

Balıklarda Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Assay)

Utku GÜNER¹, Fulya Dilek GÖKALP MURANLI¹

¹ Trakya University, Faculty Sciences, Department of Biology. 22030 Edirne, TÜRKİYE

Sorumlu Yazar: : uguner@trakya.edu.tr

Geliş Tarihi: 20.02.2013

Kabul Tarihi: 20.07.2013

Özet

Comet assay, DNA parçalarının elektrik akımı doğrultusunda hücreden çıkarak ilerlemesi (kuyruk oluşturmaya) ilkesine dayanır. Çevre kirliliği veya genotoksik ajanlara maruz kalan organizmaların hücrelerinde bulunan genetik materyal bu maruziyetten etkilenebilir ve DNA kırıkları meydana gelebilir. Meydana gelen DNA kırıkları bu metot kullanılarak gözlenebilmektedir. Comet assay, genotoksik ve karsinogenik maddelerin genetik materyal üzerindeki etkisini ortaya çıkarmaktadır. Ksenobiyotiklerin canlılar üzerine etkileri konusunda hızlı, doğru ve etkin bilgi sağlamak için kullanılan metotlardan biridir. Çevre kirliliğinin canlılar üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi ve belirli maddelerin farklı doz ve sürelerde uygulanmasına dayanan çalışmalarda Comet assay kullanılmaktadır. Özellikle ekotoksikolojik çalışmalarda, uygulama ve analiz kolaylığı nedeniyle test materyali olarak balıklar tercih edilmektedir. Test edilmek istenen maddenin kontrollü ortamlarda verilebilmesi ve diğer deney hayvanlarına göre daha kolay ve fazla sayıda temin edilebilmesi, balıkların test materyali olarak kullanımını arttırmaktadır. Comet assay çok sayıda organizma, doku ve hücre tipinde uygulanmaktadır. Balıkların farklı dokuları(solungaç, karaciğer ve sperm gibi) comet assay çalışmalarında kullanılmaktadır. Bunun yanında, balık kanı, hücre sayısının fazla olması, çekirdekli eritrositlere sahip olması nedeniyle özellikle tercih edilmektedir. Bu derlemenin amacı balıklarda, comet assay uygulama yöntemi ve comet assay sonuçlarının nasıl değerlendirildiği göstermektir.

Anahtar Kelimeler: Tek Hücre Jel Elektroforezi, Comet Assay, Balık, Comet Sonuçları

The Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay) on the Fish

Abstract

Comet assay based on the principle of DNA fragments that leave the cell in the direction of electric current. Genetic material in cells of organisms which are exposed to environmental pollution or genotoxic agents may be affected with this exposure and DNA fragments may be occur. DNA fragments can be observed using this method. Comet assay is used to assess genotoxic and carcinogenic effect of substances on genetic material. Comet assay is one of a test method which is used to get quick, accurate and effective information of xenobiotics on living organisms. This method is used both to evaluate environmental pollution on living organisms and in vitro and in vivo studies with a certain test substance with different concentration and exposure periods. In ecotoxicological studies, particularly fish is used as a test material due to ease of application and analysis. Exposure of test substance in controlled conditions, ease of providing in lots of numbers, increased use of fishes in scientific studies. Different fish tissues (gill, liver and sperm etc.) are used in Comet assay studies. Moreover, fish blood is particularly preferred due to great number of cell number and nucleated erythrocytes. The aim of this review is to evaluate Comet assay application and analyze of comet assay results on fish tissue.

Keywords: Comet assay, The Single Cell Gel Electrophoresis, Fish, Comet Assay Results

GİRİŞ

Tüm kimyasal, biyolojik ve çeşitli fiziksel stres faktörlerinin canlıların hormon, enzim, karbonhidrat ve protein metabolizmalarını etkilediği, fizyolojik ve morfolojik değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Aynı şekilde DNA üzerinde stres faktörlerinin hasar oluşturup oluşturmadığı, eğer hasar oluşturuyor ise hasar derecesinin belirlenmesi, çevreye ve doğaya duyarlılık açısından önemli olduğu gibi hedef organizmanın geleceği açısından da önemlidir. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış..** Günümüze kadar DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili farklı birçok metot kullanılmıştır. Pahalı, uzun süren, çok özel donanım ve sarflar gerektiren uzmanlık isteyen bu yöntemlerin DNA hasarlarının belirlenmesinde alternatif yöntemleri (Tice et al. 2000) gerektirmektedir. Bu ihtiyaca yanıt olarak 1988 yılında Singh ve ark tarafında geliştirilen “tek hücre jel elektroforez” veya “Comet assay” DNA hasarını ve seviyesini gösteren bir metot olarak ortaya çıkmıştır (Cotelle and Ferard 1999).

