

## Pemetrekset'in *in vitro* Alkali Tek Hücre Jel Elektroferez Yöntemi ile Genotoksik Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Hayal Çobanoğlu, Münevver Coşkun, Mahmut Coşkun, Akın Çayır

### ÖZ

Pemetrekset, mezotelyoma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve pek çok neoplazmın tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Kemoterapötik ilaçlar tedavide sadece kanser hücrelerini hedeflemezler. Tedavi süresince normal hücrelerde bu ilaçlarla karşılaşılır. Buradan yola çıkılarak planlanan bu çalışmada, pemetrekset'in *in vitro* koşullarda normal lökositler üzerine genotoksik etkisinin olup olmadığının ortaya konulması amaçlandı. Çalışmada, genotoksikite çalışmalarında hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi dolayısıyla sıklıkla kullanılan bir yöntem olan alkali tek hücre

jel elektroferez yöntemi kullanıldı. İki gönüllü donörden alınan insan periferik kan örneklerinden elde edilen lökositler, ilacın dört farklı konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100µg/mL) ile 1 saat muamele edildi. DNA hasarı bakımından 75µg/mL ( $p<0,05$ ) ve 100µg/mL'de ( $p<0,01$ ) negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Bu bulgu, pemetrekset'in normal lökositler üzerine genotoksik potansiyelinin olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Genotoksikite; tek hücre jel elektroferez yöntemi; pemetrekset

Hayal Çobanoğlu, Münevver Coşkun, Akın Çayır  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,  
Terzioğlu Kampüsü 17100, Çanakkale, Türkiye

Mahmut Coşkun  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü,  
Terzioğlu Kampüsü, 17100, Çanakkale, Türkiye

### Sorumlu Yazar:

Hayal Çobanoğlu  
e-posta: hayaltok@gmail.com

Submitted / Gönderilme: 11.01.2017 Revised / Düzeltme: 20.02.2017

Accepted / Kabul: 22.02.2017

### GİRİŞ

Kanser, çeşitli yollarla pek çok dokuda meydana gelebilen kompleks bir hastalıktır (1). Dünyada her yıl 14 milyon kişinin kansere yakalandığı ve her yıl 8.2 milyon insanın kanser nedeni ile öldüğü bilinmektedir. Eldeki veriler ışığında 2030 yılında yeni kanser vakasının yılda 22 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (2). Türkiye'ye ait en son resmi veriler değerlendirildiğinde yılda 163,500 yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Ölüm nedenlerine ait istatistikler incelendiğinde ise kansere bağlı ölümler tüm ölümlerin % 20 civarını oluşturmaktadır (3). Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (4). Pemetrekset, purin ve pirimidin sentezleri için gerekli olan folat bağımlı biyosentez döngülerini engelleyici etkiye sahip folik asit analogu yeni nesil kemoterapötik bir ilaçtır. Pemetrekset, timidilat sentaz (TS), dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve glisinamid ribonukleotid formil transferaz (GARFT) enzimlerinin de bulunduğu pek çok enzimin inhibisyonu ile kanser hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etkiye sahiptir (5-7). Mezotelyoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde geçerliliği kabul edilmiş bir ilaç olan pemetrekset'in, diğer solid tümörlerin tedavisi üzerine

etkileri de değerlendirilmektedir (7, 8). Ancak kemoterapötik ilaçların ikincil habis tümör oluşumlarına neden olabilirdiği ciddi bir kaygıdır. Çünkü kemoterapötik ilaçlar sadece kanser hücrelerini hedeflemezler. Tedavi süresince sağlıklı hücreler de bu ilaçlarla karşılaşılır (9).

