

## DROSOPHILA MELANOGASTER'DE GLISITEIN VE KOUVESTROLÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN SOMATİK MUTASYON VE REKOMBİNASYON TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Hakan AŞKIN<sup>1\*</sup>, Handan UYSAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 25240, Erzurum

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240, Erzurum

### Özet

Glisitein ve kouvestrol, akuatik çevre kirlenici olarak doğaya karışan bitkisel östrojenlerdendir. Bu çalışmada, glisiteinin ve kouvestrolün potansiyel genotoksik etkileri *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile değerlendirilmiştir. *mwh* ve *flr* işaret genlerini taşıyan üç günlük trans-heterozigot larvalara farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 5 ve 10µM) glisitein ve kouvestrol uygulanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre mutasyon gözlenen kanat sayısı ile toplam mutasyon sayısı arasında negatif veya önemsiz bir ilişki tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, glisitein ve kouvestrolün herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bitkisel östrojenler, Çevresel kirlenici, *Drosophila melanogaster*, genotoksisite, SMART

## DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF GLYCITEIN AND COUMESTROL ON DROSOPHILA MELANOGASTER VIA SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST

### Abstract

Glycitein and coumestrol are phytoestrogens that interfere with nature as aquatic environmental pollutants. In this study, the potential genotoxic effects of glycitein and coumestrol were evaluated by *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test (SMART). Third-instar larvae trans-heterozygous for two genetic markers *mwh* and *flr*, were treated by different concentrations (1, 3, 5 and 10µM) of glycitein and coumestrol. According to our results, there was a negative or insignificant relationship between the number of wings with mutations and the total number of mutations. As a result of this study, it was observed that glycitein and coumestrol did not cause any genotoxic effects.

**Keywords:** Phytoestrogen, Environmental pollutant, *Drosophila melanogaster*, Genotoxicity, SMART

---

\* E-posta: hakanbiyolog@gmail.com

## 1.Giriş

Hayvansal östrojenlere yapısal olarak benzeyen bitkisel östrojenlerin farmakolojik özellikleri nedeniyle insan sağlığı üzerine etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bitkisel östrojenleri içeren bitki özütleri birçok hastalığın tedavisinde (alternatif tıpta) kullanılmaktadır. Ancak, çevresel kirlenmeler olarak bitkisel östrojenlerin canlılar üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri göz ardı edilmiştir. Bu bitkisel östrojenlerden glisitein ve koumestrole kanalizasyon arıtma tesislerinin atıklarında rastlanmıştır [1]. Bitkisel östrojenlerin östrojenik metaboliti olan 4',7-isoflavandiol, gübre uygulanmış tarım alanlarında tespit edilmiştir [2]. Ayrıca östrojenik olarak aktif bitki sterollerini (özellikle  $\beta$ -sitosterol) ziraai topraklarda ve kanalizasyon arıtma tesislerinin atık suyunda da bulunmaktadır [1]. Bu yüzden akuatik çevreler için bitkisel östrojen kirliliği ciddi bir problem olarak görülmektedir. Ayrıca son yıllarda bilim dünyası ve kamuoyunun ilgisi antikanserijen, kalp koruyucusu ve menopozda hormon tedavisi yerine alternatif olarak kullanılmalarından dolayı bitkisel östrojenlerin üzerine odaklanmıştır. Bitkisel östrojenlerce zengin bitkisel besinlerin kullanıldığı diyetler yaygın bir şekilde kanser önleyici olarak tanıtılırken, bu maddelerin sahip olabilecekleri genotoksik etkilerin yanı sıra kanser teşhisi öncesinde ve sonrasında diyete eklenme zamanlamasında veya hormonal ve gelişimsel farklılıkların olduğu doğum öncesi, yeni doğan, ergenlik ve menopoz evrelerinde kullanımlarına karşı da olumsuz eleştiriler dile getirilmiştir [3]. Bitkisel östrojenlerin genotoksik ve potansiyel olumsuz etkileri hayvan ve klinik insan araştırma çalışmalarının yanı sıra *in vitro*'da da bildirilmiştir. Gençler ve yetişkinler arasında bitkisel gıdaların tüketimindeki artışın yanı sıra ticari olarak pazarlanan soya temelli ürün çeşitliliğinin hızlı bir şekilde artması [4] bilim dünyasını kaygılandırmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, özellikle ülkemizde çeşitli hastalıklar için alternatif tedavi amacıyla kullanımı hızla artan ancak tüm dünya ülkelerinde çevresel atık olarak da kabul edilen bitkisel östrojenlerden glisitein ve koumestrolün *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkilerinin olup olmadığını belirlemektir.