Comet assay kimyasal risk değerlendirmesi veya sucul türlerin izlenmesinde, genotoksik etkinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. (Simoniello et al. 2009). Birçok farklı balık türü örneğin (Lourenco et al. 2010), sazan (*C. carpio*) (Buschini et al. 2004, Jin et al. 2004, Klobucar et al. 2010) gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yılan kafa (*Channa punctatus*) (Ali and Kumar 2008a) genotoksik maddelerin etkilerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Comet assay genotoksik potansiyeli olan herbisit ve pestisitlerin (Bony et al. 2010) risk değerlendirmesinde kullanılmıştır (Pandey et al. 2011). Yetişkin balıklar (Zebra balığı, *Danio rerio*) yanı sıra yavru (Gontijo et al. 2003) ve embriyolar da Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) çalışmalarında kullanılmaktadır (Keiter et al. 2006).

Birçok çalışma sulardaki ksenobiyotikler (Da Rocha et al. 2009) ile DNA hasarı arasında ilişki bulunmuştur (Selvi et al. 2010). Ksenobiyotiklerin sucul canlılarının DNA üzerine etkisi gösteren başka yöntemler olmasına rağmen Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) hız, basitlik konusunda avantaj sağlamaktadır (Cavas 2011). Günümüzde sucul organizmaların kirleticilere erken aşama etkisini değerlendirmek önemi artırmıştır (Sumathi et al. 2001, Raiaguru et al. 2003). Bu nedenle comet assay birçok araştırmada tercih edilmektedir. Balıklarda toksik maddelerin, genotoksik belirteç olarak kullanılabilir genetik değişikliklere neden

olabilir (Simoniello, Gigena et al. 2009). Farklı kirleticilerin, insanlar ve doğal hayatı üzerine etkileri Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) ile araştırılabilir (Ulutas et al. 2008). Kirleticilerin xenobiyotiklerin metabolizması sonucu kanserojen ve mutajen etkiler ortaya çıkabilir ve DNA hasarı Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) ile belirlenebilir (Buschini et al. 2004).

Tek hücre Jel elektroforezi (Comet assay) sucul organizmalardaki DNA hasarı tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Sumathi et al. 2001). Kirleticinin tipi ve özeliği belirlenmeden de örneğin tarımda kullanılan şehir kanalizasyon atıkları, böcek ilaçları (Guilherme et al. 2012) ve olası diğer kirleticilerin göldeki organizmaların (sazanlar *Cyprinus carpio*) (Klobucar et al. 2010) üzerine etkisi (DNA hasarı) belirlenebilir. Bu yola genotoksik etkilere sahip maddelerin ortamda olduğu ve erken uyarı sistemi olarak Comet assay kullanılabilceği belirlenmiştir. (Cok et al. 2011).

Bu derlemede, sucul ortamlarda ekotoksikolojik bir metot olarak kullanılan Comet assay (veya Tek Hücre Jel Elektroforezi SCGE) balıklarda uygulanması ve özellikle sonuçların nasıl analiz üzerine durulmaktadır. Derlemenin diğer bir amacı comet assay avantajları göstererek daha fazla kullanımı teşvik etmektir.

