

# DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay

## Comet Assay for Determining of DNA Damage: Review

Dr. Yıldız DİNÇER,<sup>a</sup>  
Selin KANKAYA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Biyokimya AD,  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 08.09.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 21.06.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Yıldız DİNÇER  
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyokimya AD, İstanbul,  
TÜRKİYE/TURKEY  
stare63@yahoo.com

**ÖZET** DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya bazı çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Genetik bilginin sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemli olduğundan çekirdekte DNA hasarını onaran çeşitli onarım sistemleri yer almaktadır. Ağır hasar oluştuğunda veya DNA onarım aktivitesi defektif ise DNA hasarı kısa dönemde replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır. Kanser, diyabet, ateroskleroz gibi hastalıkların etiolojisinde yer alan DNA hasarı günümüzde kronik dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, ksenobiyotik ve radyasyon aracılı genotoksisitenin belirlenmesinde biyolojik belirteç olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan teknikler günümüzde büyük önem kazanmıştır. Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla "Comet Assay" tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. 1988 yılında "Alkali Comet Assay" olarak tanıtılmasından sonra çeşitli modifikasyonlarla geliştirilerek çok farklı tiplerde DNA hasarının belirlenmesinde kullanılır hale gelmiştir. Yaşlanma, moleküler epidemiyoloji, klinik ve genetik toksikoloji alanlarında önemli uygulamaları olan "Comet Assay" son yıllarda giderek artan bir sıklıkta apoptozis, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında da yer almıştır. Bu derlemenin amacı "Comet Assay" yöntemini tanıtmak, uygulamaya yönelik ayrıntılara açıklık kazandırmak ve yöntemin kullanımını yaygınlaştırmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Comet assay; DNA hasarı; DNA kırıkları; mutasyon

**ABSTRACT** DNA is the target of many reactive molecules and it is prone to be damaged easily. DNA damage may be resulted either from spontaneously during DNA metabolism or effects of some environmental factors. There are repair mechanisms for DNA damage in cell nucleus since the prevention of DNA structure is extremely important for conducting the genetic information. When a heavy damage occurs or repair mechanisms are defective, DNA damage results in inhibition of replication, transcription or protein synthesis in short term, however in long term, this damage may lead to mutation and chromosomal anomalies. DNA damage which is a contributing factor in the pathogenesis of certain diseases such as cancer, diabetes and atherosclerosis, is being evaluated as the biological marker in assessment of chemotherapy and radiotherapy, determining the radiation and xenobiotic mediated genotoxicity as well as follow up of chronic degenerative diseases. Therefore, techniques that enable the sensitive measurement of DNA damage became important recently. Comet assay is a fast, non invasive, sensitive fluorescent technique, which is being used for detecting DNA damage on single cell level and also determining the amount of damage. After its introduction in 1988 as "Alkaline Comet Assay", it has been developed with many modifications and became a workable technique for detecting a variety of DNA damages. As comet assay was being utilized in aging, molecular epidemiology, clinical and genetic toxicology, recently it is placed also in research of apoptosis and oxidative stress-antioxidants. Current review aims to give information about comet assay and its applications as well as help to propagate its use.

**Key Words:** Comet assay; DNA damage; DNA breaks; mutation

## DNA HASARI

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA'nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluştururlar. DNA bazlarının polar gruplarında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve sonuçta mutasyona neden olur. Deoksiriboz fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ise replikasyonu bloke etmenin yanı sıra aşırı miktarlarda oluştuğunda hücre ölümüne yol açmaktadır. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak  $10^4$  adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir.<sup>1</sup> DNA üzerinde oluşan hasarları onaran spesifik onarım sistemleri vardır. DNA onarım kapasitesini aşan düzeyde hasar oluştuğunda veya DNA onarım sistemleri kalıtsal veya edinsel olarak defektif ise DNA hasarı kısa dönemde deoksiribonükleotid trifosfat havuzunun miktar ve bileşiminde değişikliklere, replikasyonun durmasına, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, proteolitik aktivitenin indüksiyonuna; uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olur.<sup>2</sup> DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanırlar.<sup>3</sup>

DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Normal DNA metabolizması sırasında oluşan DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimlerdir. Pürin ve pirimidin bazlarının keto-enol tautomerizmi ya da deaminasyonu bazların eşleşme spesifitesini değiştirerek yanlış eşleşmeye yol açar. Ayrıca bazların termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı oluşur ve sonuçta apürinik/apirimidinik bölgeler meydana gelir. Baz kaybı hem replikasyonu etkiler hem de bu bölgelerde kolaylıkla zincir kırıkları oluşur.<sup>1</sup>

DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Fiziksel ajanların başında iyonizan radyasyon gelir. Radyasyon enerjisinin doğrudan etkisi ile DNA zincir kırıkları oluşurken; radyasyonla açığa çıkan enerjiyle uyarılan moleküllerin (hidroksil radikalleri) DNA ile etkileşimi hem DNA zincir kırıklarına hem de oksidatif baz modifikasyonlarına neden olmaktadır. Bir diğer fiziksel faktör olan UV ışınları DNA üzerinde çapraz bağlanmalara, pirimidin dimerleri oluşumuna ve zincir kırıklarına yol açmaktadır. DNA hasarı oluşturan kimyasal ajanların başında alkileyici maddeler, nitroz asid, platinyum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler (aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aflatoksinler ve fenitoin, warfarin, rifampin gibi ilaçlar) gelmektedir. Bu kimyasallar bazları alkilleyerek, oksitleyerek, bazlar arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına neden olarak DNA hasarı oluştururlar.<sup>4</sup>

