

## Trimetilolpropan Triakrilat'ın Potansiyel Toksik, Genotoksik ve Mutajenik Etkilerinin *Drosophila melanogaster* Kullanılarak Araştırılması

Fatma TURNA DEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Antalya Bilim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Antalya

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0001-8045-8641>

✉: fatma.demir@antalya.edu.tr

### ÖZET

Trimetilolpropan triakrilat (TMPTA), mürekkepler, plastikler, ahşap ve metal kaplamalar gibi farklı malzeme ve formüllerde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Birçok alanda yaygın olarak kullanılmasına rağmen bu maddenin genotoksik potansiyeli çeşitli *in vivo* ve *in vitro* yaklaşımlarla net olarak ortaya konmamıştır. TMPTA'nın olası riskleri hakkında literatürdeki *in vitro* ve *in vivo* verilerin çelişkili olması nedeniyle, bu kimyasal toksisite ve genotoksisite analizleri için kullanılmaya devam etmektedir. Bu bağlamda çalışmanın amacı, *in vivo* bir model olan *Drosophila melanogaster* ile TMPTA'nın potansiyel toksik ve genotoksik etkilerini ortaya çıkarmaktır. Bu amaç doğrultusunda *Drosophila* Comet, kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testleri uygulanmış ve fenotipik değişiklik belirlenmiştir. SMART yönteminde kromozom kırılması, nokta mutasyonu ve mitotik rekombinasyon tek tip klonlara neden olurken; mitotik rekombinasyon ise ikiz klonların oluşmasına neden olmaktadır. *Drosophila* hemosit hücrelerinde DNA hasarını tespit etmek için Comet testi uygulanmıştır. Deneme konsantrasyonu olarak 10 mM konsantrasyon canlılık açısından toksik etki gösterdiğinden, *Drosophila*'da genotoksisite ve mutajenite çalışmaları için 10 mM'nin altındaki konsantrasyonlarda testler yapılmıştır. Özellikle test edilen tüm toksik olmayan konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM) TMPTA, *Drosophila* SMART testinde mutajenik etkiler ve Comet testinde genotoksik etkiler göstermiştir. Ancak, TMPTA'nın toksik olmayan konsantrasyonlarında kanatlar, göğüs kılı ve gözler açısından fenotipik değişiklikler tespit edilmemiştir. Bu çalışma, TMPTA'nın *Drosophila*'daki toksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışmadır.

### Biyoloji

### Araştırma Makalesi

### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 27.08.2021

Kabul Tarihi : 19.11.2021

### Anahtar Kelimeler

Trimetilolpropan triakrilat  
*Drosophila melanogaster*  
Genetik hasar  
Somatik mutasyon  
Hemosit

## Investigation of Potential Toxic, Genotoxic and Mutagenic Effects of Trimethylolpropane Triacrylate Using *Drosophila melanogaster*

### ABSTRACT

Trimethylolpropane triacrylate (TMPTA) is a chemical which is commonly used in different materials and formulas such as inks, plastics, wood and metal coatings. Although it is widely used in many fields, the genotoxic potential of this substance has not been clearly demonstrated. Because of the conflictive *in vitro* and *in vivo* data in the literature about possible risks of TMPTA, this chemical remains to be used for toxicity and genotoxicity analyses. In this context, the aim of this study is to reveal the potential toxic and genotoxic effects of TMPTA in *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model. In accordance with this aim, *Drosophila* Comet, wing somatic mutation and recombination test (SMART) were performed and phenotypic alterations were determined. In SMART method, chromosome breakage, point mutation and mitotic recombination cause single spots while mitotic recombination causes twin spots. Comet assay applied to detect DNA damage in *Drosophila* hemocyte

### Biology

### Research Article

### Article History

Received : 27.08.2021

Accepted : 19.11.2021

### Keywords

Trimethylolpropane triacrylate  
*Drosophila melanogaster*  
Genetic damage  
Somatic mutation  
Hemocyte

cells. Since the trial concentration of 10 mM showed toxic effect in terms of viability, tests were carried out at concentrations below 10 mM. All the tested non-toxic concentrations (0.5, 1, 2.5, and 5 mM) of TMPTA showed mutagenic effects in the Drosophila Comet Assay, and genotoxic effects were observed by SMART Assay. However, phenotypic alterations were not detected in non-toxic concentrations of TMPTA in terms of wings, thorax bristle, and eyes. This is the first study in the literature to evaluate the toxic and genotoxic effects of TMPTA in Drosophila.

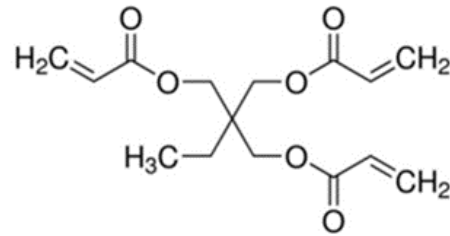
**Atıf Şekli:** Turna Demir, F 2022. Trimetilolpropan Triakrilat'ın Potansiyel Toksik, Genotoksik Ve Mutajenik Etkilerinin Drosophila Melanogaster Kullanılarak Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (6): 1243-1253. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.988017>

**To Cite :** Turna Demir, F 2022. Investigation of Potential Toxic, Genotoxic and Mutagenic Effects of Trimethylolpropane Triacrylate Using Drosophila melanogaster. KSU J. Agric Nat 25 (6): 1243-1253. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.988017>

## GİRİŞ

Son yüzyılda, endüstriyel, ticari ve tarımsal kullanımlardan evsel ve kişisel kullanımlara kadar çeşitli biçimlerde çok sayıda kimyasal madde ile çevrili durumdayız. Bu kimyasalların insanlar da dahil olmak üzere çevredeki farklı canlı organizmalar üzerinde etkisi vardır. Yapılan çalışmalar, bu etkilerin önemli bir konsantrasyon seviyesinde istenmeyen maruziyet durumunda çoğunlukla tehlikeli olabildiğini doğrulamıştır (van Leeuwen ve Vermeire, 2007; Konduracka, 2019). Yapılan çalışmalar, istenmeyen kimyasal maruziyetinin doza bağlı olarak insanlarda ölümcül zehirlenmelere neden olduğunu göstermiştir (Karunarathne, 2021). Bununla birlikte kimyasalların ve ağır metallerin düşük konsantrasyonlarda ekosistemde yer alan diğer canlı organizmalarda ve cansız ortamda birikime ve uzun vadede olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Turna Demir ve Yavuz, 2020; Naidu ve ark., 2021). Genetik toksikolojinin temel amacı, pek çok yöntem kullanılarak çeşitli çevresel etkenlerin neden olduğu DNA hasarının tespit edilmesidir. Kansere yol açan çok aşamalı olaylarda yer alan birçok gendeki mutasyonlar, genetik materyalin çeşitli mekanizmalar ile etkileşimleri ve modifikasyonları tarafından üretilebilir. Örneğin, Feron ve Vogelstein (1996) tarafından tanımlanan kolorektal kanser örneğinde gösterildiği gibi DNA'daki moleküler değişiklikler bu hastalığın oluşumunda önem taşımaktadır (Feron ve Vogelstein, 1996). Genotoksik kanserojen ifadesi, hedef hücrelerin genetik materyalini doğrudan değiştirerek kansere neden olan kimyasallar için kullanılırken, genotoksik olmayan kanserojenler doğrudan genetik hasarı ile ilgili olmayan bazı ikincil mekanizmalarla kansere neden olan kimyasalları ifade etmek için kullanılmaktadır (Hayashi, 1992). Mutajen test sistemlerinin genotoksik kanserojen bileşikler tespit etme potansiyeli, çevresel mutagenез ve genetik toksikoloji biliminin geliştirilmesi ve uygulanması için önemli bir uyarıcı olmuştur (Parry ve Parry, 2012). Trimetilolpropan triakrilat (TMPTA), üç işlevli

bir akrilat monomerdır ve serbest radikal kaynaklarına maruz kaldığında hızlıca polimerleşir. TMPTA'nın kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. TMPTA'nın açık formülü  
Figure 1. Open formula of TMPTA

