



Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta Yumurta Verimi, Yaşama Yüzdesi ve Fiziksel Büyüme Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Bayram PİRİNÇ, Şifa TÜRKOĞLU*

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas, 58140

Received: 01.09.2016; Accepted: 30.09.2016

Özet. Bu çalışmada gıdalarda ve çeşitli kozmetik ürünlerde koruyucu madde olarak kullanılan etil ve metil parabenin *Caenorhabditis elegans*'ın (*C. elegans*) yaşama yüzdesi ve yumurta verimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada etil ve metil parabenin farklı dozlarını içeren Nematod besiyerleri (NGM) hazırlanarak *C. elegans* bireyleri bu ortamda yaşamaya bırakılmıştır. Bütün petrilere *C. elegans* bireyleri ölene kadar her gün aynı saatte sayım yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar madde uygulanmamış kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda etil ve metil parabenin 350-400 ppm'lik dozlarının kontrol grubu ve diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu gözlemlenmiştir. Her iki maddenin de yaşama yüzdesini kontrole nazaran düşürdüğü tespit edilmiştir. Yumurta verimi analizinde, etil ve metil parabenin her bir dozu için hazırlanmış NGM içeren petri kaplarına ergin *C. elegans* bireyleri aktarılmış ve 36 saat sonra buradaki bireylerden 20 tanesi alınarak paraben içermeyen NGM'li petri kutularına aktarılmıştır. 20 °C'de 30 dk bekletilen petri kutularındaki yumurtaların sayıları tespit edilmiştir. 24 saat sonra çatlamayan yumurtaların sayıları tespit edilerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda madde uygulanan gruplarda yumurta veriminin kontrole nazaran azaldığı belirlenmiştir. Fiziksel büyüme analizinde ise her iki maddenin tüm dozlarının kontrol grubuna göre büyüme baskılandığı fakat bu baskılanmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Caenorhabditis elegans*, etil paraben, metil paraben, yaşama yüzdesi, yumurta verimi, fiziksel büyüme

Investigation of The Effects of Ethyl Paraben and Methyl Paraben on The Longevity and Fecundity of *Caenorhabditis elegans*

Abstract. In this study, the effects of ethyl paraben and methyl paraben, which are used as preservative on the food and various cosmetic products, on the longevity, fecundity and physical growth of *Caenorhabditis elegans* were investigated. In the study, Nematode Growth Media (NGM) medium which containing different doses of ethyl and methyl paraben were prepared and *C. elegans* individuals were allowed to live in this environment. The obtained results were compared with the untreated control group and statistically analyzed. Based on this study results in both agents were found to be lower than in control survival rate. In fecundity analysis, adult *C. elegans* individuals were transferred on culture medium that prepared petri dishes for each dose of the ethyl and methyl paraben. After 36 hours, wherein the 20 individuals were taken and transferred to NGM petri dishes without paraben. The eggs in the petri dishes incubated at 20 C for 30 minutes were determined. After 24 hours, compared with control group by the determined number of uncracked eggs. The results of statistical analysis were showed that material in the treated group compared to the control of egg production decreases. In physical growth analysis, it was determined to suppress the growth of all doses of both agents. But this suppression is not statistically significant.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, ethyl paraben, methyl paraben, longevity, fecundity, physical growth

1. GİRİŞ

20. yüzyıl her konuda olduğu gibi gıda ve kozmetik sanayinde de çok önemli gelişmelerin yaşandığı bir dönemdir. Dünya nüfusunun hızla artışı, insanların hayat standartlarını yükseltme eğilimi ve hızla şehirleşme hazır yiyeceklere ve çok çeşitli kozmetik ürünlerine talebi arttırmıştır.

Parabenler, para-hidroksibenzoik asitin esterleri olup, adını buradan almıştır. Yaygın parabenler, metil paraben (E218), etil paraben (E214), propil paraben (E216), bütül paraben ve heptil parabeni (E209)

* Corresponding author. Email address: turkoglu@cumhuriyet.edu.tr

kapsamaktadır. Parabenler kozmetik ürünlerde, ilaçlarda ve gıdalarda antimikrobiyal amaçlı kullanılan koruyuculardır. Ucuz olmaları ve düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle tercih edilirler. Akut, subakut ve kronik maruziyette parabenlerin toksik etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Çeşitli genotoksik çalışmalarda parabenlerin genel olarak mutajenik olmadıkları belirtilse de etil ve metil parabenlerin hamster over hücrelerinde kromozomal anomalileri arttırdığı saptanmış olmakla birlikte parabenlerin maternal toksisite oluşturan dozlarda dahi fetal anomali oluşturmadığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [1]. Andersen [2] etil paraben ve metil parabenin Çin hamster yumurtalık hücrelerinde kromozomal aberasyonları artırmasına rağmen genel olarak mutajen olmadığını ifade etmiştir. Aynı yazar parabenlerin alerjik bünyeli kişiler dışında herhangi bir yan etkisinin olmadığını da vurgulamıştır. Metil parabenin *Drosophila melanogaster*'de gelişim ve yumurta verimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada %2'lik metil paraben konsantrasyonunun toksik etki gösterdiği yumurta, larva, pupa ve erginleşebilen birey sayılarını önemli oranda düşürdüğü belirlenirken aynı çalışmada metil parabenin %0,02'lik düşük konsantrasyonunda bu sonuçların tersine östrojenik aktivite göstererek bu oranları artırdığı vurgulanmıştır [3].

Parabenler son 50 yıldır gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş bir aktiviteye sahip olması, düşük maliyeti ve emniyetle uzun süredir kullanılıyor olması bu bileşenleri antimikrobiyal koruyucu katkı maddesi olarak oldukça popüler bir konuma getirmiştir. Günümüzde birçok maya, küf ve bakteri çeşidine karşı sıkça kullanılmalarına karşın parabenlerin bu organizmalar üzerindeki etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak, genel olarak mikroorganizmaların zar geçirgenliği ya da mitokondriyal fonksiyonlarını bozarak etki gösterdikleri düşünülmüştür [4]. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada, parabenlerin *E. coli*'de mekanosensitif kanallarla etkileşime girerek bakteriyel osmotik gradiyenti bozduğu [5], bir başka çalışmada da metabolizmada önemli görevi olan serin aminoasitinin hücre zarında alımını inhibe ederek etki gösterdikleri bildirilmiştir [6]. Parabenlerin antimikrobiyal etkilerine rağmen insan meme kanser dokusunda tespit edilmesinden sonra, kanser ile olan ilişkisi yoğun bir araştırma konusu haline almıştır[7-9]. Bununla birlikte parabenlere hiçbir şekilde maruz kalmamış erişkin erkek ve kadınların idrarında paraben bulgularına rastlanması, bu maddelerin önceki temaslarla vücutta biriktiğini göstermektedir [10]. Tüm bu sonuçlar parabenlerin, antimikrobiyal koruyucular olarak güvenle kullanımı konusunda bazı kaygıları gündeme getirmiştir.

Birçok araştırmacı, parabenlerin yan etkilerinin özellikle östrojenik aktivitelerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Östrojenler, uterus dokusunun büyümesini ve hücre proliferasyonunu sağlayan büyüme hormonunun üretimini [11] ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) yolunun aktivasyonunu düzenler [12]. Bu nedenle uterus kütlesindeki artış östrojenik aktivitenin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Parabenlerin östrojenik aktiviteleri de özellikle oterotropik testler vasıtasıyla *in vivo* olarak birçok çalışmayla gösterilmiştir [13-15]. Ovaryumları alınmış ve erginleşmemiş fare ve sıçanlara subkutan bütül paraben uygulaması ile uterus kütlesinde artışın meydana geldiği bildirilmiştir [16]. Yapılan bir diğer çalışmada isobütül paraben ve benzil parabeninde olgunlaşmamış farelerde uterus kütlesini artırdığı tespit edilmiştir [17, 18]. Ayrıca balıklarda yapılan çalışmayla parabenlerin östrojenik aktivitenin bir başka göstergesi olan plasma vitellojen miktarında da artışa neden olduğu bulunmuştur [19]. Bununla birlikte, son yıllarda CF-1 ve CD-1 fareleri ile yapılan uterotropik deneyler sonucunda bütül parabenin uterusun ne ıslak nede kuru ağırlığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [20].

Yapılan diğer araştırmalarla, tüm paraben türlerinin belli bir östrojenik aktiviteye sahip oldukları, ancak bu aktivitenin doğal bir östrojen olan ve bu tür çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan 17 β -estradiolün aktivitesinden 1 000 ila 1 000 000 katı kadar daha düşük olduğu bildirilmiştir [21-23].

Bununla birlikte yapılan pek çok araştırma ile parabenlerin, östrojenik aktivitesinin, insan sağlığı açısından tehdit edici derecede önemli olmadığı sonucuna da varılmıştır [24, 25].

Propil paraben ve bütül paraben ile yapılan diğer çalışmalar ile bu parabenlerin, genç erkek sıçanlarda düşük ortalama epididim ve seminal vezikül ağırlıkları, düşük sperm üretimi, düşük testosteron düzeyleri gibi olumsuz üreme etkilerine neden olabileceği belirtilmiştir [26, 27]. Ancak ilerleyen yıllarda başka deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarla parabenlerin üreme organları üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı da tespit edilmiştir [20, 28].