Balıklarda Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) Uygulaması

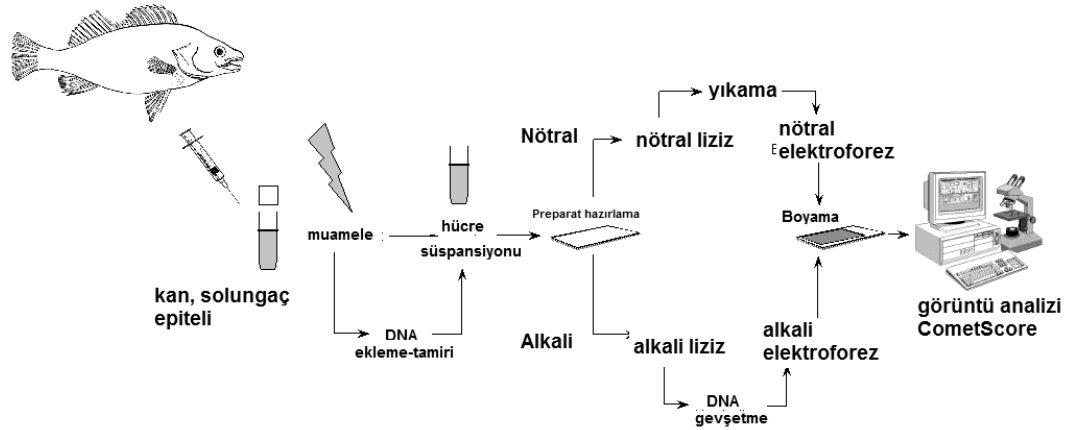
Comet yöntemini temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir (Raiaguru et al. 2003). Genel olarak Comet assay

Hücrelerin izolasyonu, Slaytların hazırlanması, Lizis, DNA sarmalının çözülmesi, Elektroforez, Nötralizasyon, Boyama ve Değerlendirme aşamaları olmak üzere 8 basamakta yapılır (Kocyigit et al. 2005).

Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir (şekil 1) ve elektriksel alan içinde yürütülür (Singh et al. 1988).

Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasar alan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektriksel alanlarda farklı hızlarda göç ederler (Cavas 2011). Çalışmalarda metotlar

arasında farklılıklar olsa günümüzde alkali comet assay daha fazla kullanılmaktadır (Tablo 1).



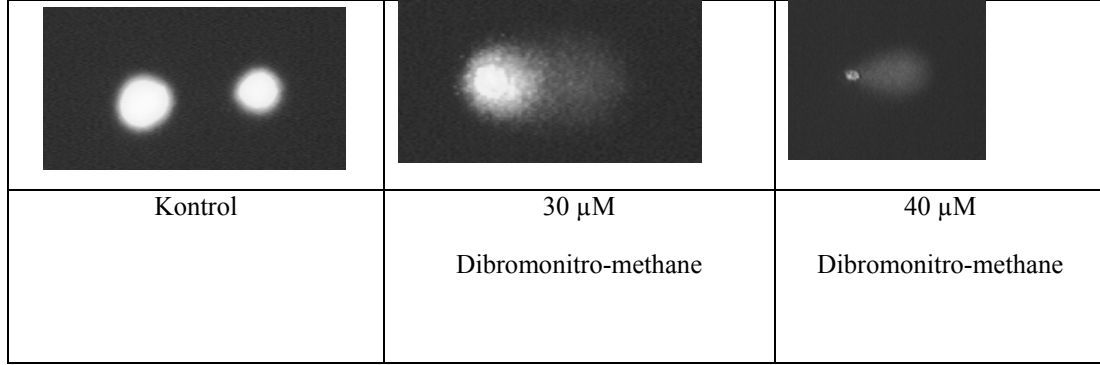
Şekil 1. Temel Tek Hücre Jel Elektrofrez (Comet assay) protokolü

Tablo 1 Farklı Tek Hücre Jel Elektrofrez (Comet assay) tipleri.

Comet tipi	Açıklama	Avantajları	Referans
Nötral comet assay	Lizis ve elektroforez, işlemleri pH 9.5; az ortamda yapılır. DNA daha az belirgin bir kuyruk oluşturur. Alkali comet assay göre daha az duyarlı bir yöntemdir.	Daha az hassasiyet gerektiren durumlarda yararlıdır, örneğin yoğun kirliliğin olduğu ya da arka planda farklı etkilerin bulunduğu çalışmalarda kullanılır.	(Fairbairn et al. 1995)
Alkali comet assay	Lizis işlemi daha yoğun bir şekilde uygulanır elektroforez alkali ortam koşullarında yapılır; pH> 13, Daha duyarlı bir yöntemdir.	Nötr comet assay metoduna göre daha net bir kuyruklu görüntüleri elde edilmektedir Bir araştırmada kullanılan yaygın bir yöntemdir. Maddelerin etkileri belirlemede Pozitif kontrol ile uygulanır (H ₂ O ₂)	(Simoniello et al. 2009)

DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp flüoresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturduklarından yönteme İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir(Şekil 2). Ethidium bromür ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile

elde edilen DNA görüntüleri değerlendirilir. Comet Assay yönteminde sonuçların değerlendirilmesi için farklı teknikler kullanılmaktadır. Burada kullanılan en yaygın parametreler; kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentidir.



