

T.C.MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DONDURULMUŞ SAZAN SPERMA HÜCRELERİNDE
DNA HASARININ TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ
(COMET) YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZLI YILDIRIM

OCAK 2016

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

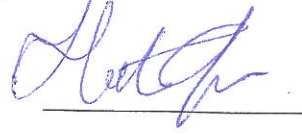
TEZ ONAYI

NAZLI YILDIRIM tarafından hazırlanan **DONDURULMUŞ SAZAN SPERMA HÜCRELERİNDE DNA HASARININ TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ (COMET) YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ** başlıklı tezinin, 14.01.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (**Jüri Başkanı**)
Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. İhsan ÇELİK (**Üye**)
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale

İmza:



Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN (**Danışman**)
Su Ürünleri Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK
Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN
Danışman, Su Ürünleri Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 14/01/2016

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Nazlı YILDIRIM

14/01/2016



ÖZET

DONDURULMUŞ SAZAN SPERMA HÜCRELERİNDE DNA HASARININ TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ (COMET) YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Nazlı YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN

Ocak 2016, 41 sayfa

Spermanın dondurularak uzun süreli muhafazasında ve çözüm sonrası düşük fertilizasyon oranlarının sebeplerinin araştırılması açısından bu çalışma önem taşımaktadır. Araştırmada İzmir DSİ Ürkmez Su Ürünleri Üretim Tesisinden temin edilen balıklar (*Cyprinus carpio*) kullanılmıştır. Yapılan çalışmada; dondurulmuş sazan balığı spermasının çözüm sonrasında tek hücre jel elektroforezi yöntemi ile DNA hasarı araştırılmıştır. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji Laboratuvarı'nda, 2-3 yaş arasındaki 3 erkek sazan balığından alınan sperm örnekleri havuzlanarak dondurulmuştur. Numunelerin çözüm sonrası tek hücre jel elektroforezi yöntemi ile DNA hasarı analiz edilmiştir. Comet metodunda hücreler floresan mikroskobunda incelenerek DNA hasarının düzeyi belirlenmiştir. Yapılan analizlerde dondurulmuş sperm DNA'sının ortalama % $31,8 \pm 2,8^a$ oranında hasara uğradığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada üç farklı comet tekniği uygulanmıştır. Bu tekniklerden pratik olarak en uygun olanı (Singh vd., 1998) balık spermasına göre optimize edilmiştir. Böylece çalışma prensibi açısından kolay bir yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte zamandan ve kullanılan kimyasallardan da tasarruf edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 3 ayrı metod arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenerek, varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Metotlara göre DNA hasarsız ve hasarlı hücre dağılımları incelenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P < 0,05$).

Anahtar Kelimeler: DNA, DNA Hasarı, COMET Analizi, Tek Hücre Jel Elektroforezi, Kryoprezervasyon, Sperm Muhafazası

ABSTRACT

DETECTION OF DNA DAMAGE OF FROZED CARP SPERM CELLS WITH SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS (COMET)

Nazlı YILDIRIM

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih ÖĞRETMEN

January, 41 pages

This study is important in the terms of long term cryopreservation of sperm and evaluating the reasons of low fertility rates after thawing. In this study, the fishes (*Cyprinus carpio*) which obtained from İzmir DSI (the general directorate of state hydraulic works) Ürkmez aquaculture production facility were used. In this study, the DNA damage of frozen and thawed carp sperm cell has been investigated with single cell gel electrophoresis method. Sperm samples obtained from 3 common carp males between 2-3 ages were frozen in Muğla University Biology Department Hydrobiology Laboratory. Samples were analyzed with single cell gel electrophoresis after thawing. In this method, cell samples were observed by fluorescent microscopy and DNA damage level were determined. Analysis showed that the frozen sperm DNA damaged about $31 \pm 2,8^a$.

Three different comet techniques were applied in this study. Between these techniques, practically the most convenient one was optimized for fish sperm cells. In this way, in terms of the operation principle, a basic method improved, time and chemical usage were reduced. Statistical differences were evaluated between used 3 different method with variance analysis (ANOVA). Distributions of damaged and undamaged cells were examined according to methods. It was determined that there is no statistical difference between groups ($P < 0,05$).

Keywords: DNA, DNA Damage, Comet Analysis, Single Cell Gel Electrophoresis, Cryopreservation, Sperm Storage.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkıları ve göstermiş olduğu destekten ötürü başta tez danışmanım Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN'e,

Laboratuar çalışmalarım sırasında ve tez yazım aşamasında her türlü destekte bulunan ve yardımcı olan değerli hocam Dr. Burak Evren İNANAN'a,

Yapmış olduğum çevirilerde bana destek olan yüksek lisans öğrencisi, sevgili Ekin DEMİRKAYA'ya, tez yazım aşamasındaki yardımlarından ötürü yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Mustafa DÖNDÜ'ye, her koşulda manevi destekte bulunan ve pozitif bakış açısıyla beni cesaretlendiren değerli arkadaşım Sercan BÖYÜKALAN'a

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen ve beni bugünlere getiren başta annem olmak üzere tüm aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL VE METOD.....	14
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	14
3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	14
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	15
3.2. Anaç Temini ve Sperm Sağımı	15
3.3. H ₂ O ₂ ile Negatif Kontrol Grubunun Oluşturulması	16
3.4. Sperm Kryoprezervasyonu.....	16
3.5. Comet Analizi	17
3.5.1. Slaytların hazırlanması	19
3.5.2. Lizis aşaması.....	20
3.5.3. DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez	21
3.5.5. DNA boyama	22
3.5.6. Comet şekil analizi	22
4. BULGULAR.....	26
4.1. DNA Hasarsız ve Farklı Derecedeki Hasarlı Örneklerde 3 Farklı Metodun Değerlendirilmesi.....	26
4.2. Kryoprezervasyon Sonrası Hasarlı ve Hasarsız Örneklerde Metodların Karşılaştırılması	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.2. Farklı metodlara göre temel SCGE metodolojisi.....	19
Çizelge 4.1. Lizis solüsyonuna eklenmiş farklı seviyelerdeki H ₂ O ₂ ile (kryoprezervasyon uygulanmamış hücrelerde) elde edilen DNA hasarı oranları (%) [Singh ve ark., 1988, Cabrita ve ark., 2005, Shen ve Ong, 2000].....	27
Çizelge 4.2. Kryoprezervasyon uygulanmış hücrelerin farklı comet metodlarına göre DNA hasarı oranları (%)	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Normal ve hasarlı hücrelerde comet deneyinin yapılışı (Başaran, 2002)	4
Şekil 3.1. Sperma sağımı.....	16
Şekil 3.2. Payetlerin kademeli olarak dondurulması.....	17
Şekil 3.3. Comet analizinin aşamaları (Fidan, 2008)	18
Şekil 3.4. Slaytların yayma preparat yöntemiyle hazırlanması.....	20
Şekil 3.5. Lamların adaptasyon için elektroforez tankında bekletilmesi	21
Şekil 3.6. Slaytların elektroforez tankına yerleştirilmesi ve elektroforez.....	22
Şekil 3.7. Flouresan mikroskopta örneklerin incelenmesi	23
Şekil 3.8. Comet değerlendirilmesinin yapıldığı flouresan mikroskoptan genel görüntüler.....	23
Şekil 3.9. Comet görüntülerinin bilgisayar yardımıyla görüntülenmesi (Fidan, 2008)	24
Şekil 3.10. DNA hasarı seviyesinin belirlenmesi (Başaran, 2002).....	24
Şekil 3.11. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. O- Hasarsız DNA; 1-Çok az hasarlanmış DNA; 2-Az hasarlanmış DNA; 3-hasarlanmış DNA; 4- tümüyle hasarlanmış DNA (Büyütme 40x).....	25
Şekil 4.1. Kryoprezervasyon uygulanmış örneklerin farklı comet metodlarına göre DNA hasarsız ve hasarlı hücre dağılımları	28

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µm	Mikrometre
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
Cl ⁻	Klor İyonu
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
K ⁺	Potasyum İyonu
KCl	Potasyum Klorür
kg	Kilogram
L	Litre
mA	Miliamper
Max	Maksimum
mg	Miligram
Mg ²⁺	Magnezyum İyonu
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Hepta Hidrat
Min	Minumum
mM	Milimolar
mm ²	Milimetre Kare
mOsm	Miliosmol
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Dihidrojen Fosfat

NaHCO_3	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
N	Normal
Na^+	Sodyum İyonu
Ppt	Trilyonda Bir
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
V	Volt

1. GİRİŞ

Günümüzde yapılan yoğun çalışmalarla önemli hale gelen spermatozoon deoksiribonükleik asit (DNA)'inde meydana gelen hasarlar, fertilizasyonu ve embriyonal yaşamdan ölüme kadar olan evreyi olumsuz yönde etkilemektedir.

Sperm kalitesi aynı zamanda spermatozoanın yumurtayı dölleyebilme kapasitesinin bir göstergesidir. Erkek balıklarda bu durum Üreme mevsimi boyunca erkek damızlıklar tarafından farklı kalitede sperma üretilmektedir. Bunun nedeni erkek balıkların üreme stratejilerine ve fiziksel ortamlarına bağlı olarak birbirleriyle devamlı bir yarış içinde olmalarıdır. Balık kültüründe, gerek düzenli bir seleksiyon programının uygulanmaması ve gerekse erkek damızlıkların sperm kalitesi incelenmeden çok sayıda yumurtanın döllenen istenmesi nedeniyle bol miktarda sperma ve yumurta ziyan edilmesi gibi önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle istenilen niteliklere sahip olmayan çok sayıda erkek ve dişi damızlıklar tüm sene boyunca işletmede tutulmasıyla önemli düzeyde ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Sperma kalitesinin bilinmesi, iyi kalitede sperma kullanılarak yüksek döl verimi elde edilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Buna bağlı olarak; spermatolojik özelliklerden herhangi birinde meydana gelen olumsuzluk döllemeyi doğrudan etkilemektedir. Kısır olan erkek damızlıkların işletmeden çıkarılması ile önemli bir ekonomik kazanç elde edilmektedir (Seçer vd. 2004).

Birçok nedene bağlı olarak DNA üzerinde sürekli hasar oluşmaktadır. Hasarın bir kısmı organizmanın kendine özgü tamir mekanizmaları tarafından onarılmaktadır. Bu hasar ve onarım arasındaki dengenin bozulması sonucunda; (hasar nedenlerinin çoğalması ve onarım mekanizmalarındaki aksaklıklar nedeniyle) fertilizasyon kapasitesinde azalma, spermatozoon genom bütünlüğünde bozulma ve mutasyonlar meydana gelmektedir. 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 (Akal ve Selçuk 2011).