Bu çalışmada kullanılan alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi (THJE); kimyasallar, radyasyon ve oksidatif stres gibi pek çok genotoksik ajanın yarattığı DNA hasarının tespitinde hızlı, hassas, güvenilir ve en yaygın olarak kullanılan yöntemdir (10-12). Bu nedenle literatürde tek hücre jel elektroforez yöntemi ile çeşitli ilaç ve kimyasalların genotoksitesinin değerlendirildiği pek çok çalışma vardır (13-16). Tek hücre jel elektroforez yönteminde teorik olarak, herhangi bir ökaryotik hücre ile çalışmak mümkündür, ancak insanlarla yapılan çalışmalarda büyük çoğunlukla lenfositler tercih edilmektedir (17, 18).

Pemetrekset'in tümör hücrelerine etkileri üzerine yapılmış pek çok çalışma vardır (5, 19-24). Ancak normal hücreler üzerine genotoksik etkileri ile ilgili *in vitro* çalışmalarda halen eksiklikler vardır (6). Yapılan literatür taramasında pemetrekset'in alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi ile normal lökositler üzerine genotoksik etkisine ait bir dataya rastlanılmadı. Bu yüzden bu çalışmada pemetrekset'in normal lökosit hücreleri üzerine muhtemel genotoksik potansiyelinin, *in vitro* alkali tek hücre jel elektroforez tekniği ile araştırılması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 28 ve 31 yaşlarında iki gönüllü donörden (sırasıyla 1 kadın, 1 erkek) elde edilen periferik kan örnekleri kullanıldı. Donörler, sigara içmediği, sürekli ilaç kullanmasını gerektirecek kronik bir hastalığı ve genetik bir rahatsızlığı olmadığı kendilerince beyan edilmiş kişilerden seçildi. Her bir donörden 4 mL kan örneği steril heparinli tüplere alındı. Örneklerin temin edildiği donörlerden gönüllü onam formları alındı. Çalışmanın etik kurul izni Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi "Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından verildi (Sayı: 18920478-050.01.04-E.148647, Karar no: 2016-23).

### Test Maddesi ve Konsantrasyon Seçimi

Test maddesi olarak steril su içinde çözülmüş pemetrekset (Ticari adı: Alimta®, Lilly, USA) kullanıldı. Molekül ağırlığı: 471,37 g/mol ve molekül formülü: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub> olan pemetrekset'in kimyasal yapısı Şekil 1'de verildi. Test

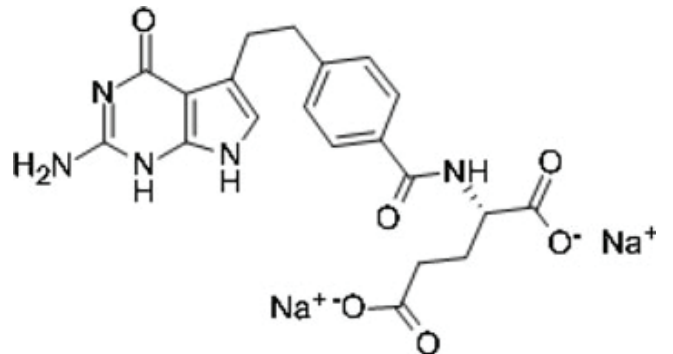
edilen konsantrasyonlar daha önce İstifli ve ark. yaptıkları çalışmadaki konsantrasyonlar dikkate alınarak belirlendi (6).

### Negatif ve Pozitif Kontroller

Pozitif kontrol olarak hücreler, 5 dakika 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edildiler. Negatif kontrollere ise hiçbir ekleme yapılmadı.

