

Spermatozoon DNA'sının Hasarına Neden Olan Faktörler, Tamir ve Hasar Tespit Mekanizmaları

Eser AKAL¹, Murat SELÇUK¹*

¹*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, 55270, Atakum, Samsun*

**Sorumlu Yazar: Eser AKAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı,
55270, Atakum, Samsun
e-posta: eserakal@omu.edu.tr*

Geliş Tarihi / Received: 20.09.2011

ÖZET

Günümüzde yapılan yoğun çalışmalarla önem kazanan spermatozoon deoksiribonükleik asit (DNA)'ındaki hasarlar, gerek fertilizasyonu, gerekse embriyonal yaşamdan ölüme kadar olan yaşamı olumsuz yönde etkilemektedir. Birçok nedene bağlı DNA üzerinde sürekli hasar oluşmaktadır. Hasarın bir kısmı organizmanın kendine özgü tamir mekanizmaları tarafından onarılmaktadır. Bu hasar – onarım arasındaki denge, hasar nedenlerinin çoğalması ve onarım mekanizmalarındaki aksaklıklar nedeniyle hasar lehine bozulması durumunda hücre ölümü, fertilizasyon kapasitesinde azalma, spermatozoon genom bütünlüğünde bozulma ve mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu meydana gelen hasarların belirlenmesi amacı ile birçok hasar tespit yöntemleri geliştirilmiştir. Tespit edilen hasarların düzeltilmesi ve elimine edilmesi yanında bu hasarların oluşmaması için gerekli önlemler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu bağlamda alınabilecek önlemler ile spermatozoon DNA'sının hasarının önüne geçmek mümkün olabilmektedir. Bu derlemede spermatozoon DNA'sının hasarına neden olan durumlar, organizmanın kendine özgü DNA hasar tamir mekanizmaları, spermatozoon DNA'sı hasarlarının tespit metotları ve muhtemel hasarlara karşı alınabilecek korunma yöntemleri hakkında veriler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: DNA, hasar, hayvan, spermatozoon

ABSTRACT

THE FACTORS INDUCED DNA DAMAGE OF SPERMATOZOON, REPAIR AND DAMAGE DETECTION MECHANISMS

The damage of the spermatozoon deoxyribonucleic acid (DNA) which is getting importance in the intensive researches of nowadays, affects the life negatively both from the embryonic stage to the death and fertilization. Lots of reasons lead continuous damage onto the DNA. The damage is recovered by the individual mechanisms of the organism. This balance of the damage-repair, increasing the damage motives and breakdowns of the recovery mechanisms lead the balance in favor of the damage and cell death, decreasing fertilization capacity, impairment of the spermatozoon genome unity and mutations will be occurred. Lots of damage determination methods have been developed to detect these damages. Beside the studies which have been done about the correction of the detected damage and elimination, there are studies onto required precautions for not to take shape of this damage. In this sense, damage of spermatozoon DNA could be prevented by some precautions. In this review, reasons of damage of spermatozoon DNA, individual damage of DNA repair mechanism of organism, determination methods of damage of spermatozoon DNA and precautions against possible damages of DNA will be addressed.

Key Words: DNA, damage, animal, spermatozoon

Giriş

Genetik bilgiyi taşıyarak nesilden nesile aktarılmasını sağlayan deoksiribonükleik asit (DNA) Watson-Crick modeline göre, helezon (heliks sarmal) şeklinde sarılmış iki uzun molekül zincirinden yapılmıştır. Bu zincir kitlenin omurgasını şeker ve fosfat komponentleri, eksenini de genetik bilgileri taşıyan nitrojen bazları oluşturur. Ancak zincirlerin dışında bulunan fosfatlar, iç taraftan deoksiriboz molekülüne, deoksiriboz molekülüne pirimidin ve pürin bazlarına, bunlar da zincirin en iç tarafında birbirlerine zayıf Hidrojen (H) bağı ile bağlanmışlardır (Çakır, 2007). DNA üzerinde çeşitli faktörlere bağlı olarak sürekli hasarlar oluşmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne ve mutasyona neden olur (Halliwell ve Aruoma, 1991). Organizmada DNA hasarı ve onarımı arasında bir denge söz konusudur. Bu denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı hayvanlarda saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun olduğu gösterilmiştir (Randerath ve ark., 1997).

Spermatozoon Dna'sındaki Hasara Neden Olan Faktörler

DNA'da oluşan hasar nedenleri dört şekilde incelenebilir:

1. Kendiliğinden Değişimler Sonucu Oluşan Hasar

1.1. Yanlış eşleşme: Normal DNA metabolizması sırasında oluşan DNA hasarının en önemli nedeni DNA sentezi sırasında bazların yanlış eşleşmesidir. Ökaryotlarda sentezi yürüten DNA polimeraz ve dışında tüm DNA polimerazların 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi vardır. Buna rağmen DNA replikasyonu sırasında normalde Adenin (A) = Timin (T), Guanin (G) ≡ Sitozin (C) eşleşmesi gerekirken sağlıklı bireylerde de yanlış baz eşleşmesi görülmektedir. Ayrıca, onarım ve

rekombinasyon işlemleri sırasında da yanlış baz yerleşebilmektedir (Sharma ve ark., 2004).