Oksidatif DNA hasarı, normal metabolizma sırasında bazı tepkime basamaklarında oluşan oksijen radikalleri tarafından endojen olarak oluşturulduğu gibi iyonizan radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi eksojen faktörler tarafından da meydana getirilmektedir. Yaşam için gerekli olan oksijen organizmada hücresel bileşenlerin hasarına neden olan reaktif ürünlerin oluşmasına yol açar. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) ve nitrojen radikalleri dış yörüngelerinde bulunan çiftlenmemiş elektronlar nedeniyle son derece reaktif moleküllerdir ve DNA ile kolayca etkileşerek oksidatif baz modifikasyonu ve DNA zincir kırıkları oluşturabilirler. DNA üzerinde yaklaşık 23 farklı tipte oksidatif baz hasarı olmakla birlikte en sık görülen baz modifikasyonu 8-hidroksi -2-deoksiguanozindir (8-OHdG). 8-OHdG güçlü bir mutajen olup, DNA replikasyonu sırasında sitozin yerine adeninle eşleşerek GTT mutasyonuna neden olur.<sup>5,6</sup> DNA üzerindeki 8-OHdG bileşikleri, 8-OHdG glikozilazlar tarafından kesilerek uzaklaştırılır. Onarımın yetersiz olduğu koşullarda hasar kalıcı hale gelir. Bu baz değişimi mutasyona uğramış protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla görülmektedir.<sup>7</sup> Bir diğer radikal hasarı tek ve çift sarmal DNA zincir kırık-

larıdır ve en reaktif SOR olan hidroksil radikalının (OH·) DNA ile etkileşimi sonucu oluşmaktadır.<sup>8,9</sup>

## COMMET ASSAY İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Spesifik hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlendi.<sup>10</sup> Mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülmüş hücreler hafif alkali ortamda bekletilerek membranların parçalanıp DNA sarmallarının kısmi açılması sağlandı. Daha sonra nötrale edilen hücreler akrinin turuncusu ile işaretlendi ve DNA hasarının düzeyi yeşil floresansın kırmızı floresansa oranının fotometrik ölçümü ile belirlendi (yeşil floresans çift sarmal DNA'yı, kırmızı floresans ise tek sarmal DNA'yı belirtir). Günümüzde bu teknik çok sayıda kritik basamak içerdiğinden tamamen terk edilmiştir. Daha sonraki yıllarda izole edilmiş hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttırmak için Ostling ve Johanson mikro jel elektroforez tekniğini geliştirdiler.<sup>11</sup> Bu teknikte mikroskop lamlarının üzerine agaroz jel içinde hücreler gömülür, yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilerek membranlar parçalanır. Nötr pH ortamında kısa bir süre elektroforez uygulanır. Yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA, sağlam DNA'ya göre daha hızlı bir şekilde anoda doğru göçer. DNA göçünün miktarı preparatların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir. Ancak burada elektroforezin nötral koşullarda uygulanması yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilemez. Tek sarmal kırıkları tamamlanmamış kesip çıkarma onarım bölgeleri ile apuridik ve apirimidinik bölgelerde olduğu gibi alkali-duyarlı bölgelerden kaynaklanmaktadır. 1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir.<sup>12</sup> Günümüzde uygulanan "Comet Assay" Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıklarının tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojidir.<sup>12</sup> Son yıllarda "Comet Assay" belirli DNA dizilerine spesifik işaretli probalar kullanılarak floresan in situ hibridizasyon tekniği ile birleştiril-

miştir. FISH (fluorescent in situ hybridization)-comet olarak adlandırılan bu modifiye teknikle dizi veya gen spesifik hasar belirlenebilmektedir.<sup>13</sup>

## COMET ASSAY METODOLOJİSİ

"Comet Assay" basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforezde kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur.<sup>14,15</sup> Sonuçların güvenilir olması için tüm işlem basamaklarının azami dikkat ve titizlikle uygulanması son derece önemlidir. Jelin son basamağa kadar bozulmadan kalabilmesi büyük bir dikkat ve el becerisi gerektirmektedir. Lizis işleminde serbestleşen DNA ışığa karşı duyarlıdır. Bu basamaktan sonra ilave kırıklar oluşmaması için işlemler karanlık odada, gece lambası ışığında yürütülmelidir. Lamaların kenar kısımlarında kalan DNA'ların daha yüksek oranda hasarlı olduğu belirlendiğinden<sup>15</sup> 'Comet' sayımı aşamasında bu bölümlerde yer alan DNA'lar dikkate alınmamalı, sayım orta kısımlarda yapılmalıdır. 'Comet sayımı' tüm çalışma boyunca aynı kişi tarafından yapılmalıdır. Kişi incelediği lamın hangi çalışma grubuna ait olduğunu bilmemelidir.

