

# Mikronükleus (MN) ve Comet Assay testlerinin farklı hayvan türlerindeki uygulamalarına örnekler

Gülşah KURUCU<sup>1\*</sup>, Derya BOSTANCI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bahçeşehir Koleji Ordu-Giresun Enver Yücel Kampüsü, Ordu

<sup>2</sup> Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu

Geliş Tarihi (Received Date): 31.08.2023

Kabul Tarihi (Accepted Date): 12.10.2023

## Öz

Farklı hayvanların dokularında biriken pek çok kirletici faktör canlıda genotoksik etki göstermektedir. Bu etkinin değerlendirilmesinde kullanılan genotoksisite testleri; kirlilik ajanlarının hayvanlarda DNA hasarına neden olup olmadığının belirlenmesine olanak sağlar. Bu faktörlerin etkilerini belirleyebilmek için farklı hayvan dokularında pek çok test sistemi geliştirilmiş ve genotoksisite testleri büyük önem kazanmıştır. Bu çalışmada, genotoksik hasarın belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılan iki test yöntemi olan Mikronükleus ve Comet Assay testleri karşılaştırılmış, avantaj ve dezavantajları belirlenerek farklı hayvan türlerinde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, genotoksik test yöntemleri, mikronükleus testi, comet assay

## Examples of the applications of Micronucleus (MN) and Comet Assay tests in different animal species.

### Abstract

Many pollutants accumulate in the tissues of various animals and exhibit genotoxic effects in living organisms. Genotoxicity tests, used to assess this effect, allow for the determination of whether pollutants cause DNA damage in the organism. To determine the effects of these factors, various test systems have been developed in different animal

\*Gülşah KURUCU, gulsahkeskinn@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5556-6568>  
Derya BOSTANCI, deryabostanci@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3052-9805>

*tissues, and genotoxicity tests have gained significant importance. In this study, two widely used test methods for assessing genotoxic damage, Micronucleus and Comet Assay tests, were compared, their advantages and disadvantages were determined, and the evaluation of studies conducted in different animal species was aimed.*

**Keywords:** *Genotoxicity, genotoxic test methods, micronucleus test, comet assay*

## 1. Giriş

İnsan popülasyonundaki artış, endüstri ve sanayideki gelişmelerle birlikte kimyasalların yoğun bir şekilde üretimi, kullanımı ve buna bağlı olarak da bu maddelerin hem sucul hem de karasal ekosistemde birikimi artmıştır [1-3].

Genotoksik etkileri olan çevresel kirleticilerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi; kirlilik durumunun, kirlilik kaynaklarının kontrolünün ve kirliliğin izlenmesinde çok önemlidir. Bu nedenle pratik, kolay uygulanabilen, kısa sürede sonuçlanabilecek, ayrıca hassas yöntem ve tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır [3-4]. Bu tekniklerin başında comet assay ve mikronükleus testi (MN) gelmekte ve en yaygın kullanılan biyoizleme testleri olarak karşımıza çıkmaktadır [3, 5-6]. Bu testlerin sonuçları farklı birçok türde kirlilik maruziyetinin ve kirliliğin etkisinin biyoizlemine amaçlayarak yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara göre, kirlilik ve genotoksik hasar arasında önemli derecede pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır [3, 7-9].

## 2. Materyal ve metod

Çevresel kirliliğin belirlenmesinde kullanılan biyogöstergeler; birçok faktör hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlarlar. Bu faktörler; ekosistemdeki canlıların toleransı, türlerin kirliliğe verdiği cevap, bu cevabın popülasyon, komünite ve ekosistem üzerine etkisi, tüm bunların insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenebilmesidir [3,10].

Genotoksisite; çekirdek (nükleus), kromozomlar veya DNA'nın yapısında meydana gelen gen mutasyonları, kromozom anomalileri, DNA kırıkları veya DNA eklentileri gibi hasarları tespit etmektedir. Genetik toksikoloji; fiziksel ve kimyasal ajanların ve radyasyon gibi kirleticilerin; kalıtsal materyaller, DNA ve hücreler üzerindeki toksik etkilerini inceler [11-12].

