glikoz, kreatinin ve albümin ölçümleri yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel değerlendirme

Deneysel verilerin istatistiksel analizi, *Microsoft Office Excel 2013* programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tukey *post hoc* testi ile çift yönlü t testi kullanılarak gruplar arasındaki farkın önemi, Bonferoni düzeltmesi yardımıyla anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki histolojik bulguların karşılaştırılmasında istatistiksel önem kontrollerinin değerlendirilmesi için Fisher Exact Testi kullanılmıştır. Değerlendirmede anlamlılık derecesi olarak $p \leq 0,05$ kabul edilmiştir. Comet testinde sonuçlar kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk yüzdesi şeklinde kaydedilmiş ve çok yönlü ANOVA istatistiksel analiz yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde hesaplanarak tablolarda gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi olarak yine $p \leq 0,05$ kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

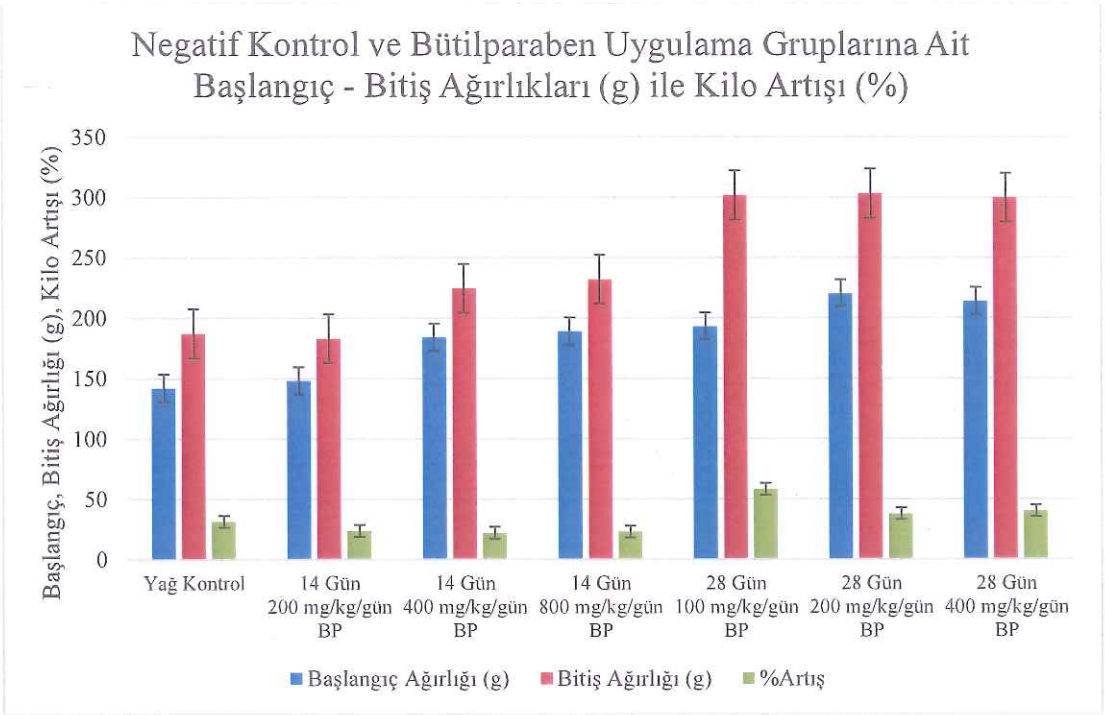
4.1.Vücut ve Organ Ağırlıkları ile Besin ve Su Tüketimi Bulguları

Yağ kontrol, pozitif kontrol ve uygulama gruplarına ait erkek sıçanların 14 ve 28 günlük uygulama sonucunda diseksiyon öncesi kaydedilen son vücut ağırlıklarının ortalamaları Tablo 4.1. ve Şekil 4.1'de, karaciğer ve böbrek gerçek organ ve rölatif organ ağırlıkları Tablo 4.2., Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. Tablo 4.3 ve Şekil 4.4'de ise tüm deney gruplarına ait besin ve su tüketim ölçümleri verilmiştir. Ölçülen son vücut ağırlıkları arasında, deney süresinin 14 ve 28 gün olarak belirlenmesine bağlı değişiklikler olduğu için istatistiksel analizler % artış baz alınarak yapılmıştır. Kontrol grubuna göre doz grupları arasında istatistiksel farklar bulunmuş olsa da bu farklar post hoc testleri sonucunda anlamsız bulunmuştur. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulanan gruplara ait sıçanların deney başlangıcı ve sonundaki vücut ağırlıkları ve % artış değeri (± SD)

Grup	Doz	Başlangıç Ağırlığı (g)	Bitiş Ağırlığı (g)	Kilo Artışı (%)
Negatif Kontrol Mısır Yağı	**1 ml**	141,83±19,67	187±25,66	31,39±11,83
14 Gün Bütilparaben	**200 mg/kg/gün**	147,83±10,14	182,67±17,75	23,52±7,63
14 Gün Bütilparaben	**400 mg/kg/gün**	183,83±13,59	224,67±20,27	21,93±4,31
14 Gün Bütilparaben	**800 mg/kg/gün**	188,83±7,29	232±17,81	22,74±6,12
28 Gün Bütilparaben	**100 mg/kg/gün**	193±27,31	301,5±28,11	58,16±0,17
28 Gün Bütilparaben	**200 mg/kg/gün**	220,33±17,77	303±23,8	37,6±0,04
28 Gün Bütilparaben	**400 mg/kg/gün**	213,83±8,27	299,67±13,54	40,15±0,04

($p \leq 0,05$)



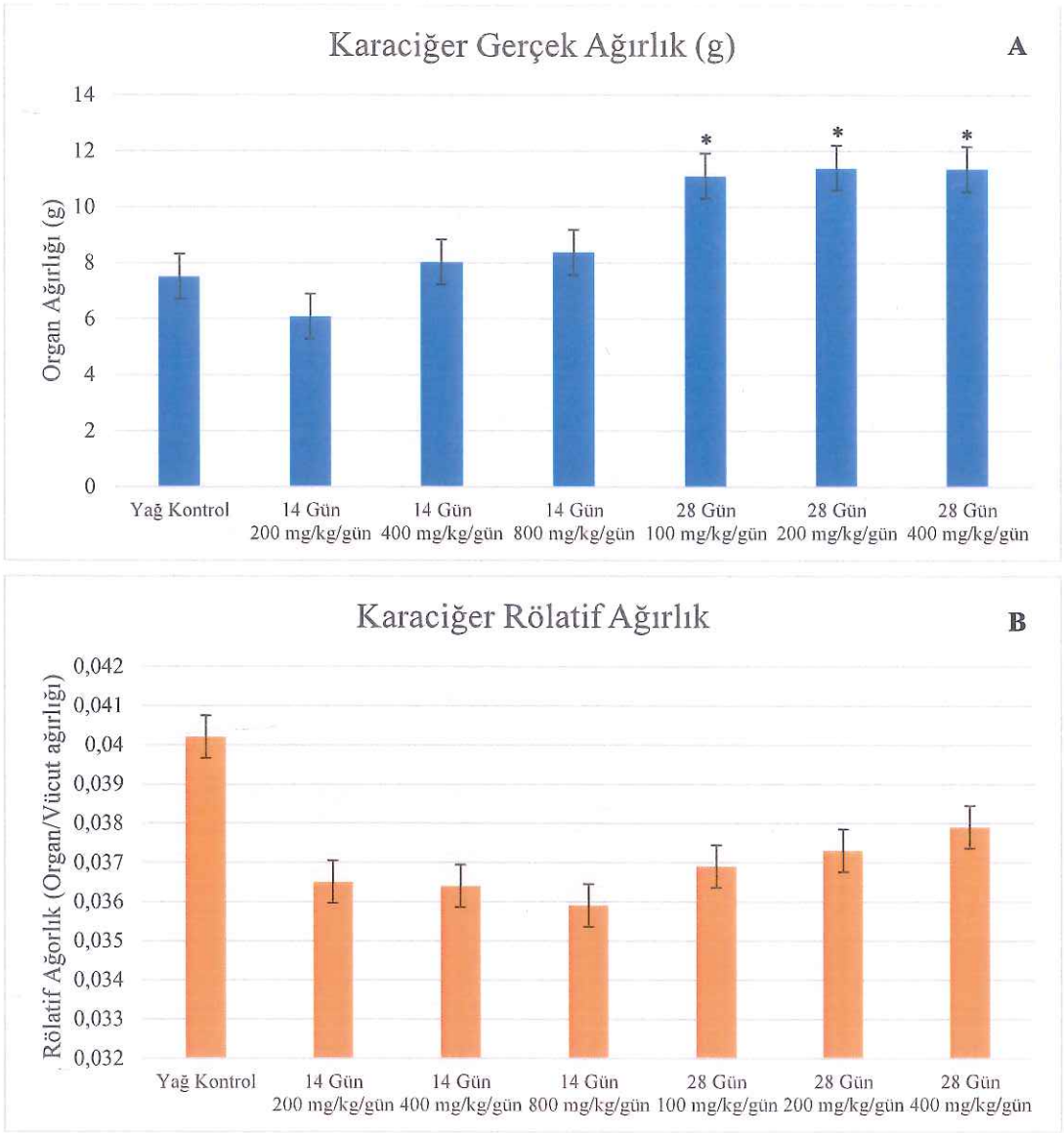
Şekil 4.1 Negatif kontrol ve bütilparaben doz gruplarının başlangıç, bitiş ağırlıkları ile kilo alım yüzdelerinin grafiği

Karaciğer gerçek ve rölatif ağırlıkları incelendiğinde 14 günlük uygulama grupları ile yağ kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Karaciğer gerçek ağırlıklarında 400 mg/kg/gün ve 800 mg/kg/gün bütilparaben gruplarında 200 mg/kg bütilparaben grubuna göre artışın olduğu görülse de bu artış anlamsızdır. 28 günlük bütilparaben doz gruplarında karaciğer ağırlığında deney süresine bağlı kilo alımıyla örtüşen anlamlı bir artış gözlenmektedir. Ancak bu artış, karaciğer rölatif ağırlıklarına bakıldığında anlamlı bulunmamıştır. Böbrek gerçek ağırlıkları incelendiğinde ise kontrol grubuyla doz grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 14 günlük bütilparaben uygulama grupları ile yağ kontrol grubu arasında böbrek rölatif ağırlıkları açısından anlamlı bir fark kaydedilmezken; 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarının rölatif ağırlıkları kontrol ve 14 günlük bütilparaben uygulama gruplarına göre anlamlı bir düşüş göstermiştir. (Tablo 4.2 ve Şekil 4.2 ve 4.3).

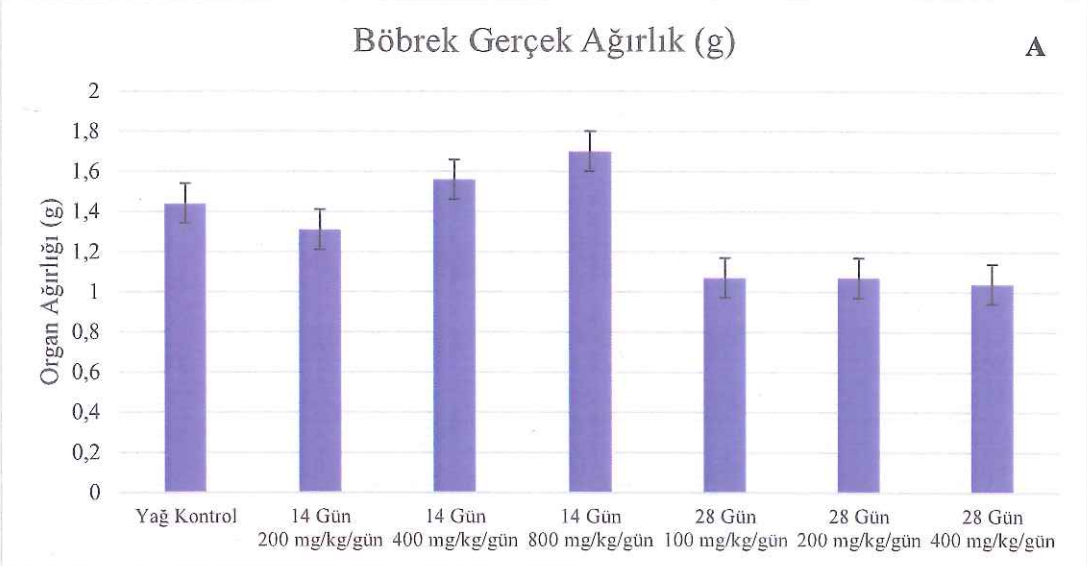
Tablo 4.2 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulanan gruplara ait karaciğer ve böbrek ağırlıkları ve organların rölatif ağırlıkları (± SD)

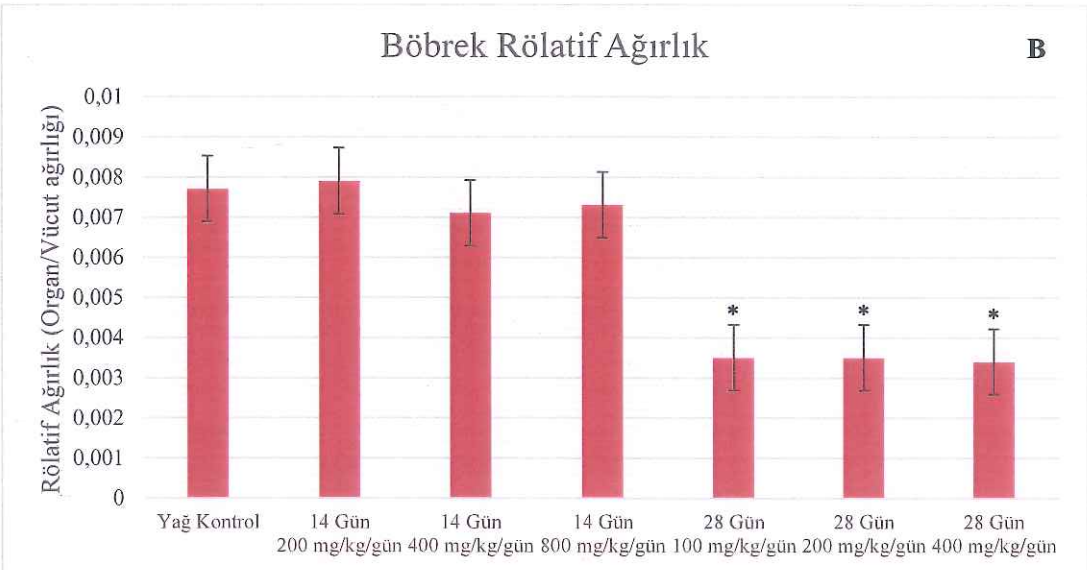
		Karaciğer		Böbrek	
Grup	Doz	Gerçek Ağırlık (g)	Rölatif Ağırlık (Organ/Vücut ağırlığı)	Gerçek Ağırlık (g)	Rölatif Ağırlık (Organ/Vücut ağırlığı)
Negatif Kontrol Mısır Yağı	1 ml	7,5±1,02	0,0402±0,0029	1,44±0,22	0,0077±0,0003
14 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	6,08±0,84[b]	0,0365±0,0033	1,31±0,18	0,0079±0,0007[b]
14 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	8,02±1,13	0,0364±0,0043	1,56±0,19	0,0071±0,0006[c]
14 Gün Bütilparaben	800 mg/kg/gün	8,37±1,37[d]	0,0359±0,0032	1,7±0,22	0,0073±0,0004[d]
28 Gün Bütilparaben	100 mg/kg/gün	11,10±1,10[a,b]	0,0369±0,0026	1,07±0,14	0,0035±0,0005[a,b]
28 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	11,38±2,02[a]	0,0373±0,0037	1,07±0,14	0,0035±0,0003[a,c]
28 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	11,35±0,36[a,d]	0,0379±0,0013	1,04±0,11	0,0034±0,0003[a,d]

[a] Kontrol grubundan farklı, [b] 14 gün 200 mg/kg/gün ile 28 gün 100 mg/kg/gün grupları birbirinden farklı, [c] 14 gün 400 mg/kg/gün ile 28 gün 200 mg/kg/gün grupları birbirinden farklı, [d] 14 gün 800 mg/kg/gün ile 28 gün 400 mg/kg/gün grupları birbirinden farklı ($P \leq 0,002381$).



Şekil 4.2 Negatif (yağ) kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer gerçek ağırlıkları (A) ve rölatif ağırlıkları (B) (*P≤0,002381)



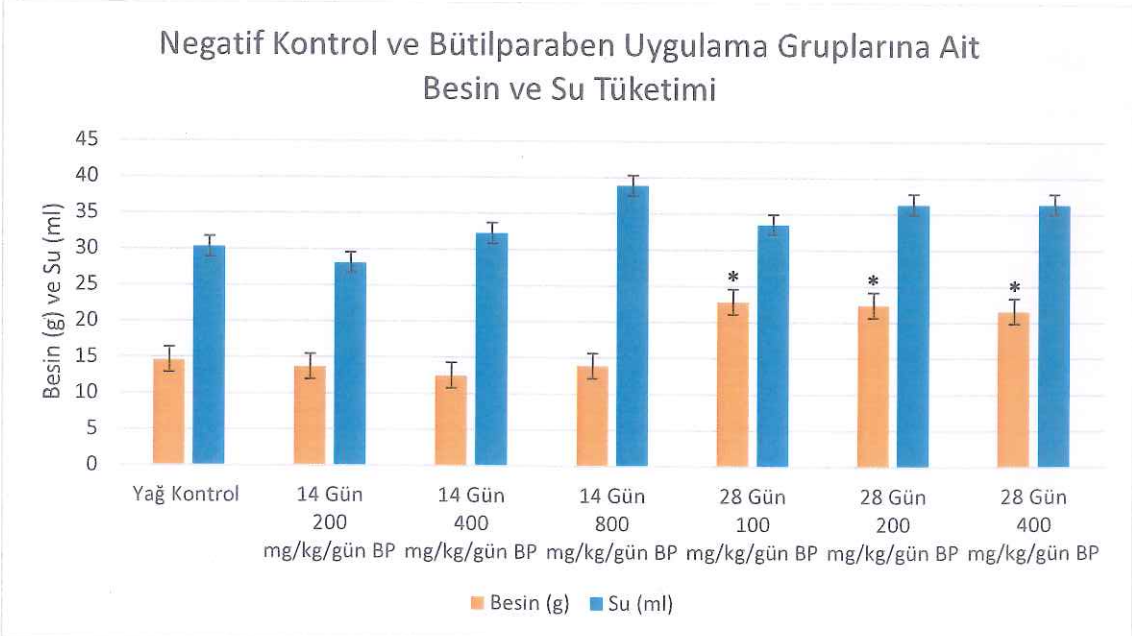


Şekil 4.3 Negatif (yağ) kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait böbrek gerçek ağırlıkları (A) ve rölatif ağırlıkları (B) (*P≤0,002381)

Tablo 4.3 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait günlük ortalama besin ve su tüketimi (±SD)

Grup	Doz	Besin (g)	Su (ml)
Yağ Kontrol 1 ml	1 ml	14,61±2,82	30,30±6,82
14 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	13,68±2,79[b]	28,07±5,36
14 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	12,51±1,43[a,b]	32,24±3,63
14 Gün Bütilparaben	800 mg/kg/gün	13,88±1,66[b]	38,88±5,97
28 Gün Bütilparaben	100 mg/kg/gün	22,82±2,16[a,b]	33,51±4,63
28 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	22,4±2,32[a,b]	36,33±5,79
28 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	21,58±1,11[a,b]	36,38±5,77

[a] Yağ kontrol grubundan farklı, [b] 28 günlük uygulama gruplarından farklı, [c]14 günlük uygulama gruplarından farklı ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.4 Negatif (yağ) kontrol ile bütilparaben doz gruplarına ait besin ve su tüketimi grafiği (*$p \leq 0,05$)

Hayvanların günlük su tüketiminde herhangi anlamlı bir fark bulunmamıştır. 14 Günlük uygulama gruplarından sadece 400 mg/kg/gün bütilparaben grubuna ait ortalama yem tüketiminde düşüş gözlenmiştir. Buna karşılık olarak, 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarının tamamında kontrol grubuna göre artış olmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise, 28 günlük doz gruplarının ortalama yem tüketimi, 14 günlük doz gruplarının ortalama yem tüketimine göre anlamlı bir artış göstermiştir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.1).

4.2. Comet Analiz Sonuçları

Yağ kontrol ve bütilparaben uygulaması yapılan sıçanların 14 günlük uygulama periyodunun sonunda kalplerinden alınan kandan izole edilen lenfositlerde ve karaciğer dokusunun sağ lateral bölgesinden alınan örneklerden izole edilen karaciğer hücrelerinde Comet testi yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu için ayrılan sıçanlara 60 mg/kg MMS (metilmetansulfonat) intraperitonal yolla enjekte edilmiş ve ertesi gün servikal dislokasyon ile deneyin sonlandırılmasından sonra alınan kan ve karaciğer örnekleri ile Comet testi yapılmıştır. Sonuçlar sırasıyla tablo 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Lenfositlere ve karaciğer hücrelerine ait görüntüler ise Şekil 4.5-20'de verilmiştir.

4.2.1. Lenfosit örneklerinde comet analizleri

14 günlük doz grubunda; lenfositlere uygulanan Comet testi sonucunda kuyruk uzunluğunda doza bağlı bir artış gözlenmektedir (Şekil 4.5). Kuyruk momenti (Şekil 4.6) ve kuyruk yoğunluğu (Şekil 4.7) ise uygulama gruplarında, yağ kontrol grubuna göre artmıştır. Uygulama grupları içinde ise 800 mg/kg'lık yüksek doz grubunda 200 mg/kg ve 400 mg/kg bütilparaben gruplarına göre düşüş gözlenmiştir (Tablo 4.4). Kuyruk yoğunlukları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Comet resimleri Şekil 4.8'den 4.14'e kadar numaralandırılmıştır.

Tablo 4.4 Lenfosit örneklerinde kontrol grupları ve 14 günlük butilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± SD)

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
Yağ Kontrol	1 ml	15,42±4,32	0,005±0,013	0,08±0,17
Pozitif Kontrol (MMS)	60 mg/kg	140,13±8,71	20,08±1,3	27,07±1,32
Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,26±4,17 [a,b,d,e]	0,02±0,07 [a,b,d]	0,24±0,85 [a,b]
Bütilparaben	400 mg/kg/gün	18,81±5,3 [a,b,c,e]	0,03±0,11 [a,b,c,e]	0,32±0,9 [a,b,e]
Bütilparaben	800 mg/kg/gün	21,77±5,05 [a,b,c,d]	0,02±0,08 [a,b,d]	0,19±0,61 [a,b,d]

[a] yağ kontrol grubundan farklı, [b] MMS pozitif kontrol grubundan farklı, [c] 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 400 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama ggrubundan farklı, [e] 800 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

28 günlük doz grubunda ise; lenfositlere uygulanan Comet testi sonucunda kuyruk uzunluğunda yine doza bağlı bir artış gözlenirken, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğunda yağ kontrol grubuna göre bir değişiklik olmamıştır. 100 mg/kg bütilparaben grubu ile yağ kontrol grubu arasında kuyruk uzunluğuna dair anlamlı bir fark bulunmamıştır. 200 mg/kg ve 400 mg/kg bütilparaben grubuna ait kuyruk uzunluğunda, yağ kontrol grubuna göre anlamlı bir artışa rastlanmıştır. Uygulama grupları arasında, kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak, kuyruk uzunluğunun uygulama grupları arasında doza bağlı bir şekilde anlamlı olarak arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.5).

Doz grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; kuyruk uzunluğu için 14 günlük uygulama gruplarında, 28 günlük uygulama gruplarına göre bir artış gözlenmiştir. Ancak 14 günlük 200 mg/kg bütilparaben grubu ile 28 günlük 200 mg/kg bütilparaben grubu arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Kuyruk momenti değerlerinde ise 28 günlük gruplarda, 14 gün gruplarına göre bir düşüş gözlense de, sadece 28 gün 400 mg/kg bütilparaben grubunun 14 günlük gruplardan farkı ve 14 gün 400 mg/kg bütilparaben grubunun 28 günlük gruplardan farkı anlamlı çıkmıştır. Kuyruk yoğunluğu; 14 günlük doz gruplarında, 28 günlük doz gruplarına göre genel bir artış göstermiştir. Özellikle 14 gün 200 mg/kg ve 400 mg/kg bütilparaben uygulama gruplarındaki artış, 28 günlük doz gruplarına nazaran oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.5 Lenfosit örneklerinde kontrol grupları ve 28 günlük butilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± SD)

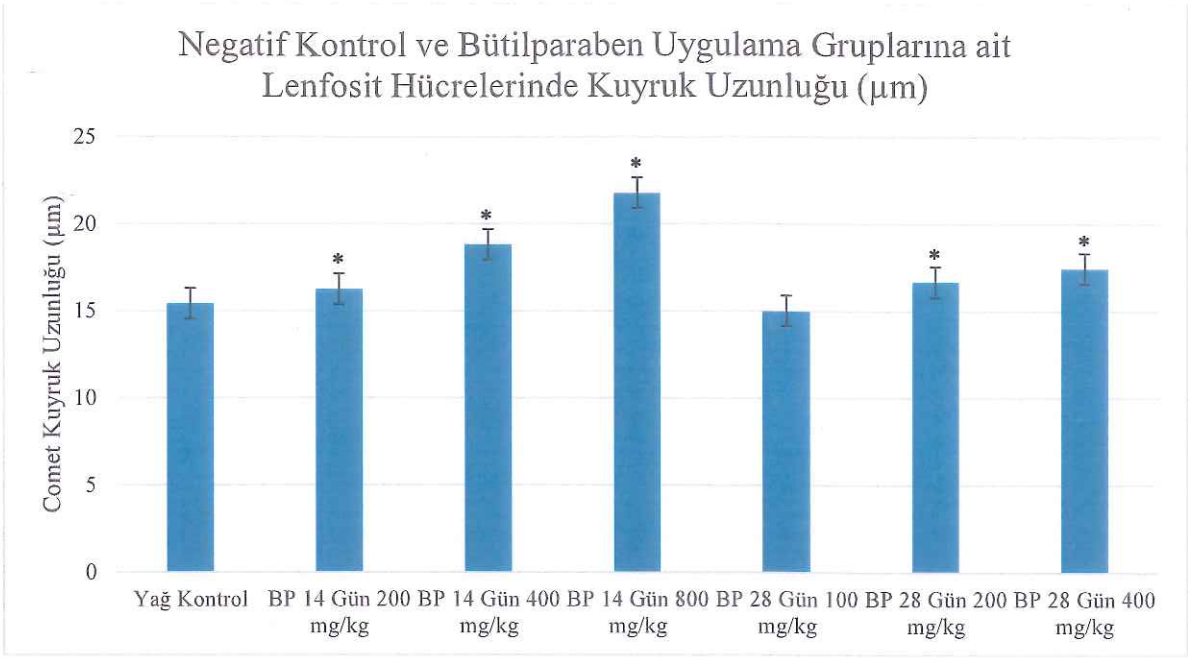
Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
Yağ Kontrol	1 ml	15,42±4,32	0,005±0,013	0,08±0,17
Pozitif Kontrol (MMS)	60 mg/kg	140,13±8,71	20,08±1,3	27,07±1,32
Bütilparaben	100 mg/kg/gün	14,99±4,62[b,d,e]	0,01±0,045[b]	0,11±0,43[b]
Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,67±4,94[a,b,c,e]	0,009±0,051[b]	0,09±0,41[b]
Bütilparaben	400 mg/kg/gün	17,44±3,96[a,b,c,d]	0,006±0,012[b]	0,14±0,23[a,b]

[a] yağ kontrol grubundan farklı, [b] MMS kontrol grubundan farklı, [c] 100 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 200 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [e] 400 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

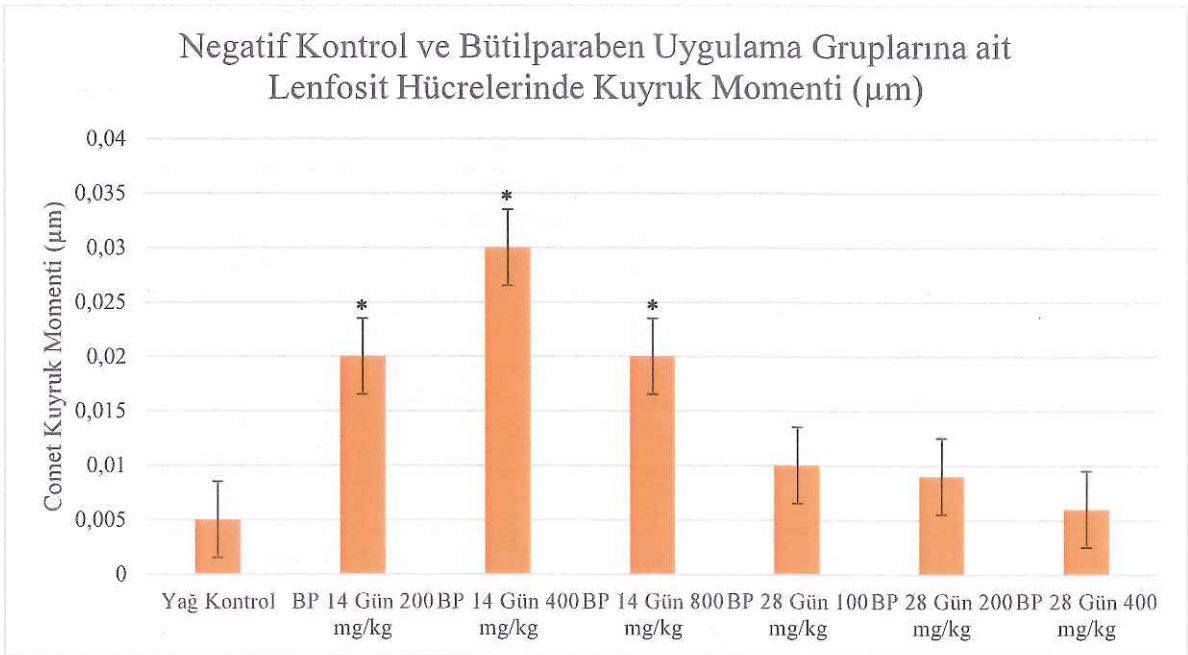
Tablo 4.6 14 günlük ve 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerin Comet parametreleri (± S:D)

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
14 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,26±4,17 [d,f]	0,02±0,07 [f]	0,24±0,85 [d,e,f]
14 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	18,81±5,3 [d,e,f]	0,03±0,11 [d,e,f]	0,32±0,9 [d,e,f]
14 Gün Bütilparaben	800 mg/kg/gün	21,77±5,05 [d,e,f]	0,02±0,08 [f]	0,19±0,61
28 Gün Bütilparaben	100 mg/kg/gün	14,99±4,62 [a,b,c]	0,01±0,045 [b]	0,11±0,43 [a,b]
28 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,67±4,94 [b,c]	0,009±0,051 [b]	0,09±0,41 [a,b]
28 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	17,44±3,96 [a,b,c]	0,006±0,012 [a,b,c]	0,14±0,23 [a,b]

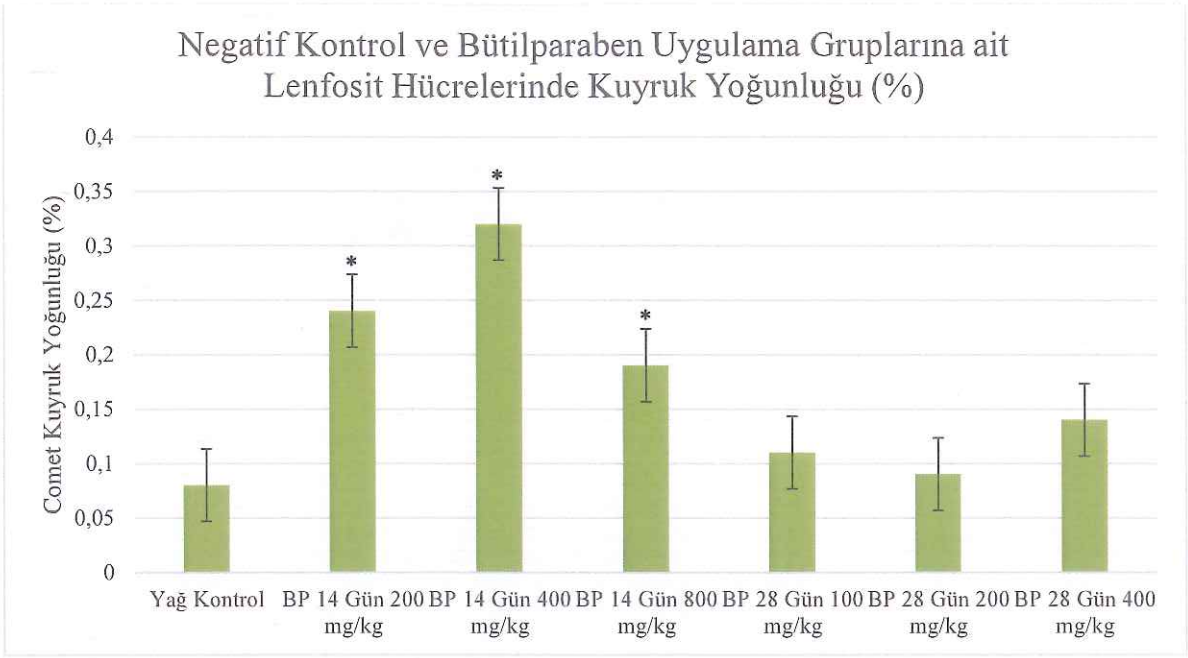
[a] 14 gün 200 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [b] 14 gün 400 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [c] 14 gün 800 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 28 gün 100 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [e] 28 gün 200 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [f] 28 gün 400 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).