TMPTA reaktif bir seyreltici ve polimer yapı taşı olarak yaygın olarak kullanılır. Üst baskı vernikleri ve mürekkepleri ile çeşitli ahşap, plastik ve metal kaplamaların formülasyonları TMPTA içermektedir. Son yıllarda çeşitli alanlarda kullanılan bu maddenin neden olduğu genotoksik ve kanserojenik etkiler sınırlı sayıda çalışma ile farklı test yöntemleri kullanılarak *in vivo* ve *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Tg.AC hemizigot farelerde yapılan 6 aylık bir dermal çalışmada TMPTA'nın hem erkek hem de dişi farelerde dermal uygulama bölgesinde deri papillomlarının görülme sıklığını ve çeşitliliğini önemli ölçüde artırdığı sonucuna varılmış olup ayrıca dişi farelerde TMPTA uygulamasına bağlı skuamöz hücreli karsinomların ve kronik inflamasyonun TMPTA uygulama bölgesinde meydana geldiği saptanmıştır (Anonim, 2005). Ayrıca 2 yıllık bir dermal kanserojenite çalışması sonuçlarına göre, TMPTA uygulamasının erkek F344/N sıçanlarda marjinal olarak artmış malign mezotelyoma görülme sıklığına neden olduğu ve dişi farelerde ise nadir görülen malign hepatik neoplazmalar (hepatoblastoma ve hepatokolanjiyokarsinom) ve uterusun stromal polip veya stromal sarkomu görülme sıklıklarının arttığını gösteren bazı kanıtlar tespit edilmiştir (Anonim, 2012). Bu çalışmalarda F344/N sıçanlar ve B6C3F1/N

fareler olmak üzere farklı iki türe ait örnekler TMPTA topikal olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada uygulama bölgesinde tümör görülme sıklığında artış olmamasına karşın inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli cilt deformasyonlarının (epidermal hiperplazi, hiperkeratozis, nekroz ve kronik inflamasyon) gözlemlendiği bildirilmiştir (Anonim, 2012). Bu nedenle son yıllarda, TMPTA'nın genotoksitesinin olası rolünün tespit edilmesinin bu tümörlerin etiyojisinin anlaşılmasında önemli bulgular içerebileceği belirtilmektedir (Kirkland ve Fowler, 2018).

Son yıllarda *Drosophila melanogaster* farklı moleküler ve genetik toksikoloji alanındaki çalışmalarda çeşitli avantajları nedeniyle uygun bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Özellikle kısa yaşam döngüsüne sahip olması, kültüre alınmasının kolay olması ve üretilmesinin oldukça düşük masrafa neden olması ile kısa yaşam döngüsü nedeniyle çok sayıda nesli kısa sürede çalışma imkanı sunması ve insan DNA'sı ile yaklaşık %60, insan hastalıklarından (otizm, diyabet ve kanser gibi) sorumlu genetik materyallerin yaklaşık %75'nin *Drosophila*'da fonksiyonel bir homoloğa sahip olması sebepleri bu canlının ilgi çeken bir model olarak kullanılmasına neden olmuştur (Lloyd ve Taylor 2010; Ong ve ark., 2016).

Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART), *Drosophila*'da larval evrede kimyasal maruziyetinden sonra yetişkin (ergin) sineklerin somatik hücrelerindeki genetik hasar tetiklenmesini değerlendirmeyi amaçlayan *in vivo* hassas bir yöntemdir (Graf ve ark., 1984).

Comet testi, Östling ve Johanson (1984) tarafından tasarlandıktan ve daha sonra Singh ve arkadaşları (1988) tarafından modifiye edilmesinin ardından bugüne kadar çok faydalı bir genotoksitesite analizi haline gelmiştir (Speit ve Hartmann, 1999; Tice ve ark., 2000; Hartmann ve ark., 2003; Collins, 2004). Çeşitli ökaryotik canlılarda kullanılabilen bu yöntem, *Drosophila* hemositlerinde genotoksitesite ve antigenotoksitesitenin tespit edilmesi için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Turna ve ark., 2014; Liman ve ark., 2020).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde TMPTA'nın toksik ve genotoksik etkilerinin bir model organizma olan *D. melanogaster* kullanılarak yapılan bir çalışmanın olmadığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda, yapılan bu çalışmada *D. melanogaster* kullanılarak TMPTA'nın toksik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçlar kapsamında TMPTA'nın olası toksik etkileri canlılık testi ve fenotipik değişiklik tespiti ile değerlendirilirken, genotoksik etkileri hemosit hücrelerinde Comet Testi ve mutajenik, rekombinojenik etkileri ise SMART ile değerlendirilmiştir. TMPTA'nın olası toksik etkileri ve fenotipik değişiklik oluşturma potansiyelinin

tespiti ve genotoksitesite testlerinden olan Comet testi için yabancı tip Oregon-R<sup>+</sup> hattı kullanılmış olup, TMPTA'nın olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin değerlendirilmesi için uygulanan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) için *mwh* ve *flr<sup>3</sup>* hatları kullanılmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Kullanılan *Drosophila* hatları, toksitesite ve kimyasal uygulamaları

