BRONZLAŞTIRICI AJAN DİHİDROKSİASETONUN OLASI SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI DERİ FİBROBLASTLARINDA İNCELENMESİ

Ayşe Mine SAYGIN KAYA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRONZLAŞTIRICI AJAN DİHİDROKSİASETONUN OLASI SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI DERİ FİBROBLASTLARINDA İNCELENMESİ

Ayşe Mine SAYGIN KAYA
0000-0003-4694-7542

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
0000-0002-3595-6286
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BRONZLAŞTIRICI AJAN DİHİDROKSİ ASETONUN OLASI SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SAĞLIKLI DERİ FİBROBLASTLARINDA İNCELENMESİ

Ayşe Mine SAYGIN KAYA

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Kozmetikler, insanlar tarafından çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Eski dönemlerde farklı bitki bölümleri gibi doğal malzemelerden elde edilen ürünler, teknolojinin de gelişmesi ile birlikte çok çeşitli hale gelmiştir. Bu çeşitlilik beraberinde doğallıktan uzaklaşmayı ve uzun vadede doğabilecek sorunları öngörebilmekte zorlanmayı getirmiştir. Günlük hayatımızda sıklıkla kullandığımız her ürünün, çağımızın en önemli sağlık problemlerinden biri olan kansere neden olabilecek potansiyele sahip olabileceği düşünülmelidir. Bu alanda yapılan çalışmalar ışığında ürünlerin sağlık açısından güvenli hale getirilebilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kozmetik amaçlı kullanılan bronzlaştırıcı ürünlerin içeriğinde bulunan dihidroksiasetonun L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaç edinilmiştir. Bu amaca istinaden, dihidroksiasetonun sitotoksik etkileri XTT testi ile klonojenik test uygulanarak, genotoksik etkileri ise komet testi ve annexin-V testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Bu testlere ek olarak dihidroksiasetonun sebep olabileceği hücre içi reaktif oksijen türevlerinin seviyesindeki değişiklik ROS testi kullanılarak ölçülmüştür. Sitotoksisite testleri, dihidroksiasetonun konsantrasyona bağlı olarak L929 hücre hattında canlılık oranlarında azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. Komet testinde dihidroksiasetonun dozlarına bağlı olarak kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artışlar saptanmıştır. ROS ölçümünde de uygulanan dihidroksiaseton dozlarına göre hücre içi ROS artışı olduğu görülmüştür. L929 hücre hattında Annexin-V testi sonucunda apoptotik potansiyelin doz artışına bağlı olarak, anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dihidroksiaseton (DHA), sitotoksisite, genotoksisite, anti-kanser, L929, Annexin V, Klonojenik testi, Komet testi, ROS testi, XTT testi
2022, ix + 65 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

THE INVESTIGATION OF THE POTENTIAL CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE TANNING AGENT DIHYDROXYACETONE ON HEALTHY SKIN FIBROBLASTS

Ayşe Mine SAYGIN KAYA

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Cosmetics have been used by people for many years. In ancient times, products obtained from natural materials such as different plant parts have become very diverse with the development of technology. This diversity has brought with it a move away from naturalness and difficulty in foreseeing the problems that may arise in the long run. It should be considered that every product that we use frequently in our daily life may have the potential to cause cancer, one of the most important health problems of our age, and in the light of studies in this field, products should be made safe for health. In this study, it was aimed to determine the in vitro cytotoxic and genotoxic effects of dihydroxyacetone, which is in the content of tanning products used for cosmetic purposes, on the L929 mouse fibroblast cell line. For this purpose, the cytotoxic effects of dihydroxyacetone were evaluated using the XTT test and clonogenic test, and the genotoxic effects were evaluated by applying the comet test and annexin-V test. In addition to these tests, the change in the level of intracellular reactive oxygen derivatives that may be caused by dihydroxyacetone was measured using the ROS test. Cytotoxicity tests show that dihydroxyacetone causes a decrease in viability in the L929 cell line depending on the concentration. Tail length, tail % DNA and olive tail moment parameters were evaluated depending on the doses of dihydroxyacetone in the comet test, and significant increases were found when compared to the control group. In the measurement of ROS, it was observed that there was an increase in intracellular ROS compared to the doses of dihydroxyacetone applied. As a result of the Annexin-V test in the L929 cell line, it was observed that the apoptotic potential increased significantly depending on the dose increase.

Key words: Dihydroxyacetone (DHA), cytotoxicty, genotoxicity, , Anticancer, L929, Annexin-V assay, Clonogenic assay, ROS assay, XTT assay
2022, ix + 65 pages.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde, bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgisini, bilgisini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum, danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ'a,

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Özgür Vatan'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana her türlü konuda destek ve yardımcı olmanın yanısıra, çıktığım bu yolda yalnız hissetmememdeki en büyük etken olan sevgili arkadaşım Uzman Biyolog Zehra Nur Düzen'e ve her zaman yardımıma koşan değerli arkadaşım Harun Serinçay'a,

Beni korkmadan risk alabilecek, hatalarını düzeltebilecek gücü ve cesareti kendinde bulabilecek bir birey olarak yetiştiren, evlatları olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum sevgili annem, babam; kardeşi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum sevgili ablama, bu süreci en güzel şekilde yönetebilmem adına hiçbir destek ve yardımdan kaçınmayan, kendime inanmamı sağlayan hayat arkadaşı olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum sevgili eşim Burak Kaya'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

AYŞE MİNE SAYGIN KAYA
31/08/22

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... İ
ABSTRACT ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... Vİ
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... Vİİİ
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... İX
1.GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kozmetik Nedir? 3
2.2. Kozmetiklerin Sınıflandırılması 3
2.3. Kozmetiklerin İnsan Sağlığına Etkileri 4
2.4. Kozmetiklerde Kullanılan Toksik Maddeler 6
2.4.1. Fitalatlar 7
2.4.2. Triklosan 9
2.4.3. 1,4-Dioksan 10
2.4.4. Parabenler 12
2.4.5. Ağır Metaller 14
2.4.6. Nanoteknoloji Ürünleri 20
2.5. Oto-Bronzlaştırıcılar 22
2.5.1 Oto-Bronzlaştırıcı Çeşitleri 24
2.5.1.1 Bronzlaştırıcı Pudra, Sprey, Stick Ve Mendiller 24
2.5.1.2 Bronzlaştırıcı Tablet, Kapsül Ve Enjeksiyonlar 24
2.5.2 Oto-Bronzlaştırıcı İçerikleri Ve Bilinen Zararlı Etkileri 25
2.6 Dihidroksiaseton (Dha) 26
2.6.1 Maillard Reaksiyonu 27
3.MATERYAL VE YÖNTEM 31
3.1 Kullanılan Ekipman Ve Sarf Malzemeler 31
3.2 Kullanılan Hücre Hattı 33
3.2.1 Hücre Hattının Pasajlanması 33
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması 33
3.3.1 Besiyerinin Hazırlanması 33
3.3.2 Hidrojenperoksit (H2o2) Hazırlanması 34
3.4 Kullanılan Madde 34
3.5 Xtt Testi 35
3.5.1 Xtt Test Protokolü 35
3.6 Klonojenik Test 36
3.6.1 Klonojenik Test Protokolü 36
3.7 Komet Testi 37
3.7.1 Komet Test Protokolü 37
3.8 Ros Testi 38
3.8.1 Ros Testi Protokolü 39

3.9 Annexin-V Testi 39
3.9.1 Annexin-V Test Protokolü 40
4. BULGULAR 41
4.1 Xtt Testi Bulguları 41
4.2 Klonojenik Test Bulguları 41
4.3 Komet Testi Bulguları 42
4.3.1 Kuyruk Uzunluğu Bulguları 42
4.3.2 Kuyruk % Dna Bulguları 43
4.3.3 Olive Kuyruk Momenti Bulguları 44
4.4 Ros Testi Bulguları 45
4.5 Annexin-V Testi Bulguları 48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 50
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ 65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
^{0}C	Celcius
cm^2	Santimetrekare
cm^2	Santimetrekare
cm^3	Santimetreküp
gr	Gram
kg	Kilogram
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
V	Volt
µg	Mikrogram

Kısaltmalar	Açıklama
A375P	İnsan Deri Kanseri Hücre Hattı
AB	Avrupa Birliği
AGEs	İleri Glikasyon Ürünleri
AKD	Alerjik Kozmetik Dermatit
As	Arsenik
B4GI2	İnsan Korneal Endotel Hücre Hattı
BBP	Benzilbütilfitalat
BK	Büyüme Kontrol
C	Karbon
CANSA	Cancer Association of South Africa
Cd	Kadmiyum
Cl	Klor
Co	Kobalt
CO_2	Karbokdioksit
Cr	Krom
Cu	Bakır
DBP	Dibütilfitalat
DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DCF-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DCFH	Dichlorodihydrofluorescin
DEP	Dietilfitalat
DHA	Dihidroksiaseton

5-MOP	5-methoxypsoralen
DMP	Dimetilfitalat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ENR	Enol Açil Taşıyıcı Protein Redüktaz
EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Demir
H	Hidrojen
H_2O_2	Hidrojenperoksit
HaCaT	Keratinosit Hücre Hattı
HEK293T	Embriyonik Böbrek Hücre Hattı
Hg	Cıva
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
LMA	Low Melting Agarose
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MN	Mikronükleus
NEAA	Nonesansiyel Aminoasit
Ni	Nikel
O	Oksijen
OTM	Olive Kuyruk Momenti
Pb	Kurşun
PBS	Phosphate Buffered Saline
PK	Pozitif Kontrol
PVC	Poli Vinil Klorür
RFU	Relative Fluorescence Units
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
TiO_2	Titanyumdioksit
UV	Ultraviyole
UVA	Ultraviyole A
UVB	Ultraviyole B
ZnO	Çinkooksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Fitalatların kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.2.	Triklosanın moleküler yapısının şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.3.	1,4-dioksanın moleküler yapısının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.4.	Paraben ve klorlu türevlerinin moleküler yapısının şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.5.	Ağır metallerin doğada yayılma yolları.....	20
Şekil 2.6.	Nano ilişkili ürün patentine sahip ilk 10 firma.....	21
Şekil 2.7.	Ciltte maillard reaksiyonu.....	27
Şekil 2.8.	Maillard reaksiyonu ürünleri.....	28
Şekil 2.9.	DHA gen regülasyon şeması.....	30
Şekil 3.1.	DHA nın kimyasal yapısının şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.1.	L929 hücre hattında uygulanan dozlar sonucu bulunan IC50 değeri.....	41
Şekil 4.2.	Farklı DHA dozları ile muamele edilen L929 hücrelerinde klonojenik test ile saptanan canlılık oranları.....	42
Şekil 4.3.	Komet testi ile belirlenen kuyruk uzunlukları.....	43
Şekil 4.4.	Komet testi ile belirlenen kuyruk % DNA bulguları.....	44
Şekil 4.5.	Komet testi ile belirlenen OTM bulguları.....	45
Şekil 4.6.	6.saat Ros ölçümü bulguları.....	46
Şekil 4.7.	12.saat Ros ölçümü bulguları.....	47
Şekil 4.8.	24.saat Ros ölçümü bulguları.....	47
Şekil 4.9.	Annexin-V bulguları.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	Kozmetiklerin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2.	Tüketiciler tarafından istenmeyen reaksiyona neden olduğu bildirilen kozmetikler.....	6
Çizelge 2.3.	ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) (2003) ‘e göre karsinojenler.....	11
Çizelge 2.4.	Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı’na (IARC) (2004)’e göre karsinojenler.....	12
Çizelge 2.5.	Saç boyalarında tespit edilen Pb ve Cd miktarları.....	17
Çizelge 2.6.	Ojelerde tespit edilen Pb ve Cd miktarları.....	17
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan ekipman ve sarf.....	31
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	32
Çizelge 3.3.	DHA’nın kimyasal kimliği.....	34

1.GİRİŞ

İnsanlardaki güzellik algısının bir getirisi olan ve uzun yıllar öncesinden beri sağlıklı görünümü de desteklediği düşülen bronz tene olan ilgi bireylerin güneş ışınlarına gereğinden fazla miktarda maruz kalmalarına ve hatta solaryum gibi doğal olmayan bronzlaşma yöntemlerini tercih etmelerine neden olmuştur.

Bronz ten isteğinin ve sahip olunan bronzluğu sürdürmenin alkol, sigara bağımlılığına benzer bağımlılık düzeylerine gelebildiğini ve ultraviyole (UV) ışınlarının bu davranışı pekiştirici bir uyaran olabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Sheehan ve Lesher 2005). Özellikle gençlik dönemlerinde brozlaşan bireylerde bu eylemin süreklilik gösterebildiği anlaşılmıştır (Curtis ve ark. 2006). Bronzluk sağlayabilmek için güneşlenme, solaryum gibi farklı yöntemler ile ışık almak zararlı miktarlarda UV maruziyetine yol açmaktadır. Aslında ciltte meydana gelen bronzlaşma, güneş ışınlarına maruz kalındığında fizyolojik olarak oluşan bir cevaptır (Jux ve ark 2011).

UV ışınları dalga boylarına göre iki tiptir, 320-400 nm aralığında olan uzun dalgalara UVA, 280-320 nm aralığında olan kısa dalgalara UVB adı verilmektedir. Bu ışınlar cildin derinliklerine ulaşabilmektedir. ROS oluşumu, DNA hasarları, melanomlar gibi ciddi sorunlara yol açmalarının yanında cilt yaşlanmasını da hızlandırmaktadırlar (Wang ve ark. 2019). Özellikle ciddi melanomlar başta olmak üzere yapılan birçok çalışma UV ışınlarının zararlarını vurgulamaktadır. Sonuç olarak UV ışınlarına maruz kalmadan bronzlaşma fikri uzun yıllardır insanların ilgisini çekmektedir. Bu sebeple kozmetik bronzlaştırıcılar kullanılmaya başlanmıştır. Bronzan olarak kullanılan kozmetik ürünlerin içerikleri değişkenlik göstermektedir ancak en sık rastlanan ana bileşik dihidroksiasetondur. Bu bileşik, cilde uygulandıktan sonra aminoasit ve proteinler ile etkileşimi sonucu, ciltte renk değişiklikleri meydana getiren melanin pigmenti gibi davranan melanoidinlerin oluşmasını sağlamaktadır (Amano ve ark. 2020). Bireysel kullanım amacıyla piyasaya sürülen birçok kozmetik ürününde olduğu gibi mevcut içeriklerin araştırılması sağlık açısından bir zorunluluk haline gelmiştir. Hafif alerjik reaksiyonlardan kanser gibi ciddi sağlık

sorunlarına kadar ortaya çıkabilecek her türden olumsuz etkinin kaynağını saptamak ve kullanılan ürünleri güvenli hale getirebilmekte bilimsel çalışmalar en etkili yoldur. Bu tez çalışmasının amacı, insanların kolayca ulaşabildiği ve sıklıkla kullandığı bronzan ürünlerin ana bileşiği olan dihidroksiasetonun sitotoksik ve genotoksik etkilerini deneysel yöntemler kullanarak araştırmaktır. Amaca yönelik olarak, L929 fare fibroblast hücre hattında dihidroksiasetonun sitotoksik etkileri XTT testi ile klonojenik test, genotoksik etkileri ise komet testi ile ararştırılmıştır. Hücre ölüm mekanizmalarının saptanması amacı ile annexin-V testi uygulanmıştır. Dihidroksiasetonun hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumlarındaki etkisi ROS ölçümü ile araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kozmetik Nedir?

Yunanca kos ve metikos kelimelerinden kökenlenmiş olan bu kavram ‘‘süslenme ustası’’ manasını taşımaktadır (Çomoğlu 2012). Amerikan gıda, ilaç ve kozmetik kanununda kozmetik kelimesi; dökülmek, serpilmek, ovulmak veya başka herhangi bir şekilde uygulanarak vücudun herhangi bir kısmının temizlenmesi, güzelleştirilmesi, cazibesinin arttırılması veya görünüşünün değiştirilmesi amacıyla kullanılan preparatlar ve bunların hazırlanması için kullanılan maddeler olarak tanımlanmıştır (Millikan 2001).

23.05.2005 tarihli ve 5324 sayılı Kozmetik Kanununa göre; “Kozmetik ürün; insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış tek ve temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan bütün preparatlar veya maddeler’’ olarak tanımlanmıştır (Anonim 2005).

2.2. Kozmetiklerin Sınıflandırılması

Kozmetikler etki alanlarına ve uygulanma biçimlerine göre sınıflandırılmıştır. Uygulanma biçimlerine göre sınıflandırılmaları deri, saç diş ya da ağıza uygulanmalarına ek olarak toz halde ya da pigment halde preparatlar ile diğer preparatlar olmalarına göre yapılmıştır.

Etki alanlarına göre sınıflandırmada ele alınan esaslar tabaka oluşturup oluşturmamaları, sebatrop etkiye sahip olmaları, direkt ya da indirekt dermatrop olmaları ve keratin içermeleridir. Bu sınıflandırma Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kozmetiklerin sınıflandırılması (Sarı 2021)

1-Uygulanış yerine göre kozmetik ürünler				
Deri	**Saç preperatları**	**Diş ve ağız**	**Tozlar ve pigmentli**	**Diğer kozmetikler**
Yumuşak kremler	Şekil veren	Diş patları	Yüz pudraları	Ayak ürünleri
Yumuşak losyonlar	Düzleştiren	Diş temizliği	Allık	Bebek ürünleri
Temizleyici kremler	Şampuanlar	Ağız suları	Dudak boyaları	Banyo ürünleri
Temizleyici losyonlar	Saç boyaları		Tırnak cilaları	Vücut pudraları
El krem ve losyonları	Renk açan		Göze uygulanan	Depilatuvarlar
Temel kremler	Parlaklık veren			
Günlük kremler	Şekil koruyucu			
Hormon kremleri	Besleyici			
Sterat kremler	Saç tokaları			
Yüz maskeleri				
Cildin rengini açan/ lekeleri gideren preparatlar				
Güneş ışınlarına karşı koruyucu /bronzlaşmayı sağlayıcı preparatlar				
Ter önleyici				
Ter kokularını önleyen preparatlar				
Tıraş preparatları				
2- Temel etki alanlarına göre kozmetikler				
Tabaka oluşturan maddeler				
Keratinli maddeler				
Sebatrop maddeler				
İndirektdermatrop maddeler				
Direkt dermatrop maddeler				

2.3. Kozmetiklerin İnsan Sağlığına Etkileri

Kozmetoloji, kozmetik kaygıların yaygınlaşması ile beraber, kullanılan ve geliştirilen her nevi kozmetik ürünün sağlık açısından incelenmesi, fayda ve zararlarının belirlenmesi adına yapılan çalışmaları içeren bilim dalıdır (Uzel 2011).

Kozmetik ürünleri, bakım ve güzelliğin yanı sıra cildi olumsuz dış etkenlere ve yaşlanmaya karşı koruma sağlama amaçlı da kullanılmaktadır. Tüm bu ürün kullanımlarının temelinde ise güzellik arayışı bulunmaktadır.

Güzellik arayışı insanlık tarihi boyunca toplumların vazgeçilmezi olmuştur. Bu nedenle bitkisel ve kimyasal içerikli çok sayıda kozmetik kullanılmaktadır. Kozmetik ürünlerde kullanılan kimyasal maddelerin olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır (Çağlar ve Saral 2014).

Kozmetiklere bağlı olarak hafif reaksiyon gelişen birçok hasta kullandığı ürünü değiştirerek ya da kullanımına ara vererek doktora gitmemektedir. Ancak çok belirgin bir rahatsızlığın ortaya çıktığı durumlarda doktora başvurmaktadır. Bu yüzden kozmetiklere bağlı dermatitlerin sıklığını belirlemek zordur (Utaş 2013). Rhiel melanozisi olarak bilinen hastalığın asıl kaynağının kozmetikler olduğu belirtilmektedir. Kozmetik içeriklerindeki koku molekülleri veya farklı bileşenleri ile teması sonucunda hiperpigmentasyon oluşumu ile saptanan bir alerjik dermatit çeşididir (Daadaa ve Tanfous 2020).

