

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞEKER HASTALIĞININ “ DİABETES MELLİTUS TİP 1 “ KONTROLLÜ
OVARYUM STİMÜLASYON UYGULANMIŞ
FARE OOSİT VE EMBRİYOLARININ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Özcan BUDAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYABETİN KONTROLLÜ OVARYEN STİMÜLASYON UYGULANMIŞ
FARE OOSİT VE EMBRİYOLARININ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Özcan BUDAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süreyya CEYLAN

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi (Proje No: 2009 / 43) tarafından desteklenmiştir.

KOCAELİ

2010

ÖZET

Diyabetin kontrollü ovaryen stimülasyon uygulanmış fare oosit ve embriolarının üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Bu çalışmada kontrollü ovaryen stimülasyon uygulanmış farelerde streptozotosin uygulamasıyla elde edilmiş tip 1 diyabetin oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkilerini araştırdık . Bu çalışmada, 2 aylık en az iki kez düzenli östrus siklusu geçiren cd 1 ırkı dişi ve erkek tip fare kullandık. Bunlar; Kontrol grubu (intraperitoneal sitrat verilen grup), sadece streptozotosin uygulanmış grup (intraperitoneal uygulama), stimülasyon grubu (intraperitoneal PMSG uygulamasından 48 saat sonra β hCG uygulaması yapılan grup), streptozotosin ve PMSG grubu (streptozotosin uygulaması sonucu kan glukoz bakılıp, PMSG uygulamasından 48 saat sonra β hCG uygulaması yapılmış grup) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Streptozotosin uygulaması yapılan fare gruplarında, intraperitoneal streptozotosin uygulamasından dört gün sonra kuyruk veninden kan alınarak glukometre ile kan glukoz değerlerine bakıldı. Gruplar üreme sistemlerinde streptozotosinden meydana gelen tip I diyabetin etkilerinin görülmesi için bir ay bekletildi. Kontrollü ovaryen stimülasyonu uygulanacak grup PMSG enjeksiyonu yapıp 48 saat sonra β hCG uygulaması yapıldı ve 12-13,5 saat sonra sakrifiye edildiler. Normal siklus takibi yapılan grupta her gün aynı saatte vajinal smear alınarak östrus siklus takibi yapıldı ve sakrifiye edildi. Kontrol grubundaki farelerde ise her gün aynı saatte vajinal smear alınarak östrus siklus takibi yapıldı ve sakrifiye edildi. Kontrollü ovaryen stimülasyonu yapılan grup PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra β hCG uygulaması yapıldı ve yaklaşık 12-13.5 saat sonra sakrifiye edilerek oositler toplandı.

Dişi fareler sakrifiye edilerek ovidukt ve ovaryumları alındı. Ampulla ve ovaryen olarak oositleri toplandı. Aynı gün erkek fareleri sakrifiye edip duktus epididimislerden sperm toplandı. Oositler kümülüs ooforus hücrelerinden ayrıldı. Kümülüs ooforus hücrelerinden ayırdığımız oositler morfolojik olarak kalite kriterlerine göre değerlendirildi. Elde edilen sperm ve oositlerle fertilizasyon için IVF yapıldı. IVF uygulamasından 16 – 18 saat sonra fertilizasyon değerlendirilmesini yapıldı. Oluşan embrioların blastosist aşamasına kadar takibi yapılarak morfolojik olarak kalite yönünden değerlendirildi daha sonra grupları

birbirleriyle kıyaslanarak, bulguları değerlendirildi.

Bu çalışmanın sonucunda; görsel ve istatistiksel olarak diyabetin oosit ve embriyo morfolojileri üzerine kalite yönünden olumsuz yönde etkilediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Kotroll overyan stimülasyon, PMSG, streptozotosin, β hCG.

ABSTRACT

Investigation of diabetes effects on oocyte and embryos of controlled ovarian hyperstimulated mice.

In this study; we investigated the effects of type I diabetes, that was achieved by streptozotocin injection, on quality of controlled ovarian hyperstimulated mice oocytes and embryos. In our study; we used 2-month year old, CD I type female (and male) mice that had at least two regular estrus cycles. These were classified into four as: control group (having intraperitoneal citrate injection), only streptozotocin group (intraperitoneal), stimulation group (intraperitoneal PMSG+ β hCG group), diabetes and stimulation group (streptozotocin and PMSG group). In streptozotocin injected mice groups; blood was withdrawn from tail vein and blood glucose level was measured with glucometer four days after intraperitoneal streptozotocin injection. These mice were kept for approximately one month in order to see the effects of type I diabetes on their reproductive systems. PMSG injection and 48 hours after PMSG injection, β hCG injection was done to controlled ovarian hyperstimulated group and they were sacrificed after 12-13,5 hours. In normal cycle follow-up group; estrus cycle follow-up was done by taking vaginal smear at same time interval every day and then, they were sacrificed. In control group mice, estrus cycle follow-up was done by taking vaginal smear at same time interval every day and then, they were sacrificed. In controlled hyperstimulated mice, β hCG injection was done 48 hours after PMSG injection and they were sacrificed after approximately 12-13,5 hours and oocytes were picked up.

Female mice were sacrificed and their oviduct and ovaries were dissected. Oocytes were collected from ampulla and ovaries. In the same day, male mice were sacrificed and sperm was collected from epididymis. Oocytes denudated and cumulus cell complexes were removed. Morphological quality criteria of denuded oocytes were assessed. IVF was performed with oocytes and sperm cells for fertilization. Fertilization check was done 16-18 hours after IVF. Embryos were followed up to blastocyst stage and their morphological quality assessment was done. Groups were compared and findings were discussed.

As a consequence; we found that diabetes has negative effects on oocytes and embryos as a means of morphological quality visually and statistically.

