

## DNA HASAR TESPİTİNDE TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ

A.Fatih FİDAN

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya  
Anabilim Dalı, 03200, Afyonkarahisar

### ÖZET

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA’da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. DNA hasarına insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. DNA da oluşan bu hasarların başlıcaları; tek ve çift sarmal kırıkları, oksidatif DNA baz hasarı, DNA-DNA, DNA-protein ve DNA-ilaç çaprazlaşmaları ve DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır. Tek hücre jel elektroforezi yada “Comet Analiz” canlı populasyonlarında, hücre düzeyinde DNA hasar tespitinde kullanılan, hızlı, basit ve çok hassas flouresan mikroskopik yöntemdir.

**Anahtar Kelimeler:** DNA hasarı, Comet Analiz

### THE SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS FOR DETERMINING THE DNA DAMAGE

### ABSTRACT

DNA damages have occurred at different levels due to various *in vivo* and *in vitro* reasons. The damage of DNA has been observed in human and many species of animals such as mice, horse, porcine and fish. These damages occurred in DNA are some structural damages such as single- and double-strand breaks, oxidative base damage, and DNA-DNA, DNA-protein, DNA-Drug crosslinking and mutations in DNA. Single cell gel electrophoresis (SCGE) or so-called “Comet assay” is a rapid, simple and very sensitive fluorescent microscopic method to examine DNA damage at individual cell level in living populations.

**Key Words:** DNA damage, Comet assay

## 1. GİRİŞ

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Hasar, normal DNA'nın kimyasal ve fiziksel yapısındaki bir değişimdir. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne kadar varan etkilere neden olur. DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir [1,2,3,4]

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelir. ROM başta mitokondrial elektron transportu olmak üzere ksenobiotik metabolizması, doğal uyaranlara karşı fagositik aktivasyon, biyosentez ve yıkım gibi olaylar sırasında da oluşur. ROM oluşumunu organizmanın yapısal ve fonksiyonel biyomoleküllerinin oksidatif stres altına girmesine yol açar [2,3,4]. Lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi DNA da ROM'in saldırısına maruz kalır. İnsan bedeninin her hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmaktadır [3]. DNA'da oksidatif baz modifikasyonunun yeni doğan sıçanlarda bile olduğu saptanmıştır [4].

Serbest radikaller DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, purin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur [5,6]. Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken, oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara yol açabilmektedir [7,8]. Farklı radikal metabolitlerin DNA hasarlarına neden oluş mekanizmaları da farklıdır [9]. Yapılan çeşitli araştırmalar süperoksit anyonu ve onun dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksidin doğrudan DNA ile eşleşerek baz oksidasyonuna ve zincir kırıklarına yol açmadığı, ancak geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu ile aktif bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin DNA hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir [10,11]. Singlet oksijen ise, guanine spesifik olarak bağlanarak hasar oluşturur [12,14]. DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid (NO) veya nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>), peroksinitrit (ONOO<sup>·</sup>), dinitrojen trioksit (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve nitrik asid (HNO<sub>3</sub>) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler [13].

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), ROM'un DNA'da yaptığı yaklaşık 23 oksidatif baz hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinenidir. Diğer DNA baz hasar ürünlerinin daha az mutajenik olmaları muhtemeldir. İlk defa 1984 yılında Kasai ve Nishimura tarafından, oksidatif DNA hasarının bir belirteci olarak tespit edilmiştir [6,15].

Bir popülasyonda DNA hasarının kabul edilebilir seviyesinin tesbiti; DNA hasar-tamir tespit çalışmaları, genotoksinlere hassas olan bireylerin belirlenmesi, çeşitli ajanlara maruz kalan bireylerin devamlı olarak izlenmesi, çevreye yayılan kimyasal maddeler ve bu maddelere maruz kalan bireylerin kontrol altında tutması, popülasyonda genetik hasar artış seviyesinin tespiti gibi amaçlarla gerçekleştirilmektedir [16].