## "COMET ASSAY" BASAMAKLARI

1. Hücresel materyalin hazırlanması
2. Mikroskop lamlarının hazırlanması
3. Lizis
4. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması (Alkali unwinding)
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. DNA'nın boyanması ve "comet"lerin görüntülenmesi

8. Comet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi

**1. Hücresel materyalin hazırlanması:** "Comet Assay"ın sonuçlarının doğruluğu test materyalinin hassas bir şekilde hazırlanmasına bağlıdır. Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri (polimorf lökositler, mononükleer hücre fraksiyonları), pirimer insan fibroblastları doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir ve bunların her birinin hazırlanması spesifiktir. Tam kan örneklerinde DNA hasar çalışmasında heparinize kan kültür ortamına alınır, düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak kullanılır. Lenfosit ve mononükleer hücrelerde DNA hasar çalışmalarında, bu hücre fraksiyonları histopak ile izole edildikten sonra kullanılır. Fibroblast ve çeşitli doku örneklerinde ise tripsin-EDTA ile muamele edilerek önce proteinler uzaklaştırılır. Bu tip ön işlemlerle serbestleşen hücreler daha önce agaroz jel ile ön kaplama yapılmış ve numaralandırılmış lamalar üzerine uygulanırlar.<sup>14</sup>

**2. Mikroskop lamalarının hazırlanması:** Lam hazırlamada en önemli hedef tüm işlemler tamamlanıncaya kadar jelin bozulmadan kalabilmesi ve mikroskopik inceleme sırasında temiz, net bir görüntü verebilmesidir. Deneyden bir gün önce normal erime noktalı agaroz jel mikroskop lamalarına baştan sona yayılır. Bu işleme ön kaplama denir. Ön kaplama yapılan lamalar kuruması için en az bir gece bekletilir. Ertesi gün düşük erime noktalı ikinci bir agaroz jel içinde süspansiye edilmiş hücreler ön kaplama yapılmış olan lamaların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren sandviç benzeri bir sistem oluşturulur. Sağlıklı sonuçlar elde edilmesinde agaroz jelin konsantrasyonu ve jel içindeki hücrelerin konsantrasyonları çok önemlidir. Optimal hücre sayısı her gözlem alanında birkaç taneden fazla olmamalıdır. Yüksek hücre yoğunlukları özellikle DNA göçünün hızlı olduğu preparatlarda comet'lerin üst üste gelmesine neden olur. Yüksek agaroz konsantrasyonu ise DNA göç hızını ve diğer işlem basamaklarını etkiler.<sup>14</sup>

Bazı araştırma protokollerinde hücreler üzerinde in vitro hasar oluşturularak inceleme yapılmaktadır. DNA üzerinde hasar oluşturmak amacıyla UV, iyonizan radyasyon veya ksantin/ksantin

oksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi radikal oluşturan ajanlar kullanılmaktadır. Bu tip çalışmalarda hücreler belirli konsantrasyon ve dozajdaki hasar yapıcı madde ile kısa süre soğuk ortamda muamele edildikten sonra lizis işlemine geçilir.

**3. Lizis:** Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat bekletilir. Lizis sırasında kan ve doku örneklerinde mevcut olan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demire bağlı serbest radikal-aracılı DNA hasarını önlemek için lizis çözeltisine % 10 oranında dimetil sülfoksit eklenir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır. DNA küçük bir miktar nonhiston proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapısında kalır. Lamalar birkaç defa uygun bir tampon ile yıkanarak hücresel artıklar, kalan deterjan ve tuzlar uzaklaştırılır. Artık preparatlar bir sonraki aşamaya hazırdır.<sup>14</sup>

**4. Alkali ortamda DNA süperkoil yapısının açılması (Alkali unwinding):** Hazırlanmış olan preparatlar çift sarmal DNA yapısının açılması için elektroforez öncesinde yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektroforez tamponunda inkübe edilir. Alkali tampon içersinde çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar. İşlem süresi araştırmacıya göre değişmekle birlikte genellikle 20 dk. olarak uygulanmaktadır.<sup>15</sup>

**5. Elektroforez:** Alkali ortamda DNA sarmalının açılmasından sonra, jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali koşullarda elektroforeze tabi tutularak comet oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığı zaman, anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Yöntemin ismi olan 'comet' bu kuyruklu yıldız görüntüsünden kaynaklanmıştır. Hasarsız DNA ise çekirdekten çıkamaz. Elektroforez 25 V, 300 mA akım ve 25 dk süre içinde gerçekleştirilir.<sup>16</sup>

**6. Nötralizasyon:** Alkali ortamda elektroforezden sonra, jel pH'sının nötralizasyonu için lamalar uygun bir tamponla (pH 7,5) üç defa yıkanır. Nötralizasyondan sonra lamalar boyanarak cometler sayılabilir veya jeller kurutularak lamalar daha sonra incelenmek üzere saklanabilir.<sup>14</sup> Kurutulmuş jelle-