## 2.Materyal ve Yöntem

### 2.1. Drosophila hatlarının kültürü

Çalışmada kullanılan *flr<sup>3</sup>* ve *mwh* hatları normal metabolik aktiviteye sahip olup Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir ve standart *Drosophila* besin ortamında ideal yaşama koşullarında (25±10°C ve %60 bağıl nem) kültüre alınmıştır. Belirleyici genlerden flare (*flr<sup>3</sup>* – 3-38.8) geni, kanatlardaki normal düz ve uzun kıllar yerine, körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşturmaktadır. Flare geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Dolayısıyla ergin bireyler oluşmamaktadır. Hem bireyleri flare geninin embriyonik letal etkisinden korumak, hem de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici *TM3* kromozomu kullanılmaktadır. Belirleyici genlerden diğeri *mwh* (multiple wing hair, 3-0.3) geni, kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini göstermektedir.

### 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Glisitein ve koumestrol, Fluka şirketinden satın alınmıştır. *Drosophila* Instant Medium, Etil Metan Sülfonat (EMS), Dimetil sülfoksit (DMSO) ve etil alkol Sigma şirketinden satın alınmıştır.

### 2.3.Yumurta toplama, Larvalara uygulama ve Ergin sineklerin kanatlarının analizi

*flr<sup>3</sup>* ve *mwh* bireyleri normal *Drosophila* besi ortamında çaprazlanarak 8 saat süreyle yumurta toplandı. Glisitein ve koumestrol uygulaması için seçilen 1, 2, 5 ve 10µM derişimler 72 saatlik larvalara uygulandı. Larvalar ergin hale gelinceye kadar bu besiyerleri içinde tutuldu. Ergin hale gelen bireyler toplanarak sabit preparat haline gelinceye kadar %70'lik alkol ve +4°C'de saklandı. Daha sonra Faure solüsyonu kullanarak kanat preparatları hazırlandı. Preparatlar ışık mikroskopunda (400X) incelenerek 3 farklı mutant klon belirlendi. Bu klonlar küçük tek tip (1-2 hücre), büyük tek tip (>2) ve ikiz klonlar olarak sınıflandırıldı. Glisitein ve koumestrol içeren deney gruplarının dışında, EMS pozitif kontrol, distile su negatif kontrol ve kimyasal çözücü olarak kullanılan DMSO da diğeri bir kontrol grubu olarak kullanıldı.

## 2.4. İstatistiksel analiz

Glisitein ve koumestrol uygulanmış sinekler kanatlarındaki her bir tip mutant klonların frekansları, Kastenbaum ve Bowman'ın şartlı binominal testi [5] kullanılarak DMSO kontrol frekansları ile karşılaştırıldı. Bu testten elde edilen olası sonuçlar pozitif, zayıf-pozitif, negatif veya önemsizdir [6].

## 3. Bulgular

Uygulama dozlarının kullanıldığı gruplarda *mwh/flr<sup>3</sup>* ve *mwh/TM3* çaprazlarından elde edilen bulgular Çizelge 1 ve Çizelge 2'de gösterilmiştir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi, glisiteinin normal kanatlara sahip *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipindeki bireylerde hiçbir doz için pozitif sonuç gözlenmemiştir. Tüm klon frekanslarına bakıldığında, sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Uygulama gruplarındaki (1-10µM) toplam klonlar 0.19 ile 0.21 arasında değişim göstermektedir. Bu sonuçlar, DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Benzer durum *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlar için de geçerlidir. Normal kanatlı bireylerden elde edilen klon indüksiyon frekans sonuçları 0.72 ile 0.82 arasında değişirken, serrat kanatlı bireyler için klon indüksiyon frekansının 0.67 ile 1.18 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 1).