Bugüne değin, DNA'ya zarar veren ajanların etkilerini ortaya koymak için kolay test yöntemleri aranmıştır [16]. 8-OHdG çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olması nedeniyle oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kabul edilmiştir [12]. Ancak 8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi oldukça pahalı bir yöntem olması ve ileri teknoloji gerektirmesi, araştırmacıları DNA hasar düzeyi tespitinde hızlı, basit ve ucuz yöntemler geliştirmeye itmiştir.

## 2. TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ

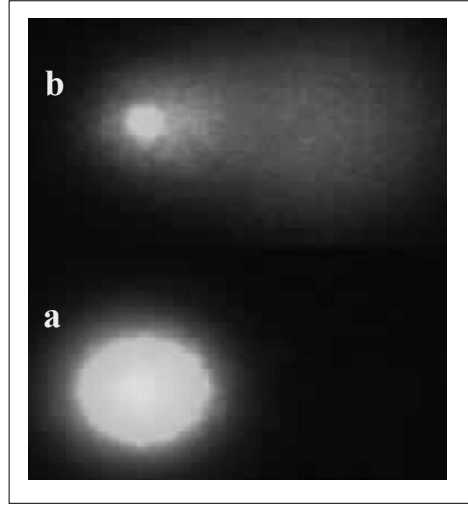
Son yıllarda gelişen “*Single Cell Gel Electrophoresis*” (SCGE) tekniği DNA sarmal kırıklarının tespiti için hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. SCGE tekniği “*Comet Assay*” ya da “*Microgel Electrophoretic Technique*” olarak da adlandırılmaktadır [17].

### 2.1. Tarihçe

İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydenberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında lam üzerindeki agaroz'da gömülmüş olan hücreleri “lize” ederek hücreleri proteinlerden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akrinin oranı ile DNA'yı boyamışlar ve kırmızı flörosana yeşilin oranını hesaplamışlardır. Kırmızı flörosans tek sarmalı, yeşil flörosans ise çift sarmalı göstermiştir. Fakat bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır [17].

Nötral teknik 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından modifiye edilerek hücredeki DNA hasarının direkt gösterilmesinde “*Microgel Electrophoretic Technique*” olarak sunulmuştur. Ostling ve Johanson agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lizing işlemine ve ardından elektroforeze tabi tuttukten sonra

akridin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyanmışlardır [20]. Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş, bu nedenle hasarlı hücreler **COMET** olarak adlandırılmıştır. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülmüş, ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir [18].



Şekil 1. Normal (a) ve Hasarlı DNA (Comet) (b)

Ancak, DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır [16]. Bu nedenle Singh ve ark. (1988) alkaline comet metodunu tanımlamışlardır. Böylece “tek sarmal kırıkları” denilen ve sadece alkali tekniikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkânı doğmuştur [19]. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden fazlasını yok edebilmekte, böylelikle SCGE tekniğinin yeni dizaynı bireylerde hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır [20,21].

## 2.2. Yöntemin Avantajları

SCGE yöntemi düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, fazla ekipman gerektirmemesi, kolaylıkla uygulanabilmesi, değişik hücre ve doku grupları ile