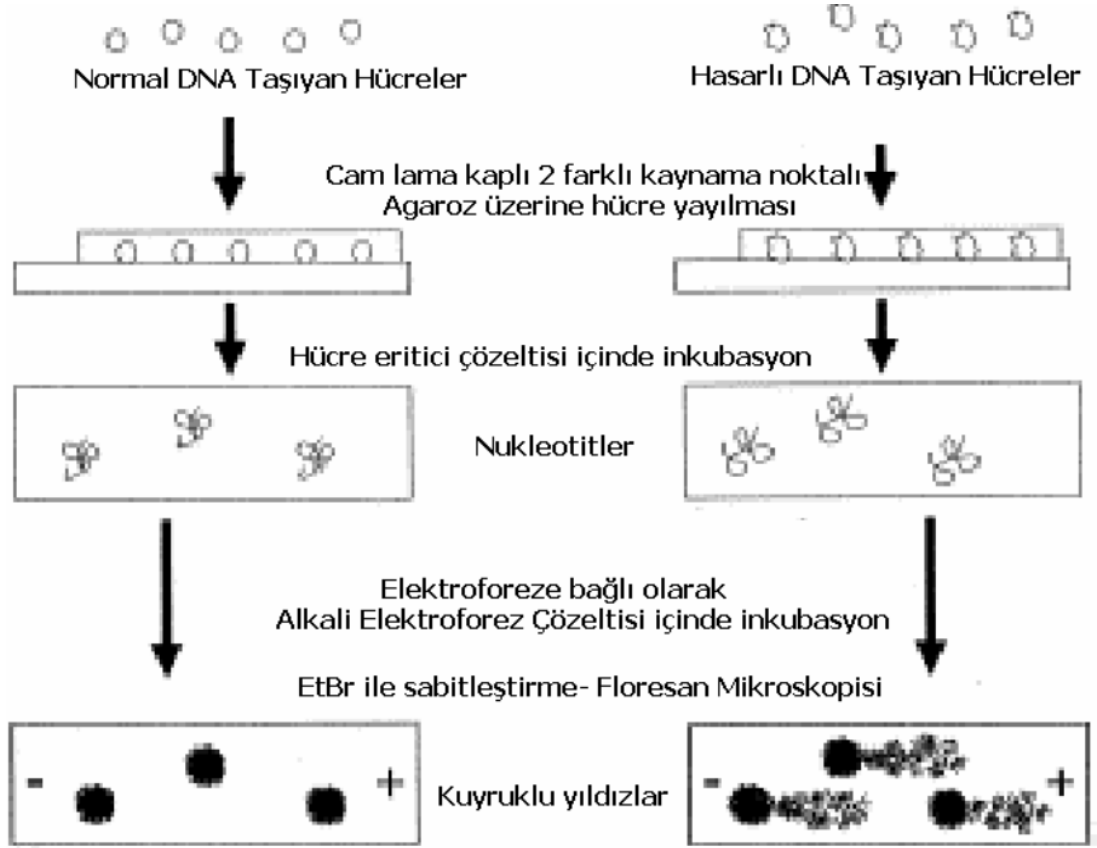
DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili bugüne kadar çok sayıda teknikler uygulanmıştır. Bu tekniklerin birçoğunun pahalı olması, uzun çalışma süreleri gerektirmesi, kimi zaman da birçok laboratuvar veya üniversitelerin sahip olmadığı radyoaktif çalışmaları içermesi gibi nedenler bu alanda çalışma yapılmasını güçleştirmiştir (Tice vd., 2000; Gichner vd., 2009). Pahalı, uzun süren, özel donanım ve sarflar gerektiren ayrıca uzmanlık isteyen bu yöntemler DNA hasarlarının belirlenmesinde alternatif yöntemlerin (Tice vd., 2000) geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu ihtiyaca yanıt olarak 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından “tek hücre jel elektroforez” veya “Comet assay ” olarak adlandırılan DNA hasarını ve seviyesini gösteren bir metot geliştirmişlerdir (Cotelle ve Ferard 1999). Comet assay analizi kimyasal risk değerlendirmesi veya suçul türlerin izlenmesinde, genotoksik etkinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Simoniello vd., 2009). Birçok farklı balık türünde örneğin; (Lourenco vd., 2010), sazan (*C. carpio*), (Buschini vd., 2004, Jin vd., 2004, Klobucar vd., 2010) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yılan kafa (*Channa punctatus*) (Ali ve Kumar, 2008a) genotoksik maddelerin etkilerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır.

“Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE) tekniği DNA sarmal kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. SCGE tekniği “Comet Assay” ya da “Microgel Electrophoretic Technique” olarak da adlandırılmaktadır (Fairbain ve ark. 1995). Aslında bu teknik, ilk olarak hayvan ve insan hücreleri (kan ve sperm hücreleri) üzerinde uygulanmıştır. Ancak son yıllarda bitkiler ve funguslar üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Vajpayee vd., 2006; Gichner vd., 2009; Rank vd., 2009). Hayvan ve bitki hücrelerinin yapısal olarak farklı olmasından kaynaklı bu tekniğin uygulanmasında bazı farklılıklar oluşmuştur. Ancak yapılan bazı değişiklikler ile bu sorun çözülmüştür (Lin vd., 2007; Gichner vd., 2009; Dikilitas vd., 2009). DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan en yaygın ölçme yöntemlerinden birisi olan tek hücre jel elektroforez yöntemi pek çok çalışmada kullanılan görsel floresan bir tekniktir (Singh vd., 1990).

Bu metot, izole edilen tek hücre DNA'sının lam üzerinde hazırlanan agaroz jel içerisinde elektroforetik ortamda yürütülmesi ve hasar seviyesine göre göç eden

farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip DNA parçalarının DNA spesifik floresan boya ile boyandıktan sonra, floresan mikroskop altında değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle oksidatif stres, kimyasal ajanlar, toksik ağır metaller, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını doğru, hassas, hızlı, ucuz ve az bir örnek hacmi kullanarak ölçülebilir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Hücre DNA'larının elektroforez de yürütülmeleri sırasında hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmez ve comet yani kuyruk oluşturmaz. Oysa hasarlı DNA'lar kırıkların oluşturduğu hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Sonuç olarak elde edilen DNA göç görüntüleri değerlendirilir ve bir fikir oluşturulur (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 1988; Horoz vd., 2006). Bu teknik tüm canlı hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Spermatozoon DNA'sı hasarı insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok canlı türünde görülmektedir. DNA da oluşan bu hasarlar başlıca; 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 bazı yapısal bozulmalardır. Sperm hücresi DNA'sında meydana gelen bu hasarların tespiti amacıyla basit hücre jel elektroforezi, tunel, spermatozoon kromatin yapısı ve 8-hidroksi 2-deoksiguanozin'in ölçümü gibi teknikler kullanılmaktadır. Spermatozoon DNA'sındaki hasarlar anormal embriyo gelişimi ve infertiliteye (kısırlığa) neden olmaktadır (Türk vd., 2005).



Şekil 1.1. Normal ve hasarlı hücrelerde comet deneyinin yapılışı (Başaran, 2002)

İnsan hücrelerinde DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydberg ve Johanson tarafından gerçekleştirilmiştir (Rydberg ve Johnson, 1978). DNA'nın ayrışmasına izin veren hafif alkali şartlarda lam üzerindeki agaroz'a gömülmüş olan hücreleri parçalayarak (lisis) hücreleri proteinlerden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip akrinin oranj ile DNA'yı boyamışlar ve kırmızı fleurosana yeşilin oranını hesaplamışlardır. Kırmızı fleuresan tek sarmalı, yeşil fleuresan ise çift sarmalı göstermiştir. Ancak bu teknik çok yaygın kullanılmamıştır (Fairbain ve ark. 1995).

Nötral teknik 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından modifiye edilerek hücredeki DNA hasarının direkt ölçülmesinde "Microgel Electrophoretic Technique" olarak sunulmuştur. Ostling ve Johanson agarozda süspanse edilen radyasyona maruz kalmış hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla parçalama (lize) işlemine ve ardından elektroforeze tabi tuttuktan sonra akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı fleuresan boyasıyla boyamışlardır (Ostling ve Johanson, 1984). Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA parçaları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız

görünümünü vermiştir. Buna bağlı olarak hasarlı hücreler Comet olarak adlandırılmıştır. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülmüş ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun fonksiyonu olduğu gözlemlenmiştir (Ertürk, 2001). Ancak, DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA’da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır (Ünal, 1998). Bu nedenle Singh ve ark. (1988) alkaline comet metodunu tanımlamışlardır. Böylece “tek sarmal kırıkları” denilen ve sadece alkali teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarını tanımlama imkânı doğmuştur. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden fazlasını yok edebilmekte, böylelikle SCGE tekniğinin yeni dizaynı deney hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Tice vd., 2000).

Sperma muhafazası sayesinde gamet transferi daha rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. Üstün verime sahip hatlara ait spermlerin başka işletmelere nakledilmesi veya yabancı formlara ait genlerin kuluçkahane stoklarına aktarımında muhafaza teknikleri kullanılmaktadır (Cloud vd., 1990). Deneysel çalışmalarda, genetik ve ıslah çalışmalarında yıl boyu ihtiyaç duyulan sperma, muhafaza teknikleri sayesinde sağlanabilmektedir (Suquet vd., 2000).

Brofeldt’in 1914 yılında alabalık spermasının soğuk ortamda daha uzun yaşadığını keşfetmesinden sonra, sperm biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla iki değişik muhafaza tekniği geliştirilmiştir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu tekniklerden birincisi spermanın 1 ila 9 °C’de kısa süreli muhafazası (soğuk muhafaza), diğeri, derin dondurucu veya sıvı azot içerisinde 0°C ile -196°C arasında uzun süreli muhafaza tekniğidir (kryoprezervasyon). Değişik balık türlerinde yapılan araştırmalarda balık spermasının, farklı suni seminal plazmaların, farklı seyreltme oranlarında kullanılmasıyla veya herhangi bir seyreltici kullanılmadan, değişik gaz atmosferleri eşliğinde, kısa süreli saklama yöntemiyle 7-34 gün yada uzun süreli saklama yöntemiyle (kryoprezervasyon) uzun yıllar boyunca canlılığını ve döleme kabiliyetini koruduğu bildirilmiştir (Canyurt vd., 2003).