Standart çaprazlama sonucu elde edilen trans-heterozigot larvalara koumestrolün uygulaması ile elde edilen sonuçlar incelendiği zaman, normal kanat fenotipine sahip *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipli bireylere ait değerlerin glisiteinden elde edilen değerlere benzediği ve önemsiz farkların elde edildiği görülmektedir. Sadece, 1µM uygulamadaki küçük tek tip ile 3µM uygulamadaki küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlardan elde edilen sonuçlar, DMSO kontrol grubundan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir ( $P>0.05$ ).

Klon indüksiyon frekansları da kontrolden elde edilen sonuçlara yakındır. DMSO grubundan elde edilen KİF 0.72 iken, 5µM koumestrol uygulaması sonucu elde edilen KİF 0.92'dir. Bu iki değer arasında istatistiksel olarak fark yoktur ( $P>0.05$ ). Serrat kanat fenotipinden elde edilen sonuçlarda da herhangi bir pozitif farka rastlanmamıştır. Sonuçlar ya negatif ya da önemsiz bulunmuştur (Çizelge 2). Glisitein ve koumestrolün uygulanan gruplarda *mwh/flr<sup>3</sup>* ve *mwh/TM3* çaprazlarından elde edilen bulgular Çizelge 1 ve Çizelge 2'de gösterilmiştir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi, glisiteinin normal

kanatlara sahip *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipindeki bireylerde hiçbir doz için pozitif sonuç gözlenmemiştir. Tüm klon frekanslarına bakıldığında, sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Benzer durum *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlar için de geçerlidir. Normal kanatlı bireylerden elde edilen klon indüksiyon frekans sonuçları 0.72 ile 0.82 arasında değişirken, serrat kanatlı bireyler için klon indüksiyon frekansının 0.67 ile 1.18 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 1).

Standart çaprazlama sonucu elde edilen trans-heterozigot larvalara koumestrolün uygulaması ile elde edilen sonuçlar incelendiği zaman, normal kanat fenotipine sahip *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipli bireylere ait değerlerin glisiteinden elde edilen değerlere benzediği ve önemsiz farkların elde edildiği görülmektedir. Sadece, 1µM uygulamadaki küçük tek tip ile 3µM uygulamadaki küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klonlardan elde edilen sonuçlar, DMSO kontrol grubundan elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir ( $P>0.05$ ). Serrat kanat fenotipinden elde edilen sonuçlarda da herhangi bir pozitif farka rastlanmamıştır. Sonuçlar ya negatif ya da önemsiz bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 1. Glisiteinin *D. melanogaster*'in  $mwh/flr^3$  ve  $mwh/TM3$  hatlarına etkileri

Uygulama Dozu	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam $mwh$ klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat ( $mwh/flr^3$ )																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 mM EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1mM DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
1 $\mu$ M Glisitein	80	12	(0.15)	-	4	(0.05)	i	1	(0.01)	i	16	(0.20)	i	17	(0.21)	i	0.82
3 $\mu$ M Glisitein	80	11	(0.14)	-	3	(0.04)	i	2	(0.03)	i	14	(0.18)	-	16	(0.20)	i	0.72
5 $\mu$ M Glisitein	80	14	(0.18)	i	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	15	(0.19)	i	16	(0.20)	i	0.77
10 $\mu$ M Glisitein	80	11	(0.14)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	15	(0.19)	i	15	(0.19)	i	0.77
Serrat Kanat ( $mwh/TM3$ )																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 mM EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1mM DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
1 $\mu$ M Glisitein	80	10	(0.13)	-	3	(0.04)	-				13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
3 $\mu$ M Glisitein	80	13	(0.16)	-	4	(0.05)	-				17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
5 $\mu$ M Glisitein	80	17	(0.21)	i	6	(0.18)	i				23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1.18
10 $\mu$ M Glisitein	80	15	(0.19)	-	5	(0.06)	i				20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würger (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçlarının gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı ( $10^5$  hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici TM3 kromozomu  $flr^3$  mutasyonu taşımaz. Olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 2. Koumestrolün *D. melanogaster*'in  $mwh/flr^3$  ve  $mwh/TM3$  hatlarına etkileri