Kozmetiklere bağlı istenmeyen etkiler şu şekilde sınıflandırılabilir (Rietschel ve Fowler 2008);

- Objektif veya subjektif irritasyon
- Kontakt allerji
- Fotosensitivite
- Kontakt ürtiker
- Akne/follikülit
- Deri ve eklerinde renk değişikliği
- Diğer lokal yan etkiler
- Sistemik yan etkiler

Farklı kozmetiklerin sebep olduğu çeşitli yan etkiler Çizelge 2.2’ de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tüketiciler tarafından istenmeyen reaksiyona neden olduğu bildirilen kozmetikler (Rietschel ve Fowler 2008)

Banyo sabun ve deterjanları	Sıklıkla irritasyon
Deodorant ve antiperspiranlar	Sıklıkla irritasyon, nadiren alerjik kozmetik dermatit (AKD)
Göz farları	Sıklıkla irritasyon
Saç boyaları	AKD
Maskara	Sıklıkla irritasyon
Nemlendiriciler	İrritasyon ve AKD
Perma solüsyonları	İrritasyon ve AKD
Şampuanlar	Sıklıkla irritasyon

Kozmetiklere bağlı alerjik reaksiyonların % 50'si yüzde gerçekleşir ve bu olguların %79'u kadındır (Rietschel ve Fowler 2008). Pafümlerde ve kokulu kozmetiklerde bulunan kokulara karşı AKD, fotosensitivite, kontakt ürtiker, pigmente kontakt dermatit ve solunum problemlerinde kötüleşme gibi yan etkiler bildirilmiştir (Utaş 2013).

Ağır metaller, saç boyaları, renk açıcılar, pudralar, nanoteknoloji ürünleri ve paraben son yıllarda en fazla üzerinde durulan maddeler olmuştur. Kozmetiklerde kullanılan tüm bu kimyasallar kanser, infertilite ya da doğum defektlerine kadar pek çok patolojinin etiyolojisinde etkindirler (Çağlar ve Saral 2014).

2.4. Kozmetiklerde Kullanılan Toksik Maddeler

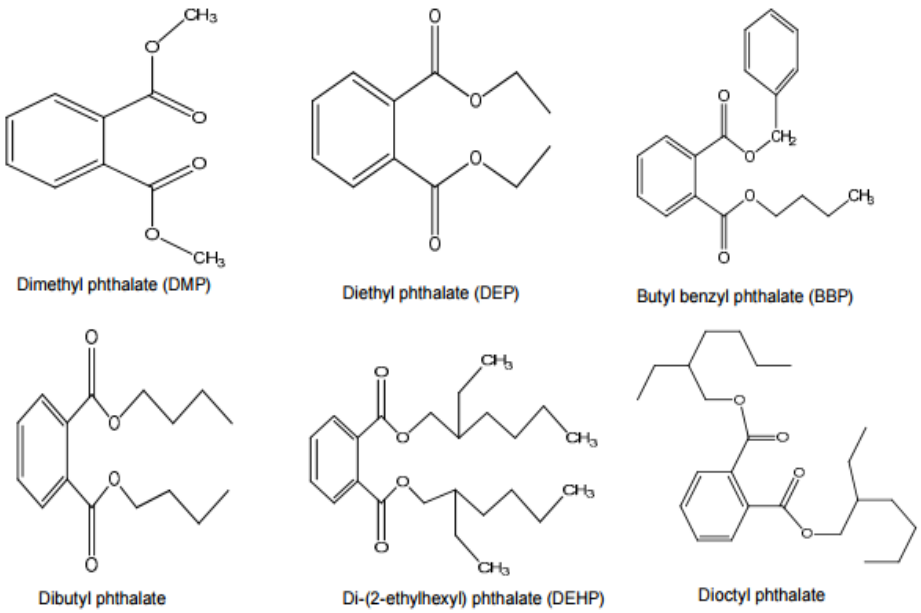
Biyolojik sistemde ksenobiyotiklerin neden olduğu tüm olumsuz etkilere ve zarar verme kapasitelerine toksisite denilmektedir. Bu zararlara sebep olan maddeler ise toksik madde olarak adlandırılır. Kozmetik maddelerin toksisite düzeylerinin değerlendirilmesinde bu maddelere maruziyet, deriye temas edeceği yüzey alanı, uygulanan madde miktarı,

uygulama süresi ve sıklığı, lokalizasyon ve maruz kalma yolları dikkate alınmalıdır (Çağlar ve Saral 2014). Kozmetiklerde sıklıkla kullanılan ve toksisite açısından en çok suçlanan maddelerden bazıları; fitalatlar, triklosan, 1,4-dioksan, paraben, etilen oksit, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, başta kurşun ve civa olmak üzere ağır metaller ve güneş koruyucular içerisindeki nanoteknoloji ürünleridir (Çağlar ve Saral 2014).

2.4.1. Fitalatlar

Fitalatlar; yapı gereçleri, besin ambalajları, tekstil, oyuncak, biberon ve emziklerin de dâhil olduğu bebek ürünleri, kan torbası, tıbbi malzeme dahil, poli vinil klorür (PVC) tipi plastik ürünlerin esnekliğini ve dayanıklılığını sağlamak için plastikleştirici olarak kullanılan ve bu nedenle çok sık karşılaşılan kimyasallardır (Erkekoğlu ve ark. 2010). Kozmetiklerde ise; parfüm, parfüm içeren diğer kozmetikler ve ojeler gibi ürünlerde kullanılan bir grup kimyasallardır. Fitalatlar vücuda kolaylıkla deri yoluyla absorbe olabilirler (Janjua 2008) ve ayrıca inhalasyon ya da medikal injeksiyonla vücuda girebilirler (Schettler 2005). Fitalatlar östrojen ve androjen hormon sistemlerininde dâhil olduğu çok sayıdaki hormon sistemi üzerindeki karmaşık etkileri nedeniyle endokrin bozucular olarak kabul edilirler (Kang ve Lee 2005). Endokrin bozucu; endokrin sistemin çalışmasını değiştiren ve sonunda sağlıklı organizmada veya onun nesilleri üzerinde ters etkilere neden olan, organizmaya dışarıdan alınan madde ve bileşikler olarak tanımlanır. Endokrin çevre bozucular üreme sistemini etkileyerek oligospermi, sperm yapısında anormallik, testiküler atrofi, uterus boyutlarında artış ve erken ergenlikten sorumlu olabilir (Çetinkaya 2009).

Kozmetiklerde fitalatların ilk kullanımına dibütilfitalatın (DBP) oje gibi ürünlerde plastikleştirici olarak kullanılmasıyla başlamıştır. Daha sonraki yıllarda bunu dimetilfitalatın (DMP) saç spreylerinde sertleştirici olarak kullanılması ve dietilfitalatın (DEP) parfümlerde solvent ve fiksatif olarak kullanılması izlemiştir (Anonim 2010). 2010 yılında FDA'nın son araştırma raporuna göre DMP ve DBP artık nadiren kullanılmaktadır. DEP ise kozmetiklerde hala yaygın olarak kullanılan fitalat türüdür. Fitalatların kimyasal yapıları Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1. Fitalatların kimyasal yapısı (Olujimi ve ark. 2010)

Göz irritasyon testi için insan korneal endotel hücre hattı (B4GI2) kullanılarak yapılan çalışmalarda; dibütil fitalat (DBP), benzil bütil fitalat (BBP) ve dietil fitalat (DEP) maruziyetinden sonra hücre proliferasyonunda azalma buna ek olarak DBP ve BBP maruziyetinde hücre toksisitesi görüldüğü bildirilmiştir (Krüger ve ark. 2012).

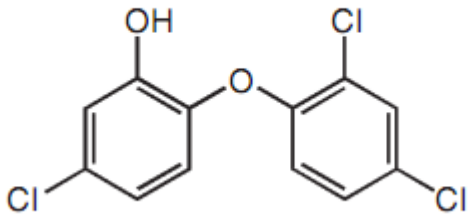
BBP'nin kanser gelişimi üzerindeki etkisini açıklamak üzere meme kanseri hücre hattıyla (MCF-7) yapılan çalışmada BBP'nin meme kanseri hücrelerinde yaşama ve yayılma yeteneğini arttırdığı bildirilmiştir (Hsieh ve ark. 2012).

Fitalatların meme dokusunda östrojen uyarısı ve androjen engellenmesi arasında dengesizlik yaratarak, östrojen etkinliğinin fazlalığı ve androjen eksikliği yaratarak pubertal jinekomastiye neden olduğu (Erkekoğlu ve ark. 2010) ve pubertal jinekomastinin de ilerleyen yıllarda meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı bildirilmiştir (Steingraber 2007).

2.4.2. Triklosan

Çoğunlukla diş bakımı, cilt bakımı ve özellikle son iki yıl içerisinde günlük hayatımızda da sıklıkla kullandığımız cilt dezenfeksiyon ürünlerinde bulunan, geniş spektrumda etkili antimikrobiyal bir maddedir (Shi ve ark. 2022). Antimikrobiyal bir ajan olmasından dolayı deterjan, sabun gibi temizlik maddelerinde de bulunmaktadır.

Triklosanın (Şekil 2.2) yaygın kullanımının, bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesine ve reçeteli ilaçların bakteriyel enfeksiyonlarla savaşamamasına neden olduğu bildirilmiştir (Ilozumba ve ark. 2022).



Şekil 2.2. Triklosanın moleküler yapısının şematik gösterimi (Fang ve ark. 2010)

Diş macunları ve deterjanlardaki triklosan şebeke sularında da bulunan klor (Cl) ile temasa geçtiğinde reaksiyona girer ve zehirli kloroform gazı oluşur. Bu gazın solunması ya da deriden nüfuzu depresyon, karaciğer rahatsızlıkları ve kanser riskini ortaya çıkarmaktadır. Triklosan maruziyetine bağlı olarak çok sayıda irritasyon ve kontakt dermatitis vakası bildirilmiştir (Glaser 2004).

İnsan meme kanseri hücreleriyle yapılan çalışmalarda triklosana maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı ve endokrin bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (Gee ve ark. 2008). Triklosan lipid sentezinde önemli rolü olan enol açil taşıyıcı protein redüktaz (ENR) enziminin aktif bölgesini bloke eder. Bu blokaj enzimin inhibe olmasına sebep olarak bakteriye bölünmede, hücre membranının yapımında gerekli olan yağ

asitlerinin sentezini engeller (Glaser 2004). Triklosan düşük konsantrasyonlarda pek çok bakteri için bakteriyostatik etki göstermektedir. Aynı çalışma bu maddenin yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal etki göstermektedir (Gomez Escalada ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalar, triklosanın genotoksik etkilerinin yanında nörotoksik, hepatotoksik, kardiyotoksik, immünotoksik etkilerinin varlığını doğrulamaktadır (Szychowski ve ark. 2022). Ek olarak; alerji, göz ve cilt tahrişi, immün sistem zayıflığı, kas fonksiyonlarında gerilemeye sebep olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Parenti ve ark. 2019).

Kan ve karaciğer hücreleri kullanılarak mikronükleus protokolünün uygulandığı çalışmaya göre, farklı sıcaklık şartlarında triklosana maruz kalan hücrelerde DNA hasarı saptanmıştır (Paul ve ark. 2019).

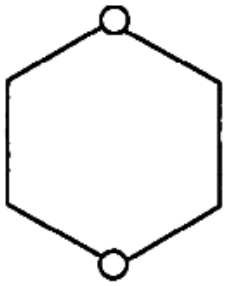
2.4.3. 1,4-Dioksan

1,4-dioksan; birçok kişisel bakım ürünü, ilaç ve çeşitli ev ürününün üretiminde kullanılan üretim hacmi yüksek bir kimyasal maddedir (Lee ve ark. 2021). Kauçuk, cila, boya, vernik gibi ürünler imal edilirken solvent olarak kullanılmasının yanısıra ve klor içerikli solventler için laboratuvar reaktifi ve stabilizatör olarak kullanılır. Kozmetik amaçlı üretilen köpürtücü maddeler, deterjanlar üretilirken yan ürün olarak oluşur (Zhou 2019).

Geniş bir kullanım alanına sahip olan 1,4-dioksan aşırı hidrofilik özelliğinden dolayı bulunduğu ortamlardan kolayca difüze olabilmekte, hava, su ve toprak gibi ortamlarda yayılabilmekte, solunum ya da deriden difüzyon yoluyla vücuda alınabilmektedir.

Canlı organizmalarda 1,4-dioksanın parçalanması ile aldehitler (formaldehit, asetaldehit ve glioksal gibi) ve organik asitler (formik, metoksiasetik asit ve oksalik asit gibi) meydana gelmektedir (Sağır ve ark. 2013).

Sağır ve ark. (2013) Swiss albino farelerde fizyolojik parametrelerin indikatörü olarak vücut ağırlığı, genotoksik parametrelerin indikatörleri olarak ise mikronükleus (MN) ve kromozomal anormallik sıklıkları kullanılarak yaptıkları çalışmada, 1,4-dioksan uygulamasının kontrol grubuna göre vücut ağırlığında istatistiksel açıdan önemli bir azalmaya, MN ve kromozomal anormallik sıklığında ise bir artışa neden olduğu belirtilmiştir. 1,4-dioksanın moleküler yapısı Şekil 2.3' te verilmiştir.



Şekil 2.3. 1,4-dioksanın moleküler yapısının şematik gösterimi (Zenker ve ark. 2003)

2013 yılında, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) kobay, fare ve sıçanlarda yapılan 2 yıllık karsinojenite çalışmalarında elde edilen sonuçlar ışığında bu maddenin insanlar için kanserojen olabileceğini kabul ederek 1,4-dioksanı AB Kozmetik yönetmeliği EK II de (kozmetik ürünlerde yasaklı maddeler listesi) listelemiştir (Zhou 2019). EPA ve IARC tarafından yapılan karsinojen sınıflandırması Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4' te verilmiştir.

Çizelge 2.3. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) (2003) 'e göre karsinojenler (Başaran 2009)

Grup A	İnsanlarda karsinojen olan maddeler
Grup B1	İnsanlarda karsinojen olduğunu gösteren sınırlı sayıda kanıt bulunanlar maddeler
Grup B2	İnsanlarda karsinojenik olabileceğine dair kanıtlar bulunan maddeler
Grup C	Hayvanlarda karsinojenik olduğunu gösteren sınırlı kanıt bulunanlar (İnsanlar için kanıt yok) maddeler
Grup D	Karsinojenik olasılığı için yetersiz bilgi içerenler
Grup E	İnsanlarda karsinojenik olmadığı gösteren yeterli kanıt bulunanlar maddeler

Çizelge 2.4. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (IARC) (2004)'e göre karsinojenler (Başaran 2009)

Grup 1	İnsanlara karsinojen
Grup 2a	İnsanlara olası karsinojen
Grup 2b	İnsanlara muhtemel karsinojen
Grup 3	İnsanlarda karsinojen olarak sınıflandırılmayan
Grup 4	İnsanlarda muhtemel karsinojenik olmayan

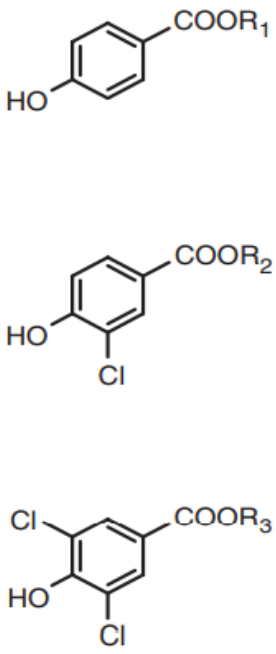
2.4.4. Parabenler

Parabenler; gıda endüstrisinde yiyecek ve içeceklerin işlenmesinde aromatik ve koruyucu, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri ile ilaç üretiminde antibakteriyel özelliklerinden dolayı 90 yıldan uzun süredir koruyucu olarak kullanılır (Zhao ve ark. 2022). Yapılan çalışmalar parabenlerin yapısında bulunan alkil zincir uzunluğunun, parabenin antimikrobiyal etkisi üzerinde direkt olarak etkili olduğunu göstermiştir (Lite ve ark.2022).

Kozmetik ürünlerin formülasyonlarında en çok kullanılan koruyucu maddelerden biri olan parabenlerin en yaygın tipleri FDA'ya göre metilparaben, etilparaben, propil paraben ve bütilparabendir (Cordeiro ve ark. 2022). Paraben grubu metilparaben, etilparaben, propilparaben, izopropilparaben, butilparaben, izobutilparaben, benzilparabenden oluşmaktadır. Şekerleme ve kurutulmuş etlerde de metilparaben, etilparaben ve propilparaben kullanılmaktadır. Parabenler sindirim yoluyla alınabilir ya da kullanılan topikallere bağlı deriden absorbe olabilirler (Castelain 2012).

Yapılan bir çalışmaya göre kozmetik ürünlerin topikal olarak uygulanmasıyla parabenler hızlı bir şekilde deriden absorbe olup hidrolize uğrayarak idrarla vücut dışına atılmaktadır (Marchese 2014). Parabenlerin östrojenik etkilerinin var olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Meme kanseri dokularına bakıldığında, metilparaben varlığı saptanarak, bu duruma endokrin bozucu etki ile sebep olduğu düşünülmüş ve bu aktiviteyi doğrulamak adına çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar genişletilmiştir (Kizhedath ve ark. 2019). Meme kanserinin oluşmasında östrojenlerin; büyümeyi, ilerlemeyi ve hatta metastazı artırması

yönünde etkileri vardır. Bu etki; MCF-7 adı ile bilinen insan meme kanseri hücreleri ile yapılan deneysel çalışmalarda hücre proliferasyonunu artırması sonucu ortaya çıkmıştır (Fransway ve ark. 2019). Meme kanserlerinin sıklıkla üst dış kadranda olması, bu alanın antiperspirant uygulanan alanda olması bu şüpheyi desteklemektedir. Kanserli meme dokusunda paraben varlığının tespit edilmesi de şüpheleri arttırmaktadır (Castelain 2012).



Şekil 2.4. Paraben ve klorlu türevlerinin moleküler yapısının şematik gösterimi (Terasaki ve ark. 2008)

Propil ve bütil parabenlerin erken çocukluk döneminde maruz kalınmasına bağlı olarak erkeklerde fertilite üzerine olumsuz etkileri olabileceğine dair şüpheler de mevcuttur (Castelain 2012). Saral ve Çağlar (2014) tarafından bildirildiğine göre; metil ve propilparabenlerin mitokondri fonksiyonlarının kuvvetli inhibitörleri olmaları nedeniyle erkek infertilitesinden sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir (Crinnion 2010).

Fareler üzerinde yapılan bir deneyde gebelik ve emzirme döneminde annenin yüksek dozlarda bütil parabene maruz kalmasına bağlı olarak (100 mg/kg dozda subkutan uygulama) epididimiste sperm sayı ve motilitesinin azaldığı gösterilmiştir (Kang ve ark. 2001).

10 Nisan 2014 tarihli AB Resmi Gazetesi'nde yayımlanan 1223/2009 sayılı mevcut AB Kozmetik Tüzüğü Ek II'sinde düzeltme yapılarak kozmetikte kullanılan 5 paraben bileşiği isopropil paraben, isobütil paraben, fenil paraben, benzil paraben ve pentil parabenin kozmetikte koruyucu amaçlı kullanımı yasaklanmıştır (Anonim 2014).

2.4.5. Ağır Metaller

Yoğunluğu 5 gr/cm^3' den büyük olan elementlere ağır metal adı verilir. Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal (demir, kobalt, bakır, mangan, molibden, çinko) ve yaşamsal olmayan (civa, platinyum, kurşun, kadminyum, krom, arsenik vb.) olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlanan ağır metallerin organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gerekir. Fakat yüksek dozları insan sağlığını olumsuz etkilemektedir (Asri ve Sönmez 2006).