Sperma, yumurta ve embriyonun dondurularak saklanması ve kullanılması birçok canlı türünde uygulanmaktadır. Akuakültürdeki türlerde ise son yıllarda kullanımı giderek artmaktadır. Balık spermasının başarılı şekilde dondurulması ilk kez 1953 yılında Blaxter tarafından ringa balığında denenmiş olup, bu güne kadar yaklaşık 50 deniz balığı türünde uygulanmıştır. Sperma türe bağlı olarak 0 °C'nin altındaki saklama koşullarında birkaç saat ile birkaç gün arasında canlı kalabilmektedir. Dondurulmuş sperma teorik olarak yıllarca zararlı etki olmaksızın saklanabilmektedir (Özgöray ve Akçay 2009). Kryoprezervasyon işleminin spermatozoon üzerine birçok olumsuz etkisi vardır. Özellikle, sperma kalitesinin düşmesi, dölleme yeteneğinin azalması ve larval sağ kalma oranında düşme en önemli olumsuzluklardır. Dondurulmuş spermada hem viabilite (canlılık) oranı düşmüş, hem de spermatozonların fonksiyonları azalmıştır. Bunun nedenleri arasında soğuk şokuna uğramaları, ozmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi kristalizasyon gösterilebilir (Özgöray ve Akçay, 2010).

Sonuç olarak kryoprezervasyon sırasında meydana gelen olumsuzlukların DNA üzerindeki negatif etkileri araştırılarak bu olumsuzlukların ortadan kaldırılabilmesi için dondurma prosedürleri optimize edilebilir. Bu noktada Comet metodu önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle metodun iyi anlaşılabilmesi ve tekniğe pratik çözümler getirilerek, uygulanabilirliğinin artırılması önemli bir husustur.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden veya dış faktörlerin etkisiyle meydana gelmektedir. Normal DNA metabolizması sırasında oluşan DNA hasarının en önemli nedeni bazların kimyasal yapısında kendiliğinden meydana gelen değişimlerdir. Pürin ve pirimidin bazlarının keto-enol tautomerizmi ya da deaminasyonu bazların eşleşme spesifitesini değiştirerek yanlış eşleşmeye yol açar. Buna ek olarak bazların termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı oluşur ve sonuçta apürinik/apirimidinik bölgeler meydana gelir. Baz kaybı hem replikasyonu etkiler hem de bu bölgelerde kolaylıkla zincir kırıkları oluşur.

Oksidatif DNA hasarı, normal metabolizma sırasında bazı tepkime basamaklarında oluşan oksijen radikalleri tarafından endojen olarak oluşturulabildiği gibi iyonize radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi dış faktörler tarafından da meydana getirilmektedir. Yaşam için gerekli olan oksijen organizmada hücresel bileşenlerin hasarına neden olan reaktif ürünlerin oluşmasına yol açar. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) ve nitrojen radikalleri dış yörüngelerinde bulunan eşlenmemiş elektronlar nedeniyle son derece reaktif moleküllerdir ve DNA ile kolayca etkileşerek oksidatif baz modifikasyonu ve DNA zincir kırıkları oluşturabilirler (Yokuş ve Çakır, 2002). Onarımın yetersiz olduğu koşullarda hasar kalıcı hale gelir. Tek ve çift sarmal DNA zincir kırıkları en reaktif SOR olan hidroksil radikalinin (OH) DNA ile etkileşimi sonucu oluşmaktadır (Cadet ve ark., 2008).

Bazı hücrelerde meydana gelen DNA hasarları ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir (Rydberg ve Johanson, 1978). Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülerek hafif alkali ortamda bekletilip, membranların parçalanması ve DNA sarmallarının kısmi açılması sağlanmıştır. Ardından nötralize edilen hücreler akrinin turuncusu ile işaretlenerek DNA hasarının düzeyi yeşil floresansın kırmızı floresansa oranının fotometrik ölçümü ile belirlenmiştir (yeşil floresans çift sarmal DNA'yı, kırmızı floresans ise tek sarmal DNA'yı belirtmektedir). Son zamanlarda bu teknik çok sayıda kritik

basamak içerdiğinden tamamen terk edilmiştir. Daha sonraki yıllarda izole edilmiş hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttırmak amacıyla Ostling ve Johanson mikro jel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir (Ostling ve Johanson, 1984). Bu yöntemde mikroskop lamalarının üzerine agaroz jel içinde hücreler gömülür ardından membranların parçalanması amacıyla yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilir. Nötr pH ortamında kısa bir süre elektroforez uygulanır. Yüksek oranda hasar (zincir kırığı) içeren DNA, sağlam DNA'ya oranla daha hızlı bir şekilde anoda doğru göçer. DNA göçünün derecesi, preparatların etidyum bromür ile boyanması sonucunda oluşan floresan yoğunluğunun, floresan mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir. Fakat bu teknikte elektroforezin nötral koşullarda uygulanması yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. Nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilemez. Tek sarmal kırıkları eşleşmemiş kesip çıkarma onarım bölgeleri ile apuridik ve apirimidinik bölgelerde olduğu gibi alkali-duyarlı bölgelerden kaynaklanmaktadır. 1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali koşullarda (pH >13) uygulayarak bu soruna çözüm bulmuşlardır (Singh vd., 1988). Günümüzde uygulanan “Comet Assay” Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıklarının tamamının tespit edilmesine olanak sağlayan bir metottur. Son yıllarda “Comet Assay” belirli DNA dizilerine özgü işaretli problemler kullanılarak flüoresan in situ hibridizasyon yöntemi ile birleştirilmiştir. FISH (fluorescent in situ hybridization) comet olarak adlandırılan bu modifiye teknikle dizi veya gen spesifik hasarları belirlenebilmektedir.

Uzun ve kısa süreli sperm muhafazası sırasında, hücre DNA'sında birtakım hasarlar oluşmaktadır. Oluşan bu hasarlar genel olarak oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir (Watson, 2000; Aitken ve Baker, 2004). Bu durumda, sperm hücre ve mitokondri zarları, aksonem yapısı zarar görerek sperm hücre yapısı ve fonksiyonu olumsuz bir şekilde etkilenir (Spinaci vd., 2005). DNA moleküllerinde oluşan oksidasyon sonucu açığa çıkan zarar; sarmalda kırıklar oluşması ve azot bazlarının oksitlenmesi olarak iki temel yol ile meydana gelir (Box vd., 2001). Cinsiyeti değiştirilmiş dişi bireylerin sperm hücrelerindeki DNA hasarlarının, kısa süreli muhafazada oksidatif stresle ilgili olduğunu ve bu oksidatif stresin sitozinlerden daha çok guaninleri etkilediği saptanmıştır (Pérez-Cerezales vd., 2009). Uzun süreli sperm muhafazasında ise

oksidatif stres gözlemlenmemiştir. Burada oluşan DNA hasarının daha ziyade soğuk şok kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Yetiştiricilik koşullarında gelişen bir balıktan alınan spermelerde, az bir oranda da olsa DNA hasarı saptanabilmektedir. Sperm hücrelerinde görülen DNA hasarları genel olarak, anormal kromatin paketlenmesi (Boissonneault, 2002; McLay ve Hugh, 2003), ROS fazlalığı (Khosravi vd., 2014), seminal plazma antioksidanlarının azalması, sperm hücrelerinin apoptozu (Pérez-Cerezales vd., 2009) gibi sebeplerden oluşabilmektedir. Uzun ve kısa süreli sperm muhafazası sonucunda DNA hasarlı sperm hücrelerinde artış gözlenmektedir. (Zilli vd., 2003; Shaliutina vd., 2013). Sperm hücrelerinde gözlemlenen DNA hasarı ile fertilizasyon kabiliyetinin azalması doğrudan ilişkilidir. Genellikle fertilizasyondan sonra yavru balıklarda bazı gelişim problemlerine hatta ölümlerine neden olmaktadır (Kopeika vd, 2004; Evenson ve Wixon, 2006).

Akuakültürde başarıyı etkileyen önemli faktörlerin başında üretilen sperm hücrelerinin hacimsel miktarı, yoğunluğu ve canlılığı gibi özellikler gelmektedir. Türler arasında bu özelliklerde büyük farklılıklar bulunmaktadır. Sperm hücrelerinin testis, testis kanalları veya sperm kanalları sisteminde bulunduğu ortam şartları, sperm hücrelerinin elde edildikten sonra muhafazası, herhangi bir sulandırıcı çözeltisi ile seyreltilme oranı ve dölleme özellikleri gibi konularda detaylı bilgilere ulaşılması balıklarda sperm kalitesi ve fizyolojisi ile ilgili konularda fikir sahibi olmak için oldukça önemlidir (Billard vd., 1995). Dış dölleme görülen balıklarda sperm hücreleri, dış ortama bırakılmaları anına kadar hareketsiz (inaktif) bulunmaktadırlar. Üreme sistemi kanal boşluklarında hareketsiz bir şekilde bulunan sperm hücreleri, su ile temas ettiğinde hareket yeteneği kazanmaktadırlar. Tatlı su balıklarının genelinde sperm hücrelerinin motiliteleri 2 dakikadan daha az sürer (Rurangwa vd., 2004). Doğada veya akuakültür ortamlarında, balık gametlerinin kalitesi birçok değişkene bağlıdır ve önemli sayıda dış faktörlerin veya kuluçka yönetimi uygulamalarının etkisi altındadır. Bu nedenlere bağlı olarak gamet kalitesi konusu artan bir şekilde ilgi görmektedir. Bu konuda önemli çalışmalar yapılsa da, gamet kalite kontrolü yapılırken bazı faktörlerin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Günümüzde gamet kalitesi konusu tam anlaşılamamakla birlikte gamet kalite kontrolü yetiştiricilik sektöründe sorun teşkil etmeye devam etmektedir. Bunun

nedeni gamet kalitesinde gözlemlenen değişkenliklere neden olan etkenlerin ve moleküler mekanizmalarının birçoğunun bilinmemesi ya da tam olarak anlaşılmamasıdır. Sperm hücrelerinin organik içeriği lipit, fosfolipit, kolesterol, trigliserit ve protein gibi metabolitlerden oluşmaktadır. Bunlara ek olarak; adenin trifosfataz, fosfataz, lipaz, esteraz, oksidazlar, birçok urikolitik enzim, malik dehidrogenaz, adenozin trifosfataz, laktat dehidrogenaz, piruvat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enerji metabolizmasında görevli birçok enzim bulunmaktadır. Bu parametrelerin ve bunlara ek olarak; yağ asitleri ve amino asitler gibi metabolitlerin de motilite karakteristikleri üzerine, etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Lahnsteiner, 2009).