Key Words: Controlled ovarian hyperstimulation, PMSG, streptozotocin, β hCG

TEŞEKKÜR

Histoloji ve embriyoloji Anabilim dalındaki yüksek lisans tez çalışmam sırasında eşsiz destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım;

Prof. Dr. Süreyya Ceylan'a

Eğitimim boyunca her türlü bilgi birikimlerini, desteğini ve deneyimlerini paylaştığı değerli hocam;

Doç. Dr. Eray Çalışkan'a

Eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri değerli hocalarım;

***Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz, Prof. Dr. Hakkı Dalçık, Doç. Dr. Serdar Filiz,
Doç. Dr. Süheyla Gonca, Yard. Doç. Dr. Yusufhan Yazır'a***

Değerli Çalışma Arkadaşlarım;

Uzm. Mol. Bio. Ender Yalçınkaya,

***Dr. Pelin Coştur Bıyıktaş, Bio. Fatih Karakaya, Bio. Elif Gelenli, Bio. Gözde Yazıcıoğlu,
Bio. Begüm Alyürük***

ve

Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezi Tüm Çalışanlarına,

Sonsuz Desteğini ve Sevgisini Her Zaman Yanımda Hissettiğim;

Annem ve Kardeşlerime

Her Zaman Yanımda Olan Sevgili Eşim;

Özlem Budak'a

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfertilite	4
2.1.1. Fertilitiyi Etkileyen Hastalıklar ve IVF	5
2.1.2. Kronik Hiperandojenik Anovulasyon	6
2.1.3. Hiperprolaktinemi ve IVF-ET	7
2.1.4. Troid Bozuklukları Ve IVF-ET	7
2.1.5. Diabetes Mellitus Ve IVF-ET	7
2.1.6. Endometriosis ve IVF-ET	8
2.1.7. Genital Tüberküloz ve IVF- ET	8
2.2. Diyabetes Mellitus Tanımı	8
2.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus Ve Gebelik	9
2.2.2. Tip 1 Diyabetes Mellitusa Neden Olan Olası Biyokimyasal Mekanizmalar	10
2.2.3. Tip 1 Diyabet Modeli Oluşturulmuş Hayvanlarda Diyabetin Embriyo Gelişimine Etkileri	11
2.2.4. Tip 1 Diyabet Ve Menstruasyon Siklusu	13
2.2.5. Oositlerin Doğum Öncesi (prenatal) Olgunlaşması	16
2.2.6. Oositlerin Doğum Sonrası (prenatal) Olgunlaşması	17
2.3. Oosit Kalitesinin Morfolojik Kriterleri ve Embriyo gelişimi üzerine etkileri	18
2.3.1. Oosit mayotik matürasyonu	18
2.3.2. Oosit kalitesinin embriyo gelişimi üzerindeki etkisi	19
2.3.3. Oosit kalitesinin morfolojik kriterleri	19
2.3.4. Kümüls-oozit kompleksi	20

2.3.5. Sitoplazma ve polar cisimcik.....	20
2.3.6. Perivitellin Aralık Ve Zona Pelüsida.....	22
2.3.7. Mayotik İğ	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Deney Hayvanları	24
3.1.1. Diöstrus:	24
3.1.2. Proöstrus:	25
3.1.3. Östrus:.....	25
3.1.4. Metöstrus:	25
3.2. Kontrollü Overyan Stimülasyon ve Oosit Toplanması:	25
3.2.1. Kontrollü Ovülasyon Stimülasyon:	26
3.2.2. Oosit Toplanması:	26
3.3. IVF Protokolü :.....	26
3.3.1. Sperm Toplama:	26
3.3.2. Sperm Kapasitasyonu:	26
3.3.3. Kümüls-Oosit Kompleksi Yıkama:	27
3.3.4. İnsaminasyon:	27
3.3.5. Zigot Yıkama ve Embriyo Kültürü:	28
3.3.6. Embriyo Kültürü:.....	30
3.4. Gruplar ve Diyabet Oluşturma Yöntemi:	34
3.4.1. Kontrol Grubu: (n= 5)	34
3.4.2. Stimülasyon Grubu : (n= 8).....	34
3.4.3. Diyabet + Stimülasyon grubu : (n= 10).....	34
3.4.4. Diyabet Grubu (n= 8)	35
3.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar , Medyumlar ve Cihazlar	35
3.5.1. PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotropin)	35
3.5.2. Streptozotosin	35
3.5.3. Yıkama Medyumu	36
3.5.4. Fertilizasyon ve Kapasitasyon Medyumları	36
3.5.5. Gelişim Medyumu (KSOM).....	37
3.5.10. İstatiksel Veriler	38

4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ.....	73
7. KAYNAKLAR.....	75
8. ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	:	Mikro litre
µm	:	Mikro metre
AH	:	Assisted Hatching
ART	:	Assisted Reproductive Technology
DJN	:	Dejenere
dL	:	Desi litre
ET	:	Embriyo Transferi
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
G	:	Gram
GAPDH	:	Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz
GIFT	:	Gamete Intrafallopian Transfer
GnRH	:	Gonadotropin Realesing Faktör
GV	:	Germinal Vesikül
GVBD	:	Germinal Vesikül Break Down
h CG	:	Human Koryonik Gonadotropin
ICSI	:	Intracytoplasmic Sperm Injection
IUI	:	Intrauterin Insemination
IVF	:	In Vitro Fertilization
İ.P.	:	İntraperitoneal
İM	:	İnverted Mikroskop
kg	:	Kilogram
KOH	:	Kontrollü Ovaryan Hiperstimulasyon
LH	:	Luteinizan Hormon
MESA	:	Mikro Cerrahi İle Epididimal Sperm Aspirasyonu
Mg	:	Miligram
MI	:	Mayoz I oosit
MII	:	Mayoz II Oosit
ml	:	Mili Litre
PC	:	Polar Cisimcik

ZP	:	Zona Pelüsida
PCOS	:	Polikistik Over Sendromu
PGT	:	İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı
PMSG	:	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
POST	:	Peritoneal Oocyte and Sperm Transfer
PZD	:	Partial Zona Dissection
SUZI	:	Subzonal Insemination
TESE	:	Testiküler Sperm Enjeksiyon
TET	:	Tubal Embriyo Transfer
Tip I	:	İnsuline Bağımlı Diyabet
Tip II	:	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet
YÜT	:	Yardımla üreme teknikleri
ZIFT	:	Zygote Intrafallopian Transfer