Şekil 2 Farklı dozlarda meydana kuyruk tipleri.

Tek Hücre Jel Elektroföresi (Comet assay) kullanılan Dokular

Balıklarda farklı bir çok doku comet assay için uygundur. Ancak seçilen dokunun mitotik olarak aktif olmayan canlı hücreler içermesi gerektir (Da Rocha et al. 2009). Balıklarda karaciğer ve sperm hücre (Zhou et al. 2006, Dietrich et al. 2007) süspansiyonları Tek Hücre Jel Elektroföresi (Comet assay) için kullanılabilir (Bony et al. 2010). Balık kanı (Mustafa et al. 2011, Altinok et al. 2012) ve solungaç epiteli Tek Hücre Jel Elektroföresi (Comet assay) çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Comet assay önce solungaç dokusundan kan hücreleri ayırmak için soğutulmuş fosfat tamponlu ($Ca^{2+}Mg^{2+}$ içermeyen) ile iki kez yıkanır. Ve soğuk ($1\times$ Hanks tuz tamponu, 20 mM EDTA, %10 dimetil sülfoksit (DMSO), homojenizasyon tamponu eklenir (pH 7.0-7.5). Doku makasla küçük parçalar halinde kesilir. Tek hücre süspansiyonu elde etmek için homojenize edilir. Elde edilen hücre süspansiyonu soğuk fosfat tamponu (4 C'de) içinde 5 dk 3000 rpm'de santrifüj edilir (Pandey et al. 2011).

Balık kanı 1:5 oranında soğuk fosfat (PBS) tamponu ile seyreltilir, 2 dakika 600 g santrifüj edilir. Çöken pelet kısım comet assay çalışmasında kullanılır (Brown and Steinert 2004). Tüm protokol UV ışığın DNA üzerindeki etkisi minimize etmek için sarı ışık altında (karanlık ya da loş ortamda) yapılmalıdır. Bekleme işlemleri kesinlik

karanlıkta olmalıdır.(Buschini et al. 2004) . Balık dokularından eritrositler dışında lenfositler ve böbrek hücreleri de comet assay kullanılmıştır.(Ali and Kumar 2008b).

Temel gereksinimler

- Elektroforez kabı (çalışma tipine göre küçük, orta boy ya da özel comet kabı, ışık almayan (karanlıkta çalışan) soğutmalı (soğutma özeliği yoksa buz aküleri üzerinde soğutulmalı),
- Güç kaynağı (20–30 volt 300mA verebilen güç kaynağı)
- Kullanılan boya uygun bir flüoresans mikroskobu(etidyum bromid için BP 515-560 nm eksitasyon filtreli, LP 580 nm bariyer filtreli)
- Mikroskoptan görüntü alabilecek görüntüleme sistemi(siyah-beyaz ya da renkli görüntü BMP formatında)
- Elde edilen görüntülerin işlenmesinde kullanılacak bir bilgisayar (Windows XP ya da üstü)