Yumurtayı başarılı bir şekilde dölleyebilmesi, bir sperm kalitesi olarak belirtilmektedir. Sperm kalitesini belirleyen faktörler içinde, sperm dölleme kapasitesi ile ilişkili olan ve motilite yüzdesi, süresi gibi ölçülebilen özellikleri bulunmaktadır. İyi bir dölleme, kaliteli yumurta ve sperm ile gerçekleşmektedir. Oluşacak embriyonun kalitesinde her iki gametin de etkisi vardır (Rideout vd., 2003). Yetiştiricilik koşullarında sperm kalitesini etkileyen biyotik ve abiyotik faktörlerin, genetik, fizyolojik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Sperm kalitesi; yetiştiricilik şartlarından, döllemeye kadar olan sürede in vivo saklama koşullarından doğrudan etkilenebilmektedir (Rurangwa vd., 2004). Akuakültürde, dişi ve erkek anaçlar arasında, üreme döneminde görülen senkronizasyon bozukluğu nedeniyle bazen dişilerden yumurta alındığı halde erkek bireylerden sperm alınamamakta veya bunun tam tersi bir durum görülmektedir. Bundan dolayı üretici, dişilerden yumurta sağımı yaptığında erkek anaçlar sperm vermediği için sağılan yumurtaya dölleme işlemi uygulanamamakta ve yumurtalar ziyan olmaktadır. Ya da erkekler olgunlaştığı halde dişilerden yumurta alınamadığında sperm kaybı söz konusu olmaktadır. Bu durum da üreticilerin ekonomik kayıplara uğramasına neden olmaktadır (Tabakoğlu, 2005). Spermin dölleme kapasitesiyle doğrudan ilişkili tüm fiziksel parametreler, potansiyel olarak sperm kalitesini belirlemede kullanılabilmektedir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda sperm yoğunluğu, ATP derişimi, motilitesi ve morfolojik yapısı, seminal plazmanın ozmolarite ve pH değerleri, kimyasal yapısı, enzimatik aktiviteleri gibi özellikler sperm kalitesini nitelendiren önemli parametrelerdir.

Sperm motilite parametrelerindeki değişkenlik farklı erkekler arasında gözlenebildiği gibi aynı bireyin üreme dönemi süresince de gözlemlenebilmektedir. Motilite kalitesi düşük olan sperm hücreleri, yumurta membranına penetre olamamakta ve yumurtayı dölleremekte başarısız olmaktadır (Billard vd., 1995).

Kontrollü balık üretimi, hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi için günümüzde oldukça büyük boyutlara ulaşmıştır. Balıkların genetik potansiyeli, türlerin ve soyların birleştirilmesi ve gamet manipölasyonları yoluyla ıslah edilebilmektedir. Bu uygulamaların bazıları gamet hücrelerinin saklanması (prezervasyon) gerektirir. Günümüzde birçok balık türü spermasının dondurulması (kriyoprezervasyon) yapılabilmektedir. Özellikle çipura, levrek, alabalık ve sazan gibi ekonomik değeri yüksek olan balıkların spermasının saklanması oldukça önemlidir (Akçay vd., 1995). Bu konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar şu şekildedir;

Baynes ve Scott (1987) Gökkuşadı alabalığı (*Onchorincus mykiss*) spermatozoalarında dondurma işlemi uygulamışlardır. Ayrıca kryoprezervasyonun sperm ve yumurta kalitesi üzerine etkilerini ve extender kompozisyonunun çözölme sonrası fertiliteye etkilerini araştırmışlardır. Cabrita ve ark. (2005) Gökkuşadı alabalığı (*Onchorincus mykiss*) ve çipurada (*Sparus aurata*) kryoprezervasyonun spermatozoa üzerindeki DNA hasarını incelemişlerdir. Irawan ve ark. (2010) dondurulmuş sazan (*Cyprinus carpio*) spermasında çeşitli extender ve kryoprotektanlar kullanarak çözölme sonrası sperm hareketliliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada üç tip kryoprotektan (dimethylsulfoxide; DMSO, methanol; MET propilen glikol; PG) ve altı farklı extender (1:1) kullanılmış ve yüksek döllerme kapasitesi elde edilmiştir. Bu çalışma sonucunda sazan spermasının dondurulmasında CCSE 2 ve DMSO kombinasyonunun çok iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Lubzens ve ark. (1997) sazan spermasının dondurulması ve saklanması konusunda araştırmalarda bulunmuş ayrıca bu konuda uygulama stratejileri geliştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda işletmeler için sazan (*Cyprinus carpio*) sperm bankaları oluşturulabileceği bildirilmiştir. Holtz (1992) Gökkuşadı alabalığında sperm kryoprezervasyonu ve pratik öneriler isimli çalışmayı yapmıştır. Bu çalışmada DMSO içeren sulandırıcı kullanılan dondurulmuş salmonid spermalarında oldukça yüksek döllenme oranları elde edilmiştir. Horvath ve ark (2007) 1.2 ve 5 ml lik

payetlerde dondurularak saklanmış sazan spermasıyla dölleme sonucunda oluşan haploid larvaları incelemişlerdir. Butts ve ark. (2011) atlantik morina balığında dondurulmuş sperma, semen özellikleri ve dölleme yeteneğini incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarında yetiştiricilik üretimi ve verimi, sperm biyolojisi ve balıklar kryobiolojisini anlamada pek çok fayda sağlayacağını bildirmişlerdir. Lahnsteiner ve ark. (2000) sazan spermatozoalarında kryoprezervasyon çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmada canlılık kontrolü için bilgisayar destekli sperm analizi kullanılmıştır. Spermatozoa dondurulmasında kryoprotektanlar, en etkili konsantrasyonlar ve kombinasyonları, dondurma ve eritme koşulları ve dengeleme etkilerinin toksik ve donmaya karşı koruyucu etkilerini tanımlama konuları üzerinde durulmuştur.

Li ve ark. (2010) kryoprezervasyonun sazan sperma hücreleri ve proteinleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kryoprezervasyonun yol açmış olduğu sperm protein profilleri arasındaki değişiklikler, sperm hızı, motilite oranı ve fertilizasyon başarısını incelemişlerdir. Rodina ve ark. (2007) dondurulmuş *Tinca tinca* spermasında; sperm motilitesi ve kuluçka başarısı konusunda çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda büyük hacimli sperm kryoprezervasyonları için en iyi prosedürü ortaya koymaya çalışılmıştır. Ayrıca büyük ölçekli kadife balığı sperma dondurulmasında ileriye yönelik pratik kullanım ve suni döllemeye ilişkin bilgiler elde edilmiştir.

Sperma kryoprezervasyon sırasında birtakım işlemlerden geçmektedir. Bu işlemler spermatozoon DNA sında bazı hasarlara yol açabilmektedir. Bu hasarlar; spermanın sulandırılması ve kısa süreli muhafazası esnasında reaktif oksijen moleküllerine maruz kalması gibi birçok farklı nedenden dolayı oluşabilmektedir (Baynes ve Scott, 1987). DNA'da oluşan bu olası hasarlar Comet assay tek hücre jel elektroforezi yöntemiyle belirlenebilmektedir. Bu konuda yapılmış çalışmalar; Ahmed ve ark. (2011) tilapialar (*Oreochmis mossambicus*) üzerinde arseniğin genotoksik etkilerinin araştırılmasında comet assay ve mikronükleus testi uygulamaları yapmışlardır. Ali ve Kumar (2008) tatlı su balığı *Channa punctatus* kullanarak farklı dokularda monokrofotosun genotoksik etkilerini tek hücre jel elektroforeziyle incelemişlerdir. Ulutaş ve ark. (2008) Mogan gölünün kirliliğinin değerlendirilmesinde comet assay metoduyla sazan balıklarının DNA hasarını incelemişlerdir.

Lee ve Steinert (2003) tatlı su ve deniz canlılarında DNA hasarlarının tespit edilmesi amacıyla tek hücre jel elektroforezi tekniğini kullanmışlardır. Yapılan çalışmaları incelediğimizde; sazan balığı sperma dondurulması ve kryoprezervasyonun sazan balığı spermasında oluşturduğu DNA hasarının incelenmesi ve değerlendirilmesi üzerine geniş ve detaylı çalışmalar gözlemlenmemiştir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Triton X-100 (Merck)

Normal erime noktalı agaroz (Sigma)

Düşük erime noktalı agaroz (Sigma)

Etidyum bromür (M.Biotech)

Trizma Base (Sigma)

Tris HCL (Sigma)

NaCl (Sigma)

KCl(Sigma)

CaCl₂(Sigma)

MgCl₂(Sigma)

NaHCO₃(Sigma)

M₂SO (Sigma)

KH₂PO₄

Na₂HPO₄

PVA (polivinil alkol)

NaOH (Sigma)

EDTA (Etilendiamintetra asetik asit)

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Derin dondurucu (-80 ° C),

Distile su cihazı (GFL),

Sıcak su banyosu (P-Selecta, Unitronic100),

Elektroforez güç kaynağı (Consort EV263),

Işık Mikroskobu (Olympus CX31),

Floresan mikroskobu (Carl Zeiss, Axioscope A.1),

DNA elektroforez tankı (Scie-plast),

pH metre (Hanna),

Vorteks (Biosan),

Isıtıcı Tabla (Stuart),

Manyetik karıştırıcı,

Hassas terazi (Sartorius),

Sıvı azot tankı,

Lam (Citoglas),

Lamel (İso-lab).

Ozmometre (Ganotech)

Payetler (IMV, France)

3.2. Anaç Temini ve Sperm Sağımı

İzmir DSİ Ürkmez Su Ürünleri Üretim Tesisinden temin edilen ve anestezi madde ile bayıltılan (2-Fenoksi-etanol), 2-3 yaş arasındaki 10 erkek sazan (*Cyprinus carpio*) arasından sağlıklı olduğu belirlenen 3 tanesi seçilmiştir. Abdominal masaj yöntemi ile sağım yapılarak sperm örnekleri alınmıştır. Sağımda kontaminasyonu önlemek için, idrar ya da feçesin sperme karışmamasına dikkat edilmiştir. Sperm örnekleri

analiz işlemleri ve kriyoprezervasyon işlemi için 2 -4 °C arasında buz kapları içinde cam tüplerde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Sperma sağımı

3.3. H₂O₂ ile Negatif Kontrol Grubunun Oluşturulması

DNA hasarının durumunu tanımlamak için bir derecelendirme belirlenmiştir. Bu amaçla lizis çözeltisi (36.75 g NaCl, 9.3 g EDTA, 0.3 g Trisma Base ve pH: 10) içerisine farklı derişimlerde H₂O₂ içeren çözeltilerle incelemeler yapılmıştır. DNA hasarsız hücrelerin belirlenmesi için, H₂O₂ içermeyen lizis çözeltisi kullanılmıştır. 1. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için 12 µM, 2. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için 25 µM ve 3. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için 50 µM H₂O₂ içeren lizis çözeltileri kullanılmıştır.