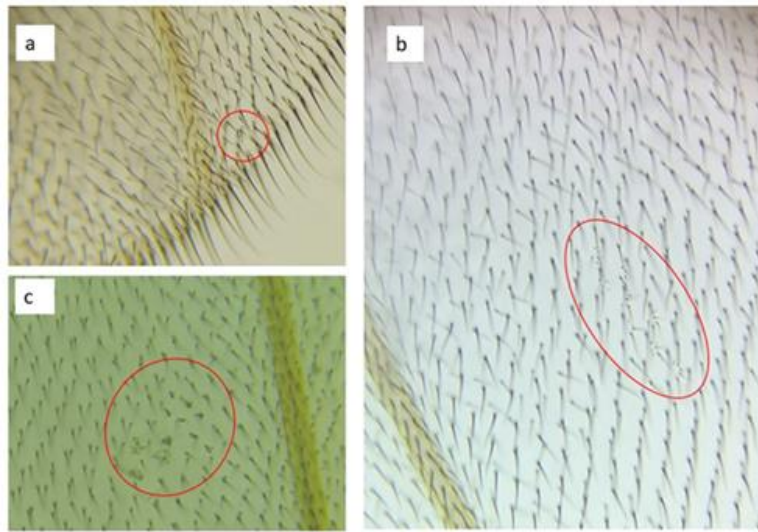
TMPTA'nın (Trimethylolpropane Triacrylate, Saflık: >%75.0, Cas Numarası: 15625-89-5, TCI Chemicals, UK) olası toksik etkileri ve fenotipik değişiklik oluşturma potansiyelinin tespiti ve genotoksitesite testlerinden olan Comet testi için yabancı tip Oregon-R<sup>+</sup> hattı kullanılmış olup, TMPTA'nın olası mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin değerlendirilmesi için uygulanan SMART için *mwh* (*mwh/mwh*) ve *flr<sup>3</sup>* (*flare-3* hatları *flr<sup>3</sup>* /In(3LR) TM3, Bds genetik yapısına sahiptir) hatları kullanılmıştır. SMART için kullanılan *mwh* ve *flr<sup>3</sup>* hatlarının genetik markörleri ve fenotipleri için daha detaylı bilgilere Lindsley ve Zimm (1992)'in yayınından ulaşılabilir. Çalışmalarda kullanılan *Drosophila* hatlarının kültürasyonu standart şartlarda (25±1 °C'de, ~ %60 nem) mısır unu, maya, agar, şeker ve asit (ortofosforik asit ve propiyonik asit) karışımından hazırlanan besi yerleri ile literatürde yer alan çalışmalarda detaylı anlatıldığı biçimde yapılmıştır (Demir ve ark., 2014; Turna ve ark., 2014). TMPTA'nın *D. melanogaster*'deki toksik etkileri canlılık testi ile değerlendirilmiştir. Yumurta verimliliği açısından 3-7 günlük bireyler tercih edilmiştir. Bu *Drosophila* bireyleri yeni bir besin şişesine alınarak 8 saat boyunca yumurta bırakmaları için bekletilmiş ve ardından bu bireyler uzaklaştırılmıştır. Oregon-R<sup>+</sup> erkek ve dişi bireylerinden bahsedilen biçimde 8 saatlik yumurtalar toplanmış ve bu canlılar 72 ±4 saatlik olduklarında *Drosophila* hazır besi yeri (Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) TMPTA'nın farklı konsantrasyonlarının 9 mL'si ile ıslatılmış ve ardından TMPTA konsantrasyonları çözücü kontrol olarak %0.5 Dimetilsülfoksit (DMSO) distile su ile hazırlanmış olup, her bir deney için negatif kontrol olarak çözücü kontrol (%0.5 DMSO) ve ayrıca distile su, *Drosophila* Comet testi için 4 mM, SMART için 1 mM Etil metan sülfonat (EMS) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. EMS, genotoksik etkileri literatürdeki mevcut çalışmalarda tespit edilmesi nedeniyle pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Turna ve ark., 2014; Demir ve Marcos, 2017). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde TMPTA'nın çözücüsü olarak DMSO kullanıldığı belirlenmiş olup (Willems, 1976; Cameron ve ark., 1991; Moore ve Doerr, 1990; Haddouk, 2005) %0.5 ve %0.3 DMSO'nun sırasıyla SMART (Demir ve ark., 2010) ve *Drosophila* Comet yönteminde

(Mukhopadhyay ve ark., 2004) çözücü kontrol olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir. Ergin bireylerdeki fenotipik değişiklik tespiti için her bir konsantrasyon için literatürdeki benzer çalışmalarda belirtildiği şekilde 50 birey kanat, toraks kılları ve göz yapıları açısından değerlendirilmiştir (Mishra ve ark., 2017). Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

### Drosophila Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Bu test, kimyasal ajanlara maruz bırakılan Drosophila larvalarının somatik hücrelerindeki heterozigotluk kaybına dayanmaktadır (Graf ve ark., 1984). Transheterozigot bireyler elde etmek amacıyla, pupadan ergin evreye geçen döllenmemiş *flr<sup>3</sup>* dişi (her bir şişeye 40) ergin bireyleri *mwh* (her bir şişeye 40) erkek bireyler ile çaprazlanmıştır. Bu deney için döllenmemiş dişi bireylere ihtiyaç duyulduğundan 4 saatlik zaman dilimlerinde pupadan çıkan dişi *flr<sup>3</sup>* bireyler erkek bireylerden ayrılarak temiz bir besin şişesine alınmıştır. Deneyler için yeterli larva elde edilebilmesi için çaprazlanan bireylerden 8 saatlik yumurtalar taze besinlere bu bireyler koyularak toplanmıştır. Üç gün sonunda ( $72 \pm 4$  saat sonra) larvalar toplanmış ve bu larvalar daha önce toksik etki göstermediği tespit edilmiş olan TMPTA konsantrasyonları (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM), çözücü

kontrol, distile su ve EMS (1 mM) konsantrasyonları ile ıslatılmış hazır besi yerlerine aktarılmıştır. Larvalar kimyasal uygulanmış bu besi yerleri ile pupa evresine geçinceye kadar beslenmiştir. Pupa evresinden sonra ergin evreye geçen bireyler toplanarak %70 etanol içeren tüplere aktararak 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Mikroskobik analiz için Faure solüsyonu içerisinde ergin bireylerin kanatları ince uçlu pens yardımıyla Stereo mikroskop altında kesilerek preparatlara yapıştırılmış ve tespit edilmiştir. Ardından ışık mikroskobu altında (400X büyütmede) üç tip klon sayılmıştır (Demir ve ark., 2011; Demir ve ark., 2014). Her bir konsantrasyon için 40 bireye ait 80 kanat değerlendirilmiştir. Mutant klonların sayımı esnasında göz önünde bulundurulmuş klonlar literatürde belirtildiği üzere; küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olmak üzere üç tiptir (Graf ve ark., 1984). Bu sınıflandırmaya göre küçük tek tip klonlar; 1 veya 2 tane *mwh* hücrelerinden (Şekil 2a), büyük tek tip klonlar; 3 veya daha fazla *mwh* (Şekil 2b) ya da 4 veya daha fazla flare mutant hücrelerinden (Şekil 2c), ikiz klonlar ise *mwh* ve *flr* hücrelerinin aynı klon içerisinde beraber bulunduğu klonlardan oluşmaktadır. Bahsi geçen klonların bazılarında ait mikroskobik görüntüler Şekil 2'de gösterilmiştir.

