



## Spermatozoon'da Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti

Deniz YENİ<sup>1</sup>  
A.Fatih FİDAN<sup>2</sup>  
Mustafa GÜNDOĞAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe  
Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Dölerme ve Sun'i  
Tohumlama Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe  
Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar, TÜRKİYE

Hayvanlarda en önemli verim döl verimidir. Özellikle DNA hasarı infertilitede çok önemli bir faktördür. Bununla birlikte pek çok türde spermatozonda DNA hasarı görülmektedir. DNA hasarı spermatozoon kalitesindeki azalmadan dolayı implantasyon öncesi embriyo ölümlerine ve anormal embriyo gelişimine neden olabilmektedir. Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA'da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Spermatozonda DNA hasarının değerlendirilmesi, biyoteknolojik yenilikler başta embriyo transferi ve in vitro fertilizasyon gibi pek çok metot olmak üzere bazı fertilitite problemlerinin çözümünde veya arzulanan yetiştirme ve sun'i tohumlama programları üzerinde önemli bir rol oynar. Bu makalede, yapılan son araştırmalar ışığında spermatozoon DNA hasarı üzerine etkili bazı faktörler ve hasarın belirlenmesinde kullanılan basit hücre jel elektrofrezisi tekniği hakkındaki bilgiler derlenmeye çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Spermatozoon, DNA hasarı, tek hücre jel elektrofrezisi.

### The Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) in Sperm DNA Damage Evaluation

One of the most important efficiency is fertility in animals. Especially DNA damage is important factor in fertility. However sperm DNA damage has been shown in many species. Decreasing in spermatozoa quality and also death embryo prior to implantation time and abnormal embryonic development can be caused by sperm DNA damage. Sperm DNA damages have occurred in the sperm DNA at different levels due to various endogen and exogen reasons. Evaluation of spermatozoon DNA damage leads to improve many techniques among the biotechnological innovations may either solve some problems of fertility, especially in embryo transfer and in vitro fertilization or plays an important role on the desired breeding and artificial insemination programs. In this article, the effects of some factors on spermatozoon DNA damage and the use of the single cell gel electrophoresis technique in the damage determination are presented in the lighting of the related recent researches.

**Keywords:** Spermatozoon, DNA damage, single cell gel electrophoresis.

### Giriş

Spermatozoonların genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi in vitro ve in vivo gerçekleştirilen birçok çalışmada (1-4) ortaya konmuştur. Nitekim, hasarlı DNA taşıyan spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetinin azaldığı ve DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma oranının da azalabileceği bildirilmektedir. Ayrıca intrasitoplazmik sperm enjeksiyon (ICSI) tekniğinde, hasarlı DNA'nın fertilizasyonu önlemeyeceği ve neticede bu hasarlı genetik materyali taşıyan embriyoların oluşabileceği bildirilmektedir. Bu nedenle ejakulatta DNA hasarlı spermatozoon oranının bilinmesi gerek fertilizasyonun önceden tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği durumların belirlenmesinde önem kazanmaktadır.

**DNA Hasarı:** Genetik olayların moleküler düzeydeki temeli genetik materyal görevini üstlenen nükleik asitlerin yapı ve özelliklerine dayanır. Nükleik asitlerin iki türü olan deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) temelde aynı yapısal özelliklere sahiptir. DNA sadece kalıtsal bilgiyi taşıyan makro moleküller olmayıp bu bilgiyi protein sentezine aktarmaktan da sorumludur (5). DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır (6). DNA üzerinde kendiliğinden değişimler sonucu veya çevresel etmenler sonucu hasar meydana gelebilmekte, oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından giderilmekle birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar mutasyona veya hücre ölümüne neden olmaktadır (7).