### *In vitro* Tek hücre jel elektroforez

Tek hücre jel elektroforez, Dhawan ve ark. tarafından belirtilen yöntemde yapılan küçük değişikliklerle uygulandı (25). Uygulamalardan önce lamalar normal erime noktalı agaroz jel ile (NMA; Invitrogen) kaplandı. Kan örneklerinden Ficol-Histopaque (Axis-Shield) ile lökositler izole edildi. Uygulamalar 3 tekrar olarak yapıldı. Her bir kültüre 10<sup>6</sup> hücre/mL olacak şekilde hücreler ve ilacın 4 farklı konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100µg/mL) eklendi. Kültürler 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüm kültürler inkübasyon sonunda, soğutmalı mikrosantrifüjde +4°C'de 3 kez soğuk fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS; Sigma) ile yıkanarak sonlandırıldı. Önceden NMA ile kaplanmış lamaların üzerine, düşük erime noktalı agaroz jel ile (LMA; Invitrogen) hücre karışımı damlatılıp lamel ile kapatıldı. Agar donana kadar (5 dakika) +4°C'de bekledi. Lamelleri alınan lamalar yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis çözeltisinin içinde +4°C'de 1 saat bekletildi. Lizis aşaması ve sonrasındaki elektroforez aşaması karanlıkta gerçekleştirildi. Elektroforez aşamasında lamalar, soğuk elektroforez çözeltisi (pH>13) içinde 20 dakika bekletildi. Bu işlem sonunda lamalar yatay elektroforez tankına yerleştirilerek soğuk elektroforez çözeltisi içinde 20 dakika, 300 mA ve 25V'ta yürütüldü. Elektroforez aşamasından sonra lamalar 15 dakika nötralizasyon çözeltisinde (pH=7,5) bekletildi.



Şekil 1. Pemetrekset disodyum kimyasal yapısı.

### Boyama ve Mikroskopik Değerlendirme

Her bir lam 65µL (20 µg/mL) etidyum bromür (EtBr; Sigma) ile 5 dakika boyanarak florasan mikroskopta (Carl Zeiss, Almanya) değerlendirme aşamasına geçildi. Mikroskopik değerlendirme Collins'e göre görsel analiz ile yapıldı (26). 3 tekrar olarak yapılan uygulamalarda her tekrar için 500 hücre, her konsantrasyon için toplamda 3000 hücre değerlendirildi. Her bir konsantrasyon için Arbitrary Unit (AU) aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$AU = \frac{0 \times A + 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D + 4 \times E}{N}$$

Bu formülde, N değerlendirilen toplam hücre sayısını temsil etmektedir. A, B, C, D, E ise sırasıyla hasarsız hücre, 1. dereceden hasarlı, 2. dereceden hasarlı, 3. dereceden hasarlı ve 4. dereceden hasarlı hücre sayılarını temsil etmektedir (Şekil 2).

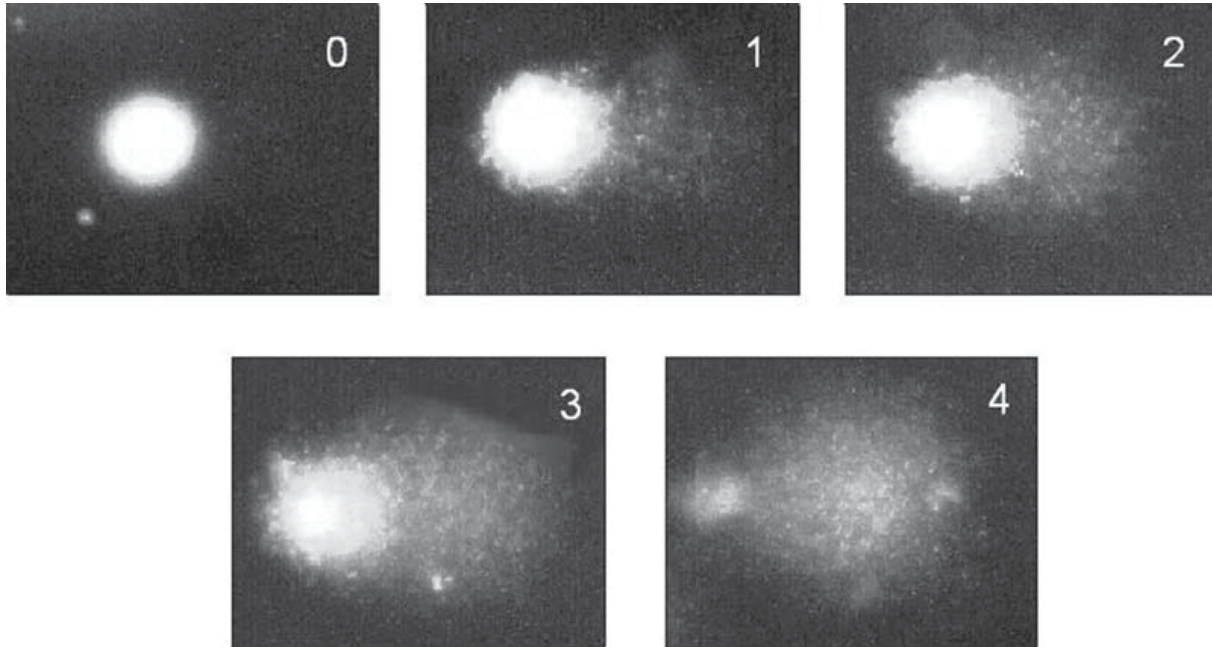
### İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler GraphPad Prism 5 (Windows için) programı kullanılarak yapıldı. Farklı

