

SPERMATOZOON DNA'SI HASARI

Gaffari TÜRK Emrah Hicazi AKSU Tanzer BOZKURT

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 06.06.2005 Kabul Tarihi: 26.07.2005

ÖZET

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA'da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Spermatozoon DNA'sı hasarına insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. DNA da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır. Spermatozoon DNA'sında şekillenen bu hasarların tespiti amacıyla basit hücre jel elektroforezi, tunel, spermatozoon kromatin yapısı ve 8-hidroksi 2-deoksiguanozin'in ölçümü gibi metotlar kullanılmaktadır. Spermatozoon DNA'sındaki hasar anormal embriyo gelişimi ve infertiliteye neden olmaktadır. Bu hasarların oluşmasını engellemek için değişik in vivo ve in vitro önlemler geliştirilmiştir. Bu derlemede spermatozoonun DNA yapısı, spermatozoon DNA'sı hasarına neden olan durumlar, hasarların tespit metotları ve bu hasarların oluşmasını engelleyecek çeşitli önlemlerle ilgili veriler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Spermatozoon, DNA, Hasar.

ABSTRACT

DNA Damage of Sperm

Sperm DNA damages have occurred in the sperm DNA at different levels due to various in vivo and in vitro reasons. The damage of sperm DNA has been observed in human and many species of animals such as mice, horse, porcine and fish. These damages occurred in sperm DNA are some structural damages such as degradation of chromatin structure, oxidation of DNA bases, false conjugation, obstruction of tubulin polymerisation, changing of bases chemically, abnormalities in the chromatin structure, cracking of DNA chain, crossing of DNA-DNA and DNA-protein, mutations in DNA. Simple cell gel electrophoresis, tunnel, the measurement of structure of sperm chromatin and 8-hydroxy 2-deoxyguanosine are used to determine these damages occurred in sperm DNA. The damage in sperm DNA causes occurring of abnormal embryonic development and infertility. Different in vivo and in vitro methods to prevent these damages were established. In this review the data regarding the structure of sperm DNA, biological situations leading to damage of sperm DNA, determination methods of certain abnormalities and different preventive methods are discussed.

Key Words: Sperm, DNA, Damage.

GİRİŞ

Bilgi taşıyıcısı olarak görev yapan DNA, RNA'ya göre daha önemli ve geniş ölçüde dikkati çekmektedir. Organizmalarda ve fajların çoğunda DNA karakteristik bir molekül oluşturur. Kalıtımda aktif olarak rol alan DNA her zaman çekirdeğin içinde ve bazen de hücrenin diğer bölümlerinde bulunmakta olup, gelişmiş canlılarda kalıtsal materyalin temelini oluşturur (1).

Amerikalı genetikçi *James WATSON* ve İngiliz Fizikçi *Francis CRICK*, 1953'lerde X ışını örneklerini ve karakteristik baz çifti özelliklerini dikkate alarak çift zincirden meydana gelen DNA'nın üç boyutlu bir eksen doğrultusunda sağ el çift sarmalı meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. DNA'nın bu iki sarmalı birbirine paralel olmayan biçimde seyretmektedir. Yani zincirlerden birinin 3' ucu ve diğerinin 5' ucu aynı tarafta bulunmaktadır. DNA'nın

omurgasını oluşturan ve hidrofilik özelliğe sahip olan şeker ve negatif yüklü fosfat üniteleri çift sarmalın dışa bakan yüzünde ve kendilerini saran su molekülüne dönüktür. Hidrofobik olan purin ve pirimidin bazları ise çift sarmalın içe bakan yüzünde ve ana eksene dikey olarak yer alırlar. Karşı karşıya duran bazlardan biri purin ise diğeri mutlaka pirimidin olmalıdır. İki purin bu yapı için büyük iki pirimidin ise küçüktür. DNA yapısındaki Adenin (A) daima iki hidrojen bağı ile Timin (T)'e ve Guanin (G) ise daima üç hidrojen bağı ile Sitozin (C)'e bağlanır (2).

Bu derlemede spermatozoonun DNA yapısı, spermatozoon DNA'sı hasarına neden olan durumlar, hasarların tespit metotları ve bu hasarların oluşmasını engelleyecek çeşitli önlemlerle ilgili veriler sunulmuştur.

Spermatozoon DNA'sı

Somatik hücrede DNA her dönüşünde 6 adet nükleosom içeren bobin spiralleri (selonit) halinde sıkıştırılmış olup 60.000 baz çifti aralığında nükleer matrikse yapışık vaziyette bulunur. Aktif genler nükleer matriks ile ilgili olmaya meyillidir. Spermatozoon nükleusunda protaminler DNA ya bağlıdır, onun negatif yükünü nötralize eder ve sıkı halkalar şeklinde kangallanır (3). Memelilerde sperm nükleusu *nükleer halka* denilen tek tip bir yapı içerir. Spermatozoon çekirdeğinin DNA'sı bu halkaya demirlenmiş bir şekilde bulunur. DNA spermatogenezis sırasında spermatozoona özel protaminler ile nükleer histonların bir araya gelmesiyle sıkılaştırılmaktadır. Sıkılaştırılmış DNA, protaminler üzerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu ile şekillenen disülfid bağları sayesinde bir arada tutulan kangallaşmış, ortası delikli çörek benzeri olan kromatin, bir spiral şekildedir (4-6). Bu spiraller normal somatik hücrenin tipik bobin benzeri spiral DNA'sından çok daha dar bir yapıya sahiptir.