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), yaklaşık olarak 1mm boyunda, mikroskopik, patojen olmayan, doğada ağaç diplerinde yaşayan bir nematoddur. *C.elegans*'ın model organizma olarak kullanılmasının en önemli özelliklerinden biri ekonomik olmasıdır, laboratuvar koşullarında, hazırlanan besiyerinde *E.coli* ile beslenerek büyütülebilmesidir. Ayrıca genetiğinin zigottan erişkine kadar her bir hücrenin iyi bilinmesi, genlerinin insan genleriyle %80 oranında homolog olması ve bir kimyasalın etkisini tüm bir organizma üzerinde gözleyip analiz etme avantajı da *C. elegans*'ın model organizma olarak kullanılmasını sağlar [29].

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, *in vitro* ortamda insan lenfosit kültürüyle yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile *in vivo* ortamda *Drosophila melanogaster* ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yaptığımız literatür taraması sonucunda bu kimyasalların *C. elegans* üzerine etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda gıdalarda ve kozmetik sanayisinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan etil ve metil parabenlerin olası genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkileri bu test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

2. MATERYAL METOD

Etil Paraben (E214)

Beyaz toz formunda bulunur.

Kimyasal adı: Etil p-hidroksibenzoat, Kimyasal Formülü: $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$

Kullanım Amacı: Koruyucu

Metil Paraben (E218)

Beyaz ve toz halindedir.

Kimyasal Adı: metil p-hidroksi benzoat. Kimyasal formülü: $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{CO}_2\text{CH}_3$

Kullanım Amacı: Koruyucu

Deneylerimizde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji bölümünden temin edilen *C. elegans* kullanılmıştır. Deneyde kullandığımız stoklar Biyoloji Bölümü *Drosophila melanogaster* odasında $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlık koşullarda tutulmuş, sadece çalışma esnasında aydınlık ortama alınmıştır.

Nematod Besi Yeri (NGM) Hazırlaması

3 g NaCl, 2,5 g peptone ve 20 g agar, hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine 1 lt saf su eklenip kaynama sıcaklığına gelene kadar magnetik karıştırıcıda homojen bir şekilde karışması sağlandı. Daha

Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta

sonra 120 °C 15dk otaklavlandı. Otaklavdan çıktıktan sonra 55 °C ye kadar soğutuldu. Soğutulan NGM'lere saplementleri olan 1 ml 1M MgSO₄, 1 ml kolesterol, 1 ml 1M CaCl₂ ve 25 ml 1,5M KH₂PO₄ eklendi. Homojen bir şekilde karıştırdıktan sonra hazırlanan NGM'ler 60 mm'lik petri kutularına yaklaşık olarak 10 ml dökülüp, katılaşması beklendi. Katılaştıktan sonra NGM'nin ortasına yaklaşık 400 µl *E. coli* OP50 suşu eklendi. *E. coli* eklenen petri kutuları yaklaşık olarak 1-2 gün steril ortamda kurutulmaya bırakıldı. Bakteri solüsyonu kuruyunca *C. elegans*'lar NGM'ye yerleştirildi. Agar kıvamını koruması için NGM'nin tamamen kurumamasına dikkat edildi.

***E. coli*'nin OP50 Suşu İçin TBX Agar Hazırlanması**

9,125 g TBX (Tryptone Bile Glucuronide Agar) agar hassas terazide tartılıp üzerine 250 ml saf su eklendi, 125°C de 15 dk otaklavlandıktan sonra 55 °C ye soğutuldu. 60 mm lik her bir petri için 10 ml, 90 mm lik petri için 15 ml dökülüp katılaşması beklendi. Katılaştıktan sonra kullanıma hazır hale gelen TBX'lere *E. coli* ekilip 37⁰C de 24 saat bekletildi.

***E. coli* OP50 Suşunun Hazırlanması**

9,125 g Lauryl Sulfate Broth (LST) hassas terazide tartılıp 250 ml saf su eklenip, 121 °C de 15 dk otaklavlandı ve süre sonunda 37 °C ye soğutuldu. Soğutulan LST'ye, bir kolonilik *E. coli* ekilip 37 °C de 24 saat etüvde bekletildi (24 saat sonra sıvı bulanıklaşır. Bulanıklık *E. coli*'nin ürediğinin göstergesidir). Bu sıvıdan 400 µl alınıp daha önce hazırlamış olduğumuz NMG üzerine eklenir [30].

***C. elegans*' ların Senkronizasyonu**

1 g NaOH hassas terazide tartılıp üzerine 5 ml saf su eklendi ve çözdürüldü. 1 ml sodyum hipoklorid ve 0,5 ml NaOH çözeltisi santrüfuj tüpüne aktarıldı. Daha önce hazırlamış olduğumuz NGM'lere saf su yardımıyla pipetaj yapılarak yumurtaların yıkanması sağlandı. Yapılan pipetaj sonunda yumurtalar santrüfuj tüpüne aktarılıp, 3000 rpm'de 10 dk. santrüfuj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı, kalan kısım yeni NGM lere aktarıldı. Bu yumurtalar senkronize olmuş yavruları oluşturacaktır. Bunlar 3. günün sonunda yetişkin forma gelince çalışmada kullanıldı

Etil Paraben ve Metil Parabenli NGM' lerin Hazırlanması

Ön çalışmalar sonucunda tespit edilen etil ve metil parabenin 1. dozu (200 ppm) tartımı yapılarak üzerine 100 ml NGM döküldü. Isıtıcı manyetik karıştırıcıda maddenin homojenizasyonu sağlandı. Diğer dozlarda (250 ppm, 300 ppm, 350 ppm ve 400 ppm) aynı işlem tekrar edildi. Her dozdan 5 petri kutusu hazırlandı. Hazırlanan NGM'ler petri kutularına yeteri kadar aktarıldı. NGM katılaştıktan sonra LST' de hazırlanan *Escherichia coli* OP50 suşu NGM' e eklenerek steril kabinde kurutuldu. Bu işlem her etil paraben ve metil paraben maddesi için ayrı ayrı yapıldı. Kontrol grubu kimyasallarla muamele edilmemiş ortamda yetiştirildi.

Etil Paraben ve Metil Parabenin *C. elegans*'larda Yaşam Süresi Üzerine Etkileri

Yaşam süresi analizinde kullanılacak NGM'ler yukarıda anlatıldığı gibi hazırlandı. Ancak yaşam süresi analizi süresince *C. elegans*'ların yumurta gelişimini önlemek amacıyla NGM hazırlama aşamasında fluorodeoxyuridine (FUDR) eklendi, Senkronizasyonu yapılmış *C. elegans*'lardan her bir petriye stero mikroskop altında steril öze yardımıyla 60'şar adet aktarıldı. Bütün petrilerdeki *C. elegans*'lar ölene kadar her gün aynı saatte canlı bireyler sayıldı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Çalışma 3 kez tekrar edildi [30].

Etil Paraben ve Metil parabenin C. elegans' larda Yumurta Verimi Üzerine Etkileri

Bu analizde içinde FUDR bulunmayan NGM ler kullanıldı. Yumurta sayımı Koelle protokolüne [31] göre yapıldı. Buna göre bir petriye 25 adet iyi beslenen L4 evresindeki *C. elegans* aktarıldı. 36 saat sonra bunların 20 tanesi yeni bir petriye aktarıldı. 20 °C'de tam 30 dakika bekletildikten sonra petriden çıkartıldı 30 dakika sonunda 20x objektif ile yumurtalar sayıldı. Sayarken petrinin tabanına klavuz çizgileri (grid) çizildi. Petrilereki yumurta sayıları belirlendi. Bir gün sonra çatlamayan yumurtalar tespit edilerek sayıldı. Her gün aynı saatte son yumurtadan birey çıkana kadar sayım yapıldı. Yumurtadan çıkma yüzdesi hesaplanarak kontrol grubuyla karşılaştırılıp, çalışma 3 kez tekrar edildi

Parabenlerin C. elegans'ta Fiziksel Büyümeye Etkisi

Fiziksel büyümenin kontrolü amacıyla, hazırlanan ve farklı dozlarda etil ve metil paraben içeren NGM'li (içerisine flurodeoxyuridine eklenmemiş) petrilere eşit miktarda *C. elegans* yumurtası ilave edildi. İçerlerinde 90-100'er adet yumurta bulunan petrilere, yumurtadan yavruların çıkışı ve fiziksel büyüklükleri açısından her gün kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak incelendi.

Çalışmalar 3 kez tekrar edilerek, ortalamalar belirlenip SPSS (SPSS 15.0) programı ile gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Değerlendirmeler Ortalama±Standart hata olarak yapıldı.

3. BULGULAR

Bu araştırmada gıda kozmetik ve ilaç sanayinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan etil paraben ve metil parabenin *C. elegans'ta* yaşama süresi, yumurta verimi ve büyüme üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Yapılan LD50 çalışmaları sonucunda her iki maddenin 500 ppm'lik dozlarının toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Doz seçiminde bu oran göz önünde bulundurularak 200, 250, 300, 350, 400 ppm'lik dozlarla çalışmanın gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür.