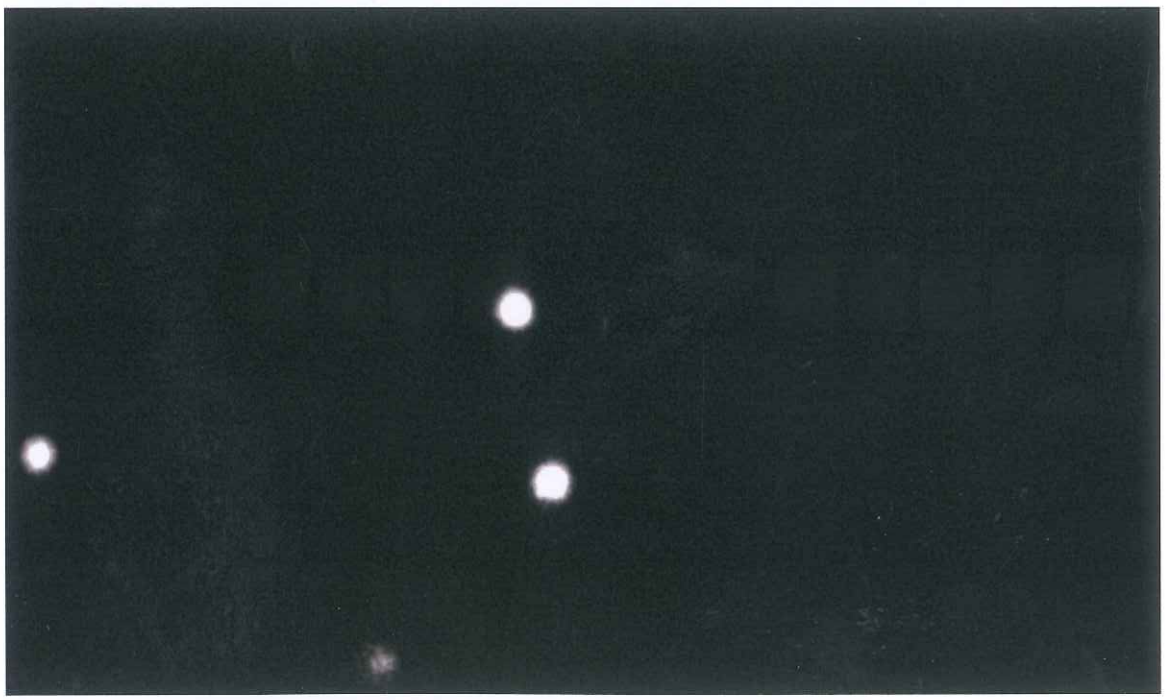
Şekil 4.5 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk uzunluğu (µm) (*P≤0,05)



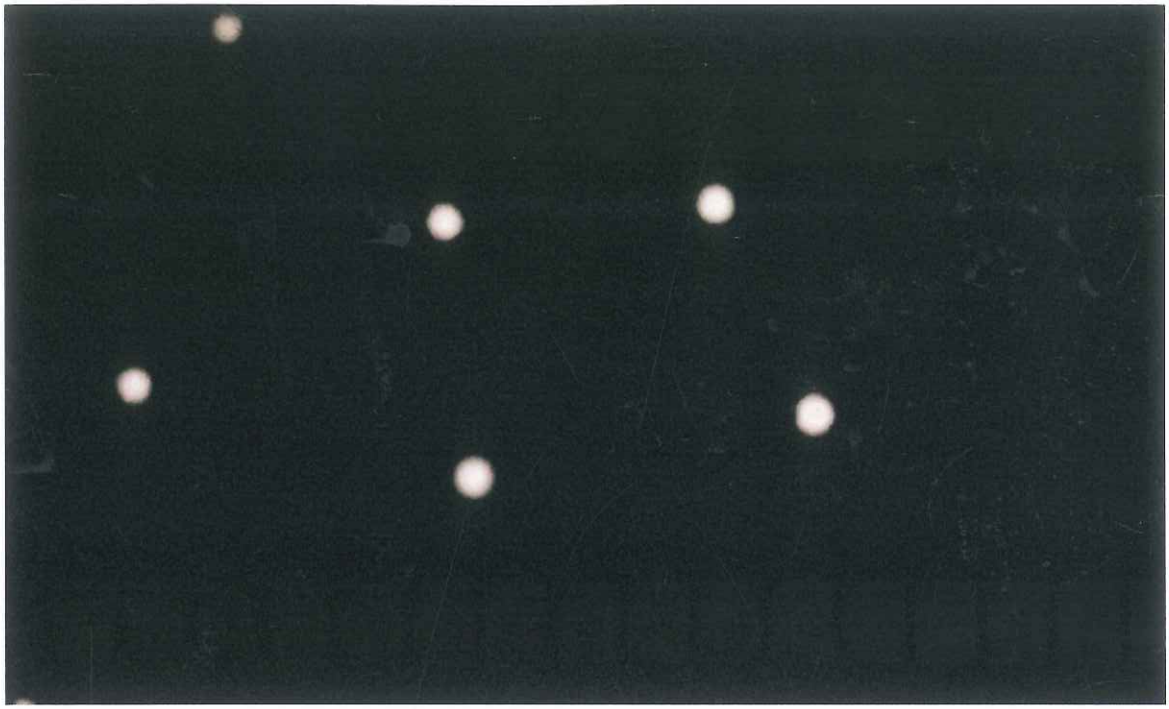
Şekil 4.6 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk momenti (µm) (*P≤0,05)



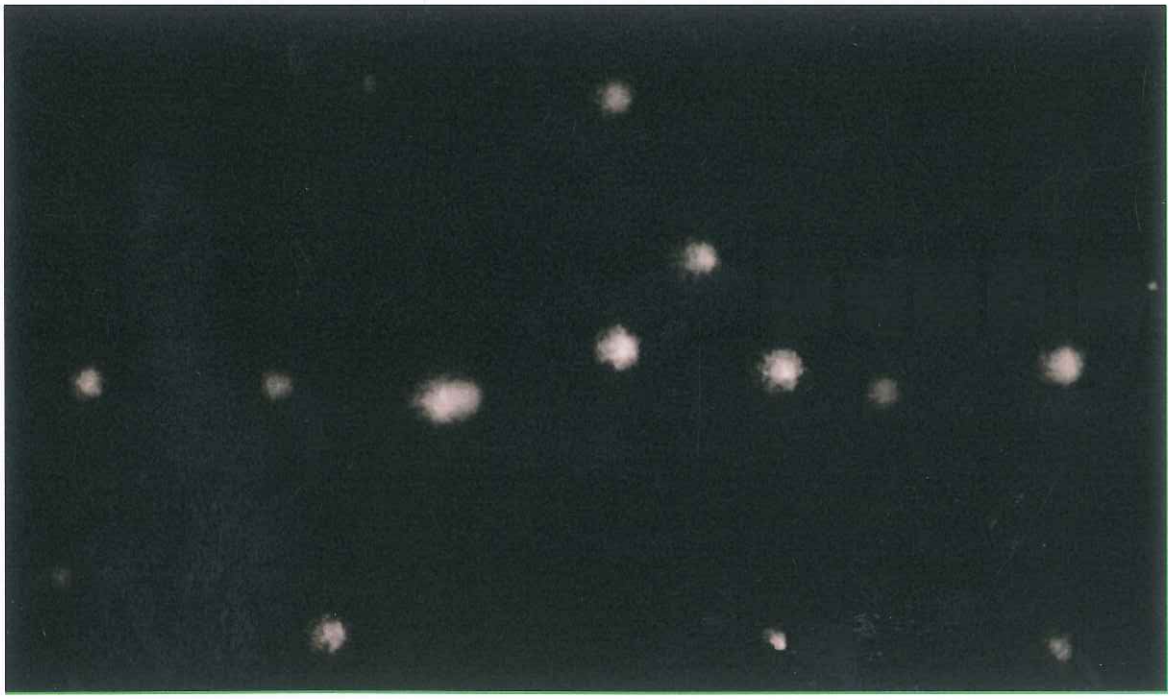
Şekil 4.7 Negatif kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%) (*P≤0,05)



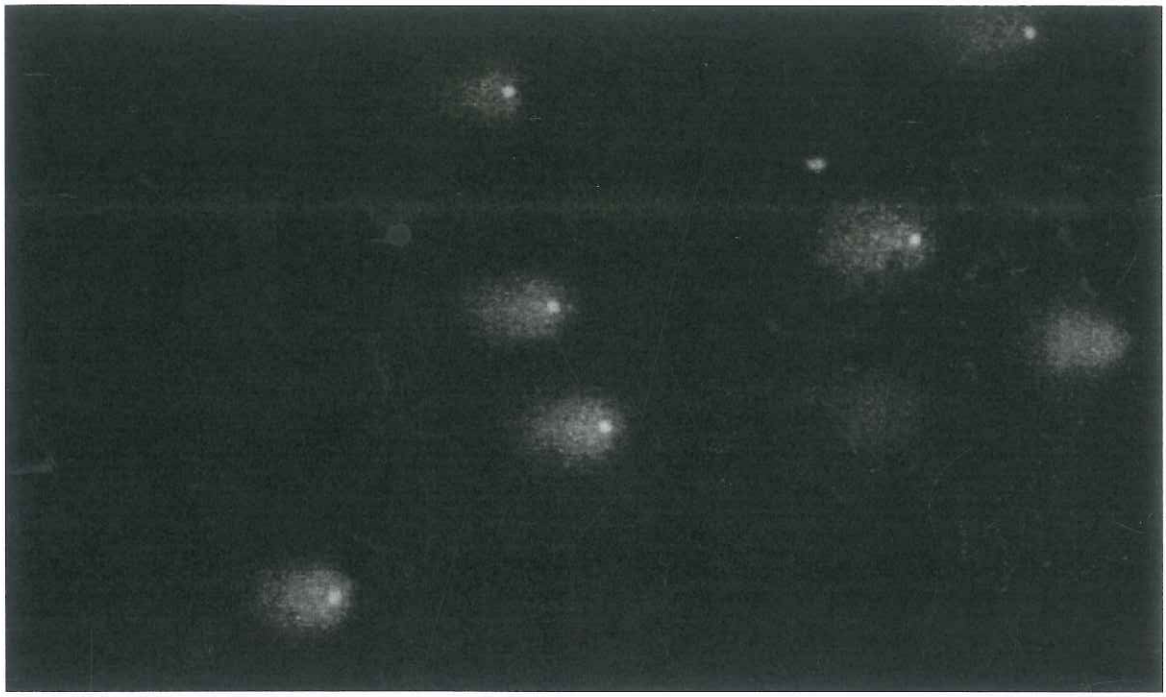
Şekil 4.8 Negatif (yağ) kontrol grubuna ait lenfosit (200X)



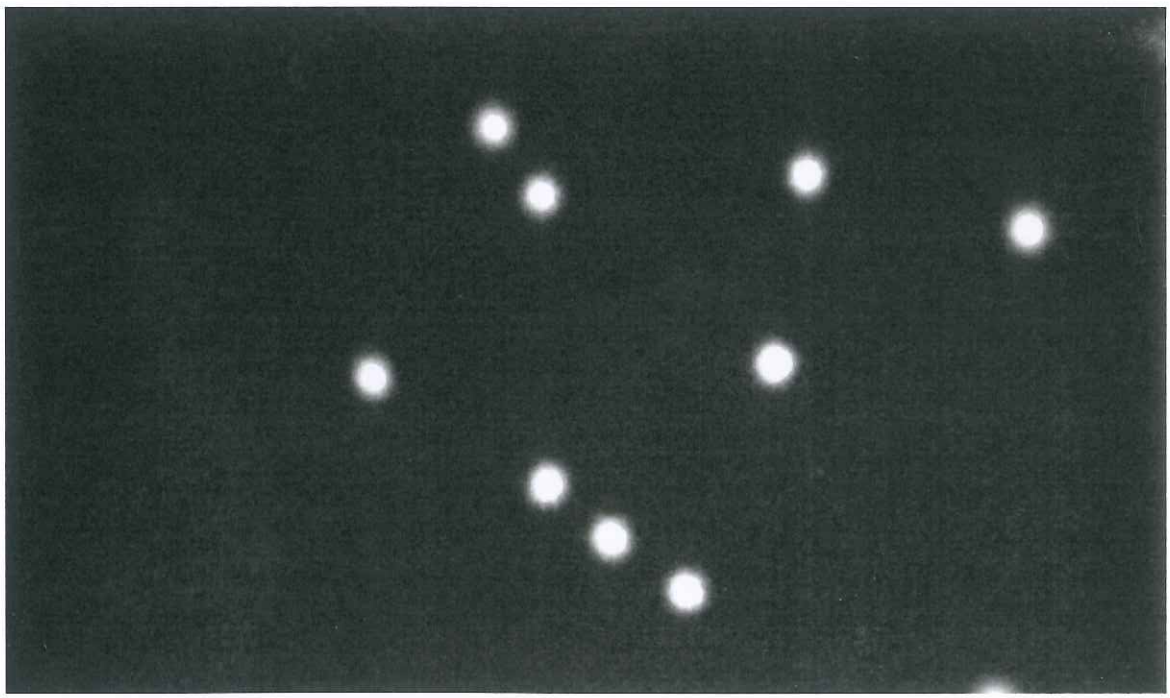
Şekil 4.9 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)



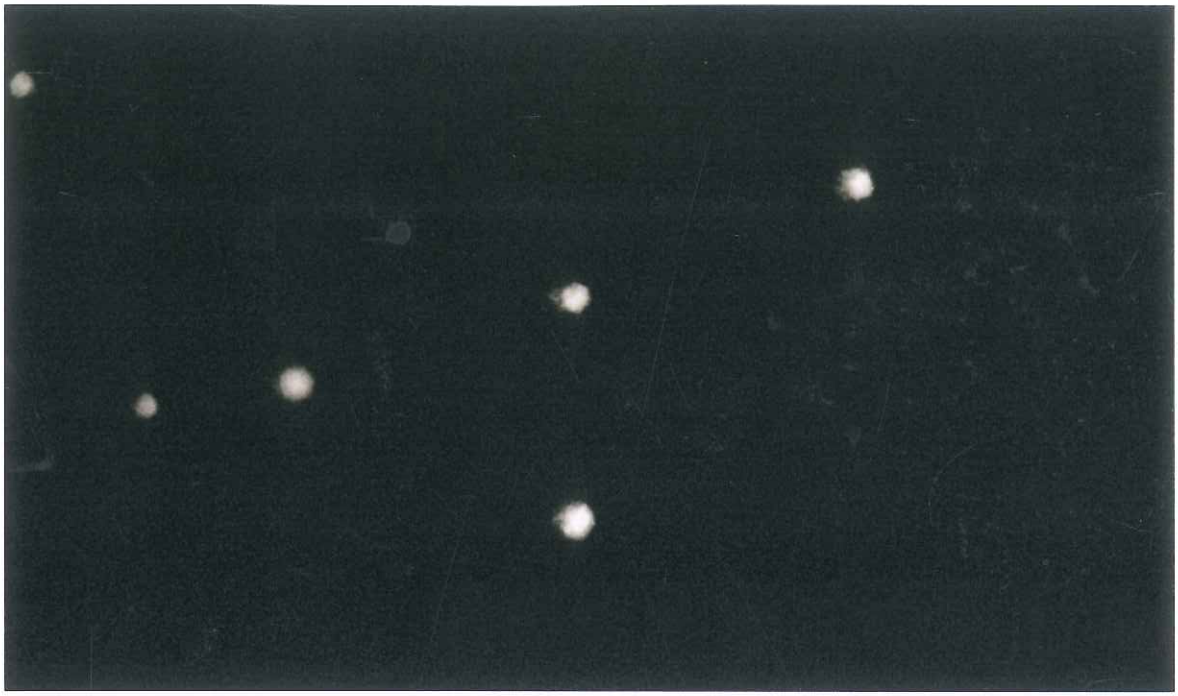
Şekil 4.10 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)



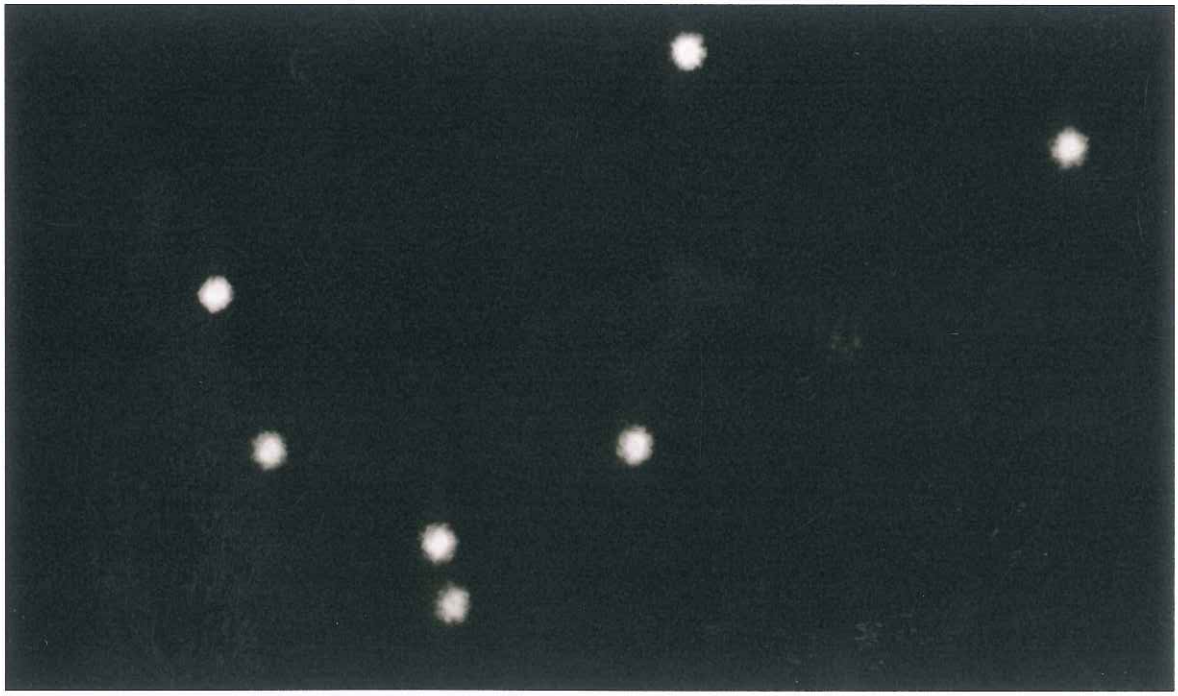
Şekil 4.11 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)



Şekil 4.12 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)



Şekil 4.13 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)



Şekil 4.14 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait lenfositler (200X)

4.2.2. Karaciğer dokusunda comet analizleri

Karaciğer dokusunda yapılan comet analizlerinde kuyruk uzunluğu (Şekil 4.15), kuyruk momenti (Şekil 4.16) ve kuyruk yoğunluğu (Şekil 4.17) parametreleri 200 mg/kg ve 400 mg/kg bütilparaben uygulama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artarken 800 mg/kg bütilparaben grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu değişimler dozdan bağımsız olarak seyrediyor gibi gözükse de sonuçların yüksek doz uygulamasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 Karaciğer hücrelerinde kontrol grupları ve 14 günlük bütilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D)

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
Yağ Kontrol	1 ml	13,35±7,02	0,01±0,05	0,21±0,7
Pozitif Kontrol (MMS)	60 mg/kg	147,08±6,34	25,42±1,71	32,19±1,71
Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,65±5,76 [a,b,d,e]	0,06±0,22 [a,b]	0,53±1,54 [a,b]
Bütilparaben	400 mg/kg/gün	21,0±5,99 [a,b,c,e]	0,08±0,21 [a,b,e]	0,71±1,6 [a,b,e]
Bütilparaben	800 mg/kg/gün	20,06±6,04 [a,b,c,d]	0,05±0,15 [a,b,d]	0,38±0,97 [b,d]

[a] yağ kontrol grubundan farklı, [b] MMS pozitif kontrol grubundan farklı, [c] 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 400 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı, [e] 800 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

28 günlük uygulama gruplarının tümünde kontrol grubuna göre kuyruk uzunluğu ve kuyruk yüzdesinde önemli derecede bir artış gözlense de bu artış doza bağlı değildir. Kuyruk yoğunluğu incelendiğinde, DNA yüzdesinin 28 gün 100 mg/kg grubunda, 200 mg/kg ve 400 mg/kg gruplarındaki ölçümlerinden anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Kuyruk momentinde ise 28 günlük doz gruplarının üçü de kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterse de doz grupları arasında fark bulunmamıştır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8 Karaciğer hücrelerinde kontrol grupları ve 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarına ait Comet parametreleri (± S:D)

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
Yağ Kontrol	1 ml	13,35±7,02	0,01±0,05	0,21±0,7
Pozitif Kontrol (MMS)	60 mg/kg	147,08±6,34	25,42±1,71	32,19±1,71
Bütilparaben	100 mg/kg/gün	20,06±5,9 [a,b,d]	0,17±0,52 [a,b]	1,18±2,49 [a,b,d,e]
Bütilparaben	200 mg/kg/gün	18,7±6,82 [a,b,c,e]	0,16±0,68 [a,b]	0,62±1,87 [a,b,c]
Bütilparaben	400 mg/kg/gün	19,78±6,85 [a,b,d]	0,21±0,94 [a,b]	0,79±2,12 [a,b,c]

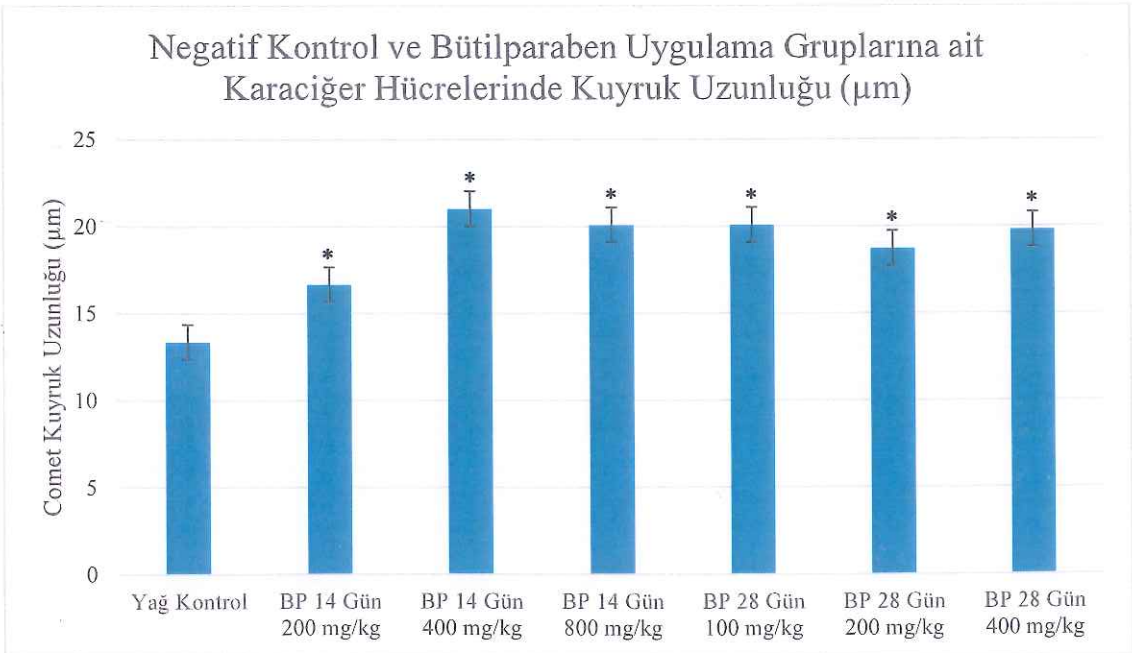
[a] yağ kontrol grubundan farklı, [b] MMS pozitif kontrol grubundan farklı, [c] 100 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 200 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı, [e] 400 mg/kg vücut ağırlığı/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

Doz grupları birbiriyle karşılaştırıldığında; kuyruk uzunluğu açısından dengeli bir artış ya da azalış izlenmemiştir (Tablo 4.9). 14 gün 400 mg/kg ve 14 gün 800 mg/kg doz grupları 28 gün 200 mg/kg ve 28 gün 400 mg/kg gruplarına göre artış gösterirken, 14 gün 200 mg/kg grubunda 28 günlük doz uygulama gruplarına göre düşüş göstermiştir. Kuyruk momenti parametresinde ise 28 günlük uygulama gruplarında, 14 günlük uygulama gruplarına göre bariz bir artış gözlenmiştir. Kuyruk yoğunluğu açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmamakla birlikte, 28 gün 100 mg/kg grubunda diğer gruplara göre ciddi bir artış gözlenmektedir (Tablo 4.8 ve 4.9). Bu durumun, ölçümler sırasında 28 gün 200 mg/kg ve 28 gün 400 mg/kg doz gruplarına ait jellerde gözlenen ve ölçülemeyecek kadar hasarlı olduğu düşünülen hayalet hücreler sebebiyle oluştuğu düşünülmektedir. (Şekil 4.24 ve 4.26). Resimler, Şekil 4.18'den 4.26'ya kadar sıralanarak verilmiştir.

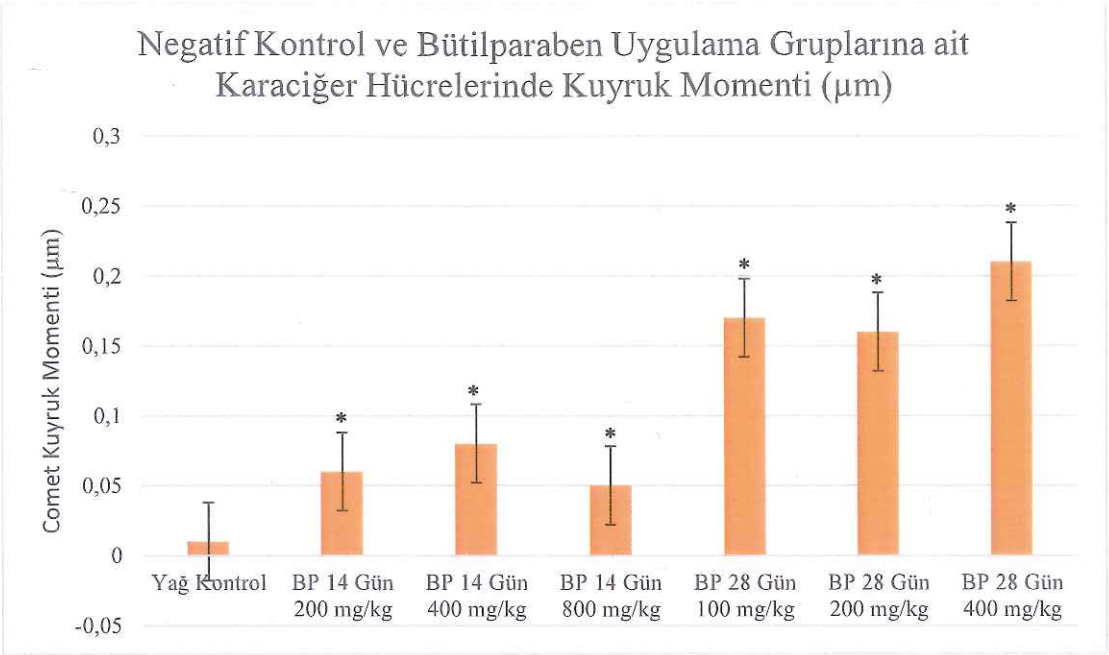
Tablo 4.9 14 günlük ve 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarına ait hepatositlerin Comet parametreleri (± S:D)

Grup	Doz	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)
14 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	16,65±5,76 [d,e,f]	0,06±0,22 [d,e,f]	0,53±1,54 [d]
14 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	21,0±5,99 [e,f]	0,08±0,21 [d,f]	0,71±1,6 [d]
14 Gün Bütilparaben	800 mg/kg/gün	20,06±6,04 [e]	0,05±0,15 [d,e,f]	0,38±0,97 [d,f]
28 Gün Bütilparaben	100 mg/kg/gün	20,06±5,9 [a]	0,17±0,52 [a,b,c]	1,13±2,49 [a,b,c]
28 Gün Bütilparaben	200 mg/kg/gün	18,7±6,82 [a,b,c]	0,16±0,68 [a,c]	0,62±1,87
28 Gün Bütilparaben	400 mg/kg/gün	19,78±6,85 [a,b]	0,21±0,94 [a,b,c]	0,79±2,12 [c]

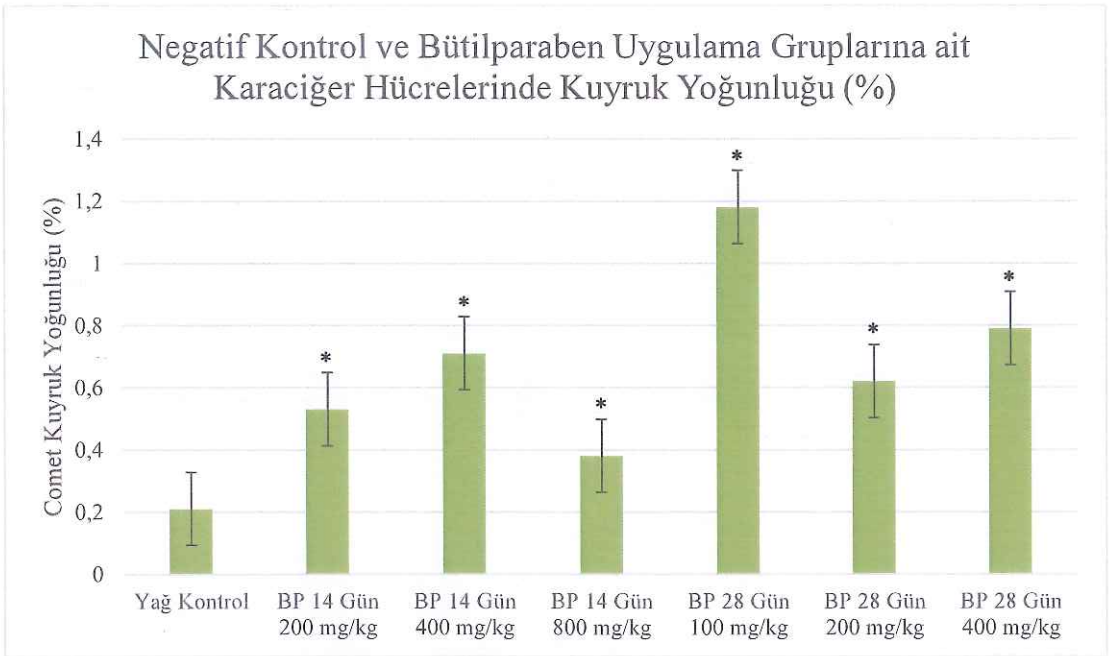
[a] 14 gün 200 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [b] 14 gün 400 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [c] 14 gün 800 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [d] 28 gün 100 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [e] 28 gün 200 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı, [f] 28 gün 400 mg/kg ağırlık/gün BP uygulama grubundan farklı ($p \leq 0,05$).