1.2. Bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimler: Herhangi bir bazın yapısal izomerinin oluşumu, o bazın eşleşme özelliğini değiştirir. Pürin ve pirimidinlerdeki azot atomları genelde $-NH_2$ formunda olduğu halde bazı durumlarda tautomerik formuna ($-NH$) dönüşebilirler. Sitozin ve adeninin spontan olarak deaminasyona uğraması sonucu sırasıyla urasil ve hipoksantin oluşmaktadır. DNA yapısında urasil oluşumu biyolojik açıdan büyük önem taşır. Urasili uzaklaştırma yeteneği olmayan *E.Coli* türlerinde kendiliğinden mutasyon hızının arttığı ve $G \equiv C \rightarrow A = T$ transisyonunun olduğu görülmüştür (Duncan, 1980). DNA yapısındaki hipoksantin potansiyel olarak mutajeniktir. Replikasyon sırasında hipoksantin sitozin ile eşlenir ve $A = T \rightarrow G \equiv C$ mutasyonuna neden olur. Pürin ve pirimidin bazları keto-enol tautomerizm ve deaminasyon sonucu değişime uğrar (Fernandez ve ark., 2003).

1.3. Baz kaybı: DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı olur ve sonuçta pürin veya pirimidinlerin uzaklaştırılmış olduğu bölgeler oluşur. Baz kaybı replikasyonu etkileyeceği gibi pürin veya pirimidinleri uzaklaştırılmış bölgede 3' fosfodiester bağının kolayca hidroliz olmasıyla zincir kırıkları da oluşur (Fernandez ve ark., 2003).

1.4. Serbest radikaller: Serbest radikaller (SR) hücrel solunum, hücre yaralanması, fagositoz ve bazı enzimatik reaksiyonlar sırasında endojen olarak üretilebildiği gibi, pestisitler, kanserojen maddeler, iyonizan radyasyon ve hava kirliliği gibi çevresel faktörler tarafından da organizmada oluşturulmaktadır. SR, DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, pürin ve pirimidin bazlarının spesifik modifikasyonuna tek veya çift dal kırıklarına, abazik alanlara baz modifikasyonlarına ve DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olur ya da deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu baz

salınımı ve DNA zincir kırıklarını indüklerken, oksidatif baz modifikasyonları mutasyona yol açar (Dinçer ve Akçay, 2000).

2. Hayvanlardaki Bireysel Farklılıklara Bağlı Meydana Gelen Hasar

2.1. Yaş: Narendra ve ark. (2003) yaşın ilerlemesiyle spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarların arttığını ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun da güçleştiğini bildirmektedirler.

2.2. Hormonlar: Yapılan bir çalışmada, testosteronun, spermatogenez sırasında DNA kırılması ve bağlanması yapan bir enzim olan DNA topoizomeras II ekspresyonunun pozitif düzenleyicisi olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Başar ve ark., 2005).

2.3. Genotoksik maddeler: Genotoksik maddelerin spermatozoon DNA'sına verdiği zararlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar acrylonitrile, tamoxifen, cyclophosphamide, styrene ve acrylamide gibi pek çok maddenin genotoksik etkiye ve spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır (Türk ve ark., 2005).

2.4. Seminal plazma: Spermatozoanın antioksidanca yetersiz bir çevrede bulunması DNA hasarı ve apoptoziste artmaya yol açar. Seminal plazmada antioksidan seviyesi azaldığında oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarı düzeyinde artış görülmektedir (Türk ve ark., 2005).

3. Spermanın İşlenmesi Aşamalarında Kullanılan Tekniklere Bağlı Hasar

3.1. Spermanın sulandırılması: Bu konuyla ilgili bilgi ve araştırma yetersizliği ile birlikte Cabrita ve ark. (2005) alabalık ve çipuralarda yaptıkları çalışmada spermayı dondurmadan önce 1:6 ve 1:20 oranında sulandırdıklarında; oluşan DNA hasarı sırasıyla %31,3 ve %41,4 olarak tespit etmişler ve istatistiksel olarak bu artışı önemli bulmuşlardır.

3.2. Spermanın kısa süreli saklanması: Boe-Hansen ve ark. (2005) domuz spermasını sulandırdıktan sonra 18°C de 5 gün saklamışlar ve 3. günün sonunda spermatozoa DNA hasarı indeksinde önemli artışların olduğunu

bildirmişlerdir. Fraser ve Strzezek (2003)'de domuz spermasını farklı sulandırıcılar kullanarak 5°C ve 16°C'de kısa süreli olarak sakladıklarında DNA hasarlarını sırasıyla %15,30 ve %12,45 olarak tespit etmişler, istatistiksel olarak önemli bulunan sonuçlar doğrultusunda spermatozoon DNA'sı hasarının, depolama sıcaklığı farklılıklarından etkilendiğini saptamışlardır.