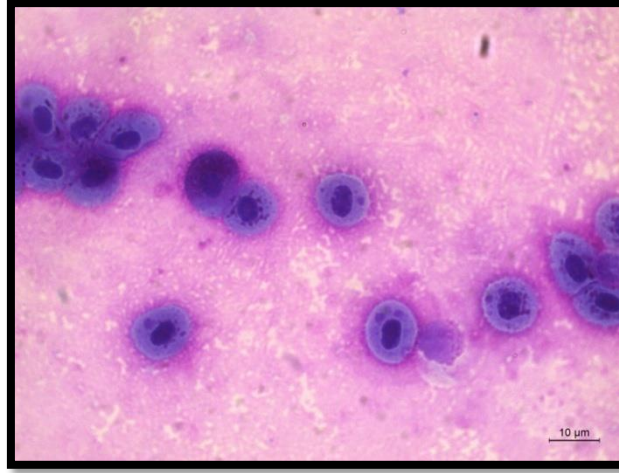
Genotoksikolojide kullanılan comet assay (tek hücre jel elektroforezi) [13] ve MN testi [14-16] kısa ve uzun dönem etkinin belirlenmesinde önemli role sahip iki tekniktir [3, 17].

Birçok farklı hayvan türünde kullanılan bu test yöntemlerinde aranan en belirgin özellikler; basit uygulanabilirlik, hızlı sonuç alabilme, ekonomik olması, az sayıda örnek ile çalışılabilirlik, hasarın tespitinde tercih edilir olması şeklinde sıralanabilir [18].

### 1.1. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus testi ilk kez 70'li yıllarda sunulmuştur [16, 19]. Şekil 1'de gösterildiği gibi mikronükleuslar; mitotik hücre bölünmesinin farklı geçiş aşamaları sırasında oluşmuş sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında gözlenen fakat ana nükleusa dahil olmayan ikinci bir küçük nükleus yapısı olarak tanımlanmaktadır [16, 18, 20].

MN, hücre bölünmesi esnasında ana çekirdeğe dâhil olmayan, kromozomların ortamda serbest kalmasıyla oluşan nükleoplazma ile sarılı bir yapıdır [21]. MN çoğunlukla; mitotik iğdeki hatalardan, kromozomal hasarlardan, hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, kinetokor ya da mitotik evrenin diğer parçalarından kaynaklanmaktadır [12].



Şekil 1. Eritrosit hücrelerinde genel mikronükleus oluşumu (X100) [18].

MN miktarındaki artış ne kadar fazla ise genetik düzensizliğin o kadar fazla olduğu anlamına gelir ki bu test hem klastojenik hem de anojenik etkileri birlikte belirleyebilmek için kullanılan önemli bir testtir [22]. Anojenler etkisi altında oluşan MN'lar hücrenin çekirdeğine çok yakın büyüklükte olabilirler. Çünkü anojenler etkisi ile oluşan MN'lar tam bir kromozom içerebilir. Klastojenler etkisi altında oluşan MN'lar ise genellikle daha küçük boyutlu olmaktadır çünkü kromozomların parçalanması veya kopmasına neden olurlar [23-24]. MN'lar gen farklılaşması (mutasyon) ve mitoz bölünme sırasında kromozom kırılması sonucu oluşan sitoplazma içerisinde çekirdek ile aynı özelliği taşıyan küçük çekirdekçik görünümündeki oluşumlardır [22].

Kromozomların genomlarındaki çevresel kirleticilerin etkileri iğ ipliklerinde işlevsel bozukluklara, sentromerde bölünme sorunlarına neden olarak bu sayısal artış veya azalış şeklindeki durumlar MN oluşumunu ortaya çıkarır [23-26].

MN testi kimyasal ve fiziksel ajanların oluşturduğu genotoksik etkilerin *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmesinde çoğunlukla kullanılan bir testtir. Bu test araştırmacıların geliştirdiği yeni yöntemler sonucu artık sadece kandaki kimyasal maddelerin sebep olduğu anormalileri *in vitro* olarak saptamak için değil başka dokularda da uygulama alanı bulmaya başlamıştır [26]. MN testinin memelilerin birçok türündeki hücrelerin

kromozomal hasarlarını belirlemek için geliştirildiği ve hassas ve güvenilirliği yüksek bir test yöntemi olduğu bildirilmiştir [27].