Kozmetiklerde bulunan toksik özellikli ağır metaller genellikle kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), nikel (Ni), arsenik (As) ve cıva (Hg)dır. Diğer grup krom (Cr), demir (Fe), bakır (Cu) ve kobalt (Co) gibi, içerikte bulunma miktarına göre toksik etki gösterebilecek elementlerdir (Borowska ve ark. 2015)

Kozmetik ürünlerin içerdiği ağır metaller cilde nüfuz edebilmekte ve sistemik şekilde absorbe edilmektedir. Bu etkileşim sonucu vücutta birikerek yaşamsal organlarda işlevsel bozukluklar dâhil birçok ciddi sağlık sorunlarını doğurabilmektedir (Suliman ve ark. 2021). Kozmetik ürünlerinde ağır metaller genel itibari ile boyar kozmetikler, terleme önleyici ürünler, mantar karşıtı kozmetikler, antibakteriyel özellikli ürünlerde karşımıza çıkmaktadır. Ek olarak losyonlar, fondötenler, beyazlatıcı kremler ve güneş kremleri, rujlar ile saç boyalarında bulunmaktadır (Arshad ve ark. 2020).

Kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) metalleri, renk vermek amacıyla boya benzeri ürünlerde kullanılmaktadır. Literatürde kurşun ve kadmiyumun kozmetikte kullanımının toksik etkileri hakkında pek çok çalışma bulunmaktadır (Yılmazcan ve ark. 2013).

Bu iki elementin, kozmetik ürünlerde kullanımının toksik etkilerini destekleyen çalışmalar ışığında Avrupa Birliği Direktifi 76/768 EEC ile belli sınırlar içerisinde kullanılmasına karar verilmiştir (Yılmazcan ve ark. 2013).

Kurşun (Pb), DSÖ sınıflandırmasında 2.sınıf kanserojenlere dâhildir. Bu metal insan metabolizmasına ve ekolojik sisteme çok ciddi zararlar veren ilk metal olarak adlandırılmıştır (Kahvecioğlu ve ark. 2004). Kurşunun toksikolojik profili oldukça yüksek olup vücut içerisine yayılarak ve hemen her hücreyi etkileyebilmesi sebebiyle sinir sistemi, dolaşım sistemi ve renal fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (Suliman ve ark. 2021). Bu zararlı etkileri destekleyen bir diğer çalışmada da yine kurşun toksisitesinin böbrekler ve sinir sistemi üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Almayahi 2021).

Hemmaphan ve Bordeerat (2022) tarafından yapılan çalışmada kurşun metalinin direkt olarak kanser oluşuma sebebiyet vermese bile DNA tamir mekanizmalarında bozulmalara yol açtığı için genotoksik etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışma, meme kanseri dokularında yüksek konsantrasyonda kurşun metali varlığını saptamıştır (Mohammadi ve ark. 2014).

Kozmetikler dışında farklı şekillerde de kurşun maruziyetinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada, kurşunun kanserojen etkileri olduğunu desteklemekle birlikte, farklı kanserojenlerin etkisini de artırabildiğini belirtmektedir (Balasubramanian ve ark. 2020).

Kadmiyum (Cd), toksik ağır metaller içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütünün sınıflandırmasına göre kadmiyum 1. sınıf kanserojen gruptadır. Herhangi bir kozmetik üründe kullanımına dair kullanım izni bulunmamaktadır. Sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sistemlere alınır. Normal olarak insan vücudunda 40 mg kadar kadmiyum bulunabilmektedir (Demir ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalarda, farklı şekillerde kadmiyuma maruz kalmanın özellikle karaciğer ve böbrekler için toksik etkilerinin fazla olduğu ve meme, prostat, akciğer, pankreas gibi kanser çeşitlerini tetiklemesine ek olarak osteoporoz riskini artırdığı, ROS oluşumu artırdığı, patojenik risklerin de gelişmesini tetiklediğini belirlenmiştir (Genchi ve ark. 2020). Uluslararası standartlar dışında kadmiyum içeren kozmetik ürünler ile yapılan çalışmada, kadmiyumun zatürre ve böbrek taşı oluşumuna sebep olduğu ek olarak kemik yoğunluğunda kayıplar oluşturduğu saptanmıştır (Genchi ve ark. 2020; Suliman ve ark. 2021).

Farklı toksik etkileri araştırılan kadmiyumun, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunu, bu etkiler ile DNA nın tamir mekanizmasını bozarak ROS üretimini de artırdığı belirlenmiştir (Rahimzadeh ve ark. 2017). Yine bu çalışmada kadmiyumun karaciğer ve böbreklerde fonksiyon bozuklukları geliştirdiği, kardiyovasküler sistem disfonksiyonuna neden olduğundan bahsedilerek karsinojenik etkilerine de ayrıca yer verilmiştir.

İnsan sağlığı üzerindeki toksik etkileri çalışmalarla desteklenen ve yasaklı maddeler listesinde olan bu metallerin kozmetiklerde kullanıldığı, Demir ve ark. (2014) tarafından saç boyaları ve ojelerle yapılan çalışmada inceledikleri ürünlerin tamamında Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1. ve 2. sınıf kanserojen olarak açıklanan kadmiyum ve kurşun metalleri tespit edilmesi ile deneysel olarak kanıtlanmıştır. Çalışmalarında kullandıkları kozmetiklerin çeşitleri ve içeriklerinde saptanan kurşun ve kadmiyum miktarları aşağıda Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5 te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5 . Saç boyalarında tespit edilen Pb ve Cd miktarları (Demir ve ark. 2014)

No	Saç Boyası	Pb (µg/L)	Cd (µg/L)
1	Bakır Sarısı	2,610	0,002
2	Çikolata	5,040	0,344
3	Kumral Küllü	4,390	0,618
4	Yoğun Sarı	3,502	0,516
5	Açık Kumral	3,952	0,857
6	Koyu Kahve	8,560	1,023
7	Karamel	6,945	0,754
8	Kızıl	2,553	0,726
9	Açık Sarı	3,260	0,525
10	Sıcak Kahve	5,154	0,872

Çizelge 2.6. Ojelerde tespit edilen Pb ve Cd miktarları (Demir ve ark. 2014)

No	Oje	Pb (µg/L)	Cd (µg/L)
1	Siyah	517,40	0,12
2	Bordo	329,88	53,67
3	Koyu Pembe	389,90	52,10
4	Açık Pembe	183,12	110,15
5	Yeşil	19,43	3,53
6	Sedef	29,17	9,38
7	Kırmızı	15,59	3,70
8	Kahverengi	25,61	1,48
9	Lacivert	24,16	0,98
10	Mor	28,77	1,93

Nikel (Ni), kozmetikte renklendirme amaçlı kullanılan malzemeler, saç şekillendiriciler ve şampuanlarda bulunmaktadır. Kozmetik kaynaklı alerjik dermatitlerin çoğunluğu nikel kaynaklı meydana gelmektedir (Sipahi ve ark. 2015). Nikelin ve nikel bileşiklerinin karsinojenik etkisi genel itibariyle solunum yoluyla maruziyet ile ilişkilendirilerek

kanserojen olarak sınıflandırılmış ve kozmetiklerde bulunan nikel içeriğinin olumsuz etkilerinin nikele karşı hassasiyet gelişmesi ile ortaya çıktığı belirlenmiştir (Bocca ve ark. 2014). İnsanlarda nikelin toksik etkilerinin, lipid ve protein yapılarında, DNA da ve DNA tamir mekanizmalarında bozukluklara yol açma ve başka biyomoleküllere bağlanarak özelliklerini değiştirmesi histon metilasyonuna neden olması olarak açıklanmıştır (Macomber ve Hausinger 2011).

Arsenik (As) kozmetikte göz farları ve kalemleri, şampuan ve saç kremi gibi saç bakım ürünleri ve duş jellerinde bulunabilmektedir. Arseniğin toksik etkileri; hücresel boyutta enerji üretimi süreçlerine etki etmesi, DNA eşlenmesi ve tamir mekanizmalarındaki enzim aktivitelerini bozması ve hatta duraklatması ile DNA hasarına yol açması olarak açıklanmıştır (Yaşar ve Akdeniz 2020). Ek olarak arsenik cilt kanserleri, bazal hücreli ve skuamöz hücreli karsinoma neden olmaktadır (Tapia ve ark. 2021).

Vücuda soluma yoluyla ya da kozmetik içeriklerinden deri yoluyla girebilen arseniğin, cilt rengini açmak için kullanılan bazı kozmetikler kullanılarak toksik etkileri araştırıldığında bireylerin kanser riskini artırdığı ve çoklu sistem bozukluklarına yol açtığı belirlenmiştir. Arsenik kaynaklı diğer belirtiler hiperpigmentasyon, cilt değişiklikleri ile nöropati, kardiyak rahatsızlıklar, hafıza sorunları ile diyabet riskinde artıştır (Mohammed ve ark. 2017).

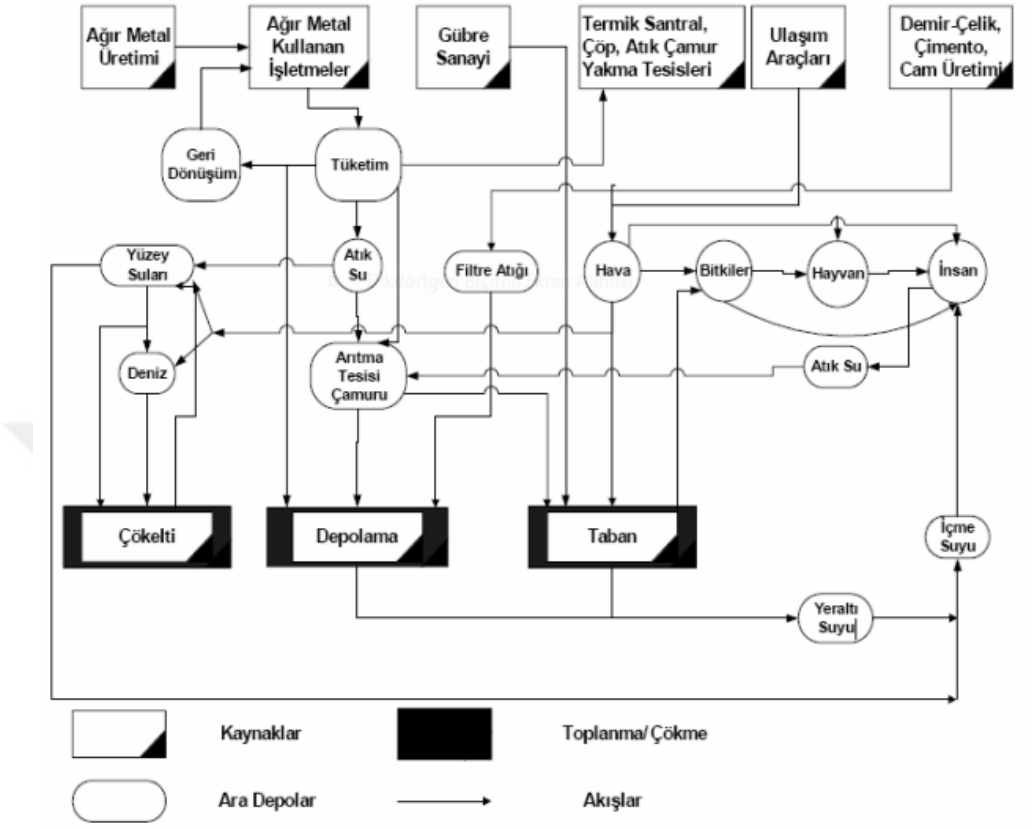
Cıva (Hg) şampuan ve saç kremleri, dudak renklendiriciler, ojeler, likit göz ürünleri, makyaj temizleme sıvıları gibi kozmetik ürünlerinde bulunmaktadır (Yaşar ve Akdeniz 2020). Melanin üretimini engellemesi sebebiyle nemlendirici kremlere nazaran, cilt rengini açmak için kullanılan kozmetik kremlerde daha fazla bulunan cıva deri yoluyla emilerek çeşitli cilt rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Bu rahatsızlıklar arasında, kontakt dermatit, ciltte renk değişiklikleri, bir çeşit döküntü olan purpura bulunmaktadır (Bocca ve ark. 2014). Cıvanın östrojenik etki yaparak meme kanseri dokusunun büyümesini tetiklediği belirlenmiştir (Mohammadi ve ark. 2014).

Bir başka çalışmada cıva maruziyetinin otoimmun rahatsızlıklara yol açabildiği, beyni hedef alarak periferik sinir fonksiyonlarını, böbrek işleyişini, enzim sistemlerini ve kas yapılarını olumsuz etkilediğinden bahsedilmiştir (Carocci ve ark. 2014). Özet olarak, yüksek oranda ağır metal maruziyeti ciltte alerjik reaksiyonlara, şişliklere, önemli boyutta kızarıklıklara ve ülserlere sebep olmaktadır. Ek olarak nörotoksik etki göstermekte, hafıza kaybına sebep olabilmekte, üremede yetmezlik görülmesine yol açmaktadır. Hücresel ölüm, DNA hasarı, oksidatif stres ve kanserojen etki gibi çok sayıda sağlık problemi oluşturabilmektedir (Arshad ve ark. 2020).

Bahsedilen ağır metaller dışında bazı metaller de kullanım ve maruziyet mikarlarına göre toksik etki yapabilmektedir. Örneğin bakır ve çinko zehirlenmelerinde gastrointestinal bozukluklar, diare, kusma, stomatit, ataksi, paralizi, konvülsiyon, depresyon, pnömoni görülebilir.

Kozmetiklerde boya amacıyla kullanılan krom toksisitesinde ciltte döküntü, böbrek ve karaciğer hasarı, akciğer kanseri, solunum yolu hastalıkları ve ölüm görülebilir. Biyosid etki amacıyla kullanılan bakır ise deride dermatit ve diskolorasyon, burun ve boğazda tahrişe yol açabilir. Kronik bakır maruziyeti beyin hasarı, progresif demyelinizasyon, psikiyatrik rahatsızlıklar, depresyon, intihar eğilimi, agresif ruh hali, hemolitik anemi, siroz, motor disfonksiyon ve korneal opasiteye neden olabilir (Ayenimo ve ark. 2010).

Kozmetiklerin içinde bulunan ağır metaller de döngüye eklenerek doğaya yayılmakta ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini daha geniş bir alanda göstermektedir. Kişisel kullanımda bireye verdiği zararların yanısıra doğaya, doğadaki döngü sonucunda da tekrar canlılara ulaşarak olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Bu durum Şekil 2.5 te şematik olarak gösterilmiştir.



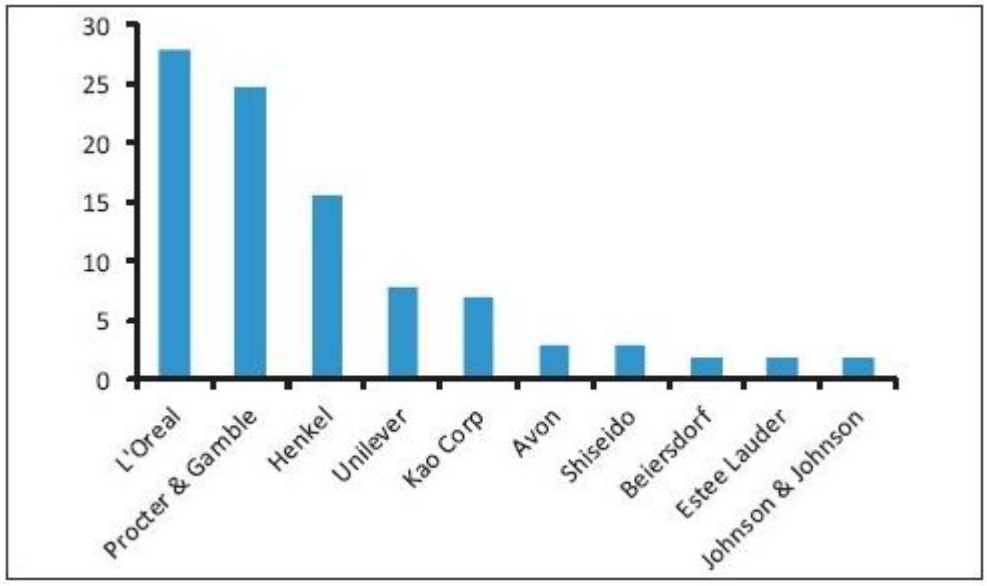
Şekil 2.5. Ağır metallerin doğada yayılma yolları (Kahvecioğlu ve ark. 2003)

2.4.6. Nanoteknoloji Ürünleri

Metrenin milyarda birini ifade eden nano terimi saç telinin genişliğinden 80.000 kat daha küçük bir boyutu ifade etmektedir. Nanoteknoloji kavramı 1 nm ile 100 nm arasındaki aralıkta bulunan her türlü yapının cihaz, sistem tasarlanması ve geliştirilmesi, karakterize edilmesi üretilmesi ve uygulamaya alınmasını kapsayan modern bir bilimdir (Raj ve ark. 2012).

Nanoteknoloji sayesinde ürünler, iletkenlik, yüksek dayanıklılık, korozyon koruması, su ve kir tutmama, çizik direnci gibi yeni işlev ve özellikler kazanmaktadır. Bu nedenle son dönemde elektronik, kozmetik, gıda, spor malzemeleri ve ilaç endüstrisinde kullanımı yaygınlaşmıştır (Çağlar ve Saral 2014). Nano ilişkili ürün patentli ilk firmalar Şekil 2.6' da

verilmiştir. Bu ürünlerin hızla pazara girmesiyle, fizyolojik ve kimyasal olarak etkilerini nasıl gerçekleştirdikleri, tetikleyebilecekleri biyolojik olaylar zinciri, sistemik etkileri ve toksisiteleri gibi pek çok soru ortaya çıkmıştır. Kısacası nanoteknoloji oldukça küçük boyutlu şeyleri yapabilmek ve kullanıma sunabilmek amacıyla bilim ile mühendislik prensiplerinin birarada uygulanmasıdır (Mu ve Sprando 2010).



Şekil 2.6. Nano ilişkili ürün patentine sahip ilk 10 firma (Raj ve ark. 2012).

Nanoteknoloji kozmetolojide 2 temel alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

- Nemlendiricilerde ve yaşlanma karşıtı ürünlerde taşıyıcı sistemler olarak.
- Güneşten koruyucu ürünler olarak (titanyum dioksit ve çinko oksit).

Ayrıca, makyaj ürünleri, parfümeri, ağız, tırnak ve saç bakım ürünleri gibi farklı kullanım alanları da vardır (Kaptanoğlu 2013). Güneş koruyucularında, UV filtresi olarak kullanılan nanopartiküller titanyumdioksit (TiO_2) ve çinkooksit (ZnO) tir . Bu bileşiklerin UV filtresi olarak kullanılmasının sebebi ışığı yansıtmak ve dağıtmaktır (Raj ve ark. 2012, Mu ve Sprando 2010).

İnsan lenfosit hücrelerinde yapılan bir çalışmada, TiO_2 in sitotoksik ve genotoksik etkileri farklı testler ile gösterilmiştir. Uygulanan komet testi sonucu DNA da oluşan hasarı göstererek bu nanopartikülün genotoksik olduğunu doğrulamaktadır, ek olarak tripan blue ile uygulanan testte alınan sonuçlar nanopartikülün sitotoksik etkilerini doğrulamaktadır (Ghosh ve ark. 2010).

ZnO in genotoksik etkisi insan keratinositleri ile yapılan çalışmada oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülerek gösterilmiştir (Sharma ve ark.2011). Ayrıca bir başka çalışmada da yine oksidatif stres kaynaklı olarak ZnO in genotoksik etkilerinin yanı sıra, mitokondriyal aktiviyeti bozduğu, hücre morfolojisini değiştirdiği hücre içi homeostaziyi etkileyerek hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir (Kocbek ve ark. 2010). Toksikoloji çalışmaları nanomateryallerin santral sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve akciğer üzerine çeşitli yan etkileri olabileceğini göstermiştir.