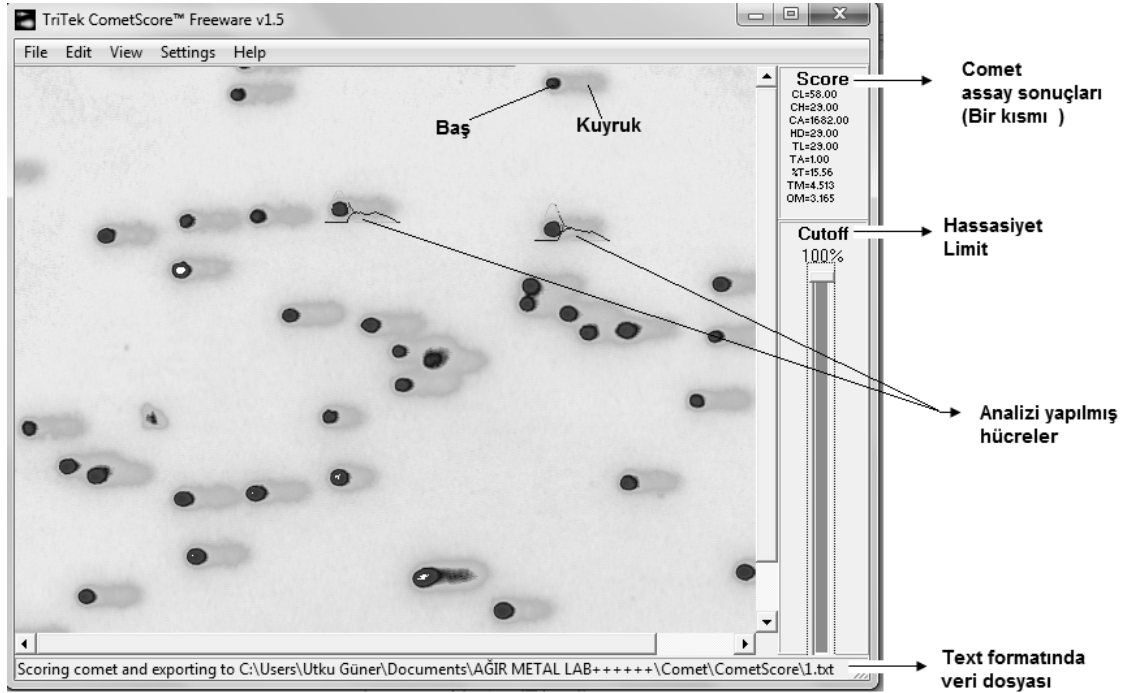
Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet assay) protokolü

- % 0.7 düşük erime noktasına sahip agar (LMPA) 37°C eritilir.(Ahmed et al. 2011). Eritme işlemi mikrodalga fırında yapılır.
- Donmaması için 20° C su banyosunda bekletilir.
- 10 µl hücre süspansiyonu, 100 µl % 0.7 LMPA ile karıştırılarak örnekler hazırlanır.
- Hazırlanan bu süspansiyondan 100 µl alınarak, normal agaroz (NMPA) kaplı lamaların üzerine konarak dondurulur.
- Preparatlar lizis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM% 10 DMSO ile Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, ve% 1 Triton X-100, taze eklendi) bir gece boyunca 4 °C'de bekletilir.
- Preparatlar elektroforez tamponunda (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA ve% 0.2 DMSO, pH> 13.5) 4 C° 20 dakika bekletilir.
- Alkalın elektroforez 24 V ve 300 mA 40 dakika süre ile 4 ° C'de uygulanır.
- Preparatlar 0.4 M Tris tamponu (pH 7.5) ile üç kez yıkama ile nötralize edilir.
- Preparatlar 100 µl etidyum bromid (10 µl / ml) ile boyanır.
- Preparatların incelenmesinde floresan mikroskobu (BP 515–560 nm eksitasyon filtreli, LP 580 nm bariyer filtreli) kullanılır.
- Elde edilen hücre görüntüleri yazılımla incelenir.

- İncelemede rastgele seçilmiş 100 (50–100) hücrede farklı parametrelerin(Comet uzunluğu, Kuyruk momenti vb.) değerleri kayıt edilir.
- Elde edilen sonuçların negatif kontrol, pozitif kontrole(mitomycin C, formaldehit ,UV radyasyonu, metil metansülfonat) göre farklılığı istatistiksel olarak incelenir(Tice et al. 2000, Ramsdorf et al. 2009).