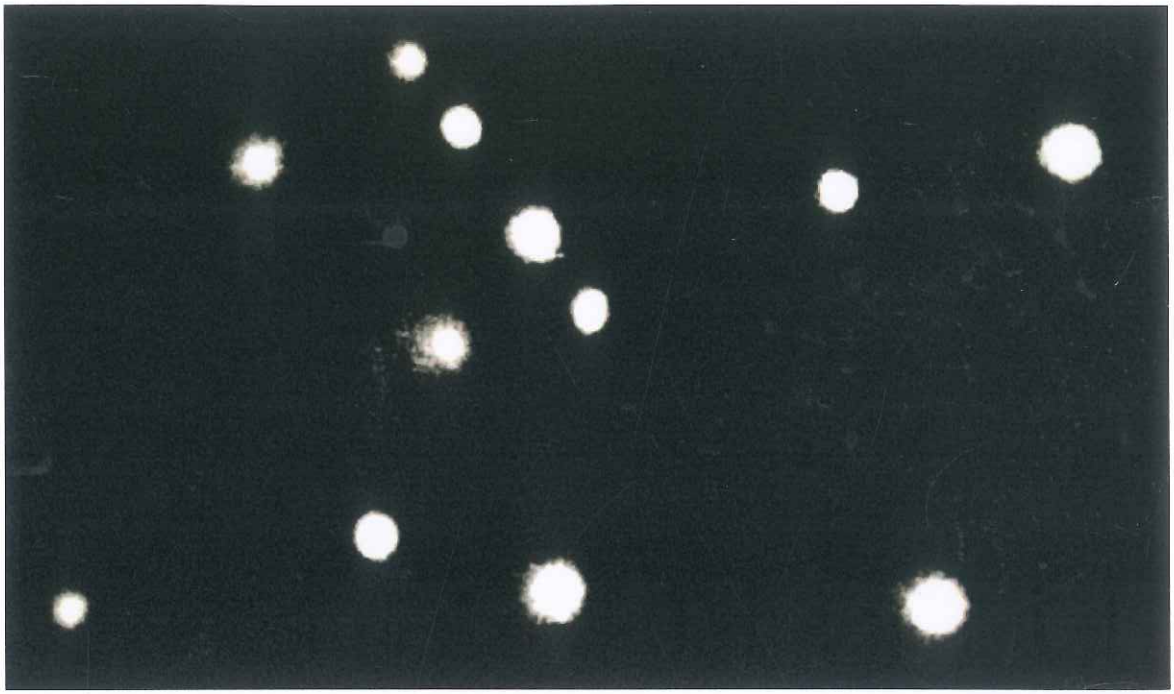
Şekil 4.15 Negatif kontrol ve doz uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk uzunluğu (µm) (*$p \leq 0,05$)



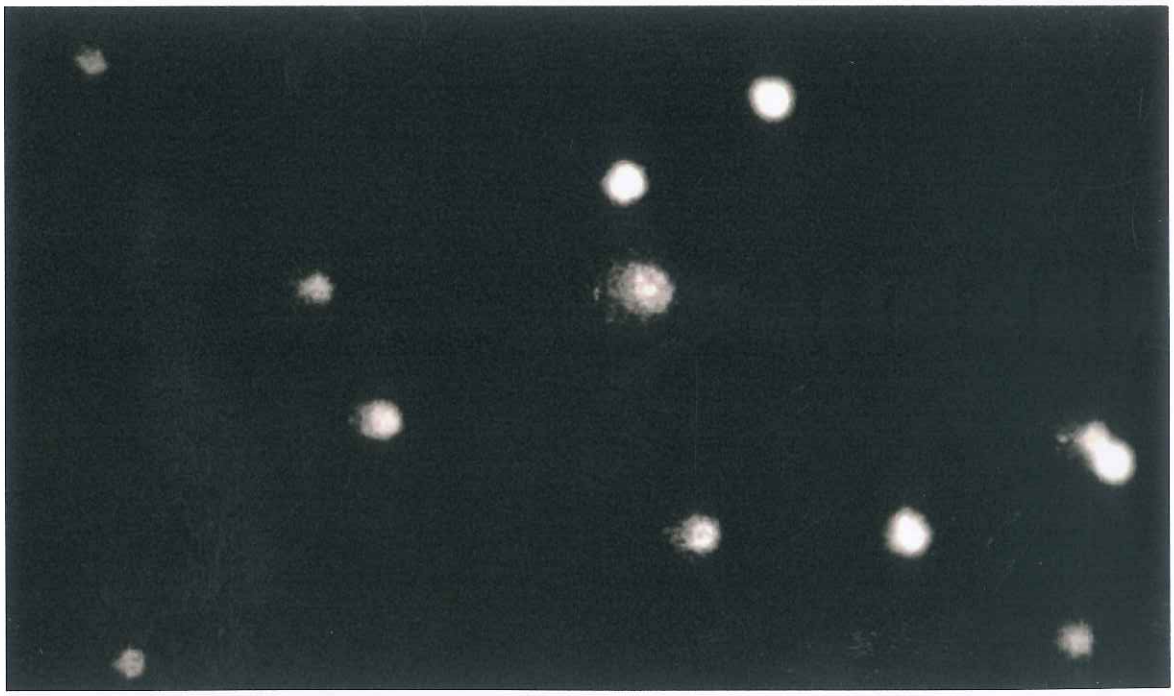
Şekil 4.16 Negatif kontrol ve doz uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk momenti (µm) (*p≤0,05)



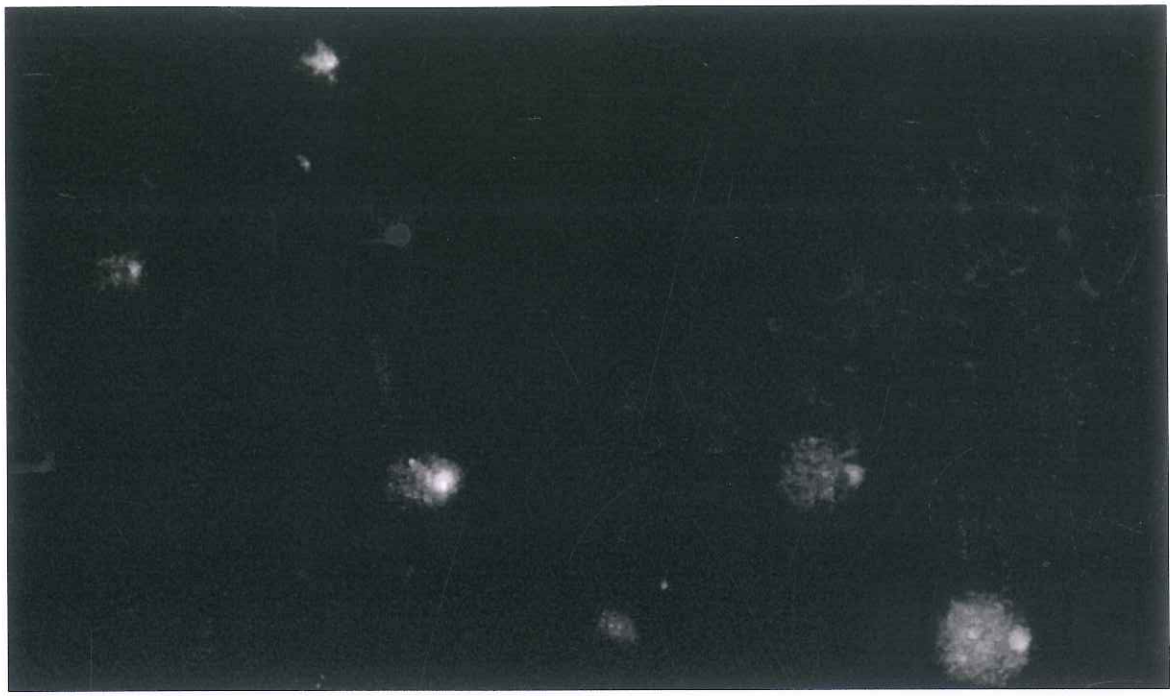
Şekil 4.17 Negatif kontrol ve doz uygulama gruplarına ait karaciğer hücrelerinde kuyruk yüzdesi (%)(*p≤0,05)



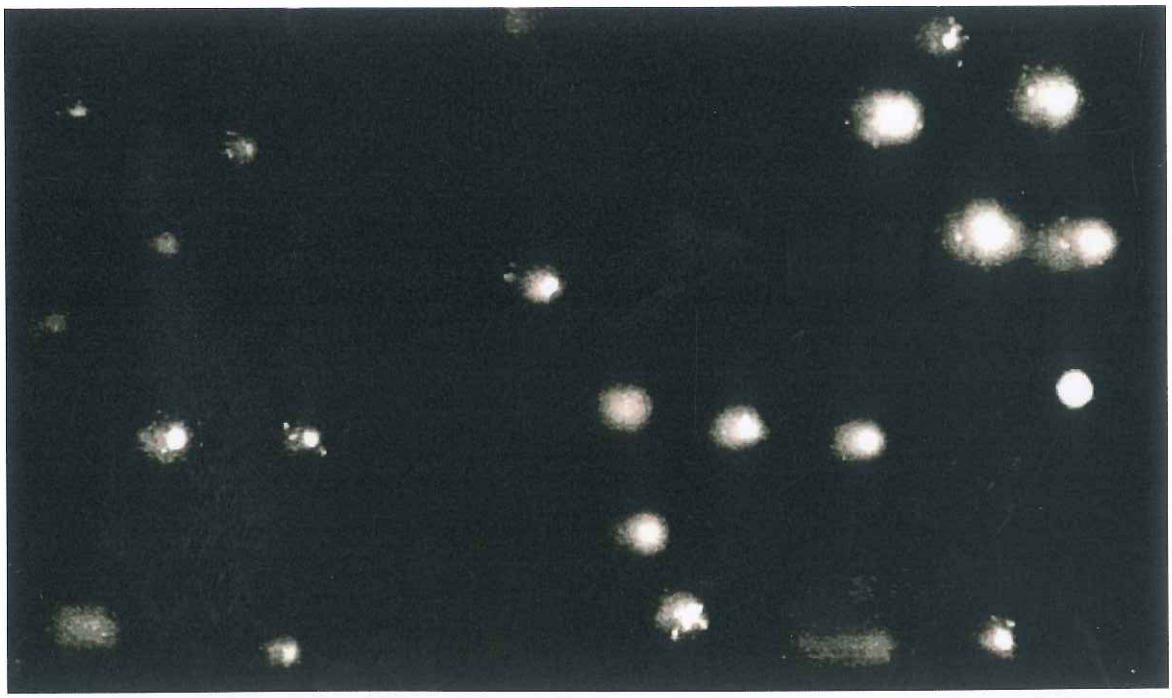
Şekil 4.18 Negatif (yağ) kontrol grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



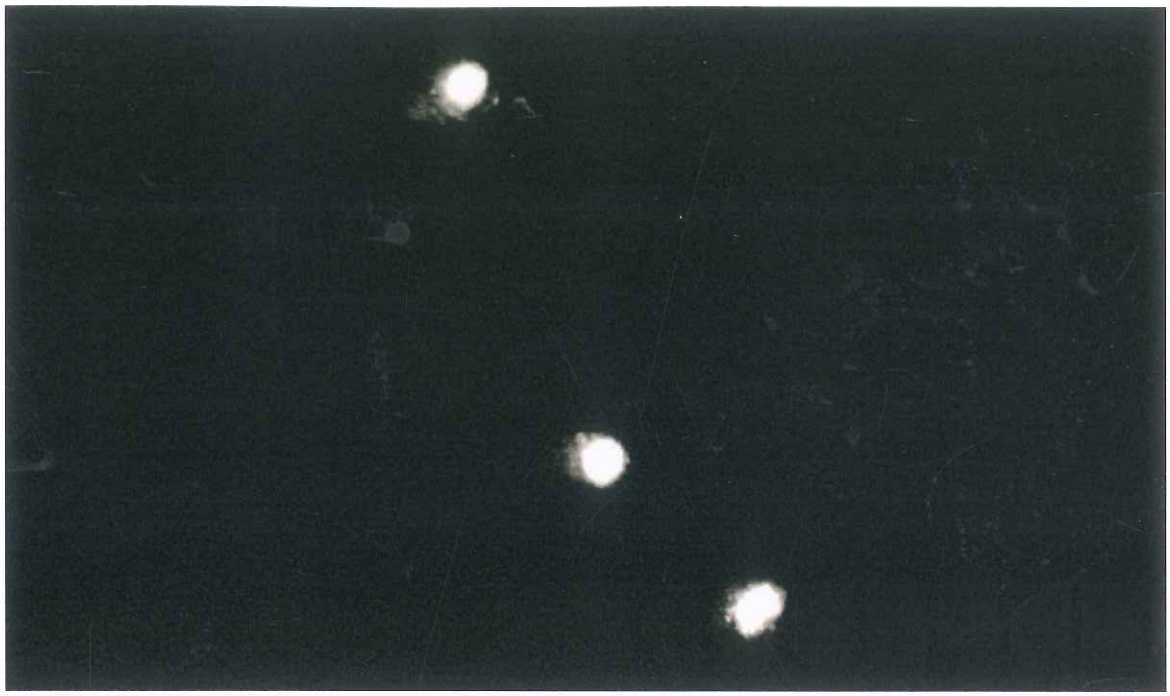
Şekil 4.19 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



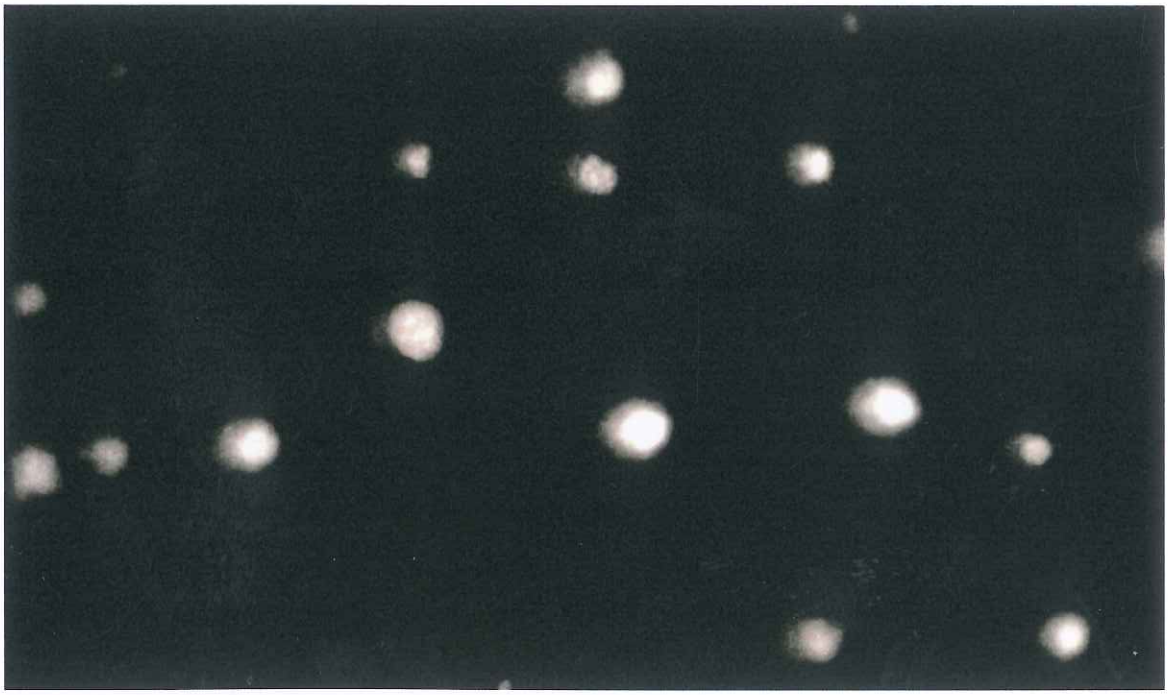
Şekil 4.20 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



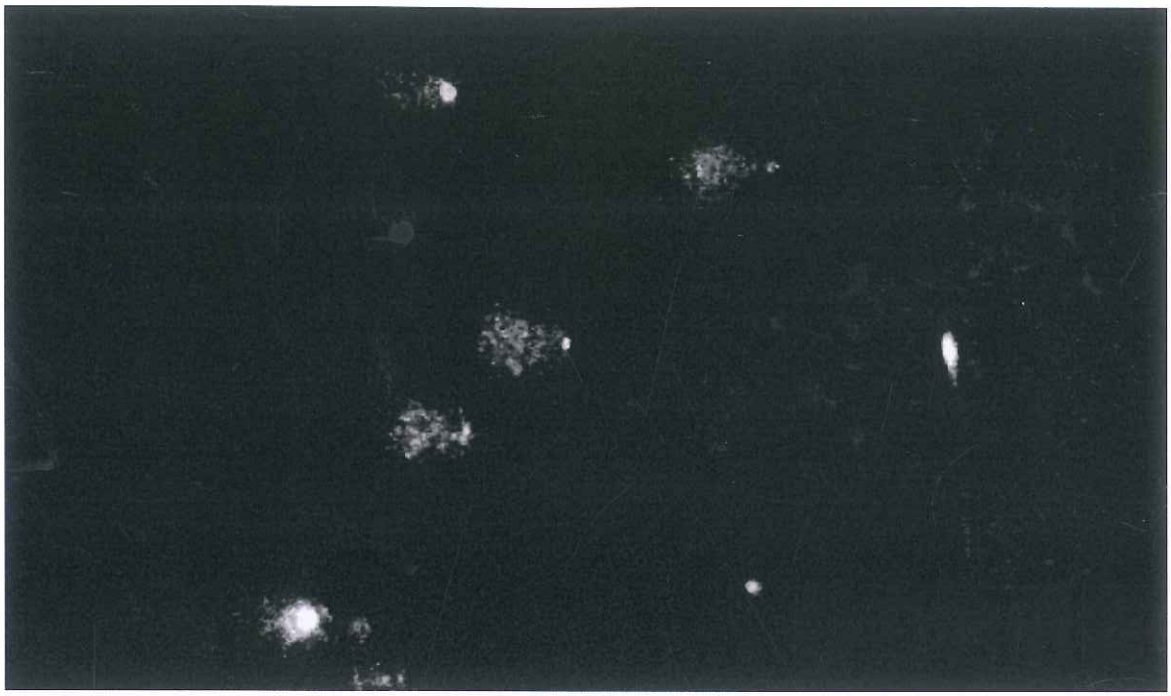
Şekil 4.21 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



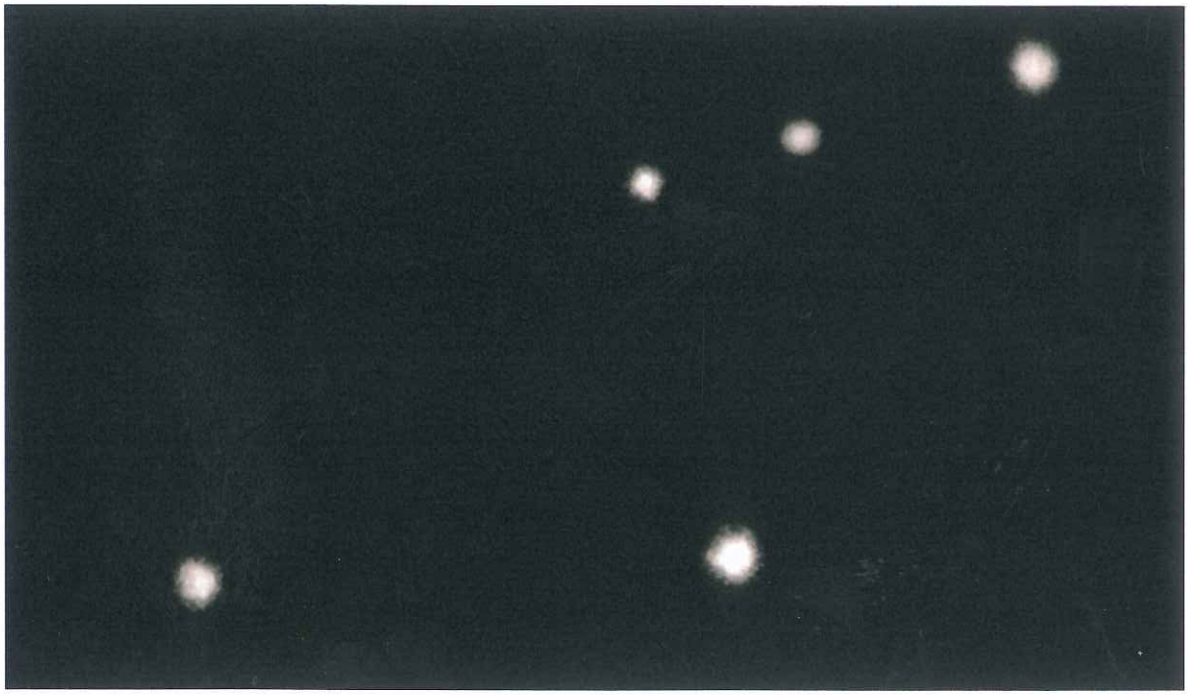
Şekil 4.22 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



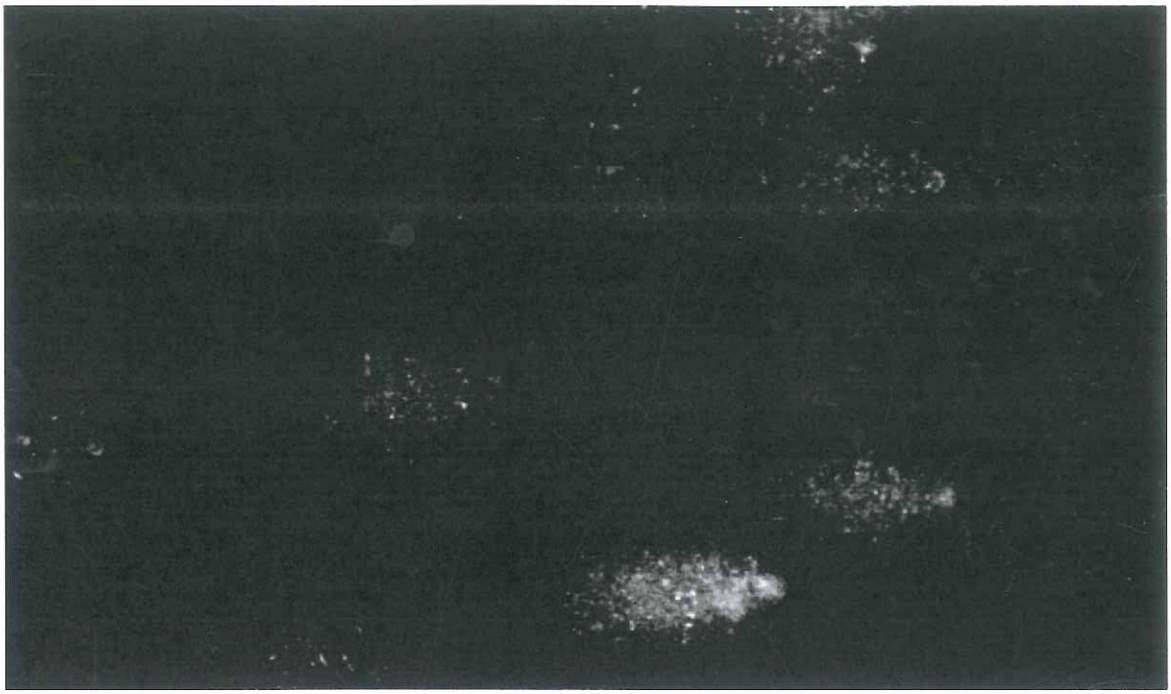
Şekil 4.23 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



Şekil 4.24 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hayalet hücreleri (200X)



Şekil 4.25 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hücreleri (200X)



Şekil 4.26 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer hayalet hücreleri (200X)

4.3. Histopatolojik İncelemeler

Deney sonunda alınan karaciğer ve böbrek dokuları Hematoksilen&Eozin ile boyanmış ve incelenmiş, karaciğer dokularının 100X ve 200X büyütmede, böbrek dokularının ise 100X'de korteks ve medulla bölgesinin fotoğrafları çekilmiştir. Tablo 4.10'da karaciğer dokusunda ve 4.11'de ise böbrek dokusunda deney gruplarına ait histopatolojik bulguların görülme sıklığı verilmiştir. Şekil 4.27'den 4.40'ye kadar kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer görüntüleri verilmiştir. 14 Günlük bütilparaben uygulama gruplarında karaciğerde sinüzoidal dejenerasyon ve konjesyon yağ kontrol grubu göre anlamlı artış göstermiştir. 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarında ise 14 günlük bütilparaben uygulama grubuna göre parametrelerde azalma gözlenmiş olsa da kontrol grubuna göre artış olmuştur. Ancak sadece 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben grubunda gözlenen sinüzoidal dejenerasyon ve konjesyon anlamlı bulunmuştur. Şekil 4.41'den 4.54'e kadar ise kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait böbrek görüntüleri verilmiştir. 14 günlük bütilparaben uygulama gruplarından 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben doz grubunda sadece glomerular kapsülün genişlemesi/parietal yapraklarda açılma sıklığındaki artış anlamlı bulunmuştur. 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben doz grubunda glomerular kapsülün genişlemesi/parietal yapraklarda açılma, konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve tübüler dilatasyon anlamlı artış gösterirken; 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben doz grubunda bunlara ek olarak gözlenen hücresel debris alanları ve tübül içi ölü hücrelerdeki artış anlamlı bulunmuştur. 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarından 28 gün 100 mg/kg/gün ile 200 mg/kg/gün bütilparaben doz gruplarında patolojik değişimlerde anlamlı bir artış kaydedilmemiştir. Buna karşılık 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben doz grubunda ise glomerular kapsülün genişlemesi/parietal yapraklarda açılma, konjesyon ve tübüler dilatasyonda anlamlı bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.10 Kontrol ve Bütilparaben uygulama gruplarına ait karaciğer dokularının histolojik bulguları

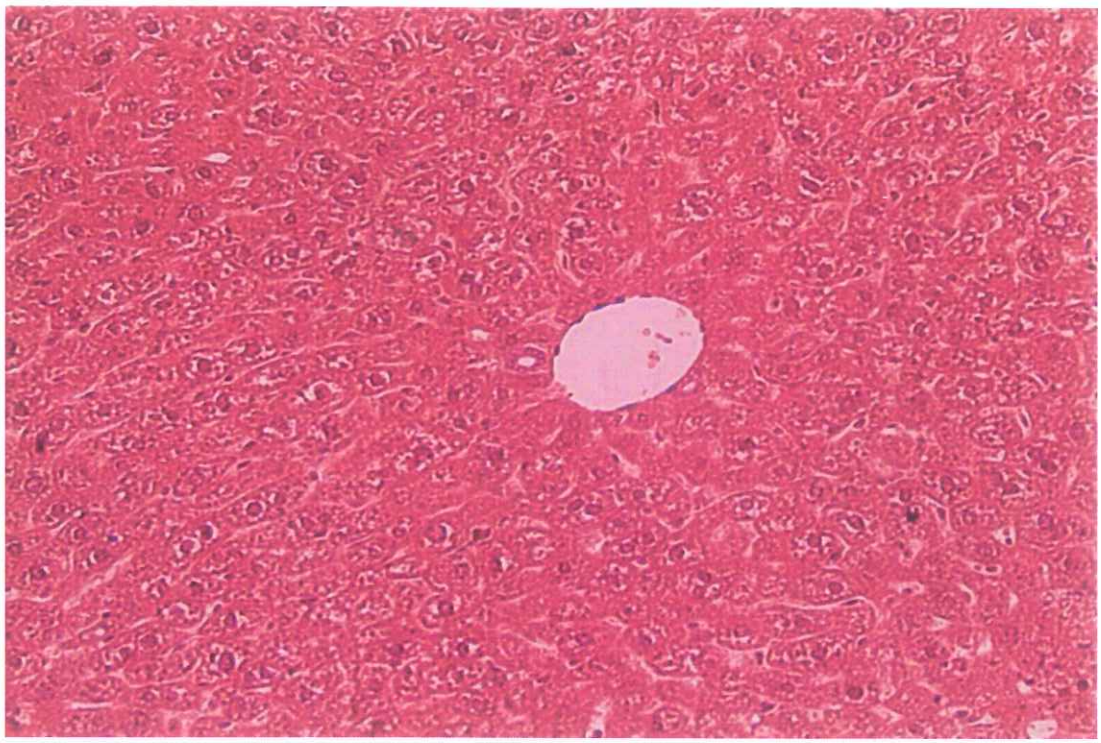
	Kontrol	Bütilparaben 14 Gün			Bütilparaben 28 Gün		
	1 ml Mısır Yağı	200 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün	800 mg/kg/gün	100 mg/kg/gün	200 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün
Sinüzoidal dejenerasyon	1/6	5/6*	5/6*	6/6*	2/6	3/6	5/6*
Konjesyon	2/6	5/6*	6/6*	6/6*	2/6	3/6	6/6*
Ödem	0/6	2/6	2/6	2/6	1/6	2/6	1/6
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	2/6	2/6	3/6	0/6	1/6	4/6
Hepatositlerde heterokromatikleşme	0/6	3/6	2/6	3/6	1/6	3/6	2/6

N: 6; Değerler, histopatolojik değişiklik gözlenen hayvan sayısı/gruptaki toplam hayvan sayısı şeklinde verilmiştir.
*Kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).