konsantrasyonlar için elde edilen DNA hasarlarının birbirlerinden istatistiksel olarak farklı olup olmadığını belirlemek için parametrik olmayan Kruskal Wallis H testi kullanıldı. DNA hasarı bakımında uygulanan konsantrasyonların istatistiksel olarak farklılığı ise Dunn testi ile analiz edildi. Çalışmada kullanılan program bu özellikleri ortaya koyduğu için seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar negatif kontrol ile karşılaştırıldı. Pozitif kontrolün negatif kontrole göre anlamlılığı Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar pemetrekset'in, çalışılan tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre ortalama AU oluşumunu arttırdığını göstermektedir. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda ortalama AU artışının 75µg/mL'de (p<0,05) ve 100µg/mL'de (p<0,01) istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. (Tablo 1). Ayrıca her bir konsantrasyonun neden olduğu DNA hasarının, konsantrasyona bağlı olarak doğrusal bir şekilde arttığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (r=0,99, p=0,001).



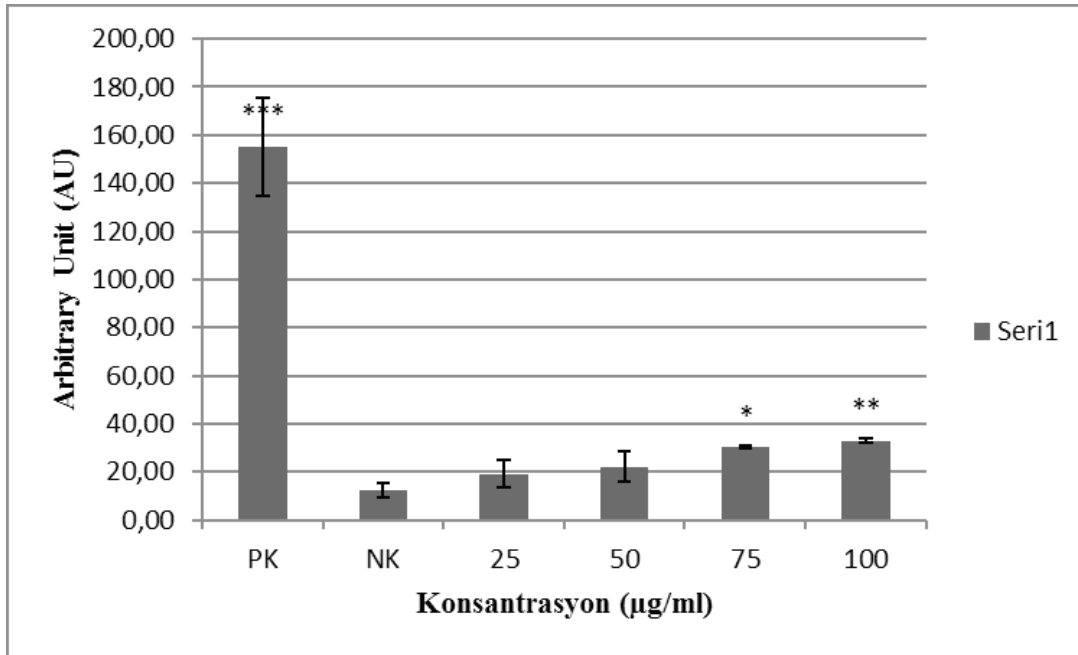
Şekil 2. Hasarsız ve hasarlı hücreler. 0: hasarsız hücre, 1: birinci dereceden hasarlı hücre, 2: ikinci dereceden hasarlı hücre, 3: üçüncü dereceden hasarlı hücre, 4: dördüncü dereceden hasarlı hücre (26).