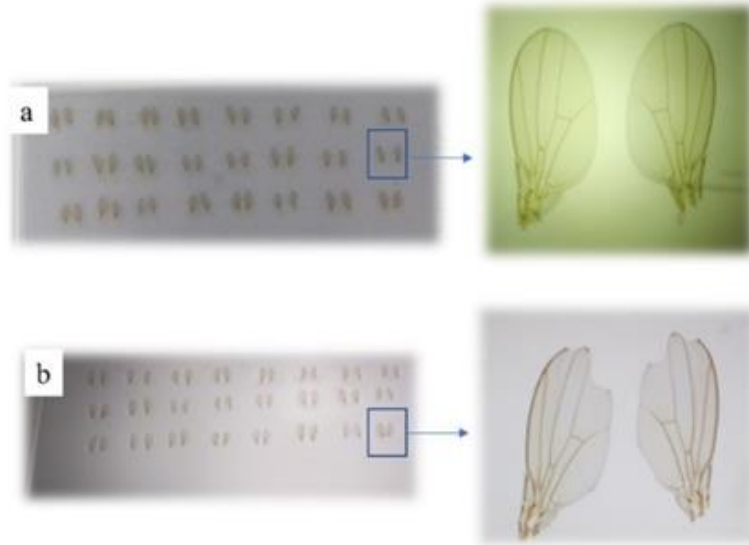


Şekil 2. Mutant klonların mikroskop görüntüleri a) Küçük tek tip klon (*mwh* 1-2)  
b) Büyük tek tip *mwh* klon (*mwh* >2) c) Büyük tek tip *flr<sup>3</sup>* klon (*flr<sup>3</sup>* > 4) (Orijinal)

Figure 2. Microscopic views of mutant clones a) small single spot (*mwh* 1-2)  
b) large single spot *mwh* clone (*mwh* >2) c) large single spot *flr<sup>3</sup>* clone (*flr<sup>3</sup>* > 4) (Original)

Bahsi geçen *flr<sup>3</sup>* geni homozigot durumda embriyolarda ölümcül (letal etki) gösterdiği için bu etkiden bireylerin korunması amacıyla TM3 dengeleyici kromozomu kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra dengeleyici kromozom rekombinasyonu baskılamak suretiyle mutasyon ve rekombinasyonun birbirinden ayırt edilebilmesine olanak sağlamaktadır (Graf ve ark., 1984; Graf ve ark.,

1992). Normal fenotipe sahip kanatlar incelendiğinde bu kanatların kenarları düzgün bir yapıya sahipken (Şekil 3a), *Bd<sup>S</sup>* (Beaded Serrat) genini taşıyan bireylerin kanatları incelendiğinde bu bireylerin kanat kenarlarının düzgün olmadığı (Şekil 3b) gözlenmektedir. Normal kanat ve serrat kanat fenotiplerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Hazırlanan kanat preparatları ve kanat fenotiplerinin görüntüsü a) Normal Kanat b) Serrat Kanat (Orijinal)  
Figure 3. Image of prepared wing slides and wing phenotypes a) Normal wing b) Serrate wing (Original)

Homozigot halde letal etki gösteren dominant  $Bd^S$  geni,  $TM3$  dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle  $TM3$  dengeleyici kromozomuna sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer bireylerden kolaylıkla ayrılabilir (Graf ve ark., 1984; Graf ve ark., 1992). Ayrıca  $TM3$  dengeleyici kromozomu rekombinasyonların baskılanması açısından önem taşımaktadır (Graf ve ark., 1984; Graf ve ark., 1992). Rekombinasyonun dengeleyici kromozomun ( $TM3$ ) tarafından baskılanması sebebiyle serrat kanat fenotipi gösteren bireylerde tespit edilen mutant klonlar yalnızca mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Bu nedenle serrat kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen sonuçlar ile normal kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak etkisi saptanmaya çalışılan kimyasalın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri tespit edilebilmektedir (Frei ve ark., 1985; Vogel, 1992; Gonzales-Cezar ve Ramos-Morales, 1997; Demir ve ark., 2013).

### Drosophila Hemositlerinde Comet Testi

Drosophila hemosit hücrelerindeki DNA hasarının tespit edilmesi için Comet testi uygulanmıştır. Bu amaçla literatürde Drosophila hemositlerinde Comet testi protokolü (Demir ve ark., 2014; Turna ve ark., 2014) takip edilmiştir. Oregon-R+ hattı  $72 \pm 4$  saatlik larvalar toplanmıştır ve ardından bu larvalar çalışmadaki kimyasal konsantrasyonları, çözücü kontrol ve distile su ile uygulanan hazır besi yeri ile  $24 \pm 2$  saat beslenmiştir. Bu sürenin sonunda larvalar musluk suyu altından nazikçe toplanmıştır ve stereo mikroskop altında hemosit izolasyonu Carmona ve arkadaşları (2011) tarafından belirtilen basamaklar izlenerek tamamlanmıştır. Hemolenfteki hemositler, stereo mikroskop altında larvaların kütükülleri ince

uçlu pensler ile kaldırılarak %0.07 Feniltiyöre içeren soğuk Fosfat Tamponu içerisine aktarılmıştır ve ardından mikrosantrifüj tüplerine alınarak santrifüj (300 g, 10 dakika) edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pelet  $20 \mu\text{L}$  soğuk Fosfat Tampon Solusyonu (PBS) içinde yeniden süspanse edilmiştir. Hemosit izolasyonundan sonra tripan mavisi kullanılarak canlılık değerlendirilmesi yapılmıştır (Pool-Zobel ve ark. 1993). Comet testi uygulamaları yapılmadan önce izole edilen hücrelerde canlılığın kontrol edilmesi ve kimyasal uygulamasının akabinde izole edilen hücrelerdeki canlılık sonuçlarının canlı hayvan deneylerindeki hedef doku ve hücreler için %70-80'in altında olması durumunun "aşırılık" belirttiği literatürdeki çalışmalarda belirtilmektedir (Henderson, 1998; Tice ve ark., 2000; Azqueta ve Collins, 2013). Tüm konsantrasyonlarda tripan mavisi ile yapılan canlılık testi sonuçlarının %70'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Hemosit izolasyon basamağının ardından Comet yöntemi uygulamaları Singh ve arkadaşları (1988) tarafından belirtilen basamaklar takip edilerek Demir ve arkadaşlarının (2014) detaylandığı şekilde uygulanmıştır. Bu basamaklar kısaca şöyledir:  $20 \mu\text{L}$  hemosit örneği  $140 \mu\text{L}$  %0.75'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılarak, daha önceden %1'lik normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplanmış preparata yayılmış ve üzeri lamelle kapatılarak 10 dakika  $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Süre bitiminde lameller kaldırılmış ve preparatlar taze hazırlanmış DMSO içermeyen soğuk lizis (2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Tris, %1 Triton X-100 ve %1 N-lauroylsarcosinate, pH 10) solüsyonunda  $+4^\circ\text{C}$ 'de 2 saat ışık almayacak biçimde bekletilmiştir. Ardından takip edilen tüm basamaklar ek genetik hasar oluşmaması için loş ışık altında gerçekleştirilmiştir. DMSO izole edilen Drosophila hücreleri lizis

basamağı için sitotoksik etki gösterebilme potansiyeli nedeniyle, bu olası etkiden kaçınılması amacıyla lizis solüsyonu hazırlanırken kullanılmamıştır (Mukhopadhyay ve ark., 2004; Siddique ve ark., 2005). Preparatlar soğuk elektroforez tamponu (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ve 300 mM NaOH, pH >13) içeren yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve DNA açılma-çözme işlemi için 25 dakika bekletilmiştir. Elektroforez işlemi aynı tampon çözelti içerisinde güç kaynağı 25 V ve 300 mA olarak ayarlanarak 20 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Elektroforez basamağından sonra preparatlar nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris, pH 7.5) içerisinde 5'er dakika 3 kez bekletilmiştir. DNA hasarını floresans mikroskop altında tespit etmek amacıyla Etidyüm Bromür (EtBr) solüsyonu (60 µg mL<sup>-1</sup>) ile boyama yapıp 10 dakika bekletilmiştir ve ardından görüntüler floresans mikroskopta 400X büyütmede elde edilmiştir. Hemositlerdeki DNA hasarının skorlanması için CaspLab Yazılımı kullanılmış ve yüzde olarak kuyruk DNA (% DNA kuyruk yoğunluğu) parametresi değerlendirilmiştir. Bu parametre Comet testinde yaygın olarak önerilen ve kullanılan bir parametredir (Kumaravel ve Jha, 2006). Her bir konsantrasyon için 100 hemosit seçilmiş ve değerlendirilmiştir.