Etil ve Metil Parabenin Yaşama Yüzdesi Üzerine Olan Etkileri

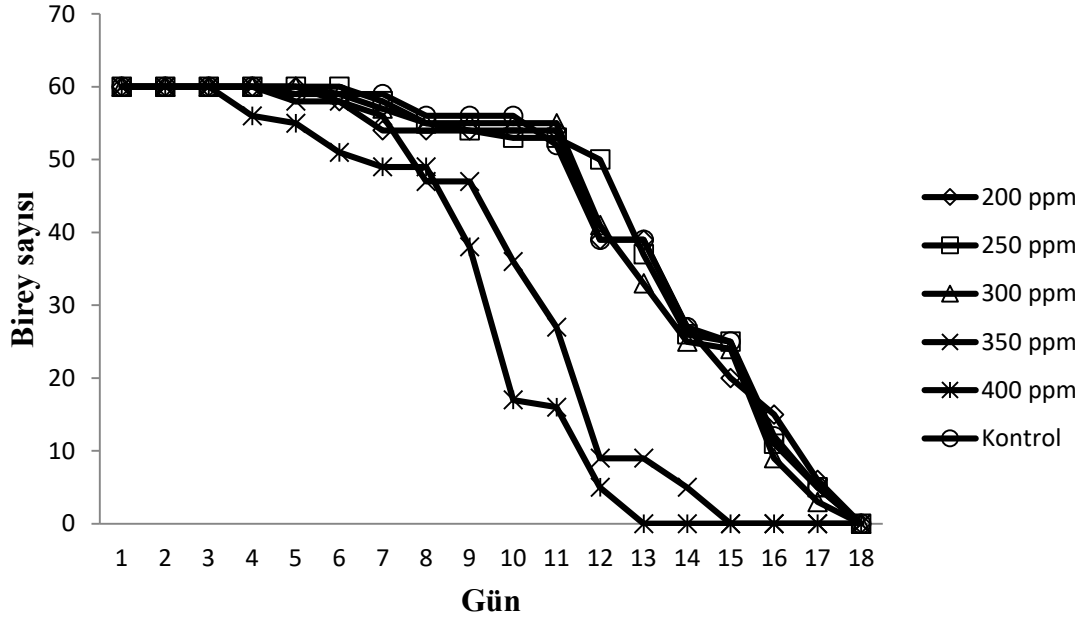
Kontrol grubu dahil olmak üzere tüm uygulama dozlarında yer alan bireyler arasındaki yaşama süresi farkının istatistiksel olarak önemli olup olmadığı SPSS 15. Programı kullanılarak % 95 güven aralığında hesaplanmıştır. Etil parabenin *C. elegans'ın* yaşam yüzdesine etkisine ait sonuçlar Şekil 1 ve Çizelge 1'de gösterilmiştir. Test sonuçlarına göre kontrol grubu ile 350 ve 400 ppm'lik uygulama dozları arasında anlamlı bir farklılık vardır. Diğer dozlar olan 200-250 ve 300 ppm için böyle bir farka rastlanılmamıştır. Dozlar kendi aralarında karşılaştırıldığında da yine ilk üç doz arasında anlamlı bir farkın olmadığı buna karşılık 350 ve 400 ppm ile aralarında anlamlı bir farkın olduğu gözlenmiştir.

Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta

Çizelge 1. Etil ve metil parabenin *C. elegans*'ta yaşama yüzdesine olan etkisi.

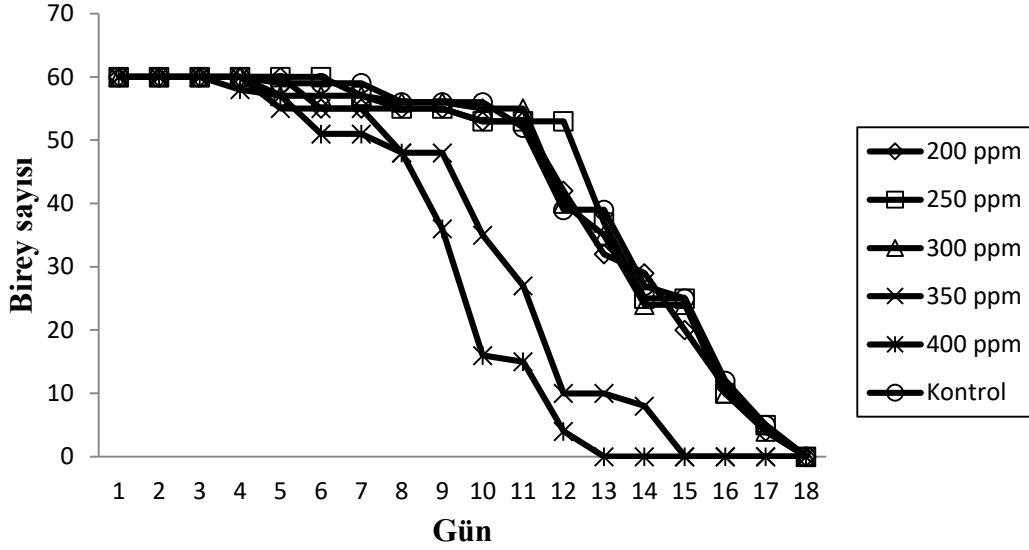
Doz	Birey sayısı	Etil paraben* Yaşama yüzdesi ORT±SH*	Metil paraben* Yaşama yüzdesi ORT±SH*
Kontrol	60	14,07±0,36 a	14,07±0,36 a
200 ppm	60	13,90±0,40 a	13,73±0,40 a
250 ppm	60	14,12±0,36 a	14,13±0,35 a
300 ppm	60	13,85±0,36 a	13,83±0,38 a
350 ppm	60	10,87±0,30 b	10,85±0,34 b
400 ppm	60	9,60±0,31 b	9,60±0,28 b

*Aynı harflerle gösterilen değerler 0,05 düzeyinde önemsizdir. ORT±SH: Ortalama±Standart hata



Şekil 1. Etil parabenin *C. elegans*'ta yaşama yüzdesine olan etkisi.

Metil parabenin yaşama yüzdesi üzerine olan etkileri ile ilgili yapılan değerlendirmelerde kontrol grubu dahil olmak üzere, tüm uygulama dozlarında yer alan bireyler arasındaki yaşama süresi farklılığının istatistiksel olarak önemli olup olmadığı SPSS 15.0 Programı ile araştırılmıştır. %95 güven aralığında elde edilen sonuçlar Çizelge 1 ve Şekil 2'de görülmektedir. 350 ve 400 ppm'lik gruplar hariç diğer uygulama grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktur.



Şekil 2. Metil parabenin *C. elegans*'ta yaşama yüzdesine olan etkisi.

Etil ve Metil parabenin Yumurta Verimi Üzerine Olan Etkileri

Etil parabenin 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm'lik dozlarının *C. elegans*'ta yumurta verimi üzerine etkilerini gösteren değerler Çizelge 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda yumurtadan çıkan yavruların yüzdesi 98,9 iken bu oran doz artışına paralel olarak azalmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda kontrol ile diğer tüm uygulama grupları arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında da, istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

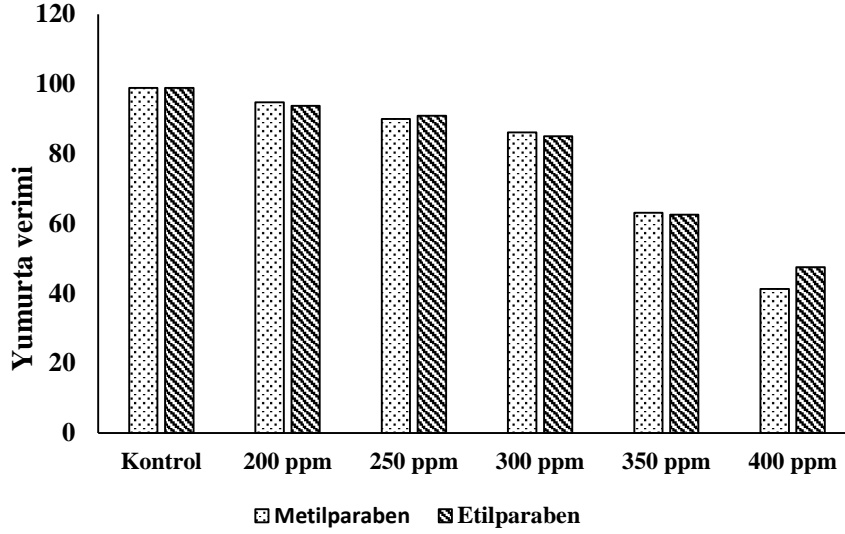
Metil parabenin yumurta verimi üzerine olan etkileri incelendiğinde elde edilen veriler Çizelge 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda %98,9'luk bir oran söz konusu iken 400 ppm'lik dozda bu oran %41,3'e gerilemiştir. Kontrol grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm dozların istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Etil ve metil parabenin yumurta verimi üzerine olan etkileri.

Doz	Etil paraben*	Metil paraben*
Kontrol	98,9 a	98,9 a
200 ppm	93,7 b	94,7 b
250 ppm	90,9 c	90,0 c
300 ppm	85,0 d	86,1 d
350 ppm	62,5 e	63,1 e
400 ppm	47,5 f	41,3 f

*Aynı harflerle gösterilen değerler 0,05 düzeyinde önemsizdir.

Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta



Şekil 3 Etil ve metil parabenin *C. elegans*'ta yumurta verimine olan etkisi.