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Ayıklama işleminden önce Kümüls - Oosit kompleksi görülmektedir, 40x Inverted mikroskop.....	27
Şekil 3.2. IVF işleminde spermilerin zona pelisudaya penetrasyonu görülmektedir.10x Inverted mikroskop.....	28
Şekil 3.3.Spermilerin oosit- kümülüs kompleksine penetrasyonu görülmektedir. 10x İverted Mikroskobu.....	29
Şekil 3.4.Spermilerin MII oosite penatrasyonu görülmekte,10x inverted mikroskop.....	29
Şekil 3.5. Spermin zona pellisudaya tutunması görülmekte, 10x İverted Mikroskop.....	30
Şekil 3.6. MII oosit görülmektedir, kutup cisimciği ok ile gösterilmiştir. 10x inverted mikroskop görüntüsü.	30
Şekil 3.7.Ayıklama işleminden sonra MI ve GV oositler görülmektedir, MI oositler kırmızı ok ile, Germinal veziküller siyah ok ile gösterilmektedir, 10x inverted mikroskop	31
Şekil 3.8. Dejenere oositler görülmektedir,10x inverted mikroskop	31
Şekil 3.9.Birinci gün kontrol grubu iki blastomerli embriyolar görülmektedir.10x inverted mikroskop.....	32
Şekil 3.10. Solda dört blastomerli 2.gün , sağda sekiz blastomerli 3. gün kontrol grubu embriyoları görülmektedir, 10x İverted mikroskop	32
Şekil 3.11.Kompaklaşmış (üstte sağda) ve morula (solda altta) safhasındaki mebriyolar Görülmektedir,10x inverted mikroskop	33
Şekil 3.12. Beşinci gün blastosistgörülmektedir, 40x inverted mikroskop	33
Şekil 4.1. Doğal siklus takibi 1. gurup farelerden ampulladan toplanan Dejenere oositler görülmektedir, 40x inverted mikroskop.	39
Şekil 4.2. Dejenere (siyah ok ile gösterilmiştir) oositler ve perivitellin aralığı geniş MI	40
oositler(kırmızı ok ile gösterilmiştir) 10x inverted mikroskop.....	40
Şekil 4.3. Kategori A kümülüs – oosit kompleksi, parlak stoplazma, yoğun kümülüs hücre dizileri görülmektedir,10x inverted mikroskop.....	41
Şekil 4.4. Kategori A kümülüs – oosit kümesi görülmektedir, 40x inverted mikroskop.	41
Şekil 4.7. Kategori C kümülüs – oosit kompleksi görülmektedir, 10x inverted mikroskop.	43

Şekil 4.8. Stoplazması koyu Kategori C kümlüs – oosit kompleksi görülmektedir, 10x inverted mikroskop.....	43
Şekil 4.9. Perivitellin aralığı normal genişlikte olanlar kırmızı ok ile,	44
Perivitellin aralığı daha geniş olan oositler ise siyah ok ile gösterildi,40x inverted mikroskop	44
Şekil 4.10 . Zona pellisuda kalınlıkları ölçülmüş oositler görülmektedir,40x inverted mikroskop.....	45
Şekil 4.11. Zona pellisuda kalınlıkları ölçülmüş kontrol grubu MII oositler görülmektedir,40x inverted mikroskop.....	46
Şekil 4.12. Diyabet çalışma grubu zona pellisuda kalınlığı ölçülmüş MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop.....	46
Şekil 4.13. Diyabet çalışma grubu zona kalınlığı fazla olan MII oosit görülmektedir,. Granüler stoplazma ve fragmente polar cisimcik kırmızı oklarla gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop	47
Şekil 4.14. Diyabet grubu kalın zona pellisudalı MII oosit görülmektedir,40x inverted mikroskop.....	48
Şekil 4.15 Kontrol grubu az stoplazma granülasyonu görülen MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop.....	49
Şekil 4.16. Diyabet grubundaki fazla granüler stoplazmalı MII oositler görülmektedir, 40x inverted mikroskop.....	49
Şekil 4.17. Diyabet çalışma grubu büyük polar cisimciği olan MII oosit görülmektedir. Solda 10x , sağda 40x inverted mikroskop.....	50
Şekil 4.18. Diyabet grubu büyük polar cisimcikli MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop.....	51
Şekil 4.19. Büyük polar cisimcikli diyabet grubu MII oositler görülmektedir,10x inverted mikroskop.....	51
Şekil 4.20. Birinci gün 2 blastomerli kontrol grubu embriyolar, solda fragmentasyon içermeyen embriyo , sağda fragmentasyonlu embriyo görülmektedir,40x inverted mikroskop	52
Şekil 4.21. Birinci gün 2 blastomerli kontrol grubu embriyolar görülmektedir, 40x inverted mikroskop.....	52

Şekil 4.22. Birinci gün diyabet grubu 2 blastomerli fragmantasyon içeren embriyolar görülmektedir, Fragmantasyonlar ok ile gösterilmiştir. 40x İverted Mikroskop	53
Şekil 4.23. Birinci gün diyabet grubu embriyoları Sol alttaki blastomerleri eşit embriyo görülmekte, sağ üstte farklı büyüklükte blastomer ve fragmantasyon içeren embriyolar görülmektedir, 40x İverted mikroskop	53
Şekil 4.24. Solda kontrol grubu 2. gün 4 blastomerli embriyo, sağda diyabet grubu 1. gün fragmantasyon içeren embriyo görülmektedir, Fragmantasyon ok ile gösterilmiştir40x İverted mikroskop	54
Şekil 4.25. Diyabet grubu 2. gün embriyoları görülmektedir. Aynı gün embriyolarının farklı gelişim ve fragmantasyon durumları görülmektedir. 40x İverted mikroskop	54
Şekil 4.26. Kontrol grubu solda 2. gün 4 blastomerli sağda 3. gün 8 blastomerli embriyoları görülmektedir, 40x İverted mikroskop	55
Şekil 4.27. Diyabet grubu 2. gün embriyoları . Farklı büyüklükteki blastomerler ve	55
fragmantasyonlar görülmektedir, 40x İverted mikroskop	55
Şekil 4.28 Kontrol grubu 3. gün embriyoları görülmekte. Ok ile gösterilen kompaktlaşmış embriyo; diğer embriyolarda fragmantasyon ve blastomer asimetrisi görülmektedir. 40x İverted mikroskop	56
Şekil 4.29. Kontrol grubu 2. gün embriyoları, sağda kompakt solda farklı büyüklükteki blastomerleri olan embriyolar görülmektedir,40x İverted mikroskop.....	56
Şekil 4.30 Kontrol grubu 4. gün embriyoları görülmektedir,40x İverted mikroskop	57
Şekil 4.31 Diyabet grubu 5. gün blastosist görülmektedir,40x İverted mikroskop	57
Şekil 4.32. Kontrol grubu 5. gün blastosist gösterilmiştir,40x İverted mikroskop	58
Şekil 4.33. Kontrol grubuna ait hatching aşamasındaki blastosist gösterilmiştir 40x İverted mikroskop	58
Şekil 4.34. Hatched olmuş kontrol grubu blastosist gösterilmiştir 40x İverted mikroskop	59
Şekil 4.35. Diyabet grubu hatched olmuş blastosist gösterilmiştir, 40x İverted mikroskop ...	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge:4.1. Stimülasyon ve Stimülasyon Grubu İstatistik Verileri.....	60
Çizelge:4.2. Stimülasyon Grubu İstatistik Değerleri.....	61
Çizelge4.3. Stimülasyon+ Diyabet Grubu İstatistik Verileri.....	62