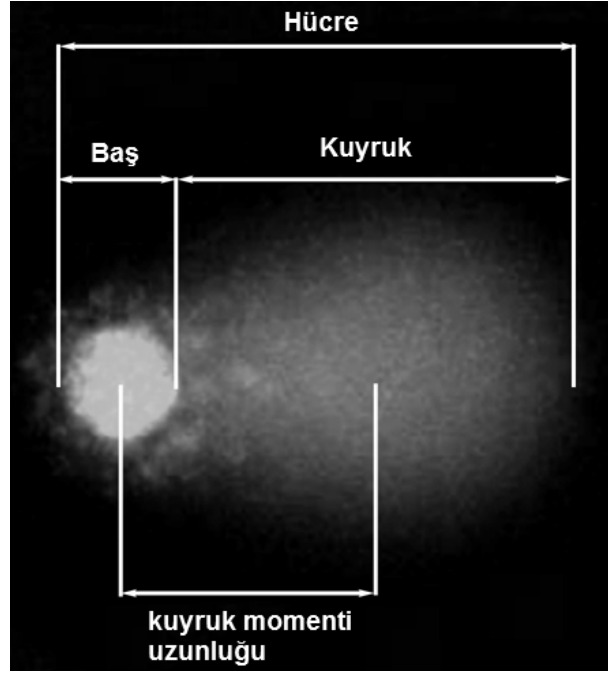
Sonuçların değerlendirilmesi

Comet score yazılımı ücretsiz ve kolay elde edilmesi nedeniyle araştırmalarda kullanılmaktadır (Şekil 3). Gündüzde yazılımlar hızlı geliştirilmekte araştırma için hızlı, kolay ve doğru analiz imkânı doğmaktadır. Tek Hücre Jel Elektrofrez (Comet assay) mikroskop görüntüleri özel yazılımlar kullanılarak analiz edilir. Analiz sonunda hücrelerdeki DNA parçalarının elektrofrez ile elektrik alan boyunca dağılması her bir hücre için ayrı ayrı ölçülür.



Şekil 3 Tek Hücre Jel Elektrofrez (Comet assay) sonuçlarının analizi için kullanılan mikroskop görüntüsü ve analiz yazılımı.

Çok sayıda (genellikle 50-100 kadar) hücreden elde edilen sonuçlar negatif kontrol değerleri ile karşılaştırılır. Ayrıca, pozitif kontrol(örneğin hidrojen peroksit) değerlerinin elde edilmesi çalışmanın doğruluğu açısından gereklidir. Doğal ortamdaki çalışmalarda ise kirliliği, temiz bölge alan ya da istasyonların karşılaştırılması yapılabilir. Comet assay görüntü analizi sonunda çok sayıda sayısal değer elde edilir(Şekil 4) (Lovell and Omori 2008).



Şekil 4 Comet assay sonucunda elde edilen sonuçlarda kullanılan farklı ölçümler

Comet assay sonucunda elde edilen bazı sayısal sonuçlar:

Kuyruk uzunluğu: DNA göçü, nükleer çekirdek vücut mesafe kuyruk uzunluğu ve DNA hasarına ölçüde değerlendirmek için kullanılır (Şekil 2).

Kuyruk uzunluğu = Kuyruk Kapsamı(Merkezi'nden Kuyruğa) Kuyruk + Kafa / 2

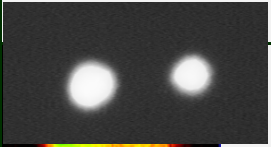
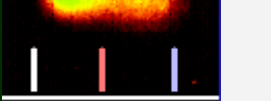
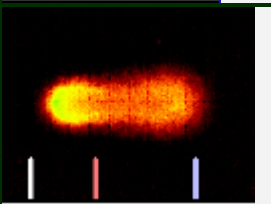
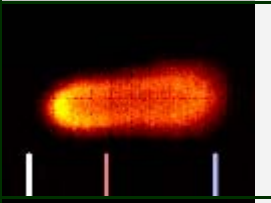
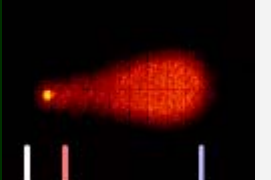
Olive kuyruk Moment: kuyruk moment kuyruk uzunluğu fraksiyondan ve kuyruk toplam DNA ürün olarak tanımlanır Olive Kuyruk Moment = (Ortalama kuyruk-Ortalama kafa X Kuyruk% DNA/100.

Ölçülen Kuyruk Moment = Kuyruk uzunluğu X Kuyruk% DNA/100.