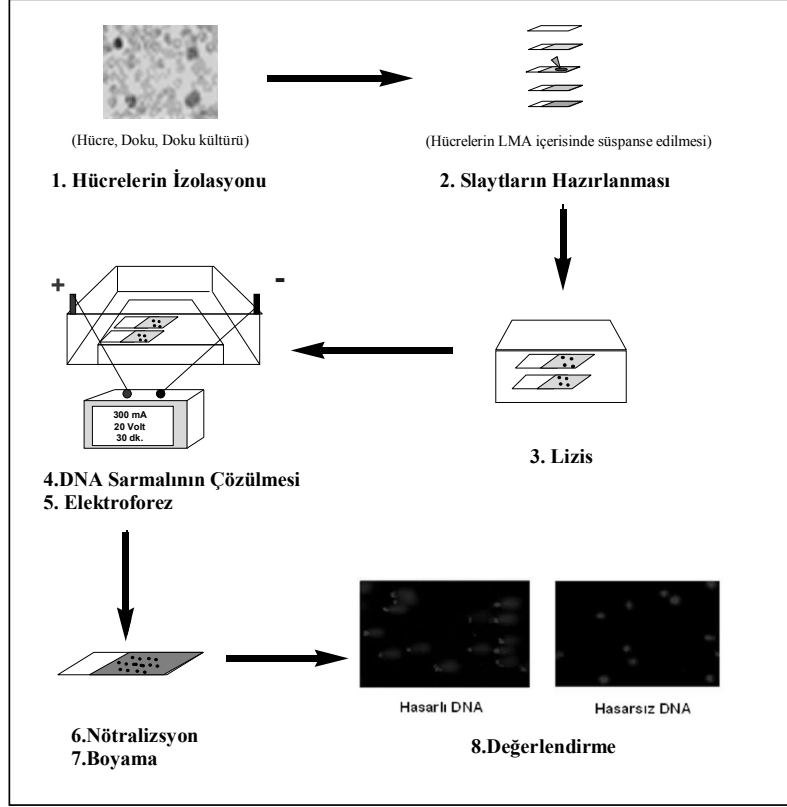
çalışılabilmesi, sonuçların birkaç saat içinde elde edilip ve değerlendirilmesi, güvenli ve ekonomik olması nedeniyle giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmaktadır [19].

### 2.3. Alkali Tek Hücre Jel Elektroforezi Yönteminin Uygulanışı

DNA'daki hasarın düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan tek hücre jel elektroforez yöntemi ya da kısa adıyla Comettir. Bu yöntem pek çok çalışmada kullanılan görsel floresan bir tekniktir [19]. Comet yöntemi, alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Tek hücreler veya çekirdekçikler Şekil 1'de görüldüğü gibi agarozda gömülür; yüksek tuz ve deterjan içeren lizis solusyonunda hücrelerin lize olmaları sağlanır, daha sonra DNA'ların elektroforez de yürütülmeleri esnasında hasarsız DNA'ların bütünlüğünü kaybetmeden yürür ve comet yani kuyruk oluşturmaz, oysa, hasarlı DNA'ların fragmenleri oluşan hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar, sonuç olarak elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilerek bir fikir oluşturulur [20,23,24].

Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuvar koşullarına göre farklılık göstermekle beraber Tice ve ark. (2000) SCGE yönteminin genel basamaklarını şöyle sıralamışlardır (Şekil 2) [25].

1. Hücrelerin izolasyonu
2. Slaytların hazırlanması
3. Lizis
4. DNA sarmalının çözülmesi
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. Boyama
8. Değerlendirme



Şekil 2. SCGE Yöntemi Genel Basamakları

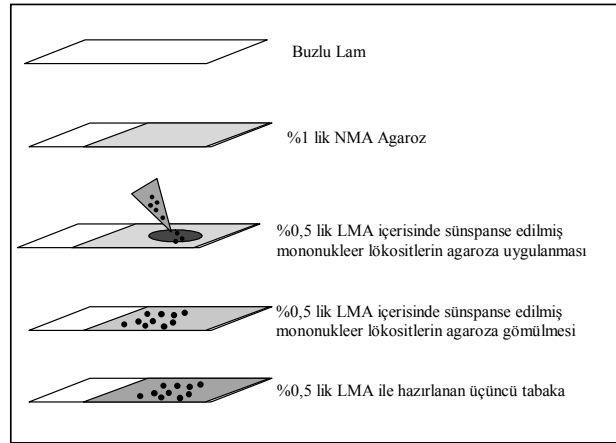
### 1. SCGE Yönteminde Kullanılabilen Hücreler

SCGE yöntemi ile insan, hayvan ve bitki hücreleri gibi bir çok çeşit hücre in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır. En çok kullanılan insan hücreleri lökositler ve lenfositlerdir. Ancak, nasal veya gastirik mukoza hücreleri, lens, deri, reproduktif hücreler, kolon hücreleri neonatal fibroblastlar, pankreas hücreleri, adenokarsinomlu hücreler gibi bir çok doku hücrelerinde kullanıldığı bildirilmiştir [31].