#### İstatistiksel Analizler

Comet testinin istatistiksel analizi için SPSS 20 (SPSS, Chicago, IL) kullanılmış ve t-testi uygulanmıştır. SMART için ise MICROSTA Paket Programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak p<0.05 alınmıştır. Tüm yöntemlerde, istatistiksel açıdan değerlendirmeler yapılırken TMPTA'nın uygulama konsantrasyonlarından (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM) elde edilen sonuçlar çözücü kontrol ile karşılaştırılmış olup, çözücü kontrol ise distile su ile karşılaştırılmıştır.

#### BULGULAR ve TARTIŞMA

TMPTA'nın toksik konsantrasyonlarının tespiti amacıyla, TMPTA'nın 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarına maruz bırakılan Oregon-R+ yabanıl tip 3. evre (72±4 saat) *D. melanogaster* larvalarının gelişerek ergin birey oluşturma (canlılık) yüzdeleri %70'in üzerinde olan konsantrasyonlar (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM) tespit edilmiş olup bu konsantrasyonlar SMART ve Comet testi ile fenotipik değişiklik tespiti için uygulanmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre TMPTA'nın 0.5, 1, 2.5 ve 5 mM konsantrasyonlarının *D. melanogaster* ergin fenotipinde kanat, toraks kılları ve göz yapısı açısından herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Fakat, SMART ve Comet testlerinin sonuçları göz önünde bulundurulduğuna her iki test için de sırasıyla mutajenik etkinin (Çizelge 1) ve DNA hasarının tetiklendiği gözlenmiştir (Şekil 4).

*Drosophila* SMART testinden elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. TMPTA'nın hem normal kanat fenotipine sahip bireylerden elde edilen hem de serrat kanat (*mwh/TM3*) fenotipine sahip bireylerden elde edilen kanatlarda uygulanan TMPTA derişimlerinde (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM) ikiz klon gözlenmemiş olup, büyük tek tip, küçük tek tip, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlarda istatistiksel anlamda önemli pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 1).

Bu bağlamda, uygulanan konsantrasyonların hepsinin *Drosophila* SMART yönteminde mutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan EMS (1 mM) güçlü rekombinojenik ve mutajenik etkisi ile tüm klon tiplerinde pozitif sonuç göstermiştir. *Drosophila* Comet testinden elde edilen sonuçlar Şekil 4'te gösterilmiştir.

Sonuçlar ortalama ± standart hata şeklinde hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak 4 mM EMS, çözücü kontrol olarak %0.5 DMSO uygulanmıştır. TMPTA konsantrasyonları ve pozitif kontrol çözücü kontrol ile, çözücü kontrol distile su ile karşılaştırılmış ve t testi uygulanmıştır (\*= p<0.001; \*\*= p<0.001; \*\*\*= p<0.001).

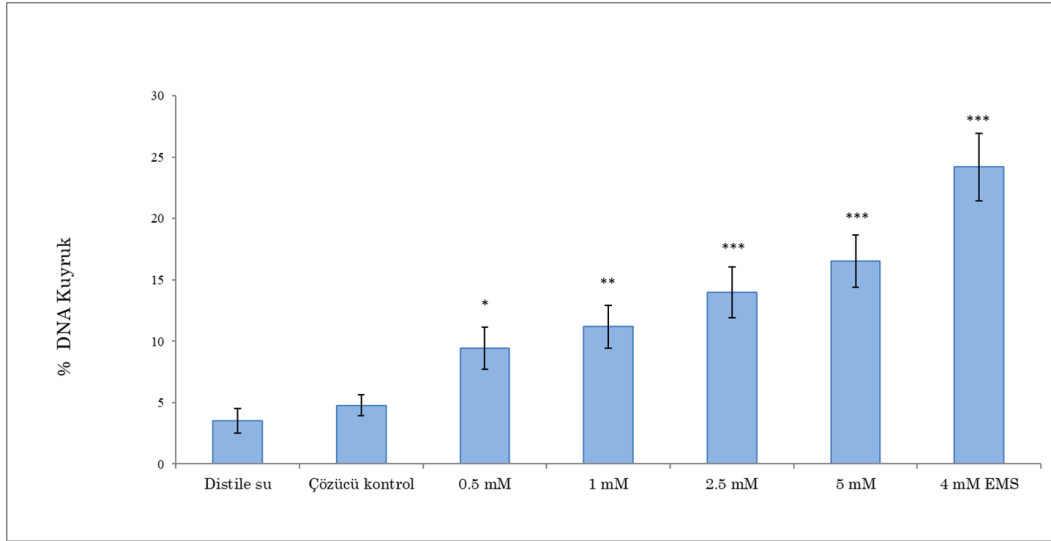
Gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda, TMPTA konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2.5 ve 5 mM) *Drosophila* hemositlerinde % kuyruk yoğunluğu parametresi açısından çözücü kontrol ile istatistiksel açıdan (p<0.05) önemli fark olduğu ve konsantrasyona bağlı bir biçimde DNA hasarı oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. Çözücü kontrol (%0.5 DMSO)'un distile su ile karşılaştırılması sonucu çözücü kontrol ile distile su arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Literatürdeki *in vitro* çalışmaların sonuçları incelendiğinde, TMPTA'nın bakteriyel mutasyon testi Ames testi ile mutajenitesi hakkında farklı araştırmacılar tarafından yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur (Ames ve ark., 1975; Gelbk, 1989; Cameron ve ark., 1991; Anonim, 2018; Anonim, 2021). Bu çalışmaların sonuçları göz önünde alındığında çoğunlukla TMPTA'nın çalışılan suşlarda ve konsantrasyonlarda mutajenite oluşturma bakımında negatif (Anonim, 2018) ve bazı suşlarda ve konsantrasyonlarda ise zayıf pozitif etkiler (Gelbk, 1989) gösterdiği tespit edilmiştir. Memeli hücre kültürü mutajenite testlerinden biri olan Fare Lenfoma testinde (Mouse Lymphoma Assay-MLA) testi kullanılarak TMPTA'nın mutajenik etkileri farklı araştırmacılar tarafından araştırılmış (Myhr, 1979; Dearfield ve ark., 1989; Moore ve ark., 1989; Cameron, ve ark., 1991) ve sonuç olarak *tk* mutasyon sonuçları elde edilmiştir. Moore ve arkadaşları (1989) tarafından yapılan çalışmada, fare lenfoma hücrelerinde TMPTA uygulamasının MLA'da küçük koloni *tk* mutantlarının sıklığının kontrole göre