Kendiliğinden değişimler sonucu oluşan DNA hasarının nedenleri arasında; DNA sentezi sırasında bazların yanlış eşleşmesi, purin ve pirimidin bazların ketoenol tautomerizm ve deaminasyon sonucu kimyasal yapısında gelişen değişimler, DNA yapısında bulunan purin ve pirimidin bazlarının termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik

### Yazışma Adresi Correspondence

Deniz YENİ  
Afyon Kocatepe  
Üniversitesi, Veteriner  
Fakültesi, Dölerme ve  
Sun'i Tohumlama  
Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar -  
TÜRKİYE

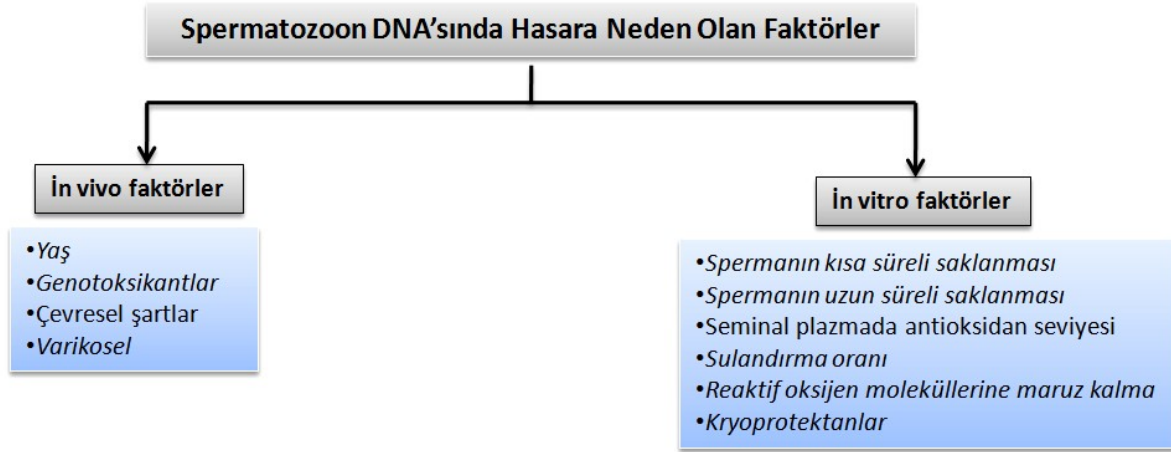
dyeni@aku.edu.tr

Geliş Tarihi : 10.09.2008  
Kabul Tarihi : 08.05.2009

baz kaybı ve hücrel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarları önemli yer tutmakta olup çevresel hasar ise fiziksel ve kimyasal hasar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. DNA'nın bütünlüğünü bozup ve farklı DNA hasarlarının oluşmasına neden olan fiziksel etkenler arasında ultraviyole ve X-ışınları önemli yer tutmaktadır (7-9). DNA hasarlarının oluşmasına neden olan kimyasal ajanlar içinde, çevresel mutajen ve karsinojenlerin en geniş grubu olan ve çeşitli gıda maddelerinde, anti-tümöral ilaçlarda ve tütünde bulunan alkilleyici maddeler, fotoaktive olmuş psoralenler gibi çapraz bağlayıcılar ve ksenobiotikler gibi elektrofilik reaktanlara metabolize edilebilen kimyasallar yer almaktadır (7).

Hücre, DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olabilmektedir (8, 10).

**Spermatozoon DNA'sı Hasarı:** Spermatozoon DNA'sı somatik hücre DNA'sından 6 kat daha yoğunluğa ve 40 kat daha az hacme sahiptir. Bu yoğun yapı ve DNA'nın spesifik şekli, DNA ve protaminler arasındaki disülfid bağları ile sağlanmaktadır. Spermatozoon DNA'sının koruyucu özellikteki bu şekli dışında spermatozoonun içinde bulunduğu seminal sıvı yüksek antioksidan seviyeleri içerir (11). Ayrıca, spermatozoonun DNA hasarlarını tamir etme kapasitesine sahip endonukleaz aktivitesi içerdiği de bilinmektedir (12). Bunun yanında DNA hasarlı spermatozoonun yetersiz ya da yanlış tamiri yeni genetik mutasyonların gelişmesi ile de sonuçlanabilir (13). Spermatozoon DNA'sı hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilmiş olmasa da (14), spermatozoonun Şekil 1'de görüldüğü gibi pek çok nedene bağlı olarak DNA hasarı meydana gelebilmektedir (15). DNA hasarı geçiren spermatozoon sonuçta tamir olabileceği gibi tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalabilir ve spermatogenezis bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması) ya da ölür (14).