### 2. Slaytların hazırlanması

PBS içerisinde hazırlanan %1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMP) agaroz jelden 80 µl alınarak buzlanmış lam üzerine damlatılır ve lam üzeri lamel ile kapatılarak 2-4°C'de 5 dk. bekletildikten sonra lameller kaldırılarak birinci agaroz tabakası hazırlanır. Hazırlanan lamlar nemli kutularda 2. ve 3. agaroz katları dökülene kadar saklanabilir [20,23,24,29].

PBS ile  $\text{mm}^3 \text{te} 10^6$  hücre olacak şekilde süspansiyon edilmiş hücrelerden  $10 \mu\text{l}$  alınarak  $80 \mu\text{l}$  % 0,5'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMP) agaroz ile ( $37^\circ\text{C}$ ) karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılır ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için bekletilir. Üçüncü aşamada aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlanır. Aşağıda Şekil 3'de slaytların hazırlanma basamakları görülmektedir.



Şekil 3. Slaytların Hazırlanması

### 3. Lizis

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır [20,23,24,29]. Bu amaçla, hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yaklaşık 1 saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren (100 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 2,5 M NaCl, 10 mM Trizma base, % 1 triton X-100, % 10 DMSO pH:10) soğuk lizis solüsyonunda bekletilir.

### 4. DNA sarmalının çözülmesi ve Elektroforez

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , 300 mM NaOH, pH 13) 20-30 ????? arasında inkübasyona bırakılır. Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutulularak kullanılır. Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA 20 V' luk elektriksel alanda  $5-25^\circ\text{C}$ 'de 30 dk. yürütülür [20,23,24,29].

### 5. Nötralizasyon

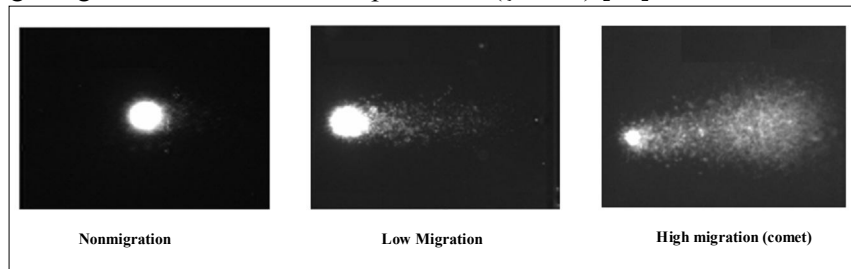
Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk ve 3 kez 5 ml/slayt (0,4 M Tris HCl pH:7,5) nötralizasyon tamponu ile yıkanır [20,23,24,29].

### 6. Boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra, slaytlar floresan boya olan Ethidium bromür (5µg/ml) kullanılarak DNA boyanır ve dört saat içinde değerlendirilir [25].

### 7. Değerlendirme

Ethidium bromür ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirilir. SCGE yönteminde sonuçların değerlendirilmesi için farklı teknikler kullanılmaktadır. Burada kullanılan en yaygın parametreler; kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentidir. Gelişmiş teknolojik imkanlara sahip olmayan laboratuvarlarda hasarlı hücreler görsel sayma yöntemi ile değerlendirilmektedir [26]. Teknikte hasarsız hücrelerin incelenmesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü vardır. Hücrelerin bu görünümü nonmigration olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise Migrasyon uzunluğu fargmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu görünüme stretch ya da low migration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (comet, high migration) şeklini alır. Son aşama ise apoptostir. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir (Şekil 4) [18].