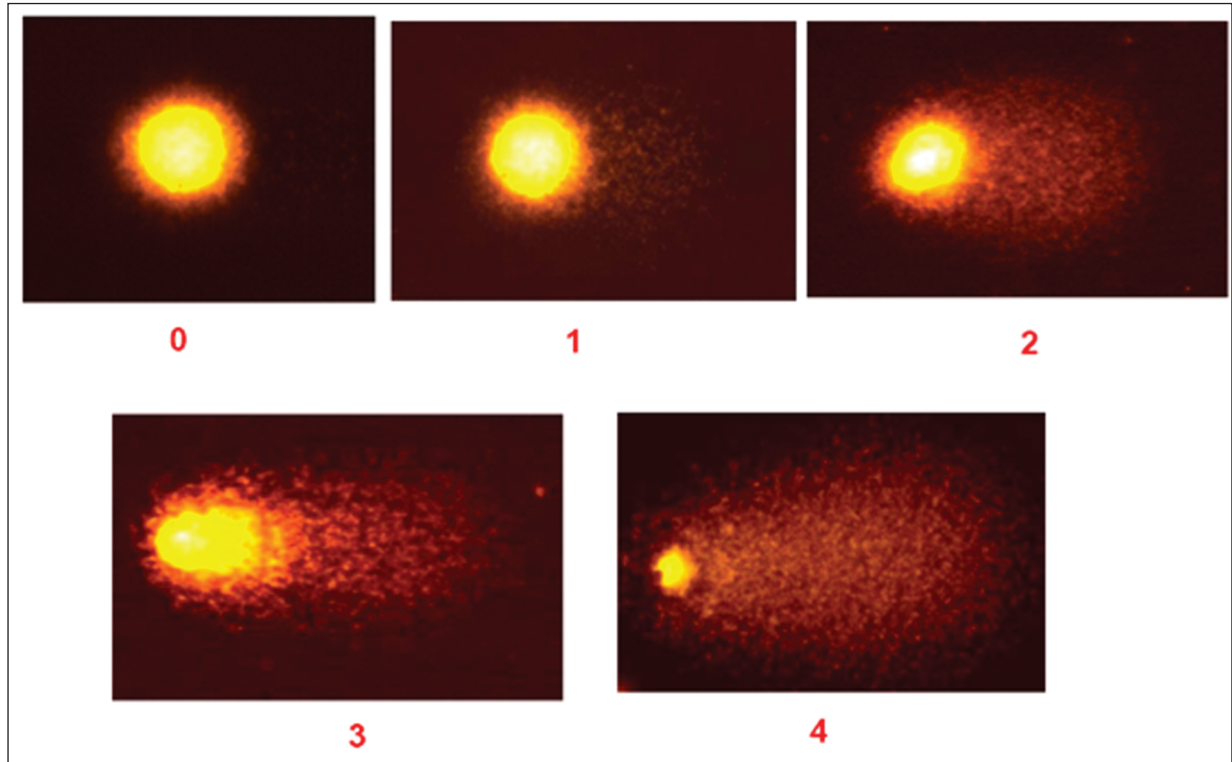
rin çok uzun süreli depolanmasında stabilizasyonu sağlamak için uygun pH'da formalin kullanılabilir.

**7. DNA'nın boyanması ve "Comet"lerin görüntülenmesi:** "Comet" in görüntülenmesi için kullanılan DNA spesifik boyalar ve mikroskopta seçilen uygun büyütme, uygulayıcının spesifik ihtiyaçlarına bağlıdır ve yöntemin güvenilirliğine ile hassasiyetine fazla bir etkisi yoktur. İşaretleme için yaygın olarak kullanılan floresan boya etidyum bromürdür. "Comet"lerin görüntülenmesinde yaygın olmamakla birlikte non-floresan boya olarak gümüş-nitrat da kullanılmaktadır. Boyama sonrasında floresan mikroskobunda anoda doğru göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız görüntüsü verir, hasarsız DNA ise spot şeklinde görülür.<sup>14-16</sup>

**8. "Comet" sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi:** Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için mikroskobik değerlendirme aynı kişi tarafından yapılmalı ve bu işi yapan kişi değerlendirme sırasında lamaların numarasını veya hangi çalışma grubuna ait olduğunu bilmemelidir. "Comet"lerin sayılmasında iki farklı yol izlenebilir:

**a) Görsel analiz:** Farklı derecelerdeki hasarı gösteren "comet"leri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel değerlendirmeye göre "comet"ler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4). Sınıflandırma "comet"lerin görünümüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirilir: Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyruksuz spot şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. kategoriye girer, 0-4 kategorileri arasında yer alan "comet"ler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde 1, 2 ve 3 kategorilerinde yer alır (Şekil 1). Sayma işlemi için her lamdan rastgele 100 "comet" seçilir ve her birine içinde buldukları kategoriye göre bir değer verilir (0, 1., 2., 3. veya 4). Her bir kategorideki "comet" sayısı belirlenerek spesifik formüller ile DNA hasarı belirlenir.<sup>14-16</sup>

**b) Bilgisayarlı görüntü analizi:** Mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak karakteristik "comet"lerin görüntüleri analiz edilir. Bu analizlerin yapılabilmesi için birçok şirket tarafından ge-



ŞEKİL 1: Görsel analizde "comet" kategorileri.

liştirilmiş olan yazılımlar kullanılır. Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti kuyruk uzunluğu ve göreceli kuyruk yoğunluğunu içeren formüllerle hesaplanan bir parametredir.<sup>14-16</sup>

Lamlar analiz edildiğinde görsel hesaplamalarla bilgisayar görüntü analizleri paralellik gösterir ve bu sonuçlar arasındaki eşleşme mükemmeldir.<sup>15,17</sup>

Tablo 1’de “Comet Assay” ile tam kanda lökosit DNA hasarı ölçümü verilmiştir.