Spermatozoon DNA'sındaki Hasar ve Önemi

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA'da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir (7). Spermatozoon DNA'sı hasarına insan (8, 9, 10) ve fare (11, 12), at (13), domuz (8), balık (4, 14, 15) gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. DNA da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi (16) kromatin yapısındaki anomaliler (17), DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları (4, 16), DNA da mutasyonlar (18) gibi bir takım yapısal bozulmalardır.

Spermatozondaki DNA hasarı ile spermanın yoğunluğu, morfolojisi, motilitesi gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığı pek çok araştırmacı tarafından araştırılmıştır (19-26). Bazı araştırmacılar spermatozoadaki DNA hasarı ile spermanın kalitesi arasında bir ilişki olduğunu (19, 22, 24, 26), bazıları ise böyle bir ilişkinin olmadığını (20, 21) ifade etmişlerdir. Saleh ve ark. (27) yaptıkları çalışmada spermatozoon DNA'sındaki hasarın üreme üzerine olumsuz etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. ROS (reaktif oksijen türleri)'un sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin apoptozisini (programlı hücre ölümü) hızlandırmaktadır. Bu da infertiliteye sebep olan spermatozoa sayısının azalması ile ilgili olarak, üreme üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır (28). İnsanlar (26), istirdiyeler (29), fareler (30) ve balıklarda (16) spermanın dondurularak saklan-

masının 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 (31). Yine sigara içen babaların spermatozoonlarındaki DNA hasarına bağlı olarak çocuklarında doğumsal anomaliler, kusurlar ve çocukluk çağında kansere yakalanma oranı artmaktadır (32-34). Bununla birlikte Guerin ve Benchaib (35) ise spermatozoon DNA'sının kalitesi ile doğumdaki anomaliler arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildirmektedirler.

Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden Olan Faktörler

1. İn vivo faktörler: Spermatozoon özellikle genotoksikler olarak bilinen ve DNA'da hasara yol açan toksik maddeler başta olmak üzere pek çok in vivo faktör tarafından hasara uğratılmaktadır. Bu konuda yıllardan beri çeşitli araştırmalar yapan bilim adamları DNAdaki hasarın fiziksel veya kimyasal etkiler sonucunda meydana geldiğini bildirmektedirler. Bu faktörlerden bazıları şunlardır:

a) Sigara

Sigara DNA hasarını artıran mutajen veya karsinojen maddeler olarak bilinen veya varsayılan maddeleri (nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar-PAH) içermektedir (7). Sigara dumanındaki mutajenik etkiye bağlı olarak sperma kalitesinde özellikle spermatozoon sayısı, motilite oranı ve anormal spermatozoon oranında önemli düşüşler meydana gelmektedir (18, 32-34). Sigara içmeye bağlı olarak insan spermasında anöploidi (kromozom anomalileri) seviyesi de artmaktadır (18). Ayrıca sigara içilmesine bağlı olarak seminal plazmadaki antioksidant seviyesinin düşmesi sonucunda da DNA hasarının arttığı bildirilmektedir (36, 37). Yapılan araştırmalar sigara içme oranı ile spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasar arasında önemli derecede pozitif bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır (38, 39).

Bir babanın sigara içmesi, kendi androjen seviyesinde değişimlerle birlikte bu babadan doğan çocuklarda da doğumsal anomaliler ve hatta çocukluk çağında bile çeşitli kanserlere neden olabilmektedir (18). Genotoksik maddeler spermatozoon hücresinde mutasyonu indükleyebilir ve yavruya geçip onların gelişimini etkileyerek, kanser meydana getirebilir (40). Kimyasal karsinojenlerin DNA'yı etkileyen metabolitleri kan yoluyla diğer doku ve organlara

taşınabilmektedir (41). Ancak Sertoli hücrelerindeki kan-testis bariyerinden dolayı gelişen cinsiyet hücreleri ile kan dolaşımı doğrudan temas içerisinde değildir. Bununla birlikte nikotin ve nikotin metabolitlerine sigara içen kişilerin spermasında rastlanması (38) DNA'yı etkileyen metabolitlerin bu engeli aşmış cinsiyet hücrelerini etkilediğini göstermektedir (7). Gaspari ve ark. (39) yaptıkları araştırma sonucunda tespit ettikleri PAH-DNA kompleksinin spermatozoa DNA'sındaki hasarın bir kanıtı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar sigara içmeksizin PAH bileşiklerine maruz kalan insanlarda da PAH-DNA kompleksinin yüksek bulunduğunu iddia etmektedirler. Erkek cinsiyet hücresinin DNA'sındaki hasar spermatogenezis esnasında tamir edilmezse, bu hasar birikerek artış gösterir (7). Olgun spermatozoon hücresinin bu hasara karşı küçük çaplı bir tamir mekanizmasına sahip olup olmadığı halen bir tartışma konusudur (18, 42). Fraga ve ark. (43) spermatozoon DNA'sının hasara uğraması için oksidatif hasarın gerekli olmadığını ve DNA'sı hasarlı bir spermatozoonun da fertilizasyonu başarabildiğini, askorbik asitin de insan spermatozoosunda oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedir.