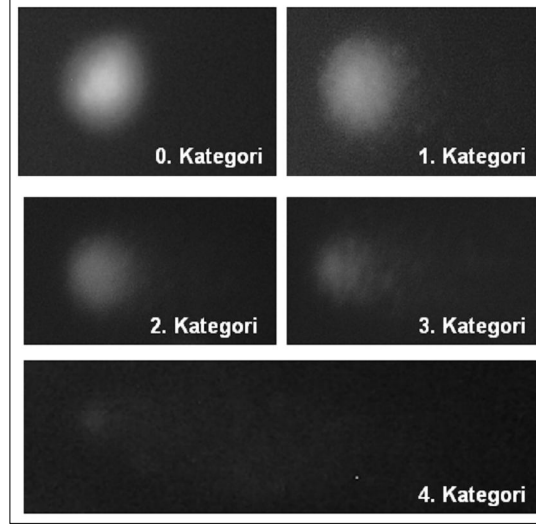


**Şekil 4.** Nonmigration, Low Migration ve High Migration (comet)

Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategorilerde sınıflandırılarak puanlandırılır. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan

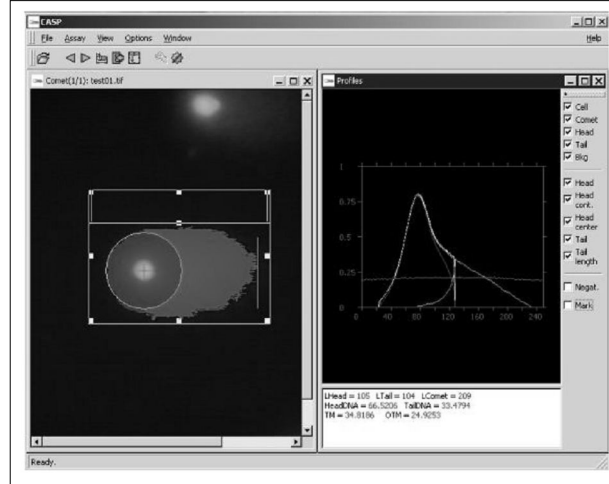


DNA'lar hasarın derecesine göre 1 den 4'e kadar puan verilir ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirilir (Şekil 5) [27].



Şekil 5. Görsel Skorlama Tekniği İle Hücrelerin Sınıflandırılması

Gelişmiş laboratuarlarda sonuçların değerlendirilmesinde kamera bağlı, bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir (Şekil 6) [17,30]. Comet ölçümü için özel bilgisayar yazılımları kullanılarak bu parametreler başarılı ve objektif olarak ölçülür [28].



Şekil 6. Comet Görüntülerinin Bilgisayar Yardımı İle Değerlendirilmesi

Son yıllarda geliştirilen Laser-scanning microscopy (LSM) teknolojisi ile , sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir [17].

### 3. SONUÇ

Canlı popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel genotoksinlere maruziyetle sonuçlanan endüstriyel faaliyetler, yaşam biçimi, çeşitli tıbbi tedaviler, iklim değişiklikleri ve birçok stres faktörü nedeniyle giderek artan bir baskı altındadır. SCGE tekniği canlı popülasyonlarında yukarıda saydığımız etmenler tarafından meydana getirilen DNA hasarının ölçümünde; hızlı, basit ve hassas bir ölçüm tekniği olması nedeniyle giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmaktadır.

### KAYNAKLAR

1. Kılınç K., Kılınç A., “Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri” Hacettepe Tıp Dergisi 33(2): 110 – 118. (2002)
2. Halliwell B., Dizdaroglu M., “The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques” Free Radical Res Commun;16:75-87(1992)
3. Ames B.N., Shigenara M.K., “DNA damage by Endogenous oxidants and mithogenesis As Causes of Aging and Cancer” Molecular Biology of free radical scavenging systems, ed, scandalios, J.G. (Cold Spring Harbor Laboratuary Pres, Plainvie .p:1-21) (1992)
4. Andican G., Burçak G., “Oksidatif DNA Hasarı Ve HPLC İle Analizi” II. Ulusal HPLC ve Diğer seperasyon Teknikleri sempozyumu. Özet kitabı.Ankara (2004)
5. Dizdaroglu M., “Chemical determination of free radical-induced damage to DNA” Free Radic Biol Med.;10(3-4):225–242. (1991)
6. Shigenaga M.K., Ames B.N., “Assays for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine: A Biomarker of in vivo Oxidative DNA Damage” Free Rad. Biol. Med. 10, 211-216. (1991)
7. Cheng K.C., Cahill D.S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L.A., “8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G to T and A to C substitutions” J. Biol. Chem. 267:166-172. (1992)
8. Kuchino Y., Mori F., Kasai H., et al., “Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues” Nature 327, 77-79. (1987)
9. Dizdaroglu M., “Chemistry of Free Radical Damage to DNA and Nucleoprotein, in DNA and Free Radicals” Edited by B. Halliwell and O. I. Aruoma, Ellis Horwood, London, pp. 19-39. (1993)