## “COMET ASSAY” İLE İLGİLİ DİĞER METODOLOJİLER

### FARKLI TİPLERDE DNA HASARI ÇALIŞMALARI

Bazı araştırmacılar “Comet Assay” tekniğinde hasara spesifik DNA onarım enzimleri kullanarak çeşitli baz modifikasyonlarının sıklığını belirlemeyi başarmışlardır. Lizis işleminden sonra hasara spesifik onarım endonukleazları ile jeller inkübe edildikleri zaman, bu spesifik hasarı içeren bölgelerde ilave kırıklar ortaya çıkar. Net hasar miktarı hesaplanırken enzim inkübasyonu varlığında kuyruktaki DNA yüzdesinden enzim inkübasyonu olmadan kuyruktaki DNA yüzdesi çıkartılır. Bu metodoloji ile UV spesifik endonukleazlar kullanılarak UV

ışınlarının neden olduğu ve cilt kanseri ile yakından ilişkili olan pirimidin dimerlerinin varlığı ve sıklığı belirlenmiştir.<sup>18</sup> Benzer olarak okside olmuş pirimidinlerin sıklığı endonukleaz III enzimi kullanılarak,<sup>19</sup> 8-OH-dG hasarının sıklığı formamido-pirimidin DNA glikozilaz kullanılarak,<sup>20,21</sup> metil adenin hasarının sıklığı 3-metiladenin DNA glikozilaz II kullanılarak gösterilmiştir.<sup>22</sup> Tablo 2’de “Comet Assay” tekniğinde sıklıkla kullanılan hasar spesifik endonukleazlar ile substratları verilmiştir.

### DNA ONARIM ARAŞTIRMALARI

Doğal DNA zincir kırıklarının yanı sıra, kesip-çıkarma onarımı sırasında oluşan geçici zincir kırıkları da elektroforezde DNA göçünü artırır. DNA kesip-çıkarma onarım mekanizmasının ilk basamağında spesifik bir endonukleaz hasara yakın bir bölgede DNA sarmalını keserek zincir kırığı oluşturur. Kesme işleminden sonra ortama deoksiribonukleozit trifosfatlar ilave edilip uygun sıcaklıkta inkübe edilirse onarım gerçekleşir ve kırık uçlar bağlanır. “Comet Assay”, DNA hasarı oluşturan bir madde ile muamele edildikten sonra DNA onarım aktivitesinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.<sup>15-17,23</sup>

### GENOTOKSİSİTE ARAŞTIRMALARI

Genotoksosite DNA zincir kırıkları ile karakterize olduğundan “Comet Assay” ile belirlenebilmektedir.<sup>24,25</sup> In vitro ve in vivo genetik toksikoloji alanında “Comet Assay” önemli uygulama alanına sahiptir. Farklı hücre dizileri ve herhangi bir organdan alınan hemen her tip hücre bu teknikte test

**TABLO 1:** Tam kanda lökosit DNA hasarı tayininde comet assay yönteminin aşamaları.

Hücrel materyalin hazırlanması	Heparinize tam kan RPMI medium ve düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak önceden normal erime noktalı agaroz ile kaplanmış lamaların üzerine yayılır. (Agarozun donmaması için çok hızlı çalışılmalıdır)
Lamların agaroz ile kaplanması	Mikroskopik lamaları üzerine %3 v/w konsantrasyonunda normal erime noktalı agaroz yayılır. Oda sıcaklığında bir gece kurumaya bırakıldıktan sonra kullanılır.
Lizis	2.5 M NaCl, 200 mM NaOH, 100 mM EDTA-Na2, 10 mM Tris, %1 v/v Triton x-100, %10 v/v Dimetilsülfoksit çözeltisinde 1 saat inkübasyon uygulanır. Lizis sonrası kalıntıları uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkama yapılır.
DNA süperkoil yapısının açılması	300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na2 çözeltisinde (bu çözelti aynı zamanda elektroforez çözeltisidir) karanlıkta 40 dk. inkübasyon uygulanır.
Elektroforez	Özel “Comet Assay” elektroforez tankında 25 dk süre ile 25 V, 300 mA akım uygulanır.
Nötralizasyon	400 mM tris-baz çözeltisi ile yıkama yapılır, pH nötralize edilir.
Boyama ve görüntüleme	20 u/ml konsantrasyonda etidyum bromür ile boyama yapılır, 400 X büyütme ile incelenir.