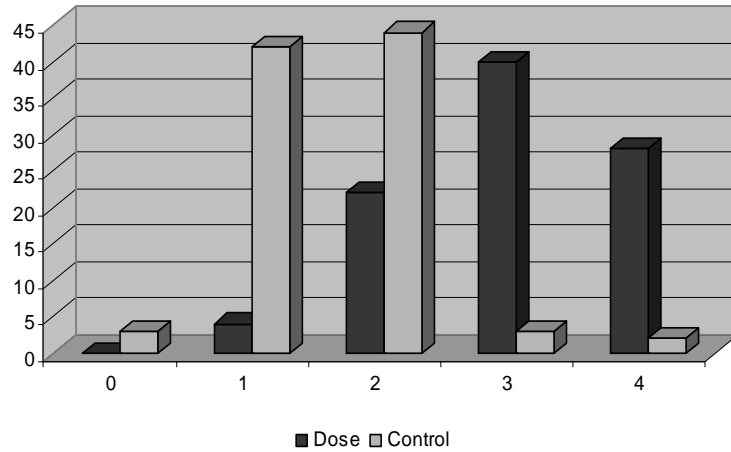
Kafa% DNA = (Kafa optimal yoğunluk / (Kafa optimal yoğunluk + Kuyruk optimal yoğunluk)) X 100.

Comet score yazılımı text formatında çok sayıda comet parametresini kayıt edebilir. Resim dosyası içinde her bir hücre analiz edilebilir. Görüntü analiz yazılımı sayısal hücre sayısı en 50 olması gerekir. Daha fazla hücre sayılması çalışmanın güvenilirliğini artırır. Elde edilen comet assay sonuçları farklı kategorilere ayrılarak sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma kuyruk uzunluğunun nükleus çapına oranı ile yapılmaktadır (Tablo 2). Bu yolla hücrelerdeki DNA hasarı sınıflandırılır. Bir preparat görüntüsü içinde farklı sınıfta DNA hasarı kategorileri sayıları karşılaştırılabilir (Şekil 5). Görüntü analiz yazılımlarıyla elde edilen değerler Excel, SPSS gibi yazılımlarla değerlendirilebilir.

Tablo 2. Comet assay DNA hasarları ve sınıflandırılması.

Sınıf 0		Hasar Yok
Sınıf 1		Az hasar; göç etmiş DNA parçaları(kuyruk) nükleus çapına eşit ya da hayda kısa.
Sınıf 2		Orta hasar ; göç etmiş DNA parçaları(kuyruk) nükleus çapına 2 katından daha kısa
Sınıf 3		Büyük hasar ; göç etmiş DNA parçaları(kuyruk) nükleus çapının 2 katına eşit.
Sınıf 4		Maksimum hasar; göç etmiş DNA parçaları(kuyruk) nükleus çapın 2 katından fazla.

Sonuçların değerlendirilmesi, doz ve kontrol gruplarının karşılaştırılması ile yapılır. Bu gruplar arasında istatistiksel farklılık araştırılır (Şekil 5).



Şekil 5 *Cyprinus carpio* DNA hasarı (0–4 DNA hasar seviyelerini göstermekte, hasar sınıfları Tablo 2’den)