1. AMAÇ VE KAPSAM

İnsüline bağımlı diyabetes mellitus, insülin üretimindeki eksikliğin neden olduğu kan glikoz seviyelerinde yükselme ile karakterizedir. Glikoz seviyesindeki bu yükselmenin gebelerde düşük, neonatal hastalıklar ve ölümler, konjenital malformasyonlar gibi ciddi patolojik komplikasyonlar ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Colton ve ark.,2003). Alınan tüm önlemlere rağmen diyabetin kontrol edilemediği annelerden doğan bebeklerde, doğum defektleri ve erken fetal kayıplar hala büyük bir problem olup, yüksek kan glikoz değerleri ve ketonların plasentadan embriyoya geçerek doğum defekti oranlarının artışına neden olduğu bildirilmektedir. Böylelikle genel neonatal popülasyona göre diyabetik annelerin yeni doğanlarında konjenital malformasyon oranının oldukça fazla olması (Sakamakı ve ark., 1999), bu konjenital malformasyonların gebeliğin 7. haftasından önce oluşarak; anensefali, spina bifida, hidrosefalus gibi çeşitli merkezi sinir sistemi ve kardiyak anomalilerden oluşan kaudal gerileme sendromunu oluşturması söz konusudur. Deneysel çalışmalar ile söz konusu konjenital malformasyonların, intrauterin ortamda fluktuasyon gösteren serum glikoz değişikliğinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Sakamakı ve ark., 1999). Günümüzde tanımlanan bu noktalar konjenital malformasyonlardaki fizyopatolojiyi açıklayamamaktadır. Bu durum, diyabette, serum glikoz seviyesindeki fluktuasyonları profilaktik olarak önlemenin dışında gerçek önleyici ya da tedavi edici protokollerin geliştirilmesini önlemektedir.

Diyabetik annelerin yeni doğanlarında konjenital malformasyonların gebeliğin 7. haftasından önce oluştuğu ve bu konjenital malformasyonların yapılan pek çok hayvan deneylerinde intrauterin ortamda serum faktörlerinin değişikliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Sakamakı ve ark., 1999).

İnsanlarda, T1P I veya insüline bağımlı diyabet, konjenital anomeli riskinin artması ve düşük gibi olumsuz prenatal sonuçlar doğurarak gebeliğe negatif etkide bulunan sonuçlara neden olur(Greene, MF. 1999, Farrell T., 2002). Aynı şekilde, anneye bağlı tip I diyabet fare ve sıçangillerde implantasyon esnasında da etkili olduğu görülmüştür (Moley KH., 1998; Chi

MM., 2000). Daha önce yapılan laboratuvar çalışmalarında embriyoların tek hücreli gametler ve zigot safhasından önce etkilendiği sonucuna varılmıştır. Streptozotosin ve alloxine ile indüklenen hipoinsülinemik ve hiperglisemik farelerde zigotların in vivo da human koryonik gonadotropin (hCG) uygulamasından 48 saat sonra diyabetik olamayan farelerle karşılaştırıldığında zigotlar düşük yüzde ile iki hücreli embriyo gelişimi göstermişlerdir (Diamond MP., 1989). Benzer şekilde, diyabetik farelerden elde edilen ve in vitroda kontrol medyumunda kültüre edilen iki hücreli embriyolar, kontrol grubu farelerle karşılaştırıldığında blastosist aşamasına ciddi bir şekilde geç ulaşır. Bu bilgiler ışığında takip edilen diyabetik farelerden elde edilen oositler, germinal vesikül aşamasından (GV), germinal vesikül break down (GVBD)' dan M1 aşamasına geç ulaşır. Bu bulgular hipergliseminin öncelikle embriyolar üzerinde oositlere göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Benzer çalışmalarda aynı sonuçlar görülmüştür (Colton SA., 2002; Chi MM., 2003). Hipergliseminin oositler ve folüküllerin üzerine etkilerini incelemek için yapılan çalışmalarda oosit maturasyonu, gelişimi ve granüloza hücrelerinin oositleri çevrelemesi incelenmiştir. h CG enjeksiyonundan sonra anneğe bağlı diyabetler, diyabetin oosit maturasyonu ve folüküller ve etrafındaki kümülüs ooforus üzerinde negatif yönde etkili olduğu görülmüştür.

Kemirgenlerle yapılan çalışmalarda diyabetin embriyo implantasyonu öncesi ve sonrası embriyolar üzerinde negatif etkide bulunduğu gözlenmiştir. Kongenital malformasyon görülme sıklığı diyabetik annelerde normal annelere göre 3-4 kez daha fazla görülmektedir (Becerra JE., 1990). Hem kimyasal hem de doğal gelişen diyabet vakalarında embriyoların daha fazla fragmantasyon içerdiği ve daha fazla dejenere olduğu gözlenmiştir (Lea RG., 1996).Yine diyabetik farelerde blastosist aşamasındaki hücre sayısı kontrol grubu farelerdeki blastosist aşamasındaki hücre sayısından daha azdır (Pampfer S., 1990). Diyabetik ratlarda yapılan çalışmalarda iki hücreli embriyoların %50 sinin kontrol grubu ratlara göre daha az sayıda sekiz hücreli embriyolara gelişim gösterdikleri bulunmuştur. Yüksek glukoz seviyesi in vitro kültür medyumlarında embriyo gelişimine zarar verir ; fruktoz, sorbitol gibi ara metabolitlerde ve ketonlarda bu durum devam eder .Tek başına yüksek doz glukoz veya keton ile kombinasyonu embriyoların blastosist aşamasında doza bağımlı gelişim göstermesine neden olur. Bilinen bu duruma karşın diyabetik rat ve fare embriyoları in vitroda normal glukoz ve pirüvat ihtiyacı gösterirler.Bu anomali belki kalıcı bir durum değildir, fakat

hiperglisemi sonucu gelişen metabolik durum sonucu kalıcı olmaya çalışır(Dufresnes E., 1993).

Bugüne kadar yapılan diyabetle ilgili *in vitro* çalışmalar, diyabetin embriyo gelişimine etkisini araştıran çalışmalar ile sınırlıdır. Diyabetli ve sağlıklı hayvanlardan elde edilmiş embriyoların morfolojik özelliklerine göre incelenmiştir (Pampfer ve ark., 1990).