Uygulama Dozu	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (>2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam $mwh$ klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			KİF
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Normal Kanat ( $mwh/flr^3$ )																	
Distile su	80	10	(0.13)		2	(0.03)		0	(0.00)		12	(0.15)		12	(0.15)		0.61
1 mM EMS	80	31	(0.39)	+	9	(0.11)	+	6	(0.08)	+	40	(0.50)	+	46	(0.58)	+	2.05
1mM DMSO	80	13	(0.16)		1	(0.01)		0	(0.00)		14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
1 $\mu$ M Koumestrol	80	11	(0.14)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	15	(0.19)	i	15	(0.19)	i	0.77
3 $\mu$ M Koumestrol	80	9	(0.11)	-	2	(0.03)	i	2	(0.03)	i	11	(0.14)	-	13	(0.16)	-	0.56
5 $\mu$ M Koumestrol	80	17	(0.21)	i	1	(0.01)	i	3	(0.04)	i	18	(0.23)	i	21	(0.26)	i	0.92
10 $\mu$ M Koumestrol	80	15	(0.19)	i	0	(0.00)	i	1	(0.01)	i	15	(0.19)	i	16	(0.20)	i	0.77
Serrat Kanat ( $mwh/TM3$ )																	
Distile su	80	14	(0.18)		4	(0.05)		b			18	(0.23)		18	(0.23)		0.92
1 mM EMS	80	34	(0.43)	+	12	(0.15)	+				46	(0.58)	+	46	(0.58)	+	2.36
1mM DMSO	80	16	(0.20)		4	(0.05)					20	(0.25)		20	(0.25)		1.02
1 $\mu$ M Koumestrol	80	11	(0.14)	-	3	(0.04)	-				14	(0.18)	-	14	(0.18)	-	0.72
3 $\mu$ M Koumestrol	80	16	(0.20)	-	5	(0.06)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
5 $\mu$ M Koumestrol	80	15	(0.19)	-	3	(0.04)	-				18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
10 $\mu$ M Koumestrol	80	12	(0.15)	-	7	(0.09)	i				19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0.97

İstatistiksel değerlendirme Frei and Würglers (1988, 1995)'e göre yapılmıştır. Fr, frekans; D, istatistik sonuçlarının gösterimi; KİF, klon indüksiyon frekansı ( $10^5$  hücre); +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m, çarpım faktörü; b, dengeleyici TM3 kromozomu  $flr^3$  mutasyonu taşımaz. Olasılık düzeyi= 0.05.

#### 4.Tartışma ve Sonuç

Çalışmalarımızda kullandığımız glisiteinin genotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir. Normal kanatlara sahip *mwh/flr<sup>3</sup>* genotipindeki bireylerin uygulama gruplarındaki (1-10µM) toplam klonlar 0.19 ile 0.21 arasında değişim göstermektedir. Bu sonuçlar DMSO kontrol ile karşılaştırıldığında, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Glisitein, soya ürünlerinde bulunan toplam izoflavonların yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu bileşiğin biyolojik etkinliği bugüne kadar rapor edilmemiştir. Ancak bu bileşik, daidzein ve genistein gibi diğer izoflavonlarla birlikte birçok kez çalışılmıştır. 150µM konsantrasyona kadar glisiteinin genotoksik etkilerini incelenmiş ve mikronükleus oluşumuna rastlanılmamıştır [7].

Koumestrol uygulanması ile elde edilen sonuçlar, glisitein uygulamasından elde edilen sonuçlara benzemektedir. Koumestrol uygulaması da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmamıştır. Normal kanat fenotiplerinden elde edilen klon indüksiyon frekansları DMSO kontrolde elde edilen sonuçlara yakındır. DMSO grubundan elde edilen KİF 0.72 iken, 5µM koumestrol uygulaması sonucu elde edilen KİF 0.92'dir. Bu iki değer arasında istatistiksel olarak fark yoktur ( $P>0.05$ ). Yapısal olarak izoflavonlara benzeyen koumestanlar içinde en önemli östrojenik aktiviteye sahip olan bileşikler koumestrol ve 4-metoksi koumestrol'dür. Koumestrol çeşitli yonca türlerinin filizlerinde ve diğer baklagillerde bulunmaktadır. Koumestrolün Chinese hamster V79 hücrelerinde hem mutajeniteye, hem de genotoksisiteye (mikronükleus oluşumu) neden olduğu gösterilmiştir [8].

