

## GENETİK TOKSİSİTE TESTLERİ

Zülal Atlı Şekeroğlu\*, Vedat Şekeroğlu

Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ordu Üniversitesi, ORDU

### Özet

Genetik toksisite, genotoksinlerin kromozom ve DNA yapısında meydana getirdiği hasarları kapsayan bir terimdir. Bu hasarlar genellikle gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, DNA zincir kırıkları ve DNA eklentileridir. Bu tip genetik hasarlar; doğum defektleri, kanser, yaşlanma, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açabildiği için, mutajen ve karsinojenlerin tanımlanması ve risklerinin en düşük seviyeye indirilebilmesi halk sağlığının korunması için önemlidir. Genotoksosite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitelerinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilebilmesi için kullanılmaktadır. Bu testler; fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirleticilerin ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasını, kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlayan biyoizlem testleridir. İnsanlar sürekli çevrelerinde bulunan çok sayıda kimyasal ve fiziksel ajana maruz kaldıkları için, bu ajanların potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksosite çalışmaları gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Bu nedenle bu derlemenin amacı, hücrelerdeki genetik hasarın göstergesi olarak değerlendirilen genotoksosite testleri ve uygulamaları hakkında bilgi vermek ve bu testlerin kullanımının yaygınlaştırılmasına yardımcı olmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** DNA hasarı, mutajenler, mutajenite testleri

## GENETIC TOXICITY TESTS

### Abstract

Genetic toxicity is a term including chromosome and DNA damages caused by genotoxins. These damages are usually gene mutations, chromosome aberrations, DNA strand breaks and DNA adducts. Since these genetic damages can cause birth defects, aging, cancer, infertility and some genetic and multifactorial diseases, identifying mutagens and carcinogens and minimizing their risks are very important for the protection of public health. Genotoxicity tests have been used to assess mutagenicity of chemical and physical agents and, to predict carcinogenic potential of these agents. These tests are bio-monitoring tests that provide to investigate of genotoxic and carcinogenic potentials and reliability of physical agents, drugs, all types of chemical we are exposed to every day such as pollutants, food additives and, to predict for cancer risk and to monitor of cancer. Since humans are continuous exposed to a large number of chemical and physical agents in their environment, the genotoxic studies about the adverse effects and potential risk of these agents, gain ground exponentially. Therefore, the aim of this review is to give information about the genotoxicity tests which are considered to be indication for genetic damage in cells, and their applications, as well as help to generalize the use of these tests.

**Key Words:** DNA damage, mutagens, mutagenicity tests

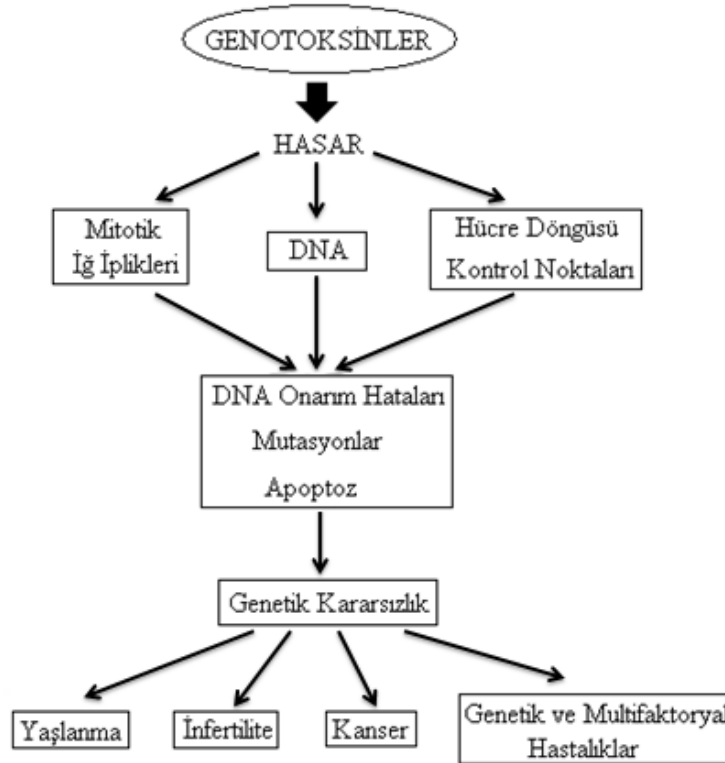
## 1.Giriş

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir [1-4].