3.3. Reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma: Baumber ve ark. (2003) aygır spermasındaki reaktif oksijen türevlerinin ve spermayı dondurarak saklamanın DNA hasarı üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada hidrojen peroksitin bu hasarda rolü olduğunu fakat süperoksit dismutazın herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada antioksidan olarak alfa-tokoferol (0,1 mM) kullanıldığında dondurmaya takiben oluşan DNA hasarının azaldığını tespit etmişlerdir.

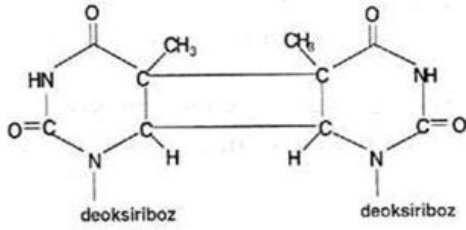
4. Çevresel Hasar

4.1. İyonize radyasyon: İyonize radyasyon (İR)'un DNA üzerine etkisi doğrudan veya dolaylı yolla olabilir. Doğrudan etki radyasyonun enerjisinin doğrudan DNA ile etkileşimi sonucu oluşurken, dolaylı etki radyasyonla açığa çıkan enerji ile uyarılan moleküllerin DNA ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Sonuçta, baz hasarı ve zincir kırıkları meydana gelir (Dinçer ve Akçay, 2000).

4.2. Ultraviyole ışınlar: 240-400 nm dalga boyu aralığında olan ultraviyole (UV) ışınları DNA üzerinde iki tip hasara yol açabilir.

a) Pirimidin dimerleri oluşumu: UV ışınlarına maruz kalan DNA'da komşu pirimidinler arasında kovalent bağlar oluşur ve bu da hasara yol açar. En çok siklobütan pirimidin dimerleri oluşmaktadır.

b) DNA çapraz bağları ve zincir kırıkları: UV radyasyon DNA-protein ve daha az olmak üzere DNA-DNA çapraz bağlarının oluşumuna neden olur. Ayrıca UV'ye maruz kalan DNA'da zincir kırıkları oluştuğu da bilinmektedir (Şekil 1) (Dinçer ve Akçay, 2000).



Şekil 1. Timin dimeri (Dinçer ve Akçay, 2000).

Figure 1. Thymine dimer (Dinçer and Akçay, 2000).

4.3. Alkileyici maddeler: Organizmada endojen olarak da sentezlenen alkileyici maddeler DNA yapısındaki nükleofilik merkezlere büyük ilgi gösterirler. Bu bölgelere atak yaparak DNA alkilasyonuna neden olurlar (Şekil 2) (Dinçer ve Akçay, 2000).

Alkileyici maddelerin mutajenik etkilerinden en fazla sorumlu olan hasar O⁶-metil guanindir (O⁶-MG). Eğer O⁶-MG timin ile eşleşirse G=C→A=T mutasyonu olur (Dinçer ve Akçay, 2000).

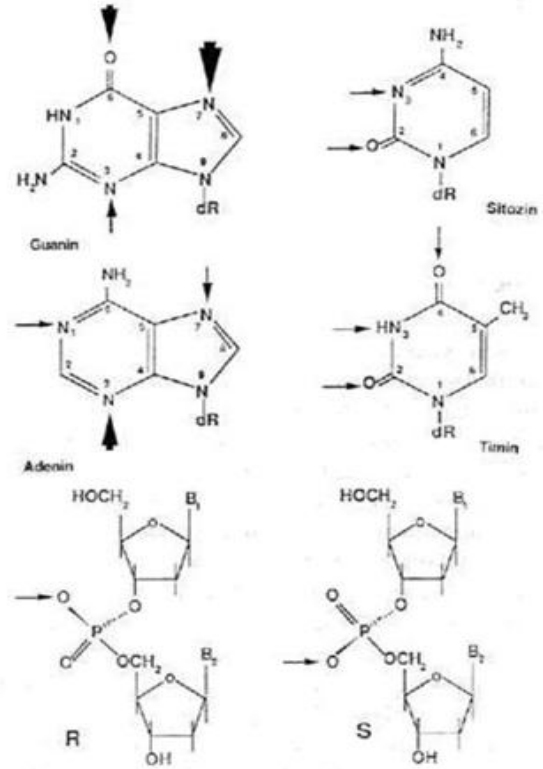
4.4. Çapraz bağlayıcılar: Nitröz asit, mitomycin, nitrojen mustard, kükürt mustard, çeşitli platinyum türevleri, diamino diklorid, fotoaktive olmuş psoralenler DNA üzerinde zincir içi ve zincirler arası bağlar oluştururlar. Bu hasar şekli en önemli hasarlardan biridir. Çünkü çapraz bağlar oluştuğunda zincirler ayrılamaz, replikasyon ve transkripsiyon durur (Fernandez ve ark., 2003).

DNA'nın Kendine Özgü Tamir Mekanizmaları

DNA'da yanlış eşleşmiş, okside olmuş, deamine olmuş ve karsinojenler ile katılma ürünü oluşturmuş bazların onarımında başlıca 4 mekanizma vardır (Meltem, 2003).