Son yıllarda somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin kullanım alanı genişleyerek çevre kirliliği ile ilgili çalışmalarda da bu test kullanılmaya başlanmıştır. Brezilya'da kanalizasyon ve endüstriyel atıkların direkt olarak boşaltıldığı Cai Nehri'nden belirli dönemlerde alınan örneklerin genotoksik etkisi SMART testi ile analiz edilmiştir [9]. Çalışma sonucunda, atık sularında somatik hücrelerde DNA ile etkileşime girerek mitotik rekombinasyonu indükleyen genotoksinlerin bulunduğu sonucuna varılmıştır. Brezilya'da Japarutaba Nehri'nde yapılan bir çalışmada ise çevresel atıklarca kirletilen yüzey ve dip suyunun genotoksisitesi değerlendirilerek çevre yerleşim yerlerine içme suyu da sağlayan bölgenin sularının genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir [10].

Mekanizma olarak antikanser ajanlar tarafından indüklenen genotoksisite apoptosis ve diğer toksik süreçlerce kanser hücre ölümünü teşvik ederek faydalı olabilmekteyken, spesifik olmayan ajanlar normal hücreleri de öldürebilmektedir. Yaptığımız çalışma sonrası glisitein ve koumestrolün herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı sonucuna varılmıştır.

#### Semboller

°	Derece
C	Santigrat
%	Yüzde değer
µM	Mikro molar
mwh	Multiple wing hair geni
flr	Flare geni
<i>TM3</i>	Dengeleyici gen
EMS	Etil metan sülfonat
DMSO	Dimetil sülfoksit
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
KİF	Klon İndüksiyon Frekansı
Fr	Frekans
D	İndüksiyon frekansı
m	Çarpım faktörü
b	Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu
GL	Glisitein
P	Önem derecesi
>	Büyüktür işareti

**Kaynaklar**

- [1]Pawlowski, S., Ternes, T.A., Bonerz, M., Rastall, A.C., Erdinger, L., Braunbeck, T., “Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen”, *Toxicol In Vitro*, 18, 129-138 (2004).
- [2]Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T., Van Der Kraak, G., “A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff”, *Environ Toxicol Chem*, 22, 2243-2250 (2003).
- [3]Klein, C.B., King, A.A., “Genistein genotoxicity: Critical considerations of in vitro exposure dose”, *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 1–11 (2007).
- [4]Mulligan, A.A., Welch, A.A., Mc Taggart, A.A., Bhaniani, A., Bingham, S.A., “Intakes and sources of soya foods and isoflavones in a UK population cohort study (EPIC-Norfolk)”, *Eur J Clin Nutr*, 61, 248–254 (2007).
- [5]Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., “Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies”, *Mutat Res*, 9, 527-549 (1970).
- [6]Frei, H., Würzler, F.E., “Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results”, *Mutat Res*, 203, 297-308 (1988).
- [7]Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K., “Genotoxicity of phytoestrogens”, *Mutat Res*, 574, 139-155 (2005).
- [8]Kulling, S.E., Metzler, M., “Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol”, *Food Chem Toxicol*, 35, 605-613 (1997).
- [9]Amaral, V.S., Silva, R.M., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., “*Drosophila* wing spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin”, *Mutat Res*, 583, 67-74 (2005).
- [10]Pantaleao, S.M., Alcantara, A.V., Alves, J.P.H., Pavanin, L.A., Graf, U., Rezende, A.A.A., Valadares, B.L.B., Fragiorge, E.J., Souza, N.C., Gutierrez, Z.R., Spano, M.A., “Assessing the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test”, *Environ Mol Mutagen*, 48, 96–105 (2007).