İnsanlarda DNA hasarının ölçülmesi ve MN frekansını belirlenmesi için MN test yöntemleri kullanılmıştır [28]. Bu test yöntemi kromozom anormalilerini gösteren diğer yöntemlere göre basit ve hızlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Farklı hayvanların dokularında karşılaşılan MN'lar dokunun alındığı canlının herhangi bir genotoksik etki altında olup olmadığının anlaşılmasında oldukça önemli göstergelerdir [18, 29].

Farklı hayvan türleri ile balık MN testlerinde hücre tipleri ve onların tanımlanma kriterleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Eko-genotoksikolojik çalışmalar göstermektedir ki sucul canlılarda dahil farklı hayvan dokularının eritrositlerinde MN testi kirliliğin önemli bir belirteçidir [10, 30-37].

MN'ların belirlenmesi ve sınıflandırılması farklı örneklerde, farklı laboratuvarlarda ve farklı gözlemcilerde değişiklik gösterebilir:

- MN'ların değerlendirilme aşamasında laboratuvarda yapılan diğer değerlendirme sonuçlarıyla karşılaştırma yapılmalıdır.
- İlk aşamada lamalar kodlanarak grupların deney mi yoksa kontrol grubu mu olduğuna bakılmaksızın 'kör' olarak mikroskopta değerlendirilmelidir.
- Hasarlı, çok fazla iç içe geçmiş, sayımı zor hücreler dikkate alınmamalı boyama sırasında da hata ya da boya kalıntıları olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
- Üst üste birikmiş ve hasarlı hücreler sayım sırasında dikkate alınmamalıdır. Ayrıca boyamadan kaynaklanan durumlar veya boya kalıntıları MN olarak değerlendirilip hücrelerin sayımında hatalara neden olabilmektedir.
- Doğru bir sayım iyi bir değerlendirme için boyanmış preparatlar x1000 büyütmede mikroskop altında incelenmelidir. Dikkat edilmesi gereken bu hususlar değerlendirme sırasında hem laboratuvarlar arasındaki farklılıkların hem de okuyuculardan doğabilecek hataların en aza indirilmesine olanak sağlayacaktır [5].

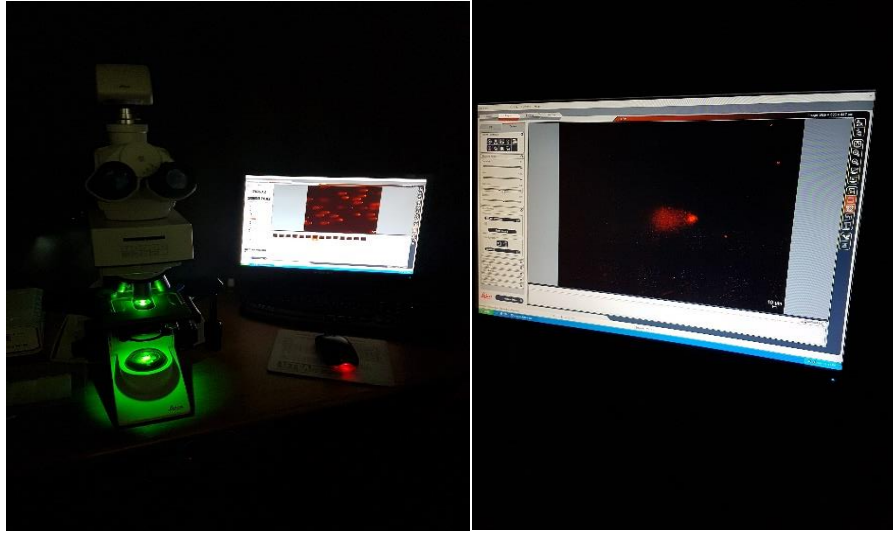
### ***1.2. Comet Assay***

DNA hasarını ve bu hasarın seviyesini belirlemeye yardımcı tek hücre jel elektroforezi olarak da adlandırılan comet assay ilk olarak Sing ve arkadaşları [38] tarafından ortaya çıkarılmıştır [13, 39]. DNA'ların hasar derecesinin durumuna göre kuyruklu yıldız benzer formlarda farklı uzunluklarda görüntüler oluşturmalarıyla hasarın belirlendiği bu yöntem İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "comet assay" adı verilmiştir [13, 18] (Şekil 2). Comet yöntemindeki temel prensip, fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu oluşmuş genotoksik ajanların oluşturduğu mutasyonların organizmanın DNA'sında ayrı ayrı incelenerek tespit edilmesidir [18, 40]. Yapılan son çalışmalarda kullanımı giderek artan comet assay, çevresel kirliliği ve bu kirliliğin organizmada meydana getirdiği hasarın belirlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir genotoksisite testi haline gelmiştir [3, 41-44].