Bir diğer nanomateryal olan karbon siyahı ise makyaj ürünlerinde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Fondötenler, eyelinerlar, farlar, maskaralar ve ojelerde bulunur. Kozmetiklerde karbon siyahı konsantrasyonu %0,001 ile %10 oranında değişir (ojelerde %5, göz makyaj ürünlerinde %10 konsantrasyonda). Karbon siyahının sıçanlarda ve farelerde inhalasyon, dermal uygulama ve subkutan enjeksiyon şeklinde uygulamaları sonucunda karsinojenik oldukları saptanmış olması nedeniyle IARC tarafından insanlarda muhtemel karsinojenik oldukları belirtilmiştir (Çağlar ve Saral 2014).

2.5. Oto-bronzlaştırıcılar

Bireylerin bronz cilde sahip olmak adına yaptıkları uygulamaların başında güneşlenme ve solaryum uygulamaları gelmektedir. Doğal bronzlaşma güneşlenme ile sağlanırken uygun mevsim dönemleri dışında elde edilen cilt rengi solaryum uygulamaları ile korunmaktadır. Bu uygulamalar kısa sürede istenilen bronzluğun sağlanamadığı ve ekonomik olmayan uygulamalardır. Güneşlenme süresini kısaltmak adına farklı bitki yağları gibi doğal içerikler veya çeşitli kozmetik ürünler de kullanılmaktadır.

Bronzlaşma sürecinin en düşündürücü kısmı zararlı ışınlara tehlikeli ölçüde maruz kalınmasıdır. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalar sayesinde UV ışınlarına maruz kalmanın ne denli riskli olduğunun fark edilmesi ile birlikte, UV ışınları ile herhangi bir şekilde etkileşim olmadan bronzlaşma sağlayabilecek ürünler kozmetikler içerisinde oldukça büyük bir yer edinmeye başlamıştır (Schmid ve ark. 2007). Kozmetik endüstrisinde üretimi artan, sağlık endişeleri olmadan pratik bir şekilde uygulanabilecek, düşük maliyetli bronzlaştırıcıların kullanımı yaygınlaşmaktadır.

Cancer Association of South Africa (CANSA) işbirliği ile yayınlanan 'Fact Sheet and Position Statement on Sunless Tanning' te açıklandığı gibi sprey formda, krem ya da losyon formda topikal olarak uygulanan, güneşsiz, kendi kendine bronzlaşma, sahte bronzlaşma gibi farklı şekillerde tanımlanabilecek bronzluk sağlayan ürünlere ek olarak ağız yoluyla ya da enjeksiyon ile uygulanabilen ürünler de mevcuttur. Bu tür ürünler oto-bronzlaştırıcılar veya oto-bronzanlar olarak adlandırılabilir (Herbst 2014).

Oto-bronzanlar kısaca su içerisinde çözünebilen ve cilde uygulanmasının hemen ardından renklenme oluşturan boyalardır. Salt kozmetik beklentilerin yanında, oto-bronzanlar vitiligoya ve postinflamatuar pigment değişikliği gibi dermatolojik kökenli rahatsızlıklara sahip olan bireylerdeki renk farklılıklarının kamuflajını sağlamak amacı ile de kullanılmaktadır (Rogers 2005). Oto-bronzanlar güneşlenme ve solaryuma kıyasla oldukça düşük riskli olduğu kabul edilen, kolay uygulanabilen ürünlerdir. Oto-bronzanlar vücudun tercih edilen bölgelerine eşit şekilde uygulanarak, uygulanan ürün miktarına bağlı olarak dereceli ve doğal görünen bronzluk sağlamaktadır. Uygulama sırasında, ürünleri tüm bölgelere eşit şekilde uygulamak önemlidir. Dikkat edilmediğinde farklı koyulukta bölgeler oluşmaktadır. Özellikle bilekler, diz ve dirsekler, parmaklar gibi leke oluşumunun kolay olduğu bölgelere daha az miktarda ürün kullanılmalıdır. Tırnaklar ve saçlar uygulama için uygun bölgeler olmadığından, bu bölgelere uygulanması önerilmemektedir. Uygulanan bölgede yara, pullanma gibi herhangi bir hassasiyete sahip noktalar var ise bu noktalarda fazla koyulaşma dolayısıyla lekelenme görülmesi muhtemel olduğundan dikkatli olunmalıdır (Draelos 2002).

2.5.1 Oto-bronzlaştırıcı Çeşitleri

Cancer Association of South Africa (CANSA) işbirliği ile yayınlanan 'Fact Sheet and Position Statement on Sunless Tanning' te yer verilen bronzlaştırıcı ürünler pudralar, spreyler, mumsu ürünler, mendiller, losyonlar, mendiller, tablet ve kapsüller ile enjeksiyonlardır (Herbst 2014).

2.5.1.1 Bronzlaştırıcı Pudra, Sprey, Stick ve Mendiller

Sıkıştırılmış ya da gevşek toz formunda olabilen pudralar klasik makyaj ürünleridir. Spreyler, stickler ve mendiller de kozmetik amaçlı kullanılan başka bronzlaştırıcı formlardır. Bu ürünler uygulandıkları bölgede cildin pigmentasyonunda herhangi bir değişiklik yapmadan yüzeysel olarak anında renklendirme için kullanılmaktadır. Çeşitli cilt tonlarına göre pigment yoğunlukları değişiklik göstermektedir. İsteğe bağlı miktarda uygulanabilen bu kozmetiklerin içeriğinde güneş koruyucular bulunabilmekte ve böylelikle güneş hassasiyetini azaltabilmektedir. Oto-bronzanların kimyasal olarak oluşturdukları pigmentasyondan farklı olarak kozmetik tabanlı bu ürünler cilt üzerinde kaldığı müddetçe bronzluk sağlamaktadır. Cilt yüzeyinden uzaklaştırıldığında, cilt kendi rengine geri dönmektedir.

2.5.1.2 Bronzlaştırıcı Tablet, Kapsül ve Enjeksiyonlar

Bu ürünler, yukarıda bahsedilen türlerden farklı olarak ciltte kimyasal pigmentasyon ile renk değişikliği sağlamaktadır. Tablet ve kapsüller hemen hemen aynı içeriğe sahip, oral yol ile alınan ve uygulama sonrasında belirli bir bölgeyi hedefleyemeyen ve vücudun her noktasında turuncudan kahverengiye renk değişikliğine neden olan ürünlerdir. FDA tarafından onaylanmamış olan bu bronzanlar birçok yan etkiye sahiptir. Enjeksiyonlar ise sentetik bir hormon olan melatoninin deri altına verilmesi ile renk değişikliğine neden olmaktadır. Kullanımı tamamen izinsiz ve yasadışı olan bronzanlardır (Rogers 2005).

2.5.2 Oto-bronzlaştırıcı İçerikleri ve Bilinen Zararlı Etkileri

Kimyasal olarak ciltte melanin pigmenti üretimini arttırarak bronzluk oluşturan oto-bronzanların içeriklerinde farklı maddeler bulunabilmektedir. Bu maddeler tirozin, 5-methoxypsoralen, karotenoid kantaksantin ve dihidroksiasetondur.

Tirozin, bronzan hap ve kapsüllerin içeriğinde bulunmaktadır, melanin stimülant hormon aktivitesini artırarak melanin üretimini hızlandırmaktadır (Schwahn ve ark. 2001). Melanin oluşumuna melanogenez adı verilmektedir. Tirozin, tirozinaz tarafından katalizlenerek dihidroksifenilalanine sonra da depokinona dönüşmektedir. Bu maddeler sonraki tepkimeler ile eumelanin ve feomelanine dönüşür. Melanogenez sırasında meydana gelen reaksiyonlar sırasında oluşan ara ürünlerin birçoğunun yüksek redoks toksisitesine sahip olmasından dolayı melanin hücrede korumalı bir biçimde üretilmektedir (Ohbayashi ve Fukuda 2022). Melanogenezin kontrolsüz bir biçimde artışı melanom oluşumuna sebep olabilmektedir. Tirozin içerikli bronzan ürünlerin FDA onayı bulunmamaktadır (Rogers 2005).

5-methoxypsoralen (5-MOP) bronzanlarda kullanılan bergamotun (*Citrus bergamia*) ekstraktında bulunan bir bileşiktir. Bu bileşik melanin oluşumunu artırmaktadır. Bir vakada bergamot yağı kullanımının ardından güneş ışınlarına maruz kalınması sonucu ciltte kabarcık oluşumu ile sonuçlanan dermatit bildirilmiştir. Aynı çalışmada, aromaterapi yağı olarak kullanılan bergamot sonrasında ikinci derece yanık oluşumu bildirilmiştir. Bu hasarların, 5-MOP bileşiğinin cilde uygulanması ile UV hassasiyetini artırması sonucu, ve melanogenezi indüklemesi sebebiyle bileşiğin fototoksik ve kanserojen özellikte olduğu bildirilmiştir (Clark ve Wilkinson 1998). Kantaksantin aslında bir karotenoiddir ve ilk keşfi chanterelle mantarında (*Cantherellus cinnabarinus*) yapılmıştır. Bu mantar dışında, bazı bitkiler ve bakterilerde de doğal olarak bulunabilmektedir. Ayrıca yapay biçimde sentezlenebilen bir bileşiktir. Karotenoid kantaksantin de diğer bileşenler gibi melanin üretimini artırması ile bronzan içeriğinde kullanılmaktadır. Bu bileşik daha çok tablet şeklinde olan bronzanlarda bulunmaktadır ve kozmetik veya vitiligo gibi hastalıkları olduğu

için bu tabletleri kullanan kişilerde ürtiker, aplastik anemi, retinopati ve hatta hepatit bulguları bildirilmiştir (Gupta ve ark. 1985, Rogers 2005). Bir diğer oto-bronzan bileşiği olan dihidroksiaseton bu çalışmada kullanılmış olup ayrı bir başlık altında incelenmiştir.

2.6 Dihidroksiaseton (DHA)

Dihidroksiaseton ilk olarak tadı sebebiyle diyabet tedavisinde glikoz yerine kullanılmıştır 1920 li yıllarda diyabet hastası olan kişilerce tatlandırıcı olarak kullanılması sırasında çiğnendikten sonra, kişilerin tükürüğünün ciltlerinde lekelere sebep olması bunun yanında ağızda veya kıyafetlerde herhangi bir renk değişikliğine sebep olmamasından dolayı kullanımı konusunda tereddütler oluşmuştur. 1950 li yıllarda güneşsiz bronzlaşma ürünleri olarak ortaya çıkmasına kadar kullanılmamıştır (Draelos 2002).

Dihidroksiaseton hayvanlar ve yüksek yapılı bitkilerde glikoliz ve fotosentez gibi enerji üretimi için gerçekleşen karbonhidrat metabolizmalarında görülen 3 karbonlu şeker molekülüdür (Curtis ve ark.2006). Tatlı tadından dolayı gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak ve emülgatör ya da plastikleştirici olarak kullanılmasının yanında kozmetikte ışığa ihtiyaç olmadan bronzlaşma sağlayan losyon içeriklerinde, medikal olarak vitiligo tedavisi ve kanama durdurucu biyomateryallerde kullanılmaktadır (Cichowska ve ark. 2019). Bronzlaştırıcı olarak kullanımının keşfinden önce şeker komasının tedavi sürecinde diyabetli bireylere glikoza alternatif olarak kullanılmıştır. Sedef hastalarına uygulanan fotokemoterapi tedavilerinde de kullanılmıştır (Curtis ve ark.2006).

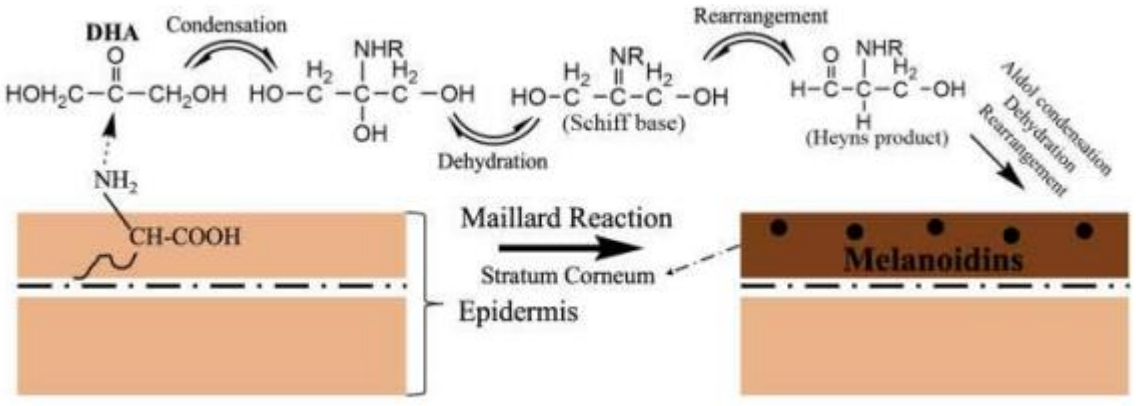
Uzun yıllardır bronzlaştırıcı olarak kullanılan DHA, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1973 yılında kozmetik içeriklerinde bulunan renklendirme amaçlı kullanılan katkı maddesi olarak kabul edilmiştir (Petersen ve ark. 2004). Sıvı, krem, losyon ya da köpük formunda olabilen bu kozmetik ürünlerinin içeriğinde %3 ila %5 oranında DHA bulunmaktadır. Elde edinlen bronzluk miktarı, DHA içeriğine göre değişebilmektedir (Curtis ve ark. 2006).

Bahsedilen bu bronzlaşma ürünleri, kısa bir süre içerisinde, güneş ışınlarının hasar oluşturma riski olmaksızın, ürün formülasyonuna göre 3-10 gün süre ile kalabilen bronzluk sağlamaktadır (Ciriminna ve ark. 2018). Stratum corneumdaki esmerleşmiş keratinli hücreler yüzeyden döküldükten sonra, melanoidinler de uzaklaşmış olacağı için cilt rengi normale döner (Sun ve ark. 2021).

2.6.1 Maillard Reaksiyonu

Güneş ışığına ihtiyaç duyulmadan bronzluk sağlayan kozmetiklerin içeriğindeki ana bileşen DHA, uygulandığında cildin yüzey yapısındaki protein ve aminoasitler ile etkileşime girerek doğal olarak melanin ile sağlanan bronzlaşmaya öykünebilen melanoidinleri meydana getirir (Amano ve ark. 2020). Melanoidinler, Maillard reaksiyonu sırasında üretilirler. Enzimatik olmayan Maillard reaksiyonu, indirgeme özelliğinde olan şekerler ile serbest amino grubu barındıran amin, aminoasit ve proteinler gibi yapılar arasında gerçekleşen esmerleşme reaksiyonu şeklinde tanımlanabilir (Shipar 2006).

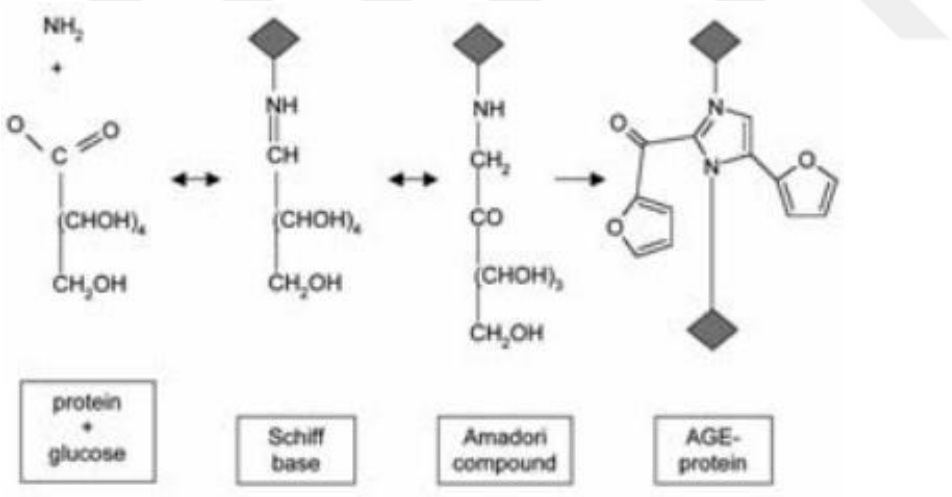
Maillard reaksiyonu ile melanoidin oluşumu cildin stratum corneum denilen en üst yüzeyindeki keratinli hücrelerin bulunduğu tabakada α-keratin kaynaklı serbest aminoasitler ile DHA nın reaksiyonu sonucunda gerçekleşir. Bu oluşumun şematik gösterimi şekil 2.7 de verilmiştir (Sun ve ark. 2021).



Şekil 2.7. Ciltte maillard reaksiyonu (Sun ve ark. 2021)

İndirgeyici şekerler ile epirdermis ve üst yüzeydeki stratum corneumdaki hücresel bileşenler ve aminoasitler arasında meydana gelen reaksiyonların başlangıç aşamalarında, ketoamin adı verilen bileşikler meydana gelir. Bu ketoaminler Amadori ürünleridir. Amadori ürünleri girdiği çeşitli reaksiyonlar serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan serbest radikaller oksidatif hasarların meydana gelmesinde etkilidir (Jung ve ark. 2008).

Reaksiyon basamaklarının devamında, glikasyon olarak adlandırılan amino-karbonil reaksiyonları sonucunda kompleks yapılı İleri glikasyon ürünleri (AGEs) ortaya çıkmaktadır. Amadori ürünleri ve AGE proteinlerinin oluşumu şematik olarak şekil 2.8 de verilmiştir. İleri glikasyon ürünlerinin kimyasal yolakları sırasında reaktif ara maddeler meydana gelir. Bu reaktifler arasında reaktif oksijen türleri (ROS) de bulunmaktadır (Yıldız 2020, Perer ve ark. 2020).



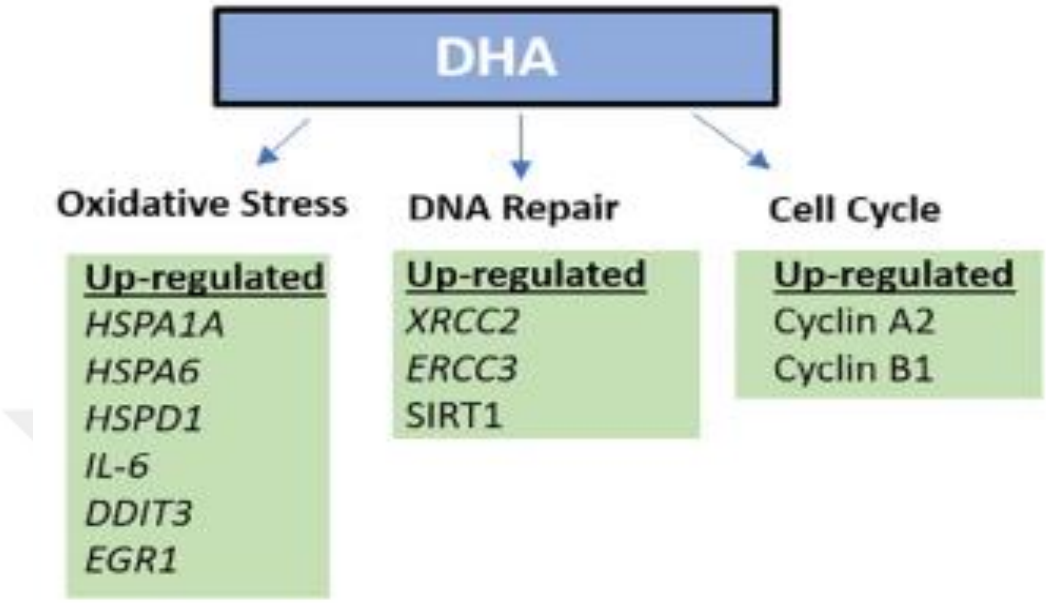
Şekil 2.8. Maillard reaksiyonu ürünleri (Jung ve ark. 2008)

Vücutta fizyolojik bir ürün olarak ortaya çıktığı için, DHA molekülünün toksik özellik gösterebileceği düşünülmemiştir. DHA nın ne şekilde toksik olabileceğine bakıldığında, melanoidinlerin oluşumu sırasında gerçekleşen bu reaksiyonların ara ve son ürünlerinin yol açtığı hasarlar ve bozukluklar akla gelmektedir. Maillard reaksiyonu ve ürünleri sebebiyle toksik olma potansiyeli düşünülerek yapılan çeşitli çalışmalarda DHA nın toksik özellik

gösterdiği ve göstermediği örneklemeler mevcuttur. Bir çalışmada DHA kaynaklı kontakt dermatit varlığı belirtilmiş, bir başka çalışmada ise mutajenik etki yaptığı gösterilmiştir. Ek olarak keratinosit ile çalışıldığında DNA da hasar oluşturduğu, hücre döngüsünde bozukluklar meydana getirdiği ve apoptotik yolakları indüklediği saptanmıştır (Curtis ve ark. 2006).