1. Baz çıkararak onarım

Bu tip onarım sistemi, hasarlı bazın doğrudan doğruya uzaklaştırılmasıdır. Spesifik DNA-glikosilaz enzimleri anormal baz ile şeker-fosfat arasındaki N-glikozid bağını hidroliz eder. Böylece DNA'da abazik bölgeler oluşur (Şekil 3).



Şekil 2. DNA üzerinde oluşan alkilasyon bölgeleri (Koyu oklar en sık alkilenen bölgeyi gösterir) (Dinçer ve Akçay, 2000).

Figure 2. Alkylation area on DNA (Dark arrows show most frequent alkylated areas) (Dinçer and Akçay, 2000).

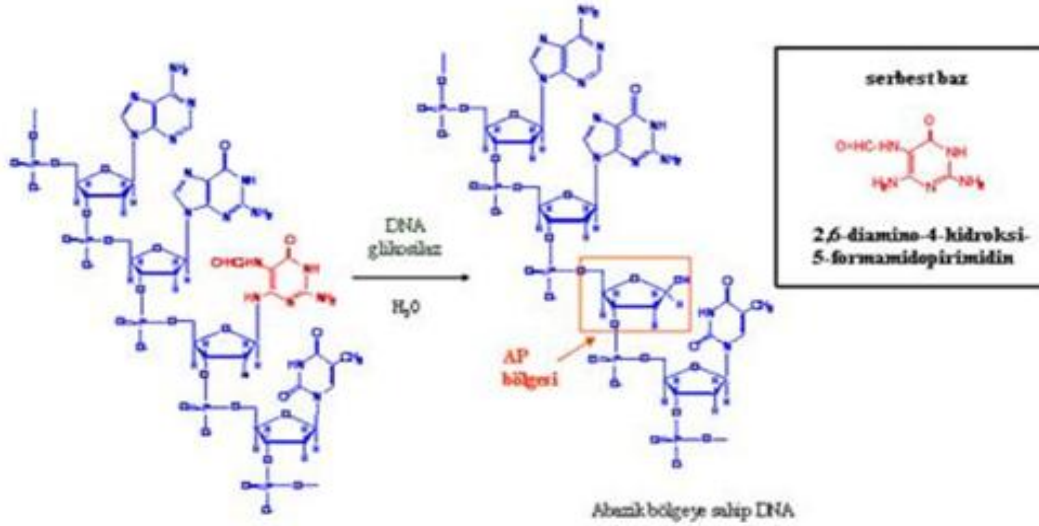
Onarım, abazik bölgelere (AP = Apürinik/Aprimidinik) doğrudan doğruya bazın konması şeklinde gerçekleşmez, geride kalan deoksiriboz 5' fosfat AP endonükleaz ile uzaklaştırılır. Oluşan bir nükleotidik boşluk ise DNA polimeraz ile doğru kodlanıp sentezlenir ve nick yapıştırılır (Şekil 4) (Fraga ve ark., 1990; Shigenaga ve ark., 1989).

2. Nükleotid çıkararak onarım

Ultraviole ışına maruz kalmış DNA'da oluşan pirimidin dimerleri ya da yanlış eşleşmiş DNA bazları, ATP bağımlı excinuclease kompleksi tarafından kesilir. *E.coli*'de uvrA, uvrB, uvrC genlerinin kodladığı ABC excinuclease enzimi görev yapar. Bu enzim hasar görmüş DNA'yı, hasarın 5' ucundan 8 baz ve 3' ucundan 4 baz sonra olmak üzere 2 ayrı pozisyonda keser. İstenmeyen baz oligonükleotid yapısı içinde uzaklaştırılır ve bir

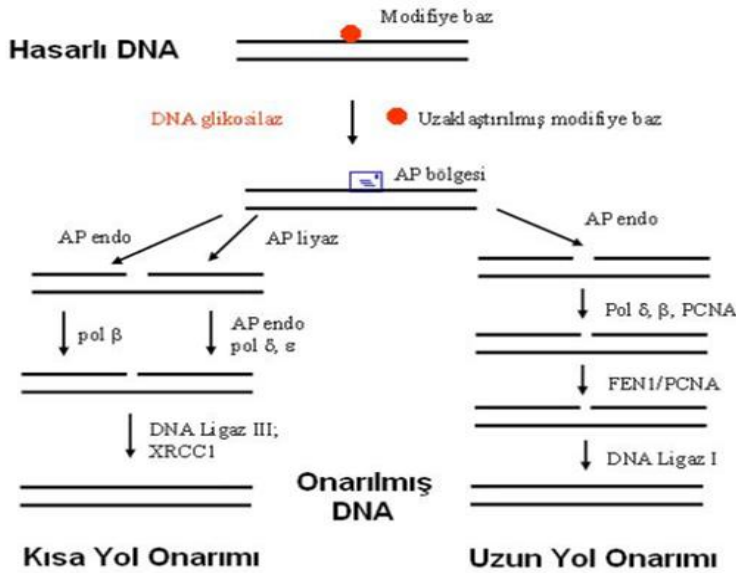
boşluk oluşur. DNA polimeraz sağlam zincirdeki bilgiyi kullanarak DNA'yı sentezler. Yeni sentezlenen DNA parçası mevcut DNA

zincirine DNA ligaz enzimiyle yapıştırılır (Şekil 5) (Fraga ve ark., 1990; Shigenaga ve ark.,1989).