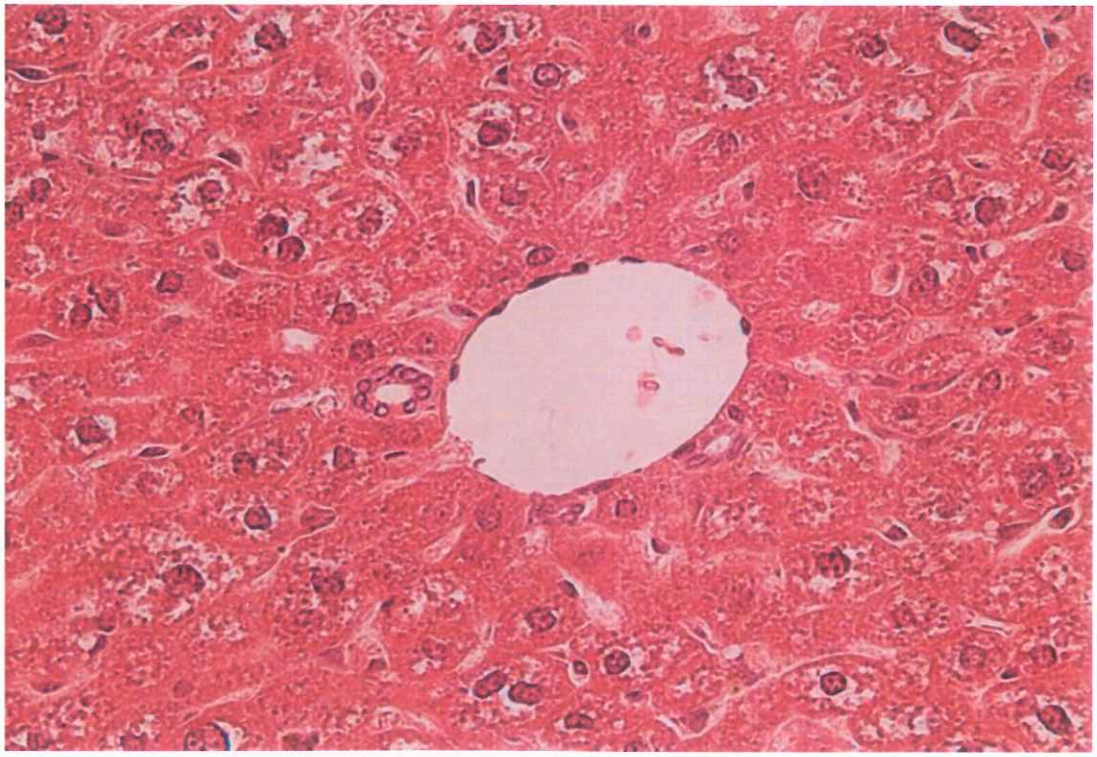
Tablo 4.11 Kontrol ve Bütilparaben uygulama gruplarına ait böbrek dokularının histolojik bulguları

	Kontrol	Bütilparaben 14 Gün			Bütilparaben 28 Gün		
	1 mL Mısır Yağı	200 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün	800 mg/kg/gün	100 mg/kg/gün	200 mg/kg/gün	400 mg/kg/gün
Konjesyon	1/6	3/6	5/6*	6/6*	3/6	3/6	5/6*
Glomerular Kapsülde Genişleme/Parietal Yapraklarda Açılma	1/6	4/6*	4/6*	6/6*	2/6	2/6	4/6*
Hücresel debris alanları	0/6	2/6	2/6	5/6*	0/6	1/6	2/6
Tübülde ölü hücreler	1/6	2/6	3/6	5/6*	1/6	2/6	2/6
Tübüler dilatasyon	2/6	3/6	6/6*	6/6*	3/6	3/6	6/6*
Mononükleer hücre infiltrasyonu	0/6	1/6	4/6*	5/6*	1/6	1/6	3/6

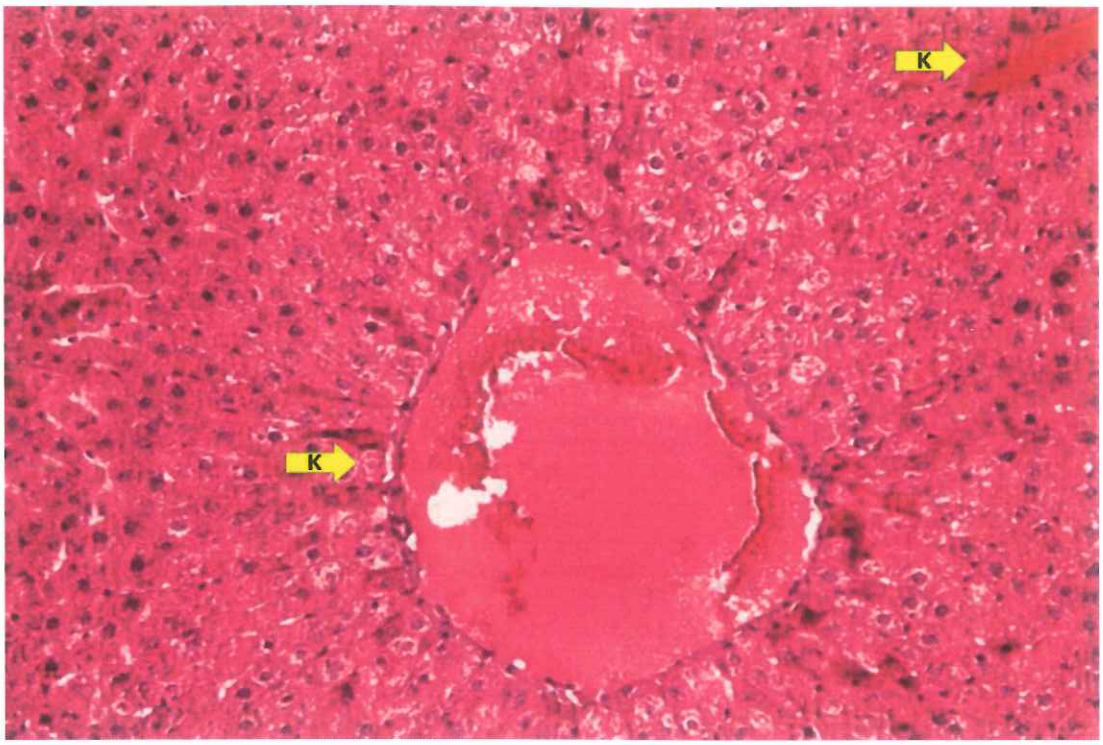
N: 6; Değerler, histopatolojik değişiklik gözlenen hayvan sayısı/gruptaki toplam hayvan sayısı şeklinde verilmiştir.
*Kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).



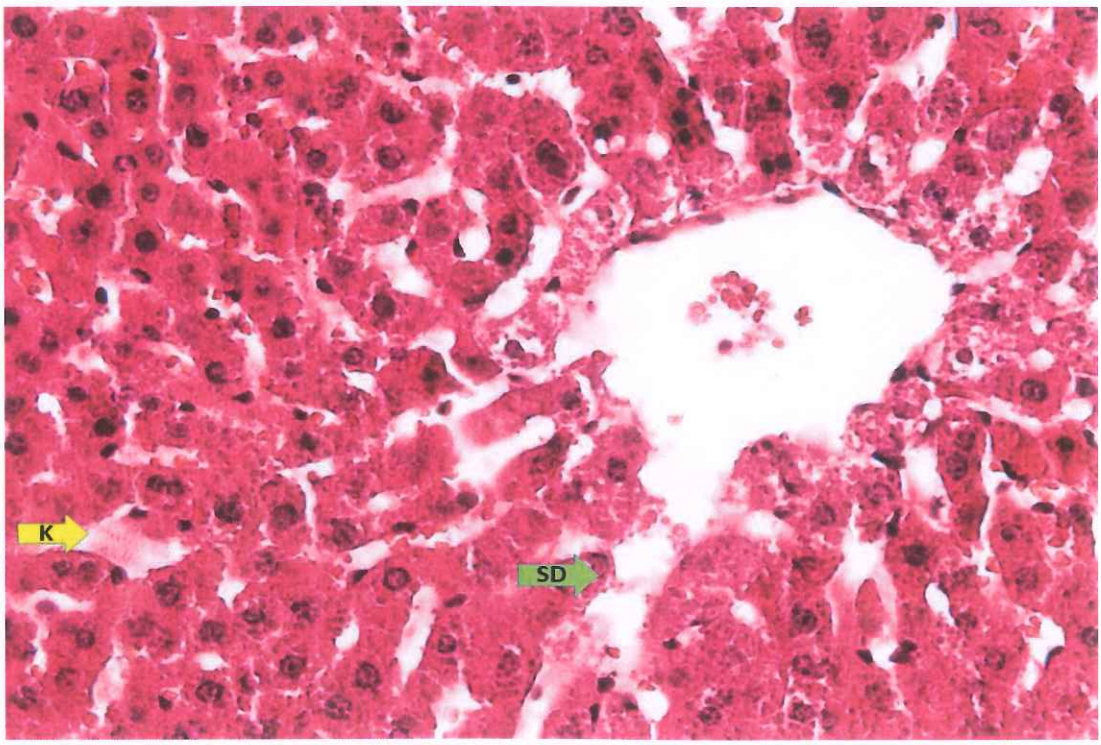
Şekil 4.27 Negatif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X)



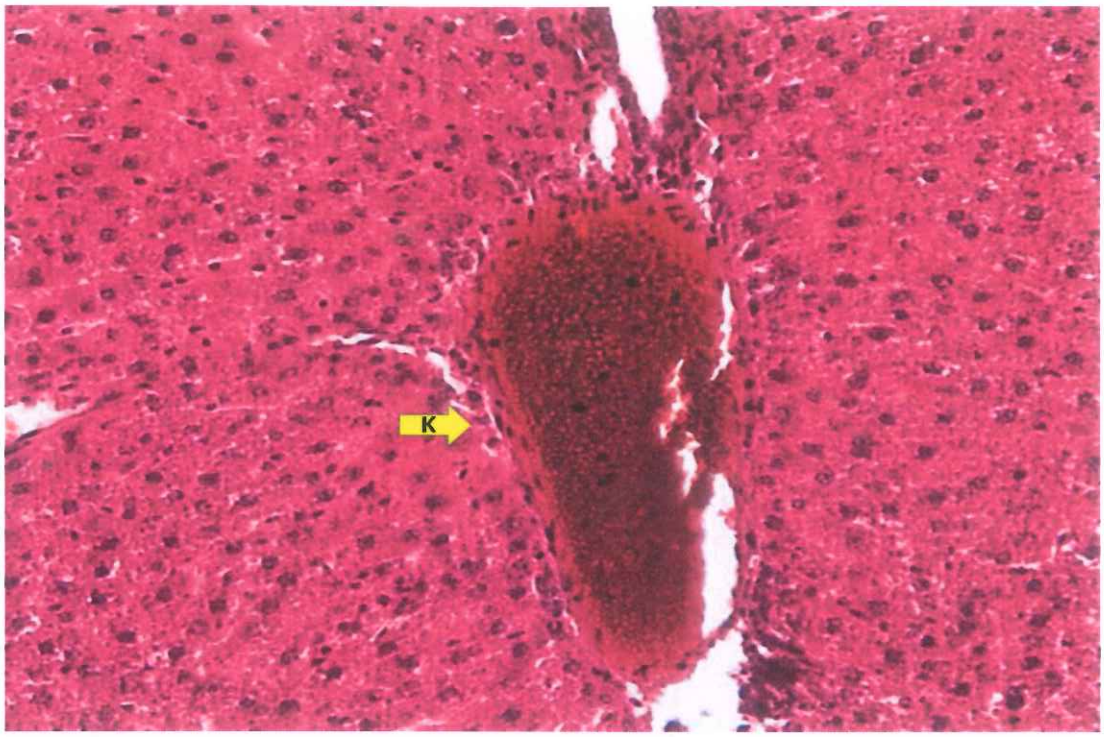
Şekil 4.28 Negatif kontrol grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X)



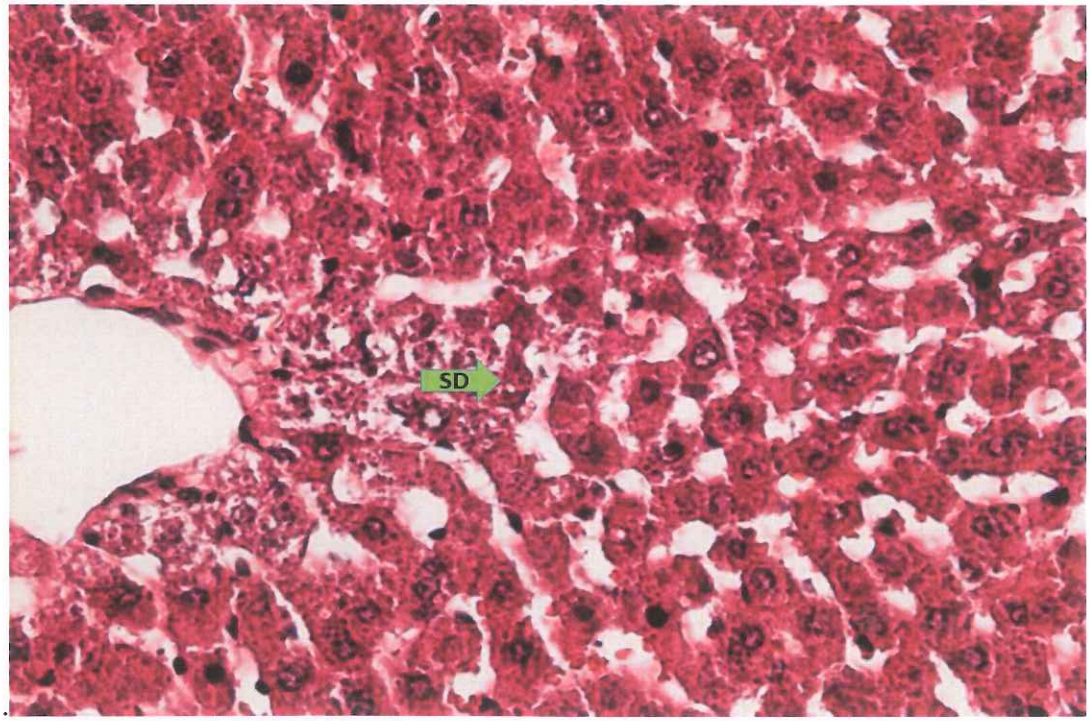
Şekil 4.29 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X). K: Konjesyon



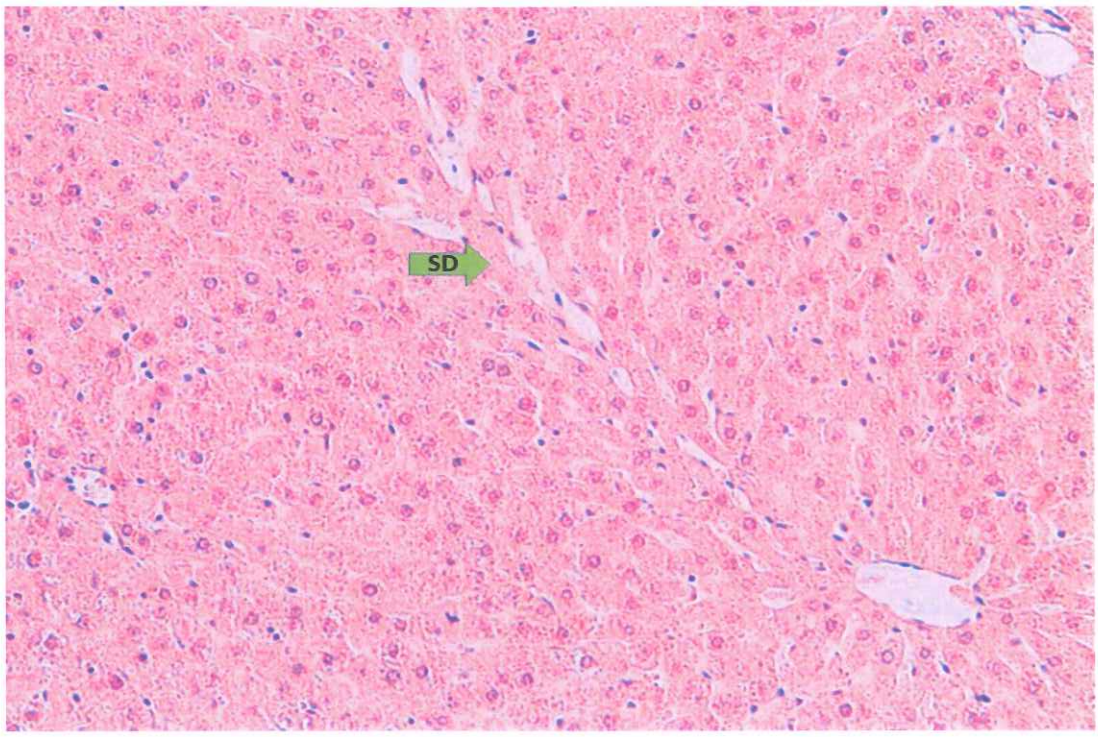
Şekil 4.30 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X). SD: Sinüzoidal dejenerasyon, K: Konjesyon.



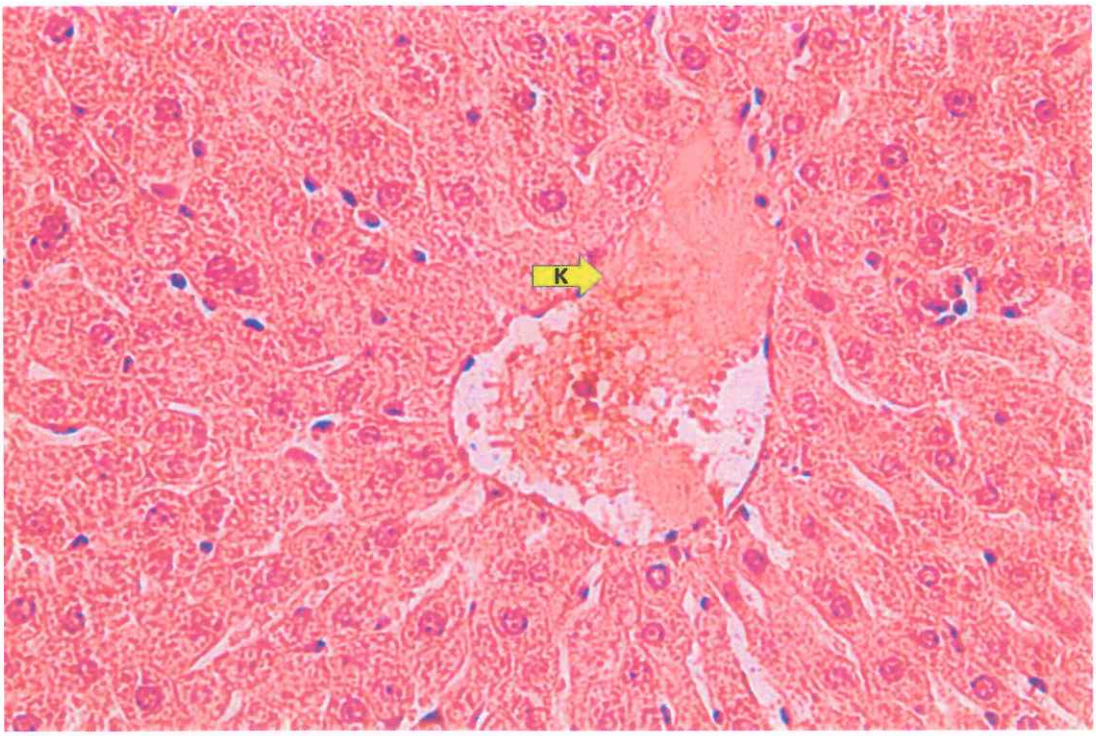
Şekil 4.31 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X). K: Konjesyon



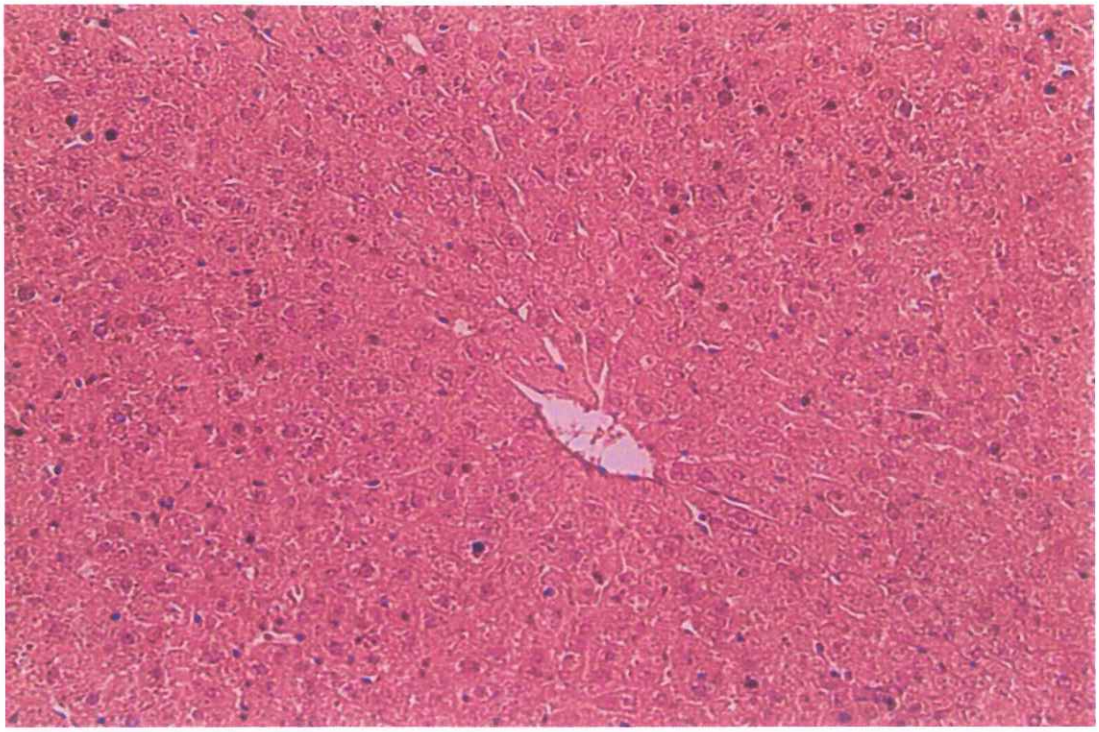
Şekil 4.32 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X). SD: Sinüzoidal dejenerasyon.



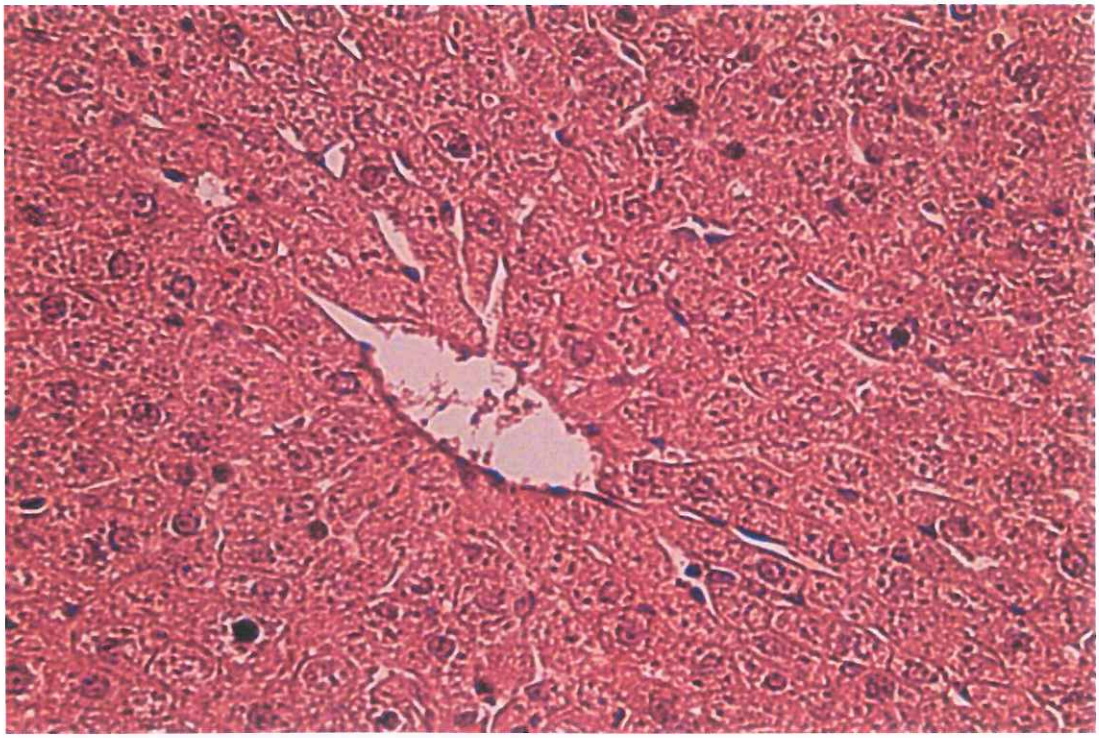
Şekil 4.33 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X). SD: Sinüzoidal dejenerasyon



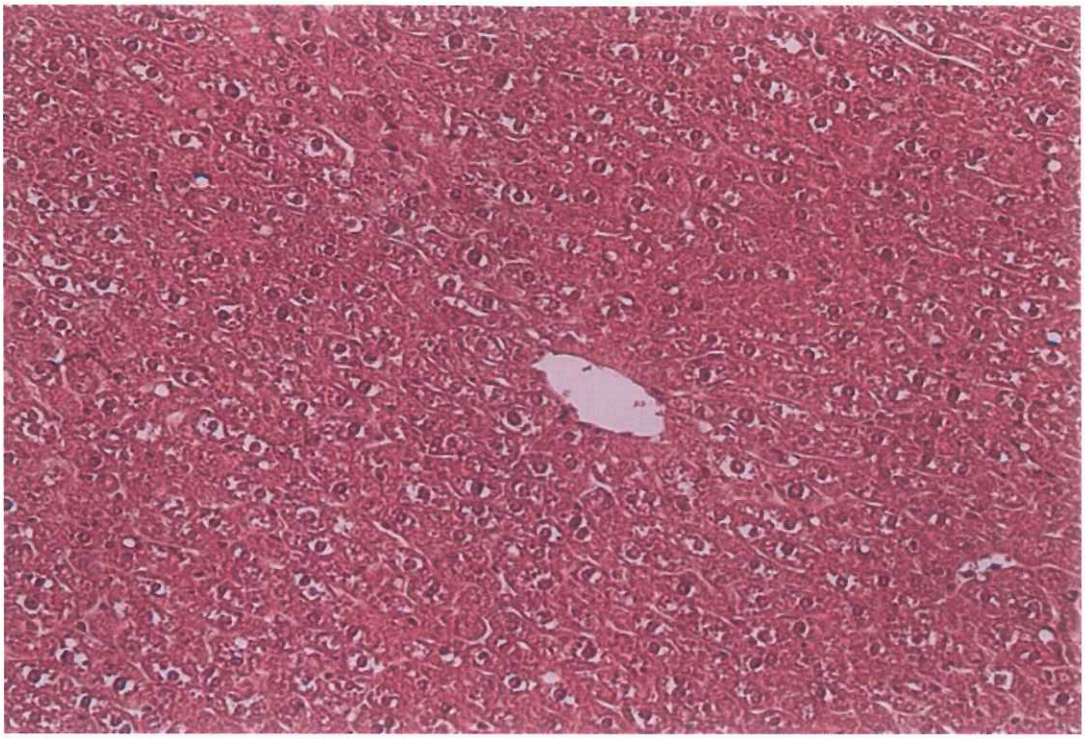
Şekil 4.34 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X). K: Konjesyon.