**Şekil 1.** Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden olan faktörler (15).

İnflamasyon, apoptoz ve oksidanların (serbest oksijen türevleri, ROS) spermatozoonun kromatinin kondanse hale geçmesini engellemektedirler. Kromatinde yeterli kondensasyon gelişmez ise spermatozoon DNA'sı da kırık gelişmesine daha hassas hale gelmektedir (14). Spermatozoonun DNA hasarına neden olan etkenlerin arasında en etkili olanları, süperoksit anyon ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleridir. Spermatozoonun metabolik aktivite için gerekli enerjinin büyük bir kısmını glikoliz olayından karşılamalarına rağmen, yüksek aerobik aktiviteleri için, fertilizasyon olayına katılan reaktif oksijen türlerinden (ROS) yararlanır. ROS yüksek reaktivite ile karakterize olup, orbitallerinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron bulundurmaları diğer moleküllerle kovalent bağ kurmalarını sağlar. Aitken ve ark. (16)'nın insanlarda

yaptıkları bir çalışmada ROS'un miktarı ile sperma miktarı arasında ve spermatozoonun ileri hareketliliği ile ROS seviyesi arasında ters bir orantı olduğunu bildirmektedirler. Yine, ROS'un sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin apoptozisini hızlandırmakta ve spermatozoon sayısının azalması ile ilgili olarak, fertilitate olumsuz etkilenmektedir (17).

DNA'nın parçalanması ile gerçekleşen programlı hücre ölümü yani apoptozis, vücutta bulunan bütün dokuların normal fonksiyon görebilmesinde önemli bir rol oynar. Apoptozis organların sağlıklı fonksiyon görebilmeleri için doğal olarak meydana gelebildiği gibi, hormonal faktörler, ROS, çevresel toksinler gibi faktörler tarafından da uyarılabilmektedir. Spermatozoa için de aynı durum geçerli olup infertilite nedeni olarak bilinen çoğu faktör spesifik mekanizmalarla apoptoza yol

açar (14). Sun'i tohumlamada önemli yer tutan spermanın kısa ve uzun süreli saklanması işlemleri DNA hasarına ve dolayısıyla anormal embriyo gelişimine ve infertiliteye neden olabilmektedir (18). Sonuçta infertilite olgularında spermatozoon DNA'sı hasarlarının önemli bir faktör olabileceğinden, DNA hasarlı spermatozoon oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının önceden tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır.

**Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE):** Son 20 yılda DNA hasarlarını belirleyebilen yeni metotların araştırılmasıyla belli bir düzeye gelinmiştir (19). DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan "Tek Hücre Jel Elektroforezi" (SCGE) hassas, basit ve hızlı bir görsel floresan tekniğidir (20). Teknik, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok alanda kullanılmakta olup "Single Cell Gel Electrophoresis", "Comet Analiz" ya da "Microgel Electrophoretic Technique" olarak da adlandırılmaktadır (19, 20).

DNA'nın kısmi olarak çözünmesine izin veren hafif alkali koşullar altında preparat üzerindeki agarozda hücrelerin lizis edilmesi ve gömülmesi ile bu hücrelerdeki DNA hasarını ilk belirleyenlerin Rydberg ve Johanson olduğu bildirilmektedir (6, 19). Nötralizasyondan sonra akrinin oranı ile DNA'yı boyamışlar ve DNA'daki hasarın boyutunu fotometre ile yeşil floresansın (çift zincir kırıklarını gösteren) kırmızı floresansa (tek zincir kırıklarını gösteren) oranı olarak belirlemişler ancak bu teknik çok yaygın olarak kullanılmamıştır (6, 19).

İlerleyen zaman içerisinde hücrelerdeki DNA hasar tespitinde duyarlılığı geliştirmek için 1984 yılında Ostling

ve Johanson tarafından nötral teknik modifiye edilerek hücredeki DNA hasarının direkt gösterilmesinde "Microgel Electrophoretic Technique" olarak sunulmuştur (21). Bu uygulamada agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreler lam üzerine yayılarak, yüksek tuz ve deterjanla lize edilmiş ve ardından elektroforeze tabi tutulduktan sonra DNA bağlayıcı floresan boya olan akrinin oranla boyanmışlardır (21). Sonuçta kırık içeren DNA'ların gevşediğini, kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazandığını ve çekirdekten anota doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermesinden dolayı hasarlı hücreleri "COMET" olarak adlandırmışlardır. Yine kuyruk uzunluğu DNA hasarını saptamak için ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun bir fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (22).