Diyabet ve gebelik patogenezini çalışan araştırmacılar ise, anovulasyon, siklus düzensizliği ve oositte meydana gelen değişiklikler ile başlayan bir diyabetik patolojiyle ilgili noktaları açıklayan bilgilere ulaşmışlar ancak ortaya koydukları bu bilgilere ve diğer tüm bilinenlere rağmen; maternal diyabet ilişkili komplikasyonların ilerleyişine ait etiolojinin net olarak anlaşılamadığını belirtmişlerdir . Embriyo ve fötüs incelemeleri esnasında tek bir *in vivo* etkenin doğrudan etkisinin incelenmesi, ancak *in vitro* çalışmalar ile olabilmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda diyabetin oosit ve embriyo gelişimi üzerine etkilerini incelemek amaçlanmaktadır. Çalışmamız diyabetle ilgili olarak kendi alanında oosit ve embriyo gelişimini birlikte araştıran yol gösterici bir çalışma olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

İnsan yaşamı fertilizasyonla başlar. Tek hücreli zigottan çok hücreli organizmanın gelişimi, mükemmel bir şekilde programlanmış bir dizi olayın sonucudur. Bu süreçte oluşan herhangi bir aksama, bu düzenlemenin bozulmasına ve infertiliteye yol açabilir. İnfertilite fizyolojik, psikolojik ve sosyolojik etkileri olan önemli bir sağlık sorunudur.

İnfertilite, çiftlerin en az bir yıl süreyle hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen çocuk sahibi olamamalarıdır . Üreme çağındaki çiftlerin % 10-15 'i infertildir. Primer infertilite daha önce hiç gebelik oluşmamasını tanımlarken, sekonder infertilite daha önce gebelik sağlanması ancak korunmasız ilişkiye rağmen yeni bir gebeliğin olmaması durumudur. Ancak 30'lu yaşlarının sonundaki kadınlarda infertilite görülme oranı % 25 'e ulaşırken, 40 yaşından sonra fertilitede azalma daha hızlı olur (Speroff L . 1999).

İnfertilite tedavisindeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler başarı oranlarının giderek artmasını sağlamıştır. Yardımcı Üreme Teknikleri (assisted reproductive technology, ART) İnsan üreme hücrelerinin (oosit ve sperm) vücut dışında fertilizasyonu ile embriyo elde edilmesini sağlayan yöntemlerin tümünü kapsar.

Yardımcı üreme teknikleri; IUI (Intrauterin Insemination), IVF (In Vitro Fertilization), GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), ZIFT (Zygote Intrafallopian Transfer), PZD (Partial Zona Dissection), SUZI (Subzonal Insemination), TET (Tubal Embriyo Transfer) ve POST (Peritoneal Oocyte and Sperm Transfer) gibi geliştirilmiş değişik yöntemleri içerir. İlk ve hala en sık kullanılan yöntem IVF' dir.

Diğer yöntemler daha invaziv olup artık günümüzde kullanım alanları azalmaktadır. Son yıllarda spermin elde edilme tekniği ve sperm enjeksiyonu YÜT' de önem kazanmıştır. Tek spermin oosit sitoplazması içine enjeksiyonu ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), testislerden sperm çıkartılması; TESE, mikro cerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu; MESA, yardımcı embriyo tutunma tekniği (assisted hatching) ve implantasyon öncesi genetik tanı (PGT) geliştirilen diğer teknolojilerdir.

IVF, eksojen gonadotropinler kullanılarak yapılan kontrollü ovaryan hiperstimulasyon (KOH) ile başlar. Sonrasında gelişen foliküller transvajinal ultrasonografi eşliğinde toplanır.

Foliküllerden elde edilen oositler laboratuvar ortamında eşten alınan uygun spermler ile fertilize edilir. İşlem sonucunda elde edilen embriyolar transservikal yoldan anne adayını uterusuna transfer edilir. Bugün itibarıyla tüm dünyada yaklaşık 3 milyon çocuk yardımcı üreme teknikleri kullanılarak dünyaya gelmiştir (Forti G, . 1998)

2.1.1. Fertilitiyi Etkileyen Hastalıklar ve IVF

IVF ve embriyo transferi (ET), YÜT içinde en eski, fakat en yaygın olanıdır. YÜT; eksojen gonadotropinler ve gonadotropin salgılatıcı hormon analogları (GnRH-a) kullanımı ile KOH, oosit toplanması , IVF, ET ve kriyoprezarvasyon basamaklarını içermektedir (WHO Technical Report Series, 1992). Tubal infertilite, izah edilemeyen infertilite, ovulasyon bozuklukları gibi klinik durumları, önemli kullanım alanlarıdır. Bunun yanında bireyin fertilitiyini etkileyen ve konvensiyonel tedavilere yanıt alınamayan olgularda da, fertilitiyi artırıcı yöntem olarak IVF-ET kullanılmaktadır. IVF-ET daha çok kadına ait infertilite nedenleri için kullanılmakta olup, erkek infertilitesinde ise giderek artan bir şekilde yardımcı üreme teknikleri ve ICSI uygulanmaktadır.

Bireyin üreme potansiyelini belirleyen en önemli parametre, hipotalamo-hipofizerovarian aksın normal işleyişidir. Bunun yanında, endokrin organların birbirleriyle eşgüdümse çalışması gerekmektedir. Normal ovulatuvar bir siklus için bu uyum gereklidir. Bu aksın işleyişindeki problemler, normal ovulasyondan sapma ve fertilitiyi azaltan

problemleri doğurmaktadır. Bu problemlerin başında, kronik anovulasyon, hiperandrojenizm, obezite, polikistik over sendromu, hiperprolaktinemi, adrenal hiperplazi, tiroid disfonksiyonları gelmektedir. Tün sayılan bu klinik durumlar, kronik hiperandrojenik anovulasyon başlığı altında toplanmaktadır . Ayrıca endometriosis, pelvik bölgede gelişen enfeksiyonlar ve genital tüberküloz ile diabetes meliitus gibi endokrinolojik sorunlar da, ovulatuvar süreçte etkin olmakta, fertilitite hızını düşürmekte ve IVF-ET kliniklerde, olgu değerlendirmesinde sıkıntılar yaratabilmekte, tedaviye yanıtı güçleştirmektedir.

2. 1.2. Kronik Hiperandrojenik Anovulasyon

Polikistik Over Sendromu (PCOS):

Polikistik over Sendromu (PCOS), üreme çağındaki kadınlardaki, genel prevalans oranı %5 civarındadır. 1990 yılında, Dünya Sağlık Örgütü tarafından, diğer endokrinolojik patolojiler (adrenal, tiroid disfonksiyonu, hiperprolaktinemi vs.) oligomenore, klinik ve laboratuvar hiperandrojenizm birlikteliği olarak tanımlanmıştır . Bu tabloya, insülin rezistansı ve gonadotropin salınım bozuklukları da eklenmektedir.

Ovulasyon bozukluğunun önemli bir nedeni de, olgularda görülen insülin rezistansı ve hiperinsülinizmdir . İnsülin yüksekliği, artan follikül atrezi hızına, azalmış seks hormon bağlayıcı protein seviyesi ve sonucunda, artmış serum testosteron değerlerine neden olmaktadır (Nestler ve ark., 1989, Poretsky ve ark., 1991).