Farklı elektriksel yük ve molekül ağırlıklarına sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda göç etmeleri esasına dayanan yöntemde DNA'lar canlı hayvan dokularından izole

edilerek agaroz jel içerisine fikse edildikten sonra yürütme işlemine tabi tutulurlar [3, 38, 45-46]. Yöntemin prosedür aşamaları tamamlandıktan sonra DNA molekülleri farklı boya ile boyanarak hazırlanan preparatlar flüoresan mikroskopta incelenmeye tabi tutulur. Bu yöntemde DNA hasarlarının değerlendirilmesinde; kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve baştaki DNA yüzdesi gibi parametreler yaygın olarak tercih edilmektedir [13, 18].

Comet assay, tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmekte olup birçok memeli hücresinde de çeşitli ajanların yol açtığı DNA hasarı ve onarım bozukluğunun belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. Genotoksik hasar, ilk etki bölgelerinde değerlendirilebilir ve hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilir [3]. Son zamanlarda comet yöntemi diğer test sistemlerine göre DNA hasarlarını belirlemedeki hassasiyetinden ve çalışma süresinin nispeten kısa olmasından dolayı toksisite çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmektedir [5, 18, 47-51].



Şekil 2. Comet assay örneği [18].

## 2. Bulgular ve tartışma

Farklı organizma türlerinde kirleticilerin genotoksik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada (Tablo 1 ve Tablo 2) görülmektedir ki kirlilik tüm canlı organizmalar için genotoksik bir risk olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki test yönteminden yola çıkarak sonuçlar dikkate alındığında kirliliğin hayvanlar için genotoksik bir risk olmaktan öte sürekli izlenmesi ve derinlemesine değerlendirilmesi gereken bir durum olduğu görülmektedir. Bu kirleticilerin veya herhangi bir kimyasalın genotoksitesini araştırılırken bir tür üzerinde birkaç farklı test sistemi uygulanabildiği gibi birkaç tür üzerinde farklı test sistemlerinin kombine değerlendirilmesi sonuçların güvenilirliklerinin artması açısından önemlidir.

Tablo1. Farklı hayvanlarda kullanılan genotoksisite çalışmalarına mikronükleus örnekleri

Organizma Türü	Lokalite	Hücre Tipi	Araştırılan Kirlilik Kaynağı	Kaynak
<i>Salmo trutta fario</i> (balık)	-	Eritrositler	PCB 77	7
<i>Labidochromis caeruleus</i> (balık)	Aydın, Türkiye	Eritrositler	Titanyum Dioksit	12
<i>Carassius auratus</i> (balık)	Türkiye	Periferal kan eritrositler	Herbisit (Roundup), glifosfat formülasyonu	48
<i>Salmo trutta</i> <i>Anguilla anguilla</i> <i>Phoxinus phoxinus</i> (balık)	İspanya	Böbrek, eritrositler	Siklofosamid, kolşisin ve kadmiyum	52
<i>Cyprinus carpio</i> (balık)	İtalya, Perugia, Trasimeno Gölü	Periferal kan	Dezenfektanlar (sodyum hipoklorit, perasetik asit ve klorid dioksit)	53
<i>Mugil sp.</i> <i>Netuma sp.</i> (balık)	Güney Brezilya	Periferal Kan	Çevresel kontaminantlar, mevsimsel değişiklikler	54
<i>Carassius auratus auratus</i> (balık)	Türkiye	Periferal kan eritrositleri, solungaç ve yüzgeç epitel hücreleri	Civa clorid, kurşun asetat	55
<i>Capoeta capoeta</i> (balık)	Kars Çayı, Türkiye	Periferal kan eritrositleri	Akrilamid	56
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (akdeniz midyesi), <i>Ruditapes decussatus</i> (akivades) <i>Pecten maximus</i> (deniz tarağı) <i>Ostrea edulis</i> (Avrupa yassı istiridyesi)	Çanakkale, Türkiye	Hemolenf hücreleri		57
<i>Mus musculus var. albinos</i> (Albino fare)	Giresun, Türkiye	normakromatik eritrositler	Dinikanazol	58
At ve Domuz	Bosna Hersek	Lenfositler		59
<i>Rana ridibunda</i> (kurbağa)	Porsuk Çayı, Türkiye	Eritrosit hücreleri	Çeşitli faktörler	60
<i>Gnorimopsar chopi</i> (kuş)	Brezilya	Eritrosit		61
Civciv	Türkiye	Perifer kan hücreleri	Fipronil	62
<i>Sprague-Dawley</i> (sıçan)	Türkiye	Kemik İliği Hücreleri	Bakır Asetoarsenit	63
Şap aşılı sığırlar	Türkiye	Kan serumları		64