3.4. Sperm Kriyoprezervasyonu

Erkek bireylerden alınan örnekler dondurma işleminden önce bir kryomedia içerisine konulmuştur. Bu ortamın içeriği şu şekildedir; 360 mg NaCl, 1.000 mg KCl, 22 mg CaCl₂, 8 mg MgCl₂, 20 mg NaHCO₃, 100 ml safsu, pH 8.2, 378 mOsm, % 10 Me₂SO, %10 yumurta sarısı (Magyary vd., 1996). Örnekler modifiye Kurokura (K) sulandırıcısı ile (1:9) oranında seyreltilmiştir. Sulandırma işlemi yapılırken sulandırıcı ile spermanın ısısının aynı olmasına dikkat edilerek (ekilibrasyon),

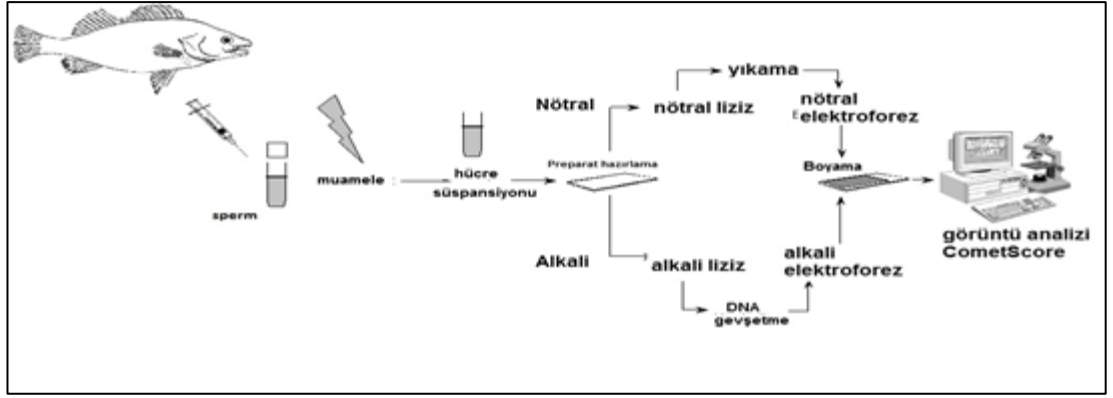
sulandırıcı spermaya kademeli olarak katılmıştır. Seyreltilen sperm örnekleri 0.25 ml payetler (IMV, France) içerisine alınıp, payetlerin ağzı PVA (polivinilalkol) ile kapatılmıştır. Uçları kapatılan payetler hemen soğuk suya (1-3 °C) atılarak polivinil alkolün sertleşmesi sağlanarak kapatma işlemi gerçekleştirilmiştir, takiben dondurmaya geçilmiştir. Dondurma işlemi payetlerin -120 °C'deki sıvı azot buharında bekletilmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir. Payetler sıvı azot buharı seviyesinin 2,5 cm yukarısında 10 dak. bekletilip, ardından sıvı azota daldırılmıştır. Sıvı azotta 1 saat bekletilen payetler çıkarılarak 40°C de 5–6 saniye benmaride (su banyosu) çözülmüştür.



Şekil 3.2. Payetlerin kademeli olarak dondurulması

3.5. Comet Analizi

DNA hasarının tespiti deneyleri, Muğla Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İşlemler sırasıyla, slayt hazırlama ve jel yerleştirilmesi, hücre lizisi ve DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, DNA boyama ve Comet şekil analizi şeklinde yapılmıştır.



Şekil 3.3. Comet analizinin aşamaları (Fidan, 2008)

Bu tez çalışmasında, daha önce çalışılmış olan üç farklı comet metodu kullanılmıştır. Çalışılan metodlar arasındaki teknik farklılıklar çizelge 3.2. de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı metodlara göre temel SCGE metodolojisi

Teknik Değişkenler	Metod 1 ^a pH: 12	Metod 2 ^b pH:10	Metod 3 ^c pH>13
Agaroz konsantrasyonu ve tabaka sayısı	% 0,5 agaroz konsantrasyonu, 2 kat slayt tabakası	%0,75 agaroz konsantrasyonu, 3 kat slayt tabakası	%1 agaroz konsantrasyonu, 2 kat slayt tabakası
Lizis solüsyonu	2,5 M NaCl, 100 mM Na ² EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton-X ve %1 sodyum lauroyl sarcosine, 1 saat 4°C inkübasyon. 10 mM dithiothreitol final konsantrasyonu 4°C’de 30 dakika inkübasyondan sonra 4 mM lithium diiodosalicylate eklenir ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyon.	2,5 M NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA, 10 mM Tris, %1 sodium lauroyl sarcosine, %1 Triton X-100, 4°C 60 dakika.	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base Lizis çalışma çözeltisi: %1 TritonX-100, %10 DMSO 4°C 50 dakika.
Elektroforez tamponu	0,3 M NaOH, 1 mM Na ₂ EDTA, 20 dakika 4°C.	300 mM sodium acetate ve 100 mM Tris 4°C 30 dakika	300 mM NaOH, 1mM EDTA 25 dakika 4°C.
Elektroforez	25 V, 300 mA, 4°C, 10 dakika.	12 V (0,46V/cm) ve 100 mA, 20 dakika	25 V, 300 mA, 25 dakika
Nötralizasyon	0,4 M Tris pH: 7,5 nötralizasyon solüsyonundan sonra saf metanolde 3 dakika.	5 ml 0,4 M Tris-HCl, pH: 7,4	0,4 M Tris-HCl, 10 mM Trizma Base, pH: 7,5

a: Cabrita ve ark., 2005., b: Shen ve Ong, 2000., c: Singh ve ark., 1998

3.5.1. Slaytların hazırlanması

PBS (phosphate buffer saline) içerisinde hazırlanan %1’lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) jelden 80 µl alınıp, lam üzerine damlatılarak lamın üzeri lamel ile kapatılmıştır. 2-4°C’de 5 dk. bekletildikten sonra lameller kaldırılarak birinci agaroz tabakası hazırlanmıştır. Hazırlanan lamalar buzdolabında nemli kutularda 2. agaroz

katı dökülene kadar saklanabilir (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 1988; Horoz vd., 2006).

PBS ile mm^3 'te 10^9 hücre olacak şekilde süspanse edilmiş hücrelerden 10 μl alınarak 80 μl % 0,5'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMP) agaroz ile (37°C benmaride) karıştırılarak birinci agaroz kat üzerine tabakalandırılmıştır ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için bekletilmiştir. 20 dakika buzdolabında bekletilen slaytların üzerinden lameller yayma preparat (froti) yöntemiyle çekilmiştir. Bu şekilde slaytların hazırlanması tamamlanmıştır.

NMA (normal melting agarose) ve LMA (low melting agarose)'nin hazırlanması için önce 250 ml stok PBS (phosphate buffer saline) hazırlanmıştır. Fosfat tamponu tuzlu (PBS) çözeltisinin içeriği; 20 g NaCl, 0.5 g KCl, 0.5 g KH_2PO_4 , 2.9 g Na_2HPO_4 ve 8 g Tris HCl' dir. PBS çalışmadan önce 10 kat sulandırılarak kullanılmıştır. %1'lik 100 ml NMA ve %0.5'lik LMA stok PBS çözeltisi ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.4. Slaytların yayma preparat yöntemiyle hazırlanması

3.5.2. Lizis aşaması

Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılır. Bu amaçla, hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra, slaytlar yaklaşık 1 saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletilmiştir.

250 ml stok lizis çözeltisi (36.75 g NaCl, 9.3 g EDTA, 0.3 g Trisma Base ve pH: 10) hazırlanmıştır (Singh ve ark. 1988). Ardından 1 ml Triton X-100, stok lizis çözeltisiyle 100 ml'ye tamamlanarak lizis çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan lamalar bir kutu (şale) içine alınarak üzerine lizis çözeltisi dökülerek +4°C'de 50 dakika boyunca lizis için bekletilmiştir.

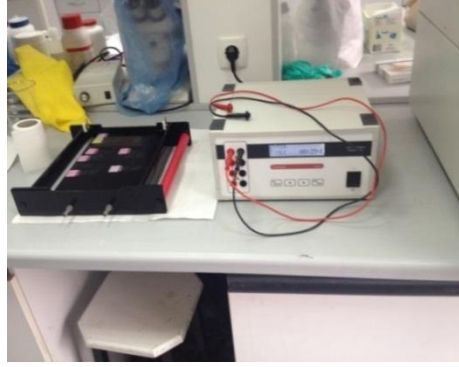
3.5.3. DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez

Lizis aşamasından 50 dakika sonra lamalar lizis çözeltisinden çıkartılıp soğuk distile su ile yavaşça yıkanmıştır. Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (500 ml için; 6 g NaOH, 0.18 g EDTA ve pH>13) 20-30 dakika arasında inkübasyona bırakılmıştır. Tampon hazırlandıktan sonra buzdolabında soğutulularak kullanılmıştır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 1988; Horoz vd., 2006).



Şekil 3.5. Lamaların adaptasyon için elektroforez tankında bekletilmesi

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözelti içerisinde 300 mA 40 V'luk elektriksel alanda 5-25°C'de 20 dakika yürütülmüştür.



Şekil 3.6. Slaytların elektroforez tankına yerleştirilmesi ve elektroforez

3.5.4. Nötralizasyon

Elektroforez işleminden sonra lamalar çıkarılıp kağıt havlu üzerinde alınmıştır. Daha sonra alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için; bir kutu üzerine alınan lamaların üstüne nötralizasyon tamponu (250 ml için; 1.82 g Tris-HCl, 0.125 g Trisma Base ve pH: 7.5) dökülüp, 20 dakika nötralizasyon için bekletilmiştir (Singh vd., 1988).

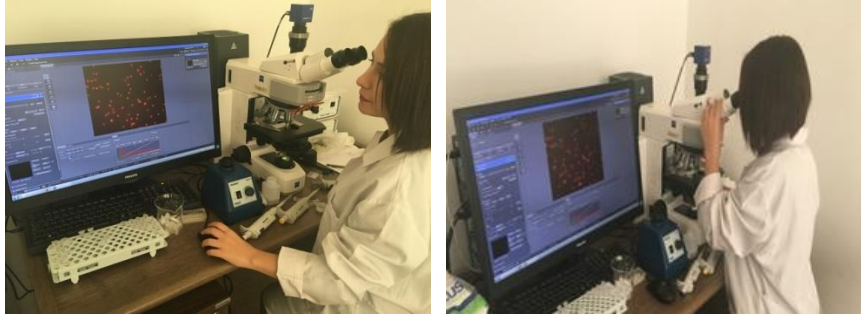
3.5.5. DNA boyama

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra, slaytlar floresan boya olan Etidyum bromür (5-10µg/ml) kullanılarak DNA boyanmıştır. Dört saat içinde floresan mikroskopta (Carl Zeiss) değerlendirilmiştir (Kocyigit vd., 2005).