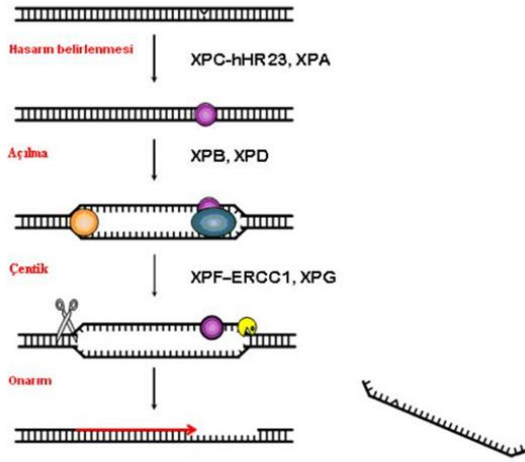
Şekil 3. DNA glikozilazın etkisi (Altuntaş, 2007).

Figure 3. Effect of DNA glycosylase (Altuntaş, 2007).



Şekil 4. Baz çıkarma onarım mekanizması (Altuntaş, 2007).

Figure 4. The base extraction repair mechanism (Altuntaş, 2007).

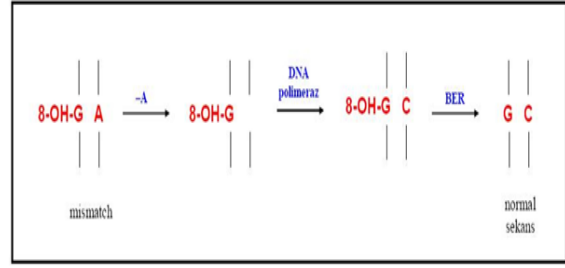


Şekil 5. Nükleotit çıkararak onarım mekanizması (Altuntaş, 2007).

Figure 5. The nucleotide extraction repair mechanism (Altuntaş, 2007).

3. Mismatch onarım (Yanlış eşleşme onarımı)

Bu onarımı *E.coli* örneği ile açıklamak mümkündür. *E.coli*'de mismatch onarım sisteminde, zincirin belirlenmesi ve onarımında görevli en az 9 protein komponenti bulunur. Zincirin belirlenmesi, 5' GATC dizilimi içinde yer alan bütün A'leri N-6 pozisyonda metilleyen Dam metilaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Replikasyondan hemen sonra, çok kısa bir süre içinde kalıp zincir metillenmiş duruma geçer. Fakat henüz sentez edilen zincir metillenmemiştir. Yeni sentezlenmiş zincirde GATC diziliminin bu geçici metillenmemiş durumu zincirin belirlenmesine olanak sağlar. Replikasyon sırasında oluşmuş ve GATC dizilimine yakın yanlış eşleşmeler, kalıp zincirdeki bilgiye göre onarılır. Onarım GATC diziliminde guaninin 5' ucundan DNA'nın koparılması, çeşitli enzimlerle lezyonun hemen ötesindeki bir segmentin çıkarılması, oluşan boşluğun kalıp zincire göre doldurulması ve nick'in yapılandırılması basamaklarını içerir (Şekil 6) (Fraga ve ark., 1990; Shigenaga ve ark., 1989).



Şekil 6. Yanlış eşleşme onarım mekanizması (Altuntaş, 2007).

Figure 6. The mismatch extraction repair mechanism (Altuntaş, 2007).

4. Doğrudan onarım

DNA'da istenmeyen değişiklikleri doğrudan uzaklaştırmaya DNA fotolizaz enziminin ışık ile oluşan siklobütan pirimidin dimerlerini, baz veya nükleotidi uzaklaştırmadan onarması örnek olarak gösterilebilir.

Bir diğer örnek ise DNA guaninin alkilleyici ajanlarla metilasyona uğraması ile oluşan, mutajenik bir lezyon olan O⁶-metil guanin onarımıdır. Bütün türlerde bulunan bir enzim olan O⁶-metil guanin DNA transferaz, aktif bölgesindeki sisteine O⁶-metil grubunu transfer eder. Böylece kendisini inaktive ederken DNA'yı onarır (Fraga ve ark., 1990; Shigenaga ve ark., 1989; Shigenaga ve Ames, 1991).