**TABLO 2:** Hasar spesifik endonükleazlar ve substratları

Hasar spesifik endonükleaz	Substratları
Endonükleaz III	Okside pirimidinler, apirimidinik/apürinik bölgeler
Endonükleaz V (UV endonükleaz)	Siklobütan pirimidin dimerleri, apirimidinik/apürinik bölgeler
Formamidopirimidin glikozilaz	Açık halkalı pürinler (adenin ve guanin), 8-hidroksideoksiguanozin, apirimidinik/apürinik bölgeler
3-Metiladenin DNA glikozilaz	3-Metiladenin
Urasil DNA glikozilaz	Urasil

edilebilir. Tanımlanmış genotoksik ve mutagenik ajanların farklı hücre tipleri ve farklı dokulardaki spesifik aktiviteleri (hücreye spesifik metabolik aktivasyon ve in vitro DNA onarımı; toksikokinetikler ve bir maddenin farklı yollarla vücuda verilmesini takiben doz-toksik yanıt ilişkisi) “Comet Assay” ile araştırılabildiği gibi, genotoksik etkisi henüz tam olarak tanımlanmamış olan araştırma kimyasallarının toksik etkileri ve doz-toksikite ilişkisi de bu yöntemle belirlenebilmektedir. Genotoksikite araştırmalarında kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında “Comet Assay”ın bazı avantajları vardır. Deney hayvanlarının hemen her bir dokusunda ve hatta insan biyopsi örneklerinde sadece az miktarda hücreye ihtiyaç duyarak DNA kırıklıklarını belirleme imkânı verir. Bütün prosedür birkaç saatte tamamlanabilir ve bir görüntü analizörü varsa anında değerlendirilebilir. Ayrıca ihtiyaç duyulan donanımın büyüklüğü ve maliyeti genetik toksikolojide kullanılan diğer kısa zamanlı testlerden daha fazla değildir.<sup>16</sup>

#### APOPTOZİS ARAŞTIRMALARI

Nekroz ya da apoptoz-aracılı sitotoksikite nedeni ile oluşan DNA kırıkları elektroforezde DNA göçünün artmasına neden olur. Her iki durumda da çift sarmal zincir kırıkları oluşmaktadır.<sup>26,27</sup> Apoptotik ve nekrotik hücreler nötral veya alkali ortamda uygulanacak elektroforez ile belirlenebilir.<sup>28,29</sup> Bazı araştırmacılar “comet”lerin karakteristik görünümüne dayanarak “Comet Assay” ile apoptotik hücrelerin nekrotik hücrelerden kolayca ayrılabilirdiği sonucuna ulaşmışlardır. Bu araştırmacılara göre bazı istisnalar bulunsa da genel olarak apoptotik hücreler küçük baş ve yelpaze şeklinde kuyruğu olan “comet”ler; nekrotik hücreler ise geniş baş ve değişik uzunluklarda dar bir kuyruğa sahip “comet”ler oluşturmaktadır.<sup>28,30,31</sup>

#### BİYOLOJİK İZLEME

“Comet Assay” göreceli olarak kolay, ucuz, hızlı ve non-invaziv bir teknoloji olduğu ve 10-20 mikrolitre kan örneğinde uygulanabildiğinden beslenme, yaşlanma, egzersiz gibi biyolojik süreçlerin izlenmesinde, çevresel değişikliklerin canlı sistemlerdeki etkisinin belirlenmesinde, hipoksi, ozon ve kemoterapi etkilerinin değerlendirilmesinde, sperm kalitesinin belirlenmesinde tercih edilmektedir.<sup>32-40</sup>

#### ANTIOKSİDAN ARAŞTIRMALARI

Oksidatif stresin kanser, diyabet, ateroskleroz, nörodegeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin temelinde yer aldığı belirlenmesinden sonra araştırmalar antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitli antioksidanlar farklı mekanizmalarla oksidatif hasarı önlemekte, sınırlamaktadır. Antioksidan özelliği bilinen çeşitli maddelerin klinik kullanımına ilişkin çalışmalar yürütülürken bir yandan da yeni bir takım bitkisel moleküllerin antioksidan özellikleri olup olmadığı araştırılmaktadır. “Comet Assay”, sayıları büyük bir hızla artmakta olan in vivo ve in vitro antioksidan çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.<sup>41-46</sup>

#### KLİNİK ARAŞTIRMALAR

“Comet Assay”ın klinik araştırmalarda kullanılması çeşitli hastalıkların patojenik mekanizmalarının aydınlatılmasına önemli katkı sağlamıştır. Bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında,<sup>47</sup> kansere duyarlılığın belirlenmesinde,<sup>48</sup> kanser tedavisinin takibinde,<sup>36,49</sup> diabetes mellitus,<sup>21,50-52</sup> katarakt,<sup>53</sup> romatoid artritis-sistemik lupus eritematozus,<sup>54,55</sup> polikistik over sendromu<sup>56</sup> ve Alzheimer<sup>57-59</sup> gibi hastalıklarda artmış DNA hasarı “Comet assay” ile gösterilmiş, post menopozal kadınlarda hormon

replasman tedavisinin,<sup>60</sup> tiryakilerde sigaranın DNA üzerine etkileri yine bu yöntemle incelenmiştir.<sup>61,62</sup> Reprodüktif tedavide erkek infertilitesi söz konusu olduğunda sperm DNA'sının bütünlüğü "Comet Assay" ile test edilmiştir.<sup>63</sup>