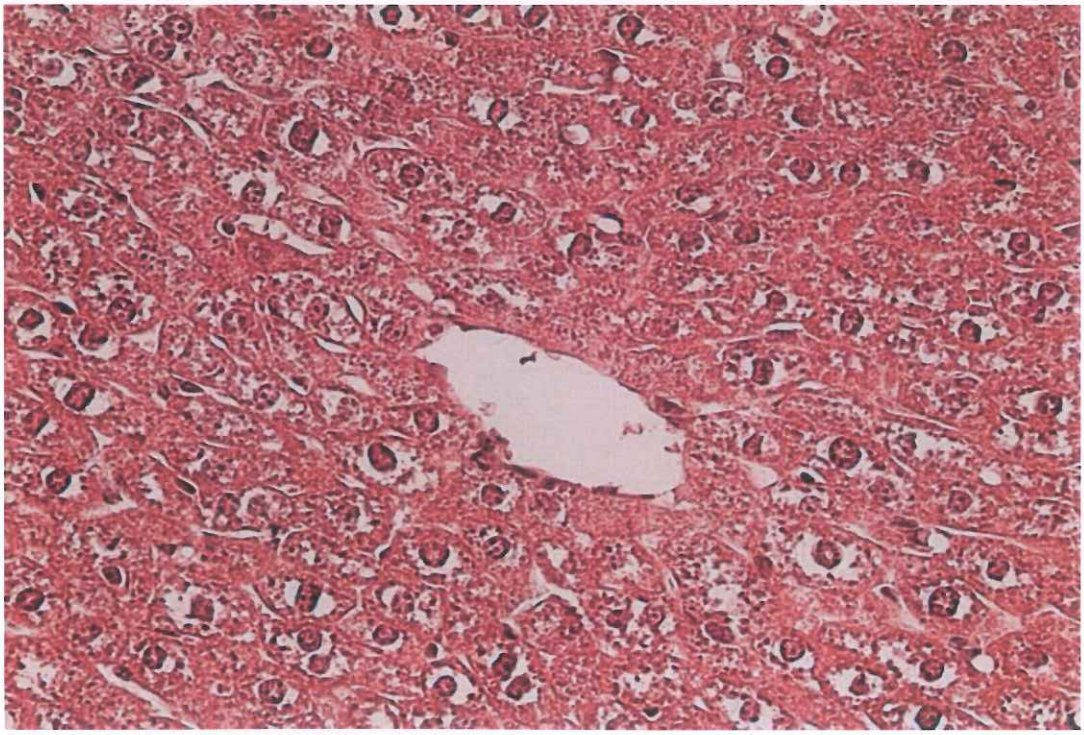
Şekil 4.35 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X)



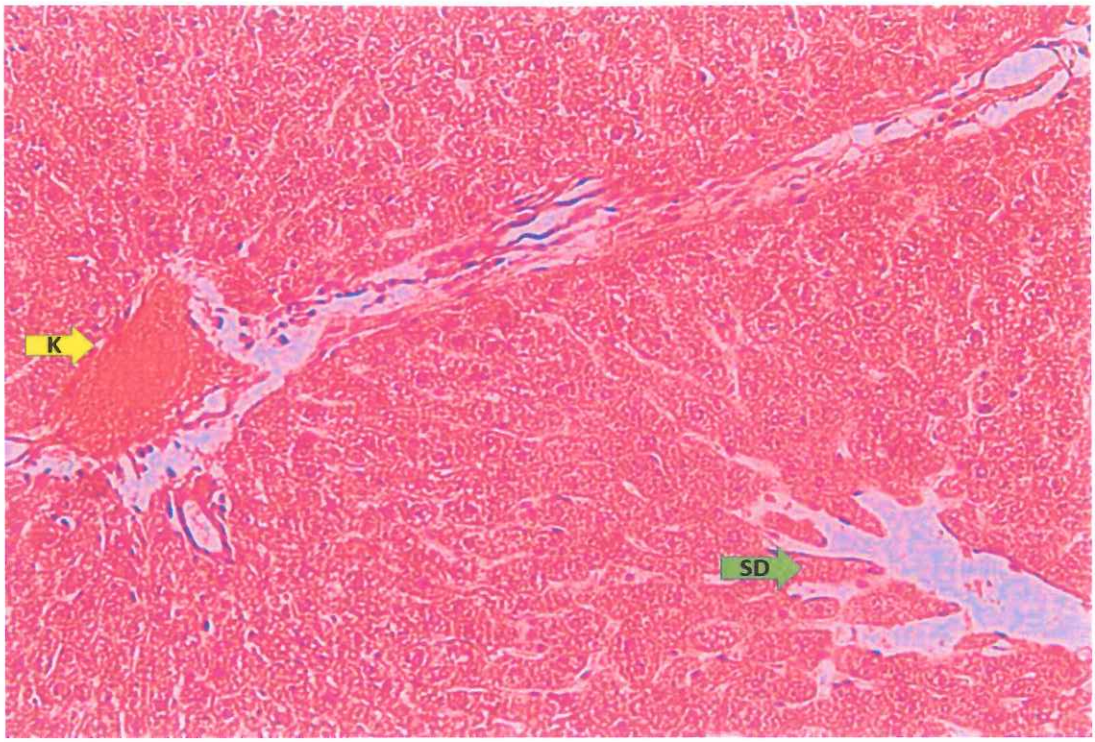
Şekil 4.36 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X)



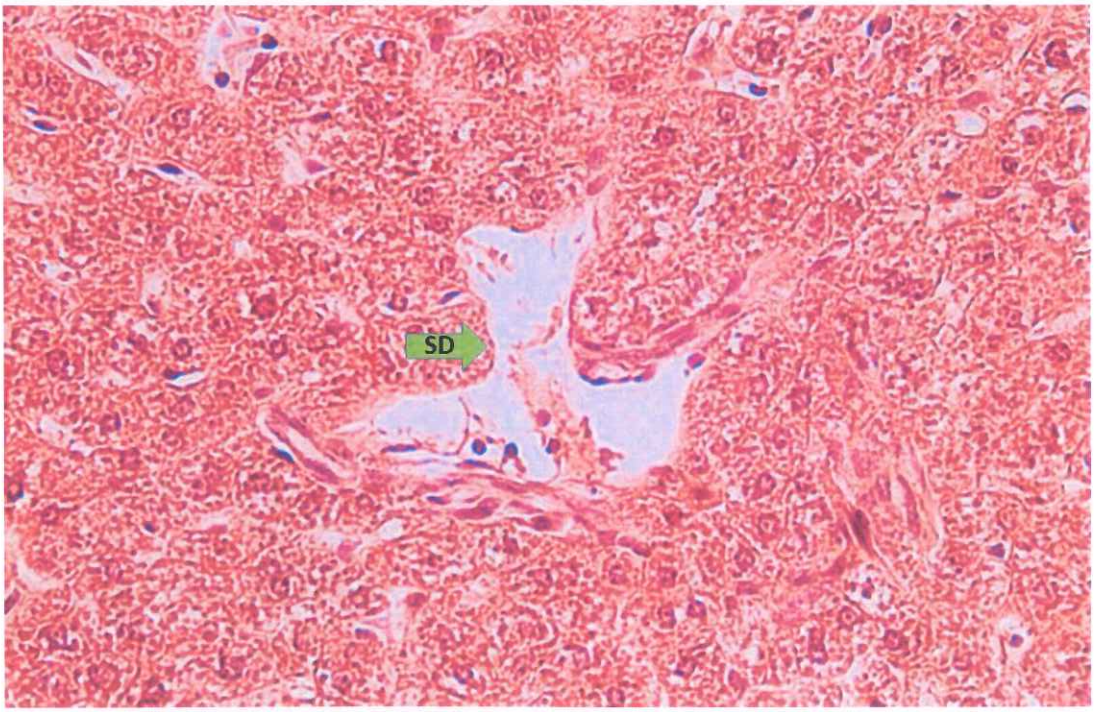
Şekil 4.37 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X)



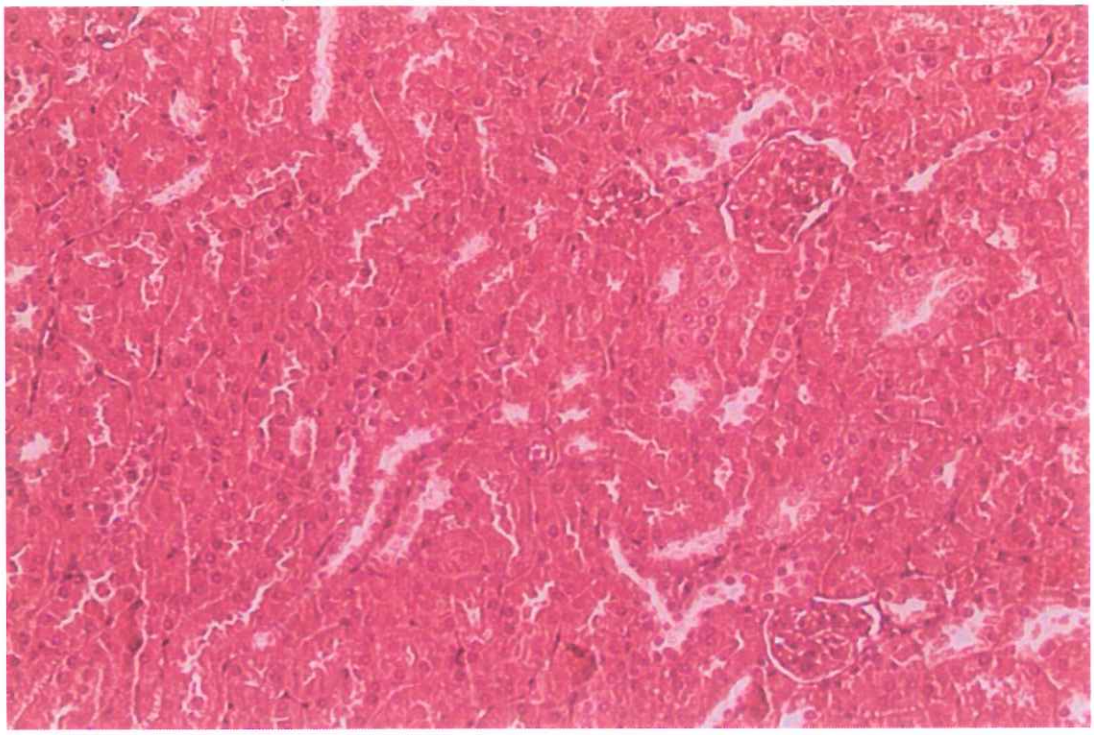
Şekil 4.38 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X)



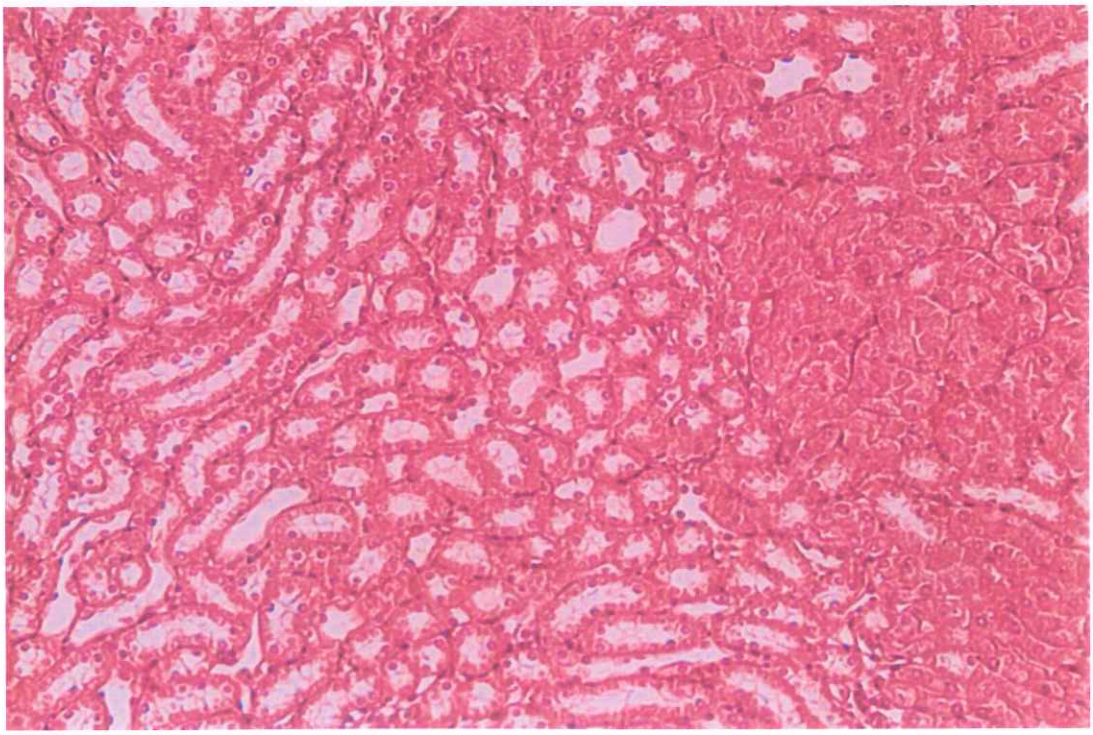
Şekil 4.39 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (100X). SD: Sinüzoidal dejenerasyon, K: Konjesyon.



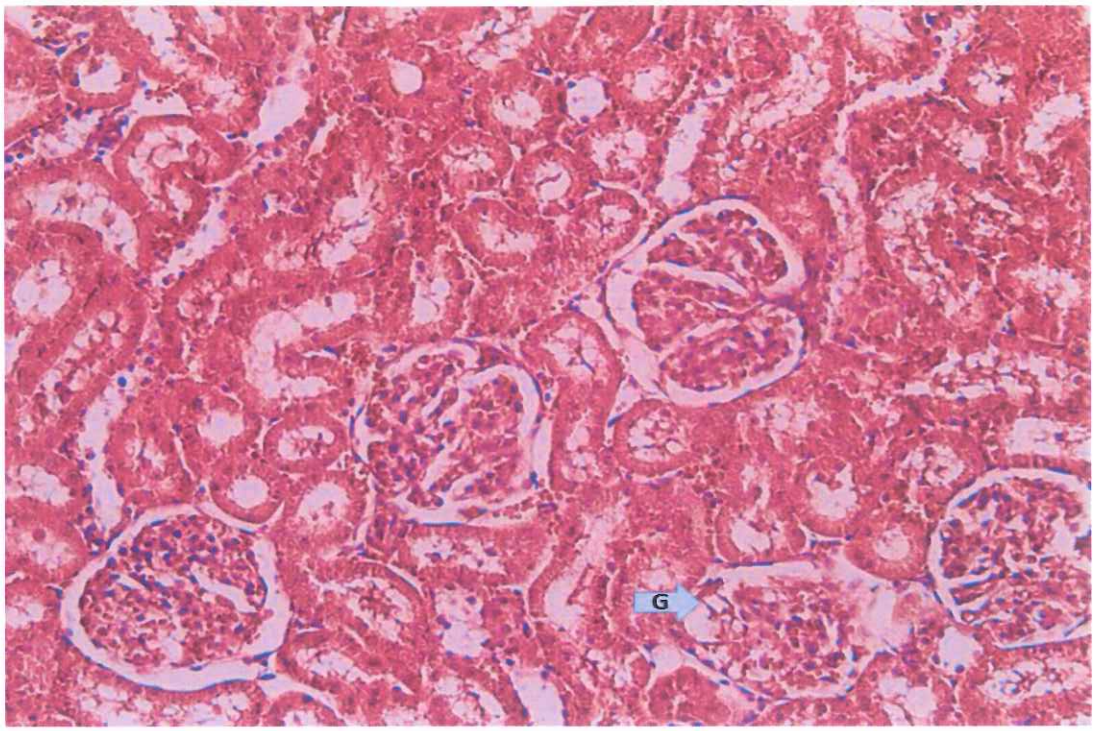
Şekil 4.40 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü (200X). SD: Sinüzoidal dejenerasyon, MHİ: Mononükleer hücre infiltrasyonu.



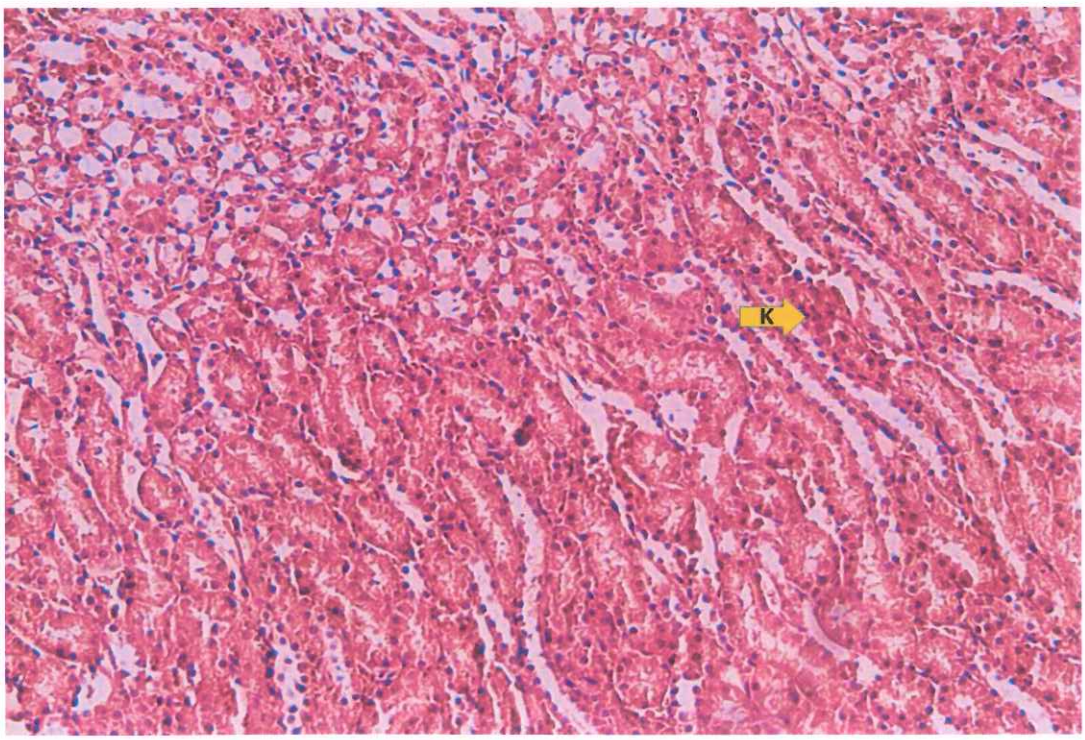
Şekil 4.41 Negatif kontrol grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X)



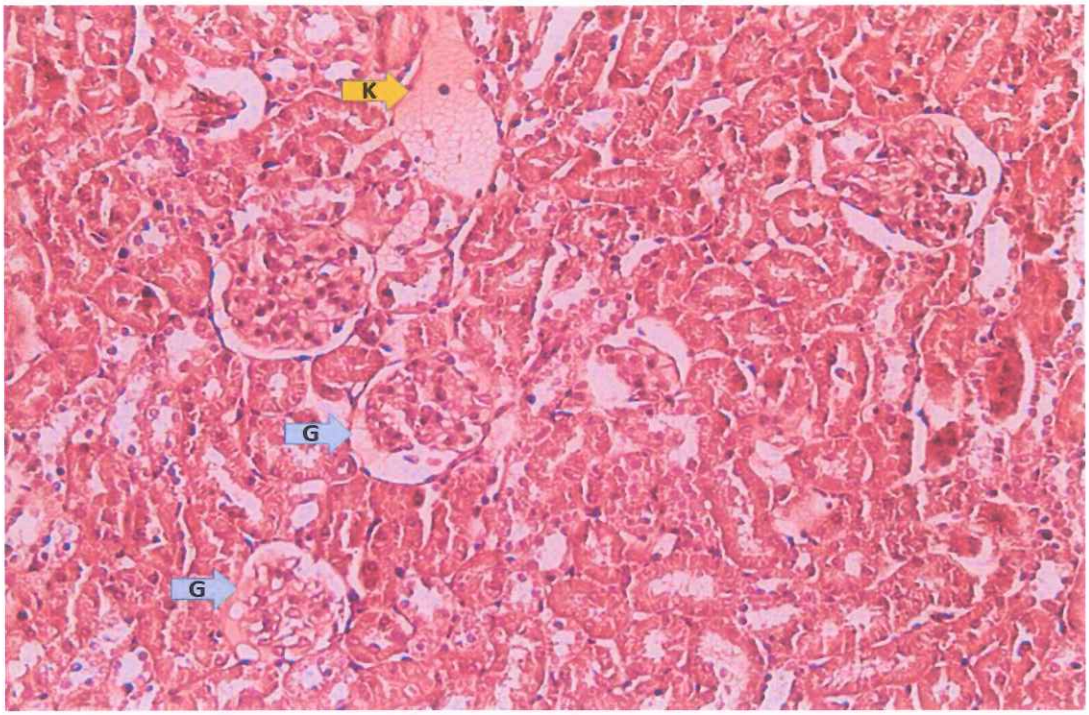
Şekil 4.42 Negatif kontrol grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X)



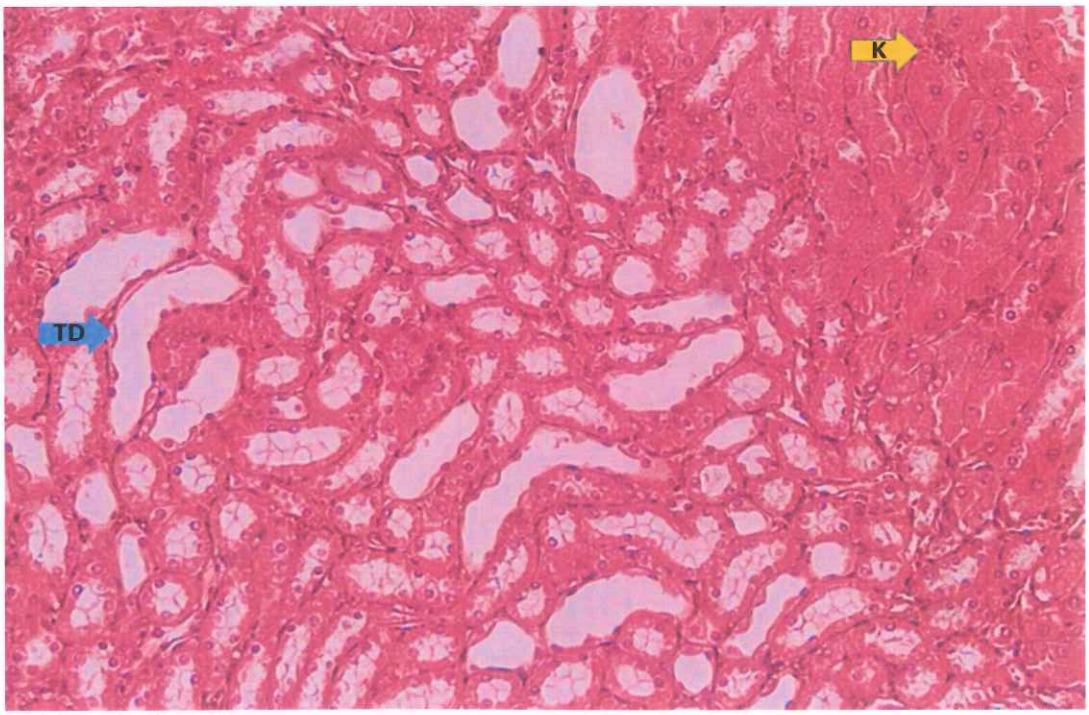
Şekil 4.43 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X). G: Parietal yapraklarda açılma.



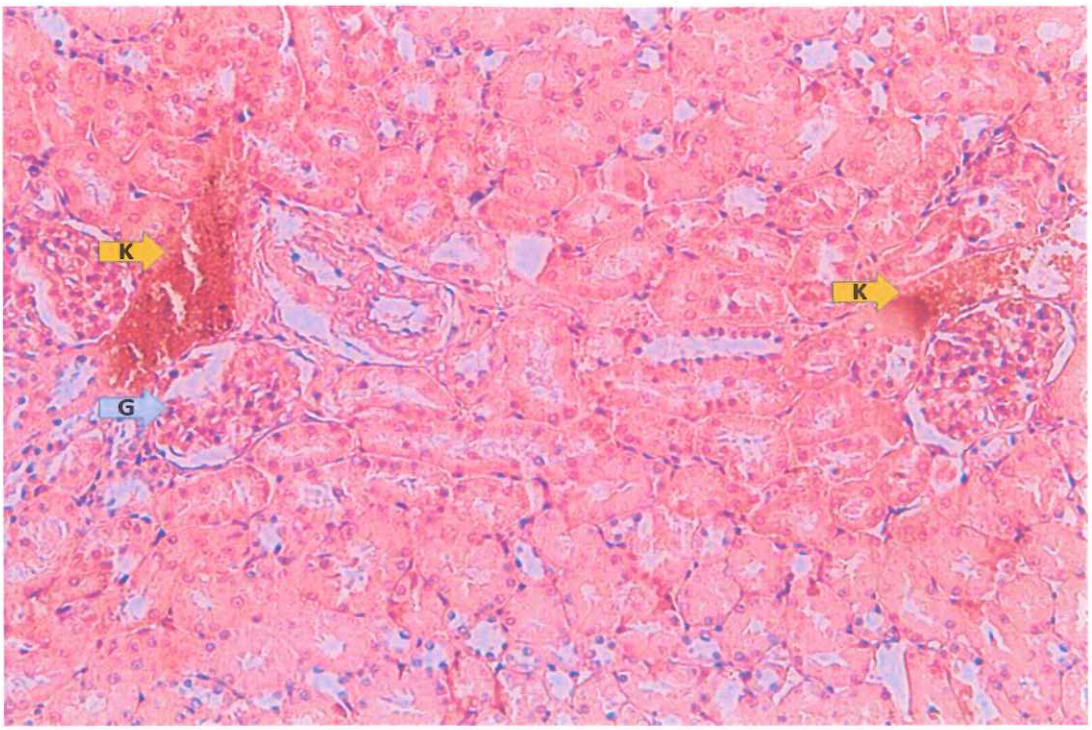
Şekil 4.44 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). K: Konjesyon.



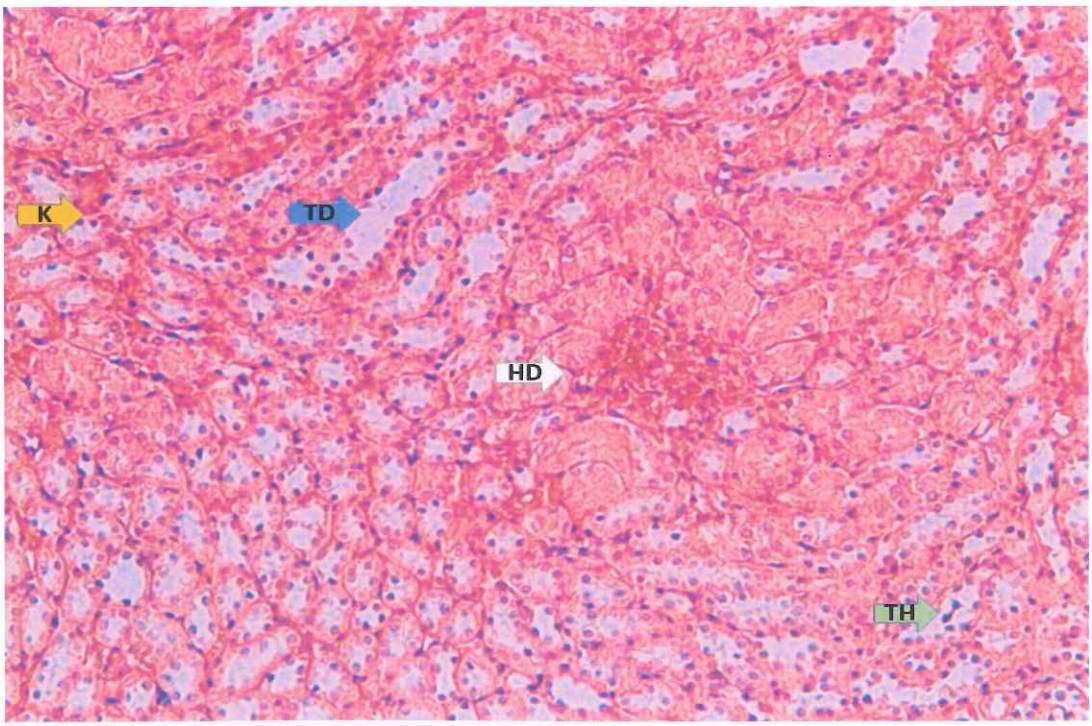
Şekil 4.45 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X). G: Parietal yapraklarda açılma, K: Konjesyon.



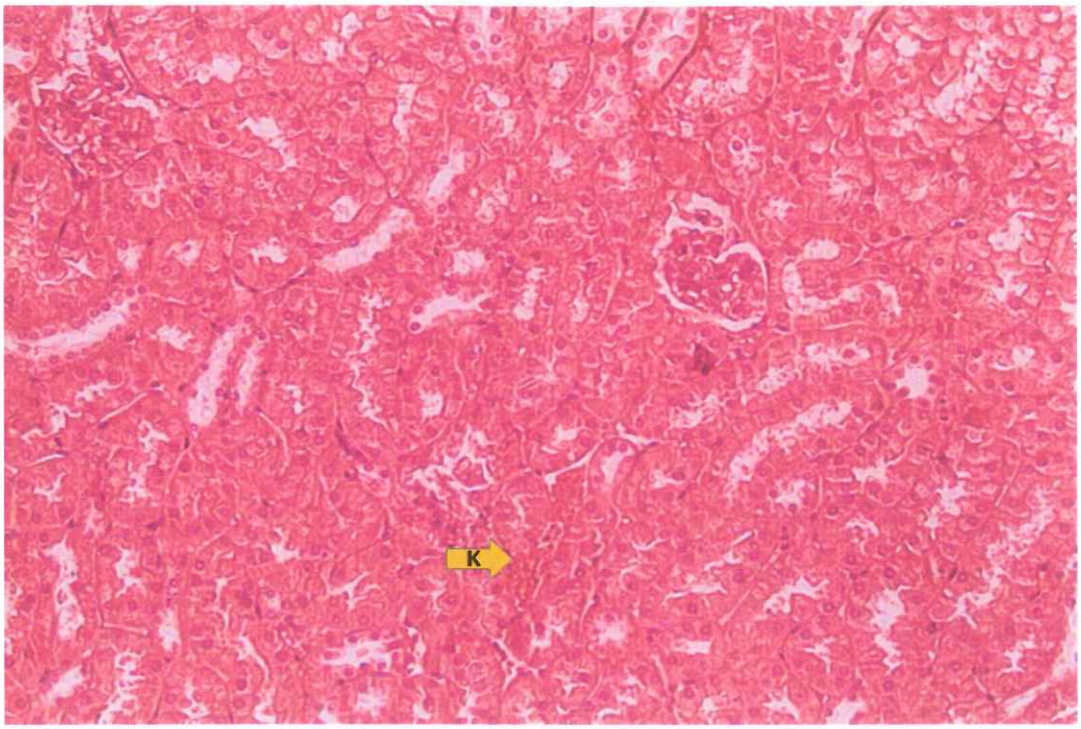
Şekil 4.46 14 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). TD: Tübüler dilatasyon, K: Konjesyon.



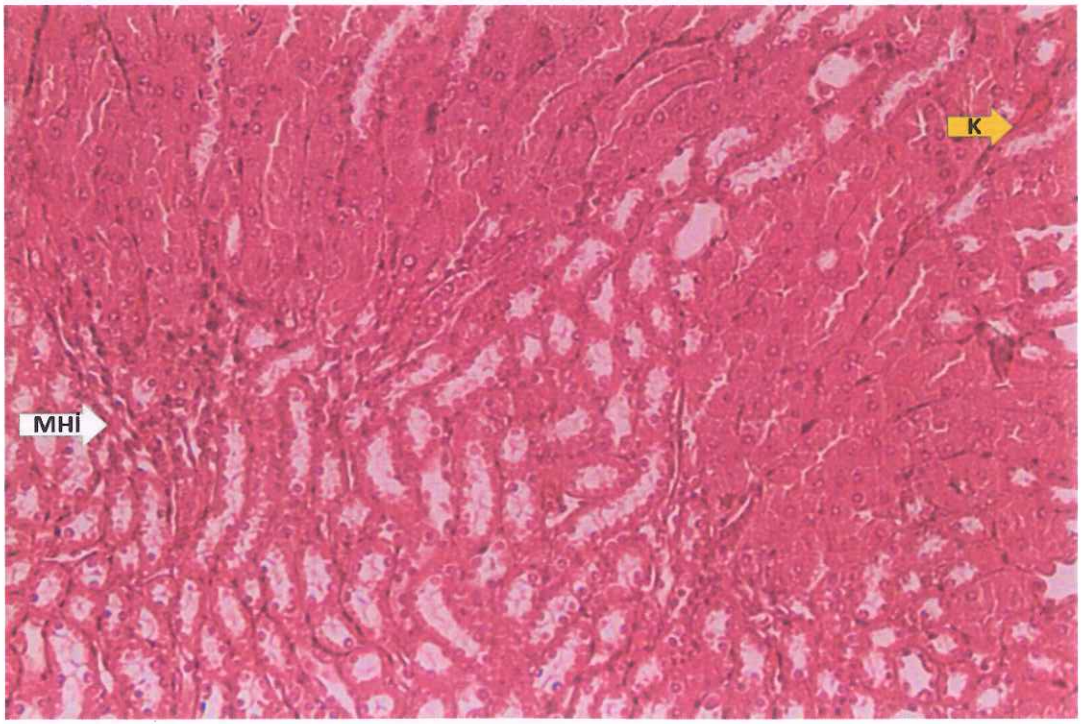
Şekil 4.47 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X). G: Parietal yapraklarda açılma, K: Konjesyon.