b) Varikosel

Varikoselin spermatozoondaki DNA hasarına nasıl yol açtığı henüz tam anlaşılmamasıyla birlikte Fujisawa ve ark. (44) varikoselli hastaların testis dokusunda DNA polimeraz seviyesinde önemli bir azalma olduğunu ve bu enzimin eksikliğinin spermatogenezis üzerine olumsuz bir etki yaparak DNA hasarı meydana getirebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Varikoselli fertil veya infertil hastalarda yapılan araştırmalar seminal oksidatif strese bağlı yan ürün (ROS) düzeyinde artma ve toplam antioksidant kapasitede (TAK) azalmaların meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Artan seminal oksidatif stres ürünleri spermatozoon DNA'sındaki hasarla birlikte spermatozoonun plazma membranında lipid peroksidasyona, spermatozoon motilitesi, metabolizması ve fertilizasyon kapasitesinde ise azalmalara neden olarak spermatozoonun fonksiyonunu engellemektedir (45). Ayrıca oksidatif stres spermatozoonun kromatin bütünlüğünü etkileyerek tek ve çift DNA sarmalı kırılmalarına sebep olmaktadır (46).

c) Yaş

Yaşlanma ile doğru orantılı olarak spermatozoon DNA'sında hasar meydana gelmektedir. DNA çift sarmalındaki hasar ile spermatozoondaki apoptozisin yaşlanmaya paralel olarak artmakta olup bu artış

muhtemelen spermatogenezis esnasında ve sonrasında hücre seçim sistemindeki yetersizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (47). Bazı araştırmacılar (22, 48) normal ve infertil erkeklerde sperm motilitesi ile yaş arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğunu, yaşa bağlı azalan spermatozoa motilitesi ve artan DNA hasarının muhtemelen sperma süspansiyonu içerisindeki lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen moleküllerinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler. Narendra ve ark. (47) ise yaş ile spermadaki lökosit sayısı ve reaktif oksijen türleri arasında bir ilişkinin olmadığını, yaşın ilerlemesiyle spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarlar arttığını ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun da güçleştiğini bildirmişlerdir.

d) Genotoksikantlar

Genotoksikler yani hücre DNA'sında hasara yol açan maddeler DNA'da mutasyona ve kötü huylu kansere yol açmaktadır. Genotoksikant maddelerin spermatozoa DNA'sına verdiği hasarlarla ilgi pek çok araştırma yapılmıştır. Bu maddelerden biri olan vanadium, özellikle volkanik bölgelerdeki yeraltı sularında bulunmakta olup (49) spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğu tespit edilmiştir (17). Prooksidant özelliğe sahip olan demir elementi ile oluşturulan oksidatif strese bağlı DNA hasarı ve spermatogenetik fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir. Daha da önemlisi uzun süreli demir verilmesini takiben canlı vücudunda oksidatif strese bağlı olarak mayoz sonrası testis hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının yanısıra spermatozoonun fizyolojisi ve fonksiyonunda bozukluklar oluşmaktadır (11).

Kemoterapotik ajan olan cisplatin de spermatozoonun baş kısmında anomalilere (50) ve spermatozoon DNA'sında hasara sebep olan genotoksik bir maddedir (12). Genotoksik maddelerin spermatozoon DNA'sına verdiği zararlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar acrylonitrile (51), tamoxifen (52), cyclophosphamide (53, 54), styrene (54) ve acrylamide (55) gibi pek çok maddenin genotoksik etkiye ve spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır.

e) Çevre

Çevresel şartlar spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarın artmasında rol oynamaktadır. Bu şartlar DNA'nın bozulmasına sebep olabilir, spermatogenezis boyunca DNA tamirini engelleyebilir veya azaltabilir ya da hücrede apoptozis oluşturabilir. Bu yüzden ideal çevrede genç bir bireyin spermatozoosunda minimal DNA hasarı

ve daha az apoptozis görülür. Seminal plazmada antioksidan seviyesinin yüksek olması spermatozoonu çevresel DNA hasarına karşı korur. Bu nedenle antioksidanca zengin bir çevre hem testisteki hem de fertilizasyon için ovuma doğru giden spermatozoon DNA'sının bütünlüğünün sağlanması için taşınma süresince en uygun şartları sağlamaya yardımcı olabilir. Bunun tersine genç bir bireyde spermatozoonun antioksidanca yetersiz bir çevrede bulunması DNA hasarı ve apoptoziste artmaya yol açar (47). Alkol tüketimi (56) ve kafein alınması (57) da sperma kalitesini etkilemekle birlikte yavrularda doğumsal bozukluklara (58), kanser (59, 60) ve mental hastalıklar (61) gibi üreme ile ilgili önemli problemlere yol açabilmektedir. Diğer taraftan Horak ve ark. (7) ile Gaspari ve ark. (39) ise kahve ve alkol tüketimi ile DNA hasarı arasında bir ilişkinin olmadığını ileri sürmektedir. Sperma kalitesi üzerine zararlı etkisi olan diğer çevresel faktörlerden phthalates [phthalik asit esterleri içeren plastik sanayisinde ve diğer endüstriyel alanlarda kullanılan organik bileşikler (C₆H₄)] gibi endüstriyel kimyasallar (62) ve tanı amacıyla yapılan radyasyonların (röntgen ışınları) da (59) spermatozoon DNA'sı üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır.