Farklı dozlar ve farklı süreler ile DHA ya maruz bırakılan insan keratinositleri (HaCaT) ile yapılan bir çalışmada, süre ve doz ile doğru orantılı olarak hücre döngüsü blokajı ile apoptozun indüklendiği ve hücre bölünmesi ile hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Petersen ve ark. 2004).

Petersen ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmayı destekleyen nitelikteki bir başka çalışmada da insan keratinositleri (HaCaT) kullanılmıştır. Bu çalışmada da DHA konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında ve proliferasyonunda önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Bu sonucun alınmasındaki etkenin, belirli bir süre hücrelerin DHA ya maruziyeti sonrasında oksidatif stres ve DNA tamir mekanizmalarının gen ekspresyonlarının regülasyonlarında değişim gözlenmiştir (Perer ve ark. 2020). Dolaylı olarak toksisite göstermesi ve yeterli çalışma bulunmaması ışığında FDA tarafından DHA nın kozmetiklerde kullanımı, topikal kullanım dışında (dudaklar ya da göz bölgesinde kullanımı) sınırlandırılmış durumdadır (Fu ve ark. 2004). DHA nın neden olduğu regülasyon değişikliği şematik olarak Şekil 2.9 da verilmiştir.



Şekil 2.9. DHA gen regülasyon şeması (Mehta ve ark. 2021)

Tez çalışmamızda dünyada yaygın olarak kullanılan dihidroksiasetonun olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile, fare deri fibroblast L929 hücre hatında XTT ve klonojenik hücre canlılık testleri ile komet DNA hasar testi, ROS oksidatif hasar testi ve Annexin-V canlılık testleri uygulanmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanınal ekipmanlar Çizelge 3.1' de ve sarf malzemeler ise Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar

Ekipman	**Marka/Model**
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Kaba terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	ELEKTRO.MAG-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON-ECLİPSE E100
Komet yazılımı	KAMERAM 21
Elektroforez güç kaynağı	PEQLAB-REQPOWER 300
Elektroforez tankı	CLEAVER SCIENTIFIC
Mikroplaka okuyucu	BİO TEK, ELx800 U.S.A
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buzdolabı	REGAL
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX
-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Karıştırıcı-ısıtıcı	M TOPS MS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEX XS

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar (devam)

Distile su cihazı	MP MINI PURE - DEST UP
Su banyosu	NUVEBATH NBS
Fluoroskan Ascent FL Mikroplaka Florometre ve Lıminometre	THERMO SCIENTIFIC

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	**Firma/ Katalog No**
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/Dragon Med Levo plus
Steril 15 ml' lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar (T-12,5, T-25, T-75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
l-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PAN BIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PAN BIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PAN BIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
Lowmelting agaroz	SIGMA/ A9414-25 G
Normal agaroz	SIGMA/ A9539-100 G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA (ROS Kit)	CELL BIOLABS'Oxiselect^{TM}/ 59342021
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/ 1548576

3.2 Kullanılan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında, L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları, başlık 3.3.1 de açıklandığı şekilde hazırlanan besiyeri içerisinde, 75 ve 25 cm^2 lik flasklarda 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde kültür edilmiştir.

3.2.1 Hücre Hattının Pasajlanması

Hücreler yeterli büyüklüğe ve flask içerisinde yeterli doluluk oranına ulaştığında besiyeri aspirasyon ile uzaklaştırılır. Hücreler flask tabanında tutunmuş halde bulunduklarından aspirasyondan etklenmemektedir. Besiyeri uzaklaştırıldan sonra Phosphate Buffered Saline (PBS) kullanılarak yıkanarak, PBS aspire edilir. Yıkama işleminin ardından, tutunmuş haldeki hücrelerin flask tabanından ayrılmalarını sağlamak üzere flaska tripsin eklenir, yaklaşık 3 dakika inkübatör içerisinde bekletilir. Süre sonunda flask mikroskopta kontrol edilir, hücreler yüzeyde görünüyorsa, tripsin ile aynı miktarda besiyeri eklenmesi ile tripsin reaksiyonu durdurulur. Flask içeriği 15 ml lik falcon tüplere aktarılır. 5 dakika süre ile +4 °C, 2500 rpm de santrifüjlenir. İşlem sonunda süpernatant tüpten uzaklaştırılır. Hücrelerin pipetajlanarak süspanse olması sağlanır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan yeterli miktarda hücre, besiyeri eklenmiş yeni flasklara aktarılır.

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 Besiyerinin Hazırlanması

Oluşturulmak istenen hücre kültürüne uygun besiyeri içeriği hücrenin kaynağına, tipine, adaptasyon yeteneğine ve besin ihtiyacına göre belirlenir. Bu çalışmada kullanılan L929 hücre hattına uygun besiyeri; 500 ml EMEM medyum içerisine 6 ml penisilin-streptomisin, 60 ml fetal bovine serum, 6 ml NEAA (nonesansiyel aminoasit) ve 3 ml L-glutamin eklenmesi ile hazırlanmıştır.

3.3.2 Hidrojenperoksit (H2O2) Hazırlanması

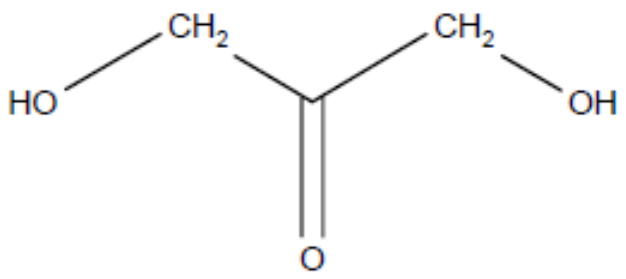
%35 lik ana stoktan alınan 6,318 µl H_2O_2, 4993,682 µl distile edilmiş su ile 5 ml ye tamamlanarak yeni stok çözelti hazırlanmıştır.

3.4 Kullanılan Madde

Molekül ağırlığı 90,08 g/mol olan dihidroksiaseton, granüler parçacıklar içerebilen, kristal yapılı beyaz pudra şeklinde fiziksel yapıya sahiptir. Kimyasal kimliği Çizelge 3.3' de moleküler yapısının şematik gösterimi Şekil 3.1' de verildiği gibidir (Directorate-General for Health&Consumers, SCCS 2010).

Çizelge 3.3. DHA nın kimyasal kimliği

INCI Adı	Dihydroxyacetone
Kimyasal Adı	1,2-Dihydroxy-2-propanone
Ticari Adları	1,3-Dihydroxydimethyl ketone / Propane-1,3-diol-2-one / DHA
CAS Numarası	96-26-4
EC Numarası	202-494-5
Kimyasal Formülü	$C_3H_6O_3$



Şekil 3.1. DHA nın kimyasal yapısının şematik gösterimi

Bu çalışmada DHA farklı konsantrasyonlarda kullanılmak üzere besiyerinde çözülerek hazırlanmıştır. L929 fare fibroblast hücre hattında sitotoksisite belirlenmesi adına XTT testi ile Klonojenik testler uygulanmıştır. DHA' nın genotoksik etkileri de komet testi ile araştırılmıştır. Hücre ölüm mekanizmalarının belirlenebilmesi adına Annexin-V protokolü uygulanmıştır. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumda DHA nın etkisinin araştırılması ise ROS ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

3.5 XTT Testi

XTT testi, canlı hücrelerin metabolik aktivitesi ile XTT ajanının suda çözünebilen formazan ürünlerine dönüşmesi sonucu oluşturduğu renk farklılıklarının mikroplaka okuyucuda belirlenmesine dayanır. Bu test ile hücre canlılığı (viabilite) ölçülmektedir (Loures ve Levitz 2016).

3.5.1 XTT Test Protokolü

Hücreler, 1 hafta süresince 75 cm2 lik flasklarda büyütülmüştür. Flaskların doluluk oranı %80 e ulaştığında pasajlanmış ve 96 kuyucuğu olan platelere aktarılmıştır. Her kuyucuğa L929 hücre hattından 5×10^3 hücre eklenmiştir. 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmış, süre sonunda yeni besiyeri eklenmiş ve 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1250 µg/mL, 2000 µg/mL, 3250 µg/mL, 5000 µg/mL,

6000 µg/mL, 7500 µg/mL konsantrasyon ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından kuyucuklara PBS li yıkama yapılarak, 100 µL besiyeri ve aktive XTT solüsyonu eklendikten sonra 3 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikroplaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Blankler çıkarılarak (1-A muamele grubu / A kontrol) x100 formülü ile hesaplama sonrası proliferasyon eğrisi çizilmiştir. Proliferasyon eğrisi doğrultusunda L929 IC_{50} konsantrasyonu belirlenmiştir. Kullanılan kimyasallar deneyin hemen öncesinde 37 °C de eritilmiştir.

XTT solüsyon A ya 1:50 hacim oranında elektron bağlama solüsyonu eklenerek XTT ölçüm solüsyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plate için gerekli 5000 µL XTT solüsyonu için 10 µL aktive edici ajan gerekmektedir.

3.6 Klonojenik Test

Klonojenik test, keşfedildiği dönemlerde radyasyona maruz kalan hücrelerin maruziyet sonucu durumlarını incelemek üzere kullanılmıştır (Rafehi ve ark. 2011). Hücrelerin üremeye dayalı şekilde koloni oluşturabilme yeteneklerinin ölçülmesine dayanan sitotoksik bir test yöntemidir (Brix ve ark. 2020).

3.6.1 Klonojenik Test Protokolü

T75 flaskta ve %80 konfluent olan flasklara pasajlanan hücreler sonrasında toplanarak +4°C'de 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda supernatant kısmı atılarak hücreler süspanse edilmiştir. Hücre sayım cihazı kullanılarak toplam hücre sayısı belirlenmiştir. Belirlenen sayıda hücre, deney grupları sayısı kadar T25 flaska ekilmiştir. T25 flasklarda bulunan hücreler %80 doluluk oranına ulaştığında DHA için kontrol grubu, $IC_{6,25}$, $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında dozlama yapılmıştır. 24 saat geçtikten sonra hücreler pasajlanmış ve 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmı atılmış, hücrelerin süspanse edilmesinden sonra canlı hücreler

sayılmıştır. Hücre sayımı sonrasında 60 mm lik petrilere 500' er hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücre ekimi tamamlanan petriler 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi, petrilerin her gün invert mikroskopta kontrol edilmesi ve belirli bir koloni büyüklüğüne ulaşmasının saptanmasına kadardır. İnkübasyon süresi sonunda kristal viyole ile boyanmış, her bir petride oluşmuş koloniler sayılarak tablo oluşturulmuş ve aşağıda verilen formül kullanılarak yüzde yaşayabilirlik oranı, kullanılan maddenin sitotoksisitesi hesaplanmıştır.

$$Canlılık(sitotoksisite) = \frac{Petri\ başına\ düşen\ ortalama\ koloni\ sayısı}{Kontrol\ petrisindeki\ ortalama\ koloni\ sayısı}\ x\ 100$$

3.7 Komet Testi

Komet testi DNA da meydana gelen hasarı ve oluşan hasarın onarım durumunu incelemeye yarayan bir genetoksisite testidir. DNA da meydana gelen zincir kırıkları tamir mekanizmaları tarafından tamir edilemediğinde, DNA molekülleri elektroforez sayesinde hücrenin çekirdeğinden uzaklaşarak kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturacak biçimde göç ederler. Kuyruk uzunluğu DNA da meydana gelen hasar hakkında bilgi sahibi olmayı sağlamaktadır (Olive ve Banath 2006).

3.7.1 Komet Test Protokolü

L929 hücre hattının bulunduğu 75 cm^2 lik flasktan 25 cm^2 lik flasklara pasajlanan hücreler 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler büyüme kontrol, pozitif kontrol grupları ile DHA için $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında dozlanarak 24 saat süre ile bekletilmiştir. Belirlenen süre sonunda flask tabanında konfluente olan hücreler tripsin eklenerek kaldırılarak santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonraki adımların soğuk solüsyonlar kullanılarak karanlık ortamda gerçekleştirilmesine dikkat edilmiştir. Süpernatant kısmı tüpten aspire edilmiş,

kalan kısım 1 ml PBS eklenerek seyreltilmiş ve pipetajlanarak karışması sağlanmıştır.
37 °C ye ayarlanmış su banyonu içerisine, 250 µl LMA eklenen eppendorf tüpler yerleştirilmiştir. 100 µl hücre pelleti hazır eppendorflara aktarılarak pipetaj yöntemiyle karıştırılmıştır. İyice karıştırılan hücre-jel süspansiyonundan 80 µl lik miktarlar çekilerek test protokolünden 1 gün önce low melting agaroz ile kaplanarak hazır hale getirilmiş lamlara yayılmıştır. Lamlar 15 dakika süresince +4°C de bekletilmiştir. Üzerlerine kapatılan lameller dikkatlice kaldırılarak lizis solüsyonu hazırlanmış ve folyo ile sarılarak karanlık bir ortam haline getirilmiş şaleler içerisine yerleştirilmiş ve 24 saat süre ile +4°C de bekletilmiştir.

Bekleme süresi sonlandığında lamlar elektroforez tankına yerleştirilerek, elektroforez tamponu içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakika sonunda 500mA, 25V akım ile yürütme işlemi başlatılmıştır. Yürütme işlemi sonrası tanktan alınan lamlar nötralizasyon tamponu ile 5 dakika boyunca karanlıkta nötralize edilmiştir. Soğuk distile su kullanılarak yıkanan lamlar kurulanıp fikse edilmek üzere 5 dakika saf etanolde bekletilmiştir. Floresan mikroskopta incelemeye hazır hale getirebilmek için konsantrasyonu 20 µg/ml olan EtBr den 0,2 ml çekilmiş ve lamlara damlatılmıştır. Lameller ile kapatılan lamların mikroskobik incelemeleri, her lamdan 100 hücre sayılarak, komet sayım programında komet ve kuyruk uzunlukları ile kuyruk moment uzunlukları değerlendirilerek yapılmıştır.

3.8 ROS Testi

DHA' nın hücre içi ROS oluşumuna etkisi DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) maddesinin RPMI medyumda çözülerek değerlendirilmiştir. DCF-DA boyası floresan özellikte değildir. Hücreye difüze olarak girer ve hücresel esterazlar ile DCFH' a hidrolize olur. DCFH, ROS varlığında hızla okside olarak yüksek oranda floresan etkiye sahip olan 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) e dönüşmektedir.

3.8.1 ROS Testi Protokolü

75 cm^2' lik flasklarda üretilen L929 hücre hattı 96 kuyucuklu syah platelere çift tekrarlı olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süre ile 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

Besiyeri uzaklaştırılıp, PBS ile iki kez yıkanmıştır. Sonraki adımda hücrelere 0,5 mM DCFH-DA stok çözeltisin RPMI'da çözülmesi ile hazırlanan. 1X DCFH-DA/Besiyeri çözeltisinden 1:9 seyreltme ile tüm kuyucuklara 100 µl eklenerek 37 °C ve %5 CO_2 şartlar altında inkübe edilmiştir. 120 dakikalık inkübasyon sona erdikten sonra DCFH-DA yüklenmiş olan hücrelerin bulunduğu kuyucuklar PBS ile 2 kez yıkanarak ortamdan DCFH-DA uzaklaştırılmıştır.

Yüklü hücreler, XTT ile belirlenen IC12,5, IC25, IC50, IC75 ve IC90 DHA dozları ile 2 saat süresince dozlanmıştır. Pozitif kontol için H2O2' nin IC50 konsatrasyonu kullanılmıştır. Süre bitiminde plateler 480nm/530 nm florometrik plaka okuyucuda 24 saatlik belirlenen aralıklarda okutulmuştur. Okuma sonuçlarında RFU (relative fluorescence units) değerleri ROS oluşum potansiyelini yansıtmıştır.

3.9 Annexin-V Testi

Kontrollü hücre ölümü, hücre homeostazisi ve organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için oldukça önemli ve gereklidir. Apoptozis denilen bu hücre ölüm mekanizmasında bozukluklar meydana geldiğinde kanserleşme ve birçok nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkar (Kupcho ve ark. 2018). DHA maruziyeti sonucu meydana gelen hücre ölümlerinin apoptotik olup olmadığını saptayabilmek için Muse Annexin-V & Dead Cell kit (Millipore, Almanya) kullanılmıştır.

3.9.1 Annexin-V Test Protokolü

Muse Annexin-V & Dead Cell kiti temel olarak, hücrelerde bulunan moleküllerin Annexin-V ve 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) ile işaretlenmesi sonucu, moleküllerin floresans şekilde saptanmasıdır. Bu işlem sonucu hücrelerin erken ve geç apoptotik olarak belirlenmesi sağlanır.

Hücreler 25 m^{2}' lik flasklara 25000 hücre/flask oranında ekilmiştir. Flasklar 24 saat süresince 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler 24 saat boyunca, XTT testi sonucu belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, IC_{75} ve IC_{90} konsantrasyonlarında dozlanmıştır. Dozlama sonrasında, herbir gruptan 500 hücre/ µL oranında süspanse edilerek, oluşan süspansiyondan 1:1 oranında Annexin V & Dead Cell Assay kit çözeltisi ile karıştırılarak 30 dakike süre ile oda sıcaklığında karanlık bir ortam oluşturularak beklemeye alınmıştır. Muse Cell Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) ile canlılığını sürdüren hücreler ile birlikte erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve ölü hücrelerin yüzdeleri saptanmıştır.