Ancak bu teknik sadece DNA çift dal kırılmalarının belirlenmesine imkan vermektedir (19). Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından ziyade DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır (23). Bu nedenle "Alkalın Comet Metodu" 1988 yılında tanımlanmıştır. Böylece "tek sarmal kırıkları" denilen ve sadece alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkanı doğmuştur (6, 19, 20). Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95'inden fazlasını yok edebilmekte böylelikle tekniğin yeni dizaynı hücrelerin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün doğrudan tespitine olanak sağlamaktadır.

Elektroforez ve lizis aşamalarının pH'sına bağlı olarak tekniğin duyarlılığı değişebildiğinden nötral ve alkalin lizis solüzyonları sırasıyla çift ve tek sarmal kırılmalarını belirlemek için kullanılmaktadır (Tablo1) (19, 24).

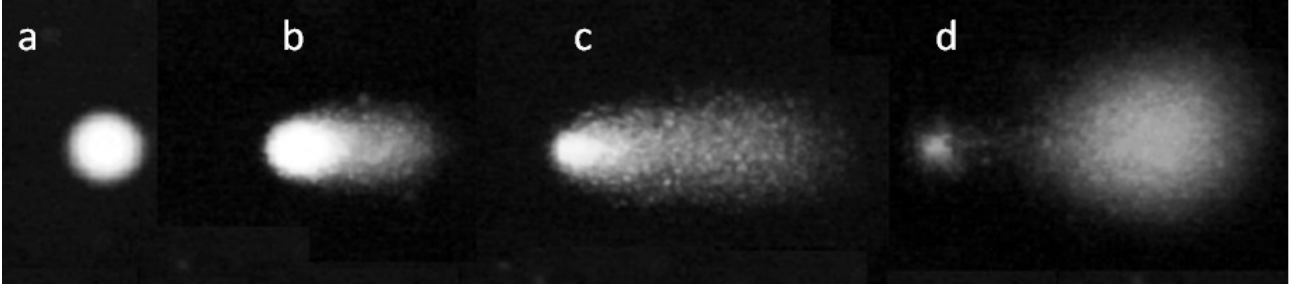
**Tablo 1.** SCGE yöntemiyle farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri (24).

pH:7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

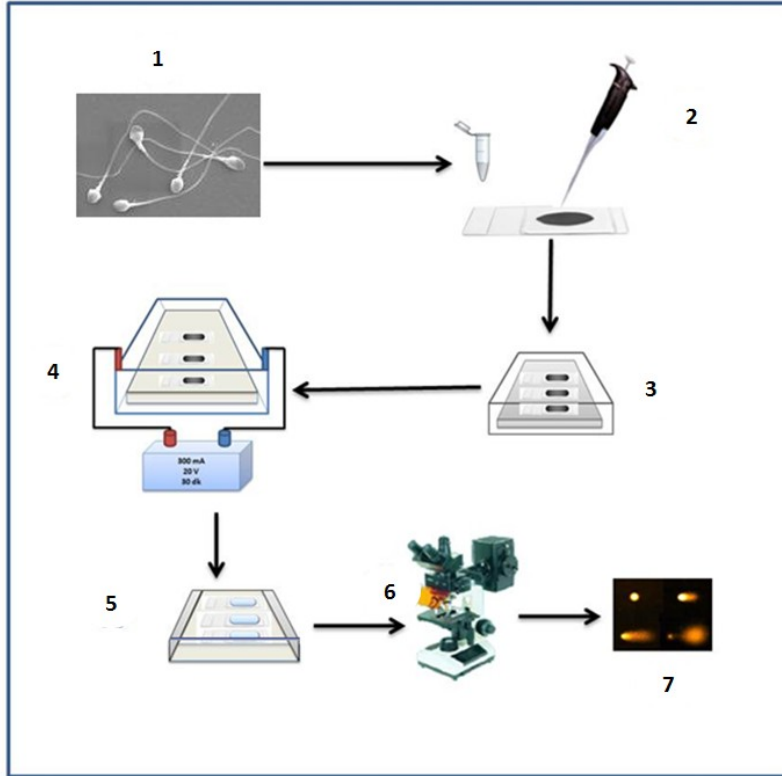
**Spermatozoon DNA'sı Hasarının Tespitinde Alkali SCGE Tekniğinin Uygulanması:** Geçmiş yıllarda SCGE tekniği birkaç değişikliğe uğrasa da temelini teşkil eden prensipler nötral ve alkalin versiyonlara dayanmaktadır (19). Teknik kısaca, alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Spermatozoon lam üzerinde agarozda gömülür. Yüksek tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonunda membranların parçalanarak protein bağları çözülür ve spermatozoon DNA'sı açığa çıkarılır. Daha sonra DNA'ların elektroforez de yürütülmeleri esnasında hasarsız DNA'lar kuyruk yani comet oluşturmazken

hasarlı DNA'ların fragmentleri oluşan hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluşturmaktadırlar (Şekil 2). Floresan boyama sonucunda elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilip DNA hasarı hakkında bir kanı oluşturulur (25-27).

Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuvar koşullarına göre farklılık göstermekle beraber spermatozoon DNA'sında oluşan hasarın tespit edilmesi amacıyla uygulanan SCGE yöntemi değişik aşamalardan oluşmaktadır (Şekil 3).



Şekil 2. a: Normal DNA, b, c, d: Hasarlı DNA (Comet) (6)



Şekil 3. SCGE Yönteminin Genel Aşamaları 1: Sperma süspansiyonunun hazırlanması, 2: Slaytların hazırlanması ve spermatozoonların agaroz gömülmesi, 3:Lizis, 4:DNA sarmalının çözülmesi ve Elektroforez, 5: Nötralizasyon ve Boyama, 6-7: Hasarlı ve Hasarsız DNA Görüntülerinin elde edilmesi ve Değerlendirme

#### Sperma Süspansiyonunun Hazırlanması:

Hücrelerdeki DNA hasarını tespit etmek amacıyla uygulanan SCGE yönteminde, değerlendirilecek hücreler, hücreler arası ayırma imkân sağlayacak bir şekilde süspansiyon edilmelidir. Bir klinik örnekten ya da canlıdan alınan hücrelerde DNA hasarının ölçülmesindeki asıl olay örneklerin ekstra hasara veya ilave bir onarıma imkan vermeksizin işlenmesi ve izole edilmesidir (19, 28). Bu nedenle alınan ejakulat en geç 30 dk. içerisinde polipropilen bir tüpe alınıp havayla teması önlenerek karanlık ortamda ve soğuk zincirde korunmalıdır (25). Sperma phosphate buffered saline (PBS) ile iki kez yıkanarak aynı koruyucu önlemler altında çalışmanın bir sonraki aşamasına hazır hale getirilmektedir (15).

#### Slaytların Hazırlanması ve Spermatozoonların

**Agaroz Gömülmesi:** SCGE yönteminde slaytlar tek agaroz tabakalı ya da daha yaygın olarak kullanılan 3 tabakalı sandviç yöntemleri ile hazırlanır. Tek tabakalı yöntemde hücreler düşük donma sıcaklığına sahip agaroz gömüldükten sonra buzlanmış lam üzerine yayılır. Üç tabakalı sandviç yönteminde ise hücreler orta katmandaki düşük donma dereceli agaroz gömülürler. Tabaka hazırlamada yeterli manipülasyon kabiliyeti ve analiz boyunca jellerin lam üzerinde donmuşluğu korunabilmelidir (19). Bu nedenle spermatozoon DNA hasarı tespitinde sandviç modelinin uygulanması manipülasyon kolaylığı bakımından tercih edilmektedir.

Yöntemde 10x PBS içerisinde hazırlanan % 0.75'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) jelden 100 µl alınarak tamamen buzlanmış ya da etrafları buzlanarak çerçeve oluşturulmuş lam üzerine damlatılarak froti şeklinde yayılır ve katılaşması için oda sıcaklığında bekletilir (6). Etkili bir analiz için hücrelerin dilüsyonu ve agarozun yoğunluğu önemlidir (19). Bu nedenle 10 µl PBS içinde yaklaşık 100.000 spermatozoa olacak şekilde sperma solüsyonunun dilüsyonu sağlanmalıdır (25). Daha fazla hücre kullanılırsa oluşan görüntünün analizi zorlaşabilmektedir (19). Dilüye edilen süspansiyondan 10 µl alınarak 80 µl % 0,5-1 oranında düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) jel ile (37 °C) karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılır lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için bekletilir (24-26). Üçüncü tabakadaki agaroz oranı jel boyutuna bağlı olarak değişebilir. Bu amaçla % 0,5-1 konsantrasyonda LMA ikinci tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlanır (19, 26).