Tablo 2. Farklı hayvanlarda kullanılan genotoksisite çalışmalarına Comet örnekleri

Tür	Çalışma Bölgesi	Hücre Tipi	Kontaminasyon Nedeni	Kaynak
<i>Salmo trutta fario</i> (balık)	-	Eritrositler	PCB 77	7
<i>Zoarces viviparus</i>	Göteborg Limanı	Eritrositler	PAH metabolitleri	41
<i>Danio rerio</i> (balık)	Almanya, Rhine ve Elbe nehirleri	Hepatositler ve solungaçlar	-	44
<i>Carassius auratus</i> (balık)	Türkiye	Periferal kan eritrositler	Herbisit (Roundup), glifosfat formülasyonu	48
<i>Cyprinus carpio</i> (balık)	İtalya, Perugia, Trasimeno Gölü	Periferal kan	Dezenfektanlar (sodyum hipoklorit, perasetik asit ve klorid dioksit)	53
<i>Mugil sp.</i> <i>Netuma sp.</i> (balık)	Güney Brezilya	Eritrositler	Metil metan sülfonat (MMS)	54
<i>Anguilla anguilla</i> <i>L. caged eel</i> (balık)	Portekiz, Aveiro Lagünü	Karaciğer ve böbrek hücreleri	-	65
<i>Limnoperna fortunei</i> (golden midye)	Guaíba Gölü (Brezilya)	Hemositler	Endüstriyel, kentsel, kırsal kirleticiler	66
<i>Microtus guentheri</i> (tarla faresi)	Antalya, Türkiye	Kan lenfositleri	Ağır metal	67
<i>Apodemus sylvaticus</i> (dağ faresi)	Portekiz	Kan hücreleri	Radyonükleidler ve metallere	68
<i>Apodemus flavicollis</i> (dağ faresi)	Bulgaristan	Kan hücreleri	Hava kirliliği	69
<i>Capoeta banarescui</i> (balık)	Türkiye	Eritrosit	Ağır metal	70
<i>Ciconia ciconia</i> (leylek)	İspanya	Kan hücreleri	Arsenik	71
<i>Milvus migrans</i> (kara çaylak)	İspanya	Kan hücreleri	Arsenik	71
<i>Xenopus laevis</i> <i>Pleurodeles waltl</i> (kurbağa)		Eritrositler	Kadmiyum	72

Farklı hayvan türlerinde meydana gelen DNA hasarlarının belirlenmesi ve izlenmesinde nispeten ucuz bir yöntem olan Comet Assay oldukça önem kazanmış uzun yıllardan beri genotoksikolojide önemli testlerden biri haline gelmiştir [73-76]. Aynı şekilde MN testleri de kısa zamanlı, kolay uygulanabilir, duyarlı bir test sistemi olması nedeniyle canlılarda sıkça tercih edilmektedir. Tüm kirlilik etkilerinin belirlenmesi için büyük çaplı araştırma çalışmalarında da güvenle kullanılabilir. Çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerinin hayvan türleri üzerinde MN testi ve Comet Assay ile araştırıldığı bu çalışmadan hareketle; kullanılan test sistemlerinin yanı sıra farklı yöntemler de

uygulanmalı, değerlendirilmeli ve birbirleriyle karşılaştırılarak sonuçlar desteklenmelidir.