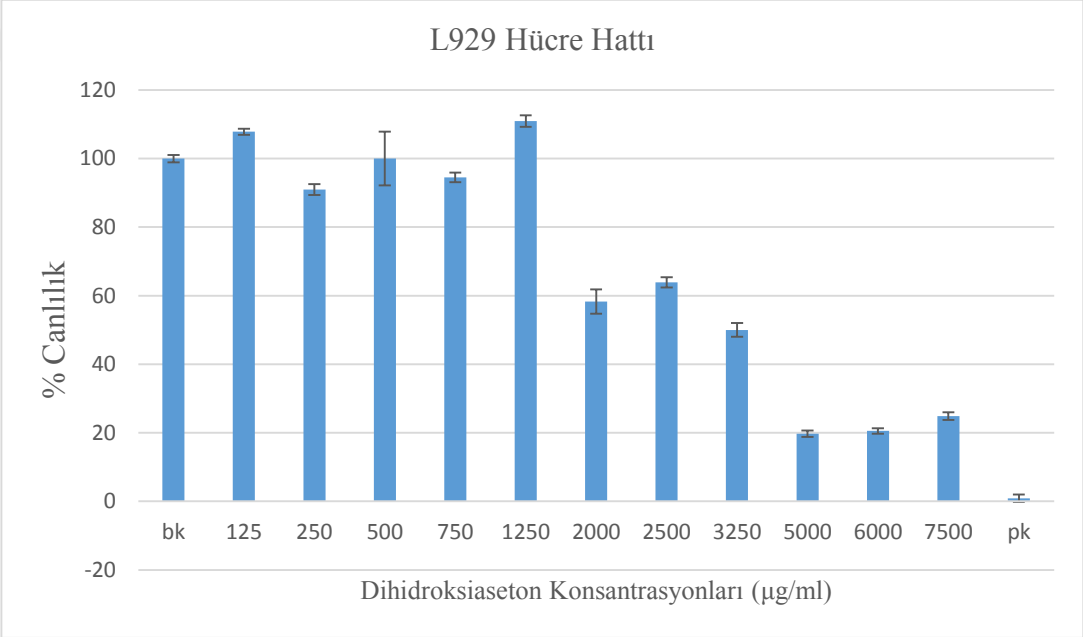
İstatistik Analiz

Bu tez çalışmasında tüm deneyler en az üç bağımsız tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlarda bu verilerin ortalama değerleri ve standart hata değerleri verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 22 paket programıyla gerçekleştirilmiştir. Analizlerde One way ANOVA ardından Tukey, Tamhane veya Mann Whitney U testlerinden uygun olanlar verilerin normal dağlım gösterip göstermemesine ve/veya varyansların homojenliğine bağlı olarak seçilerek uygulanmış, her deneyin bulgularında sonuçlara yer verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 XTT Testi Bulguları

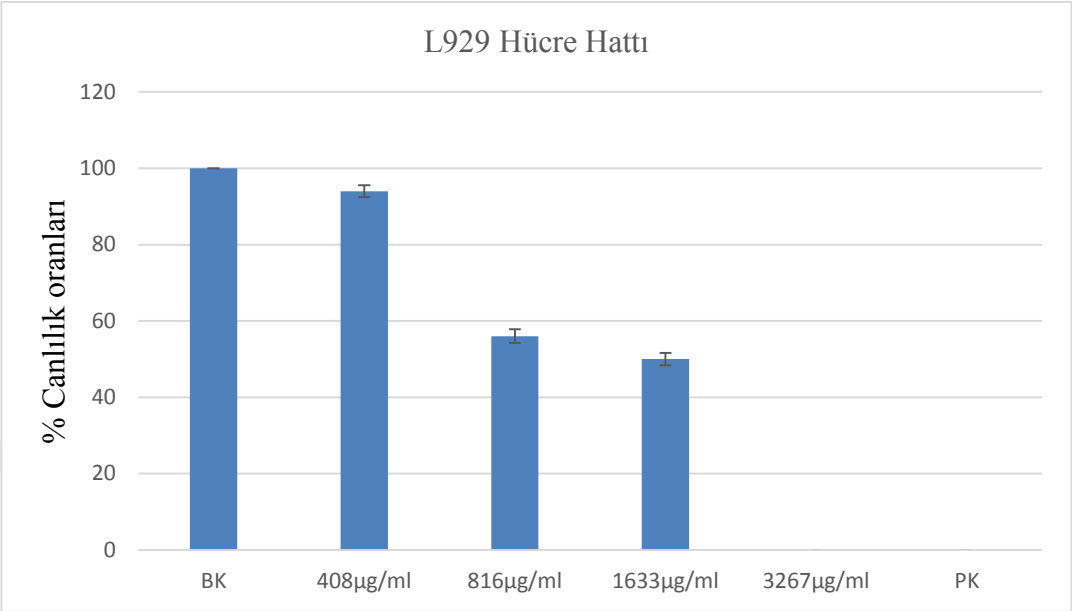
L929 hücre hattı 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1250 µg/mL, 2000 µg/mL, 3250 µg/mL, 5000 µg/mL, 6000 µg/mL, 7500 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat süre ile dozlanmış ve Şekil 4.1' de verilen IC_{50} değeri 3267 µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. L929 hücre hattında uygulanan dozlar sonucu bulunan IC_{50} değeri

4.2 Klonojenik Test Bulguları

L929 hücre hattında 408 µg/mL, 816 µg/mL, 1633 µg/mL, 3267 µg/mL konsantrasyonlarında yapılan dozlama sonucunda canlılık oranları saptanmış ve Şekil 4.2' de gösterilmiştir. Bu test sonucunda dozlara bağlı olarak koloni oluşumunda belirgin bir azalış izlenmiştir.



Şekil 4.2. Farklı DHA dozları ile muamele edilen L929 hücrelerinde klonojenik test ile saptanan canlılık oranları

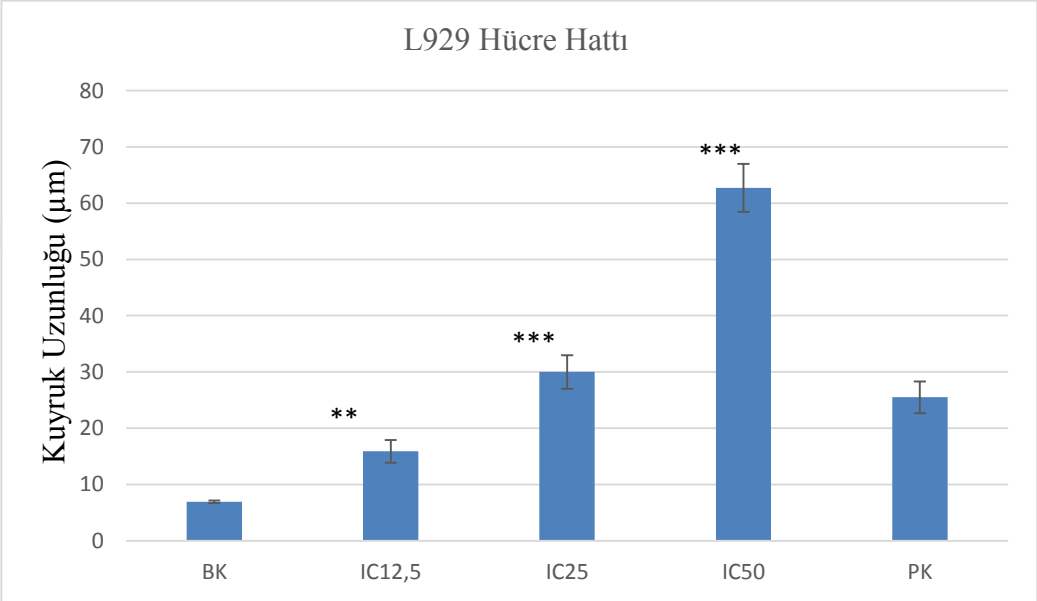
4.3 Komet Testi Bulguları

Komet testinde kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve Olive kuyruk momenti (OTM) parametreleri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistik analizi SPSS22 kullanılarak yapılmıştır.

4.3.1 Kuyruk Uzunluğu Bulguları

L929 hücre hattının, farklı konsantrasyonlarda dihidroksiaseton ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulanan $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında kuyruk uzunlukları sırasıyla; 15,8916 ± 2,028851 µm, 30,00438 ± 2,982061 µm, 62,71508 ± 4,277578 µm olarak saptanmıştır. Ek olarak kontrol gruplarında büyüme kontrol (BK) için 6,93001 ± 0,234072 µm ve pozitif kontrol (PK) için 25,51678 ± 2,81541 µm olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır.

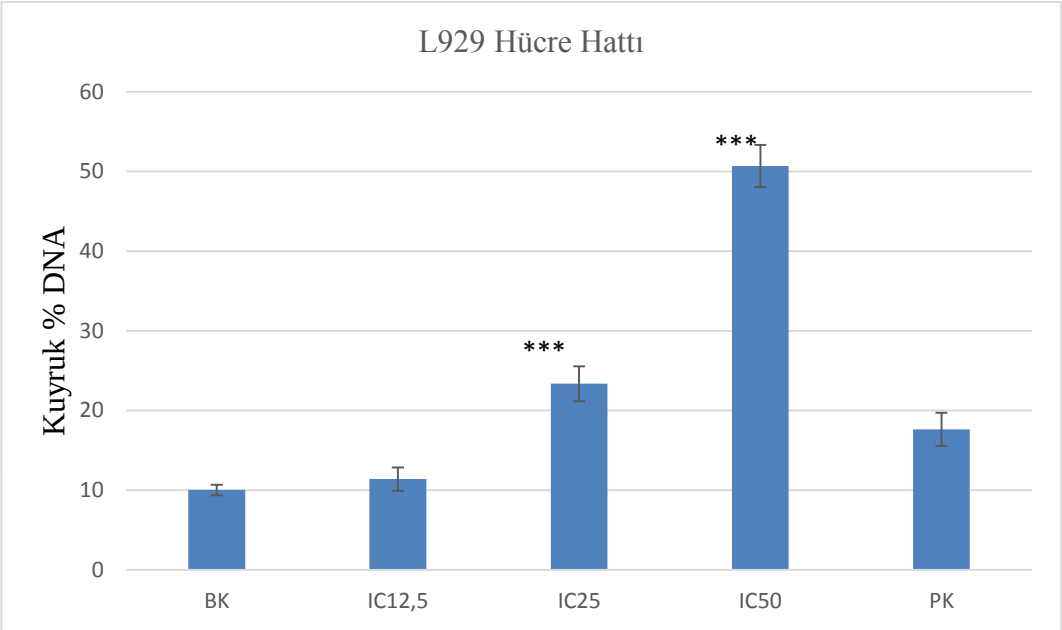
Analiz sonucunda kontrol grupları ile $IC_{12,5}$ dozu arasında ($p \leq 0,01$**), IC_{25} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) ve IC_{50} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3 te verilmiştir.



Şekil 4.3. Komet testi ile belirlenen kuyruk uzunlukları

4.3.2 Kuyruk % DNA Bulguları

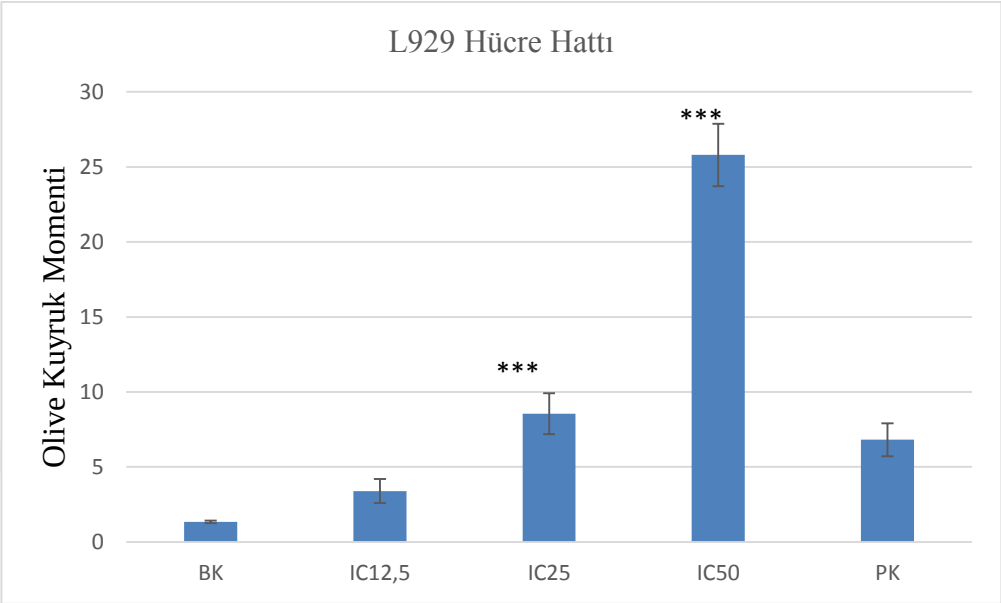
L929 hücre hattının, farklı konsantrasyonlarda dihidroksiaseton ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulanan $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında elde edilen kuyruk % DNA değerleri sırasıyla; 11,40449 ± 1,46695 µm, 23,36795 ± 2,19770 µm, 50,69072 ± 2,65486 µm olarak saptanmıştır. Ek olarak kontrol gruplarında büyüme kontrol (BK) için 10,02923 ± 0,64535 µm ve pozitif kontrol (PK) için 17,6425 ± 2,08996 µm olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Analiz sonucunda kontrol grupları ile IC_{25} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) ve IC_{50} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4 te verilmiştir.



Şekil 4.4. Komet testi ile belirlenen kuyruk % DNA bulguları

4.3.3 Olive Kuyruk Momenti Bulguları

L929 hücre hattının, farklı konsantrasyonlarda dihidroksiaseton ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulanan $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında elde edilen olive kuyruk momenti değerleri sırasıyla 3,39206 ± 0,79702 µm, 8,54212 ± 1,369017 µm, 25,79738 ± 2,075285 µm olarak saptanmıştır. Ek olarak kontrol gruplarında büyüme kontrol (BK) için 1,33515 ± 0,083262 µm ve pozitif kontrol (PK) için 6,81338 ± 1,104332 µm olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Analiz sonucunda kontrol grupları ile IC_{25} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) ve IC_{50} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5 te verilmiştir.

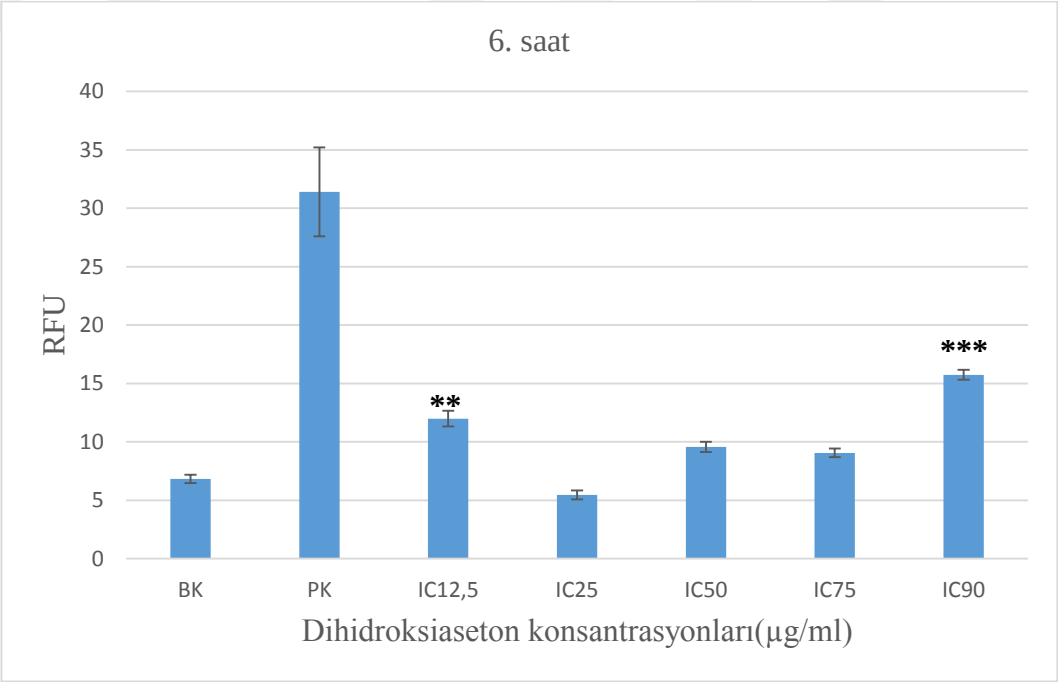


Şekil 4.5. Komet testi ile belirlenen OTM bulguları

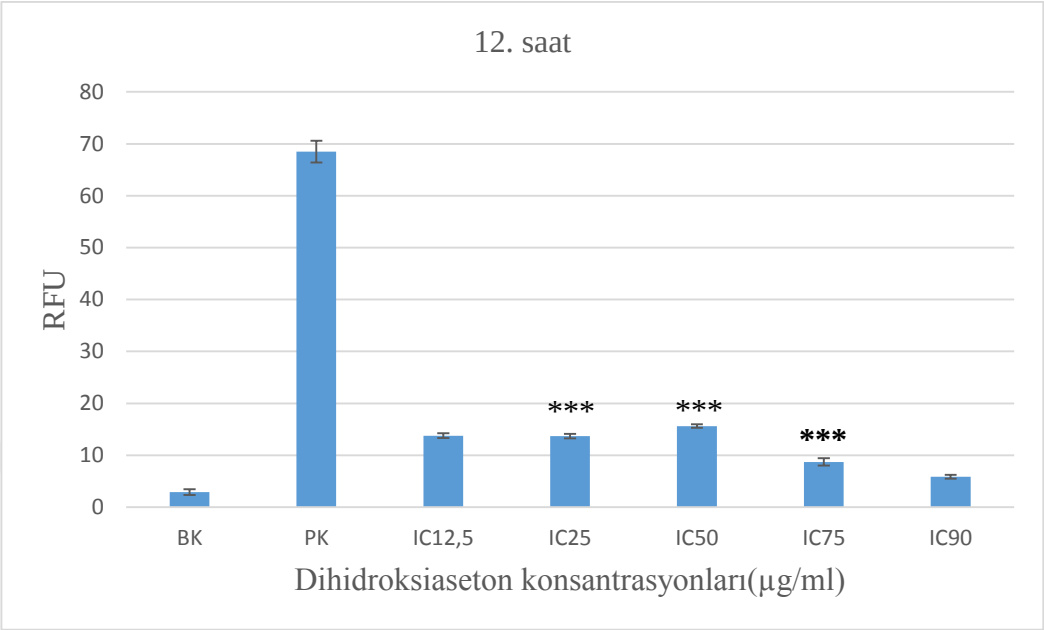
4.4 ROS Testi Bulguları

L929 hücre hattı dihidroksiasetonun, XTT ile belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, IC_{75} ve IC_{90} dozları ile muamele edilmiş ve altı saat, on iki saat ve yirmi dört saat sonraki ROS seviyeleri ölçülmüştür. Uygulanan dozlar ile belirlenen ROS değerleri 6. saatte sırasıyla 11,9925 ± 0,664235, 5,4504 ± 0,386381, 9,572638 ± 0,440138, 9,0572 ± 0,367497, 15,74625 ± 0,41937 olarak saptanmıştır. Kontrol gruplarında bu değerler büyüme kontrol (BK) için 6,841475 ± 0,353641 ve pozitif kontrol (PK) için 31,4175 ± 3,806714 olarak belirlenmiştir. 12. saatte sırasıyla 13,77125 ± 0,459921, 13,6875 ± 0,417521, 15,62 ± 0,319523, 8,69875 ± 0,703306, 5,869625 ± 0,359733 olarak saptanmıştır. Kontrol gruplarında bu değerler büyüme kontrol (BK) için 2,8915 ± 0,577855 ve pozitif kontrol (PK) için 68,48875 ± 2,096096 olarak belirlenmiştir. 24. saatte sırasıyla 2,842375 ± 0,239645, 3,768125 ± 0,400821, 4,60325 ± 0,366103, 2,409363 ± 0,353567, 2,150275 ± 0,726502 olarak saptanmıştır. Kontrol gruplarında bu değerler büyüme kontrol (BK) için 1,093413 ± 0,170808 ve pozitif kontrol (PK) için 0,2438 ± 0,003308 olarak belirlenmiştir. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS22 kullanılmıştır. One-way Anova ve Post-Hoc / Tamhane uygulanmıştır.