2. İn vitro faktörler: Spermatozoon DNA'sında hasara neden olan in vitro faktörler genellikle spermanın işlenmesi aşamalarında kullanılan tekniklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Spermanın alınmasından dışının tohumlanmasına kadar geçen bu süre içerisinde uygun tekniklerle alınan sperma uygun şekillerde işlemlere tabi tutulur. Bu süreçte spermatozoa DNA'sında hasar meydana gelebilmektedir.

a) Spermanın kısa süreli saklanması

Kısa süreli saklama ile damızlıktan alınan sperma uygun sulandırıcılarla ve uygun tekniklerle sulandırılarak buzdolabında (+4 °C) 3-5 gün saklanabilmektedir. Bu işlem, kısa süre içerisinde tohumlanacak hayvanların varlığında başvurulabilecek bir uygulamadır. Kısa süreli saklamanın spermatozoon DNA'sında hasar oluşturduğuna dair çok fazla bilgi olmamasıyla birlikte Boe-Hansen ve ark. (63) 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 (42) de domuz spermasını farklı sulandırıcılar kullanarak 5 ve 16 °C'de kısa süreli olarak sakladıklarında sulandırıcıların niteliğine göre DNA hasarı düzeyinin değişiklik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Spermanın kısa süreli saklanması esnasında sulandırıcıya

antioksidan maddelerin katılmasıyla serbest radikal oluşumunun azalmasına bağlı olarak DNA'da şekillenebilecek hasar minimize edilebilir (64).

b) Spermanın uzun süreli saklanması

Spermanın uzun süreli saklanması; kullanılan damızlık hayvanın spermasından daha uzun süre istifade edilmesi hatta damızlık ölse bile spermasının kullanılabilirliğinin sağlanması açısından oldukça önemlidir. İnsanlarda testiste hasara veya ejakülasyonda bozukluklara yol açan bazı sitotoksik kemoterapotiklerin kullanımı, ışın tedavisi ve cerrahi müdahalelerden önce spermanın daha sonra kullanılmak üzere alınıp dondurulması sık sık başvurulan bir yöntemdir (65, 66).

İnsan (8, 65) dâhil olmak üzere geyik (67), aygır (13), domuz (8) ve balık (4, 15) gibi pek çok hayvan türünde spermanın uzun süreli saklanması için yapılan işlemler esnasında spermatozooanda DNA hasarının oluşup oluşmadığı ile ilgili bir takım araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar spermanın dondurulup çözülmesi sırasında spermatozoa DNA'sında hasarın oluştuğunu ortaya koymaktadır.

Spermanın dondurularak saklanması işlemleri sırasında herhangi bir uygulama basamağında uygun olmayan bir işlemin yapılması, bu uygulamalar esnasında spermatozoon DNA'sında meydana gelebilecek muhtemel hasarın düzeyinde artışa sebep olacaktır.

c) Seminal plazma

Seminal plazmada antioksidan seviyesi azaldığında oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarı düzeyinde artış görülmektedir (68). Alkan ve ark. (69) seminal plazmada antioksidan seviyesinin azalması sonucu reaktif oksijen moleküllerinin artmasından dolayı DNA hasarından kaynaklanan infertilite meydana geldiğini bildirmektedir.

d) Sulandırma oranı

Bu konuyla ilgili hemen hemen hiç bilgi bulunmamakla birlikte Cabrita ve ark. (4) alabalık ve çipuralarda yaptıkları çalışmada spermayı dondurmadan önce 1: 6 ve 1: 20 oranında sulandırdıklarında; oluşan DNA hasarı sırasıyla %28.2 ve %41.4 olarak tespit etmişlerdir. Sonuçta spermaya yüksek düzeyde sulandırıcı katılmasının DNA hasarını arttırdığı kanısına varmışlardır.

e) Reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma

Aslında reaktif oksijen molekülleri sınırlı seviyede olduğunda spermatozoonun kapasitasyonu sırasında fizyolojik role sahiptir (70-72). Ancak

yüksek düzeyde reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma spermatozoa DNA'sında hasara ve lipid peroksidasyona neden olmaktadır (68, 73). Baumber ve ark. (13) Aygır spermasındaki reaktif oksijen moleküllerinin 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 dondurmayı takiben oluşan DNA hasarının azaldığını tespit etmişlerdir.

f) Kryoprotektanlar

Spermayı dondurarak saklama esnasında spermatozoonda oluşabilecek zararlı etkiler kryoprotektan maddeler kullanılarak azaltılabilmektedir. Hemen hemen her türün sperması farklı özelliklere sahip olduğu için dondurma işleminden önce spermaya katılacak olan kryoprotektanın çeşidi, yoğunluğu ve spermanın kryoprotektana maruz bırakılma süresi türe göre ayarlanması gerekir (74). Farklı türlerin spermasının kryopreservasyonunda dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, propilen glikol, metanol, butandiol asetat ve 1,2- propandiol gibi kryoprotektanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (75, 76). Kryoprotektanlar dondurma esnasında spermatozoonun baş kısmındaki intrasellüler kompartmana geçerek sıvının donmasını ve buz kristallerinin oluşmasını seçici olarak engeller. Yapılan araştırmalar dondurma amacıyla spermaya kryoprotektanların katılmasının spermatozoon DNA'sında herhangi bir hasara neden olmadığını göstermektedir. Diğer bir ifadeyle spermaya kryoprotektan katılıp katılmaması spermatozoon DNA'sını etkilememektedir (21, 77).