10. Aruoma O.I., Halliwell B., Dizdaroglu M., "Iron Ion-Dependent Modification of Bases in DNA by the Superoxide Radical-Generating System Hypoxanthine/Xanthine Oxidase" *J. Biol. Chem.* 264, 13024-13028. (1989)
11. Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M., "Damage to the Bases in DNA Induced by Hydrogen Peroxide and Ferric Ion Chelates" *J. Biol. Chem.* 264, 20509-20512. (1989)
12. Dizdaroglu M., "Oxidative Damage to DNA in Mammalian Chromatin" *Mutat. Res.* 275, 331-342. (1992)
13. Thomas S., Lowe J.E., Knowles R.G., Green, I.C., Gren M.H.L., "Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide" *Mutat Res.* 18;402(1-2):77-84. (1998)
14. Steenken S., "Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions to their radical cations and e- and OH adducts" *Chem. Rev.*, 89: 503-520. (1989)
15. Yokuş B., Çakır D.Ü., "İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine" *T Klin J Med Sci*, 22535-543(2002)
16. Ünal Y., "Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının COMET assay tekniği ile araştırılması" Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Entitüsü.Yüksek Lisans Tezi. (1998)
17. Fairbain D.W., Olive P.L., O'Neill, K.L., "The Comet Assay: A Comprehensive Review" *Mutation Res.*; 339: 37-59. (1995)
18. Ertürk Ş., "Sevofloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi" Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reaminasyon Anabilim Dalı . Uzmanlık Tezi. (2001)
19. Singh, N.P., Danner, D.E. Tice, R.R., Brant, L., Schneider, E.L., "Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology" *Mutat. Res.* 37 P:123. (1990)
20. Ostling O., Johanson K.J., "Microelectrophoretic Study Of Radiation-Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells" *Biochemical And Biophysical Research Communications* , 123, 291-298. (1984)
21. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. "Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing" *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221. (2000)
22. Gwo J.C., Wu C.Y., Chang W.S., Cheng H.S., "Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay" *Cryo Lett*; 24: 171-180. (2003) Jin-

23. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells” *Exp. Cell Res.* 175, 184-191. (1988)
24. Horoz M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., Aslan M., Koylu A.O., Gumus M., Celik H., Koksall M., “Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation” *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 596, Issues 1-2, Pages 137-142. (2006)
25. Kocyigit A., Keles H., Selek S., GUZEL S., CELIK H., EREL O., “Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis Mutation” *Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 585, Issues 1-2, 71-78. (2005)
26. Kobayashi H., Sugiyama C., Morikava Y., Hayashi M., Sofuni T., “A Comparison Between Manual Microscopic Analysis and Computerized Image Analysis InThe Single Cell Gel Electrophoresis” *MMS Commun.*, 3(2) 103-115. (1995)
27. Collins A.R., “The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations” *Molecular Biotechnology* Volume (26); 249-261 (2004)
28. Shen HM, Ong CN. “Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility” *Free Rad Biol Med*; 28: 529-536. (2000)
29. Giovannelli L., Pitozzi V., Riolo S., Dolara P., “Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay” *Mutation Research* 538 71–80(2003)
30. Gamlı, M., “Anestezik Maddelere Maruz Kalan Ameliyathane Çalışanlarında Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay) Tekniğı İle Kromozom Kırıklarının Tesbiti” Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Kliniğı. Uzmanlık Tezi. (1997)
31. Fairbain. D.W., Olive, P.L., O’Neill, K.L., “The Comet Assay: A Comprehensive Review” *Mutation Res.* 339: 37-59 (1995)