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidide gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır [1-3,5].

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Şekil 1) [6,7].

Genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişki pek çok çalışmada incelenmiş ve insanlar için karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunu gösterilmesi, genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur [1,4,5,8,9].



Şekil 1. Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları.

## 2. Genetik Toksisite Testlerinin Kullanım Alanları

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir [10]. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşurlar [1,4,5]. Genotoksisite testleri ile mutajenlerin

tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri ise insanda risk tayini için kullanılmaktadır [4].

Genotoksosite testleri esas olarak genomu etkileyebilecek UV ve irradyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunmada, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak kullanılmaktadır [1,7,11-20].

Bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır [1,3,18,19,21-23].

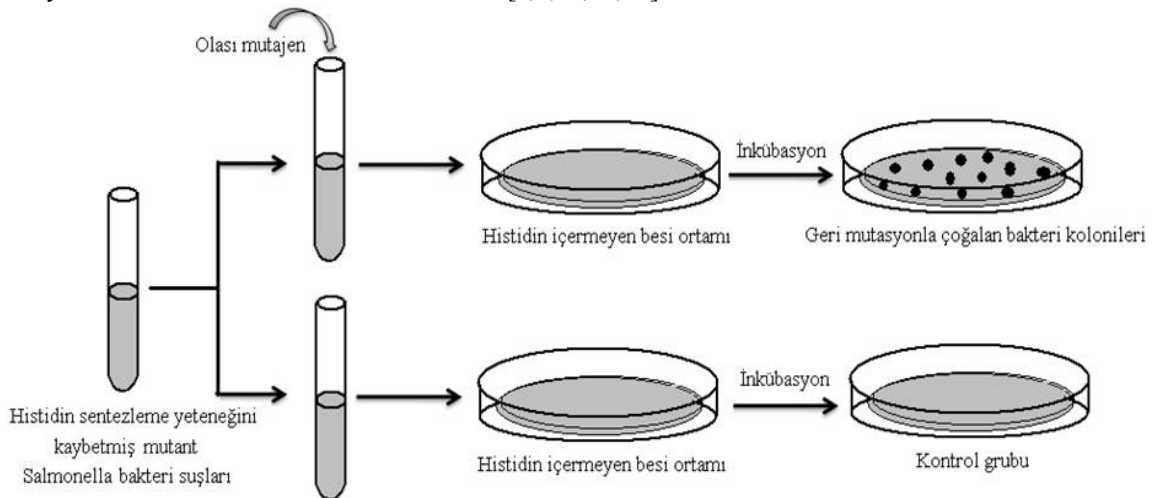
### 3. Genetik Toksisite Testleri

Genetik sistemler ile genotoksitesini test edilmek istenen maddelerin kanserojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir.

#### 3.1. *Salmonella*/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom mutajenite testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş bakteriyel test sistemlerinden biridir. Ayrıca hızlı, ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu test, insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve kanserojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de sıklıkla kullanılmaktadır [1,24-30].

Ames testinde, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları kullanılmaktadır. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un yapay mutasyonla oluşturulmuş olan histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanır. Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyona uğrayan koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir (Şekil 2). Ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmaktadır [1,4,24,25,30].

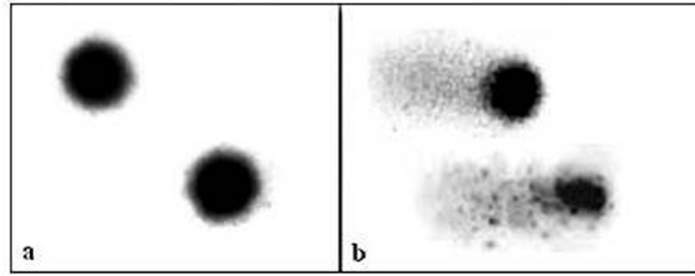


Şekil 2. Ames testinin uygulanması ve mutajeniteyi gösteren koloniler.