Çizelge 1. *Drosophila* SMART testinde TMPTA'nın genotoksik (mutajenik) etkisi  
 Table 1. Genotoxic (mutagenic) effect of TMPTA in the *Drosophila* SMART test

TMPTA (mM)	Kanat sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam <i>mwh</i> klonları (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon indüksiyon frekansısı (10 <sup>5</sup> hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Marker heterozigot kanatlar ( <i>mwh/flr</i> <sup>3</sup> ) - Normal Kanat																	
Distile Su	80	9	(0.11)		2	(0.03)		0	(0.00)		11	(0.14)		11	(0.14)		0.56
Çözücü Kontrol	80	11	(0.14)	i	2	(0.03)	i	0	(0.00)	i	13	(0.16)	i	13	(0.16)	i	0.67
1 mM EMS	80	59	(0.74)	+	71	(0.89)	+	8	(0.10)	+	118	(1.48)	+	138	(1.73)	+	6.05
0.5	80	34	(0.43)	+	9	(0.11)	+	0	(0.00)	i	43	(0.54)	+	43	(0.54)	+	2.20
1	80	38	(0.48)	+	16	(0.20)	+	0	(0.00)	i	54	(0.68)	+	54	(0.68)	+	2.77
2.5	80	49	(0.61)	+	20	(0.25)	+	0	(0.00)	i	65	(0.81)	+	69	(0.86)	+	3.33
5	80	42	(0.53)	+	21	(0.26)	+	0	(0.00)	i	62	(0.78)	+	63	(0.79)	+	3.18
Balancer (Dengeleyici) heterozigot kanat ( <i>mwh/TM3</i> ) - Serrat Kanat																	
Distile Su	80	12	(0.15)		2	(0.03)					14	(0.18)		14	(0.18)		0.72
Çözücü Kontrol	80	15	(0.19)	i	4	(0.05)	i				19	(0.24)	i	19	(0.24)	i	0.97
1 mM EMS	80	78	(0.98)	+	43	(0.54)	+				121	(1.51)	+	121	(1.51)	+	6.20
0.5	80	88	(1.10)	+	16	(0.20)	+				104	(1.30)	+	104	(1.30)	+	5.33
1	80	77	(0.96)	+	21	(0.26)	+				98	(1.23)	+	98	(1.23)	+	5.02
2.5	80	96	(1.20)	+	15	(0.19)	+				111	(1.39)	+	111	(1.39)	+	5.69
5	80	89	(1.11)	+	34	(0.43)	+				121	(1.51)	+	123	(1.54)	+	6.20

No: değerlendirilen kanat sayısı; Fr: frekans; D: istatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würzler 1988): +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz fark; m: çarpım faktörü; olasılık düzeyi: 0.05.



Şekil 4. Comet testinde TMPTA maruziyet sonuçları  
Figure 4. TMPTA exposure results in the Comet test

anamlı olarak arttığı ve ayrıca hem Çin hamster yumurtalık hücrelerinde (Chinese hamster ovary cell-CHO) hem de fare lenfoma hücrelerinde kromozom aberasyonunu arttığı gösterilmiştir ve bu sonuçların klastojenik etki ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. TMPTA'nın klastojenik potansiyeli L5178Y fare lenfoma hücreleri ve insan lenfositleri kullanılarak yapılan kromozom aberasyon testlerinden ve L5178Y hücreleri kullanılarak yapılan mikronükleus (MN) testlerinden elde edilen pozitif sonuçlar ile doğrulanmıştır (Dearfield ve ark., 1989; Haddouk, 2005). TMPTA'nın genotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir derlemede literatürdeki çalışmalar özetlenmiştir (Kirkland ve Fowler, 2018).

Literatürde yer alan çalışmalarda TMPTA'nın *in vivo* klastojenitesi, farelerde kemik iliği ve periferik kan örneklerinde MN çalışmaları ile araştırılmıştır (Haddouk, 2006; Anonim, 2012). Ayrıca, 3 ve 6 ay boyunca B6C3F1 or Tg.AC hemizigot farelerde yapılan cilt maruziyeti (cilt boyama) çalışmalarında, uygulama bölgesinde tahrişe ve iltihaplanmaya neden olan dozlarda TMPTA'nın MN'li eritrositlerin sıklığında artışa neden olmadığı gözlenmiştir (Anonim, 2012). Bunun yanı sıra oral yoldan TMPTA uygulanan farelerde kemik iliği polikromotik eritrositlerinde MN artışı olmamıştır (Haddouk, 2006). İntravenöz TMPTA uygulanan CD-1 farelerde kemik iliği ve karaciğer örneklerinde Comet testi gerçekleştirilmiştir (Keig-Shevlin, 2017). Yapılan deneylerin birinde düşük ve orta dozlarda kemik iliğinde Comet kuyruk yoğunluğunda önemli artışlar görülmesine rağmen, diğer deneyde sonuçlar benzer dozlarda tekrarlanmamıştır ve karaciğerde Comet kuyruk yoğunluğunda artış gözlenmemiştir (Keig-Shevlin, 2017). Literatürde TMPTA'nın *in vitro* düşük

konsantrasyonlarda klastojenik etki gösterdiği halde *in vivo* olarak çok daha yüksek konsantrasyonlarda DNA zincir kırılmalarını tetikleyememesinin nedenini açık olmadığı ve bu hususun açıklanmasında maruz kalma süresinin kritik bir faktör olabileceği belirtilmiştir (Kirkland ve Fowler, 2018). *In vitro* çalışmalarda durağan 34 saatlik TMPTA uygulamalarının DNA hasarı ve kromozom kırıklarının tetiklenmesi için yeterli olduğu fakat bu sonuçların oluşması için dinamik *in vivo* maruziyetlerin yeterli olmadığı belirtilmiştir. Bunun en önemli bir diğer nedeni olarak da memeli sağlıklı dokulardaki doğal antioksidan ve detoksifikasyon yeteneklerinin, sitotoksikite ve DNA hasarına karşı hücreleri korumada *in vitro* kültürlenmiş hücrelere göre daha etkili olabilmesi gösterilmektedir (Kirkland ve Fowler, 2018). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu bir şekilde TMPTA'nın insan lenfositlerinde ve Çin hamster yumurtalı hücrelerinde (CHO) kromozom anomalilerini ve muhtemel olarak L5178Y fare lenfoma hücrelerinde bir klastojenik etki yolu ile mutajenik yanıtları tetiklediği gösterilmiştir (Dearfield ve ark., 1989; Haddouk, 2005; Anses, 2019). Yapılan bu çalışmanın SMART sonuçları TMPTA uygulamasının *D. melanogaster*'de mutajenik etkilere neden olduğunu göstermiştir. TMPTA'nın genotoksik ve mutajenik potansiyelinin değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulacak bir diğer husus deneylerde kullanılan çözücüdür. TMPTA'nın çözücü kontrolü olarak sırasıyla DMSO ve Polietilenglikol 400 (PEG-400) kullanılarak yapılan bir *in vitro* çalışmada, PEG-400'de çözünen TMPTA uygulaması sonuçlarının DMSO'da çözünen TMPTA uygulamasına göre 4 kat daha az genotoksik olduğu tespit edilmiştir (Hegarat ve ark., 2020).