3.5.6. Comet şekil analizi

Comet tekniğinde sonuçların değerlendirilmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Gelişmiş teknolojik imkânlara sahip olmayan laboratuvarlarda hasarlı hücreler görsel skorlama adı verilen teknik kullanılarak ölçülmektedir. Teknikte hasarsız hücrelerin incelenmesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü vardır. Hücrelerin bu görünümü göç etmemiş yada “nonmigrasyon” (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Bu görünüme

“düşük seviyede migrasyon” denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız “yüksek seviyede migrasyon” şeklini alır. Son aşama ise “apoptosis”dir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine paraleldir (Ertürk, 2001) (şekil 3.9).

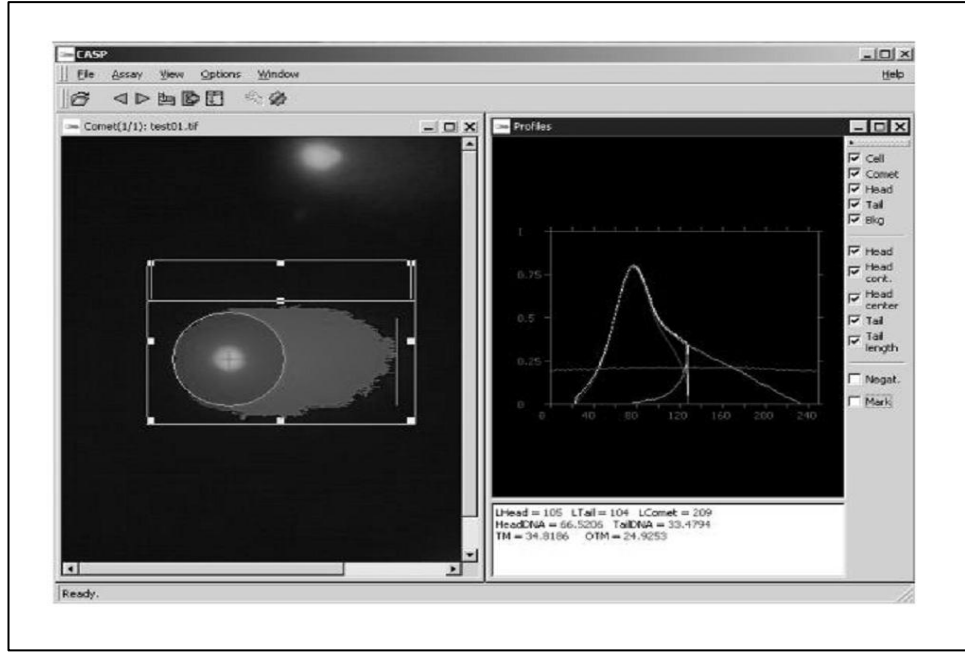


Şekil 3.7. Flouresan mikroskopta örneklerin incelenmesi

Gelişmiş laboratuvarlarda sonuçların değerlendirilmesinde bu konuda yapılmış yazılımlar’dan yararlanılmaktadır. Fakat farklı değerlendirme teknikleri de dikkat çekmektedir. Görüntü analizinde göç etmiş hücreler, kuyruk uzunluklarına göre sınıflandırılarak ayırt edilmektedir.



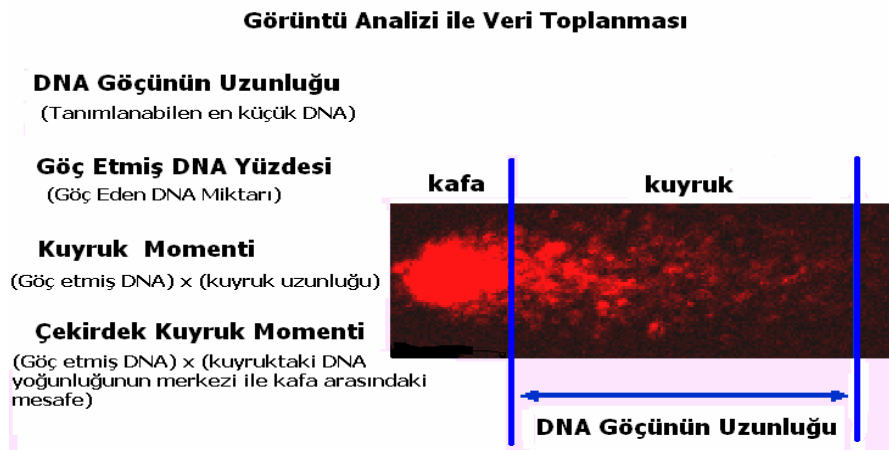
Şekil 3.8. Comet değerlendirilmesinin yapıldığı flouresan mikroskoptan genel görüntüler



Şekil 3.9. Comet görüntülerinin bilgisayar yardımıyla görüntülenmesi (Fidan, 2008)

Kamera ataçmanlı, bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle hasarlı hücrelerin baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi çeşitli comet parametreleri ölçülmüştür.

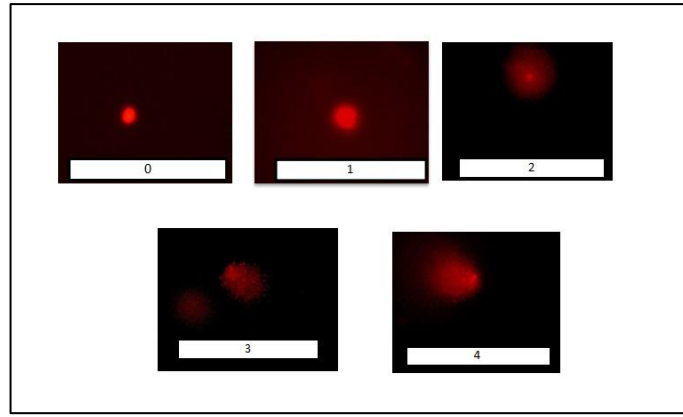
Hasarın ölçülmesinde kullanılan başka bir ölçüm tekniği ise “tail moment=kuyruk momenti”dir. Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranını tanımlamaktadır (Shen ve Ong, 2000).



Şekil 3.10. DNA hasarı seviyesinin belirlenmesi (Başaran, 2002)

Hücrelerde meydana gelen DNA hasarları derecelerine göre şekil 3.11 de verilmiştir. Oluşan DNA hasarı, derecesine göre beş kategoride değerlendirilmiştir.

- Dairesel şeklide hiç kuyruk oluşturmamış DNA görüntülerinden hiç hasarlanmamış DNA lar “0”,
- çok az hasarlanmış DNA lar “I”,0
- az hasarlı DNA lar “II”,
- hasarlanmış DNA lar “III” ve
- çok hasarlı DNA lar “IV.” derece hasar olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.11. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA’ların görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; 1-Çok az hasarlanmış DNA; 2-Az hasarlanmış DNA; 3-hasarlanmış DNA; 4- tümüyle hasarlanmış DNA (Büyütme 40x)

4. BULGULAR

4.1. DNA Hasarsız ve Farklı Derecedeki Hasarlı Örneklerde 3 Farklı Metodun Değerlendirilmesi

Uygun koşullarda motilite değerleri ölçülen ve hasarlı olmadığı belirlenen örnekler ile lizis aşamasında farklı yoğunluklarda H_2O_2 uygulanan örnekler farklı metodlara göre gruplara ayrılarak, DNA hasarsız ve hasarlı hücrelerin oranları belirlenmiştir. Uygulama sonrası DNA hasarsız ve hasarlı hücre oranları Tablo 3.1.'de verilmiştir. Tablo 3.1.'de görüldüğü üzere, H_2O_2 uygulanan örnek hücrelerinin hepsi hasar görmüştür. Lizis çözeltisine eklenen H_2O_2 yoğunluğu arttıkça, hasar derecesinde bir artış gözlenmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda, DNA hasarsız hücrelerin 24-30 μm çapında halkalar şeklinde olduğu belirlenmiştir. DNA hasarının derecesine bağlı olarak artış gösteren Comet görünümünün uzunluğu 1. derecede DNA hasarlı hücreler için 30-40 μm , 2. derecede DNA hasarlı hücreler için 40-50 μm ve 3. derecede DNA hasarlı hücreler için >50 μm olarak ölçeklendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Lizis solüsyonuna eklenmiş farklı seviyelerdeki H₂O₂ ile (kryoprezervasyon uygulanmamış hücrelerde) elde edilen DNA hasarı oranları (%) [Singh ve ark., 1988, Cabrita ve ark., 2005, Shen ve Ong, 2000]

		Hasarsız	1.derece	2.derece	3.derece
H₂O₂ içermeyen çalışma grubu	Singh	98,8±0,8 ^a	1,2±0,8 ^b	0,0	0,0
	Cabrita	98,8±0,6 ^a	1,2±0,6 ^b	0,0	0,0
	Shen	98,8±0,8 ^a	1,2±0,8 ^b	0,0	0,0
12 µMol H₂O₂ içeren çalışma grubu	Singh	0,0	78,7±0,8 ^a	21,3±0,8 ^b	0,0
	Cabrita	0,0	78,7±1,8 ^a	21,3±1,8 ^b	0,0
	Shen	0,0	78,8±1,8 ^a	21,2±1,8 ^b	0,0
25 µMol H₂O₂ içeren çalışma grubu	Singh	0,0	7,3±1,8 ^a	83,8±1,5 ^b	8,8±1,3 ^c
	Cabrita	0,0	7,3±2,0 ^a	85,3±3,3 ^b	7,3±1,3 ^c
	Shen	0,0	7,3±1,3 ^a	85,0±2,3 ^b	7,7±1,6 ^c
50 µMol H₂O₂ içeren çalışma grubu	Singh	0,0	0,0	8,0±1,3 ^a	92,0±1,3 ^b
	Cabrita	0,0	0,0	6,5±1,3 ^a	93,5±1,3 ^b
	Shen	0,0	0,0	7,2±1,0 ^a	92,8±1,0 ^b

Sonuçlar incelendiğinde H₂O₂ içermeyen örnek grubunda 2. ve 3. derece DNA hasarlı hücre, 12 µMol H₂O₂ içeren çalışma gruplarında 1. ve 2. derece DNA hasarlı hücre, 50 µMol H₂O₂ içeren çalışma gruplarında ise 2. ve 3. derece DNA hasarlı hücre gözlemlenmiştir. Ancak 25 µMol H₂O₂ içeren çalışma gruplarında her dereceden DNA hasarlı hücre gözlemlenmiştir. Metodlar arasındaki H₂O₂ yoğunluğuna bağlı DNA hasarı yüzdeleri incelenerek varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İstatiksel olarak aralarında farklılık gözlemlenmemiştir (P<0,05).