### 3.2. Comet Testi

Son yıllarda gelişen Comet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan Comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerinde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir [1,31-39].

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozta yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar (Şekil 3). Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir. Comet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında; kuyruk moment, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır [19,31,32,34,38-40].

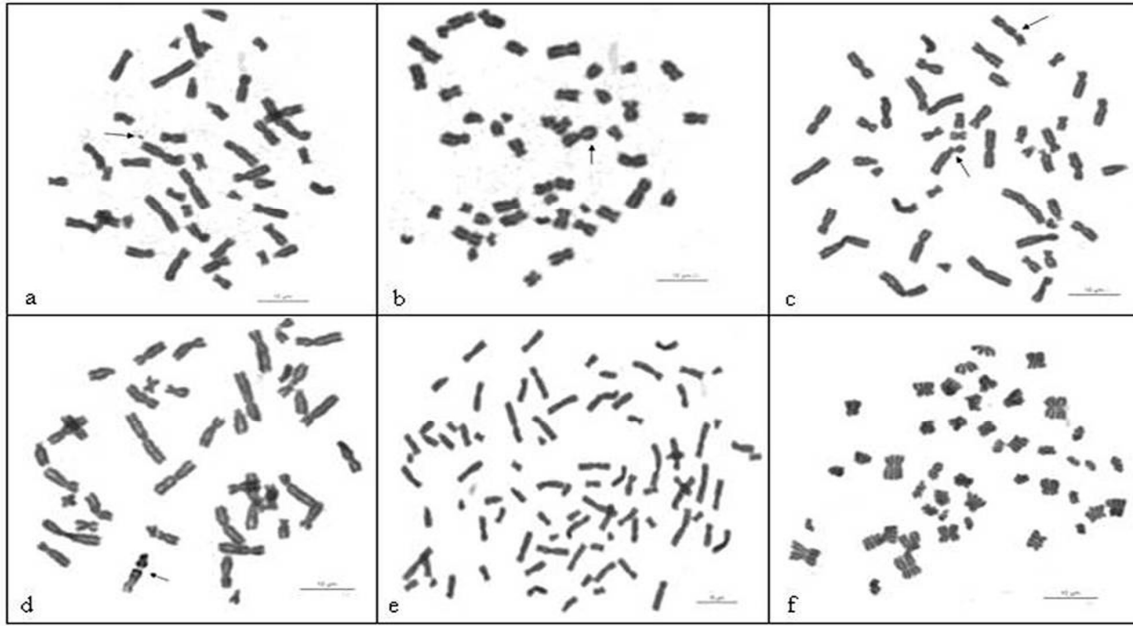


Şekil 3. Hasarsız DNA (a) ve hasarlı DNA taşıyan nükleusların (b) Comet testi ile görünümü.

### 3.3. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir [16,17,19,41,42]. KA testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. *In vitro* KA testi ile memeli hücre kültürlerinde, *in vivo* KA testi ile genellikle kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği frekansı değerlendirilebilmektedir. Ayrıca *in vivo* KA testi, özellikle mutajenik hasarın belirlenmesinde türe ve dokuya göre değişebilen metabolizma, farmakokinetik ve DNA onarım mekanizmaları gibi faktörlerin değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır [1,11,43,44].

*In vitro* memeli KA testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan ortamlarda, genellikle periferik kan lenfosit hücreleri inkübe edilmektedir. *In vivo* KA testinde ise genellikle hedef doku olarak vaskülarizasyonu fazla ve hızlı sirkülasyona sahip hücre popülasyonu içeren kemik iliği kullanılmaktadır. *In vitro* KA testinde kültürler hasat edilmeden genellikle 2 saat önce, *in vivo* çalışmalarda ise hayvanlar sakrifiye edilmeden 2-4 saat önce, bir tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran kolşisin uygulanmaktadır. Kültürlerden veya kemik iliği hücrelerinden uygun protokollere göre metafaz hücreleri elde edilmekte ve kromozomlarda ortaya çıkan çeşitli yapısal ve sayısal anormallikler (Şekil 4) tespit edilebilmektedir [11,43-45].