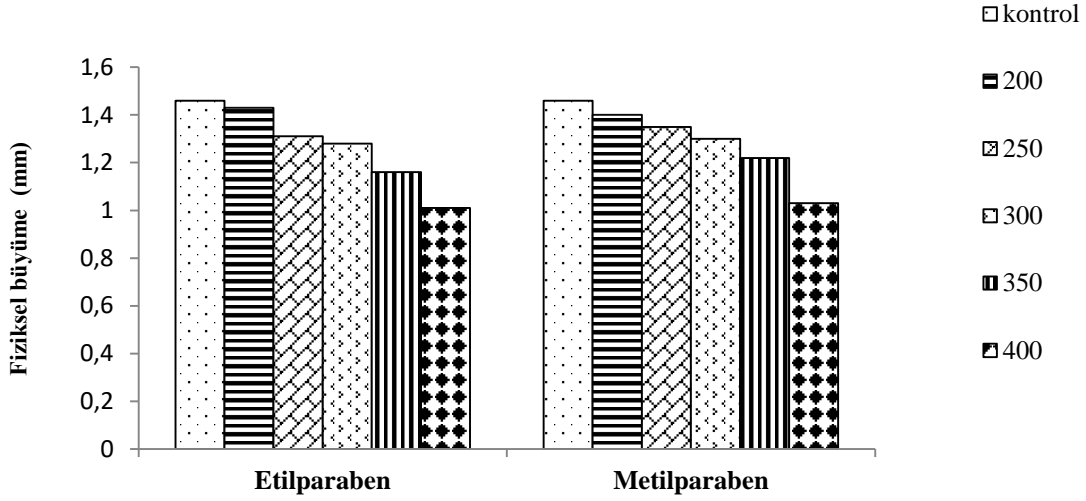
Etil ve Metil Parabenin Fiziksel Büyüme Üzerine Olan Etkileri

Etil ve metil parabenin fiziksel büyüme üzerine olan etkilerinin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler ve bu verilere göre hazırlanmış grafikler Çizelge 3 ve Şekil 4'de gösterilmiştir. 3 gün süre ile 3X objektifi ile boy ölçümleri yapılan *C. elegans*'larda her iki maddenin tüm dozlarının kontrol grubuna göre büyümeyi baskıladığı gözlenmiştir (Şekil 5-19). Ancak bu baskılamının istatistiksel olarak bir anlamı bulunmamaktadır.

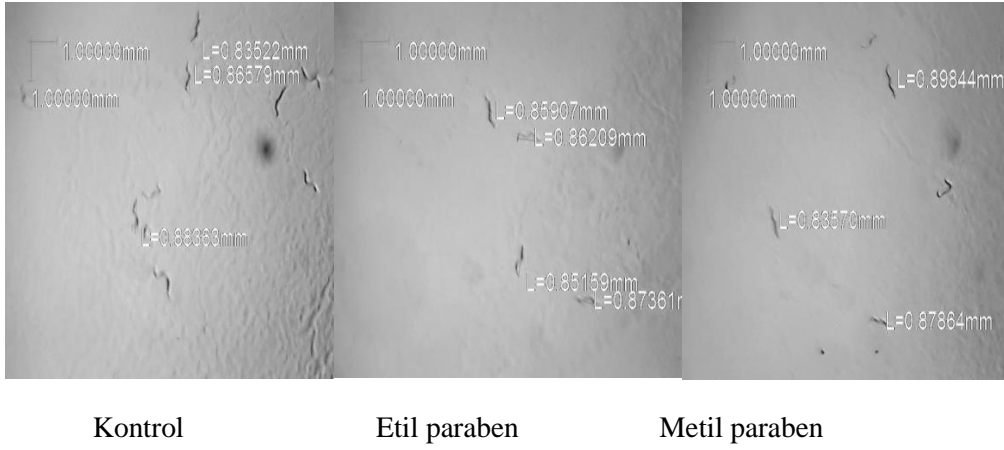
Çizelge 3. Etil ve metil parabenin *C. elegans*'ta fiziksel büyümeye olan etkisi.

Doz	Etil paraben*	Metil paraben*
Kontrol	1,46 a	1,46 a
20 ppm	1,43 a	1,40 a
250 ppm	1,31 a	1,35 a
300 ppm	1,28 a	1,30 a
350 ppm	1,16 a	1,22 a
400 ppm	1,01 a	1,03 a

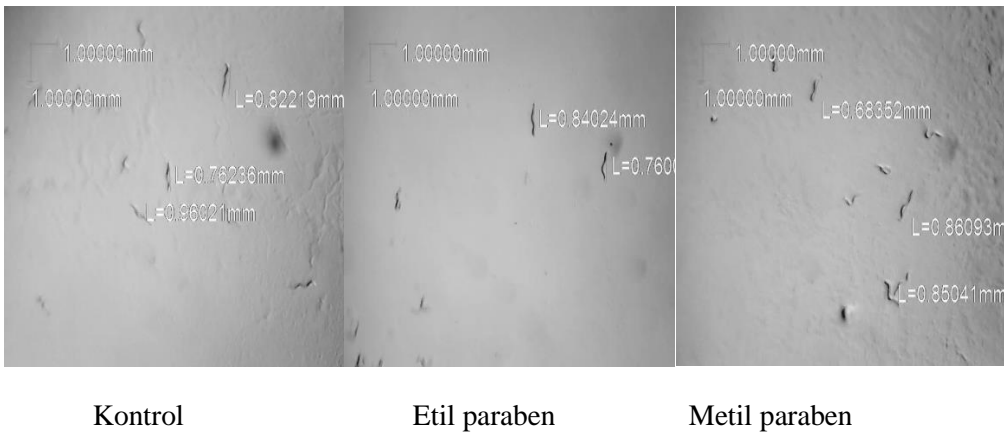
*Aynı harflerle gösterilen değerler 0,05 düzeyinde önemsizdir.



Şekil 4. Etil ve metil parabenin *C. elegans*'ta fiziksel büyümeye olan etkisi.

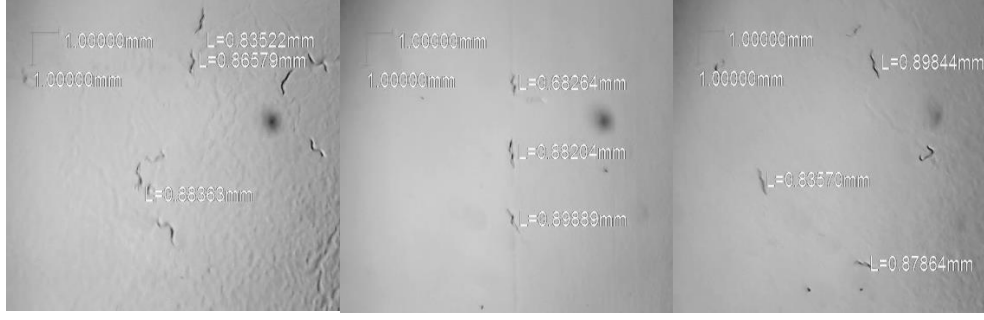


Şekil 5. Etil ve metil parabenin 200 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 1. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Şekil 6. Etil ve metil parabenin 250 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 1. Gün ölçülen boy uzunlukları.

Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta

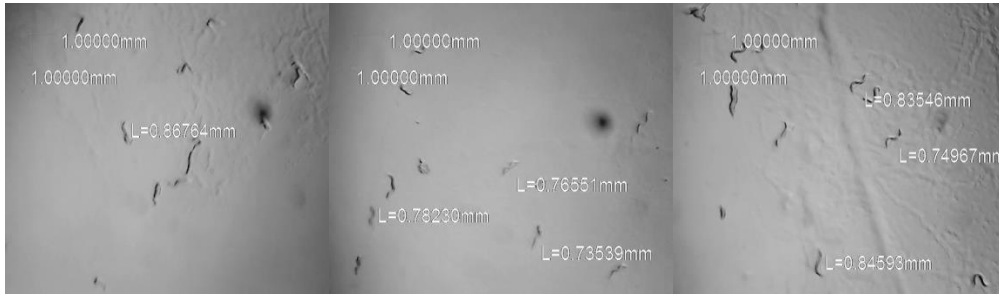


Kontrol

Etil paraben

Metil paraben

Şekil 7. Etil ve metil parabenin 300 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 1. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Kontrol

Etil paraben

Metil paraben

Şekil 8. Etil ve metil parabenin 350 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 1. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Kontrol

Etil paraben

Metil paraben

Şekil 9. Etil ve metil parabenin 400 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 1. Gün ölçülen boy uzunlukları.

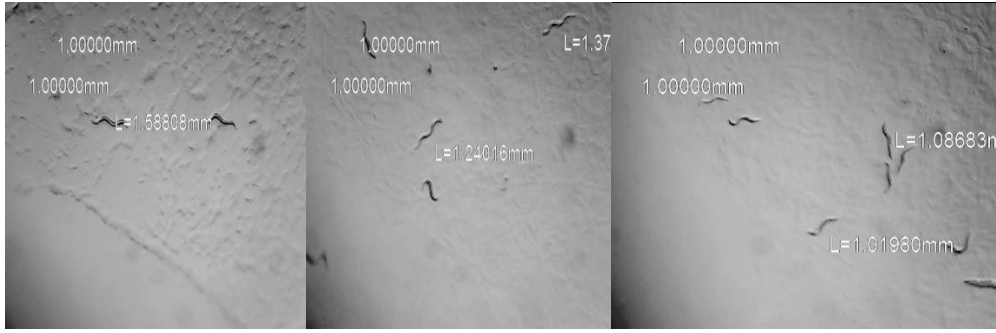


Kontrol

Etil paraben

Metil paraben

Şekil 10. Etil ve metil parabenin 200 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 2. Gün ölçülen boy uzunlukları.