**Tablo1.** Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Pemetrekset'in insan normal lökositlerindeki ortalama AU değerleri

Pemetrekset Konsantrasyon	Değerlendirilen Toplam Hücre Sayısı	1. donör ort AU	2. donör ort AU	Ort AU±SE
NK	3000	15,33	9,33	12,33±4,24
50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3000	134,83	175,40	155,12±28,68***
25 µg/mL	3000	24,68	13,39	19,04±7,99
50 µg/mL	3000	28,52	15,86	22,19±8,95
75 µg/mL	3000	30,80	29,61	30,21±0,84'
100 µg/mL	3000	32,14	33,90	33,02±1,25''

NK: Negatif kontrol, AU: Arbitrary Unit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit, Ort: Ortalama, SE: Standart sapma

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001



**Şekil 3.** Pozitif ve negatif kontrol ile Pemetrekset'in farklı konsantrasyonlarına bağlı oluşan Arbitrary unit (AU) değerleri ( $r=0,99$ ,  $p=0,001$ , doğrusal regresyon analizi). PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$

## TARTIŞMA

Bu çalışmada pemetrekset'in normal lökositler üzerine genotoksik potansiyeli *in vitro* koşullarda tek hücre jel elektroforez tekniği ile araştırıldı. Çalışılan dört konsantrasyondan (25, 50, 75 ve 100µg/mL) 75 ve 100µg/mL de ortalama AU değerlerinin negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). Bu sonuç ilacın çalışılan

konsantrasyonlarda DNA hasarını uyardığını ve genotoksik potansiyeli olabileceğini göstermektedir.

Literatürde pemetrekset'in normal lökositler üzerindeki genotoksik etkisini alkali tek hücre jel elektroforez tekniği ile değerlendiren bir veriye rastlanmamıştır. Ancak ilacın çeşitli kanser hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerini değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Yang ve ark. yaptıkları çalışmada, İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

hücrelerini 16, 24 ve 48 saat pemetrekset ile muamele ettikten sonra ilacın DNA hasarını uyarıp uyardığını araştırmışlar. Bu çalışmada, pemetrekset'in kanser hücrelerinde DNA hasarını uyardığı ve sürenin artmasına bağlı olarak DNA hasarının da arttığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (24). Bir başka çalışmada, pemetrekset'in genotoksitesi cilt kanseri hücrelerinde tek hücre jel elektroforez yöntemi ile çalışmış ve ilacın DNA hasarını uyardığı bulunmuştur (23). Bu iki çalışmada elde edilen sonuçlar ve bizim çalışmamızın sonucu pemetrekset'in hem kanser hücreleri hem de normal hücrelerdeki genotoksik etkisinin olabileceğine işaret etmektedir.