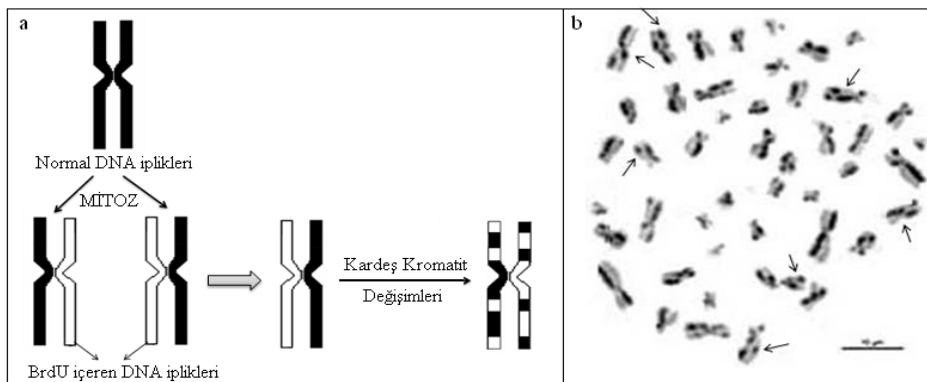


Şekil 4.

Kromozom anormallikleri içeren metafazlar. a- Fragment, b- Kardeş kromatit birleşmesi, c- Kromatit kırıkları, d- Kromozom kırığı, e- Poliploidi, f- Endoreduplikasyon.

### 3.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

KKD, kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişimidir ve DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını göstermektedir. Ayrıca KKD'ler nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile yakından ilişkilidir [46-51]. Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında önemli bir yere sahiptir. Mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD frekansının arttığı ve artmış KKD frekansı ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişkinin olduğu saptanmıştır [19, 46-49,51-55]. KKD testi ile özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptanmaktadır. KKD testinde, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesinin eklenmektedir ve bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlardaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi gösterilmektedir. Kültürlerdeki hücreler çoğalırken DNA'ların replikasyonu sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri geçmektedir. Ultraviyole lambası ile ışınlanmaya maruz bırakıldığında DNA içine yerleşmiş olan BrdU daha açık renkte boyanmış bölgeler olarak görülmektedir (Şekil 5a). Kromatitlerin farklı boyanmasına neden olan bu boyanma farkı ile DNA'da kardeş kromatitler arasında oluşan değişimler gözlemlenmektedir (Şekil 5b) [48,51,56-58].

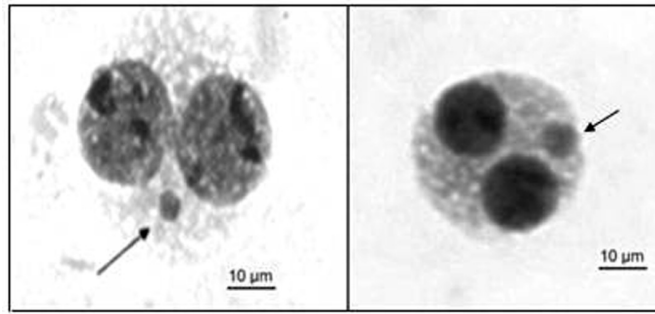


Şekil 5. a- BrdU ile kardeş kromatit değişiminin belirlenmesi, b- Kardeş kromatit değişimleri içeren metafaz plağı.

### 3.5. Mikronükleus (MN) Testi

MN'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur [1,22,52,59-63].

MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir [62,63]. *In vitro* MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalsin-B maddesi ilave edilmektedir. Bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan binükleat (çift nükleuslu) hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilmekte ve preparatlarda MN bulunduran binükleat hücrelerin (Şekil 6) oranı tespit edilmektedir [1,64,65]. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenmektedir. Bu test ile genellikle kemik iliğinde ve/veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır [64,67-69].