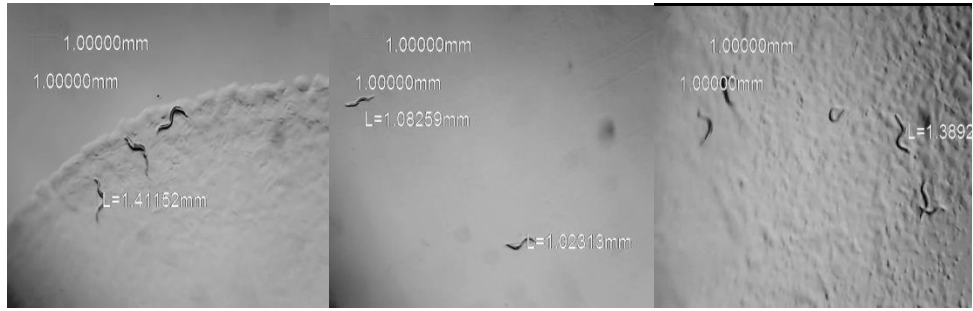


Kontrol

Etil paraben

Metil paraben

Şekil 11. Etil ve metil parabenin 250 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 2. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Kontrol

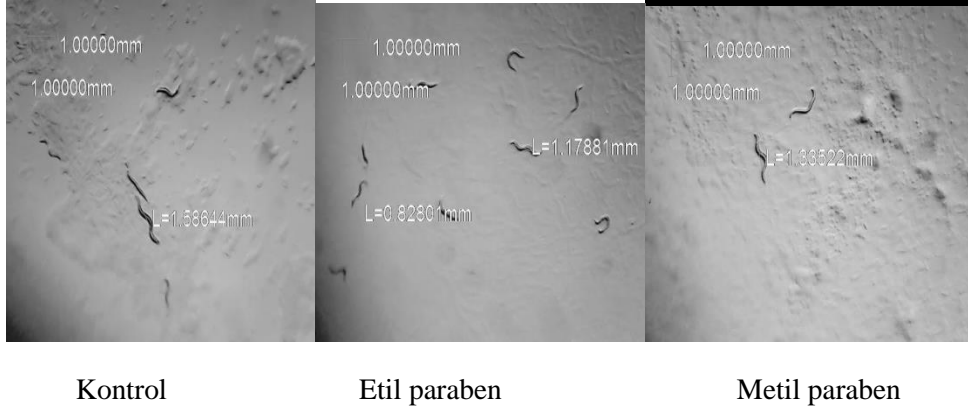
Etil paraben

Metil paraben

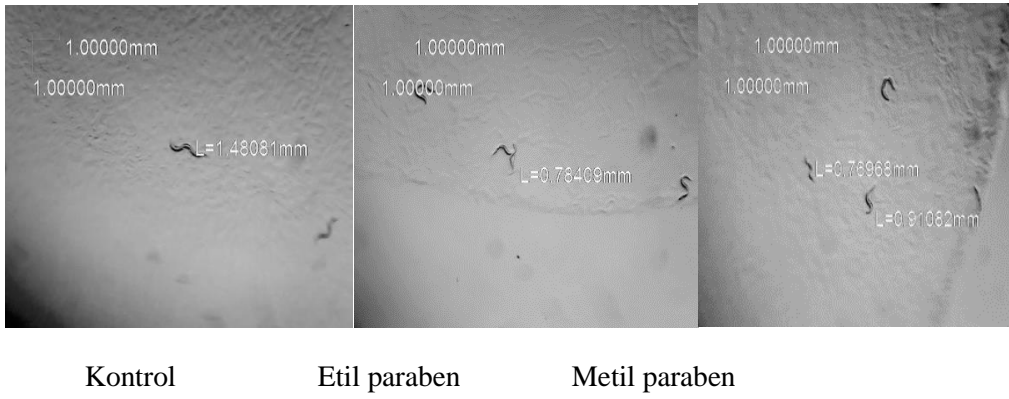
Şekil 12. Etil ve metil parabenin 300 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu

2. Gün ölçülen boy uzunlukları.

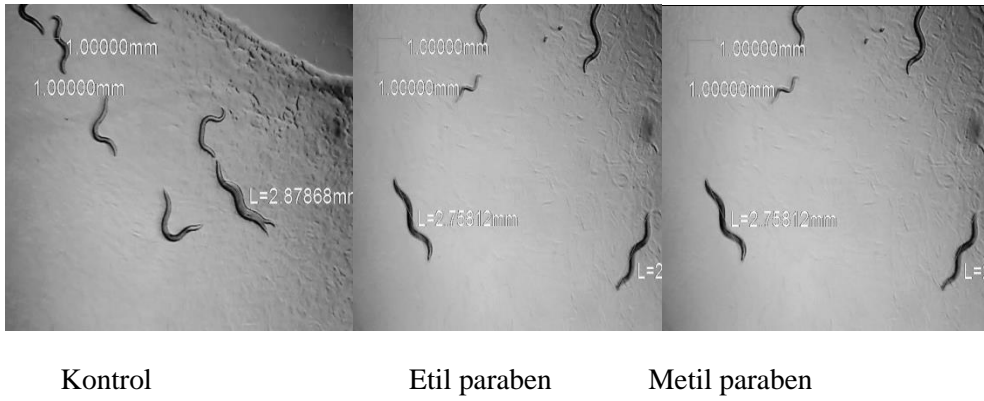
Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta



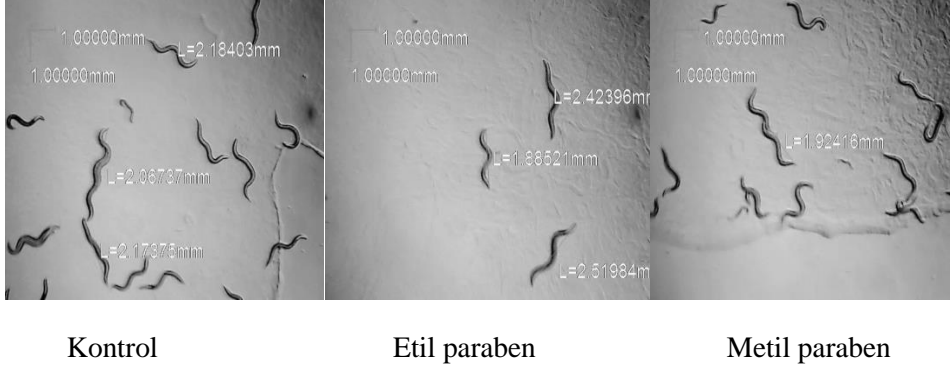
Şekil 13. Etil ve metil parabenin 350 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 2. Gün ölçülen boy uzunlukları.



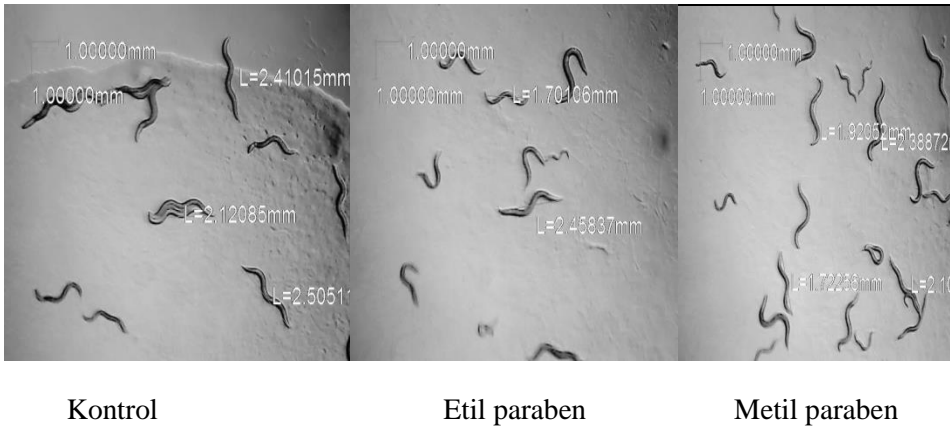
Şekil 14. Etil ve metil parabenin 400 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 2. Gün ölçülen boy uzunlukları.



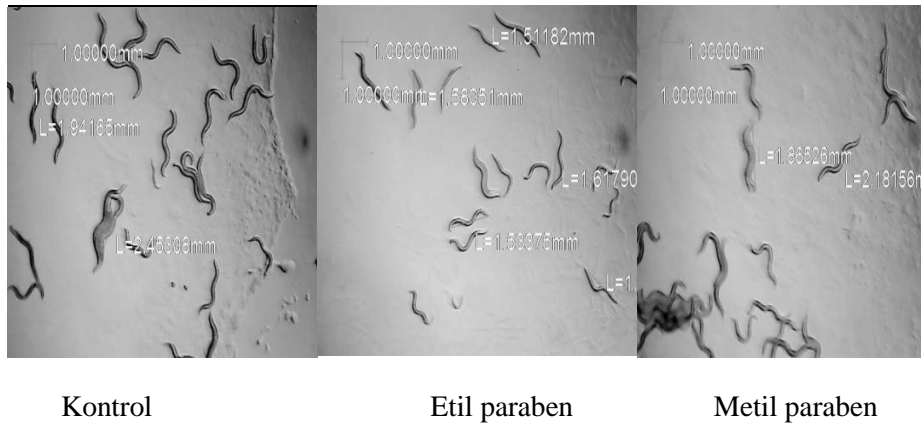
Şekil 15. Etil ve metil parabenin 200 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 3. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Şekil 16. Etil ve metil parabenin 250 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 3. Gün ölçülen boy uzunlukları.

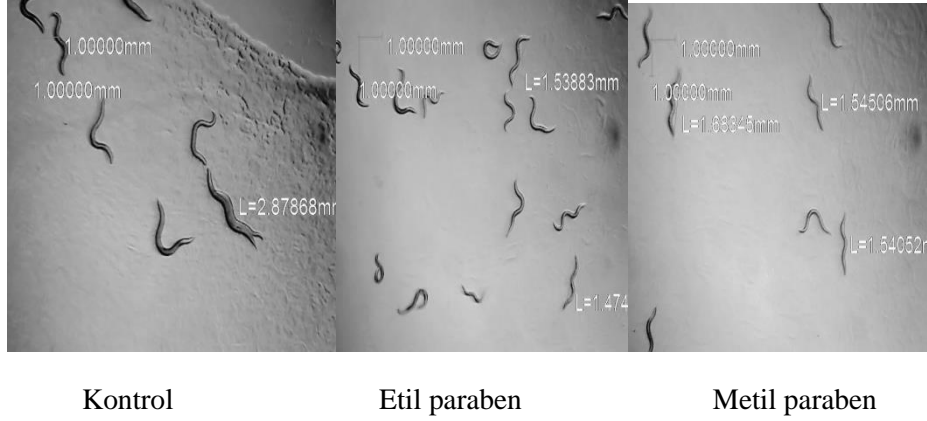


Şekil 17. Etil ve metil parabenin 300 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 3. Gün ölçülen boy uzunlukları.