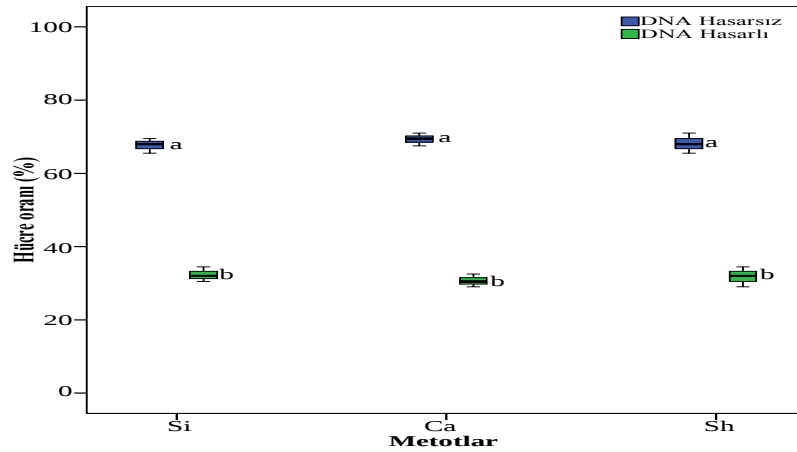
4.2. Kriyoprezervasyon Sonrası Hasarlı ve Hasarsız Örneklerde Metodların Karşılaştırılması

Kriyoprezervasyon çalışmaları sonrasında Comet uygulanan örneklerin DNA hasarlı ve hasarsız hücre oranları (%) Çizelge 4.2.'de verilmiştir. DNA hasarlı hücreler, hasar derecelerine göre ayrı ayrı gruplandırılarak belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Kriyoprezervasyon uygulanmış hücrelerin farklı comet metodlarına göre DNA hasarı oranları (%)

	Hasarsız DNA	Total Hasarlı DNA (1.+2.+3.)	1.derece	2.derece	3.derece
Singh	67,67±2,0 ^a	32,3±2,0 ^a	15,0±2,0 ^a	13,0±1,8 ^a	4,3±2,5 ^a
Cabrita	69,33±1,8 ^a	30,7±1,8 ^a	7,8±1,8 ^b	11,8±2,4 ^a	11,0±1,0 ^b
Shen	68,17±2,8 ^a	31,8±2,8 ^a	4,3±1,3 ^b	12,2±1,3 ^a	15,3±0,3 ^c

Çalışılan 3 ayrı metod arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenerek, varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Metotlara göre DNA hasarsız ve hasarlı hücre dağılımları Şekil 4.1. de belirtilmiştir. Şekilde kullanılan harfler (a,b) gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığını göstermektedir ($P < 0,05$).



Şekil 4.1. Kriyoprezervasyon uygulanmış örneklerin farklı comet metodlarına göre DNA hasarsız ve hasarlı hücre dağılımları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan çalışmada; dondurulmuş sazan spermasında, farklı comet yöntemlerine göre DNA hasarı incelenmesine bakılmıştır. Comet analizi yapılan numuneler flouresan mikroskop yardımıyla incelenip, bilgisayar yazılımı yardımıyla (Carl Zeiss Zen Vision) fotoğrafları çekilerek değerlendirilmiştir. Slayt üzerindeki numuneler DNA hasar derecesine göre beş gruba ayrılıp ve 0'dan 4'e kadar numaralandırılmıştır.

İn vitro antigenotoksisite çalışmalarında; DNA hasarı yaratmak için, metil metansülfonat (MMS), H_2O_2 , ferroz sülfat, tersiyer bütıl hidroperoksit (t-BHP), formaldehit, 1,2-dimetilhidrazin, doksorubisin gibi kimyasal maddeler kullanılmaktadır (Gao vd., 2006, Munari vd., 2009, Lima vd., 2005, Chen vd., 2003, Tavares vd., 2006, Lee vd., 2008).

Yapılan çalışmada taze sperm hücrelerinin DNA'larında oksidatif stres oluşturmak için bu kimyasallar arasından H_2O_2 seçilmiştir. H_2O_2 , hücre membranını kolayca geçebilen ve sitoplazmada Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metal iyonlarının varlığında enzimatik olmayan, Haber-Weiss ya da Fenton reaksiyonlarıyla oldukça radikal özellik gösteren hidroksil radikale dönüşebilen bir moleküldür. Oluşan hidroksil radikali tek ve çift zincir kırıklarının, alkali labil bölgelerin ve çeşitli tipte okside pürin ve pirimidin bazlarının oluşumunu indükleyebilir (Joenge, 1989).

Oksidatif strese karşı hücre direnci; hücre tipleri arasında farklılık gösterebileceği gibi aynı tipteki hücrelerde bile farklı direnç tablolarıyla karşılaşılabilir. Bu nedenle deneysel olarak aynı derecede hasar yaratılan hücrelerde dahi, tamamen aynı cevabın alınması beklenmemelidir. Hücrelerin aşırı H_2O_2 'ye maruz bırakılması DNA'yı parçalara ayıracak ve oluşan parçalar comet yöntemiyle görülemeyeceği için hücreleri parçalamadan, maksimum hasar verebilecek doz seçilmelidir (Panayiotidis vd., 1999). Yapılan çalışmalarda, DNA hasarı yaratmak için kullanılan H_2O_2 konsantrasyonunun, kullanılan hücre tipine göre oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan sperm hücre serileri için belirlediğimiz 12. 25 ve 50 μM hasarlayıcı konsantrasyonları literatürle uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar birçok *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testi geliştirilmiştir. *In vitro* bakteriyel reverse-mutasyon testi (Ames Testi), kromozomal hasar için *in vitro* timidin kinaz testi, *in vivo* mikronukleus testi, kromozom aberasyon testi, floresans *in situ* hibridizasyon (FISH) ve comet analizi bu yöntemler arasında sayılabilir. Bu yöntemlerden comet analizi özellikle kimyasal bileşiklerin genotoksisite üzerine etkisinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir (Bilgici, 2005, Riberio vd., 2009). Bu çalışmada hem çalışma prensibine uygun olması, hem de kolay, hassas, hızlı, ekonomik, güvenilir olması (Collins vd., 1997, Hatmann vd., 2003) gibi diğer yöntemlere olan üstünlüklerinden dolayı comet analizi kullanılmıştır.

Çalışmada üç farklı comet tekniği uygulanmıştır. Bu tekniklerden pratik olarak en uygun olanı optimize edilmiştir. Böylece çalışma prensibi açısından kolay bir yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte zamandan ve kullanılan kimyasallardan da tasarruf edilmiştir.

Çalışılan tekniklerden birincisi olan Metod 1^a (Cabrita vd., 2005) da; lizis çözeltisi sodyum lauroil sarcosine, lityum diiodosalisilat ve dithiothreitol içermektedir. Ayrıca bu teknikte nötralizasyon safhasında hücreler saf metanolde 3 dakika bekletilir.

İkinci teknik olan Metod 2^b (Shen ve Ong, 2000) de ise diğer metodlardan farklı olarak agaroz tabakası 3 kattır. Lizis solüsyonundaki farklılık ise sodyum lauroil sarcosine ve sodyum asetat kimyasallarının kullanılmasıdır.

Çalışılan ve optimize edilen son teknik Metod 3^c (Singh vd., 1998) diğer tekniklere göre uygulaması daha kolay ve ucuz bir tekniktir. Ayrıca içeriğinde lauryl sarcosine, lityum diiodosalisilat, dithiothreitol gibi pahalı ve nörotoksik olduğu kanıtlanan kimyasallar bulunmamaktadır. Bu açıdan yaklaşıldığında tek hücre jel elektroforezi (SSGE) uygulamasında bu kimyasallar kullanılmadan, %1'lik agaroz konsantrasyonu ile iki kat yayma preparat (froti) hazırlanarak, comet tekniği sağlıklı ve uygun bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

Metod 1^a ve Metod 2^b kullanılan ve Metod 3^c de bulunmayan kimyasalların maliyetleri şu şekildedir;

Sodyum lauroyl sarcosine: 100 gr 68,50 Euro, (219,80 TL)

Dithiothreitol: 50gr 59 Euro (189,39 TL)

Lithium diiodosalicilate: 5 gr 176.50 Euro (566,50 TL)

Sodium acetat: 500 gr 34,50 Euro (110,74 TL)

Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda, diğer iki metodda kullanılan bu kimyasallar çalışmadan çıkarıldığında, çalışılan metodun maliyet açısından da optimize edildiği ve daha uygun olduğu gözlemlenmiştir

Sonuç olarak; tez çalışmasında kullanılan ve optimize edilen bu metodun uygulanması, hem zaman tasarrufu hem de çalışmanın maliyetini düşürmek açısından yararlı olduğu gözlemlenmiştir. Optimize edilen bu metodun sazan balığı sperm hücrelerinin DNA hasar analizlerinde kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın farklı hücrelerde kullanılabilirliğini belirlemek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, M. K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M. A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M. S., Khan, M. S. ve Islam, M.M. (2011) Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test, *Chemosphere*, 84,143-149.
- Aitken, R.J. ve Baker, M.A. (2004) Oxidative stress and male reproductive biology, *J Reprod Fertil*, 16,581-88.
- Akal, E. ve Selçuk, M. (2011) Spermatozoon DNA'sının Hasarına Neden Olan Faktörler, Tamir ve Hasar Tespit Mekanizmaları, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg*, 39(2), 284-293.
- Ali, D. ve Kumar, S. (2008) Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline singlecell gel electrophoresis, *Science of the Total Environment*, 405,345-350.
- Başaran,A.A.,(2002) Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektroforezi Uygulamaları 14. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı* 29-31 Mayıs 2002, Ankara, 06100.
- Baynes, S.M., Scott, A.P. (1987) Cryopreservation of Rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thawfertility, *Aquaculture*, 66,53-67.
- Bilgici, B. (2005) Behçet hastalığında genotoksisite, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Samsun.
- Billard, R., Cosson, J., Perche, G. ve Linhart, O. (1995) Biology of sperm and artificial reproduction in carp, *Aquaculture*, 129, 95–112.
- Boissonneault, G. (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair, *FEBS Letters*, 514, 111–114.