Şekil 6. Mikronükleus içeren binükleat hücreler.

### 4. Sonuç

Son yıllarda genetik defektlerin, genetik hastalıkların ve kanser vakalarının sayısı önemli bir artış göstermektedir. Her ne kadar bu tip defektler ve hastalıkların nedenleri spontan mutasyonlara bağlansa da, çevremizde sürekli maruz kaldığımız dış kaynaklı fiziksel ve kimyasal ajanların etkileri de göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür. Bu nedenle mutajenlerin genotoksisite açısından değerlendirilmesi ve ciddi genotoksik risk taşıyanların belirlenerek gerekli önlemlerin alınmasını amaçlayan genotoksisite testlerinin kullanımlarının yaygınlaştırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir. Bu testlerin kullanımlarının yaygınlaşması ile bireylerin herhangi bir kimyasal ajana verecekleri genetik cevabın önceden belirlenmesi, metabolizma bozuklukları ve kanser gibi hastalıkların klinik belirti vermeden taranarak yatkın bireylerin saptanması ve gerekli önlemlerin alınması sağlanabilecektir. Tıbbi araştırmalarda genotoksisite testlerinin yaygınlaştırılmasıyla insan sağlığı ve yaşam kalitesinin artması tüm bilim adamlarının beklentisidir.

### Kaynaklar

- [1] W.N. Choy, "Genetic toxicology and cancer risk assessment", *Marcel Dekker*, New York, 29-187, (2001).
- [2] R.R. Young, "Genetic toxicology", *Toxicology*, 173, 103-21, (2002).
- [3] K. Mortelmans, S.D. Rupa, "Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists", *Adv Appl Microbiol*, 56: 379-401, (2004).
- [4] N. Vural, "Toksikoloji", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 115-129, (2005).
- [5] E. Zeiger, "History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal", *Environ Mol Mutagen*, 44: 363-71, (2004).