Özellikle *in vivo* çalışmalarda çözücülerin sadece kimyasal bileşimin kendisini modifiye etmesinin yanı sıra aynı zamanda kimyasal bileşimin toksikokinetiğini ve dolayısıyla toksisitesini de etkileyebilme potansiyeli olduğu belirtilmektedir. Çözücü madde antioksidan ve anti-enflamatuvar özellik göstererek kimyasalın tetiklediği biyolojik yanıtı engelleyebilme potansiyeline sahiptir. Örneğin PEG-400 ilaç formülasyonlarında kullanılan ve etken maddelerin gastrointestinal emilimlerini etkileyen inaktif yapıda bir bileşiktir (Ma ve ark., 2017).

## SONUÇ

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında, çeşitli *in vitro* çalışmalarda tetiklenen mutajenik ve genotoksik etki ile benzer şekilde *D. melanogaster*'de mutajenik ve genotoksik etkiler gözlenmiştir. Yapılan bu *in vivo* SMART çalışmasında deneysel maruziyet modeli göz önünde bulundurulduğunda bu maruziyet tipinin Graf (1995)'in belirtmiş olduğu üzere larvalarda akut değil kronik maruziyet biçimi olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, literatürdeki *in vivo* çalışmalarda maruziyet biçimlerindeki ve canlı türündeki farklılıklardan kaynaklı olarak hem genotoksik etki gözlenen hem de gözlenmeyen sonuçlar görülmüş ve bu çalışmada *Drosophila* SMART ile elde edilen sonucun açıklanmasında kronik bir maruziyetin söz konusu olması nedeniyle maruz kalma süresinin kritik bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

İlerleyen çalışmalarda, mekanistik açıdan değerlendirmeler ile TMPTA'nın olası genotoksik ve mutajenik etkilerinin farklı test sistemleri ve canlı türleri ile incelenerek aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca son yıllarda TMPTA'nın nanoteknolojik yöntemlerle modifikasyonunu ve farklı formlarının biyomedikal malzemelerin üretimlerini konu alan çalışmaların (Forghani ve ark., 2018) olması nedeniyle, üretilen bu modifiye ürünlerin olası biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi önem taşıyacaktır.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Araştırmanın tasarımı, verilerin toplanması, kaynakların araştırılması, analizlerin yapılması ve makalenin yazımı makale yazarı tarafından yapılmıştır.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

Ames BN, McCann J, Yamasaki E 1975. Methods For Detecting Carcinogens and Mutagens With The

Salmonella/mammalian-microsome Mutagenicity Test. *Mutat Res* 31: 347-364.

Anonim 2005. NTP report (GMM 3) On The Toxicology Studies of Trimethylolpropane Triacrylate (Technical grade) in F344/N Rats, B6C3F1 Mice And Genetically Modified (FVB Tg. AC hemizygous) Mice (Dermal studies), US National Toxicology Program, P.O. Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709, October, 2005, [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/gmm\\_rpts/gmm3.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/gmm_rpts/gmm3.pdf).

Anonim 2012. NTP Technical Report (TR-576) On The Toxicology And Carcinogenesis Studies Of Trimethylolpropane Triacrylate (Technical grade) In F344/N Rats And B6C3F1/N Mice (Dermal studies), US National Toxicology Program, P.O. Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709, December 2012.

Anonim 2018. Willems MI 2018. Evaluation Of TMPTA, PETA and PEGDA in The Salmonella/microsome Mutagenicity Test, Report No. R5144, TNO Laboratories, Zeist, The Netherlands, 2018 (September 1976).

Anonim 2021. NTP. [https://manticore.niehs.nih.gov/cebssearch/test\\_article/15625-89-5](https://manticore.niehs.nih.gov/cebssearch/test_article/15625-89-5).

Anses 2019. Substance Evaluation Conclusion Document For 2-ethyl-2-[[[(1-oxoallyl) oxy] methyl]-1,3-propanediyl Diacrylate (Trimethylolpropane triacrylate), EC No 239- 701-3, CAS No 15625-89-5. In: Evaluating Member State(s): France.

Azqueta A, Collins AR 2013. The Essential Comet Assay: A Comprehensive Guide to Measuring DNA Damage and Repair. *Arch Toxicol* 87(6): 949-968.

Collins AR 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261.

Cameron TP, Rogers-Back AM, Lawlor TE, Harbell JW, Seifried HE, Dunkel VC 1991. Genotoxicity of multifunctional acrylates in the Salmonella/mammalian-Microsome Assay and Mouse Lymphoma TK+/-assay. *Environ Mol Mutagen* 17: 264-271.

Carmona ER, Creus A, Marcos R 2011. Genotoxic Effects of Two Nickel-Compounds in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 718: 33-37.

Dearfield KL, Millis CS, Harrington-Brock K, Doerr CL, Moore MM 1989. Analysis Of The Genotoxicity Of Nine Acrylate/methacrylate Compounds In L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis* 4: 381-393.

Demir E, Kocaoğlu S, Kaya B 2010. Antigenotoxic Properties of Chlorophyllin and Chlorophylls in The *Drosophila* Wing Spot Test. *Fresen Environ Bull* 19(12): 3131-3138.

Demir E, Marcos R 2017. Assessing The Genotoxic Effects of Two Lipid Peroxidation Products (4-oxo-2-nonenal and 4-hydroxy-hexenal) in Haemocytes