Son zamanlarda, PCOS patofizyolojisinde, kısır döngüyü oluşturan, hiperandrojenizm kliniğini bozabilecek yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. İnsülin doku hassasiyetini arttıran ilaçlar (metformin, thiazolidinedione türevi pioglitazone, rosiglitazone, tioglitazone vb.), PCOS olgularında, ovulasyon restorasyonu için kullanılmaktadır (Yaralı ve ark., 1996, Hasegawa Ve Ark., 1999).

2.1.3. Hiperprolaktinemi ve IVF-ET

Serum prolaktin yüksekliği, hipofizden lüteinizan hormon sekresyonunu artırmakta, GnRH salınımını engellemekte ve, adrenal androjenlerini artırarak anovulasyona neden olmaktadır (Asuakı ve ark., 1993). Hiperprolaktinemi yapan nedenlerin ayırıcı tanısı iyi yapılmalı ve nedene göre tedavi planlanmalıdır.

2.1.4. Troid Bozuklukları Ve IVF-ET

Troid bezinin normal olarak çalışması, ovulasyon ve menstrüel siklus için gereklidir. Fertiliteyi artırma amacı ile , tiroid fonksiyonlarının yerine getirilmesi gerekmektedir. Öncelikli tedavi yaklaşımları, tiroid bezinin fizyolojik oranda hormon sentezini yapabilmesini sağlamaktır. Bu nedenle, tiroid hormon preparatları, kullanılmalıdır. Zollner ve arkadaşları(2001) tubal infertilite nedeni ile IVF-ET planlanan olgularda, endokrinolojik açıdan yaptıkları hormonal değerlendirmede, ilk siklusta gebelik görülen olguların, olmayanlara göre daha yüksek troid stimüle hormon ve düşük testosteron seviyelerine sahip olduklarını saptamışlardır.

2.1.5. Diabetes Mellitus Ve IVF-ET

Diabetes mellitus olgularında IVF-ET endikasyonu, normal popülasyona göre farklılık göstermemektedir. IVF-ET başarısını etkileyen faktörlerin başında, prekonsepsiyonel endokrinolojik değerlendirmenin normal olması gerekliliği gelmektedir. Kan şekeri yükselmesi kontrol altına alınmadan yapılan IVF-ET sikluslarında, gebelik kayıpları ve konjenital anomali hızında artış görülmüştür . Uygun kontrollerle kan şekeri düzenlenmiş bir şekilde planlanan IVF-ET sikluslarında, elde edilen ve fertilize olan oosit sayısı, siklus başına gebelik hızları, diabetes mellitus olmayan olgular ile benzerlik göstermektedir (Hovay H. ve ark. , 1995)

2.1.6. Endometriosis ve IVF-ET

Endometriosisli olgularda fertilité genelde azalmaktadır. Ayrıca kadının yaşı ve infertilite süresi de, endometriosisde fertilitéyi etkileyen diğer faktörlerdir.

2.1.7. Genital Tüberküloz ve IVF- ET

Genital tüberküloz, genital bölgede, özellikle tuba uterina ve endometriyuma verdikleri hasar ile, fertilité hızını direkt etkilemektedir . Endometrium kalınlığının atrofik sınırlarda olduğu veya tüberküloz endometrit histopatolojik tanısı olan olgularda, gebelik şansı minimal olmaktadır (Soussis I. ve ark. , 1998) .

2.2. Diyabetes Mellitus Tanımı

Diyabetes mellitus dünya popülasyonunun %5'inden fazlasını etkileyen ana sağlık problemlerinden olup, çok yaygın bir metabolik hastalıktır . Diyabetes mellitusun, insüline bağımlı Tip I (IDDM; İnsulin-dependent diyabetes mellitus) ve insüline bağımlı olmayan Tip II (NIDDM; Non-insulin-dependent) diyabete β hücrelerinin otoimmün hasarına neden olur . Dolayısı ile insüline bağımlı Tip I diyabetes mellitusda, fonksiyonel β hücresi ya hiç yoktur ya da oldukça azdır (Adısakwattana S. ve ark. 2005).

Günümüzde dünyada 200 milyondan fazla insanı etkileyen bu heterojen hastalığın dünya çapındaki prevalans oranının 2000 yılında 150 milyon olduğu açıklanmıştır. Diyabetin 2010 yılında 220 milyon insanı etkileyeceği, 2025 yılında ise bu sayının 2 katına çıkacağı tahmin edilmektedir . Günümüzde diyabet, insülin tedavisi veya oral hipoglisemik ajanlar ile tedavi edilmektedir. Buna rağmen bu tedavi diyabetin neden olduğu retinopati, nefropati, nöropati, ateroskleroz ve kalp hastalıkları gibi yaşam kalitesi ve süresini azaltan şiddetli komplikasyonları önlemede yeterli değildir . Yapılan pek çok geniş kapsamlı çalışma, glikoz homeostazisini sağlamanın diyabet tedavisinde başlıca ilerleme olacağını kanıtlamıştır (Matl R. 2005; Soria B., 2005).

İnsan organ transplantasyonlarında ise verici dokunun sınırlı temini ana sorundur. Embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu uygun ve yeterli sayıda β hücrelerinin eldesi için yeni bir olasılık ortaya çıkarmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ile embriyonik kök hücrelerinin *in vitro*da spontan olarak, insülin üretebilen β hücre markırları hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir . Ayrıca fare embriyonik kök hücrelerinden üretilen insülin salgılayan hücrelerin streptozotosinuygulanmış farelerde diyabet tedavisini *in vivo* olarak da sağladığı tespit . Sonuçta, pankreas Langerhans adacıklarındaki β hücre kaybını yenilemenin tedavide en iyi yol olduğu düşünülmektedir . Ancak, hastalığın tedavisi için kullanılan transplantasyonun en önemli engeli insülin üreten hücrelerin sınırlı kaynağıdır (Thang J. ve ark., 2006).

2.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus Ve Gebelik

Diyabetik gebelikte konjenital malformasyonlar ve erken fetal kayıplar hala ana komplikasyonlar olarak bildirilmektedir . Alınan tüm önlemlere rağmen diyabet kontrolünün zayıf olduğu kadınlarda, diyabetik annelerden doğan bebeklerde doğum defektleri hala büyük bir problemdir . Yüksek kan glikoz değerleri ve ketonların plasentadan embriyoya geçerek doğum defekti oranlarının artışına neden olduğu açıklanmaktadır. Bu nedenle diyabetik bireylerde gebe kalınmadan önce uygun kan glikoz değerlerinin kontrolü çok önemlidir. Pekçok kadın embriyo 2-4 haftalık olana kadar gebe olduğunu fark etmez. Annenin kan glikoz değerlerinin erken gelişim süreci olan gebeliğin ilk 6 haftası boyunca embriyonun gelişen organlarını etkilediği tespit edilmiştir. Erken gelişim haftalarının gelişen embriyo için çok önemli olması nedeni, yüksek kan glikoz değerleri doğum defektlerine yol açabilir. Bu nedenle diyabetli kadınlarda gebelik mutlaka önceden planlanmalıdır (Vercheval M. ve ark. 2000).