- [6] M. Kirsch-Volders, A. Vanhauwaert, U. Eichenlaub-Ritter, I. Decordier, "Indirect mechanisms of genotoxicity", *Toxicol Lett*, 140-141: 63-74, (2003).
- [7] R. Mateuca, N. Lombaert, P.V. Aka, I. Decordier, M. Kirsch-Volder, "Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring", *Biochimie*, 88: 1515-31, (2006).
- [8] I.F.H. Purchase, E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre, F.R. Westwood., "An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens", *Brit J Cancer*, 37: 873-959, (1978).
- [9] H.K. Mavournin, H.D. Blakey, C.M. Cimino, F.M. Salamone, A.J. Heddle, "The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program", *Mutat Res*, 239: 29-80, (1990).
- [10] A. Bedir, B. Bilgici, Z. Yurdakul, B.Ş. Gürsel, M. Alvrur, "DNA hasarı analizinde  $\mu$ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması", *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3): 97-103, (2004).
- [11] R.J. Preston, W. Au, M.A. Bender, J.G. Brewen, A.V. Carrano, J.A. Heddle, A.F. McFee, S. Wolff, J.S. Wassom, "Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program", *Mutat Res*, 87: 143-88, (1981).
- [12] D. Brusick, "Principles of genetic toxicology", *Plenum Press*, New York, 155-170, (1987).
- [13] J. Wassom, "Origins of genetic toxicology and the environmental Mutagen Society", *Environ Mol Mutagen*, 14: 1-6, (1992).
- [14] D.J. Kirkland, "Genetic toxicology testing requirements: Official and unofficial views from Europe", *Environ Mol Mutagen*, 21 (1): 8-14, (1993).
- [15] P. Hrelia, F. Vigagni, F., Maffei, M. Morotti, A. Colacci, P. Perocco, S. Grilli, G. Cantelli-Forti, "Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests", *Mutat Res*, 321 (4): 219-28, (1994).
- [16] D. Anderson, "Human Biomonitoring", *Mutat Res*, 204: 353-541, (1988).
- [17] A.V. Carrano, A.T. Natarajan, "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutat Res*, 204: 379-406, (1988).
- [18] E. Zeiger, "Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance", *Regul Toxicol Pharmacol*, 28: 85-95, (1998).
- [19] R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hugmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E.G. Suhaker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans". *Mutat Res*, 463: 11-172, (2000).
- [20] G.B. Jena, C.L. Kaul, P. Ramarao, "Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines", *Indian Journal of Pharmacology*, 34: 86-99, (2002).
- [21] E. Zeiger, J.K. Haseman, M.D. Shelby, B.H. Margolin, R.W. Tennant, "Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals", *Environ Mol Mutagen*, 1: 1-14, (1990).
- [22] S. Demirel, A. Zamani, "Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları", *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-27, (2002).
- [23] A. Olaharski, R. Sotelo, G. Solorza-Luna, M.E. Gonsebatt, P. Guzman, A. Mohar, D.A. Eastmond, "Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis", *Carcinogenesis*, 27: 3317-43, (2006).
- [24] J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames, "Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals", *Proc Nat Acad Sci*, 72: 5135-39, (1975).
- [25] D.R. Maron, B.N. Ames, "Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test", *Mutat Res*, 113: 173-215, (1983).
- [26] U.K. Alekperov, B.N. Ames, T. Kada, L.W. Wattenberg, "Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPENC expert group on antimutagens and desmutagens", *Mutat Res*, 168: 47-65, (1986).
- [27] K. Victorin, L. Busk, U.G. Ahlborg, "Retinol (Vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test", *Mutat Res*, 179: 41-48, (1987).
- [28] R. Jung, G. Engelhart, B. Herbolt, R. Jöckh, W. Muller, "Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA 102", *Mutat Res*, 278: 265-70, (1992).
- [29] A.S. Jarvis, M.E. Honeycutt, V.A. Mc Farland, A.A. Bulich, H.C. Bounds, "A comparison of the Ames assay and mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment", *Ecotox Environ Safe*, 33:193-200, (1996).
- [30] K. Mortelmans, E. Zeiger, "The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay", *Mutat Res*, 455: 29-60, (2000).
- [31] O. Östling, K.J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", *Biochem Biophys Res Commun*, 123 (11): 291-298, (1984).