DNA Hasar Tespit Yöntemleri

Günümüzde yaygın olarak DNA fragmentasyonu değerlendirilmesinde Flow cytometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP nick-end labeling (Tunel), sperm chromatin structure assay (SCSA), single cell gel electrophoresis (Comet) ölçümleri kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2004). Bunun yanında in situ transkripsiyon analizi, akridin oranj (metakromik boya), spermatozoon kromatin dispersiyon, elektron mikroskop, enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA), fluorescein in situ hybridization (FISH) ve likit kromatografi kullanılmaktadır (Agarwal ve Said, 2003; Fernandez ve ark., 2003; Floyd ve ark., 1986). Ayrıca DNA yapısını belirlemede kullanılabilecek anilin mavi ve metil yeşil, gimsa CMA3 gibi boya

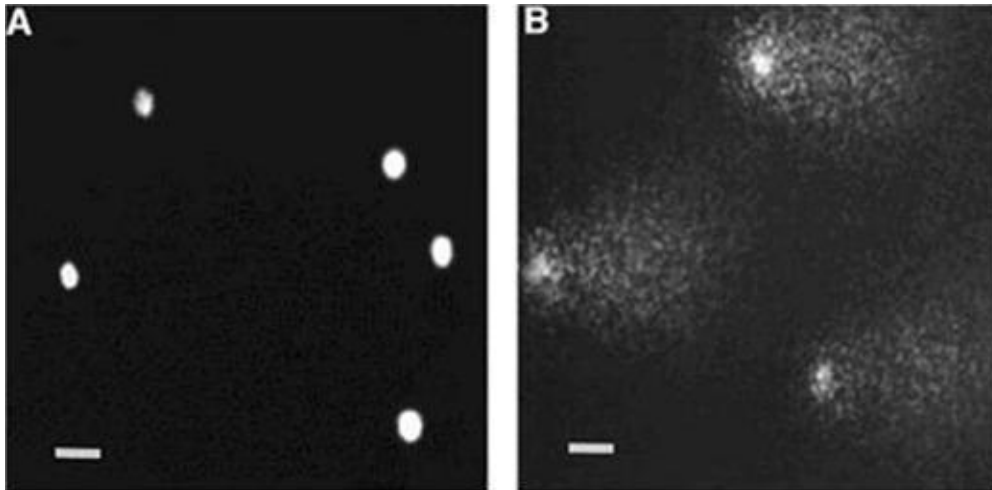
yöntemleri de bulunmaktadır (Esterhuizen ve ark. 2000). Bu bölümde yukarıdaki metotlardan en çok kullanılanlar ele alınacaktır.

1. Comet: Comet yöntemi alkali labil bölgeler ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar sonucu oluşan zincir kırıkları gibi DNA hasarlarının derecesinin değerlendirilmesinde güncel bir tarama yöntemidir. Ostling ve Johanson tarafından radyasyonla indüklenen sağlam hücrelerde oluşan DNA kırıklarını değerlendirmek için geliştirilmiştir (Aravindan ve ark., 1997). DNA hasarını saptamadaki yüksek sensitivitesi, çok çeşitli ökaryotik hücrelerde çalışılabilir olması, az hücre sayısında da çalışılabilmesi comet yönteminin avantajlarındandır. DNA hasarına yol açan ajanların erken biyolojik etkilerini belirlemede yararlıdır. Comet yönteminde; zaman, sıcaklık, ışık gibi faktörler DNA'da hasara neden olabileceğinden hücreler en kısa sürede soğukta ve ışıktan korunarak çalışılmalıdır (Abdulkerim ve ark., 2004). Spermatozoa DNA'ya bağlanan boya ile boyanır ve ortaya Comet (kuyruklu yıldız) çıkar. Comet'in yorumlanmasında nükleus çapı ve kuyruk uzunluğu esastır. Çift DNA zincirindeki kırıklar Comet'in baş kısmında yoğunlaşırken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar Comet'in kuyruğunda

yoğunlaşarak uzama gösterir (Şekil 7) (Sakkas ve ark., 2002). Prensip olarak; sperma süspansiyonunun hazırlanması, jel yerleştirilmesi, hücre lizisi, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, DNA boyama ve Comet şekil analizi şeklinde tanımlanabilir.

Comet pahalı olmamasına karşın, hassas ve DNA hasarı belirlenmesinde güvenilirliği olan bir yöntemdir (Morris ve ark., 2002). Bazı çalışmalara göre spermatozoon DNA kırıklarının incelenmesinde SCSSA ve TUNEL'e göre daha duyarlı bir analiz yöntemidir (Donnelly ve ark., 2000).

2. TUNEL: Hasarlı spermatozoaların apoptozisin göstergesi olduğu bilinmektedir. TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan spermadaki spermatozoon popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczyca ve ark. (1993) tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde, DNA kırıklarının 3'-OH ucu reaksiyonunu katalizleyen exojen terminal deoksinukleotidiltransferaz (TdT) enzimi bağlanarak işaretlenir ve bu kısma (tek ve çift DNA zincir kırıkları) uridin trifosfat (dUTP) bağlanarak biotinlenir. Biotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır (Agarwal ve Said, 2003).