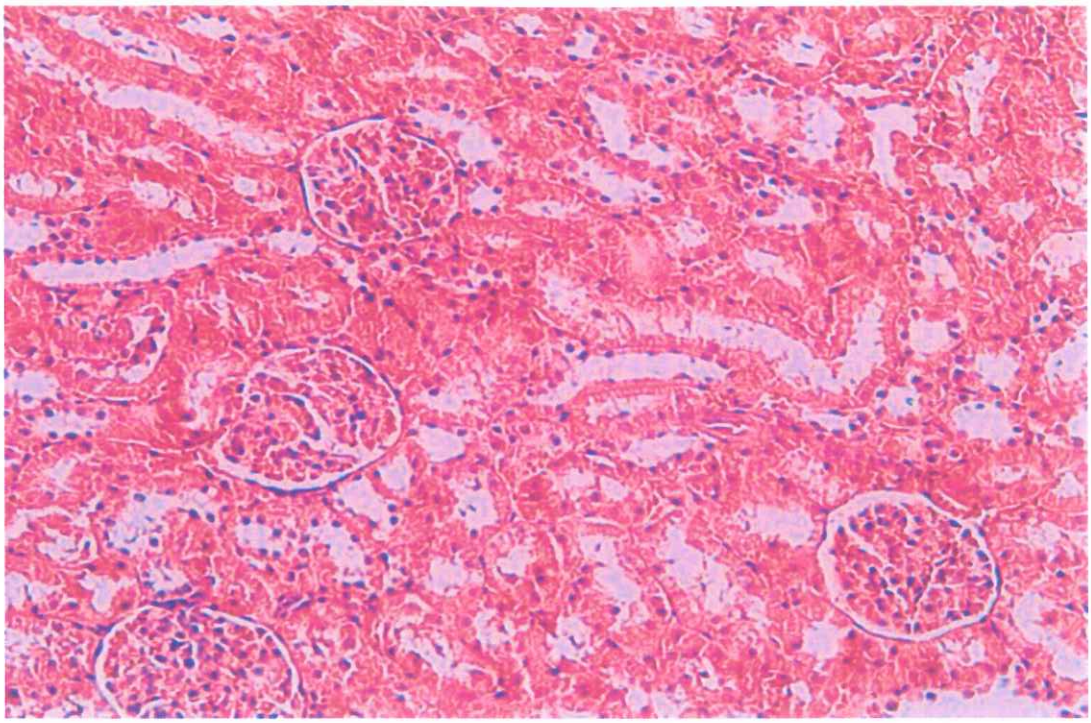
Şekil 4.48 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). TD: Tübüler dilatasyon, TH: Tübülde ölü hücreler, HD: Hücresel debris, K: Konjesyon.



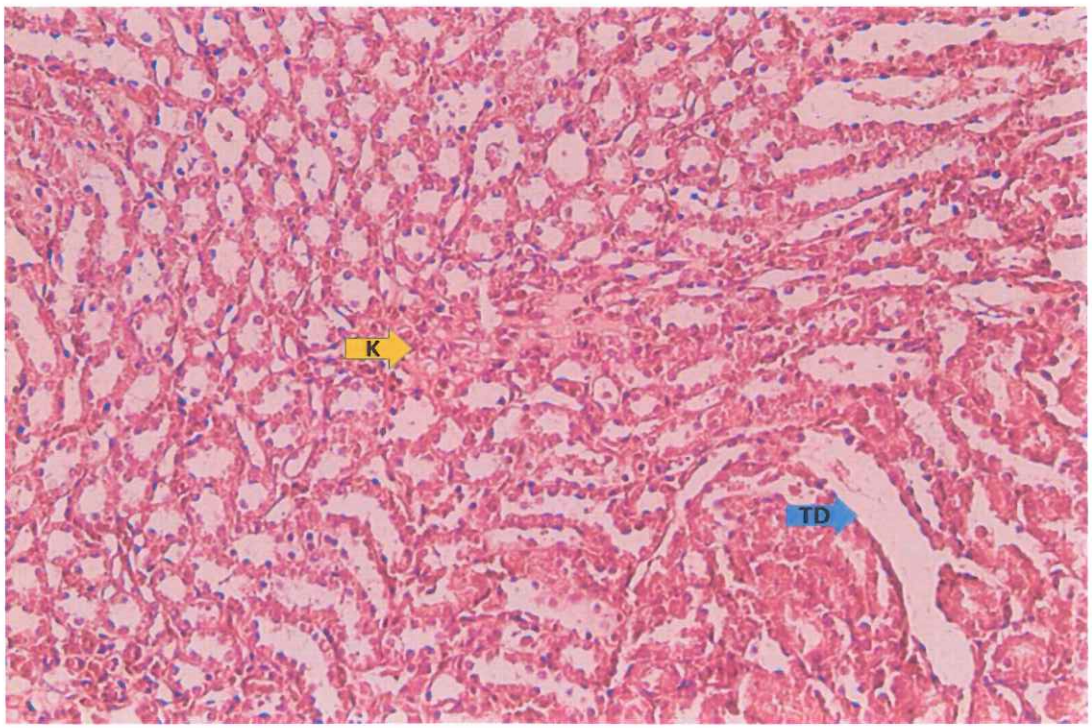
Şekil 4.49. 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X). K: Konjesyon.



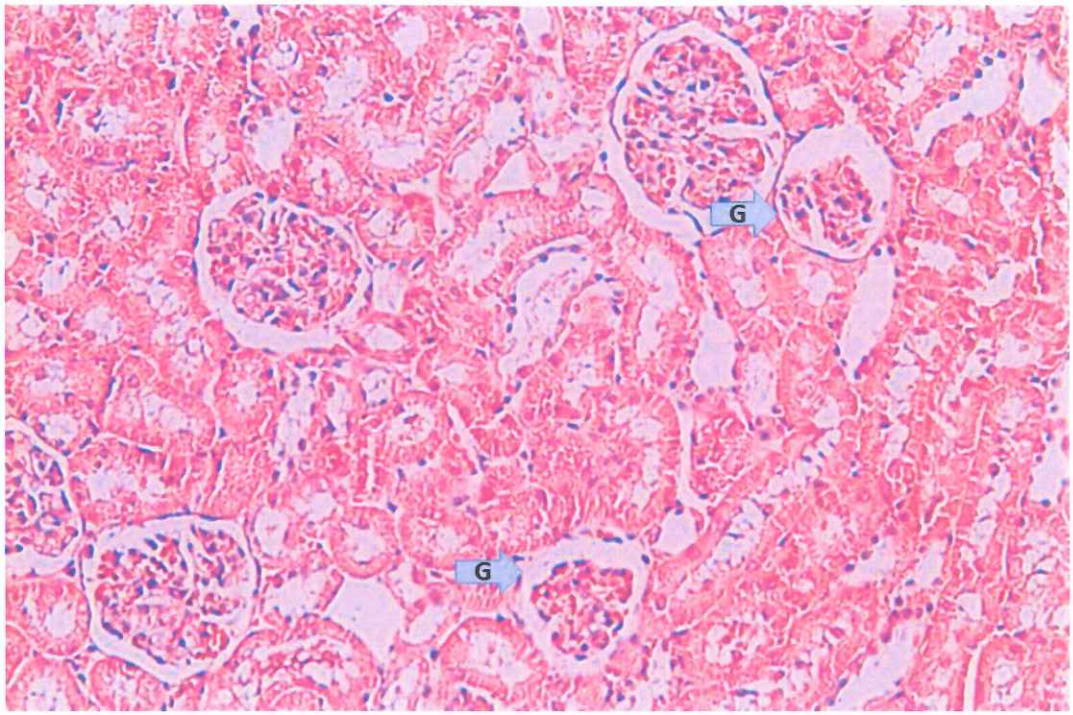
Şekil 4.50 28 gün 100 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). K: Konjesyon, MHİ: Mononükleer hücre infiltrasyonu.



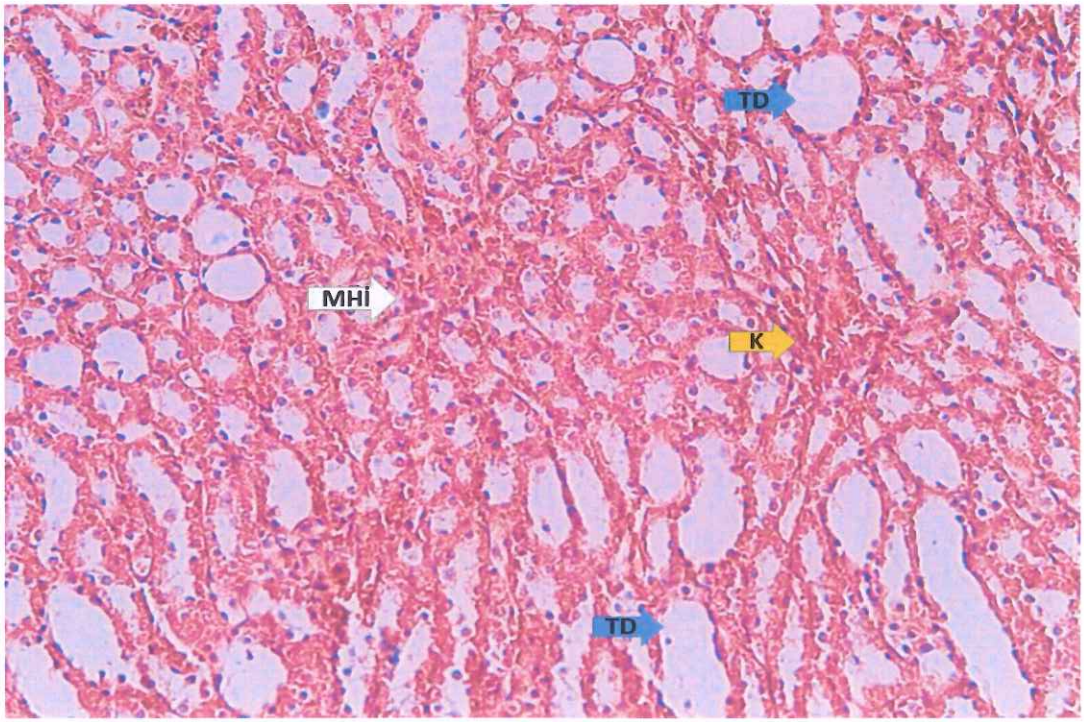
Şekil 4.51 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (200X)



Şekil 4.52 28 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). TD: Tübüler dilatasyon, K: Konjesyon.



Şekil 4.53 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek korteksinin histolojik görüntüsü (100X). G: Parietal yapraklarda açılma, kapsülde genişleme.



Şekil 4.54 28 gün 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait böbrek medullasının histolojik görüntüsü (100X). TD: Tübüler dilatasyon, MHİ: Mononükleer hücre infiltrasyonu, K: Konjesyon.

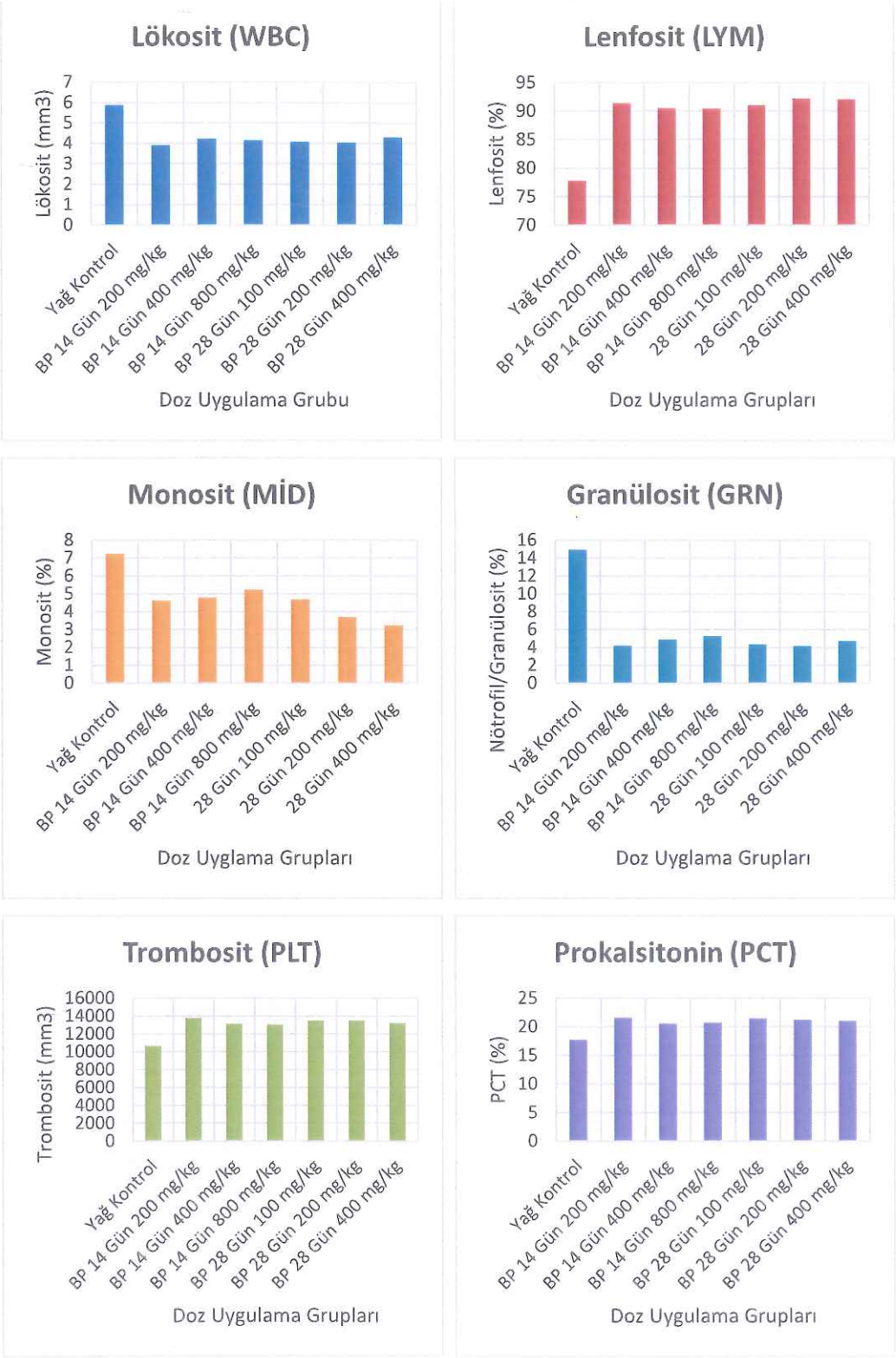
4.4. Hematolojik İncelemeler

Diseksiyon sırasında sıçanların kalbinden alınan kanda yapılan tam kan analiz sonuçları Tablo 4.12'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, lökosit seviyesinin tüm Bütilparaben uygulama gruplarında, negatif (yağ) kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Lenfosit seviyesi Bütilparaben gruplarında anlamlı bir artış gösterirken, nötroil/granülosit seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Bütilparaben gruplarındaki eritrosit seviyelerinde anlamlı bir artış, MCV değerlerinde ise anlamlı bir düşüş olmuştur. Kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm Bütilparaben gruplarında gözlenen Trombosit ve Pct değerlerindeki artış da istatistiksel açıdan anlamlıdır (Şekil 4.55 ve 4.56).

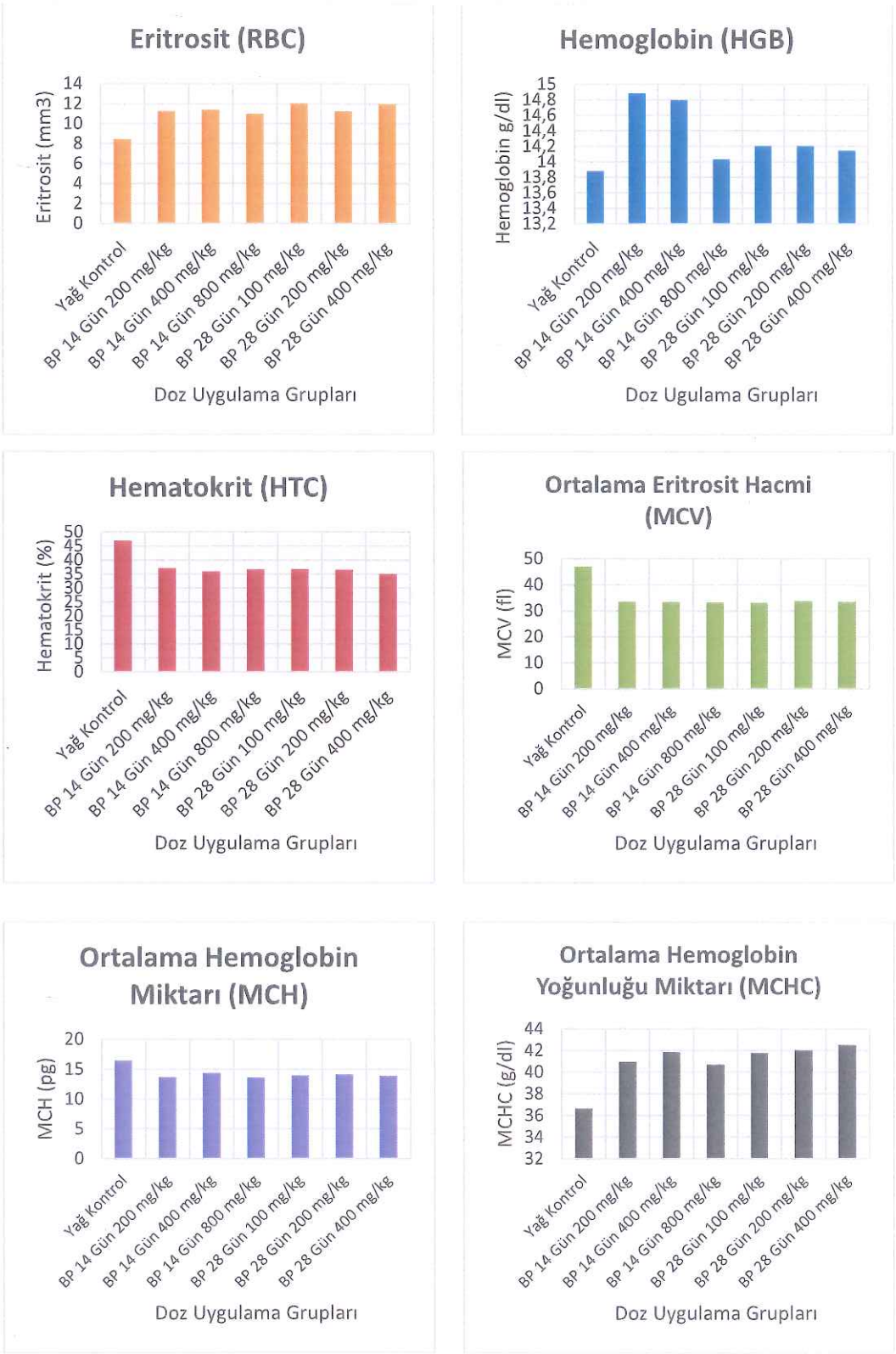
Tablo 4.12 Yağ kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait sıçanların kan analiz sonuçları (±SD)

		Bütilparaben 14 Gün			Bütilparaben 28 Gün		
	Yağ Kontrol	**200 mg/kg/gün**	**400 mg/kg/gün**	**800 mg/kg/gün**	**100 mg/kg/gün**	**200 mg/kg/gün**	**400 mg/kg/gün**
Lökosit (mm^3)	5,88±1,72	3,91±0,64 [a]	4,22±0,64 [a]	4,14±0,62 [a]	4,07±0,51 [a]	4,02±0,59 [a]	4,30±0,81 [a]
Lenfosit (%)	77,8±14,89	91,35±3,76 [a]	90,48±4,82 [a]	90,37±2,16 [a]	90,98±1,69 [a]	92,15±1,93 [a]	92,07±3,93 [a]
Monosit (%)	7,25±4,12	4,62±1,37	4,78±2,75	5,23±1,6	4,69±0,83	3,7±0,74	3,23±2,41
Nötrofil/Granülosit (%)	14,95±12,24	4,2±2,6 [a]	4,88±2,6 [a]	5,23±1,46 [a]	4,33±1,56 [a]	4,13±1,56 [a]	4,7±2,58 [a]
Eritrosit (mm^3)	8,45±1,06	11,23±0,9 [a]	11,4±0,75 [a]	10,98±0,62 [a]	12,02±0,79 [a]	11,22±1,2 [a]	11,98±0,88 [a]
Hemoglobin (g/dl)	13,88±3,56	14,88±1,14	14,79±1,65	14,03±1,06	14,20±1,23	14,2±1,12	14,14±0,78
Hematokrit (%)	39,08±11,94	37,1±3,73	36±3,22	36,58±0,98	36,73±0,83	36,55±1,15	34,98±3,74
MCV (fl)	46,97±15,17	33,42±0,93 [a]	33,38±1,09 [a]	33,27±0,85 [a]	33,05±1,0 [a]	33,63±1,11 [a]	33,4±0,69 [a]
MCH (pg)	16,45±3,64	13,63±1,07	14,37±0,63	13,57±0,85	13,95±1,03	14,12±0,79	13,93±0,95
MCHC (g/dl)	36,67±3,56	40,95±3,79	41,83±1,72	40,68±0,95	41,75±1,11	42,03±0,9	42,48±3,26
Trombosit (mm^3)	10641,5±1142,95	13767,7±1186,7[a]	13148,8±1660,99[a]	13032,8±1250,82[a]	13490,3±1113,63[a]	13488,5±916,3[a]	13191,8±1462,38[a]
Pct (%)	17,7±1,66	21,58±1,19 [a]	20,6±1,04 [a]	20,77±1,11	21,43±0,73 [a]	21,22±1,03 [a]	21,02±1,29 [a]

[a] Yağ kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.55 Doz gruplarına ait Lökosit (WBC), Lenfosit (LYM), Monosit (MİD), Granülost (GRN), Trombosit (PLT) ve Prokalsitonin (PCT) değerlerini gösteren grafikler



Şekil 4.56 Doz gruplarına ait Eritrosit (RBC), Hemoglobin (HGB), Hematokrit (HTC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Hemoglobin Miktarı (MCH) ve Ortalama Hemoglobin Yoğunluğu Miktarı (MCHC) değerlerini gösteren grafikler

4.5. Biyokimyasal İncelemeler

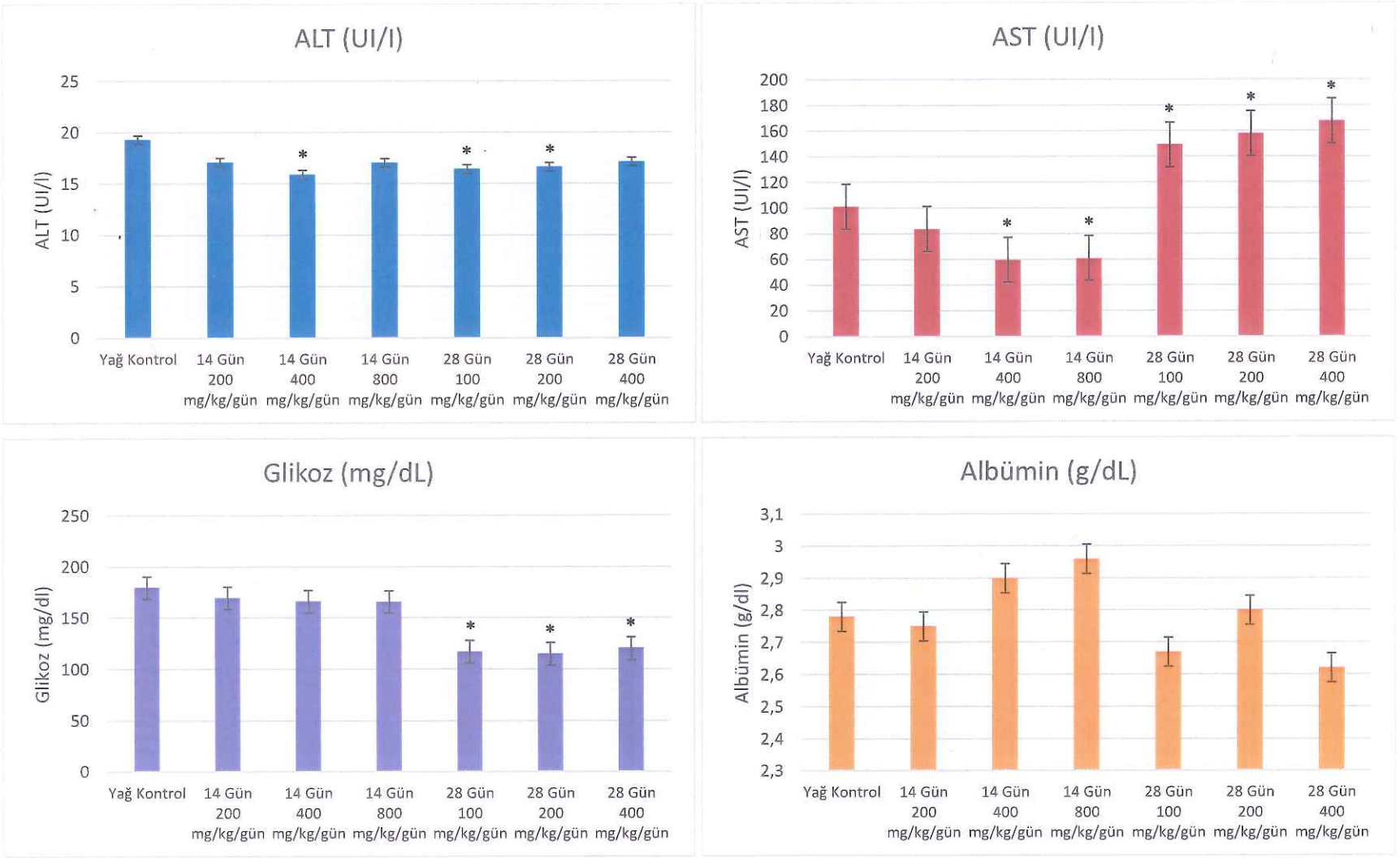
Deney sonunda sıçanların kalbinden alınan kandan elde edilen serum örneklerinde ALT, AST, trigliserit, glikoz, albümin, kreatinin ve üre analizleri yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve Tablo 4.13'de verilmiştir.

Yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda ALT değerlerinin 14 günlük ve 28 günlük bütilparaben uygulama gruplarında yağ kontrol grubuna göre düştüğü gözlense de, sadece 14 gün 400 mg/kg/gün ve 28 gün 100 mg/kg/gün ile 200 mg/kg/gün bütilparaben uygulama gruplarına ait değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer 14 günlük uygulama gruplarına ait biyokimya parametrelerinde kontrol grubu ve uygulama grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Buna karşılık; AST değerlerinde 14 günlük doz gruplarında kontrol grubuna göre düşüş gözlenirken, 28 günlük doz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca; 28 günlük doz gruplarında glikoz değerlerinde görülen düşüş ile kreatinin değerlerinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır.

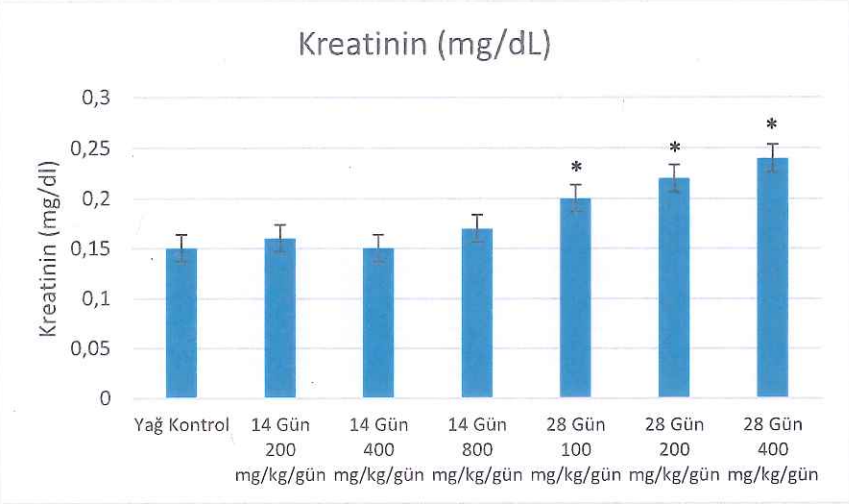
Tablo 4.13 Yağ kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait biyokimya sonuçları (±SD)

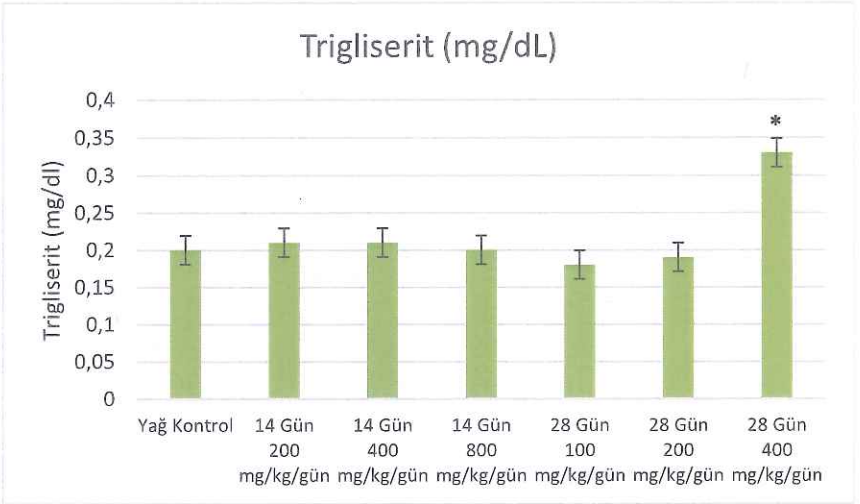
	Yağ Kontrol	14 Gün 200 mg/kg/gün	14 Gün 400 mg/kg/gün	14 Gün 800 mg/kg/gün	28 Gün 100 mg/kg/gün	28 Gün 200 mg/kg/gün	28 Gün 400 mg/kg/gün
ALT (UI/l)	19,31±2,74	17,1±0,85	15,91±0,93[a]	17,05±1,05	16,45±1,1[a]	16,66±0,63[a]	17,15±0,58
AST (UI/l)	101,13±2,77	83,52±3,76	59,43±0,58[a]	60,8±0,42[a]	149,27±0,58[a]	158,02±0,31[a]	167,85±0,42[a]
Glikoz (mg/dL)	179,82±16,04	169,57±6,39	166,28±17,49	165,85±26,23	117,33±14,93[a]	115,23±4,74[a]	120,58±7,37[a]
Albümin (g/dL)	2,78±0,14	2,75±0,23	2,9±0,17	2,96±0,11	2,67±0,18	2,8±1,12	2,62±0,16
Kreatinin (mg/dL)	0,15±0,04	0,16±0,01	0,15±0,02	0,17±0,02	0,2±0,015[a]	0,22±0,1[a]	0,24±0,21[a]
Trigliserit (mg/dL)	0,2±0,04	0,21±0,05	0,21±0,05	0,2±0,04	0,18±0,05	0,19±0,05	0,33±0,05[a]
Üre (mg/dl)	7,37±1,32	7,68±1,43	8,01±1,39	8,07±1,39	9,39±5,02	6,84±0,29	7,65±0,24

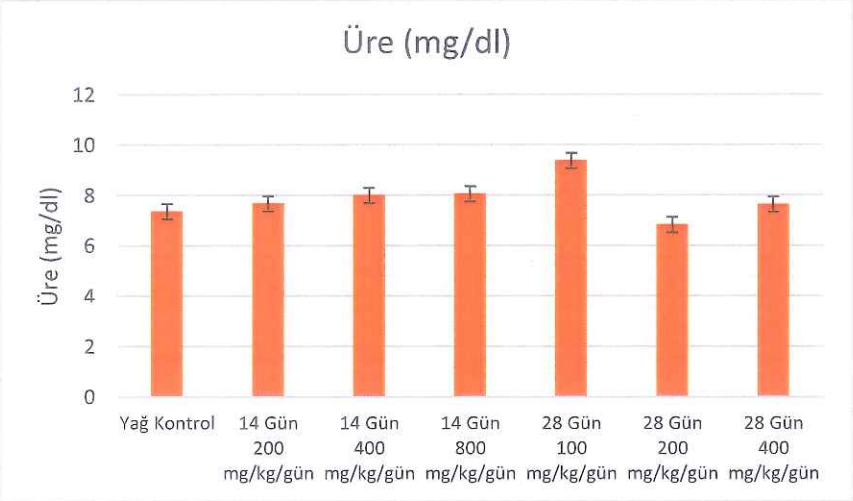
[a] Yağ kontrol grubundan farklı ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.57 Kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait ALT, AST, glikoz ve albümin değerleri (*p≤0,05)







Şekil 4.58 Kontrol ve bütilparaben uygulama gruplarına ait kreatinin, trigliserit ve üre değerleri (*p≤0,05)

5. TARTIŞMA

Gelişen kozmetik, gıda ve ilaç endüstrisi ile beraber ürünlerin raf ömrünün uzaması önemli bir unsur olarak yer almaktadır. Ürünlerde uzun süre boyunca bakteri ve mantar üremesini engellemek için üretilen sentetik koruyucular gıda ve kozmetik sektörünü rahatlatmakla beraber bir takım endişeleri de beraberinde getirmiştir. Yiyecek ve içeceklerle, ilaçlarla veya kozmetik kullanımıyla beraber vücuda alınan bu maddelerin insan ve çevre sağlığı için metabolizmalarının, vücutta birikimi ve atılımı, yan etkileri, olası zararlı etkileri ve doğada birikimi araştırılması gereken ciddi konular olup, bu amaçla sürekli olarak in vivo ve in vitro çalışmalar yürütülmektedir.