- Box, H. C., Dawidzika, J. B. ve Budzinskia, E.E. (2001) Free radical-induced double lesions in DNA, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 856–868.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi, C., Santoro A., Dorr A. M. ve Rizzoni, M. (2004) Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557,119-129.
- Butts, I.A.E. , Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M.K., Słowińska, M., Soler, C. ve Trippel, E.A. (2011) Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., *Theriogenology*, 75,1290-1300.
- Büyükhatoğlu, Ş. ve Holtz, W. (1978) Preservation of trout sperm in liquid or frozen state, *Aquaculture*, 14. 45-49.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L. (2005) Evaluation of DNA damage in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilt head sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm, *Cryobiology*, 50 (2), 144-153.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. (2008) Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells, *Acc Chem Res*, 41(8), 1075-83.
- Canyurt, M. A., Akhan, S. ve Takma, Ç. (2003) Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Spermilerinin Kısa Süre Saklanması Üzerine Bir Araştırma. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 20, 537 – 542.
- Chen, X., Nishida, H. ve Konishi, T. (2003) Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H₂O₂ in cultured NIH3T3 fibroblasts, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26, 282-284.
- Cloud, J.G., Miller, W.H. ve Levanduski, M.J. (1990) Cryopreservation of sperm as a means to store Salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *The progressive Fish-Culturist*, 52, 51-53.

- Collins, A.R., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslova, K. ve Vaughan, N. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 139-146.
- Cotelle, S. ve Ferard, J. F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34,246-255.
- Dikilitaş, M. ve Koçyiğit, A. (2010) Canlılarda “TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ” Yöntemi ile DNA hasar analizi (Comet Analiz Yöntemi), *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(2), 77- 89.
- Ertürk, Ş. (2001) *Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Ankara.
- Evensona, D. P. ve Wixon, R. (2006) Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility, *Theriogenology*, 65, 979–991.
- Fairbairn D.W., Olive P.L. ve O’Neill, K.L. (1995) The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutation Res.*, 339,37-59.
- Fidan, F.A. (2008) DNA HASAR TESPİTİNDE TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ, *Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*.
- Gao, K., Henning, S.M., Niu, Y., Youssefian, A.A., Seram, N.P., Xu, A. ve Heber, D. (2006) The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17,89-95.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E. ve Plewa, M. (2009) The use of higher plants in the Comet Assay” , İn *Issues in Toxicology n° 5 the Comet Assay in Toxicology*, eds A. Dhawan and D. Anderson (London: Royal Society of Chemistry), 98-119.
- Hartmann, A., Agurell, A., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A.R., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. ve Tice, R.R. (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

- Holtz, W. (1993) Cryopreservation of Rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations, *Aquaculture*, 110,97-100.
- Honeyfield, D.C. ve Krise, W.F. (2000) Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatotzoa; Cryopreservation aquatic species, *Advances in World Aquaculture*,7, 49-58.
- Horoz M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., Aslan M., Koylu A.O., Gumus M., Celik H. ve Koksall M. (2006) Assessment of peripheral DNA damageby alkaline comet assay in main tenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation, *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596, 137-142.
- Horvath, A., Miscolczi, E., Mihalfy, S., Osz, K., Szabo, K. ve Urbanyi, B. (2007). Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploid samong larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54,251-257.
- Irawan, H., Vuthiphandchai, V. ve Nimrat, S. (2010) The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm, *Animal Reproduction Science*, 122,236-243.
- Jin, H. H., Lee, J. H. ve Hyun, C. E. (2004) Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14,268-275.
- Joenge, H. (1989) Genetic toxicology of oxygen, *Mutation Research*, 219, 193-208.
- Khosravi, M., Abedi, A., Hayes, R. E., Epling, W. S. ve Votsmeier, M. (2014) Kinetic modelling of Pt and Pt:Pt diesel oxidation catalysts, *Applied Catalysis B: Environmental*, 154–155,16–26.
- Klobucar, G. I. V., Stambuk, A., Pavlica, M., Peric, M. S., Hackenberger, B. K. ve Hylland. K. (2010) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*), *Ecotoxicology*, 19,77-84.
- Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D. M. ve Holt, W. V. (2004) Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm, *Theriogenology*, 61, 1661–1673.

- Lahnsteiner, F. (2009) Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology*, 72, 333–340.
- Lahnsteiner, F., Berger B., Horvath, A., Urbanyi B. ve Weismann, T. (2000) Cryopreservation of spermatozoa in Cyprinid fishes, *Theriogenology*, 54,1477-1498.
- Lee K,J., Choi, J.H., Hwang, Y.P., Chung, Y.C. ve Jeong, H.G. (2008) Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative hepatotoxicity and DNA damage, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2445-2450.
- Lee, F. L. ve Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals, *Mutation Research*, 544, S43–S64.
- Li , P., Hulak, M., Li, Z.H., Sulc, M., Psenicka. M., Rodina, M., Gela, D. ve Linhart, O. (2010) Ice-ageen durance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio L.* *Theriogenology*,74(3), 413–423.
- Lima, R.O.A., Bazo, A.P., Said, R.A., Sforcin, J.M., Bankova, V., Darros, B.R. ve Lin, A., Zhang, X., Chen, M. ve Cao, Q. (2007) Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation, *Journal of Environmental Science*, 19, 596-602.
- Lourenco, J., Castro, B. B., Machado, R., Nunes, B., Mendo, S., Goncalves F., ve Pereira, R. (2010) Genetic, Biochemical, and Individual Responses of the Teleost Fish *Carassius auratus* to Uranium, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58:1023-1031.
- Lubzens , E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F. ve Feigin, P. (1997) Carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa cryobanks strategies in research and application, *Aquaculture*, 155, 13-30.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., ve Feigin, P. (1997) Carp (*Cyprinus carpio L.*) spermatozoa cryobanks — strategies in research and application, *Aquaculture*,155,13-30.

- Magyary, I., Urbanyi, B. ve Horvath, L. (1996) Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization, *J. Appl. Ichthyol.* 12, 117–119.
- Munari, C.C., Alves, J.M., Bastos, J.K. ve Tavares, D.C. (2009) Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay, *Journal of Applied Toxicology*, 30(1), 22-28.
- Ostling, O. ve Johanson K.J. (1984) Microelectrophoretic Study of Radiation Induced DNA Damage In Individual Mammalian Cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291–298.
- Özgöray, E. D. ve Akçay, E. (2010) Deniz balıklarında sperma, yumurta ve embriyo dondurulması, *Lalahan Hayvan Araştırma Enstitü Dergisi*, 50(1), 53-64.
- Panayiotidis, M., Tsolas, O. ve Galaris, D. (1999) Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca⁺²- dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 548-556.
- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. ve Herráez, M.P. (2009) Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant, *Theriogenology*, 74, 282-289.
- Rank, J., Syberg, K., ve Jensen, K. (2009) Comet assay on tetraploid yeast cells, *Mutation Research*, 673,53-58.
- Riberio, D.A., Carlin, V., Fracalossi, A.C.C. ve Oyama, L.M. (2009) Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: An in vitro study, *International Endodontic Journal*, 42, 987-991.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A. ve Litvak, M.K. (2004) Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*, 230, 215–228.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Hadi Alavi, S.M., Hulak, M. ve Linhart, O. (2007) Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos, *Theriogenology*, 67,931-940.

- Rurangwa, E., Kime, D.E., Olleviera, F. ve Nasha, J. P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish, *Aquaculture*, 234, 1–28.
- Rydberg, B, Johanson, K.J. (1978) Estimation of single strand breaks in mammalian cells. DNA Repair Mechanism, Academic Press, New York, 465-8.
- Salvadori, D.M.F. (2005) Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45, 8-16.
- Seçer, S., (1998) Su ürünleri ve Balık yetiştiriciliği. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Üretim Dergisi*, 5/6 , 26-42.
- Seçer, S., Tekin, N., Bozkurt, Y., Bukan, N. ve Akçay E. (2004) Correlation between biochemical and spermatological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 56 (4), 274-280.
- Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, L., Linhartova, P. ve Linhart, O. (2013) Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm, *Animal Reproduction Science*, 139, 127–135.
- Shen, H.M. ve Ong, C.N. (2000) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility, *Free Rad Biol Med*, 28, 529-536.
- Simoniello, M. F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., ve Parma, M. J. (2009) Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, 155-158.
- Singh N. P., McCoy ,M. T., Tice, R.R. ve Schneider , E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Singh, N.P., Danner, D.E. Tice, R.R., Brant, L. ve Schneider, E.L. (1990) Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology, *Mutat. Res.*, 37, 123.

- Spinaci, M., De Ambrogi, M., Volpe, S., Galeati, G., Tamanini, C. ve Seren, E. (2005) Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development, *Theriogenology*, 64, 191–201.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cossonand, J. ve Billard, R. (2000) Cryopreservation of sperm in marine fish, *Aquaculture Research*, 31, 231-243 in Canyurt vd., 2003.
- Tabakoğlu, S. Ş. (2005) Hipofiz uygulanmış ve uygulanmamış farklı boy gruplarına ait aynalı sazan (*cyprinus carpio*)'ların sperm kalitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Adana.
- Tavares, D.C., Barcelos, G.R.M., Silva, L.F., Tonin, C.C.C.T. ve Bastos, J.K. (2006) Propolis induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells, *Toxicology in Vitro*, 20: 1154-1158.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. ve Sasaki Y.F. (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Türk, G., Aksu, E.H. ve Bozkurt, T. (2005) Spermatozoon DNA'sı Hasarı, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20 (1), 85-95.
- Ulutas, O. K., Okusluk, O., Demir, N., Durnaz, E., ve Cok, I. (2008) Determination of possible pollution in Lake Mogan (Ankara) by Comet assay using common carp (*Cyprinus carpio* L), *Toxicology Letters*, 180, S204-S205.
- Ünal, Y. (1998) *Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının COMET assay tekniği ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimler Entitüsü, Ankara.
- Vajpayee, P., Dhawan, A. ve Shanker, R. (2006) Evaluation of the alkaline comet assay assessment, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 483-489.
- Watson, P. F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492.

Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. (2002) Biomarker of invivo oxidative DNA damage; 8-hydroxy-2'-deoxy guanosine], *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 22(5),535-43.

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, R., Storelli, C. ve Vilella, S. (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation , *Cryobiology*, 47, 227–235.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Nazlı YILDIRIM

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: Gaziantep-14/07/1989

Medeni Hali : Bekar

Telefon : 0 542 820 1610

E-posta : yldrmnzl@yahoo.com.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	İnci Konukoğlu Lisesi- Gaziantep	2006
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi – Lisans – MUĞLA	2012
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi – Yüksek Lisans - MUĞLA Fen Fakültesi –Biyoloji Bölümü – Balıklarda Üreme Kalitesi	2016