- [32] V.J. McKelvey-Martin, M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo, A. Collins, "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review", *Mutat Res*, 288: 47-63, (1993).
- [33] D.W. Fairbairn, P.L. Olive, K.L. O'Neill, "The comet assay: a comprehensive review", *Mutat Res*, 339: 37-59, (1995).
- [34] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp Cell Res*, 175: 184-191, (1988).
- [35] F. Kassie, W. Parzefall, S. Knasmüller, "Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies", *Mutat Res*, 463: 13-31, (2000).
- [36] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, "Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing", *Environ Mol Mutagen*, 35: 206-221, (2000).
- [37] P.L. Olive, J.P. Banath, "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells", *Nature Protocols*, 1 (1): 23-29, (2006).
- [38] Y. Dinçer, S. Kankaya, "DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay", *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30 (4): 1365-73, (2010).
- [39] Z.A. Şekeroğlu, V. Şekeroğlu, Z. Kolören, "The *in vitro* alkaline comet assay in genetic toxicology", *JABS*, 5 (13): 49-54, (2011).
- [40] A. Çelik, B. Mazmanci, Y. Çamlica, Ü. Çömelekoğlu, A. Aşkın, "Evaluation of cytogenetic effects of lambda-Cyhalothrinon wistar rat bone marrow by gavage administration", *Environ Safe*, 61: 128-133, (2005).
- [41] J.R.K. Savage, "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", *Env Mol Mutagen*, 22: 198-207, (1993).
- [42] H. Norppa, S. Bonassi, I.L. Hansteen, L. Hagmar, U. Strömberg, P. Rössner, P. Boffetta, C. Lindholm, S. Gundy, J. Lazutka, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, R.J. Sram, L.E. Kunudsen, R. Barale, A. Fucic, "Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk", *Mutat Res*, 600 (1-2): 37-45, (2006).
- [43] H.J. Evans, "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 405-427, (1984).
- [44] R.J. Preston, B.J. Dean, S. Galloway, H. Holden, A.F. McFee, M. Shelby, "Mammalian *in vivo* cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells", *Mutat Res*, 189: 157-65, (1987).
- [45] C.E. Ford, J.L.A. Hamerton, "Colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes", *Stain Technol*, 3: 247-51, (1956).
- [46] S.A. Latt, R.R. Sehrek, K.S. Loveday, C.P. Dougherty, C.F. Schuler, "Sister chromatid exchange", *Adv Hum Genet*, 10: 267-331, (1980).
- [47] S. Wolff, "Sister chromatid exchange", *Advances in Human Genetics*, 10: 183-201, (1980).
- [48] P.E. Perry, E.J. Thompson, "The methodology of sister chromatid exchanges", In: Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., eds. *Handbook of mutagenicity test procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 495-529, (1984).
- [49] E. Sonoda, M.S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata, S. Takeda, "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells", *Mol Cell Biol*, 19 (7): 5166-69, (1999).
- [50] T. Helleday, "Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells", *Mutat Res*, 532: 103-15, (2003).
- [51] D.M. Wilson, L.H. Thompson, "Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange", *Mutat Res*, 616: 11-23, (2007).
- [52] A. Karaman, F. Keskinler, "Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar", *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 29 (6): 1392-97, (2009).
- [53] P. Perry, H.J. Evans, "Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange", *Nature*, 258: 121-25, (1975).
- [54] A.V. Carrano, L.H. Thompson, P.A. Lindl, J.L. Minkler, "Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis", *Nature*, 271: 551-53, (1987).
- [55] M. Cheng, M.K. Conner, Y. Alaria, "Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom's syndrome lymphocytes", *Cancer Res*, 71: 4508-12, (1981).
- [56] M. Topaktaş, G. Speit, "Induction of SCE and CA in human lemphocytes with prometryn", *Tr J Biol*, 14: 69-78, (1990).
- [57] A.T. Natarajan, "Chromosome aberrations: past, present and future", *Mutat Res*, 504: 3-16, (2002).
- [58] M. Topaktaş, E. Rencüzoğulları, "Sitogenetik", *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 87-91, (2010).



- [59] P. Vanparys, F. Vermeiren, M. Sysmans, R. Temmerman, "The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity", *Mutat Res*, 244: 95-103, (1990).
- [60] T.J. Cheng, D.C. Christiani, X. Xu, J.C. Wain, J.K. Wiencke, K.T. Kelsey, "Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer", *Mutat Res*, 349: 43-50, (1996).
- [61] F. Duffaud, T. Orsiere, P. Villani, A.L. Pelissier, F. Volot, R. Favre, A. Botta, "A comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients", *Mutagenesis*, 12: 227-31, (1997).
- [62] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen, "The *in vitro* micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction", *Mutat Res*, 392 (1-2): 19-30, (1997).
- [63] H. Stoper, O.S. Müller, "Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview", *Toxicology in Vitro*, 11: 661-67, (1997).
- [64] G. Krishna, M. Hayashi, "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation", *Mutat Res*, 455: 155-66, (2000).
- [65] M. Fenech, A.A. Morley, "Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* aging and dose X-irradiation", *Mutat Res*, 161: 193-98, (1986).
- [66] M. Fenech, "The *in vitro* micronucleus technique", *Mutat Res*, 455: 81-95, (2000).
- [67] J. Heddle, "A rapid *in vivo* test for chromosome damage", *Mutat Res*, 18: 187-90, (1973).
- [68] W. Schmid, "The micronucleus test", *Mutat Res*, 31: 9-15, (1975).
- [69] M. Hayashi, J.T. Mac Gregor, D.G. Gatehouse, I.D. Adler, D.H. Blakey, S. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: Aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, A report from the international work shop on genotoxicity test procedures (IWGTP)", *Environ Mol Mutagen*, 35: 234-52, (2000).