Şekil 18. Etil ve metil parabenin 350 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 3. Gün ölçülen boy uzunlukları.

Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta



Şekil 19. Etil ve metil parabenin 400 ppm'lik dozunun uygulanması sonucu 3. Gün ölçülen boy uzunlukları.

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılan birçok katkı maddesinin toksik etkili olup olmadığı bilim dünyasında halen tartışılmaktadır. Gıdalar ve kozmetik ürünlerine eklenen maddelerin miktarı ve buna maruz kalan insanların sayısı göz önüne alındığında bu konunun önemi açıkça anlaşılmaktadır. Bu nedenle bilim adamları yıllardır birçok katkı maddesinin olası klastojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle belirlemeye çalışmaktadır.

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, *in vitro* ortamda insan lenfosit kültürüyle yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile *in vivo* ortamda *Drosophila melanogaster* ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yaptığımız literatür taraması sonucunda bu kimyasalların *C. elegans* üzerine etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda gıdalarda ve kozmetik sanayisinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan etil ve metil parabenin olası genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkileri *in vivo* test yöntemi kullanılarak araştırılmıştır

Deneylerimizde elde ettiğimiz verilere göre parabenlerin 350 ve 400 ppm'lik dozlarının *C. elegans* bireylerinde yaşama yüzdesini kontrol grubuna nazaran düşürdüğü anlaşılmıştır. Diğer gruplar arasında da kontrol grubuna nazaran değişimler olmasına karşılık bu oranlar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 1).

Etil ve metil parabenin yumurta verimi üzerine etkileri incelendiğinde ise, her iki maddenin de *C. elegans*'ta toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). Yine aynı maddelerin *C. elegans* bireylerinde fiziksel büyüme üzerine olan etkilerini araştırdığımızda, bu maddelerin büyümede toksik etki gösterdiği, ancak bu etkinin istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 3).

Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, etil ve metil parabenin 350 ve 400 ppm'lik dozlarının yaşama süresi üzerine olan olumsuz etkisinin genotoksik etki değil, farklı toksik etkiler meydana getiren mekanizmalar sonucunda olduğunu düşünmekteyiz. Soni ve ark. [32] tarafından yapılan bir araştırmada, parabenlerin toksik etki mekanizmasının, oksidatif fosforilasyon sonucu meydana gelen mitokondriyal depolarizasyon ve ATP enerjisinin hızla tükenmesiyle membran geçirgenliğindeki değişikliklerin ortaya çıkardığı etkiler sonucu olduğu açıklanmıştır. Bununla birlikte, propil paraben, metil paraben, fenoksietanol, benzil alkol ve etil heksil gliserinin apoptotik, nekrotik, ve genotoksik etkilerinin insan

deri fibroblast hücrelerinde *in vitro* olarak araştırıldığı çalışma sonucunda, bu maddelerin hücreleri apoptoza ve nekroza sokarak benzer sitotoksik etkiler gösterdikleri bildirilmiştir [33].

Günlük olarak çeşitli gıda maddeleri ile birlikte alınan parabenlerin güvenilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla, değişik zamanlarda Avrupa Birliği'nin yetkili kurumları tarafından risk değerlendirmeleri yapılmaktadır. Avrupa komisyonu Gıda Maddeleri Bilimsel Komitesi'nin (The Scientific Committee on Food=SCF) 1994 yılında yapmış olduğu risk değerlendirmesinde, *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri ile etil, metil, propil, ve büti lparabenin genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. Ancak kesin olarak ispatlanmamış olmasına rağmen, özellikle bütil paraben ve propil parabenin fetüs üzerinde bazı anomalilere yol açtıkları ve bu nedenle teratojenite çalışmalarının yenilenmesine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.

1984 yılında yapılan bir çalışmada parabenlerin 13,000 üzerinde kozmetik ürün içinde bulunduğunu göstermiştir [34]. Günümüzde kişisel bakım ve kozmetik ürün çeşitliliğinin ne kadar arttığı göz önüne alınırsa, paraben içeren ürünlerin ne kadar yaygınlaşmış olduğunu tahmin etmek zor olmaz. Paraben içeren ürün grupları arasında bulunan kozmetikler (föndoten, pudra, göz farı, maskara, makyaj temizleyiciler, ruj, çabuk kuruyan ojeler) ve kişisel bakım ürünleri (losyon ve kremler, diş macunu, şampuanlar, saç bakım malzemeleri, güneş yağları, cilt temizleyiciler ve tonikler, terlemeyi önleyici deodorantlar) ne kadar geniş bir yelpazeye parabenlere maruz kaldığımızı göstermektedir.

Yapılan araştırmalar, bir yetişkinin her gün yaklaşık 8 kozmetik ürünü vücut temizliği ve cilt bakımı için kullandığını göstermiştir. Cildimiz vücudumuzun %60'ını oluşturan en büyük organımızdır. Kozmetik ürünlerde bulunan bazı kimyasalların deri tarafından hızlı emilimi göz önüne alındığında, bu ürünleri kullanan insanlarda baş dönmesi, ekzema, deri iritasyonları, alerji vb. gibi bağışıklık sistemiyle ilişkili semptomlara yol açabilmesi yadsınmamalıdır. Her geçen gün kimyasal içerikli ürünlerden etkilenen insanların sayısında artma görülmesi, örnek olarak 2011 yılında yayınlanan bir çalışmaya katılan yüzlerce hamile kadının tümünün kan örneklerinde 163 zararlı kimyasalın bulunmuş olması [35] ayrıca dikkate alınması gereken bir konudur.

Parabenlerin cilde nüfuz edebildiği ve sistematik olarak emilebildiği, dolayısıyla insan doku, kan ve idrarlarında parabenlerin bulunabildiği hem *in vitro* hem de *in vivo* birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir. Örneğin, parabenleri içeren kremin cilde sürülmesinden 8 saat sonra metilparaben %60, etilparaben %40, ve propilparaben %20 oranında cilt yapısında bulunmuştur [36]. Norveç'te yapılan çalışmaya göre, 332 kadının kan örneklerinde metilparaben 63% (ortalama 9.4 ng/ml), etilparaben 22% (ortalama < 3 ng/ml) ve propilparaben 29% (ortalama < 2 ng/ml) oranlarında tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonlar istatistiksel olarak cilt losyonu kullanımıyla ilişkilendirilmiş, parabenlerin vücutta kısa-zamanlı ömürlerine rağmen paraben içeren losyon, krem veya benzeri ürünlerin sık kullanımı durumunda kadınlarda yüksek konsantrasyon ve kalıcı oranlarda parabenler tespit edilmiştir [37]. Yetişkin ve ergenlik çağındaki kadınlardan alınan idrar tahlili örneklerinde metil ve propil paraben miktarlarının erkeklere göre çok daha yüksek olması, bu maddeleri içeren kişisel bakım ürünlerinin kadınlar tarafından daha çok kullanılmasına bağlanmıştır [38]. Kozmetik ürün ve formüllerinde bulunabilen parabenlerin deriyle etkileşimi nedeniyle birçok kontakt dermatit vakasına, yani deriye doğrudan temas etmesi sonucu ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyona neden olabildiği tespit edilmiştir ve bilimsel çalışmalarda bildirilmiştir. Bazı kişilerde allerjik (immünolojik; bağışıklık sistemi tarafından regüle edilen) kontakt dermatit oluşumuna neden olabilmektedir. Her ne kadar parabenler zayıf yapılı allerjenler olarak tanımlansalar da, parabene hassas veya hasar görmüş cilde sahip kişilerde allerjik kontakt dermatit daha çok görülebilmektedir [39-45].

Parabenler kimyasal yapılarından dolayı östrojenik karaktere, yani östrojen gibi “doğal steroid” hormonlarını taklit edebilme yeteneğine sahiptirler [46]. Östrojenik kimyasallar ayrıca endokrin bozucu kimyasallar olarak tanımlanmaktadır. Bu tür hormon bozucu kimyasal maddeler, maruz kalan kişinin hormonal dengesini bozabilen ve hatta bağışıklık sistemini etkileyebilen maddelerdir. Amerikan Çevresel Koruma Örgütü (Environmental Protection Agency, EPA) “Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?” adlı raporunda parabenlerin östrojenik etkisi olduğunu bildirmiştir.

Hayvanlar ile yapılan deneysel çalışmalar paraben ve metabolitlerinin endokrin bozucu etkilerinin olabileceğini göstermiştir [47-49]. Östrojenik karaktere sahip isobutilparaben gebelik döneminde sıçanlara verilmiş, doğan yavruların yetişkinlikte sosyal tanıma ve öğrenme yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir. Özetle, gebelik süreci içerisinde deneklerin isobutilparabene maruz kalması insanlarda görülen otistik bozukluklara benzer sosyal etkileşime ve iletişime zarar veren rahatsızlığa neden olabilmektedir [15, 50]. Ayrıca gebelik döneminde annelerin parabenlere maruz kalması sonucunda yavruların yetişkinlik döneminde rahimlerinin östrojene hassasiyetinin arttığı gözlenmiştir. Ergenlik döneminde farelere yüksek dozda metil- ve isopropilparaben verilmesi, menstrüasyon döneminin kısalmasına, yumurtalık, tiroid ve böbreküstü bezlerinin, karaciğer ve böbrek ağırlıklarının azalmasına ve üreme organlarında histopatolojik bozukluklara neden olmuştur [23].