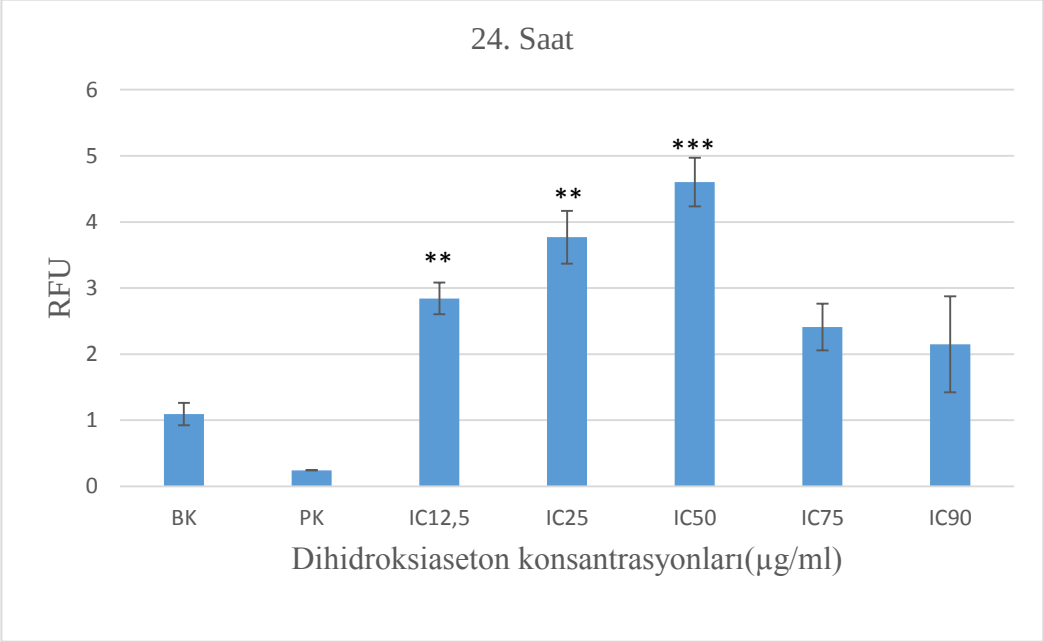
Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 6.saat için $IC_{12,5}$ dozu arasında ($p \leq 0,01$**), IC_{90} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) dozu arasında anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. 12.saat için IC_{25} dozu arasında ($p \leq 0,001$***), IC_{50} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) ve IC_{75} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. 24. saat için kontrol grupları ile $IC_{12,5}$ ve IC_{25} dozu arasında ($p \leq 0,01$**), IC_{50} dozu arasında ($p \leq 0,001$***) anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.6. 6. saat ROS ölçümü bulguları



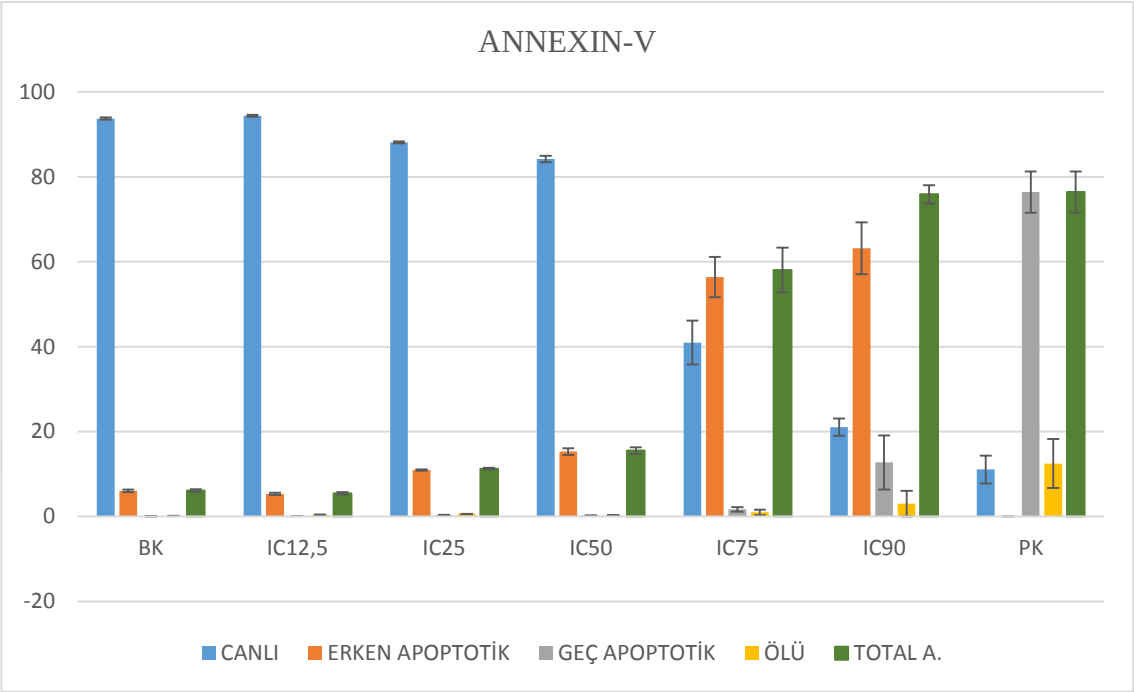
Şekil 4.7. 12. saat ROS ölçümü bulguları



Şekil 4.8: 24. saat ROS ölçümü bulguları

4.5 Annexin-V Testi Bulguları

XTT testi sonucu belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, IC_{75} ve IC_{90} konsantrasyonlarında 24 saat süresince gerçekleştirilen DHA ile dozlanma sonucunda elde edilen canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik, ölü hücre ve total apoptotik hücre sayılarının yüzdelik oranları ve standart hata değerleri sırasıyla 94,35 ± 0,225469 (canlı hücre), 5,333333 ± 0,296282 (erken apoptotik), 0,116667 ± 0,016667 (geç apoptotik), 0,4 ± 0,100003 (ölü), 5,45 ± 0,28432 (total apoptotik), 88,11667 ± 0,202765 (canlı), 10,95 ± 0,160732 (erken apoptotik), 0,333333 ± 0,066669 (geç apoptotik), 0,6 ± 0,028868 (ölü), 11,28333 ± 0,216673 (total apoptotik), 84,19 ± 0,766247 (canlı), 15,29333 ± 0,770333 (erken apoptotik), 0,233333 ± 0,044097 (geç apoptotik), 0,283333 ± 0,033334 (ölü), 15,52667 ± 0,790726 (total apoptotik), 40,96 ± 5,155656 (canlı), 56,40333 ± 4,738076 (erken apoptotik), 1,666667 ± 0,537458 (geç apoptotik), 0,976667 ± 0,617657 (ölü), 58,06667 ± 5,269545 (total apoptotik), 21,06 ± 2,038916 (canlı), 63,18333 ± 6,114393 (erken apoptotik), 12,72667 ± 6,385173 (geç apoptotik), 3,03 ± 3,030089 (ölü), 75,91 ± 2,147488 (total apoptotik) şeklinde belirlenmiştir. Kontrol gruplarında bu değerler büyüme kontrol (BK) için 93,73333 ± 0,258744 (canlı), 6,05 ± 0,300009 (erken apoptotik), 0,083333 ± 0,044097 (geç apoptotik), 0,133333 ± 0,044097 (ölü), 6,133333 ± 0,268232 (total apoptotik) şeklinde ve pozitif kontrol (PK) için 11,08667 ± 3,283694 (canlı), 0 (erken apoptptik), 76,41667 ± 4,844184 (geç apoptotik), 12,49667 ± 5,773477 (ölü), 76,41667 ± 4,844184 (total apoptotik) şeklinde belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9 da verilmiştir.



Şekil 4.9. Annexin-V bulguları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Uzun bir geçmişi olan kozmetiklerin kullanımı günümüzde de oldukça yaygındır. Geçmişte çoğunlukla doğal yöntemler ile elde edilen kozmetikler, modern zamanda teknolojinin de desteği ile birçok farklı içerik kullanılarak üretilmektedir. Doğal bileşenlerin yanısıra sentetik bileşenlerin de kozmetik ürünlerde bulunması sebebiyle bu ürünlerin güvenli olup olmadıkları sorusunu akıllara getirmektedir. Kullanılan her bileşiğin bilimsel yöntemlerle araştırılması, kullanıma uygun olup olmadıkları ve hangi miktarlarda güvenli olduklarının belirlenmesinde en etkili yöntemdir.

Kozmetik ürünlerin, içeriklerinde bulunan bileşenlerin etkilerinin bilinmemesi, gereğinden fazla kullanılması ya da yanlış uygulanması sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bu sağlık sorunları hafif alerjik reaksiyonlar olabileceği gibi çağın hastalığı olan kanserin bir çeşidi olan melanoma da neden olabilmektedir.

Melanom dünya çapında hızla büyüyen ve hızlı metastaz yeteneği olan, lokal olarak tekrarlayabilen malign karakterde bir tümör olarak tanımlanabilir. 2020 senesi kanser istatistiklerinde melanom insidansı incelendiğinde %7 erkek hastaların % 4 kadın hastaların saptanması ile beş ve altıncı sıralarda yer aldığı görülmektedir. Küresel düzeyde yıllık olarak hemen hemen 23 100 vaka ve 55 500 ölüm ile Amerika'da yaygınlıkta altıncı sırada yer almaktadır (Chen ve ark. 2022).

Melanomların önemli nedeni UV maruziyetidir. Güneş ışınları dışında brozlaşma sağlamak ya da elde edilen bronzluğu koruyabilmek adına solaryum cihazları kullanılmaktadır. Solaryum cihazlarının kullanımı ile de UV radyasyonuna maruz kalınmaktadır. Alınan UV radyasyonu DNA da hasar oluşturmakta, oksidatif stresi artırmakta ve cilt iltihaplanmalarına yol açmaktadır. Temelde bronzlaşma UV ışınlarına karşı geliştirilen fizyolojik bir tepkidir. Bu tepkinin düzeyi, genetik yapı, cilt ve saç rengi, ciltte oluşmuş önceki bronzlaşmanın geçmişi gibi faktörlerce belirlenmektedir (Sample ve He 2017). Malign cilt tümörlerinin %2 si melanomdur ve en tehlikeli formu kutanöz melanomdur.

Kutonöz melanom pigmentli melanositlerden kökenlenmektedir (Zhang ve ark. 2022). Genellikle, sürekli güneş ışınlarının alınması ile cilt melanositleri melanomlara dönüşebilmektedir (Shoji ve ark. 2022). Bu dönüşümün temelinde melanositlerin UV ışınlara verdiği tepkinin düzensizleşmesi yatmaktadır (Sample ve He 2017).

Ciddi melanomlara ek olarak UV ışınlara maruz kalmak çeşitli mutasyonlara, ışık kaynaklı yaşlanmaya (fotoyaşlanma), ve immun sistem baskılanmasına da sebep olmaktadır (Vechtomova ve ark. 2021).

Birçok çalışmada yer verilen UV zararlarının bilinmeye başlanması ile bronzluğun sağlanmasında daha güvenli yollar aranmaya başlanmıştır. Güneşsiz bronzlaştırılar ya da otobronzlaştırıcılar olarak adlandırılan ürünlerin amacı UV maruziyeti olmadan doğal bronzluğu taklit etmektir. Cilde topikal uygulama ile geçici olarak bronzluk oluşturulur. Elde edilen renk miktarı uygulanan ürünün miktarı ile bağlantılıdır. Bronzan kozmetiklerin tercih edilmesinde bir diğer etken ise uygulanma kolaylığı ve doğal görünüm oluşturmasıdır (Foltis ve ark. 2022). Bronzlaştırıcı kozmetiklerin ana bileşeni dihidroksiasetondur (DHA). DHA, cildin stratum korneum tabakasında bulunan aminoasitler ile etkileşime girerek Maillard reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlar. Bu reaksiyon ile melanositler gibi bronzlaşma oluşturan melanoidinler meydana gelir. Böylece DHA, UV ışınlarına gerek olmadan ciltte bronzluk sağlamış olur (Turner ve ark. 2022). Sıklıkla kullanılmaya başlanan bronzan kozmetiklerin ana bileşeni olan DHA nın oksidatif stresi artırdığı ve meydana getirdiği maillard reaksiyonu sonucunda ileri glikasyon ürünlerinin ortaya çıktığı bilinmektedir (Smith ve ark. 2018).

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmamızda, otobronzanlarda kullanılması FDA tarafından onaylanmış tek bileşen olan (Striz ve ark. 2021) DHA' nın sitotoksik ve genotoksik etkileri L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Muhtemel sitotoksik etkiler XTT ve klonojenik test yöntemleri ile araştırılmıştır. Tez çalışmamızda uygulanan XTT protokolü sonucunda, L929 fare fibrolast hücre hattında IC_{50} değeri 3267 μg/mL olarak belirlenmiştir. Smith ve ark. (2019) tarafından HEK293T hücre hattında yapılan çalışmada,

hücrelerde DHA maruziyeti sonucu hayatta kalma oranlarının düştüğü bildirilmiştir. Bu düşüşün DHA' nın geliştirdiği reaksiyonlar sonucu oluşan ileri glikasyon ürünlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. A375P hücre hattı ile yapılan bir başka çalışmada da DHA maruziyetinin hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (Smith ve ark. 2018). Bahsedilen çalışmalar ile tez çalışmamızda uyguladığımız XTT protokolü sonuçları DHA' nın sitotoksik etkileri olduğu düşüncesini desteklemektedir.

DHA bileşeninin sitotoksik etkilerini araştırdığımız bir diğer yöntem olan klonojenik testte L929 fare fibroblast hücre hattı farklı konsantrasyonlarda DHA ile 24 saat süre ile dozlanmıştır. Test sonucunda elde ettiğimiz bulgulara bakılarak doz artışı ile birlikte, belirlenen 1633 μg/mL dozuna kadar hücrelerin koloni oluşturabilme yeteneklerinde düşüş gözlenmiş ve bu doz sonrasında hücrelerin koloni oluşturamadığı saptanmıştır. Uygulanan iki sitotoksisite testi de dihidroksiasetonun sitotoksik etkilerinin varlığını göstermektedir.

Tez çalışmamızda DHA' nın sitotoksik etkilerin araştırılmasına ek olarak DNA üzerindeki genotoksik etkileri de komet testi uygulanarak araştırılmıştır. $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} konsantrasyonlarında uygulanan DHA etkileri kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momenti parametreleri ile değerlendirilmiştir. Kuyruk uzunluğu bulgularına bakıldığında L929 hücre hattında 24 saat DHA maruziyeti sonucunda kontrol grupları ile anlamlı farklılıklar olduğu görülmektedir. Kuyruk % DNA parametresi incelendiğinde ise uygulanan farklı konsantrasyonlarda, özellikle IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarında %DNA içeriğindeki artışın kontrol gruplarına göre anlamlı derecede farklı olduğu belirlenmiştir. Olive kuyruk momenti parametresi ise yine IC_{25} ve IC_{50} konsantrasyonlarında, kontrol gruplarına göre istatistiki olarak en yüksek anlamlı farklılığın oluştuğu görülmektedir. Uygulanan komet protokolü ile DHA' nın DNA'da tek ve çift iplik kırıkları oluşturduğu anlaşılmaktadır. Çift iplik kırıkları DNA'da onarılması oldukça zor ve toksik hasarlar grubundandır (Barrows ve ark. 2022). DHA'nın direk olarak deri epitel hücreleri üzerine uygulanmasından sonra cildin canlı katmanlarına ulaşamadığı düşünülmekteydi. Ancak sonrasında yapılan çalışmalar DHA'nın canlı kısımlara absorbe olduğu ve hatta kan dolaşımına katıldığının ortaya çıkması sebebiyle bu hücrelerdeki DNA hasar olasılığının

artışı göz önünde bulundurulması gereken bir durumdur (Smith ve ark. 2019). İnsan epidermal keratinositleri ile yapılan çalışmada DHA' nın benzer şekilde 50 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında DNA'da hasar oluşturduğu komet testi ile belirlenmiştir (Striz ve ark. 2021).

Oksidatif stres sitotoksik ve genotoksik etkilerin artmasına neden olan bir diğer sebeptir. Hücrede reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ve artışı oksidatif stresi yükseltmektedir. Bu bilgiye dayanarak tez çalışmamızda DHA' nın hücre içi ROS oluşumundaki etkisi ROS ölçümü testi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı DHA' nın XTT ile belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, IC_{75} ve IC_{90} dozları ile altı, on iki ve yirmi dört saat boyunca dozlanmış ve hücre içinde meydana gelen ROS oluşumlar hesaplanmıştır. Belirlenen RFU değerleri incelenerek DHA maruziyeti sonrasında hücre içi ROS oluşumunda artış saptanmıştır. Mehta ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada bahsedildiği gibi bu tez çalışmasında da her üç zaman dilimine ait ölçüm ve istatistiksel analiz sonucunda kontrol grupları ile karşılatırma yapılmış ve ROS seviyelerindeki artış gözlenmiştir. ROS kavramı hücrede farklı sinyaller meydana getiren ve hasarlara sebep olan molekülleri tanımlamaktadır (Sies ve ark. 2022). Bu moleküller yüksek oranda reaktif özelliğe sahip olmakla birlikte hücre içinde artışı oksidatif hücre ölümüne ve apoptoza neden olmaktadır. (Mansoor ve ark. 2022). Ek olarak hücre farklılaşma ve proliferasyonunda, translasyon ardından meydana gelen proteinlerin modifikasyonunda, gen ekspresyonu olaylarında önemli bir rol üstlenen bu molekülün miktarı, fizyolojik açıdan normal olan hücrelerde homeostazinin sağlanması için korunmaktadır (Zhang ve ark. 2022). Hücre içinde metabolizmaya katılan oksijenin indirgenmesi ile oluşan reaktif oksijen türlerinin (serbest radikaller ve prooksidanlar) miktarı artmaya başlar. ROS artışı olarak ifade edilen bu durum hücrede oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres hücre üzerinde toksik etkiye sahiptir. ROS artışı ile oksidatif stres düzeyindeki yükselmenin toksisitesinin sonucunda DNA hasarları meydana gelmektedir. Oluşan DNA hasarları ise kanserleşmenin en temel nedenidir (Özcan ve ark. 2015). Çalışmamızda kullandığımız DHA' nın da meydana getirdiği ROS artışı olası risklerin göstergesidir. DNA' da hasar ve ROS artışı hücre ölümü yani apaoptoza yol açan önemli olaylardır.

Bu sebeple hücre ölümü mekanizmalarını göstermesi nedeniyle çalışmamızda uygulanan protokoller sonucunda elde edilen bulgular ışığında hücrelerin ölüm mekanizmalarını anlayabilmek adına L929 hücre hattında XTT testi sonucu belirlenen $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, IC_{75} ve IC_{90} konsantrasyonları ile Annexin-V testi yapılmıştır. Bahsedilen konsantrasyonlar ile 24 saat süre ile gerçekleştirilen dozlama sonucunda DHA' nın hücrelerdeki apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Geçmiş yıllarda Petersen ve ark. (2004) tarafından DHA ile yapılan bir çalışmada elde edilen bulgular neticesinde hücrelerin apoptoza gittiği düşünülmüştür ve günümüzde yapılan bu tez çalışması bu fikri desteklemektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve geçmişte yapılan çalışmalar ışığında DHA kullanımının risklerinin belirlenebilmesi için daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılmasının önemli olduğunu ve ilerletilen çalışmalar ile bu bileşiğin hangi mekanizmalar ile hangi riskleri doğurduğunun da bilinmesi sağlanacaktır. Meydana gelebilecek olumsuzlukların, ortaya çıkış şeklinin bilinmesinin çözüme ulaşmada en güvenilir yol olduğunu düşünmekteyiz. Özellikle kozmetik ürünler gibi kolay ulaşılabilir ve kolay uygulanabilir ürünler vasıtasıyla bu bileşene maruziyetin artması sonucu doğabilecek olumsuz sonuçları en aza indirebilmek adına yapılacak olan çalışmalar sayesinde, bilinçli ve güvenli kullanım sağlanmasını umut etmekteyiz.

KAYNAKLAR

Almayahi, B. A. (2021). Alpha particle rates and heavy metal concentrations in cosmetics available in the Najaf markets. *Heliyon*, 7(5).

Amano, K., Xiao, K., Wuerger, S., Meyer, G. (2020). A colorimetric comparison of sunless with natural skin tan. *Plos One*, 15(12).