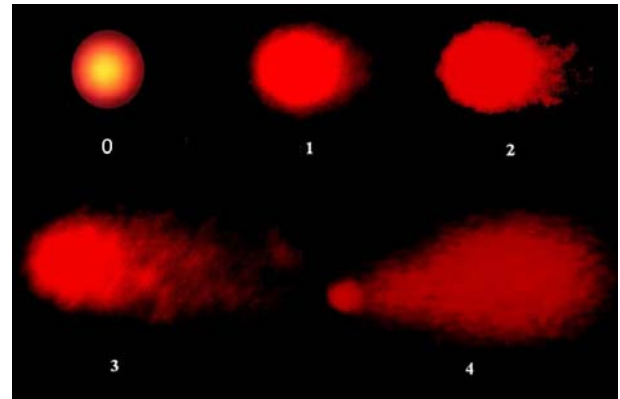
**Hücre Lizisi:** Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmakta olup spermatozoonlar lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonunda (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 ve 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), pH 10) yaklaşık 1 saat süre ile inkübe edilir (6, 27, 29). Bir saat sonunda soğuk lizis solüsyonundan çıkarılan slaytlar 4 saat süre ile 37°C de 100 µg/ml proteinase K içeren lizis solüsyonunda tekrar inkübe edilerek hücrelerin lize olup DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalması sağlanmış olmaktadır (26, 30).

**DNA Sarmalının Çözülmesi ve Elektroforez:** SCGE yönteminde, DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez süresi, çalışılmakta olan hasar ile incelenmekte olan hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir (19). Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar elektroforez tamponunda 20-30 dk. arasında inkübasyona bırakılırlar (26). Bu inkübasyon döneminin amacı yüksek yoğunluklu tuzlu lizis solüsyonun DNA ile bir elektrotmuş gibi mücadele ettiği tabakadaki agardan ayrılmasını sağlamaktır (19). Agaroz gömülü spermatozoonların elektroforez tamponunda (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 12.5) inkübasyonu tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 250 mA ve 12 volt'luk elektriksel alanda (0.714 V/cm) minimal ışık altında 20 dk. yürütülür (25, 26). Mikroskopik deneylerde DNA'nın yalnızca 1mm oranında ilerlemesinin comet formasyonu için yeterli olduğu bildirilmektedir (19).

**Nötralizasyon ve Boyama:** Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için, slaytlar taze hazırlanmış Tris tamponuyla (40 mM Tris, pH 7.4) 3 kez yıkanarak nötralizasyon sağlanır (25, 26). Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slaytlara floresan boya tatbik edilerek DNA'lar boyanır. Görsellik için kullanılan DNA'yı tespit eden boyayla ilgili tekniğin son adımı, büyük

ölçüde araştırmacının ihtiyaçlarına dayanır ve çalışmanın duyarlılığında çok az etkisi vardır. Daha çok kullanılan boya ethidium bromid, propidium iyodid, dihydrochloride ve YOYO-1 dir (19, 26, 30).

**Hasarlı ve Hasarsız DNA Görüntülerinin Elde Edilmesi ve Değerlendirme:** Floresan boya ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirilerek hasar düzeyi hakkında bir kaniya varılır (6). Bu nedenle SCGE yönteminde sonuçların değerlendirilmesi için farklı teknikler kullanılmaktadır. Kullanılan en yaygın kriterler; kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranıdır. Gelişmiş teknolojik imkanlara sahip olmayan laboratuvarlarda hasarlı hücreler görsel skorlama yöntemi ile subjektif olarak değerlendirilmektedir (31). Teknikte hasarsız hücrelerin incelenmesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümüdür. Hücrelerin bu görünümü göç etmemiş olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise göç uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik göstereceğinden, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçmesi nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama oluşur. Bu görünüme "gerilmiş (stretch) ya da düşük dereceli göç (low migration)" adı verilmektedir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız comet, yüksek dereceli göç (high migration) şeklini alır. Son aşama ise apoptozistir. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir (22). Fakat bu yaklaşım hasarlı hücreler arasındaki tahribatın büyüklüğü hakkında bilgi vermekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hasarlı hücreler, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırılır (19). Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre Şekil 4'de görüldüğü gibi 1 den 4'e kadar puanlandırılır ve sonuçlar görsel skorlama (AU) ile değerlendirilir (29, 32).