SONUÇ

Balıklar sınırlı bir çevrede yaşamaları ve çevre kirleticilerden hızlı süre ve doza bağlı olarak etkilemeleri ile deneysel çalışmalar da sıklıkla kullanılmaktadır. Comet assay günümüzde genetik toksikolojide giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunun yanında çevre risk analizi, kirliliğin belirlenmesinde, sucul ortamın analizinde comet assay önemini artırmaktadır. Comet assay temel biyolojik araştırmalarda güvenilir ve sağlam bir araç olarak kullanılmaya devam edecektir. Araştırmacıların bu metodu farklı obje ve yerlerde kullanmaları çalışmalarında katkıda bulunacağı kanısındayım.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M. K., M. Habibullah-Al-Mamun, M. A. Hossain, M. Arif, E. Parvin, M. S. Akter, M. S. Khan, and M. M. Islam. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere* **84**:143-149.
- Ali, D. and S. Kumar. 2008a. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Science of the Total Environment* **405**:345-350.
- Ali, D. and S. Kumar. 2008b. Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Science of the Total Environment* **405**:345-350.
- Altinok, I., E. Capkin, and H. Boran. 2012. Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **102**:61-67.
- Bony, S., I. Gaillard, and A. Devaux. 2010. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **90**:421-428.
- Brown, J. S. and S. A. Steinert. 2004. DNA damage and biliary PAH metabolites in flatfish from Southern California bays and harbors, and the Channel Islands. *Ecological Indicators* **3**:263-274.
- Buschini, A., A. Martino, B. Gustavino, M. Monfrinotti, P. Poli, C. Rossi, A. Santoro, A. M. Dorr, and M. Rizzoni. 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **557**:119-129.
- Cavas, T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology* **49**:1431-1435.
- Cok, I., O. K. Ulutas, O. Okusluk, E. Durmaz, and N. Demir. 2011. Evaluation of DNA Damage in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) by Comet Assay for Determination of Possible Pollution in Lake Mogan (Ankara). *TheScientificWorldJournal* **11**:1455-1461.
- Cotelle, S. and J. F. Ferard. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **34**:246-255.
- Da Rocha, C. A. M., P. D. L. De Lima, R. A. Dos Santos, and R. M. R. Burbano. 2009. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay-A Review. *Reviews in Fisheries Science* **17**:170-173.
- Dietrich, G. J., M. Zabowska, M. Wojtczak, M. Slowinska, D. Kucharczyk, and A. Ciereszko. 2007. Effects of different surfactants on motility and DNA integrity of brown trout (*Salmo trutta fario*) and common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Reproductive Biology* **7**:127-142.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive, and K. L. Oneill. 1995. The Comet Assay - a Comprehensive Review. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* **339**:37-59.
- Gontijo, A. M. D. C., R. E. Barreto, G. Speit, V. A. V. Reyes, G. L. Volpato, and D. M. F. Salvadori. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **534**:165-172.
- Guilherme, S., I. Gaivao, M. A. Santos, and M. Pacheco. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat Res.*
- Jin, H. H., J. H. Lee, and C. E. Hyun. 2004. Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**:268-275.
- Keiter, S., A. Rastall, T. Kosmehl, K. Wurm, L. Erdinger, T. Braunbeck, and H. Hollert. 2006. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube River - A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science and Pollution Research* **13**:308-319.
- Klobucar, G. I. V., A. Stambuk, M. Pavlica, M. S. Peric, B. K. Hackenberger, and K. Hylland. 2010. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology* **19**:77-84.

- Kocyigit, A., H. Keles, S. Selek, S. Guzel, H. Celik, and O. Erel. 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **585**:71-78.
- Lourenco, J., B. B. Castro, R. Machado, B. Nunes, S. Mendo, F. Goncalves, and R. Pereira. 2010. Genetic, Biochemical, and Individual Responses of the Teleost Fish *Carassius auratus* to Uranium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **58**:1023-1031.
- Lovell, D. P. and T. Omori. 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* **23**:171-182.
- Mustafa, S. A., S. N. Al-Subiai, S. J. Davies, and A. N. Jha. 2011. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* **20**:1455-1466.
- Pandey, A. K., N. S. Nagpure, S. P. Trivedi, R. Kumar, and B. Kushwaha. 2011. Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **726**:209-214.
- Raiaguru, P., S. Suba, M. Palanivel, and K. Kalaiselvi. 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **41**:85-91.
- Ramsdorf, W. A., F. D. F. Guimaraes, M. V. M. Ferraro, J. Gabardo, E. D. Trindade, and M. M. Cestari. 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **673**:78-81.
- Selvi, M., T. Cavas, A. C. K. Benli, B. K. Memmi, N. Cinkilic, A. S. Dincel, O. Vatan, D. Yilmaz, R. Sarikaya, T. Zorlu, and F. Erkoc. 2010. In vivo Genotoxicity Assessment of Esbiothrin in Fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Drug Metabolism Reviews* **42**:126-127.
- Simoniello, M. F., F. Gigena, G. Poletta, A. Loteste, E. Kleinsorge, M. Campana, J. Scagnetti, and M. J. Parma. 2009. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **83**:155-158.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider. 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* **175**:184-191.
- Sumathi, M., K. Kalaiselvi, M. Palanivel, and P. Rajaguru. 2001. Genotoxicity of textile dye effluent on fish (*Cyprinus carpio*) measured using the comet assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **66**:407-414.
- Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, and Y. F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**:206-221.
- Ulutas, O. K., O. Okusluk, N. Demir, E. Durrnaz, and I. Cok. 2008. Determination of possible pollution in Lake Mogan (Anlcara) by Comet assay using common carp (*Cyprinus carpio* L). *Toxicology Letters* **180**:S204-S205.
- Zhou, B. S., W. H. Liu, W. H. L. Siu, D. O'Toole, P. K. S. Lam, and R. S. S. Wu. 2006. Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **77**:136-142.