Spermatozoon DNA'sındaki Hasarın Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler

I. Basit hücre jel elektroforezi (Comet): Spermatozoon DNA'sındaki hasarın düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi basit hücre jel elektroforez yöntemi ya da kısa adıyla Comettir. Bu yöntem pek çok çalışmada kullanılan görsel floresan bir tekniktir (9, 15, 29, 78). Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuardan laboratuara farklılık göstermekle beraber prensip olarak; sperma süspansiyonunun hazırlanması, jel yerleştirilmesi, hücre lizisi, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, DNA boyama ve Comet şekil analizi şeklinde tanımlanabilir. Kısaca yapılan işlemler şöyledir;

1. *Spermatozoa yıkama:* sperma fosfat buffer solüsyonu ile iki kez yıkanır ve bu solüsyon ile 2 milyon sperm/ml olacak şekilde yeniden sulandırılır.

2. Slayt hazırlama ve jel yerleştirme:

2.1. %0.75'lik normal erime noktasındaki agarozdan 100 µl tamamen dondurulmuş slaytın üzerine bırakılır ve jel oda ısısında en az 5 dakika bekletilerek katılaştırılır.

2.2. 72 µl %0.75'lik düşük erime noktasına sahip agaroz ile 8 µl sperma süspansiyonu karıştırılır ve ilk tabakanın en üstüne karışım ilave edilir.

2.3. Jel 4 °C'de 8 dakika katılaştırıldıktan sonra üçüncü tabaka olan 100 µl %0.75'lik düşük erime noktasındaki agaroz ilave edilir ve 4 °C'de 8 dakika bekletilir.

3. Hücre lizisi ve DNA dekondezasyonu:

3.1. 4 °C'deki slayt soğuk lizis solüsyonu (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, %1 sodium lauryl sarcosine, %1 Triton X-100, pH: 10) içine daldırılarak bir saat bekletilir.

3.2. Slayt, RNase uygulaması için 37 °C'de 4 saatliğine 10 µg/ml RNase ihtiva eden bir solüsyona (2.5 M NaCl, 5 mM Tris, %0.05 sodium lauryl sarcosine, pH 7.4) nakledilir.

3.3. Slayt 200 µg/ml proteinase K içeren pH: 7.4'teki 2.5 M NaCl, 5 mM Tris, %0.05 sodium lauryl sarcosine solüsyonu içinde 15 saat süreyle protein kinaza tabi tutulur.

4. *Elektroforez:* Slaytlar 300 mM sodium acetate ve 100 mM Tris, pH: 10 içinde 4 °C'de elektroforez tankında ekuilibre edildikten sonra 4 °C'de 12 V (0.46V/cm) ve 100 mA elektroforezde bir saat yürütülür.

5. *Nötralizasyon:* Slaytlar 0.4 M Tris-HCl (pH: 7.4) içerisinde en az 5 dakika nötrale edilirler.

6. *Boyama:* Her bir slayta 45 µl ethidium bromide (15 µg/ml) ilave edilir.

7. *Mikroskopik şekil analizi:* Burada kullanılan en yaygın parametreler; kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentidir. Comet ölçümü için özel bir şekil analizi yazılımı olan Komet sistem (Kinetic Imaging, UK) kullanılarak bu parametreler başarılı ve objektif olarak ölçülür (78).

II. Tunel (Flow cytometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP nick-end labeling) ölçüm kiti: Tunel yöntemi asıl olarak apoptozis sırasında meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için tasarlanmıştır (79). Kısaca yapılan işlemler şöyledir;

1. Sperma örnekleri iki kez PBS ile yıkanır ve sperma süspansiyonu hazırlanır.

2. Sperma süspansiyonu ($1-2 \times 10^6$ spermatozoa/ml) %1'lik paraformaldehitte yeniden süspansiyon edilir.

3. Bu süspansiyon bir buz kalıbı üzerine konularak 30-60 dakika bekletilir.

4. Süspansiyondan sonra tekrar PBS ile yıkanır ve %70 buz-soğuk etanol karışımında yeniden süspansiyon edilir. Bu son süspansiyon 300 g'de 5 dak. santrifüj edilerek üstte kalan etanol süpernatantı alınır.

5. Etanolün uzaklaştırılmasından sonra kalan hücre pelletleri PBS'de iki kez yıkanır ve 37°C 'de 50 μl boyama solüsyonunda [Terminal deoksi-transferaz (TdT) enzimi, TdT reaksiyon tamponu, fluorescein etiketli deoxyuridine triphosphate nükleotidleri (FITC-dUTP) ve distile su] içeren 60 dakika bekletilerek yeniden sulandırılır.

6. Bütün hücreler Rinse buffer solüsyonunda yeniden yıkanır ve 0.5 ml propidium iodide/RNase solüsyonunda yeniden yeniden sulandırılarak karanlık bir odada 30 dakika inkubasyona tabi tutulur (Oda sıcaklığı).

7. Histogram çıkarmak ve TUNEL-pozitif yüzdesini hesaplamak için elde edilen veriler FlowJo v 4.4.4 yazılım programında flow sitometri kullanılarak analiz edilir.

III. Spermatozoon kromatin yapısının ölçülmesi: Bu yöntem ile 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. Tek sarmallı DNA / çift sarmallı DNA oranında artış daha fazla denatürasyon ve kromatin yapısında daha fazla kırılabilirlik olduğunu gösterir (80).