Parabenlerin sadece kadınları etkilemediği, ayrıca erkeklerde de üreme problemlerine yol açtığı gösterilmiştir. Parabenlerin hormonları taklit edebilme özelliği, erkek üreme fonksiyonlarını negatif şekilde etkilemekte, Avrupa Birliği kanunları tarafından günlük kabul edilebilir dozlarda dahi sperm üretimini azaltabilmektedir [26, 27]. 2010-2011 seneleri içinde yapılan bilimsel çalışmalarda parabenlerin sadece hücresel düzeyde değil, genetik yapı taşlarımız olan DNA düzeyinde de etkisini gösterdiği bulunmuştur [9, 51, 52].

Bu çalışmalara ek olarak, meme kanseri hastalarının sayısının gittikçe artması ve araştırmalarda meme dokusunda [53] az bile olsa parabenlerin bulunmuş olması dikkate alınması gereken hususlardır. 2012’de yayınlanan bir çalışmada 40 hastadan alınan 160 meme kanser doku örneğinde ortalama total paraben değeri 85.5 ng/gram olarak bulunmuş, yüksek oranlarda propil paraben ve metil paraben, daha düşük oranlarda ise butil paraben, etil paraben ve isobutil paraben tesbit edilmiştir [54]. Her ne kadar araştırmada paraben içeren kol altı kozmetiği kullanımının meme kanseri örnekleri ile ilişkisi sorgulansa da, çalışmada ilginç bir nokta ise 40 hastadan 7’sinin hiç bir şekilde kol altı kozmetiği kullanmamış olmasıdır. Bu dikkate alınması gereken bulgu, 7 hastanın başka kaynaklardan parabenlere maruz kaldığını düşündürmektedir.

Parabenlerin, zayıfta olsa östrojenik etkisiyle MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin büyümesini arttırıcı özelliği [7, 46, 55], bazı araştırmacılar tarafından parabenlerin meme kanseri tetikleyici kimyasallar olarak tanımlamalarına neden olmuştur. Diğer araştırmacılar ise östrojenik etkinin çok zayıf olmasından dolayı sorun açmayacağını öne sürmektedirler [56]. Her ne kadar insanlar üzerinde yapılmış kısıtlı çalışmalar parabenlerin kanserle direkt ilişkisini açık şekilde göstermediyse de, eldeki bulgular bu kimyasallara temkinli yaklaşılmasını ve daha kapsamlı detaylı yeni araştırmaların yapılması gerektiğini işaret etmektedir.

Cilt emiliminden sonra parabenler, paraben ve metabolitleri olarak idrar ile atılır [57]. Parabenler vücuttan hızla atılsa da, bu maddelerin varlığı su içeren ekosistemlerde (göl, dere) [58, 59], kanalizasyon sularında, günlük ve tarımda kullanılan sularda tespit edilmiştir. Bu şekilde, vücudumuzdan attığımızı

düşündüğümüz kimyasallar yine çevresel etkenlerle geri dönebilmekte, sürekli bir döngü içinde bizi etkileyebilmektedirler [60].

Gelecekte yapılacak çalışmalar, parabenlerin hormonal açıdan hassas dokularda ne oranlarda biriktiğine ve gösterdikleri östrojenik aktivitenin östrojen kaynaklı genel çevre problemlerine (örnek: suda yaşayan organizmalarda üreme ve gelişim bozuklukları gibi) ne oranda katkıda buldukları konularına yoğunlaşmalıdır.

2009 yılında Danimarka Çevre Koruma Ajansı, 2 yaşındaki çocukların endokrin bozucu maddelere maruz kalması hakkında yaptıkları detaylı çalışmada losyon ve güneş koruyucu ürünlerin içinde bulunan propil ve butilparabenlerin küçük çocukların gelişimini tehdit edebileceği sonucuna vardı. Küçük yaştaki çocuklar ve yeni doğan dönemi, organizmanın endokrin bozucu kimyasallara karşı en savunmasız olduğu dönemlerdendir. Bu gelişim sürecinde bu tür kimyasallara maruz kalınması durumunda çocukların organ gelişimi ve özellikle üreme ve bağışıklık (immün) sistemi üzerindeki uzun dönemli etkileri henüz bilinmemektedir. Bu nedenle Danimarka, özellikle propil- ve butilparabenin bebek ve 3 yaş altı çocuklar için üretilen kozmetik ürünlerinde kullanılmasını 15 Mart 2011 tarihinden itibaren yasaklamıştır. Danimarka, Avrupa Komisyonunda benzer bir yasağı başlatmayı ve üye ülkelerin bu yasağı desteklemesini şiddetle tavsiye etmektedir. Bunun yanı sıra Fransa parabenlerin kozmetik ürünlerde kullanımının yasaklanması için çalışmalar yapmaktadır.

Her ne kadar şu anda parabenler hakkında Amerika'da bir yasağın olmasına da, belli başlı üreticiler müşterilerin yoğun talepleri doğrultusunda parabenlerden uzaklaşmaya ve parabensiz koruyucular kullanmaya yönelmektedirler. Uluslararası sertifikalandırma kuruluşları ECOCERT ve CosmeBio, kozmetiklerde paraben kullanılması durumunda organik ürün sertifikası vermemektedir.

Aubert ve ark. [61]'nin Sprague-Dawley sıçanları ile yaptıkları çalışma sonucunda metil, propil ve bütül parabenin memeli organizmalar üzerinde zararlı bir etki verecek oranda plazmada birikmediği, emilimlerinin çok iyi olduğu ve tamamen zararsız küçük metabolitlere parçalandıkları sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında, parabenlerin genotoksik etki göstermemesinin nedenlerinden birinin de yukarıdaki çalışmada belirtildiği gibi uyguladığımız parabenlerin *C.elegans*'ın sindirim sistemi tarafından kolayca emilimlerinin gerçekleştirilip zararsız küçük metabolitlere parçalanmaları ve organizmadan biriktirilmeden dışarı atılmaları olduğunu düşünmekteyiz.

Ayar ve Uysal [62] tarafından yapılan çalışmada bazı parabenlerin genotoksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* şartlarda kısa süreli test teknikleri ile araştırılmıştır. *In vivo* çalışma sonunda kullanılan tüm parabenlerin genotoksik etki göstermediği ancak toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmanın *in vitro* bölümünde ise çalışılan tüm parabenlerin kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansını artırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı sonucuna varılmıştır. Buna karşılık bütülparaben ve propilparabenin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği, bunun da istatistiksel olarak önemli olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmayla gıda ilaç ve kozmetik sanayiinde sıkça kullanılan koruyucu katkı maddelerinden parabenlerin belirtilen dozlarda kullanıldığında, genotoksik etki göstermediği ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebileceği belirlenmiştir. Her ne kadar parabenlerin östrojenik etkisi östrojenin binde biri ile 10 milyonda biri ve cilt tarafından en çok emildiği gösterilen metilparabenin etkinliği doğal östrojen etkinliğinin 2 milyon 500 binde biri kadar olarak gösterilse de, günde en az 8 değişik çeşit kozmetik ürünle direkt ve ek olarak çevresel etkenlerle dolaylı olarak kişilerin bu tür kimyasallara çoğalarak artan bir etkileşimle maruz kalabilecekleri olasılığı dikkate alınmalıdır. Özetle

bütün bu bilgiler, parabenler konusuna her kimyasalda olduğu gibi ihtiyat ile yaklaşmayı ve en son bilimsel çalışmalar ışığında karar vermemiz gerektiğini göstermektedir.

Teşekkür

Yazarlar çalışma sürecindeki tüm yardımlarından dolayı Uzman Vet. Hekim Dr. Necati ÖZPINAR'a teşekkürlerini sunarlar. Bu çalışma CÜBAP F-414 nolu Yüksek Lisans Projesi desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Çağlar A.B. ve S Seçil (2014). Kozmetolojide Toksikite Sorunu Turk J Dermatol 4, 248-51.
2. Andersen F.A. (2008). Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. International Journal of Toxicology, 27,1-82
3. ei G.U. (2009). Toxicity and estrogen effects of mthy paraben on *Drophosila melanogaster*. Food Science , 30 (1), 252-254.
4. Sox T.E. (1997). Mechanisms of action of cosmetic preservatives. In: Braman, D.K (Ed.), Cosmetic Microbiology: A Proactical Handbook. CRC Press LLC,Boca Roton, pp. 163-167.
5. Nguyen T., Clare B., Gvo W. and Martinac B. (2005). The effects of parabens on the mechano sensitive channels of *E. coli*. Eurpean Biophysical Journal. 34, 389-395.
6. Freese E., Shev C.W. and Galliers E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, 241, 321-325.
7. Byford J.R., Shaw L.E., Drew M.G.B., Pope G.S., Saver M.J. and Darbre P.D. (2002). Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. The Journal of Steroid biochemistry and Molecular Biology, 80, 49-60.
8. Darbre P.D., and Harvey P.W. (2008). 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, 28, 561-578.
9. Martin J.M., Peropadre A., Herrero O., Freire P.F., Labrador V. and Hazen M.J. (2010). Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparabenin mammalian cells. Mutation Research, 702, 86-91.
10. Xiayun Y., Amber M.B., John A.R., Larry L.N. and Antonia M.C. (2006). Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. Environmental Health Perspectives, 114 (12), 1843-1846.
11. Leung K., Johannsson G., Leong G.M. and Ho K.K.Y. (2004). Estrogen regulation of growth hormone action. Endocrine Reviews,25, 693-721.
12. Kahlert S., Neudling S., van Eickels M., Vetter H., Meyer R. and Grohe C. (2000). Estrogen receptor rapidly actiates the IG-1 receptor pathway. Journal of Biological Chemistry, 275, 1847-1843.
13. Lemini C., Silva G., Timessi C., Lague D., Valverse A., Gonzalez-Martinez M., Hernández A., Rubio-Póo C., Chavez Lara B. and Valenzuela F. (1997). Estrogenic effects of p-hydroxybenzoic acid in CD1 mice. Environmental Research, 75, 130-134.
14. Routledge E.J., Parker J., Odum J., Ashby J. and Sumpter J. (1998). Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. Toxicology and Applied Pharmacology, 153, 12-19.
15. Kawaguchi M., Morohoski K., Masuda J., Watanabe G., Morita M., Imai H., Taya K. and Himi T. (2009). Maternal isobutyl-paraben exposure decreases the plasma corticosterone level in dams and sensitivity to estrogen in famele offspring rats. Journal of Veterinary Medical science, 71 (8), 1027-1033.
16. Lemini C., Hernandez A., Jaimez R., Franco Y., Avila M.E. and Castell A.(2004). Morphometric analysis of mice uteri treated with the presarvatives methyl, ethyl, propyl and buthylparaben. Toxicology and Industrial Health, 20 123-132.
17. Darbre P.D., Byford J. R., Shaw L. E., Hall S., Coldham N.G., Pope G. S. and Saver M. J. (2003). Oestrogenic activity of benzylparaben. Journal of Applied Toxicology, 23, 43-51.
18. Darbre P.D., Byford J.R., Shaw L.E., Horton R.A., Pope G.S. and Saver M.J. (2002).Oestrogenic activityof isobutylparaben *in vitro* and *in vivo*.Journal of Applied Toxicology, 22, 219-226.