Son yıllarda, sıklıkla kullanılan koruyuculardan bazılarının endokrin bozucu etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Endokrin bozucu olarak nitelendirilen maddeler, vücutta endokrin sistemin çalışmasını değiştirerek organizmada veya sonraki nesillerde olumsuz etkilere neden olabilen sentetik maddelerdir. Endokrin bozucu bileşenlere plastiklerde, deterjanlarda, pestisit ve herbisitlerde, endüstriyel kimyasalların içinde rastlanabilir. Vücuda alındığında çeşitli dokularda birikebilir, süte karışabilir veya gelişimin kritik dönemlerinde olumsuz etkilere neden olabilirler. Bu nedenle endokrin bozucular ve insan sağlığına etkileri hakkındaki endişeler ve tartışmalar giderek artmaktadır [8].

Parabenler, oldukça ucuz ve maliyetsiz olmalarına karşın son derece başarılı antifungal ve antibakteriyel olarak etki gösteren kimyasallardır. En çok kullanılan metilparaben, etilparaben, propilparaben ve bütilparaben arasında en yüksek endokrin bozucu potansiyeline sahip olanı bütilparabendir [56]. Yaygın olarak bulunduğu ürünler nedeniyle atık sularda da varlığına rastlanılmış, çevreye salındığı belirlenmiştir [57]. Parabenlerin östrojen benzeri yapıları nedeniyle zayıf endokrin bozucu olduğu bildirildiğinden beri bu konuda artan bir endişe söz konusu olmuştur [26]. Genel olarak parabenlerin vücutta birikmediği, parçalanarak kısa sürede vücuttan atıldığı belirtilse de meme kanseri teşhisi konulan hastalardan alınan tümör örneklerinde bütilparaben varlığının tespit edilmesi, bütilparabenin karsinojenik olabileceğini ve vücutta meme dokusu gibi yavaş metabolizması olan ve enzim eksikliği bulunan hassas bölgelerde tehlikeli olabileceğini akla getirmektedir [27]. Buna karşılık Witorch ve Thomas; Darbre ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın yetersiz olduğunu, tespit edilen bütilparaben seviyelerinin çok düşük miktarlarda olduğunu, dolayısıyla kanser ile ilişki kurulamayacağını belirtmiştir [58]. Hatta sentetik östrojen hapları, doğum kontrol hapları günlük dozlarda vücuda alınmasına rağmen kullanımıyla

meme kanseri ilişkilendirilmemiştir [59]. Endokrin bozucularla ilgili bir diğer düşünce de hayvan deneylerinde alınan sonuçların insanda karşılığının olmamasıdır. Örneğin; soya içeren besinler ile beslenen hayvanların hormon taramalarında güçlü östrojenik aktivite sonucuna ulaşılmasına rağmen izoflavonların primatlarda ve insanlarda, besinlerle alınan seviyelerde östrojenik etki yaratmıyor olmaları gösterilebilir. Öyle ki soya ürünleri tüketiminin en yüksek olduğu Asya popülasyonlarının, kanser görülme sıklığının en düşük olduğu popülasyonlar arasında olduğu belirtilmektedir [60]. Bunlardan yola çıkılarak, endokrin bozucu etkisi olan bir kimyasalın doğrudan kanser ile ilişkilendirilmeden önce yapılması gereken araştırmalar arasında mutlaka genotoksik çalışmaların da bulunması gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmada bütilparabenin seçilme sebepleri; hakkında metilparaben ve etilparaben kadar net bilgi sahibi olunmaması, henüz ADI, NOAEL gibi değerlerinin uzman panelleri çerçevesinde kesin olarak belirtilmemiş olması ve kanserojen olabileceği iddia edilmesine karşın tatmin edici genotoksik çalışmaların ve kanser araştırmalarının yapılmamış olmasıdır.

Vücuda giren reaktif potansiyeli olan yabancı moleküllerin hedefi, hasarlara duyarlı bir molekül olan DNA'dır. Elbette DNA hasarı kaçınılmazdır ve DNA metabolizması sırasında kendiliğinden oluşabilir, ultraviyole ve iyonize radyasyon gibi çevresel etkenler veya bazı çevresel faktörlerin genotoksik etkisiyle meydana gelebilir. DNA polimeraz tarafından okunan hasarlı kalıp yüzünden yanlış eklenen bir nükleotid ile replikasyon sırasında bir mutasyon meydana gelebilir [61]. Genetik bilginin sağlam olması vücudun işleyişi ve gelecek nesillere aktarımı açısından son derece önemlidir. Bu yüzden çekirdekte DNA hasarlarının onarımından sorumu çeşitli onarım sistemleri bulunmaktadır. DNA üzerindeki hasar onarılamayacak boyutta büyükse veya onarım mekanizmasında bir bozukluk varsa, hasar kısa vadede replikasyon, transkripsiyon ve translasyon bozukluklarına ve hatta inhibisyonuna yol açarken, uzun vadede mutasyon ve kromozom anomalilerine neden olmaktadır. Özellikle genotoksik ajanlar yüzünden DNA'nın kırılgan bölgelerinde meydana gelebilecek hasarlar ciddi karsinojenik etkiler doğurabilirler. Bunun sonucunda da kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıklara yol açan DNA hasarları ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkların veya ksenobiyotik ve radyasyon kaynaklı hasarların tespiti için geliştirilen genotoksisite testlerinin belirteci olarak çekirdek DNA'sında meydana gelen hasarlar kullanılmaktadır. En yaygın DNA hasarı ölçüm tekniklerinden biri olan Tek hücreli jel elektroforezi ya da "Comet Assay" tekniği, hücre düzeyinde DNA hasarını ve miktarını saptamak için hızlı ve hassas bir floresan mikroskobik yöntemdir [62]. Bizim çalışmamızda,

Comet Testi için temelde OECD'nin hazırlamış olduğu 489 Numaralı Test Yöntemi olan in vivo Mammalian Alkaline Comet Assay izlenmiştir. Kullanılacak sıçanlar 6 haftalık seçilerek ergenlik öncesinde bütilparabene maruziyet sonucu oluşabilecek olan genetik hasarın gözlenmesi amaçlanmıştır. Laboratuvar koşulları, hayvanların kafeslenmesi, yem-su tüketim durumları test yöntemine uygun olarak hazırlanmıştır. Bütilparabenin vücuda alındıktan sonra hızlıca karaciğerde parçalanması ve metabolitlerinin kana karışarak böbrekler ile, idrarla vücuttan atılması nedeniyle Comet testi için karaciğer hepatositleri ve kan lenfositleri seçilmiştir. Pozitif kontrol mutajeni olarak, seçilen dokulara en çok hasarı veren Metil metansulfonat (MMS) uygun görülmüştür. MMS; DNA bazlarını etkileyerek yanlış baz eşleşmelerine sebep olan, DNA hasarı oluşturan alkilleyici bir ajandır DNA hasarının ölçülmesi için yönergede bahsedilen kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk yüzdesi parametreleri belirlenmiştir. Ölçümler sırasında daha önce bahsedilen hayalet hücreler ayrı tutulmuş, ölçümlere dahil edilmemiştir. Test yöntemine göre, 28 günlük uygulama için maksimum tolere edilen doz 1000 mg/kg, 14 gün için maksimum tolere edilen doz 2000 mg/kg'dır ve bizim çalışmamız belirlenen doz sınırları ile uyum sağlamıştır [53]. Karaciğerin rejenerasyon yeteneği de göz önüne alınarak uygulamanın iki farklı zamana bölünmesi planlanmıştır. Böylece 100, 200 ve 400 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozlarında 28 gün; 200, 400 ve 800 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozlarında 14 gün boyunca bütilparaben uygulanmasına karar verilmiştir [54, 55].

Deney süresince her gün uygulamadan önce hayvanların vücut ağırlıkları, tükettikleri yem ve su miktarları ölçülmüştür. Günlük vücut ağırlığına oranlanan bütilparaben miktarı %10'luk 80µL etanol çözeltisinde çözdürülerek üzerine 1 ml'ye tamamlanana kadar mısır yağı eklenmiş ve her gün aynı saatte hayvanlara uygulanmıştır. Bunun sebebi bütilparabenin zincir uzunluğu nedeniyle oluşan kimyasal özelliğinin alkol ve türevlerinde çözünebiliyor olmasıdır. İn vitro bir çalışmada etanol varlığında karaciğer mikrozomları ile aynı ortama bırakılan parabenlerin hidrolizin yanında transesterifikasyona da uğradığı belirtilmiştir. Ancak parabenlerin transesterifikasyonla oluşan metabolitleri de aynı ortamda hidrolize katılarak hemen hemen aynı sürede vücuttan atıldığı için zararlı bir metabolit oluşturmamaktadır [63]. Benzer şekilde alkolde çözdürülerek uygulanan parabenlerle yapılan bir çalışmada parabenlerin herhangi bir östrojenik ve uterotrofik etki göstermediği gözlenmiştir. [64]. Oishi'nin 10, 100 ve 1000 mg/kg/gün dozlarda bütilparaben uyguladığı sıçanlarda vücut ağırlığında doza bağlı bir düşüş gözlenmiş olsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [9, 19]. Gebe sıçanlarla 2004'de yapılan bir çalışmada ise 1000

mg/kg/gün bütilparaben verilen grupta vücut ağırlığının ve besin tüketiminin istatistiksel olarak azaldığı sonucuna ulaşılırken [23], 2008'de yapılan bir başka çalışmada bütilparabenin gebe sıçanların vücut ağırlığına herhangi bir etkisi bulunmadığı belirtilmiştir [22]. Yeni doğan sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise PND 21-90 zaman aralığında yüksek 400 ve 1000 mg/kg/gün bütilparaben uygulanan gruplarda vücut ağırlığının azaldığı ancak PND 90-180 aralığında tekrar arttığı gözlenmiştir [65, 66]. Bizim çalışmamızda, 14 günlük 400 mg/kg/gün ve 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama gruplarında kontrol ve 200 mg/kg/gün gruplarına göre anlamlı bir kilo artışı bulunmuş olsa da yüzde kilo artışı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark bulunmamıştır. Bitiş ağırlıkları arasındaki bu farkın bütilparaben uygulamasından ziyade, hayvanların başlangıç ağırlıklarındaki farklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. 28 günlük doz grubunda deney süresinin uzamış olmasından kaynaklanan bir artış söz konusu olduğu için kontrol ve 14 günlük gruplarla karşılaştırılırken % artış baz alınmıştır. Önceki çalışmalarda gözlenen kilo kaybı ya da buna benzer advers bir etki, bizim eney gruplarımızda gözlenmemiştir. Deney süresince kontrol grubuna ve 14 günlük doz gruplarına ait hayvanların günlük besin ve su tüketimleri de doza bağlı anlamlı bir değişim göstermemiştir. 28 günlük doz grubuna ait hayvanlardaki yem tüketiminin ise arttığı gözlenmişse de bu durum bütilparaben uygulamasıyla ilişkilendirilmemiştir. Dolayısıyla, bütilparabenin besin-su tüketimi ve ağırlık artışı üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Deney sonunda sıçanların gerçek ve rölatif organ ağırlıkları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yine 28 günlük doz grubunun bitiş kilosu 14 günlük doz gruplarından fazla olduğu için karaciğer ağırlıkları bundan etkilenmiştir. Bu sebeple istatistiksel değerlendirme yapılıp sonuca varılırken rölatif organ ağırlıkları baz alınmıştır. Buna göre 14 günlük doz gruplarında karaciğer gerçek ağırlıkları, negatif kontrol grubundan farklı değildir ancak 200 mg/kg/gün doz grubuna ait karaciğer gerçek ağırlığı 400 ve 800 mg/kg/gün grubuna göre azalmıştır. 28 günlük doz gruplarının tümünde kontrol grubuna göre karaciğer gerçek ağırlıklarında bir artış gözlense de, bu deney süresi göz önüne alındığında yanıltıcıdır. Kontrol ve tüm doz gruplarına ait karaciğer rölatif ağırlıkları karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Böbrek gerçek ağırlıklarına bakılacak olursa, 14 günlük ve 28 günlük doz gruplarına ait böbrek gerçek ağırlıkları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak 14 gün 800 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubu böbrek ağırlıkları 14 gün 200 mg/kg/gün bütilparaben grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 14 günlük uygulama gruplarına ait böbrek rölatif

ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ancak 28 günlük uygulama gruplarının böbrek rölatif ağırlıkları, kontrol ve 14 günlük doz gruplarına göre düşük bulunmuştur. Vo ve arkadaşlarının olgunlaşmamış dişi sıçanlara, PND 21-40 zaman aralığında bütilparaben uygulaması sonucunda böbrek rölatif ağırlıklarında kontrol grubuna göre bir artış gözlenmediğini ancak karaciğer rölatif ağırlıklarında doza bağımlı olmayan anlamlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir [67]. Hoberman ve arkadaşlarının ise olgunlaşmamış erkek sıçanlara PND 22'den itibaren 8 hafta boyunca uyguladığı bütilparabenin sadece 1000 mg/kg/gün'lük dozunda karaciğer rölatif ağırlığında anlamlı bir artış gözlenmiş ancak gerçek ağırlıkta herhangi bir değişim olmadığı için advers etki olarak nitelendirilmemiştir [68]. Garcia ve arkadaşlarının 6 haftalık sıçanlar üzerinde 57 gün boyunca bütilparaben uygulayarak yaptıkları bir çalışmada da karaciğer gerçek ağırlıkları ve rölatif ağırlıkları arasında anlamlı bir değişiklik kaydetmemişlerdir [69]. Çalışmamızda karaciğer rölatif ağırlıklarda herhangi bir değişim olmamasının sebebinin, ergenlik dönemine girmiş, gelişiminin kritik dönemini atlatmış olan 6 haftalık sıçanlarla çalışmış olmamız olabileceği düşünülmektedir. 28 günlük bütilparaben gruplarında karaciğer gerçek ağırlığında, kontrol grubuna göre gözlenen artışa karşılık rölatif ağırlıklarda değişim olmamasının bir diğer sebebi de ALT ve AST seviyelerindeki değişimlerle ilişkili olabilir. 28 günlük bütilparaben gruplarında gözlenen böbrek rölatif ağırlığındaki düşüşün ise, kreatinin seviyesindeki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Bütilparaben uygulanan Çin hamsteri hücrelerinde poliploid hücre üretimi ve hücrede kromatid kırıkları, boşluklar, kromozomal değişimler ve halka formları gözlenmişse de bir diğer çalışma olan fibroblast hücre hattına uygulanan en yüksek dozda bile mutajenik etki gözlenmemiştir. Bunun yanında Ames testi uygulanan *Salmonella typhimurium* suşlarında da mutajenik etkisine rastlanmamıştır [8]. Yapılan in vitro çalışmada ise bütilparabenin tek dozluk akut etkisine bakılmış ancak herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır. Meeker ve arkadaşlarının yürüttüğü klinik bir çalışmada ise donör erkeklerden alınan idrar örneklerinde bütilparaben seviyesi yüksek olanların sperm örneklerinden yapılan Comet testinde DNA hasar yüzdesi de yüksek çıktığı ancak bunu tamamen bütilparaben varlığına bağlayamadıklarını belirtmişleridir [70]. Sasaki ve arkadaşları tek seferlik yüksek dozda bütilparaben uyguladıkları farelerden aldıkları mide, kolon, karaciğer, böbrek, mesane, beyin, akciğer ve kemik iliği örnekleri üzerinde Comet testi uygulamışlar ancak DNA hasarında herhangi bir artışa rastlamamışlardır [48]. Buna karşılık Park ve arkadaşları, 28 gün boyunca bütilparaben uyguladıkları Sprague-Dawley sıçanlarından aldıkları testis ve

epididimis spermatozoa örneklerinde DNA hipermetilasyonuyla karşılaşmış ve bunu artan DNA hasarı ile ilişkilendirmişlerdir [49]. Metilasyon; DNA'nın yalnızca CG (CpG) dinükleotidlerinde bulunan sitozinlerde meydana gelir. CpG adacıkları insan genomunu oluşturan genlerin promotor bölgelerinin yaklaşık %50'sinde görülür. Promotor bölgelerin RNA polimeraz ile bağlanma bölgesi oluşturarak gen ekspresyonunun kontrolünde önemli rol oynuyor olması, bu bölgelerdeki hipermetilasyonun kanser oluşumu ile bağlantısındaki önemine dikkat çekmektedir [71]. Diğer yandan; DNA metilasyonu, gelişim mekanizmasının epigenetik düzenlenmesi ve genom stabilitesi konusunda kritik rol üstlendiği için bütilparaben kaynaklı metilasyonda oluşabilecek değişimler önem arz etmektedir [72]. Bu nedenle, benzer doz uygulamalarında hipermetilasyon bulgusunu ve kanserojen etkiyi destekleyen DNA hasarı görülebileceği düşünülerek Comet testi uygulanmıştır. Comet testi kullanılarak lenfositler ve karaciğer hücreleri üzerinde yapılan ölçümlerde; bütilparaben uygulama gruplarının hepsinde, kontrol gruplarına göre anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ancak doz grupları arasında 14 günlük yüksek doz gruplarında ölçülen lenfosit değerleri, 28 günlük düşük doz verilerinden daha yüksektir, Karaciğer parametrelerinde ise 28 günlük doz gruplarının kuyruk uzunluğu, 14 günlük doz gruplarına göre daha düşükken kuyruk momenti ve kuyruk yüzdesi daha yüksektir. Lenfositler üzerindeki kuyruk uzunluğu değerleri, 14 günlük gruplara ait lenfositlerin ölçümlerinde doza bağlı artış gözlenirken, 28 günlük lenfositlerdeki artışın doza bağlı olduğu kesin olarak söylenememektedir. 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün gruplarındaki artış anlamlıdır ancak, 100 mg/kg/gün grubunda anlamlı bir artış izlenmemiştir. 14 Günlük uygulama gruplarına ait karaciğer ölçümlerinde ise kuyruk uzunluğu 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün gruplarında artmış, 800 mg/kg/gün grubunda ise kontrol grubuna göre artsa da diğer uygulama gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. 28 günlük uygulama gruplarında ise genel olarak kontrol grubuna göre bir artış gözlenmiştir ancak en yüksek değere 100 mg/kg/gün grubunda ulaşılmıştır. Hem karaciğer hücrelerinde hem de lenfositlerde kuyruk momenti ve kuyruk yüzdesi ölçümleri; 14 günlük uygulamada 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün gruplarında artış, 800 mg/kg/gün grubunda ise kontrol grubuna göre artmasına rağmen diğer uygulama gruplarına göre azalış göstermiştir. 28 günlük gruplarda lenfositlere ait kuyruk momenti ve kuyruk yüzdesi değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Buna karşılık her iki parametrede 28 günlük gruplarda kontrole göre ciddi bir artış gözlenmiştir ancak özellikle kuyruk yüzdesi değerlerine bakılırsa en yüksek değer yine 100 mg/kg/gün grubunda ölçülmüştür. Gerek 14 gün 800 mg/kg/gün gerekse 28 gün 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün uygulama gruplarındaki bu düşüşlerin, ölçümler sırasında sıklıkla karşılaşılan

ancak ölçümü yapılamayan hayalet hücreler (ghost cell) olduğu düşünülmektedir. Bu aşamada bütilparabene yüksek maruziyet; meydana gelen geri dönüşümsüz DNA hasarlarından kaçınmak için bu hücrelerde apoptozu stimüle etmiş olabileceğini akla getirmiştir [21]. Özellikle karaciğerin parabenlerin parçalanmasında birincil rolü üstlendiği düşünülürse, buradaki hasarın yüksek dozlarda daha da artması beklenebilir. Ancak elektroforez sonucu jelde ilerleyen ve boyanabilen hücreler canlı hücrelerdir. Bağırsak hücrelerine tek başına etki eden bütilparabenin, hücresel fosforilasyonu askıya alarak oksidatif strese yol açtığı, Bcl-2 ekspresyonunu artırarak ve *Bax* expresyonunu azaltarak Kaspaz-3'ü çalıştırdığı, beraberinde de oksidatif DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir [73]. Benzer bir mekanizmanın da burada gözlendiği ve hücrelerin apoptoz öncesi aşamada yakalanarak DNA hasarı nedeniyle ölçülemeyecek seviyeye geldiği düşünülmektedir. Öyle ki; sıçan hepatositleri ve mitokondrisi üzerinde propilparaben ile yapılan bir çalışma sonucunda, propilaparaben uygulanan hücrelerin ATP rezervlerinin tükenerek mitokondrial depolarizasyon yaşadıkları ve bu nedenle membran geçirgenliğinin inhibe olması ile hücre içine kontrolsüz çözelti girişine bağlı olarak hücrelerin şiştiği gözlenmiştir [74]. İnsan karaciğerinde yapılan benzer bir çalışmada ise yine propilparaben uygulaması yapılan hücrelerde enerji metabolizmasına bozulmayla beraber süperoksit dismutaz konsantrasyonunda ve dolayısıyla metabolizmasında meydana gelen düşüş sonucu reaktif oksijen türlerinde (ROS) artış meydana geldiği gözlenmiştir. Bunun devamında da apoptoz ve nekroz gözlenmiştir [75]. Farelerle yapılan in vivo bir çalışmada ise bütilparaben uygulaması sonucunda lipit peroksidasyonunda artışa bağlı olarak reaktif oksijen türlerinde ve serbest radikal reaksiyonlarında artış olduğu kaydedilmiş ve oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir [76]. Böbrekten izole edilen Vero hücre hattında yapılan ve propilparaben uygulaması içeren bir diğer çalışmada ise DNA çift zincir kırıklarının öncülleri tespit edilmiş ve bu durumun mutasyon ve kromozomal hasara uzanabileceği bildirilmiştir [97]. Son derece hasarlı ama canlı hücreler olan hayalet hücrelerin; önceki çalışmalardaki örneklere benzer şekilde karşımıza çıktığı, muhtemelen hepatosit ve lenfositlerde meydana gelen DNA çift zincir kırıkları ve oksidatif hasar sebebiyle apoptoza başlayan hücreler olduğu ve yüksek dozlarda ölçülen verilerin bu nedenle düşmüş olabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, bütiparabenin sıçan karaciğerindeki mikrozomlarda, insan karaciğerindeki mikrozomlara göre çok daha hızlı parçalandığı bildirilmiştir [77, 78]. Bu sayede etkisinin çok yüksek seviyelerde çıkmamış olabileceği de düşünülmektedir. Sadece parabenlerin değil metabolitlerinin de östrojenik etkileri olduğunu gösteren çalışmalar, karaciğerde parçalanan paraben metabolitlerinin, gözlenen Comet sonuçlarına neden olmuş olabileceğini akla

getirmiştir [79, 80]. Tartışmayı metilmetansülfonat değerleri üzerinden ele alacak olursak, yüksek dozlarda uygulamalar yapılmasına rağmen gözlenen Comet parametreleri son derece düşüktür. Özellikle 2005 yılında günlük ortalama paraben alımının 76 mg/gün olduğu [81] ve günümüzde parabensiz ürünlerin artması nedeniyle bu dozun azalmakta olduğu varsayılırsa bütilparabenin memelilerde DNA hasarına yol açma potansiyelinin oldukça düşük olduğu söylenebilir. Buna karşılık kozmetik ürünlerde kullanılan bütilparabenin yıkama yoluyla suya karışmasının doğal yaşamı, esteraz aktivitelerinin özelleşmemiş olması nedeniyle özellikle balıkları ciddi ölçülerde etkileyebileceği düşünülmektedir [57, 82].

Garcia ve arkadaşları tarafından subkutan yolla 57 gün boyunca uygulanan bütilaparabenin karaciğer dokularında herhangi bir patolojik etkiye neden olmadığı belirtilmiştir [69]. Plazmada 30 güne kadar kaldığı bildirilen bütilparabenin mikrozomlarda beklemeden parçalanıyor olması sebebiyle [15, 83] önceki çalışmaya benzer bir etki görüleceği düşünülmüş olsa da histopatolojik incelemeler sonucunda, 14 günlük yüksek doz bütilparaben gruplarının üçünde de karaciğer dokularında sinüzoidal dejenerasyon ve konjesyon gözlenmiştir. Az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem oluşumu ve heterokromatikleşmiş hücrelerde de artış gözlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunacak sıklıkta karşılaşılmamıştır. 28 günlük düşük doz uygulama gruplarında 100 mg/kg/gün ile 200 mg/kg/gün bütilparaben gruplarına ait karaciğer dokularında anlamlı düzeyde herhangi bir patoloji gözlenmezken 400 mg/kg/gün bütilparaben grubuna ait karaciğer dokusunda konjesyon, sinüzidal dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonunda gözlenen artış anlamlı bulunmuştur. Dokularda gözlenen heterokromatikleşmiş hücreler oldukça az sayıdadır ve sıklığı anlamlı bulunmamıştır. Comet testinde ölçülemeyen hücrelerin heterokromatikleşmiş hücrelerden kaynaklanmamış olabileceği, sinüzoidal dejenerasyona bağlı geliştiği düşünülmektedir. Böbrek dokuları incelendiğinde; 14 gün bütilparaben uygulama gruplarından 200 mg/kg/gün bütilparaben grubunda glomerulus kapsülünde gözlenen genişleme anlamlıyken konjesyon bulguları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 14 gün 400 mg/kg/gün ve 800 mg/kg/gün gruplarında gözlenen histolojik farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 28 günlük uygulama gruplarında ise sadece 400 mg/kg/gün bütilparaben grubunda gözlenen değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır, 100 mg/kg/gün ve 200 mg/kg/gün gruplarında artan histopatolojik değişimler anlamlı bulunmamıştır. Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 28 gün boyunca isopropil ve isobütilparaben karışımının dermal olarak uygulandığı 5 haftalık Sprague-Dawley sıçanlarda karaciğer ve böbrekte benzer histopatolojik çalışmalar yürütülmüş ancak

dokularda doğal yollarla oluşabilen birkaç lezyon dışında bir değişime rastlanmadığı belirtilmiştir [84]. Bunun sebebinin dermal maruziyetin oral maruziyet kadar bu dokulara etki etmemesinin olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımıza göre; bütilparabenin dönüştürme ve atılımdan sorumlu iki organ olan karaciğer ve böbrek üzerinde, kısa süreli yüksek doz ve uzun süreli düşük doz maruziyetinde bir takım hasarlara yol açabileceği sonucuna varılabilir. 28 günlük doz gruplarına ait lenfosit örneklerinde gözlenen hasarın, 14 günlük doz gruplarındaki lenfosit ölçümlerinde elde edilen verilerden daha düşük olmasının sebebi; lenfositlerin 15 günlük yenilenme sürecine bağlı olarak bütilparabenin kalıcı hasara neden olamamasını akla getirmiştir. Diğer bir yandan; karaciğer hücrelerinde bakıldığında 28 günlük bütilparaben uygulamasının kuyruk momenti ve DNA yüzdesinde 14 günlük bütilparaben grubuna göre bir artışa neden olduğu andan kuyruk uzunluğunda herhangi bir artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, ALT ve AST verilerindeki değişimler ile karaciğer hücrelerinde gözlenen DNA kırıklarının ilişkili olabileceği ve muhtemel bir rejenerasyon ile kalıcı hasarın önüne geçilmeye çalışıldığı akla gelmektedir. Yine de genotoksite çalışmalarının kanser oluşumunun erken safhalarındaki DNA bozulmalarını belirlemede kullanıldığı ve bizim Comet bulgularımızın da anlamlı bulunduğu göz önüne alınacak olursa; daha geniş yürütülen kronik çalışmalarda dokularda meydana gelen hasarların ve zararlı etkilerin daha da ciddi boyutlarda olacağı tahmin edilmektedir.