- and Midgut Cells of *Drosophila melanogaster* Larvae. *Food Chem Toxicol* 105: 1-7.
- Demir E, Turna F, Kaya B, Creus A, Marcos R. 2013. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food Chem Toxicol* 53: 221-227.
- Demir E, Turna F, Aksakal S, Kaya B, Marcos R 2014. Genotoxicity of Different Sweeteners in *Drosophila*. *Fresenius Environmental Bulletin* 23 (12c): 3426-3432.
- Demir E, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R 2011. Genotoxic Analysis of Silver Nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology* 5: 417-424.
- Feron ER, Vogelstein B 1996. A Genetic Model For Colorectal Tumour Genesis. *Cell* 62: 759-767.
- Forghani A, Garber L, Chen C, Tavangarian F, Tighe TB, Devireddy R, Pojman JA, Hayes D. 2018. Fabrication and characterization of thiol-triacrylate polymer via Michael addition reaction for biomedical applications. *Biomed Mater* 14(1): 015001.
- Frei H, Würgler FE, Juon, Hall CB, Graf U 1985. Aristolochic Acid is Mutagenic and Recombinogenic in *Drosophila* Genotoxicity Tests. *Arc Toxicol* 56: 158-166.
- Frei H, Würgler FE 1995. Optimal Experimental Design and Sample Size for The Statistical Evaluation of Data From Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) In *Drosophila*. *Mutat Res* 334: 247-258.
- Gelbk H-P 1989. Report on the Study of Trimethylolpropanetriacrylat (ZST Test Substance No.: 88/998) In The Ames Test, Project No.: 40M0998/884398, BASF AG, Department of Toxicology, Z 470, 6700 Ludwigshafen/Rh., Federal Republic of Germany, February 1989.
- Gonzales-Cesar E, Ramos-Morales P 1997. Sodium Azide Induces Mitotic Recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 389 (2 3):157-165.
- Graf U 1995. Analysis Of The Relationship etween Age Of Larvae At Mutagen Treatment and Frequency and Size of Spots for The Wing Somatic Mutation and Recombination Test n *Drosophila melanogaster*. *Experimentia* 51: 168-117.
- Graf U, Van Schaik N, Würgler FE 1992. Mutation Genetics. *Drosophila Genetics A pratical Course*, Springer, New York, 239 sy.
- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juan H, Hall CB, Kale PG 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6: 153-188.
- Haddouk H 2005. Trimethylolpropane Triacrylate. In *Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test in Cultured Human Lymphocytes*. Study number 28205 MLH. CIT Laboratories, BP 563, 27005 Evreux, France, December 2005.
- Haddouk H 2006. Trimethylolpropane triacrylate. Bone marrow micronucleus test by oral route in mice. Study number 29406 MAS. CIT Laboratories, BP 563, 27005 Evreux, France, June 2006.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR 2003. Recommendations for Conducting The In Vivo Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Hayashi, Y. (1992). Overview of genotoxic carcinogens and non-genotoxic carcinogens. *Exp Toxicol Pathol* 44(8): 465-471.
- Hegarat LL, Huet S, Pasquier E, Charles S 2020. Impact of Solvents on The in vitro Genotoxicity o TMPTA in Human HepG2 Cells. *Toxicol In Vitro* 69: 105003.
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S 1998. The Ability of The Comet Assay To Discriminate Between Genotoxins and Cytotoxins. *Mutagen* 13: 89-94.
- Karunarathne A, Bhalla A, Sethi A, Perera U, Eddleston M 2021. Importance of pesticides for lethal poisoning in India during 1999 to 2018: a systematic review. *BMC Public Health* 21(1): 1-13.
- Keig-Shevlin Z 2017. TMPTA. Mouse alkaline comet assay. Study number 8354612, Covance Laboratories Ltd., Harrogate, UK, October 2017.
- Kirkland D, Fowler P 2018. A Review of The Genotoxicity of Trimethylolpropane triacrylate (TMPTA). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 828: 36-45.
- Kirkland D, Speit G 2008. Evaluation Of The Ability Of A Battery of Three in vitro Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-carcinogens: III. Appropriate Follow-up Testing in vivo. *Mutat Res Gen Tox En is* 654 (2): 114-132.
- Konduracka E. 2019. A link between environmental pollution and civilization disorders: a mini review. *Rev Environ Health* 34(3): 227-233
- Kumaravel TS, Jha AN 2006. Reliable Comet Assay Measurements for Detecting DNA Damage Induced by Ionising Radiation And Chemicals. *Mutat Res Gen Tox En* 605(1-2): 7-16.
- Liman R, Kursunlu AN, Çiğerci İH, Özmen M, Acikbas Y 2020. Assessment of the Cytotoxic and Genotoxic Potential of Pillar [5] Arene Derivatives by *Allium cepa* Roots and *Drosophila melanogaster* Haemocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* 192: 110328.
- Lindsley DL, Zimm GG 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, 1133 sy.
- Lloyd TE, Taylor JP 2010. Flightless Flies: *Drosophila* Models of Neuromuscular Disease. *Ann N Y Acad Sci* 1184: E1-20.
- Ma BL, Yang Y, Dai Y, Li Q, Lin G, Ma YM 2017. Polyethylene Glycol 400 (PEG400) Affects the Systemic Exposure of Oral Drugs Based on

- Multiple Mechanisms: taking Berberine as an Example. *RSC advances*, 7(5), 2435-2442.
- Mishra M, Sabat D, Ekk, B, Sahu S, Unnikannan P, Dash, P 2017. Oral Intake of Zirconia Nanoparticle Alters Neuronal Development and Behaviour of *Drosophila melanogaster*. *J Nanopart Res* 19(8): 1-12.
- Moore MM, Doerr CL 1990. Comparison of Chromosome Aberration Frequency and small-colony TK-deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis* 5: 609-614.
- Moore MM, Harrington-Brock K, Doerr CL, Dearfield KL 1989. Differential Mutant Quantitation at The Mouse Lymphoma tk And CHO Hgprr loci. *Mutagenesis* 4: 394-403.
- Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A 2004. Evaluation Of In Vivo Genotoxicity of Cypermethrin in *Drosophila melanogaster* Using The Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 19(2):85-90.
- Myhr B 1979. Mutagenicity Evaluation Of Trimethylolpropane Triacrylate In The Mouse Lymphoma Forward Mutation Assay, LBI Project No. 20989, Litton Bionetics Inc., 5516 Nicholson Lane, Kensington, Maryland, USA, January 1979.
- Naidu R, Biswas B, Willett IR, Cribb J, Singh BK, Nathanail CP, Coulon F, Semple KT, Jones KC, Barclay A, Aitken RJ 2021. Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environ Int* 156: 106616.
- Ong C, Lee Q Y, Cai Y, Liu X, Ding J, Yung L-Y L, Bay B-H, Baeg G-H 2016. Silver Nanoparticles Disrupt Germline Stem Cell Maintenance in The *Drosophila* Testis. *Sci Rep* 6: 20632.
- Östling O, Johanson KJ 1984. Microelectrophoretic Study Of Radiation- induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
- Parry JM, Parry EM 2012. *Genetic Toxicology Principles and Methods*. Springer, New York, 433 sy.
- Pool-Zobel BL, Guigas C, Klein R, Neudecker CH, Renner HW, Schmezer P 1993. Assessment of Genotoxic Effects By Lindane. *Food Chem Tox* 31(4): 271-283.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR Schneider EL 1988. A Simple Technique For Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
- Siddique HR, Chowdhuri DK, Saxena D, Dhawan, A 2005. Validation Of *Drosophila melanogaster* As an in vivo Model for Genotoxicity Assessment Using Modified Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 20: 285-290.
- Speit G, Hartmann A 1999. The Comet Assay (Single Cell Gel Test). A Sensitive Genotoxicity Test for The Detection of DNA Damage And Repair. *Methods Mol Biol* 113: 203-212.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki, YF 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines For in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-221.
- Turna Demir F, Yavuz M. 2020. Heavy metal accumulation and genotoxic effects in levant vole (*Microtus guentheri*) collected from contaminated areas due to mining activities. *Environ Pollut* 256: 113378.
- Turna F, Aksakal S, Demir E, Kaya B. 2014. Antigenotoxic Effects of Resveratrol in Somatic Cells Of *Drosophila melanogaster*. *Fresenius Environ Bull* 23: 2116-2125.
- Van Leeuwen CJ, Vermeire TG 2007. *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. Springer, Dordrecht, 686 sy.
- Vogel EW 1992. Tests For Recombinogens In Somatic Cells of *Drosophila*. *Mutat Res* 284: 159-175.