### Kaynaklar

- [1] Hutzinger, O., Tulp, M.T.M., ve Zitko, V., Chemicals with pollution potential. Aquatic Pollutants: Transformation and Biological Effects, 1, p.13 (2015).
- [2] Martins, M., Ferreira, A.M., Costa, M.H., ve Costa, P.M., Comparing the genotoxicity of a potentially carcinogenic and a noncarcinogenic PAH, singly, and in binary combination, on peripheral blood cells of the European sea bass. **Environmental toxicology** (2015).
- [3] Göney, G., Çevre Kirliliğinin Biyoizlenmesinde Balıklarda Genotoksisite Testleri. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, (1), 43-49, (2016).
- [4] Wells, P.G., Biomonitoring the health of coastal marine ecosystems—the roles and challenges of microscale toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, 39(1), 39- 47, (1999).
- [5] Al-Sabti, K., ve Metcalfe, C.D., Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 343(2), 121-135, (1995).
- [6] De Flora, S., Vigano, L., D’agostini, F., Camoirano, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F. ve Arillo, A., Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 319(3), 167-177, (1993).
- [7] Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, 11(5), 485-492, (1996).
- [8] Klobučar, G.I., Štambuk, A., Pavlica, M., Erben, R., Genotoxicity monitoring of freshwater environment: comet and micronucleus assays. **In Symposium Pollutant responses in marine organisms**, 62; 306-316, (2006).
- [9] Raisuddin, S., ve Jha, A.N., Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single cell gel electrophoresis and cytokinesis block micronucleus assay. **Environmental and molecular mutagenesis**, 44(1), 83-89, (2004).
- [10] Obiakor, M., Okonkwo, J., Nnabude, P., ve Ezeonyejiaku, C., Eco-genotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution. **Journal of Animal Science Advances**, 2(1), pp.123-133, (2012).
- [11] Kutoğlu, S., Tatların Baraj Gölündeki su kirliliğinin bazı Cyprinidae türlerine genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir, (2017).
- [12] Bulut, B., Titanyum Dioksit’in (TiO<sub>2</sub>) Ergin *Labidochromis caeruleus* (Fryer, 1956) Türüne Genotoksik Etkileri: Mikronükleus Testi, Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, (2021).
- [13] Güner, U. ve Gökcalp Muranlı, F.D., Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay). **Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi**, 3(9), 103-114, (2013).
- [14] Ma, TH., *Tredescantia* micronucleus bioassay and polen tube chromatidaberration test for in situ monitoring and mutagen screening, **Environmental Health Perspective**, 37, 85-90, (1981).



- [15] Scarpato, R., Migliore, L. Ve Barale, R., The micronucleus assay in Anadontacygnea for the detection of drinking water mutagenity. **Mutation Research**, 245, 231-237, (1990).
- [16] Düzel, S., Sentetik Piretroit Deltametrin'in *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) Üzerindeki Akut ve Genotoksik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2013).
- [17] Jha, A.N., Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, 23(3), 207- 221, (2008).
- [18] Kurucu, G., Curi Deresi (Ordu) Su, Sediment ve *Alburnus chalcoides* Türünde Ağır Metal Birikimi ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu, (2020).
- [19] Fenech, M. ve Crott, JW., Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakagefusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Mutation Research**, 504, 131-136, (2002).
- [20] Heddle, JA., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournn, K., Macgregor, JT., Newell, GW. ve Salamone, MF., The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program, **Mutation Research**, 123, 61-118, (1983).
- [21] Yıldız, Y. ve Önen, Ö., Bazı kirleticilerin Teleostlar üzerindeki genotoksik etkileri. **Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 9(1):63-74, (2016).
- [22] Heddle, JA., Cimino, MC., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, MD., Tucker, JD., Vanparys, P., MacGregor, JT., Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 18(4), 277-291, (1991).
- [23] Fenech, M., The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455, 81-95, (2000).
- [24] Şekeroğlu, V. ve Şekeroğlu, ZA., Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. **Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi**, 68(4), 241-252, (2011).
- [25] Schiffmann, D. ve De Boni, U., Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. **Mutation Research**, 246(1), 113-122, (1991).
- [26] Yıldırım, A. ve Yıldırım, MS., Matbaa sanayinde çalışan işçilerin bukkal mukoza hücrelerinde mikronükleus ve binükleotid sıklığının belirlenmesi. **Tıp Araştırmaları Dergisi**, 9(1), 25-28, (2011).
- [27] Stopper, H. ve Müller, SO., Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in Vitro**, 11, 661-667, (1997).
- [28] Fenech, M., Holland, N., Chang, WP., Zeiger, E., ve Bonassi, S., The human micronucleus project-an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, 428, 271-283, (1999).
- [29] Gül, G., Endokrin Bozucu Kirleticilerin Bazı Ekonomik Balık Türlerinde Gonad Histopatolojisine ve Vitellogeninlerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2014).
- [30] Anbumani, S. ve Mohankumar, M.N., Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. **Research Journal of Environmental Sciences**, 5(12), p.867, (2011).