## YÖNTEMİN DEZAVANTAJLARI

"Comet Assay" basit, hızlı, ucuz, duyarlı bir yöntem olması, çok küçük hacimde örnek gerektirmesi ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği nedeniyle sıklıkla kullanıldığı halde, bazı dezavantajlara sahiptir. Tekniğin uygulama aşamalarındaki bazı farklılıklar (agaroz konsantrasyonu, uygulanan hücre miktarı, elektroforez süresi, vb) farklı sonuçlara yol açsa da, aynı protokolü uygulayan farklı laboratuvarların sonuçlarında da farklılık olabilmektedir.<sup>64</sup> Bu farklılıklar büyük oranda "Comet" sayımı yapan kişiden kaynaklanmaktadır. "Comet" sayımının deneyimli bir kişi tarafından gerçekleştirilmesi ve projenin başından sonuna kadar aynı kişi tarafından yürütülmesi sonuçların güvenilirliği açısından elzemdir. Çalışmalar sırasında negatif ve pozitif kontrol kullanımı sonuçların güvenilirliğini arttıracaktır. Özellikle biyolojik izleme çalışmalarında istenilen miktarda kolayca elde edilebildiğinden tam kan lökositleri sıklıkla kullanılmak-

tadır. Oysa yapılan çalışmalar taze izole edilen lenfositlerde hasar oluşturuca bir ajanla işlem sonrasında, DNA onarımının çok yavaş ilerlediğini göstermiştir.<sup>65</sup> Dolayısıyla DNA onarım çalışmaları için lenfositler iyi bir tercih değildir. DNA hasarı oluşturan bir kimyasalla işlem yapıldığında, uygulanacak optimum konsantrasyon ve uygulama süresi (zincir kırıklarının oluşacağı fakat hücrenin canlılığını kaybetmeyeceği konsantrasyon ve süre) literatürde belirlenmiş olsa bile araştırmacı tarafından test edilerek belirlenmeli, bu arada hücre canlılığı da mutlaka test edilmelidir. Tam kan lökositlerinde belirlenen DNA hasarı organizmanın genel durumunu ortaya koyar, fakat spesifik bir dokuya ait hasarı göstermez. Bunlar "Comet Assay" çalışmalarında araştırmacıyı yönlendirecek bilgilerdir.

## SONUÇ

Çeşitli tiplerde DNA hasarı ve DNA onarım aktivitesinin belirlenmesinde basit, hızlı ve duyarlı bir yöntem olan "Comet Assay" ülkemizde sınırlı sayıda araştırmacı tarafından uygulanmaktadır. Yöntemin tanıtılması ve kullanımının yaygınlaştırılmasıyla tıbbi araştırmaların kalitesinin artacağı kesindir.

## KAYNAKLAR

- Lindahl T. Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res* 1990;238(3):305-11.
- Johnson RT, Collins AR, Squires S, Mulliner AM, Elliot GC, Downes CS, et al. DNA Repair under stress. *J Cell Sci* 1987;6(Suppl):263-88.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress: Adaptation, damage, repair and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 247-53.
- Dinçer Y, Akçay T. [DNA damage]. *Türk Biyokimya Dergisi* 2000;25(2):73-9.
- Yokuş B, Çakır DÜ. [Biomarker of invivo oxidative DNA damage; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(5):535-43.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17(10): 1195-214.
- Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998;58(18):4023-37.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res* 2008;41(8):1075-83.
- Dizdaroglu M, Kirkali G, Jaruga P. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radic Biol Med* 2008;45(12):1610-21.
- Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in mammalian cells. *DNA Repair Mechanism*. In: Hanawalt, PC, Friedberg, EC, eds. *New York: Academic Press*; 1978. p.465-8.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123(1):291-8.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175(1):184-91.
- Shaposhnikov S, Frenge E, Collins AR. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization--a review. *Mutagenesis* 2009;24(5):383-9.
- Green MH, Lowe JE, Delaney CA, Green IC. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol* 1996;269:243-66.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26(3):249-61.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 1993;288(1):47-63.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995;336(1):69-77.
- Gedik CM, Ewen SW, Collins AR. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol* 1992;62(3):313-20.
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993;14(9):1733-5.
- Collins AR, Dusinská M, Gedik CM, Stětina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 3:465-9.



21. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, Ilkova H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res* 2002;505(1-2):75-81.
22. Blasiak J, Gloc E, Wozniak K, Czechowska A. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chem Biol Interact* 2004;149(2-3):137-49.
23. Collins AR, Fleming IM, Gedik CM. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. *Biochim Biophys Acta* 1994;1219(3):724-7.
24. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al; 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18(1):45-51.
25. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
26. Marks DI, Fox RM. DNA damage, poly (ADP-ribose)ylation and apoptotic cell death as a potential common pathway of cytotoxic drug action. *Biochem Pharmacol* 1991;42(10): 1859-67.
27. Elia MC, Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Barnum JE, Harmon LS, et al. Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environ Mol Mutagen* 1994;24(3):181-91.
28. Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993;136(1):130-6.
29. Vasquez M, Tice RR. 1997. Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay [Abstract]. *Environ Mol Mutagen* 29(suppl 28):53.
30. Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 1996;18(6):407-16.
31. Kizilian N, Wilkins RC, Reinhardt P, Ferrarotto C, McLean JR, McNamee JP. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques* 1999;27(5):926-30.
32. Møller P, Loft S, Lundby C, Olsen NV. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J* 2001;15(7):1181-6.
33. Risom L, Lundby C, Thomsen JJ, Mikkelsen L, Loft S, Friis G, et al. Acute hypoxia and reoxygenation-induced DNA oxidation in human mononuclear blood cells. *Mutat Res* 2007;625(1-2):125-33.
34. Bornholdt J, Dybdahl M, Vogel U, Hansen M, Loft S, Wallin H. Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice. *Mutat Res* 2002;520(1-2):63-71.
35. Palli D, Sera F, Giovannelli L, Masala G, Grechi D, Bendinelli B, et al. Environmental ozone exposure and oxidative DNA damage in adult residents of Florence, Italy. *Environ Pollut* 2009;157(5):1521-5.
36. Brozovic G, Orsolich N, Knezevic F, Horvat Knezevic A, Benkovic V, Sakic K, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of cisplatin treatment combined with anaesthetics on EAT cells in vivo. *Onkologie* 2009;32(6):337-43.
37. Boone JJ, Bhosle J, Tilby MJ, Hartley JA, Hochhauser D. Involvement of the HER2 pathway in repair of DNA damage produced by chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther* 2009;8(11):3015-23.
38. Herrera M, Dominguez G, Garcia JM, Peña C, Jimenez C, Silva J, et al. Differences in repair of DNA cross-links between lymphocytes and epithelial tumor cells from colon cancer patients measured in vitro with the comet assay. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5466-72.
39. Trisini AT, Singh NP, Duty SM, Hauser R. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril* 2004;82(6):1623-32.
40. Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Talwar P, Sharma RK, Dhawan A, et al. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. *Mutat Res* 2009;665(1-2):29-36.
41. Wu TC, Huang YC, Hsu SY, Wang YC, Yeh SL. Vitamin E and vitamin C supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Vitam Nutr Res* 2007;77(4):272-9.
42. Briviba K, Bub A, Möseneder J, Schwerdtle T, Hartwig A, Kulling S, et al. No differences in DNA damage and antioxidant capacity between intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr Cancer* 2008;60(2):164-70.
43. Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. Spormann TM, Albert FW, Rath T, Dietrich H, Will F, Stockis JP, et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(12):3372-80.
44. Di Giacomo C, Acquaviva R, Sorrenti V, Vanella A, Grasso S, Barcellona ML, et al. Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. *J Med Food* 2009;12(1):145-50.
45. Silva JP, Gomes AC, Proença F, Coutinho OP. Novel nitrogen compounds enhance protection and repair of oxidative DNA damage in a neuronal cell model: comparison with quercetin. *Chem Biol Interact* 2009;181(3): 328-37.
46. Baumeister P, Huebner T, Reiter M, Schwenk-Zieger S, Harrés U. Reduction of oxidative DNA fragmentation by ascorbic acid, zinc and N-acetylcysteine in nasal mucosa tissue cultures. *Anticancer Res* 2009;29(11):4571-4.
47. Alapette C, Benoit A, Moustacchi E, Sarasin A. The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):154-9.
48. Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, et al. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 2000; 21(4):557-61.
49. Jalożyński P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, Markowska J, Szyfter K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat Res* 1997;385(3):223-33.
50. Collins AR, Raslová K, Somorovská M, Petrovská H, Ondrusová A, Vohnout B, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 1998;25(3):373-7.
51. Anderson D, Yu TW, Wright J, Ioannides C. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutat Res* 1998;398(1-2):151-61.
52. Dinçer Y, Akçay T, Ilkova H, Alademir Z, Ozbay G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutat Res* 2003; 527(1-2):49-55.
53. Kleiman NJ, Spector A. DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Curr Eye Res* 1993;12(5):423-31.
54. McCurdy D, Tai LQ, Frias S, Wang Z. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Radiat Res* 1997;147(1):48-54.
55. Altındag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2007;40(3-4):167-71.
56. Dinger Y, Akçay T, Erdem T, Ilker Saygili E, Gundogdu S. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65(8):721-8.
57. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, et al. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002;22(5):1752-62.
58. Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat Karakaya A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers* 2004;9(2): 203-9.
59. Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppè F, Tognoni G, et al. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging* 2005;26(5):567-73.
60. Ozcaglı E, Sardas S, Biri A. Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Maturitas* 2005;51(3):280-5.
61. Dinçer Y, Saygili EI, Akçay T. [Influence of smoking on DNA damage and blood glutathione level]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2003;23(2):108-11.
62. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994;307(1):323-33.
63. Lewis SE, Agbaje IM. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008;23(3):163-70.
64. Forchhammer L, Bräuner EV, Folkmann JK, Danielsen PH, Nielsen C, Jensen A, et al. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis* 2008;23(3):223-31.
65. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008; 23(3):143-51.