Bu işlem kısaca şu şekilde yapılmaktadır;

200 mikrolitre'lik sperma ($1-2$ milyon/ml) 0.40 ml %0.1 Triton X-100, 0.15 M NaCl ve 0.08 N HCl, (pH: 1.4) ile karıştırılır. 30 sn sonra sperm süspansiyonundaki pH yükseltilir ve hücreler 6 $\mu\text{g/ml}$ acridine orange, 370 ml 0.1 M citric acid, 630 ml 0.2 M Na_2HPO_4 , 1 mM disodium EDTA ve 0.15 M NaCl, (pH: 6.0) içeren 1.2 ml acridine turuncu buffer

ilave edilerek boyanır. Hücreler 488 nm lazer uyarımı ile flow sitometri kullanılarak analiz edilir.

IV. 8-hidroksi 2-deoksiguanozin'in ölçümü: 8-hidroksi 2-deoksiguanozin (8-OHdG) en yaygın oksidatif DNA hasarı biyoişaretleyicisidir. Genomik DNA'da 8-OHdG tayini için kullanılan en yaygın metod elektrokimyasal belirlemeli yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-EC)'dir. Spermada 8 OHdG'nin ölçümü kısaca şu şekilde yapılmaktadır (78);

a) DNA ekstraksiyonu

Sperma örneği ilk önce sperm yıkama solüsyonu (SWB 10mM Tris-HCl, 10mM ethylenediaminetetraacetate[EDTA], 1M NaCl, pH 7.4) ile yıkanır. Daha sonra dithiothreitol (DTT), proteinaz K ve SDS ile inkube edilir. Akabinde spermatozoa DNA'sı kloroform/izoamil alkol ile ekstrakte edilir ve ribonükleaz A ile sindirilir. Daha sonra DNA 10 mM Tris-HCl içinde bir sonraki enzimatik DNA sindirimi için çözündürülür. DNA ürünü spermatozoa sayısına bağlı olarak 40 ile 300 μg arasında (1 milyon hücrede ortalama 1.63 μg olmak üzere) değişim gösterir (78).

b) Enzimatik DNA sindirimi

Bu aşama 8-OHdG için kritik bir basamaktır. Bazı araştırmacılar (43, 81) nükleaz P1 ve alkalın fosfataz gibi enzimlerle kombine olarak kullanmalarına rağmen Shen ve Ong (78) DNA sindirimini bakteriyel kaynaklı alkalın fosfataz (AP) kullanıldığında daha iyi sonuç verdiğini ve diğer kaynaklardan elde edilen AP ile daha az sindirim sağlandığını bildirmektedirler. Her bir örnekte %90'ın üzerinde olan DNA sindirimi dönüşüm faktörü ile deoksiguanozin (dG) yoğunluğu hesaplanabilir. ($1\mu\text{g DNA} = 0.62\text{nmol dG}$)

c) HPLC-EC analizi

Bu analiz sistemi bir Gilson pompası, bir Whatman partisphere 5 C 18 kolon, bir elektrokimyasal dedektör (Ag/AgCl elektrot, camsi karbon elektrot, 0,7 V, 50 nA), ultraviyole dedektör (254 nm) bir otoörnekleyici ve bir toplayıcıdan meydana gelmektedir. 8-OHdG ve dG düzeylerinin belirlenmesi için sırasıyla 13 ve 9 dakikalık bir zaman gereklidir. Sonuçlar 8-OHdG/ 10^5 olarak verilir. Spermatozoon DNA'sındaki hasarın tespiti için spermada 8-OHdG'nin düzeyinin belirlenmesi duyarlı ve nitelikli bir yöntem olarak gözükmesine rağmen bu yöntemle ilgili problemler şöyle sıralanabilir;

a) DNA ekstraksiyonu ve sindirimini kapsayan analitik işlemler suni DNA oksidasyonu ile ortaya çıkabilir.

b) Standart işlemlerin eksikliği farklı laboratuvarlar arasında önemli varyasyonlara sebep olabilir.

c) Nispeten büyük miktarda (50 µg) DNA gerektirmesi klinik örneklerde yaygın olarak kullanımını engeller.

Yukarıda belirtilen durumlar dikkate alındığında spermada 8-OHdG düzeyinin güvenilir bir şekilde tespit edilebilmesi için şu önlemleri almak gereklidir (78).

1- DTT ve proteinaz K ile inkubasyon sperm DNA'sını decondense ve ekstrakte etmek için esastır.

2- İnsan eliyle yapılan hataları en aza indirmek için DNA ekstraksiyonunda fenol kullanımından sakınılmalıdır.

3- Sistemin belirleme sınırına bağlı olarak 30 µg'dan daha az DNA ekstraktları kabul edilmemelidir.

4- Bütün çalışma boyunca 8-OHdG standartlarında aynı kimyasalları ve ajanları kullanmak gerekir.

5- Her grubun analizinde kaliteli kontrol için az miktarda karıştırılmış örnek kullanılmalıdır.

6- Sindirimden sonra mümkün olduğu kadar (genellikle birkaç gün içinde) çabuk analiz edilmelidir.

Spermatozoon DNA'sında Oluşan Hasara Karşı Alınabilecek Önlemler

Pek çok faktör hücrenin genetik materyalinde hasara sebep olmaktadır. Bu hasarların onarılması için gerekli mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte spermatozoon genomundaki hasarın, fertilizasyondan sonra oosit içinde tamir mekanizması tarafından düzeltildiği bazı araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir (82, 83).