- [31] Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., ve Sofuni, T., Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 399(2), 125-133, (1998).
- [32] Bolognesi, C., ve Hayashi, M., Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, 26(1), 205-213, (2011).
- [33] Schmidt, W., The micronucleus test, **Mutation Research**, 31, 9-15, (1975).
- [34] Ali, F., El-Shehawi, A.M., ve Seehy, M.A., Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. **African journal of biotechnology**, 7(5), 606-612, (2008).
- [35] Ayllon, F., ve Garcia-Vazquez, E., Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49(3), 221-225, (2001).
- [36] Çavaş, T., ve Ergene-Gözükara, S., Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. **Environmental and molecular mutagenesis**, 46(1), 64-70, (2005).
- [37] Obiakor, M.O., Okonkwo, J.C., ve Ezeonyejaku, C.D., Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 775, 20-30, (2014).
- [38] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., ve Schneider, E.L., A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, 175(1), 184-191, (1988).
- [39] Cotellet, S. ve Ferard, J.F., Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 34, 246-255, (1999).
- [40] Rajaguru, P., Suba, S., Palanivel, M., ve Kalaiselvi, K., Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 41(2), 85-91, (2003).
- [41] Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C. ve Sturve, J., DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 552(1), 187-195, (2004).
- [42] Frenzilli, G., Nigro, M., ve Lyons, B.P., The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 681(1), 80-92, (2009).
- [43] Nagarani, N., Devi, V.J., ve Kumaraguru, A.K., Identification of DNA damage in marine fish *Therapon jarbua* by comet assay technique. **Journal of Environmental Biology**, 33(4), p.699, (2012).
- [44] Schnurstein, A., ve Braunbeck, T., Tail moment versus tail length—application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49(2), 187-196, (2001).
- [45] Kumaravel, T. S., ve Jha, A. N., Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, 605, 7-16, (2006).

- [46] Çavaş, T., 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(6), 1431-1435, (2011).
- [47] Tice, RR., Agurell, E., ve Anderson, D., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35(3), 206-221, (2000).
- [48] Çavaş, T. ve Könen, S., Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, 22(4), 263-268, (2007).
- [49] Çavaş, T. ve Könen, S., In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. **Aquatic Toxicology**, 90(2), 154-159, (2008).
- [50] Bopp, KS., Abicht, HK., ve Knauer, K., Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. **Aquatic Toxicology**, 86(2), 197-204, (2008).
- [51] Kontaş, S., ve Bostancı, D., Genotoxic effects of environmental pollutant heavy metals on *Alburnus chalcoides* (Pisces: Cyprinidae) inhabiting lower Melet River (Ordu, Turkey). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 104, 763-769, (2020).
- [52] Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., ve Garcia-Vazquez, E., Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56(3), 442-448, (2003).
- [53] Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M. ve Rizzoni, M., 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(2), 119-129, (2004).
- [54] De Andrade, V.M., Da Silva, J., Da Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L. ve De Freitas, T.R., Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. **Environmental and molecular mutagenesis**, 44(5), 459-468, (2004).
- [55] Çavaş, T., In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, 46(1), 352-358, (2008).
- [56] Kılıçle, P. A., ve Doğan, A., Akrilamidin *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) Üzerindeki Genotoksik Etkileri. **Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 9(1), 75-81, (2016).
- [57] Özkurnaz, G., Çanakkale Boğazı Umurbey Kıyılarında Yetişen Bazı Çift Kabuklu Yumuşakçaların (*Bivalvia*) Solungaçlarındaki Ağır Metal Birikimleri ve Genotoksik Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, (2012).
- [58] Yalçın, E., Taşlı, B., Çiçek, F., Demirtaş, G., Yapar, K., ve Çavuşoğlu, K., Albino farelerde dinikanazol toksisitesine karşı üzüm çekirdeği özütünün koruyucu rolünün araştırılması. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi**, 32(1), 1-6, (2016).
- [59] Hasanbašić, D., ve Rukavina, D., Micronuclei in lymphocytes of horses and pigs after in vitro irradiation. **Acta veterinaria**, 57(4), 341-350, (2007).