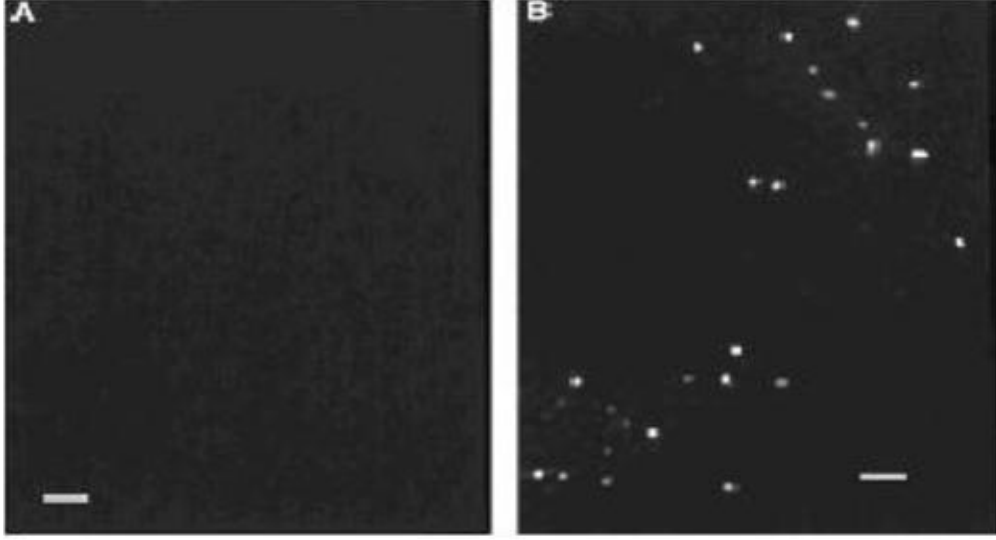


Şekil 7. A: Hasarlanmamış DNA.

B: Hasarlanmış DNA (Donnelly ve ark., 2000).

Figure 7. A: Undamaged DNA.

B: Damaged DNA (Donnelly et al., 2000).



Şekil 8. A: Çok az hasarlı ya da hasarlanmamış DNA.
B: Hasarlanmış DNA (Donnelly ve ark., 2000).

Figure 8. A: Little or no DNA damage.
B: Damaged DNA (Donnelly et al., 2000).

3. SCSA: SCSA, flowsitometrik bir yöntemdir (Agarwal ve Said, 2003). Bu yöntemle denatüre olan DNA, ısı veya asit ile muamele edildikten sonra metakromik bir boya olan akridin oranj ile çift zincirli DNA kelat oluşturularak tek sarmallı DNA'ların (tek sarmallı DNA'lar ≥ 630 nm'de kırmızı floresan renk verir) çift sarmallı (çift sarmallı DNA'lar 515-530 nm'de yeşil floresan renk verir) olanlara oranı ölçülür. (Evenson ve ark., 2002). Tek sarmallı DNA / çift sarmallı DNA oranında artış daha fazla denatürasyon ve kromatin yapısında daha fazla kırılma olduğunu gösterir (Sailer ve ark., 1995).

4. In situ translasyon ölçümü: DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda dUTP tek DNA zinciri ile birleşir (Manicardi ve ark., 1995). Klinik olarak kullanımı kısıtlıdır ve in vitro fertilizasyon sonuçları ile in situ translasyon sonuçları arasında korelasyon bulunmamaktadır. In situ translasyon yöntemi ile yapılan nükleer bütünlük değerlendirmesindeki sonuçlar ile spermatozoa konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi arasında net bir ilişki olduğu görülmüştür (Irvine ve ark., 2000).

5. Akridin oranj: SCSA'nın basitleştirilmiş şeklidir. Pahalı olmayan ve iyi yetişmiş bir teknisyene gerek olmayan bir yöntemdir. Acridine orange (AO), spermatozoonun yorumlanması ve mikroskopik incelenmesi sırasında renklerin çabuk solması, heterojen boyanmanın görüntüyü kötüleştirme güçlük yaratmaktadır. Bazı laboratuvarlar AO testini erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanmaktaysa da, alınan neticeler tartışmalıdır. Buna rağmen bu yöntemin klinik önemi AO test ile TUNEL sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca spermatozoa motilitesi ve AO testi arasında negatif bir korelasyon da vardır (Sakkas ve ark., 2002).

6. Spermatozoa kromatin dispersiyon: Son zamanlarda tanımlanan bu yöntem, DNA fragmentasyonu için basit ve pahalı olmayan bir tekniktir. Testin temeli, kırık DNA'ya sahip spermatozoonun asit denatürasyonu sonrası ve nükleer proteinlerin açığa çıkmasını takiben aquase agarozda karakteristik bir halo vermesidir. Oluşan bu halonun küçüklüğü veya yokluğu yoğun DNA fragmentasyonunu gösterir (Sakkas ve ark., 2002).