Pemetrekset'in, normal periferik lenfositlerin üzerine genotoksik etkisinin değerlendirildiği başka bir çalışmada KA (Kromozom aberasyonları), MN (Mikronükleus) ve KKD (Kardeş kromatid değişimi) teknikleri kullanılmış. İlacın KA tekniğinde kromozom hasarını negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede uyardığı bulunmuştur (6). Kromozom aberasyonlarını oluşturan mekanizmalardan birisi kromatitlerde oluşan kırıklardır. Tek hücre jel elektroforez yönteminin esası da DNA'daki zincir kırıklarıdır. Dolayısı ile İstifli ve ark. elde ettikleri sonuç bu çalışmada elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir. Başka bir antifolat kemoterapötik ilaç olan metotreksat ile yapılan *in vivo* genotoksitesite çalışmasında metotreksat'ın hem MN hem de kromozom aberasyonlarında artışa neden olduğu ve ilacın hem insanlarda hem de deney hayvanlarında genotoksik olduğu bildirilmiştir (27). Benzer şekilde Padmanabhan ve ark. metotreksat'ın sperm hücreleri üzerinde de toksik etkisi olduğunu bildirmiştir (28). Farklı teknikler (MN, KKD, Tek hücre jel elektroforez gibi) kullanılarak yapılan genotoksitesite çalışmalarında ortaya çıkan sonuçlar bazen tutarlılık göstermeyebilir. Örneğin İstifli ve ark.'nın pemetrekset'in genotoksitesitesini *in vitro* olarak değerlendirdikleri çalışmada MN ve KKD yöntemlerinde elde ettikleri sonuçlar bu çalışmadaki bulgu ile çelişmektedir. Bunu sebebinin şu olabileceği düşünülmektedir: Tek hücre jel elektroforez yönteminde DNA hasarı dinlenme evresindeki (G0 evresi) hücrelerde tespit edilir. Ancak KKD ve MN hücre döngüsünde ilerleyen hücrelerde tespit edilmektedir (13). Kalweie ve ark. göre G1 fazındaki lenfositler G0 fazındaki lenfositlerden daha fazla tamir kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle hücre döngüsünde ilerleyen lenfositlerde, G1 fazındaki tamir süreci sebebi ile MN ve KKD oluşumunda beklenen anlamlı artışlar görülemeyebilir (29).

Alkali tek hücre jel elektroforez (pH > 13) tekniği DNA'da tek ve çift zincir kırıklarının (SSB, DSB), SSB ile ilişkili tamamlanmamış baz eksizyon tamir bölgelerinin belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir (25). Yöntemde

DNA hasarını oluşturan bir diğer mekanizma ise DNA'da oluşan alkali hassas bölgelerdir (ALS). Pek çok genotoksik ajan DNA'da direkt iplik kırıklarına neden olmaz. Bu genotoksik ajanlar, DNA'da ya Apürinik / Apirimidinik bazsız (AP) bölgeler oluşturarak ya da baz veya fosfatın alkillenmesine yol açarak DNA'da ALS oluşturabilirler. DNA'da oluşan ALS tek hücre jel elektroforez yöntemi sırasında yüksek pH'lı elektroforez çözeltisi içinde kırıklara dönüşebilir (30, 31). Alkali tek hücre jel elektroforez tekniğinin kullanıldığı bu çalışmada, pemetrekset'in DNA hasarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olması ilacın DNA'da yukarıda belirtilen mekanizmalardan biri ya da daha fazlası yolu ile DNA hasarını uyardığı olabileceği söylenebilir.