- [60] Saleh, K., Mikronükleus Testi Ile Bazı Kimyasal Maddelerin ve Çevre Kirleticilerin Neden Olduğu Klastojenik Etkilerin Araştırılması, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, (2015).
- [61] Silveira, E. D. R., Benvindo-Souza, M., Assis, R. A., Dos Santos, C. G. A., de Lima Amorim, N. P., Borges, R. E., ve de Souza Santos, L. R., Micronucleus and different nuclear abnormalities in wild birds in the Cerrado, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 1-9, (2022).
- [62] Özparlak, H., Arslan, A., ve Güler, G. Ö., Organik insektisit Fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronükleus test sisteminde belirlenmesi. **Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi**, 2(37), 1-8, (2011).
- [63] Türkez, H., Tatar, A., Geyikoğlu, F., Togar, B., ve Keleş, M., Bakır Asetoarsenit'in İn Vivo Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 13(2), 132-136, (2014).
- [64] Gürhan, B., Şenel, E., Dakılır, G., ve Öztürkmen, H., Şap Aşılı Sığırlarda Mikronötralizasyon ve ELİSA ile Antikor Düzeylerinin Saptanması. **Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**, 7(5), 99-108, (1994).
- [65] Maria, V. L., Correia, A. C., ve Santos, M. A., Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. **Environment International**, 29, 923-929, (2003).
- [66] Villela I. V., de Oliveira I. M., Silveira J. C., Dias J. F., Henriques J. A. P. ve da Silva J., Assessment of Environmental Stress by the Micronucleus and Comet Assays on Limnoperna fortunei Exposed to Guaíba Hydrographic Region Samples (Brazil) Under Laboratory Conditions. **Mutation Research**, 628: 76-86, (2007).
- [67] Turna Demir, F., Farklı Kirlilik Potansiyellerine Sahip Lokalitelerde Yaşayan *Microtus guentheri* Örneklerindeki Ağır Metal Birikim Seviyelerinin Saptanması ve Genetik Hasarın Araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, (2018).
- [68] Lourenço, J., Pereira, R., Gonçaves, F. ve Mendo, S., Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. **Science of the Total Environment**, 443: 673-680, (2013).
- [69] Mitkovska, V., Chassovnikarova, T., Atanasov, N. ve Dimitrov, H., DNA damage detected by Comet assay in *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) from Strandzha Natural Park. **Acta Zoologica Bulgarica**, 4: 155-158, (2012).
- [70] Kontaş, S., ve Bostancı, D., Balıklarda genotoksik hasarın belirlenmesine yönelik bir araştırma: *Capoeta banarescui* örneği. **Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research**, 6(2), 144-152, (2020).
- [71] Baos R, Jovani R, Pastor N, Tella JL, Jiménez B., ve Gómez G., Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. **Environmental Toxicological Chemical**, 25(10):2, 794-803, (2006).
- [72] Mouchet F, Gauthier L, Baudrimont M, Gonzalez P, Mailhes C., ve Ferrier V. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian Larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the Comet assay and the micronucleus test, **Environmental Toxicology**, 22(4):422- 35, (2007).
- [73] Møller, P., The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, 33(1), 1-7, (2018).

- [74] Jiang, N., Naz, S., Ma, Y., Ullah, Q., Khan, M. Z., Wang, J., Lu, X., Luosang, D. Z., Tabassum, S., Cahtha, A. M. M., ve Basang, W. D., An Overview of Comet Assay Application for Detecting DNA Damage in Aquatic Animals. **Agriculture**, 13(3), 623, (2023).
- [75] Cordelli, E., Bignami, M., ve Pacchierotti, F., Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicol Research** 10: 68–78, (2021).
- [76] Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S. A., O’Neill Gaivão, I., ve Collins, A., Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in genetics**, 5, 288, (2014).