2.2.2. Tip 1 Diyabetes Mellitusa Neden Olan Olası Biyokimyasal Mekanizmalar

Tip I diyabetes mellitus olgularında teratojeniteye neden olan biyolojik mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Hipergliseminin neden olduğu malformasyonlarda sorbitol birikimi, myoinositol eksikliği, araşidonik asit eksikliği ve prostoglandin metabolizmasındaki değişiklikler gibi pek çok teratojenik faktör tespit edilmiştir (Ramachadran B. ve ark. 2004).

Diyabetik gebeliklerde serbest radikalleri yok edici enzimler fazla glikozu ve diğer oksidatif substratları etkisiz hale getiremediği için serbest oksijen radikallerinin embriyonik dismorfogenezise neden olduğu açıklanmaktadır. Yapılan çalışmalar diyabette oksijen radikalleri türleri ve araşidonik asit metabolizmalarının değiştiğini ileri sürmektedir. Bu etkilerin diyabetik gebeliklerde şiddetli embriyonik dismorfogenezisi indüklediği açıklanmaktadır. Oksijen radikallerinin artması, antioksidatif ürünlerin azalması ana sorun olarak görülmektedir. Diyabetik sıçanların embriyolarında vitamin E değerlerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu durum gebe annelere vitamin E takviyesini doğrular (Wentzel P., ve ark. 2003).

Oksijen radikallerinin artma mekanizması, gelişimde çok önemli olan glikoz metabolizması gibi intrasellüler yolları etkileyebildiği fakat etki mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır. Oksijen radikallerinin neden olduğu embriyopati için genel görüş yüksek glikoz konsantrasyonuna maruz kalan dokuların mitokondrilerinde aşırı süperoksit üretimidir. Bu bütün diyabetik komplikasyonlarda yaygın mekanizma olarak açıklanmaktadır. Oksijen radikalleri ürünlerinin fazlalığının olası sonucunun mitokondrilerde oksijen radikalleri sızıntılarının artması ve sitosolik glukolitik enzim olan gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenazın (GAPDH) inhibisyonu olduğu belirtilmektedir. Yapılan pek çok çalışma GAPDH'nın apoptozis ve yaşla ilişkili nöral hastalıklarda da temel role sahip olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda glutasyon gibi pek çok antioksidatif ajan GAPDH'nın yapısını etkiler ve fonksiyonunu değiştirir. Oksidatif stresin GAPDH aktivitesini artırmadan GAPDH gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir, bu durum hücre çekirdeğine GAPDH göçünün artmasına neden olduğunu açıklamaktadır. Sığır endotelial hücrelerinin yüksek glikoza maruz

kaldığında aşırı süperoksit ürettikleri tespit edilmiştir. Bu aşamada aşırı oksijen radikallerinin GAPDH'yı inhibe ediyor olabileceği düşünülmüştür. Endojen aldehitlerin oksidasyonu sonucunda GAPDH aktivitesi inhibe olur, bu durum GAPDH'nın diyabetik nöropatilerde önemli etiyolojik element olduğunu gösterir. Embriyonik GAPDH inhibisyonu oksijen radikallerinin artmasına yol açar. Bu durumun diyabetik embriyopati etiyolojisinde rol alabileceği açıklanmaktadır (Wentzel P., ve ark. 2003).

2.2.3. Tip 1 Diyabet Modeli Oluşturulmuş Hayvanlarda Diyabetin Embriyo Gelişimine Etkileri

Hayvanlarda streptozotosin ve alloksan gibi diyabetojenik ajanlar ile pankreas hücrelerinin zarar görmesi sonucunda diyabetes mellitusun oluşabileceği bildirilmiştir .

Yapılan çalışmalar kemirgenlerde diyabetin pre ve postimplante embriyo gelişiminin her ikisine de zarar verdiğini ortaya koymuştur. İn vitro yüksek glikoz içeren postimplante embriyo kültürü fiziksel anomalilere ve gelişim geriliğine neden olmuştur. En yaygın görülen anomali nöroporus anteriorun kapanma bozukluğu olarak bildirilmiştir. Diyabetik hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar bu gözlemlerin uterin atrofi, çiftleşme yeteneğinin azalması ve hipotalamik-hipofizial-ovaryan döngüdeki değişiklikler nedeniyle olduğunu işaret etmektedir (Yılmaz S. ve ark. 2003).

Tip I diyabetin ovaryuma ait fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir. Diyabetik hayvanların ovulasyon oranı normal glikoz seviyeli hayvanlardan daha düşük olarak tespit edilirken, ovaryan steroidogenezis değişiklikleri ile atrezi görülme sıklığında da artış gözlemlendiği belirtilmiştir (LIU J. ve ark. 2001) .

Süperovule ya da spontan sikluslu diyabetik hayvan modellerinde dejenere ve fragmente embriyo oranında artışın yanısıra; preimplante embriyo gelişim gecikmesi belirgin olarak gözlenmiştir . Diyabetik hayvanlardan elde edilen blastosistlerin kontrol grubu hayvanlar ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde daha az hücre içerdiği saptanmıştır (Moley K. H. ve ark. 2001) .