DNA hasarının yaşlanma, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca hayvan modellerinde ve insanlarla yapılan deneylerde kanser gelişimi ve DNA hasarının bağlantılı olduğu görülmektedir. Başka bir deyişle DNA hasarı ve yanlış tamir edilmiş DNA kanserin başlaması ve ilerlemesinin altında yatan moleküler bir olaydır (32, 33). Bu çalışmada kullanılan tek hücre jel elektroforez yöntemi ise DNA hasarının tespitinde kullanılan hassas ve güvenilir bir yöntemdir (18). Bu nedenle, kemoterapötik ilaçlarla yapılmış önceki bazı çalışmalarda (6, 9, 24, 28) ve pemetrekset ile yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular kemoterapötik ilaçların ikincil habis tümör oluşumlarına neden olabilirdiği görüşünü güçlendirmektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada pemetrekset'in genotoksitesitesi, günümüzde doğru ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilen alkali tek hücre jel elektroforez yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuç ilacın normal lökositler üzerine genotoksik potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte ilacın genotoksitesitesi farklı moleküler mekanizmalarla oluşan DNA hasarı indikatörü olan başka tekniklerle de (KA, MN, KKD) araştırılmalıdır. Özellikle MN tekniği ile yapılacak çalışmalarda geleneksel giemsa boyama yerine floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) boyama kullanılırsa ilacın genotoksik niteliğinin (kromozom kırıklarına neden olan klastojenik bir ajan mı, yoksa tam kromozom kaybına neden olan anojenik bir ajan mı olduğu) netlik kazanacağı düşünülmektedir. İlacın tek hücre jel elektroforez ile yapılacak bundan sonraki çalışmalarında da yine yöntemin FISH kombinasyonunun kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Çünkü bu teknikte ilacın özellikle kanser ile ilgili gen bölgelerinde (KARS, TP53, APC) ya da telomer bölgelerinde hasara neden olup olmadığı tespit edilebilecektir.

**Evaluation of genotoxic potential of pemetrexed by using *in vitro* alkaline comet assay****ABSTRACT**

Pemetrexed is a chemotherapeutic drug, approved for the treatment of mesothelioma and non-small cell lung cancer and variety of neoplasm. Chemotherapeutic drugs don't target only cancer cells in treatment. During treatment these drugs encounter with normal cells as well. Therefore, in this *in vitro* study, it was aimed to investigate the whether genotoxic effect or not of Pemetrexed on normal leukocytes. *In vitro* alkaline

comet assay was used in this study. Leukocytes from human peripheral blood samples from two volunteer donors were used in the study. In the present study, leukocytes were treated with four different concentrations (25, 50, 75, and 100 µg/ml) of the drug for 1 hour. At concentration of 75 µg/ml and 100 µg/ml, there were statistically significant increases in DNA damage compared to the negative control ( $p < 0.05$ , and  $p < 0.01$  respectively). The obtained result shows that Pemetrexed may have genotoxic potential on normal leukocytes.