19. Pedersen K.L., Pederson S.N., Christiansen L.B., Korsgaard M. and Bjerregaard P. (2000). The preservatives ethyl-, propyl- and buthylparaben are oestrogenic in an *in vivo* fish assay. *Pharmacology & toxicology*, 86,110-113.
20. Shaw J. and De Catanzaro D. (2009). Estrogenicity of parabens revisited: impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. *Reproductive Toxicology*, 28, 26-31.
21. Van Meewen J.A., Van Son O., Piersma A. H., de Jong P.C. and Van Den Berg M. (2008). Aromatase Inhibiting and combined etrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230,372-38219.
22. Vo T.T. and Jeung E.B. (2009). An evaluation of astrogenic activity of parabens using uterine calbindin-D9k gene in an immature rat model. *Toxicological Science*, 112 (1), 68-77.
23. Vo T.T., Yoo Y.M., Choi K.C. and Jeung E.B. (2010). Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rant model. *Reproductive Toxicology*, 29 (3), 306-316.
24. Witorsch R.J. and Thomas J.A. (2010). Personal care products and endocrine disprution: a critical review of the literatüre. *Critical Reviews in Toxicology*, 40 (3), 1-30.
25. Scialli A.R. (2011). Reproductive effects of the parabens. *Reproductive Toxicology*, 32, 138-140.
26. Oishi S. (2001). Effect of butylparaben on the malereproduvtive system in rats . *Toxicology and Industrial Health*, 17, 31-39.
27. Oishi S. (2002). Effects of propylparaben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1807-1813.
28. Hoberman A.M., Schrevr D.K., Leazer T., Daston G.P., Carthew P., Re T., Laretz L. and Mann P. (2008). Lack of effcet of butylparaben and metyhlparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Research Part B: Devolopmental and Reproductive Toxicology*, 83 (2), 123-133.
29. Hertweck M., Hoppe T., Baumeister R. (2003). *C. elegans*, a model for agind with high-troughput capacity. *Exp. Gerontol*. 38 (3): 345-346.
30. Sutphin G.L., Kaeberlein M. (2009). Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media, JJOVE. 27. <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1152>, doi: 10.3791/1152.
31. Koelle M. (2005). Quantitation of constitutive egg-laying Ref: (http://www.wormbook.org/chapters/www_behavior/behavior.html#sec9). Yale University, New Haven, CT, USA.
32. Soni M.G., Burdock G.A., Tsylor S.L. ve Greenberg N.A. (2001). Safety assessment of propylparaben: a review of the published literarture. *Food and Chemical Toxicolgy*, 39, 513-532.
33. de Carvallho C.M., Menezes P.F.C, Letenski G.C., Praes C.E.O., Feferman I.H.S. ve Lorencini M. (2012). İnVitroinduction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic presarvative: application of flow cytometry as a comlementary analysis by NRU. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 176-182.
34. Elder R.R.L (1984). Final report on the safety assessment of metilparaben, etilparaben, propilaraben and butilparaben. *Journal of the American College of Toxicology*, 3, 147-209.
35. Woodruff T.J., Zota A.R., Schwartz J.M. (2011). Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 119:878-885.
36. Pedersen S., Marra F., Nicoli S., Santi P. (2007). In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci.*, 29:361-367.
37. Sandanger T.M., Huber S., Moe M.K., Braathen T., Leknes H., Lund E. (2011). Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, 21:595-600.
38. Calafat A. M., Ye X., Wong L. Y., Bishop A. M., Needham L. L. (2011). Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect*, 118, 679-685.
39. Schnuch A., Geier J., Uter W., Frosch P. J. (1998). Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. *Br J Dermatol*, 138:467-476.
40. Marks J. G., Belsito D. V., DeLeo V. A., Fowler J. F., Jr., Fransway A. F., Maibach H. I., Mathias C. G, Nethercott J.R, Rietschel R.L., Sherertz E.F., Storrs F.J., Taylor J.S. (1998). North American Contact Dermatitis Group patch test results for the detection of delayed-type hypersensitivity to topical allergens. *J Am Acad Dermatol*, 38, 911-918.

41. Dastychova E., Necas M., Vasku V. (2008). Contact hypersensitivity to selected excipients of dermatological topical preparations and cosmetics in patients with chronic eczema. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 17, 61-68.
42. Sanchez-Perez J., Diez M.B., Perez A.A., Jimenez Y.D., Diez G. (2006). Allergic and systemic contact dermatitis to metilparaben. *Contact Dermatitis*, 54, 117-118.
43. Mowad C.M. (2000). Allergic contact dermatitis caused by parabens: 2 case reports and a review. *Am J Contact Dermat*, 11, 53-56.
44. Simpson J.R. (1978). Dermatitis due to parabens in cosmetic creams. *Contact Dermatitis*, 5, 311-312.
45. Fisher A.A. (1979). Paraben dermatitis due to a new medicated bandage: the 'paraben paradox. *Contact Dermatitis*, 5, 273-274.
46. Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Kano I. (2001). ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem Toxicol*, 39, 1225-1232.
47. Boberg J., Taxvig C., Christiansen S., Hass U. (2010). Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol*, 30, 301-312.
48. Kang K.S., Cho S.D., Lee Y.S. (2002). Additive estrogenic activities of the binary mixtures of four estrogenic chemicals in recombinant yeast expressing human estrogen receptor. *J Vet Sci*, 3, 1-5.
49. Kawaguchi M., Morohoshi K., Imai H., Morita M., Kato N., Himi T. (2010). Maternal exposure to isobutil-paraben impairs social recognition in adult female rats. *Exp Anim*, 59, 631-635.
50. Kawaguchi M., Irie K., Morohoshi K., Watanabe G., Taya K., Morita M., Kondo Y., Imai H., Himi T. (2009). Maternal isobutil-paraben exposure alters anxiety and passive avoidance test performance in adult male rats. *Neurosci Res*, 65, 136-140.
51. Meeker J.D., Yang T., Ye X., Calafat A.M., Hauser R. (2011). Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect*, 119, 252-257.
52. Park C.J., Nah W.H., Lee J.E., Oh Y.S., Gye M.C. (2011). Butil paraben-induced changes in DNA metilation in rat epididymal spermatozoa. *Andrologia*.
53. Darbre P.D., Aljarrah A., Miller W.R., Coldham N.G., Sauer M.J., Pope G.S. (2004). Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*, 24, 5-13.
54. Barr L., Metaxas G., Harbach C.A., Savoy L.A., Darbre P.D. (2012). Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J. Appl. Toxicol*.
55. Pugazhendhi D., Sadler A.J., Darbre P.D. (2007). Comparison of the global gene expression profiles produced by metilparaben, n-butilparaben and 17beta-oestradiol in MCF7 human breast cancer cells. *J. Appl. Toxicol.*, 27, 67-77.
56. Witorsch R.J., Thomas J.A. (2010). Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Crit Rev Toxicol.*, 40 Suppl 3, 1-30.
57. Janjua N.R., Frederiksen H., Skakkebaek N.E., Wulf H.C., Andersson A.M. (2008). Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int. J. Androl.*, 31, 118-130.
58. Yamamoto H., Tamura I., Hirata Y., Kato J., Kagota K., Katsuki S., Yamamoto A., Kagami Y., Tatarazako N. (2011). Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Sci. Total Environ.*, 410-411, 102-111.
59. Brausch J.M., Rand G.M. (2012). A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82, 1518-1532.
60. Bedoux G., Roig B., Thomas O., Dupont V., Le Bot B. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int*.
61. Aubert N., Ameller T. and Legrant, I.J. (2012). Systemic exposure to paraben: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-propyl-and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (3-4), 445-454.
62. Ayar A., Uysal H. (2013). Genotoxic and safety assessment of 2 parabens in somatic cells of *in vivo Drosophila melanogaster*. *Turk. J. Biol.* 37, 683-688.