Angerer, J., Bernauer, U., Chambers, C., Degen, G.,. Rastogi, S. C., Rogiers, V., Sanner, T., Van Benthem, J., Van Engelen, J., Waring, R., White, I.R. (2010). Opinion on dihydroxyacetone. *Scientific Committee on Consumer Safety*, https://ec.europa.eu/health/system/files/2016-11/sccs_o_048_0.pdf

Anonim, (2005). Kozmetik Kanunu. https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/03/20050330-1.htm

Anonim, (2010). Dibütil ftalat. https://www.ataman-chemicals.com/urunler/dibutil-ftalat-2593.html

Anonim, (2014). Cosmetics europe the personel care association. https://www.reach-gs.eu/news.asp?lang=TR&id=79

Arshad, H., Mehmood, M. Z., Shah, M. H., Abbasi, A. M. (2020). Evaluation of heavy metals in cosmetic products and their health risk assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(7): 779-790.

Asri, F., Sönmez, S. (2006). Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. *Derim*, 23: 36-45.

Ayenimo, J. G., Yusuf, A. M., Adekunle, A. S., Makinde, O. W. (2010). Heavy metal exposure from personal care products. *Bulletin of Contamination and Toxicoloy*, 84(1): 8-14.

Balasubramanian, B., Meyyazhagan, A., Chinnappan, A. J., Alagamuthu, K. K., Shanmugam, S., Al-Dhabi, N. A., Ghilan, A. K. M., Duraipandiyan, V., Arasu, M. V. (2020). Occupational health hazards on workers exposure to lead (Pb): A genotoxicity analysis. *Journal of Infection and Public Health*, 13(4): 527-531.

Barrows, J. K., Lin, B., Quaas, C. E., Fullbright, G., Wallace, E. N., Long, D. T. (2022). BRD4 promotes resection and homology-directed repair of DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, 13(1): 1-10.

Başaran, N. (2009). Çevresel faktörler ve kanser. https://docplayer.biz.tr/6179222-Cevresel-faktorler-ve-kanser.html

Bocca, B., Pino, A., Alimonti, A., Forte, G. (2014). Toxic metals contained in cosmetics: A status report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(3): 447-467.

Borowska, S., Brzóska, M. M. (2015). Metals in cosmetics: implications for human health. *Journal of Applied Toxicology*, 35: 551-572.

Brix, N., Samaga, D., Hennel, R., Gehr, K., Zitzelsberger, H., Lauber, K. (2020). The clonogenic assay: robustness of plating efciency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiation Oncology*, 15(1): 1-12.

Carocci, A., Genchi, G., Sinicropi, M. S. (2014). Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 229: 1-18.

Castelain, F., Castelain, M. (2012). Parabens: a real hazard or a story?. *Eur J Dermatol*, 22(6): 723-727.

Chen, Y., Guo, L., Zhou, Z., An, R., Wang, J. (2022). Identifcation and validation of a prognostic model for melanoma patients with 9 ferroptosis-related gene signature. *BMC Genomics*, 23(1): 1-15.

Cichowska, J., Figiel, A., Stasiak-Rózanska L., Witrowa-Rajchert, D. (2019). Modeling of osmotic dehydration of apples in sugar alcohols and dihydroxyacetone (DHA) solutions. *Foods*, 8(1): 20.

Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L. M., Pagliaro, M. (2018). Dihydroxyacetone: an updated insight into an important bioproduct. *Chemistry Open*, 7: 233-236.

Clark, S. M., Wilkinson, S. M. (1998). Phototoxic contact dermatitis from 5-methoxypsoralen in aromatherapy oil. *Contact Dermatitis*, 38(5): 289-290.

Cordeiro, A. C., Salvador, B. C., Szpak, R., Tonin, F. S., Borba, H. H., Maluf, D. F., Wiens, A. (2022). Allergic contact dermatitis after the use of cosmetics containing parabens: systematic review and meta-analysis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65.

Crinnion, W. J. (2010). Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. *Alternative medicine review*, 15(3): 190-196.

Curtis, A.R., Sheehan, D. J. (2006). Sunless tanning: a review. *Cosmetic Dermatology*, 19(11): 691-694.

Çağlar, A. B., Saral, S. (2014). Kozmetolojide toksisite sorunu. *Turkish Journal of Dermatology*. 8(4).

Çetinkaya, S. (2009). Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, 36(1): 59-66.

Çomoğlu, T. (2010). Kozmetikler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16: 1-8.

Daadaa, N., Tanfous, B. 2020. Riehl melanosis. *StatPearls Publishing*, https://europepmc.org/article/NBK/nbk557437

Demir, N., Göktürk, T. Akçay, O. (2014). Bazı kozmetik ürünlerde ağır metal (Pb, Cd) tayini. *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 9(2): 194-200.

Draelos, Z. D. (2002). Self-tanning lotions are they a healthy way to achieve a tan?. *New Ethicals Journal*, 6(1): 59-61.

Erkekoğlu, P., Giray, B., Durmaz, E., Özmert, E., Kızılgün, M., Derman, o., Yurdakök, K. (2010). Fitalat teması ile plazma amilaz ve lipaz düzeyleri arasındaki ilişkinin pubertal jinekomasti hastalarında değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Arşivi*, 45(4): 66-70.

Escalada, M. G., Harwood, J. L., Maillard, J. Y., Ochs, D. (2005). Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6): 879-882.

Fang, J. L., Stingley, R. L., Beland, F. A., Harrouk, W., Lumpkins, D. L., Howard, P. (2010). occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. *Journal of Environmental Science and Health*, 28(3): 147-171.

Foltis, P., Galdi, A., Oresajo, C. (2022). Sunless Tanning Products. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*, 2022: 200-203.

Fransway, A. F., Fransway, P. J., Belsito, D. V., Yiannias, J. A. (2019). Paraben toxicology. *Dermatitis*, 30(1): 32-45.

Fu, J. M., Dusza, S. W., Halpern, A. C. (2004). Sunless tanning. *Journal of American Academy of Dermatology*, 50(5): 706-713.

Gee, R. H., Charles, A., Taylor, N., Darbre, P. D. (2008). Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*, 28(1): 78-91.

Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11).

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81(10): 1253-1262.

Glaser, A. (2004). The ubiquitous triclosan a common antibacterial agent exposed. *Pesticides and You*, 24(3): 12-17.

Gomez Escalada, M., Harwood, J. L., Maillard, J. Y., Ochs, D. (2005). Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 879-882.

Gupta, A. K., Haberman, H. F., Pawlowski, D., Shulman, G., Menon, I. A. (1985). Canthaxanthin. *International Journal of Dermatology*, 24(1): 528-532.

Hemmaphan, S., Bordeerat, N. K. (2022). Genotoxic effects of lead and their impact on the expression of DNA repair genes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(7).

Herbst, M. C. (2014). Fact sheet and position statement on sunless tanning. *Cancer Assosiation of South Africa*, 1-10.

Hsieh, T. H., Tsai, C. F., Hsu, C. Y., Kuo, P. L., Hsi, E., Suen, J. L., Hung, C. H., Lee, J. N., Chai, C. Y., Wang, S. C., Tsai, E. M. (2012). n-butyl benzyl phthalate promotes breast cancer progression by inducing expression of lymphoid enhancer factor 1. *Plos One*, 7(8).

Ilozumba, M. N., Shelver, W. L., Hong, C., Ambrosone, C.B., Cheng, T. D. (2022). Urinary concentrations of triclosan, bisphenol a, and brominated flame retardants and the association of triclosan with demographic characteristics and body fatness among women with newly diagnosed breast cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8).

Janjua, N. (2008). Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *International Journal of Andrology*, 31: 118-130.

Jung, K., Seifert, M., Herrling, T. (2008). The Fatal Effect of Self-Tanning Agents during UV Irradiation. *SÖFW-journal*, 134(3): 12-17.

Jux, B., Kadow, S., Luecke, S., Rannug, A., Krutmann, J., Esser, C. (2011). The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation–induced skin tanning. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(1): 203-210.

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. (2004). Metallerin çevresel etkileri-I. *Metalurji Dergisi*, 137: 46-51.

Kang, K. S., Che, J. H., Ryu, D. Y., Kim T. W., Li, G. X., Lee, Y. S. (2001). Decreased sperm number and motile activity on the f1 offsipring maternally exposed to butyl-p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(3): 227-235.

Kang, S. C., Lee, B. M. (2005). DNA methylation of estrogen receptor α gene by phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68: 1995-2003.

Kaptanoğlu, A. F. (2013). Kozmetikler ve nanoteknoloji. *Türkiye Klinikleri J Cosm Dermatol-Special Topics*, 6(4): 59-66.

Kizhedath, A., Wilkinson, S., Glassey, J. (2019). Assessment of hepatotoxicity and dermal toxicity of butyl paraben and methyl paraben using HepG2 and HDFn in vitro models. *Toxicology in Vitro*, 55: 108-115.

Kocbek, P., Teskac, K., Kreft, M. E., Kristl, J. (2010). Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO_2 nanoparticles. *Small*, 6(17): 1908-1971.

Krüger, T., Cao, Y., Kjærgaard, S. K., Knudsen, L. E., Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2012). Effects of Phthalates on the Human Corneal Endothelial Cell Line B4G12. *International Journal of Toxicology*, 31(4): 364-371.

Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., Grailer, J., Worzella, T., Riss, T., Lazar, D., Cali, J. J., Niles, A. (2019). A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*, 24: 184–197.

Lee, C., Asato, C., Wang, M., Mao, X., Gobler, C. J., Venkatesan, A. K. (2021). Removal of 1,4-dioxane during on-site wastewater treatment using nitrogen removing biofilters. *Science of the Total Environment*, 771.

Lite, C., Guru, A., Juliet, M., Arockiaraj, J. (2022). Embryonic exposure to butylparaben and propylparaben induced developmental toxicity and triggered anxiety-like neurobehavioral response associated with oxidative stress and apoptosis in the head of zebrafish larvae. *Environmental Toxicology*, 1-17.

Loures, F. V., Levitz, S. M. (2016). XTT assay of antifungal activity. *Bio-protocol*, 5(15).

Macomber, L., Hausinger, R. P. (2011). Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics*, 3(11): 1153-1162.

Mansoor, S., Wani, O. A., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants*, 11(2):225.

Marchese, M. (2014). Parabens and breast cancer. *Natural Medicine Journal*, https://www.naturalmedicinejournal.com/journal/parabens-and-breast-cancer

Mehta, R., Sonavane, M., Migaud, M. E., Gassman, N. R. (2021). Exogenous exposure to dihydroxyacetone mimics high fructose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 62(3): 185-202.

Millikan, L. E. (2001). Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. *Clinics in Dermatology*, 19(4): 371-374.

Mohammad, M., Bakhtiari, A. R., Khodabandeh, S. (2014). Concentration of Cd, Pb, Hg, and Se in different parts of human breast cancer tissues. *Journal of Toxicology*, 2014.

Mohammed, T., Mohammed, E., Bascombe, S. (2017). The evaluation of total mercury and arsenic in skin bleaching creams commonly used in Trinidad and Tobago and their potential risk to the people of the Caribbean. *Journal of Public Health Research*, 6(3): 184-189.

Mu, L., Sprando, R. L. (2010). Application of Nanotechnology in Cosmetics. *Pharmaceutical Research*, 27(8): 1746-1749.

Ohbayashi, N., Fukuda, M. (2022). Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000 Research*, 9.

Olive, P. L., Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1): 23-29.

Olujimi, O. O., Fatoki, O. S., Odendaal, J. P., Okonkwo, J. O. (2010). Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment: a need for more monitoring. *Water Sa*, 36(5):.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3): 331-336.

Parenti, C. C., Ghilardi, A., Torre, C. D., Mandelli, M., Magni, S., Giacco, L. D., Binelli, A. (2019). *Science of the Total Environment*, 650: 1752-1758.

Paul, T., Shukla, S. P., Kumar K., Poojary, N., Kumar, S. (2019). Effect of temperature on triclosan toxicity in Pangasianodon hypophthalmus (Sauvage, 1878): Hematology, biochemistry and genotoxicity evaluation. *Science of the Total Environment*, 668: 104-114.

Perer, J., Jandova, J., Fimbres, J., Jennings, E. Q., Galligan, J. J., Hua, A., Wondrak, G. T. (2020). The sunless tanning agent dihydroxyacetone induces stress response gene expression and signaling in cultured human keratinocytes and reconstructed epidermis. *Redox Biology*, 36.

Petersen, A. B., Wulf, H. C., Gniadecki, R., Gajkowska, B. (2004). Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(2): 173-186.

Petersen, A. B., Wulf, H. C., Gniadecki, R., Gajkowska, B. (2004). Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. *Mutation Research*, 560: 173-186.

Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of Visualized Experiments*, 49.

Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., Moghadamnia, A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: an update. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 8(3):135-145.

Raj, S., Jose, S., Sumod U. S., Sabitha M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(3): 186-13.

Rietschel, R. L., Fowler, J. F., Fisher, A. A. (2008). Fisher's Contact Dermatitis. PMPH-USA. 862.

Rogers, C. J. (2005). Spray-on Tanning. *Aesthetic Surgery Journal*, 25(4): 413-415.

Sağır, S., Çavuşoğlu, K., Yapar, K. (2013). 1,4-Dioksan verilen swiss albino farelerde yeşil çayın bazı fizyolojik ve genotoksik parametreler üzerine koruyucu etkisi. Erzincan *University Journal of Science and Technology*, 6(2): 145-155.

Sample, A., He, Y. (2017). Mechanisms and prevention of UV- induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 34: 13-24.

Sarı, C. (2021). Relationship between personal care and cosmetic product use in pregnancy and fetal health. *Turkish Journal of Family Medicine & Primary Care*, 15(3): 633-638.

Schettler, T. (2005). Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*, 29: 134-139.

Schmid, D., Belser, E., Zülli, F. (2007). Self-tanning based on stimulation of melanin biosynthesis. *Cosmetics & Toiletries Magazine*, 122(7): 55-62.

Schwahn, D. J., Xu, W., Herrin, A. B., Bales, E. S., Medrano, E. E. (2001). Tyrosine levels regulate the melanogenic response to a-melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Research*, 14(1):32-39.

Sharma, V., Anderson, D., Singh, S., Tobin, D. J. (2011). Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(5): 3782-3788.

Sheehan, D. J., Lesher, J. L. (2005). The effect of sunless tanning on behavior in the sun: a pilot study. *Southern Medical Journal*, 98(12):1192-1196.

Shi, K., Zhang, H., Xu, H., Liu, Z., Kan, G., Yu, K., Jiang, J. 2022. Adsorption behaviors of triclosan by non-biodegradable and biodegradable microplastics : kinetics and mechanism. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4084672

Shipar, A. H. (2006). Formation of the Heyns rearrangement products in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: a computational study. *Food Chemistry*, 97(2): 2331-243.

Shoji, Y., Bustos, M. A., Gross, R., Hoon, D. S. B. (2022). Recent developments of circulating tumor cell analysis for monitoring cutaneous melanoma patients. *Cancers*, 14(4): 1-17.

Sies, H., Belausov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamato, M., Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Rewievs Molecular Cell Biology*, 23: 499-515.

Sipahi, H., Charehsaz, M., Güngör, Z., Erdem, O., Soykut, B., Akay, C., Aydın, A. (2015). Risk assessment of allergen metals in cosmetic products. *Journal of Cosmetic Science*, 66(5): 313-323.

Smith, K. R., Granberry, M., Tan, M. C. B., Daniel, C. L., Gassman, N. R. (2018). Dihydroxyacetone induces G2/M arrest and apoptotic cell death in A375P melanoma cells. *Environmental Toxicology*, 33(3): 333-342.

Smith, K. R., Hayat, F., Andrews, J. F., Migaud, M. E., Gassman, N. R. (2019). Dihydroxyacetone exposure alters NAD(P)H and induces mitochondrial stress and autophagy in HEK293T cells. *Chemical Research in Toxicology*, 32: 1722-1731.

Steingraber, S. (2007). The falling age of puberty in US girls. http://stopwestnilesprayingnow.org/FallingAgeofPuberty.pdf

Striz, A., Depina, A., Jones, R., Gao, X., Yourick, J. (2021). Cytotoxic, genotoxic, and toxicogenomic effects of dihydroxyacetone in human primary keratinocytes. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 40(3): 232-240.

Suliman, R. S., Alghamdi, S. S., Ahmad, D., Alghamdi, R. I., Alotaibi, R., Alghwainm, M ., Aljammaz, N. A. (2021). Comparative analysis of the heavy metals content in selected colored cosmetic products at Saudi market. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 12(4): 430-434.

Sun, Y., Lin, L., Zhang, P. (2021). Colour development kinetics of Maillard reactions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(9): 3495-3501.

Szychowski, K. A., Skora, B., Bar, M., Piechowiak, T. (2022). Triclosan (TCS) affects the level of DNA methylation in the human oral squamous cell carcinoma (SCC-15) cell line in a nontoxic concentration. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 149.

Tapia, E., Delgado, M., López, L., Gilabert, M., Falcón, M., Sebastiani, G., Sailer, S., Algar, O., Fernández, V. (2021). Toxic elements in traditional kohl-based eye cosmetics in spanish and German markets. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11).

Terasaki, M., Masakazu, M. (2008). Determination of chlorinated byproducts of parabens in swimming pool water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88(13): 911-922.

Turner, J., O'loughlin, D. A., Green, P., McDonald, T. O. Hamill, K. J. (2022). In search of the perfect tan: Chemical activity, biological effects, business considerations, and consumer implications of dihydroxyacetone sunless tanning products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022.

Utaş, S. (2013). Kozmetiklere bağlı istenmeyen reaksiyonlar. *TÜRKDERM*, 37(3): 161-169.

Uzel, İ. (2011). Anadolu uygarlıklarında kozmetoloji. *Lokman Hekim Journal*, 1(1): 47-54.

Vechtomova, Y. L., Telegina, T. A., Buglak, A. A., Kritsky, M. S. (2021). UV radiation in DNA damage and repair involving DNA-photolyases and cryptochromes. *Biomedicines*, 9(11): 1-13.

Wang, M., Charareh, P., Lei, X., Zhong, J. L. (2019). Autophagy: multiple mechanisms to protect skin from ultraviolet radiation-driven photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

Yaşar, Ö., Akdeniz, Ş. (2020). Kozmetikler ve kişisel bakım ürünlerinin sağlığa olumsuz etkileri ve hemşirenin rolleri: literatür derleme. *Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(3): 118-125.

Yıldız, F. (2020). İleri glikasyon reaktifleri(AGEs) ve minimal işlenmiş gıda beslenmesi (advanced glycation and products and minimally processed food nutrition) metabolik glikasyon reaksiyonları. *Research Gate*, https://www.researchgate.net/publication/344757789_Ileri_Glikasyon_ReaktifleriAGEs_ve_Minimal_Islenmis_Gida_Beslenmesi_Advanced_Glycation_End_Products_and_Minimally_Processed_Food_Nutrition_Metabolik_Glikasyon_Reaksiyonlari

Yılmazcan, Ö., Erdemir, Ü., Güçer, Ş. (2013). Göz farlarındaki kurşun ve kadmiyum düzeylerinin indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi ile incelenmesi. 3. Kozmetik Kongresi, 15-17 Şubat 2013, Antalya.

Zenker, M. J., Borden, R. C., Barlaz, M. A. (2003). Occurrence and treatment of 1,4-dioxane in aqueous environments. *Environmental Engineering science*, 20(5): 423-432.

Zhang, B., Pan, C., Feng, C., Yan, C., Yu, Y., Chen, Z., Guo, C., Wang, X. (2022). Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Report*, 27(1): 45-52.
Zhang, H., Chen, Z., Zhang, A., Gupte, A. A. Hamilton, D. J. (2022). The role of calcium signaling in melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3).

Zhao, Y., Qu, J., Zhao, M., Wu, P., Xue, J., Jin, H. (2022). Associations between paraben in human serum And rheumatoid arthritis risks. https://www.researchsquare.com/article/rs-1343384/v1

Zhou, W. (2019). The determination of 1,4-dioxane in cosmetic products by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1607.