Sonuç

Birçok nedene bağlı DNA üzerinde sürekli hasar oluşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda spermatozoon DNA'sındaki hasarın üreme üzerine olumsuz etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Reaktif Oksijen Türleri'nin (ROT) sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin apoptozisini (programlı hücre ölümü) hızlandırmaktadır. Bu da spermatozoa sayısının azalması ile üreme üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır. İstiridyeler, fareler ve balıklarda spermanın dondurularak saklanması DNA hasarına ve dolayısıyla anormal embriyo gelişimine ve infertiliteye neden olduğu belirtilmiştir. Hatta DNA'sı hasarlı olan spermatozoonlar embriyonik gelişimi olumsuz etkilemekle birlikte genetik hastalık riskini de artırmaktadır (Türk ve ark., 2005). Fertilizasyon ve embriyonik yaşamı olumsuz yönde etkileyebilen spermatozoon DNA'sı hasarını kısmen de olsa engellemek mümkündür. Bu bağlamda damızlıkların doğru zamanda yetiştirmeden çıkarılıp yaş faktörünün ortadan kaldırılması, seminal plazma içerisindeki antioksidan madde düzeyini düzenlenmesi, spermanın kısa veya uzun süreli saklanması yapılacak işlemlerde hasara neden olan etkenlerin elimine edilmesi, sperma sulandırıcı ve sulandırma oranının türe uygun şekilde seçilmesi, spermanın dondurulmasında hayvan türüne uygun kriyoprotektan madde kullanılması, iyonize radyasyon, ultraviyole ışınlar gibi DNA'da hasara sebep olan radyasyon ortamından uzak tutulması, ayrıca günümüzde çok fazla kullanım alanı olan pestisitler ve kanserojen maddeler gibi birçok kimyasal maddelerle en az temasın sağlanması gibi önlemler alınabilir.

KAYNAKLAR

- Abdulkerim, B., Birşen, B., Mehmet, U., Duygu, E., Muhlise, A., 2004.** Kriyoprezervasyonun Genotoksik Etkilerinin Comet Yöntemi İle Araştırılması. In: Turk J Biochem; 29(1); 1-176. 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon.
- Altuntaş, İ., 2007.** Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Agarwal, A., Said, M.T., 2003.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human Reproduction Update 9 (4), 331-345.
- Aravindan, G.R., Bjordahl, J., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1997.** Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. Experimental Cell Research 236 (1), 231-237.
- Başar, M., Çakan, M., Emir, L., Aydos, K., 2005.** Spermden Doğuma. www.androloji.org.tr / DNA %20 hasarlarının %20 erkek %20 infertilitesinde %20 önemi. doc (Erişim 22.06.2009)
- Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003.** Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. Journal of Andrology 24 (4), 621-628.
- Boe-Hansen, G.B., Ersbøll, A.K., Greve, T., Christensen, P., 2005.** Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. Theriogenology 63 (7), 2006-2019.
- Çakır, M., 2007.** Sağlık Yüksek Okulları İçin Histoloji (Ders Notları). http://host.nigde.edu.tr/uludogan/gakir/histoloji_saglik_yuksekokulu.pdf (Erişim 23.08.2011)
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., 2005.** Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology 50 (2), 144-153.
- Diñçer, Y., Akçay, T., 2000.** DNA Hasarı. Türk Biyokimya Dergisi 25 (2), 73-79.
- Donnelly, E.T., O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S.E., 2000.** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. Human Reproduction 15 (7), 1552-1561.
- Duncan, B.K., 1980.** Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. Nature 287 (9), 560-561.
- Esterhuizen, A.D., Franken, D.R., Lourens, J.G.H., Prinsloo, E., Van Rooyen, L.H., 2000.** Sperm chromatin packaging as indicator of invitro fertilization rates. Human Reproduction 15 (3), 657-661.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K., 2002.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male

- infertility and comparisons with the other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25-43.
- Fernandez, J.L., Mouriél, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vasquez, R., Alvarez, J.L., 2003.** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 24, 59-66.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M., Wong, P.K., 1986.** Formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter. *Biochemical Biophysical Research Communications* 137, 841-846.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N., 1990.** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 4533-4537.
- Fraser, L., Strzezek, J., 2003.** The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 42 (1), 49-55.
- Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z., 1993.** Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the in Situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. *Cancer Research* 53, 1945-1951.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991.** DNA Damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Febs Letters* 281 (1-2), 9-19.
- Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J., 2000.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21, 33-44.
- Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D., 1995.** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction* 52, 864-867.
- Meltem, M., 2003.** DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi* 28 (1), 20-24.
- Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D.R., 2002.** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 17 (4), 990-998.
- Narendra, P.S., Charles, H.M., Richard, E.B., 2003.** Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility* 80 (6), 1420-1430.
- Randerath, K., Zhou, G.D., Monk, S.A., Randerath, E., 1997.** Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis* 18, 1419-1421.
- Sailer, B.L., Jost, L.K., Evenson, D.P., 1995.** Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal of Andrology* 16, 80-87.
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, T., Bizzaro, D., 2002.** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061-1067.
- Sharma, R.K., Said, T., Agarwal, A., 2004.** Sperm DNA damage and clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian Journal of Andrology* 6, 139-148.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J., Ames, B.N., 1989.** Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 9697-9701.
- Shigenaga, M.K., Ames, B.N., 1991.** Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 10, 211-216.
- Türk, G., Aksu, E.H., Bozkurt, T., 2005.** Spermatozoon DNA'sı Hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 20 (1), 85-95.