Hematolojik analiz sonuçlarına göre, lökosit seviyesi tüm bütilparaben uygulama gruplarında kontrol grubuna göre düşük çıkmıştır. Düşük lökosit seviyesine karaciğer rahatsızlıkları, viral enfeksiyonlar veya vitamin eksikliği gibi durumlar neden olabilmektedir. Uygulama gruplarındaki lökosit seviyesindeki düşüş, bütilparaben uygulamasından kaynaklı karaciğer hücrelerindeki histolojik dejenerasyona ve DNA hasarına bağlanabilse de bu konuda henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır. Lenfosit seviyesi bütilparaben uygulama gruplarında genel olarak artış göstermiştir. Lenfosit artışının ise vücuda giren bütilparabene bağlı olarak arttığı düşünülmüştür. Nötrofil seviyesin tüm uygulama gruplarında gözlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Nötrofil düşüklüğü ise genellikle kemik iliğinde meydana gelen hasarlar veya kemik iliği kanseri durumunda ortaya çıkan bir sonuçtur ancak bu çalışmada kemik iliği ile ilgili herhangi bir test yapılmadığı için bu düşüşün nedeni tam olarak bilinmemektedir. Benzer endokrin bozucularla yapılan çalışmalarda eritrosit değerlerinde gözlenen azalma [85] bu çalışmada da beklenirken, tersi bir etkiyle artış göstermiştir. MCV değeri ise uygulama gruplarında kontrol grubuna göre düşmesine rağmen bu değişim doza bağlı olarak gözlenmemiştir. MCV

değerinin düşüklüğü genellikle B6 vitamini eksikliği veya demir eksikliğine bağlı anemiyle ya da kan kaybı ile ilişkilidir ve eritrosit çapının büyüklüğünü ifade eder. Bununla beraber eritrositlerde görülen artışa bağlı olarak MCV azalışı gözlenmiş olabilir. Trombosit ve Pct değerleri ise uygulama gruplarında artış göstermiştir ancak yine doza bağlı bir artış gözlenmemiştir ki bunun patolojik açıdan herhangi bir anlamı bulunmamaktadır. Diğer analiz parametrelerinde herhangi bir değişiklik kaydedilmemiştir. Yine benzer bir çalışma olan isopropil ve isobütilparaben karışımının SD sıçanlara dermal uygulanması sonucunda incelenen kan örneklerinde kan ve serum biyokimyasıyla ilgili parametrelerin hiç birinde önemli bir fark bulunmamıştır ancak bu muhtemelen parabenlerin maruziyet yollarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır [84]. Diğer yandan; tüm doz gruplarında birbirine yakın değerlerin elde edilmesi ve sadece kontrol grubu ile aralarında farklılık olması, diğer çalışmalardaki kontrol grubu kan değerleri incelendiğinde düşündürücüdür [85, 86]. Kontrol grubunun deneyinin sonlandırıldığı sırada eritrositlerin yıkılmasının arttığı, haptoglobulin seviyesinin yükseldiği zamana denk gelmiş olma gibi farklı ihtimalerden dolayı yanıltıcı bir fark gözlenmiş olabileceği düşünlmüştür [87].

2017 yılında, subkutan olarak uygulanan bütilparabenin biyokimyasal herhangi bir değişime sebep olmadığı bildirilmiştir [69]. Buna karşın, bizim çalışmamıza ait biyokimyasal incelemeler sonucunda ALT değerlerinin bütilparaben uygulama gruplarında, yağ kontrol grubuna göre düştüğü gözlenmişse de sadece 14 gün 400 mg/kg/gün ve 28 gün 200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün bütilparaben uygulama grubuna ait değerler anlamlı bulunmuştur. Ancak doza bağlı bir etki söz konusu değildir. AST değerleri ise 14 günlük uygulama gruplarında düşerken, 28 günlük uygulama gruplarında yükselmiştir. ALT ve AST değerleri, karaciğerde meydana gelen hasarlar sonucunda kana salınmaları nedeniyle yükselirler [88]. Karaciğer yenilenmesi üzerine yapılan bir çalışmadan yola çıkarak; 14 günlük uygulama gruplarında AST değerlerinde gözlenen düşüşün hasar gören karaciğer hücrelerinin rejenerasyonu ile beraber gerçekleştiği, 28 günlük doz gruplarında ise meydana gelen hasarlarla beraber yükseldiği düşünülmektedir [89]. 28 günlük uygulama gruplarındaki karaciğer Comet verilerindeki sonuçlar ile AST değerlerindeki yükseliş birbirini desteklemektedir. Gönüllülerden 1 yıl boyunca alınan serum örnekleri üzerinde yapılan testler sonucunda düşük AST ve ALT değerleri olan hastaların alkolik karaciğer hastalığı olduğu bulgusunun paylaşılmasına karşın [90], alkolik karaciğer hastalarının karaciğer dokularında gözlenen yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu, apoptoza uğramış hücreler, yağlı hepatositler veya hepatoselüer karsinom gibi histopatolojik parametrelerin

[91] 14 günlük doz gruplarındaki histolojik bulgularla uyuşmaması nedeniyle AST değerlerinde gözlenen düşüşün bu çeşit bir karaciğer rahatsızlığından olmadığı kanısını uyandırmıştır. 14 günlük uygulama gruplarında ölçülen diğer parametrelerde ise kontrol grubu ve uygulama grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. 28 günlük uygulama gruplarında glikoz verilerinde gözlenen düşüşün ise, benzer çalışmalarda endokrin bozucuların pankreas beta hücreleri üzerinde gözlenen insülin salgısını artırıcı etkisi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir [92]. Yine 28 günlük gruplarda kreatinin değerlerindeki artış dikkat çekmektedir. Kreatinin yüksekliği böbrek hasarının kritik belirteçlerinden biridir ve özellikle glomerular fonksiyonda meydana gelen bozulmalarda yükselir [93]. 28 günlük gruplarda doza bağlı gözlenen artış, kontrol grubuna göre anlamlıdır. Bu durumda vücuttan atılan bütilparabenin böbreklere hasar vermiş olabileceği düşünülmüştür. Böbrek dokularında gözlenen histopatolojik bulgular böbrek hasarını desteklemektedir ancak bu çalışmada böbrek üzerinde Comet testi gerçekleştirilmediği için net bir karara varılamamaktadır.

Çalışmamızın bulgularına göre bütilparaben doz gruplarında yağ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı çıkan DNA hasarı gözlenmektedir. Bu hasarın; daha önceki çalışmalarda sıklıkla artışının kanser ile ilişkisine değinilen, ER ekspresyonundaki artışa bağlı olarak geliştiği ve kansere yol açma potansiyeli olduğundan bahsedilmektedir. MCF-7 meme kanser hücre hattı ve MCF-10A sağlıklı meme hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda bütilparabenin MCF-7 hücreleri üzerinde progesteron reseptörünün mRNA ekspresyonunu, ER-α ve ER-β'ni her ikisinin de gen ve protein ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir. Daha dikkat çekici olanı ise, MCF-10A hücrelerinde de ER-α ve ER-β gen ve protein ekspresyonunu artırdığının gözlenmesinin meme kanseri progresyonunda potansiyel etken olabileceğinin ileri sürülmesidir [94]. Gönüllülerden alınan kan örneklerinden izole edilerek kültür ortamında çoğaltılan lenfositlere uygulanan parabenlerin de hem genotoksik karsinojenlerin tespitinde sıklıkla kullanılan kromozomal aberasyon testinde hem de Comet testinde pozitif sonuçlar verdiği bildirilmiştir [95]. Yine de in vivo deney sürecinde bunu kanıtlayan kesin bulgulara halen ulaşılamamıştır. Bizim çalışmamızda da genotoksik bir pozitif kontrol ajanı olan, kanserojen MMS'in lenfosit ve karaciğer hücreleri üzerindeki etkileri ile karşılaştırıldığında bütiparaben kaynaklı DNA hasarı düşük seviyelerde kalsa da negatif kontrol grubunda elde edilen verilere göre oldukça yüksektir. 24 hafta boyunca, vücuda alınan günlük dozlar göz önüne alınarak 13 kimyasaldan oluşan bir karışım uygulanmış ve ROS varlığına bağlı olarak vücudun savunma

mekanizması olan katalaz seviyesinin veya süperoksit dismutaz gibi başka antioksidan enzimlerin artışı ile sonuçlanmıştır [96, 97]. Memelilerin metabolik savunması, bir noktaya kadar bu etkileri bertaraf edebilecek enzim ve mekanizmalara sahiptir. Yine de sıçan metabolizmasının insana göre daha hızlı bir şekilde parabenleri parçalıyor olasına rağmen [13] DNA hasarları ile karşılaştığımız için insanda yüksek dozlarda bütilparaben maruziyetinin ciddi zararlarının olabileceğini öngörebiliriz. Özellikle, vücuda alınan birbirinden farklı birçok endokrin bozucunun olduğu düşünülmeli ve uzun süreli maruziyette parabenlerle ortaya çıkabilecek kokteyl etkisinin de göz önüne alınması gerekmektedir.

Literatürde parabenlere olan ilginin artmasıyla beraber çoğalan çalışmalar arasında pubertal dönemdeki sıçanlarda bütilparabenin genotoksik, histopatolojik, biyokimyasal ve hematolojik etkilerinin beraber çalışıldığı, süre bazlı, düşük ve yüksek doz karşılaştırmalı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada bütilparabenin hem yüksek dozda kısa süreli hem de düşük dozda uzun süreli maruziyetinin DNA hasarına neden olma potansiyelinin olduğuna ışık tutulmuştur. Ancak bütilparaben ve diğer parabenlerin günlük tüketim sınırları içerisinde, besin veya sıvı tüketimi yoluyla kronik olarak uygulanması ve geniş kapsamda genotoksik analizlerinin yapılması durumunda kalıcı DNA hasarına neden olup olmayacağı anlaşılabilir ve karsinojenik potansiyeli konusunda yorum yapılabilir.

KAYNAKÇA

[1] C. L. Walker, Minireview: Epigenomic Plasticity and Vulnerability to EDC Exposures, *Molecular Endocrinology*, vol. 30, no. 8, sf. 848–855, Aug. **2016**.

[2] Y. Motarjemi, G. Moy, and E. C. D. Todd, Environmental Contaminants , *Encyclopedia of Food Safety*, Vol.2, **2014**.

[3] C. Chighizola and P. L. Meroni, The role of environmental estrogens and autoimmunity, *Autoimmunity Reviews*, vol. 11, no. 6–7, sf. A493–A501, **2012**.

[4] A. Mantovani and A. Fucic, Puberty dysregulation and increased risk of disease in adult life: Possible modes of action, *Reproductive Toxicology.*, vol. 44, sf. 15–22, **2014**.

[5] K. Nowak, W. Ratajczak–Wrona, M. Górska, and E. Jabłońska, Parabens and their effects on the endocrine system, *Molecular and Cellular Endocrinoogy.*, **2018**.

[6] Anonim, File:Paraben-2D-skeletal.png - Wikimedia Commons., https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paraben-2D-skeletal.png., **(16 Mayıs 2018).**

[7] Anonim, Paraben: The Ugly Side of Beauty, https://nasstheuglysideofbeauty.wordpress.com/paraben/ , **(16 Mayıs 2018).**

[8] Masten S.A., Scott A. Butylparaben [CAS No. 94-26-8]: Rewiew of toxicological literature. National Toxicology Program, National Institutes of Health (NIEHS), **2005**.

[9] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, and U. Hass, Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites, *Reproductive Toxicology*, vol. 30, no. 2. sf. 301–312, **2010**.

[10] European Commission, The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients, *SCCS*, vol. 1564, sf. 151, **2016**.

[11] N. R. Janjua, H. Frederiksen, N. E. Skakkebæk, H. C. Wulf, and A.-M. Andersson, Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans, *International Journal of Andrology*, vol. 31, no. 2, sf. 118–130, **2008**.

[12] X. Ye, A. M. Bishop, J. A. Reidy, L. L. Needham, and A. M. Calafat, Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans, *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 12, sf. 1843–1846, **2006**.

[13] H. M. Harville, R. Voorman, and J. J. Prusakiewicz, Comparison of paraben stability in human and rat skin., *Drug Metabolism Letters*, vol. 1, no. 1, sf. 17–21, **2007**.

[14] C. Jewell, J. J. Prusakiewicz, C. Ackermann, N. A. Payne, G. Fate, R. Voorman, and F. M. Williams, Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture, *Toxicology and Applied Pharmacology.*, vol. 225, no. 2, sf. 221–228, **2007**.

[15] S. Abbas, H. Greige-Gerges, N. Karam, M.-H. Piet, P. Netter, and J. Magdalou, Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol. 25, no. 6, sf. 568–577, **2010**.

[16] I. Klopčič, K. Kolšek, and M. S. Dolenc, Glucocorticoid-like activity of propylparaben, butylparaben, diethylhexyl phthalate and tetramethrin mixtures studied in the MDA-kb2 cell line, *Toxicology Letters*, vol. 232, no. 2, sf. 376–383, **2015**.

[17] S. Oishi, Effects of propyl paraben on the male reproductive system, *Food Chemicals and Toxicology*, vol. 40, no. 12, sf. 1807–1813, Dec. **2002**.

[18] S. Oishi, Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 42, no. 11, sf. 1845–1849, **2004**.

[19] S. Oishi, Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats, *Toxicology and Industrial Health*, vol. 17, no. 1, sf. 31–39, **2001**.

[20] M. S. Alam and M. Kurohmaru, Disruption of Sertoli cell vimentin filaments in prepubertal rats: An acute effect of butylparaben in vivo and in vitro, *Acta Histochemica*, vol. 116, no. 5, sf. 682–687, **2014**.

[21] R. S. Tavares, F. C. Martins, P. J. Oliveira, J. Ramalho-Santos, and F. P. Peixoto, Parabens in male infertility-Is there a mitochondrial connection?, *Reproductive Toxicology*, vol. 27, no. 1. sf. 1–7, **2009**.

[22] C. Taxvig, A. M. Vinggaard, U. Hass, M. Axelstad, J. Boberg, P. R. Hansen, H. Frederiksen, and C. Nellemann, Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis?, *Toxicological Sciences*, vol. 106, no. 1, sf. 206–213, **2008**.

[23] G. P. Daston, Developmental toxicity evaluation of butylparaben in Sprague-Dawley rats, *Birth Defects Research. Part B - Developmentand Reproducdtive Toxicology*, vol. 71, no. 4, sf. 296–302, **2004**.

[24] L. Kolatorova, J. Vitku, R. Hampl, K. Adamcova, T. Skodova, M. Simkova, A. Parizek, L. Starka, and M. Duskova, Exposure to bisphenols and parabens during pregnancy and relations to steroid changes, *Environmental Research*, vol. 163, sf. 115–122, **2018**.

[25] C. Lemini, R. Jaimez, M. E. Ávila, Y. Franco, F. Larrea, and A. E. Lemus, In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens, *Toxicology and Industrial Health*, vol. 19, no. 6, sf. 69–79, **2003**.

[26] T. Nishihara, J.-I. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi, Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay., *Journal of Health Sciences.*, vol. 46, no. 4, sf. 282–298, **2000**.

[27] P. D. Darbre, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, and G. S. Pope, Concentrations of Parabens in human breast tumours, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 24, no. 1, sf. 5–13, **2004**.

[28] Y. Watanabe, H. Kojima, S. Takeuchi, N. Uramaru, S. Ohta, and S. Kitamura, Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptor α and β and androgen receptor, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 57, sf. 227–234, **2013**.

[29] T. Okubo, Y. Yokoyama, K. Kano, and I. Kano, ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERα and PR, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 39, no. 12, sf. 1225–1232, **2001**.

[30] J. J. Prusakiewicz, H. M. Harville, Y. Zhang, C. Ackermann, and R. L. Voorman, Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects, *Toxicology*, vol. 232, no. 3, sf. 248–256, **2007**.

[31] P. D. Darbre and P. W. Harvey, Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 28, no. 5. sf. 561–578, **2008**.

[32] P. D. Darbre, Underarm cosmetics and breast cancer, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 23, no. 2. sf. 89–95, **2003**.

[33] J. A. van Meeuwen, O. van Son, A. H. Piersma, P. C. de Jong, and M. van den Berg, Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 230, no. 3, sf. 372–382, **2008**.

[34] U. Bernauer, Q. Chaudhry, G. Degen, E. Nielsen, T. Platzek, S. Chandra Rastogi, C. Rousselle, J. van Benthem, P. Coenraads, M. Dusinska, D. Gawkrodger, W. Lilienblum, A. Luch, M. Metzler, and N. Monteiro-Rivière, Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) Opinion on Parabens - Updated request for a scientific opinion on propyl- and butylparaben, **2013**.

[35] H. J. Lin and Y. M. Choong, A Simple Method for the Simultaneous Determination of Various Preservatives in Liquid Foods, *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 7, no. 4, sf. 291–304, **1999**.

[36] H. J. Lin M. L. Wang, C. W. Chen and B. S. Hwang, M. H. Lee, Y. M. Choong, A gas chromatographic method for determination of nicotinamide, paraben esters and caffeine in commercial health drinks, tonic drinks and cold formulas *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 8, no. 3, sf. 180–186, **2000**.

[37] CIR, 3 Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, and Butylparaben, *International Journal of Toxicology*, vol. 3, no. 5, sf. 147–209, **1984**.

[38] S. C. Rastogi, A. Schouten, N. de Kruijf, and J. W. Weijland, Contents of methyl- , ethyl- , propyl- , butyl- and benzylparaben in cosmetic products, *Contact Dermatitis*, vol. 32, no. 1, sf. 28–30, **1995**.

[39] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Child-Specific Exposure Factors Handbook. **2008**.

[40] R. A. Rudel, D. E. Camann, J. D. Spengler, L. R. Korn, and J. G. Brody, Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust, *Environmental Sciences and Technoogy.*, vol. 37, no. 20, sf. 4543–4553, **2003**.

[41] N. Aubert, T. Ameller, and J. J. Legrand, Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [^{14}C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 3–4, sf. 445–454, **2012**.

[42] Y. Nakagawa and P. Moldéus, Mechanism of p-Hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, vol. 55, no. 11, sf. 1907–1914, **1998**.

[43] S. D. Kodani, H. B. Overby, C. Morisseau, J. Chen, L. Zhao, and B. D. Hammock, Parabens inhibit fatty acid amide hydrolase: A potential role in paraben-enhanced 3T3-L1 adipocyte differentiation, *Toxicology Lettert*, vol. 262, sf. 92–99, **2016**.

[44] E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 153, no. 1, sf. 12–19, **1998**.

[45] Kang K. S. , Che J. H. , Ryu D. Y. , Kim T. W. , Li G. X. , Lee Y. S., Decreased sperm number and motile activity on the f1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben), *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 64, no. 3. sf. 227–235, **2002**.

[46] S. Terasaka, A. Inoue, M. Tanji, and R. Kiyama, Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity, *Toxicology Letters*, vol. 163, no. 2, sf. 130–141, **2006**.

[47] I. F. Nes and T. Eklund, The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in Escherichia coli and Bacillus subtilis., *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 54, no. 2, sf. 237–242, **1983**.

[48] Y. F. Sasaki, S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kabasawa, K. Iwama, K. Taniguchi, and S. Tsuda, The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 519, no. 1–2, sf. 103–119, **2002**.

[49] C. J. Park, W. H. Nah, J. E. Lee, Y. S. Oh, and M. C. Gye, Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa, *Andrologia*, vol. 44, no. SUPPL.1, sf. 187–193, **2012**.

[50] P. L. Olive and J. P. Banáth, The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells, *Nature Protocols*, vol. 1, no. 1, sf. 23–29, **2006**.

[51] S. Nandhakumar, S. Parasuraman, M. Shanmugam, Kr. Rao, P. Chand, and Bv. Bhat, Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay), *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, vol. 2, no. 2, sf. 107, **2011**.

[52] A. R. Collins, The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations, *Molecular Biotechnology*, vol. 26, no. 3, sf. 249–261, **2004**.

[53] O. Guideline, F. O. R. The, and T. Of, OECD / OCDE OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS TG 489 OECD / OCDE, **2014**.

[54] A. Rothfuss, M. O'Donovan, M. De Boeck, D. Brault, A. Czich, L. Custer, S. Hamada, U. Plappert-Helbig, M. Hayashi, J. Howe, A. R. Kraynak, B. jan van der Leede, M. Nakajima, C. Priestley, V. Thybaud, K. Saigo, S. Sawant, J. Shi, R. Storer, M. Struwe, E. Vock, and S. Galloway, Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 702, no. 1, sf. 40–69, **2010**.

[55] Y. Ogiwara, M. Sugiura, K. Watanabe, J. Tawara, E. Endo, H. Maruyama, S. Tsuji, K. Matsue, H. Yamada, Y. Wako, and K. Kawasako, Evaluation of the repeated-dose liver, bone marrow and peripheral blood micronucleus and comet assays using kojic acid, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 780–781, sf. 111–116, **2015**.

[56] N. Valkova, F. Lépine, L. Valeanu, M. Dupont, L. Labrie, J. G. Bisaillon, R. Beaudet, F. Shareck, and R. Villemur, Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant Enterobacter cloacae Strain EM, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 6, sf. 2404–2409, **2001**.

[57] H. Yamamoto, I. Tamura, Y. Hirata, J. Kato, K. Kagota, S. Katsuki, A. Yamamoto, Y. Kagami, and N. Tatarazako, Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach, *Science of Total Environment*, vol. 410–411, sf. 102–111, **2011**.

[58] R. J. Witorsch and J. A. Thomas, Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature, *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 40, no. SUPPL. 3. sf. 1–30, **2010**.

[59] G. J. Nohynek, C. J. Borgert, D. Dietrich, and K. K. Rozman, Endocrine disruption: Fact or urban legend?, *Toxicology Letters*, vol. 223, no. 3, sf. 295–305, **2013**.

[60] P. H. M. Peeters, L. Keinan-Boker, Y. T. van der Schouw, and D. E. Grobbee, Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence., *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 77, no. 2, sf. 171–183, **2003**.

[61] H. F. Lodish, (Çeviri: H. Geçkil, M. Özmen, and O. Yeşilada), *Moleküler hücre biyolojisi*. Bölüm 4, Palme Yayıncılık, 6.Basım, **2011**.

[62] E. Rojas, M. C. Lopez, and M. Valverde, Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 722, no. 1–2. sf. 225–254, **1999**.

[63] C. Fujino, Y. Watanabe, N. Uramaru, and S. Kitamura, Transesterification of a series of 12 parabens by liver and small-intestinal microsomes of rats and humans, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 64, sf. 361–368, **2014**.

[64] A. Hossaini, J. J. Larsen, and J. C. Larsen, Lack of oestrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 38, no. 4, sf. 319–323, **2000**.

[65] L. Zhang, S. Ding, P. Qiao, L. Dong, M. Yu, C. Wang, M. Zhang, L. Zhang, Y. Li, N. Tang, and B. Chang, n-butylparaben induces male reproductive disorders via regulation of estradiol and estrogen receptors, *Journal of Applied Toxicology*, vol. 36, no. 9, sf. 1223–1234, **2016**.

[66] L. Zhang, L. Dong, S. Ding, P. Qiao, C. Wang, M. Zhang, L. Zhang, Q. Du, Y. Li, N. Tang, and B. Chang, Effects of n-butylparaben on steroidogenesis and spermatogenesis through changed E2levels in male rat offspring, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 37, no. 2, sf. 705–717, **2014**.

[67] T. T. B. Vo, Y. M. Yoo, K. C. Choi, and E. B. Jeung, Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model, *Reproductive Toxicology*, vol. 29, no. 3, sf. 306–316, **2010**.

[68] A. M. Hoberman, D. K. Schreur, T. Leazer, G. P. Daston, P. Carthew, T. Re, L. Loretz, and P. Mann, Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats, *Birth Defects Research. Part B - Development and Reproducdtive Toxicology*, vol. 83, no. 2, sf. 123–133, **2008**.

[69] T. Garcia, E. Schreiber, V. Kumar, R. Prasad, J. J. Sirvent, J. L. Domingo, and M. Gómez, Effects on the reproductive system of young male rats of subcutaneous exposure to n-butylparaben, *Food and Chemical Toxicology.*, vol. 106, no. Pt A, sf. 47–57, **2017**.

[70] J. D. Meeker, T. Yang, X. Ye, A. M. Calafat, and R. Hauser, Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage, *Environ. Health Perspect.*, vol. 119, no. 2, sf. 252–257, **2011**.

[71] D. B. Sayin, Metilasyon ve Kanser, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, vol. 28, no. 4, sf. 513–524, **2008**.

[72] F. Xin, M. Susiarjo, and M. S. Bartolomei, Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation?, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 43. sf. 66–75, **2015**.

[73] T. Khanal, H. G. Kim, S. W. Jin, E. Shim, H. J. Han, K. Noh, S. Park, D. H. Lee, W. Kang, H. K. Yeo, D. H. Kim, T. C. Jeong, and H. G. Jeong, Protective role of metabolism by intestinal microflora in butyl paraben-induced toxicity in HepG2 cell cultures, *Toxicology Letters*, vol. 213, no. 2, sf. 174–183, **2012**.

[74] Y. Nakagawa and G. Moore, Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes., *Biochemical Pharmacology*, vol. 58, no. 5, sf. 811–6, **1999**.

[75] S. Szelag, A. Zabłocka, K. Trzeciak, A. Drozd, I. Baranowska-Bosiacka, A. Kolasa, M. Goschorska, D. Chlubek, and I. Gutowska, Propylparaben-induced disruption of energy metabolism in human HepG2 cell line leads to increased synthesis of superoxide anions and apoptosis, *Toxicology in Vitro*, vol. 31, sf. 30–34, **2016**.

[76] K. H. Shah and R. J. Verma, Butyl p-hydroxybenzoic acid induces oxidative stress in mice liver-an in vivo study., *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 68, no. 6, sf. 875–879, **2011**.

[77] T. Imai, M. Taketani, M. Shii, M. Hosokawa, and K. Chiba, Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine, *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 34, no. 10, sf. 1734–1741, **2006**.

[78] H. Ozaki, K. Sugihara, Y. Watanabe, C. Fujino, N. Uramaru, T. Sone, S. Ohta, and S. Kitamura, Comparative study of the hydrolytic metabolism of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, heptyl-and dodecylparaben by microsomes of various rat and human tissues, *Xenobiotica*, vol. 43, no. 12, sf. 1064–1072, **2013**.

[79] C. Lemini, G. Silva, C. Timossi, D. Luque, A. Valverde, M. González-Martínez, A. Hernández, C. Rubio-Póo, B. Chávez Lara, and F. Valenzuela, Estrogenic effects of p-Hydroxybenzoic acid in CD1 mice, *Environmental Research*, vol. 75, no. 2, sf. 130–134, **1997**.

[80] C. Lemini, A. Hernández, R. Jaimez, Y. Franco, M. Avila, and A. Castell, Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben, *Toxicol. Ind. Health*, vol. 20, no. 10, sf. 123–132, **2004**.

[81] M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, no. 7. sf. 985–1015, **2005**.

[82] B. Alslev, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard, Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout Oncorhynchus mykiss exposed via food and water, *Aquatic Toxicology*, vol. 72, no. 4, sf. 295–304, **2005**.

[83] X. Ye, L. Y. Wong, L. T. Jia, L. L. Needham, and A. M. Calafat, Stability of the conjugated species of environmental phenols and parabens in human serum, *Environment International*, vol. 35, no. 8, sf. 1160–1163, **2009**.

[84] M. J. Kim, S. J. Kwack, S. K. Lim, Y. J. Kim, T. H. Roh, S. M. Choi, H. S. Kim, and B. M. Lee, Toxicological evaluation of isopropylparaben and isobutylparaben mixture in Sprague-Dawley rats following 28 days of dermal exposure, *Regulatory Toxicology Pharmacology*, vol. 73, no. 2, sf. 544–551, **2015**.

[85] O. K. Ulutaş, N. Yıldız, E. Durmaz, M. A. Ahbab, N. Barlas, and I. Çok, An in vivo assessment of the genotoxic potential of bisphenol A and 4-tert-octylphenol in rats, *Archives of Toxicology*, vol. 85, no. 8, sf. 995–1001, **2011**.

[86] A. Korkmaz, M. A. Ahbab, D. Kolankaya, and N. Barlas, Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 10, sf. 2865–2871, **2010**.

[87] F. L. A. Willekens, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y. A. M. Groenen-Döpp, H. J. Bos, G. J. C. G. M. Bosman, A. G. Van den Bos, A. J. Verkleij, and J. M. Werre, Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation, *Blood*, vol. 101, no. 2, sf. 747–751, **2003**.

[88] W. Moselhy, W. M. S. Ahmed, W. A. Moselhy, and T. M. Nabil, Bisphenol A Toxicity in Adult Male Rats: Hematological, Biochemical and Histopathological Approach, *Global Veterinaria*, vol. 14, no. 2, sf. 228–238, **2015**.

[89] M. Kim, H. Lee, S. Kim, J. Cho, Analysis of the relationship between liver regeneration rate and blood levels, *Pakistan Journal of Medical Sciences*, vol. 31, sf. 31-36, **2014**.

[90] G. Lum, Low activities of aspartate and alanine aminotransferase: Their significance in alcoholic liver disease, *Laboratory Medicine*, vol. 26, no. 4, sf. 273–276, **1995**.

[91] P. Sakhuja, Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis?, *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, sf. 16474-16479, **2014**.

[92] P. Alonso-Magdalena, S. Morimoto, C. Ripoll, E. Fuentes, and A. Nadal, The estrogenic effect of bisphenol a disrupts pancreatic β-cell function in vivo and induces insulin resistance, *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 1, sf. 106–112, **2006**.

[93] M. H. Gault, L. L. Longerich, J. D. Harnett, C. Wesolowski, Predicting glomerular function from adjusted serum creatinine, *Nephron*, vol. 62, sf. 249-256, **1992**.

[94] A. M. Wróbel and E. Ł. Gregoraszczuk, Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor-α and -β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells, *Toxicology Letters*, vol. 230, no. 3, sf. 375–381, **2014**.

[95] D. Güzel Bayülken, B. Ayaz Tüylü, H. Sinan, H. Sivas, Investigation of genotoxic effects of paraben in cultured human lymphocytes, *Drug and Chemical Toxicology*, sf. 1-8, **2017**.

[96] A. O. Docea, E. Gofita, M. Goumenou, D. Calina, O. Rogoveanu, M. Varut, C. Olaru, E. Kerasioti, P. Fountoucidou, I. Taitzoglou, O. Zlatian, V. N. Rakitskii, A. F. Hernandez, D. Kouretas, and A. Tsatsakis, Six months exposure to a real life mixture of 13 chemicals' below individual NOAELs induced non monotonic sex-dependent biochemical and redox status changes in rats, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 115, sf. 470–481, **2018**.

[97] J. M. P. Martin, A. Peropadre, O. Herrero, P. F. Freire, V. Labrador, M. J. Hazen, Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells, *Mutation Research/Genetic Toxcology and Environmental Mutagenesis*, vol. 702, 86-91, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Burcu Öztaşcı

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : burcuoztasci05@gmail.com

Adresi : Prof. Dr. Ahmet Taner Kışlalı Mah., 2924. Sokak, Taflan Sitesi, 3.Blok No:3 Çayyolu, Çankaya / ANKARA

Eğitim

Lise : Ankara Ümitköy Anadolu Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (Advanced)

İş Deneyimi

Klinik Araştırma Uzmanı, Trio Grup Klinik Araştırma Şirketi, Ankara (09.2017 – Halen)

Deneyim Alanları

Genetik toksikoloji, toksikoloji, in vivo çalışmalar

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. FHD-2015-8820, Bütilparabenin (Butyl 4-Hydroxybenzoat) Pubertal Dönemdeki Erkek Sıçanlarda Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Investigation of genotoxic effects of butylparaben (butyl 4-hydroxybenzoate) on pubertal male rats ,52nd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Seville, İspanya, 4-7 Eylül 2016, poster sunumu, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427416318811

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 06/07/2018

Tez Başlığı: BÜTİLPARABENİN (BUTYL 4-HİDROKSİBENZOAT) PUBERTAL DÖNEMDEKİ ERKEK SIÇANLARDA GENOTOKSİK, HİSTOPATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 103 sayfalık kısmına ilişkin, 05/07/2018 tarihinde tez danışmanı tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

06.07.2018

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı:	Burcu ÖZTAŞCI
Öğrenci No:	N14124482
Anabilim Dalı:	Biyoloji
Programı:	Zooloji
Statüsü:	☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

(Unvan, Ad Soyad, İmza)