**Şekil 4.** Görsel Skorlama Tekniği (AU) İle Hücrelerin Sınıflandırılması (0:Hasarsız DNA Görüntüsü, 1-4: Hasarlı DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanması) (6)



Gelişmiş laboratuarlarda sonuçların değerlendirilmesinde kameralı bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi çeşitli comet parametreleri özel bilgisayar yazılımları kullanılarak başarılı ve objektif olarak değerlendirilebilmektedir (20, 33, 34). Son yıllarda değerlendirmede Laser-scanning microscopy (LSM) teknolojisi kullanılarak DNA sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla tespit edilmektedir (19, 20).

Canlı popülasyonlarının genetik bütünlüğü, bir çok genotoksik ajan, yaşam biçimi, çeşitli tıbbi tedaviler, iklim değişiklikleri ve bir çok stres faktörü nedeniyle giderek

artan bir baskı altında olduğundan DNA hasarlı spermatozoon oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde ve gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır. Ayrıca yardımcı üreme tekniklerinden IVF, ICSI uygulaması ve ticari sperma üretiminden önce DNA hasarının varlığının araştırılması zorunluluk haline gelmiştir. Sonuç olarak, SCGE tekniği, spermatozoon DNA'sında oluşabilecek hasarların ölçümünde; tek veya çift sarmal DNA hasarlarının ayrı ayrı görülebilmesi, düşük bir bütçe ile yürütülerek verilerin hızlı, hassas ve etkili olarak elde edilebilmesi gibi avantajlarından dolayı giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulacaktır.

## Kaynaklar

1. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14(4): 1039-1049.
2. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73(1): 43-50.
3. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69(3): 528-532.
4. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284(6): 696-704.
5. Sözbilir Bayşu N, Bayşu N. *Biyokimya*. 1. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2007.
6. Fidan AF. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Diyete Katılan Farklı Yapılardaki Saponin İçerikli Bitkilerin DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu ve Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkilerinin Araştırılması (Doktora Tezi), Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1, 2007.
7. Dinçer Y, Akçay T. DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2000; 25 (2): 73-79.
8. Müftüođlu M, DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2003; 28(1): 20-24.
9. Balajee AS, Bohr VA. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 2000; 250(1-2): 15-30.
10. Bohr VA. DNA Repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2885-2892.
11. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80(6): 1420-1430.
12. Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *Cell Biol* 1997; 16(9): 1087-1097.
13. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987; 327: 77-79.
14. Aydos K. Sperm DNA hasarlarının fertilizasyon üzerine etkileri ve infertilitede önemi. [http://www.androloji.info/DNA\\_hasari.php](http://www.androloji.info/DNA_hasari.php) 01.11.2007.
15. Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *F Ü Sađ Bil Derg* 2006; 20: 85-95.
16. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *BioEssays* 1994; 16: 259-267.
17. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
18. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-677.
19. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 277(1-2): 225-254.
20. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill, KL. The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Res* 1995; 339: 37-59.
21. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 123: 291-298.
22. Ertürk Ş. Sevofloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, 2001.
23. Ünal Y. Radyoterapi Gören Kanserli Hastalara Ait Kan Lenfositlerinde DNA Hasarının Comet Assay Tekniği İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.
24. Baltacı V, Oligospermi ve Azospermi Olgularında Sperm Hücrelerinde DNA Hasarının Comet Tekniği İle Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2003.
25. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility* 2003; 80: 1420-1430.
26. Verit FF, Verit A, Kocyigit A, et al. No Increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stres in patients with

- idiopathic infertility. Arch Gynecol Obstet 2006; 274: 339-344.
27. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; (175): 184-191.
  28. Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, et al. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. Environ Mol Mutagen 1994; 24: 23-45.
  29. Horoz M, Bolukbas C, Bolukbas F, Kocyigit A, et al. Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2006; 596(1-2): 137-142.
  30. Singh, NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int J Radiat Biol 1994; 66: 23-28.
  31. Kobayashi H, Sugiyama C, Morikava Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparasion between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. MMS Commun 1995; 3: 103-115.
  32. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair principles, applications and limitations. Molecular Biotechnology 2004; 26: 249-261.
  33. Gamlı M. Anestezik Maddelere Maruz Kalan Ameliyathane Çalışanlarında Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay) Tekniği ile Kromozom Kırıklarının Tespiti. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Ankara Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, 1997.
  34. 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.