Spermatozoon DNA'sında hasara yol açabilen etkenlerin bir kısmı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Yardımcı üreme teknolojileri için başvurulacak işlemlerde yapılan hataların en aza indirgenmesi ve yeni stratejilerin belirlenmesi yanında aşağıda belirtilen *in vivo* ve *in vitro* tedbirlerin alınması ile spermatozoon DNA'sında oluşabilecek muhtemel hasarların en aza indirgenmesi sağlanabilir.

1. *In vivo* önlemler

a) Özellikle insanlar için geçerli olan sigara ile ilgili olumsuz yan etkilerin giderilmesi için halkın bilgilendirilmesi gerekir. Bununla ilgili çalışmalarda

askorbik asitin insan spermatozoasında oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (36, 43).

b) İnsan ve hayvanlarda görülen varikozel için cerrahi tedavi önerilebilir veya özellikle hayvan yetiştiriciliğinde kalıtsal olduğu düşünülen vakalarda bu hayvanlar damızlık yetiştiriciliğinde kullanılmamalıdır.

c) Yaşla ilgili olarak yine yetiştiricilikte kullanılan damızlıklar zamanı geldiğinde genç nesillerle yer değiştirilmelidir.

d) Acrylonitrile (ACN), tamoxifen, cyclophosphamide (CP), styrene, acrylamide, demir intoksikasyonu ve cisplatin gibi genotoksik maddelerin kullanımının engellenmesi veya sınırlandırılması önerilebilir.

e) Özellikle kanser hastası olan insanlarda kemoterapotiklerin yan etkilerini azaltacak sağaltım çalışmalarına önem verilmelidir.

f) İnsan veya kaliteli damızlıklarda kemoterapiye başlamadan önce spermanın gerekirse daha sonra kullanmak için alınıp dondurulması tavsiye edilebilir.

g) Seminal plazma içerisinde antioksidan madde düzeyi azaldığında oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarı artmaktadır. Dolayısıyla antioksidan maddelerin alınması bu hasarın oluşumunu azaltabilir (43).

h) Yine fertilizasyondan sonra ovum içerisindeki tamir mekanizmaları sayesinde DNA hasarları nispeten tamir edilebilmektedir. Özellikle dişilerde ovumdaki tamir mekanizmasını bozabilecek maddelerin kullanılmasının sınırlandırılması faydalı olabilir.

2. *In vitro* önlemler

a) Spermayı kısa veya uzun süreli saklama sırasında yapılan işlemlerdeki hataları en aza indirmek için hayvan türüne uygun olan yöntemler geliştirilmelidir. Örneğin aygırlarda spermayı dondurmadan önce seminal plazmanın ayrılması faydalı bulunmuştur (84).

b) Kısa süreli saklama esnasında sperma içerisine antioksidan madde katılması muhtemel oksidatif stresi en aza indirmesine bağlı olarak DNA hasarının azaltılmasına yardımcı olacaktır (64).

c) Spermayı saklama sırasında kullanılan sulandırıcılar hayvan türünün spermasına zarar vermeyecek veya oluşabilen zararı en aza indirgeyecek nitelikte olmalıdır.

d) Sperma sulandırma oranı da hasarda etkili olduğu (4) için türe uygun şekilde sulandırma yapılmalıdır.

e) Spermayı dondurma işlemi esnasında sperması dondurulacak hayvanın türüne bağlı olarak uygun miktarda kryoprotektan madde konulmalıdır (74, 76).

KAYNAKLAR

1. Arıtürk E. Evcil Hayvanlar Genetiği. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:9, Ders kitabı:3, 1977.
2. Gözükara EM. Biyokimya 1. Evin Matbaası, İkinci Baskı, Malatya, 1994.
3. Ward WS. Deoxyribonucleic Acid Loop Domain Tertiary Structure in Mammalian Spermatozoa. Biol Reprod 1993; 48: 1193-1201.
4. Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, et al. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology 2005; 50: 144-153.
5. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in the mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 569-574.
6. Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J Reprod Fertil (Suppl) 1971; 13: 65-75.
7. Horak S, Polanska J, Widlak P. Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. Mutat Res Gen Tox En 2003; 537: 53-65.
8. Hamamah S, Royere D, Nicolle JC, et al. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: A comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. Reprod Nutr Dev 1990; 30: 59-64.
9. Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ, et al. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res-Fund Mol M 1997; 374: 261-268.
10. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril 2003; 80: 1420-1430.
11. Muralidhara KD. Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. Toxicology 2005; 206: 169-178.
12. Khyriam D, Prasad SB. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. Mutat Res-Fund Mol M 2003; 526: 9-18.
13. Baumber J, Ball BA, Linfor JJ et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl 2003; 24: 621-628.
14. Cabrita E, Robles V, Sarasquete MC, et al. Cryopreservation of gilthead sea bream *Sparus aurata* sperm. In: Proceeding of the International Congress of Aquaculture, 2-7 March, Hawaii, USA, 2004.
15. Zilli L, Schiavone R, Zonno V, et al. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. Cryobiology 2003; 47: 227-235.
16. Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, et al. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. Theriogenology 2004; 61: 1661-1673.
17. Leopardi P, Villani P, Cordelli E, et al. Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei on DNA damage induced in mice by oral exposure. Toxicol Lett 2005; 158:39-49.
18. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, et al. Sperm chromatin damage associated with male smoking. Mutat Res-Fund Mol M 1999; 423: 103-111.
19. Benchaib M, Braun V, Lornage J, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18: 1023-1028.
20. Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, et al. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. Fertil Steril 2001; 75: 186-192.
21. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod 2001; 16: 1191-1199.
22. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, et al. Integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000; 21: 33-44.
23. Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, et al. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of

- failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15: 1717-1722.
24. Morris ID, Ilott S, Dixon L, et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17: 990-998.
 25. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 313-318.
 26. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-607.
 27. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of sperm nuclear DNA damage on the fertility potential of couples with idiopathic and male-factor infertility. *Fertil Steril* 2002; 78: S61.
 28. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
 29. Gwo JC, Wu CY, Chang WS, et al. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo Lett* 2003; 24: 171-180.
 30. Ahmadi A, Sonn-Chye N. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284: 696-704.
 31. Zini A, Bielecki R, Phang D, et al. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-677.
 32. Pacifici R, Altieri I, Gandini L, et al. Nicotine, cotinine and *trans*-3- hydrocotinine levels in seminal plasma of smokers - effects on semen parameters. *Ther Drug Monit* 1993; 15: 358-363.
 33. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, et al. Effects of smoking on testicular function semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol* 1995; 154: 1030-1034.
 34. Vine MF, Tse CKJ, Hu PC, et al. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril* 1996; 65: 835- 842.
 35. Guerin JF, Benchaib M. Assays for assessment of sperm DNA integrity: relationships with fertility and conceptus quality. *Gynecol Obstet Fertil* 2004; 32: 799-802.
 36. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, et al. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res-Fund Mol M* 1996; 351: 199-203.
 37. Shen HM, Chia SE, Ni ZY, et al. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 675-680.
 38. Zenzes MT, Bielecki R, Reed TE. Detection of benzo (a) pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril* 1999; 72: 330-335.
 39. Gaspari L, Chang SS, Santella RM, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res-Gen Tox Env* 2003; 535: 155-160.
 40. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996;19: 323-337.
 41. Ginsberg GL, Atherholt, B. Transport of DNA-adding metabolites in mouse serum following benzo(a)pyrene administration. *Carcinogenesis* 1989; 10: 673-679.
 42. Fraser L, Strzezek J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; 42: 49-55.
 43. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga HJ, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003-11006.
 44. Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, et al. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1988; 50: 795-800.
 45. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 869-880.
 46. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
 47. Narendra PS, Charles HM, Richard EB. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420- 1430.
 48. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-1046.
 49. Farias SS, Casa VA, Vasquez C, et al. Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean Plain. *Sci Total Environ* 2003; 309: 187-199.
 50. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, et al. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2005 (in press).
 51. Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, et al. Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. *Mutat Res-Genc Tox Env* 2003; 537: 93-100.

52. Pagano G, de Biase A, Deeva IB, et al. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci* 2001; 68: 1735-1749.
53. Anderson D, Bishop JB, Garner RC, et al. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res-Fund Mol M* 1995; 330: 115-181.
54. Simula AP, Priestly BG. Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three in vivo assays. *Mutat Res-En Mut R S* 1992; 271: 49-58.
55. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, et al. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res-Rev Gen Tox* 1988; 195: 45- 77.
56. Hu J, Many Y, Ugnat AM. Paternal cigarette smoking, hard liquor consumption and the risk of childhood brain tumors: A case-control study in northeast China. *Acta Oncol* 2000; 39: 979-984.
57. Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P. A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum Reprod* 2002; 17: 1746-1754.
58. Pollard I. Substance abuse and parenthood: biological mechanisms—bioethical challenges. *Women Health* 2000; 30: 1-24.
59. Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, et al. Association of paternal diagnostic X-ray exposure with risk of infant leukemia. Investigators of the Childrens Cancer Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 645-653.
60. Ji BT, Shu XO, Linet MS, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 238-244.
61. Malaspina D, Corcoran C, Fahim C, et al. Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet* 2002; 114: 299-303.
62. Duty SM, Singh NP, Ryan L, et al. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod* 2002; 17: 1274-1280.
63. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, et al. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 2005; 63: 2006-2019.
64. Vishwanath R, Shannon P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 321-331.
65. Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76: 892-900.
66. Chung K, Irani J, Knee G, et al. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2004; 113: S7-S11.
67. Soler AJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, et al. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* 2005 (in press).
68. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res-Fund Mol M* 2000; 447: 249-256.
69. Alkan I, Simsek F, Haklar G, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 157: 140-143.
70. Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, et al. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 41-47.
71. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, et al. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 2004; 70: 518-522.
72. Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonine-glutamine-tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Reprod* 2003; 68: 1291-1298.
73. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 659-668.
74. Morris GJ. Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections, Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge (England) 1981.
75. Christensen JM, Tiersch TR. Cryopreservation of channel catfish sperm: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. *Theriogenology* 2005; 63: 2103-2112.
76. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62: 3-22.
77. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod* 2004; 19: 932-939.
78. Shen HM, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 529-536.
79. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by

- the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993;53: 1945-1951.
80. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; 16: 80-87
81. Shen HM, Chia SE, Ni ZY, et al. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 675-680.
82. Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, et al. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. *Cryobiology* 2003; 46: 43-52.
83. Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol App Pharmacol* 2005; 202: 189-198.
84. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63: 2372-2381.

Yazışma Adresi: Gaffari TÜRK, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama. Anabilim Dalı, 23119 Elazığ-TÜRKİYE
Tel: 0 424 237 00 00-4084 e-posta: gturk@firat.edu.tr