**Keywords:** Genotoxicity; comet assay; pemetrexed

**KAYNAKLAR**

- Dalkic E, Wang X, Wright N, Chan C. Cancer-Drug Associations: A complex system. PLoS ONE 2010; 5: 1-15.
- T.C Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye kanser istatistikleri <http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2014-RAPOR.pdf> (Erişim tarihi: 07 Şubat 2017).
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı. Kansere istatistikleri [http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2017\\_4\\_subat.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2017_4_subat.pdf) (Erişim Tarihi: 07 Şubat 2017).
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı. Kansere Tedavisi <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-tedavisi/38-kanser-tedavisi.html> (Erişim tarihi: 07 Şubat 2017).
- Shepherd FA, Dancey J, Arnold A, Neville A, Rusthoven J, Johnson RD, Fisher B, Eisenhauer E. Phase II study of pemetrexed disodium, a multitargeted antifolate, and cisplatin as first-line therapy in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 2001; 92: 595-600.
- Istifli ES, Topaktas M. Genotoxicity of pemetrexed in human peripheral blood lymphocytes. Cytotechnology 2013; 65: 621-8.
- Eldin NE, Elnahas HM, Mahdy MAE, Ishida T. Liposomal pemetrexed: formulation, characterization and *in vitro* cytotoxicity studies for effective management of malignant pleural mesothelioma. Biol Pharm Bull 2015; 38: 461-9.
- Chattopadhyay S, Moran RG, Goldman ID. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. Mol Cancer Ther 2007; 6: 404-17.
- Choudhury RC, Ghosh SK, Palo AK. Potential transmission of the cytogenetic toxic effects of methotrexate in the male germline cells of swiss mice. Environ Toxicol Pharmacol 2001; 10: 81-8.
- Rojas E, Valverde M, Lopez MC, Naufal I, Sanchez I, Bizarro P, Lopez I, Fortoul TI, Wegman PO. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res 2000; 468: 11-7.
- Dusinska M, Collins AR. The comet in human biomonitoring: Gene-environment interactions. Mutagenesis 2008; 23: 191-205.
- Karlsson HL, Bucchianico SD, Collins AR, Dusinska M. Can the comet assay be used reliably to detect nanoparticle-induced genotoxicity? Environ Mol Mutagen 2015; 56: 82-96.
- Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Sforzolini GS, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S, Rodrigue AV. *In vitro* genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (comet) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. Toxicol 1998; 130: 129-39.
- Vandghanooni S, Eskandani M. Comet: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. BioImpacts 2011; 1: 87-97.
- Nunes APM, Machado SCF, Nunes RM, Danta FJS, De Mattos JCP, de-Araujo AC. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet. Food Chem Toxicol 2007; 45: 662-6.
- Rozgaj R, Kasuba V, Brozovic G, Jazbec A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet and micronucleus test. Int J Hyg Environ Health 2009; 212: 11-7.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000; 35: 206-21.
- Szeto YT, Benzie IFF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CMN, Tse MMY. A buccal cell model comet assay: Development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. Mutat Res 2005; 578: 371-81.
- Wang Y, Zhao R, Goldman ID. Decreased expression of the reduced folate carrier and folypolyglutamate synthetase is the basis for acquired resistance to the pemetrexed antifolate (LY231514) in an L1210 murine leukemia cell line. Biochem Pharmacol 2003; 65: 1163-70.
- Giovannetti E, Mey V, Danesi R, Mosca I, Tacca MD. Synergistic cytotoxicity and pharmacogenetics of gemcitabine and pemetrexed combination in pancreatic cancer cell lines. Clin Cancer Res 2004; 10: 2936-43.
- Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Marini L, Tacca MD, Danesi R. Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. Mol Pharmacol 2005; 68: 110-8.

22. Li T, Ling YH, Goldman D, Perez-Soler R. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human nonsmall cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3413-22.
23. Buqué A, Muhialdin JS, Muñoz A, Calvo B, Carrera S, Aresti U, Sancho A, Rubio I, Vivanco GL. Molecular mechanism implicated in Pemetrexed-induced apoptosis in human melanoma cells. *Mol Cancer* 2012; 11: 2-15.
24. Yang TY, Chang GC, Chen KC, Hung HW, Hsu KH, Wu CH, Sheu GT, Hsu SL. Pemetrexed induces both intrinsic and extrinsic apoptosis through ataxia telangiectasia mutated/p53-dependent and -independent signaling pathways. *Mol Carcinog* 2013; 52: 183-94.
25. Dhawan A, Bajpayee M, Pandey AK, Parmar D. Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet for rapid genotoxicity assessment. <http://www.cometassayindia.org/protocol%20for%20comet%20assay.pdf>. Erişim tarihi : 20 February 2017.
26. Collins AR. The comet for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-61.
27. Shahin AA, Ismail MM, Saleh AM, Moustafa HA, Aboul-Ella AA, Gabr HM. Protective effect of folic acid on low-dose methotrexate genotoxicity. *Z Rheumatol* 2001; 60: 63-8.
28. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folic acid. *Mutat Res* 2009; 673: 43-52.
29. Kalweit S, Vasudey V, Obe G. Liquid-holding experiments with human lymphocytes; III experiments with G0 and G1 cells. *Mutat Res* 1988; 207: 41-4.
30. Collins AR, Dobson VR, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: What can it really tell us?. *Mutat Res* 1997; 375: 183-93.
31. Comet Assay Interest Group. [http://cometassay.com/index\\_files/Page345.htm](http://cometassay.com/index_files/Page345.htm) (Erişim tarihi 15 Şubat 2017).
32. Kastan MB. DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 517-24.
33. McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 2008; 23: 183-90.