Streptozotosin ile indükte diyabetik gebe sıçanlardan elde edilen geç morula ve blastosistlerde, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücrelerinin incelenenip karşılaştırıldığı çalışmalarda, gebeliğin beşinci gününde toplanan maternal diyabete maruz kalmış blastosistlerin iç hücre kitlesinde kontrol grubu sıçanlardan toplanan embriyolara göre belirgin şekilde hücre azalması görüldüğü; trofoektoderm hücre popülasyonunun ise değişmeden kaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada iki grup arasında gözlenen bu farklılıkların gebeliğin beşinci gününde toplanan morula evresi embriyolarda, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm differensiyasyonu henüz tamamlanmadığından gözlenemediği açıklanmıştır. Bu durum iç hücre kitlesinin farklı bir şekilde ki duyarlılığının blastosist oluşumundan sonra belirlenebildiğini ortaya koymaktadır. Gebeliğin altıncı gününde iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücrelerinin her ikisinin gelişiminde de diyabetin belirgin inhibitör etkisi rapor edilmiştir fakat trofoektoderm hücrelerine göre iç hücre kitlesindeki küçülme çok daha şiddetli olarak tespit edilmiştir. Diyabetik sıçanlardan elde edilen blastosistlerin iç hücre kitlesinin gelişim bozukluğu özellikle iç hücre kitlesinde lokalize hücre ölüm oranının belirgin şekilde artışı ile ilişkilidir. Bilindiği gibi iç hücre kitlesindeki aşırı küçülme implantasyon sonrası normal embriyogenezis ile bağdaşmaz. Bu nedenle preimplante blastosistlerin iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücreleri arasındaki duyarlılık farklılığının diyabetik gebeliklerde tanımlanan postimplante defektlerin nedeni olabileceği bildirilmektedir . Aynı zamanda bu duyarlılık farklılığı, anembriyonik kese ve spontan gebelikler ile IVF olgularında rastlanılan sadece biyokimyasal gebelik pozitifliği durumları ile ilişkili olduğunu da düşündürebilir. Gebeliğin 11. gününde streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanların embriyolarında sağlıklı sıçanların embriyolarına göre embriyonik malformasyonların ve gelişim geriliğinin belirgin şekilde fazlalığı tespit edilmiştir (%2,8 nöral lezyon; %4 lezyon). Gebeliğin 11. gününde diyabetik sıçanların izole edilen embriyonik hücrelerinde, flow sitometri ile belirlenen, intrasellüler radikallerin arttığı belirlenmiştir (Sakamakı H., 1999).

2.2.4. Tip 1 Diyabet Ve Menstruasyon Siklusu

Diyabetli hastalarda fertil yaşam süresi boyunca menstural düzensizlik oranı oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir . Tip I diyabetli kadınlarda menstural düzensizliklerin; hipotalamik gücün azalması ya da olası insülin etkisi sonucunda atrezi oranının artması nedeniyle oosit kalite ve sayısında azalma nedenleriyle açıklanabileceği belirtilmektedir.

İnsülinin in vitro kültür ortamındaki folikül mikro çevresinde granuloza hücrelerinin ihtiyacını karşılayarak follikül bütünlüğünün korunmasında ve gelişmesinde görev aldığı tespit edilmiştir. İnsülin eksikliği, follikül dejenerasyonuna yol açar. İnsülinin folliküller üzerinde doğrudan etkili olmadığı; follikül hücrelerinin gonadotropinlere duyarlılığını artırarak dolaylı etki gösterdiği bulunmuştur. İnsülin, granuloza ve teka hücrelerinin proliferasyonuna, canlılığının devam ettirilmesine ve östrojen, progesteron üretimini arttırmasına katkıda bulunmaktadır . Tip I diyabetlilerde hipotalamik GnRH üretimi yavaşlar ve bunun etkisiyle luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımı azalır. FSH, folikül gelişiminde görev alan, granuloza hücrelerinin in vivo ve in vitro proliferasyonu ve farklılaşmasına katkıda bulunan bir hormondur. Antiapoptotik bir faktördür ve granuloza hücrelerinin canlılığının sürdürülmesinde işlev görür . LH; ovulasyonu tetikleyen, progesteron üretimine neden olan ve endometriyumun büyümesini hızlandıran bir hormondur . GnRH, FSH ve LH salınımında meydana gelen düzensizliklerin özellikle kontrol altında olmayan diyabetik kadınlarda gözleendiği bildirilmektedir (Liu J., 2001; Sliwa L.2001; Strotmeyer E., 2003) .

İnsülin tedavisinden önce diyabetik kadınların infertilite ve hipogonadizm sorunları %90'dan yüksek tespit edilmiştir ; insülin tedavisinin diyabetik kadınların çoğunda fertilitiyi düzenleyebileceği belirlenmiştir. Pek çok hastanın, sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldığında menstrual düzensizliklere sahip olduğu ve bu hastalarda fertil yaşam kalite ve süresinin azaldığı rapor edilmiştir (Arrais R. F, 2006).

Tedavi görmeyen diyabetik hastalarda metabolik stresin, bir adrenal katekolaminerjik cevap olan ketoasidozis aktivitesinin oluşmasına neden olduğu açıklanmıştır. Bu durumun pek çok bireyde, plazma epinefrin ve norepinefrinin artışına neden olduğu gözlenmiştir. Epinefrin ve norepinefrinin öncüsü olan dopamin kan beyin bariyerinden genelde geçmez. Fakat

diyabetik hastalarda bu transmitter permeabilitesinin değişebileceği belirlenmiştir. Dopamin LH salınımını engeller, bunun bir sonucu olarak merkezi ve periferik sinir sisteminde diğer katekolamin değerlerinde artış olur bu durumun anormal gonadotropin artışına yol açtığı tespit edilmiştir (Arrais R. F., 2006).

Hipotalamus ve hipofiz bezindeki fonksiyonel bozuklukların endojen opioid olan endorfini bozduğu tespit edilmiştir. Bu durumun direkt ya da indirekt olarak dopaminerjik maddelerin artışına neden olduğu ve LH'nın azaldığı belirlenmiştir. Tüm bunlar menstruel disfonksiyonun nedeni olarak açıklanabilir .

Deneysel diyabetik hayvanlarda progesteron üretiminin azaldığı tespit edilirken normal ya da azalmış östrojen üretiminin varlığı gösterilmiştir. Steroidogenezdeki bu değişimin gonadotropinlerin salınımı ve GnRH azalması ile ilişkili olabileceği ya da ovaryan hücrelerde gonadotropin reseptörlerinin sayısının ya da duyarlılığının azalmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Arrais R. F., 2006) .

Diyabetin ovulasyon oranını azalttığı ve embriyonik gelişim geriliğine neden olduğu gösterilmiştir (Colton S. A., , 2003).

Maternal diyabetin preimplante embriyo gelişimi ve gebeliği olumsuz olarak etkilediği tespit edilmiştir (Chang A. S., 2002).

Gelişen oositte granuloza hücreleri oositi sararak oositin gelişimini destekler, oositin etrafında multilaminar hücre tabakası olarak organize olurlar. Oosit ve granuloza hücreleri arasında parakrin sinyaller ve gap junctional haberleşmeler vardır (Schuetz A. W., 1996).

Normal granuloza hücre gelişim ve iletişim varlığının differansiyasyon ve oosit gelişimi için çok önemli olduğu saptanmıştır . Diyabetik farelerden elde edilen oositlerdeki maturasyon gecikmesinin, granuloza hücreleri arasındaki intersellüler iletişim zayıflığı nedeni, oosit ve granuloza hücreleri arasındaki parakrin iletişim eksikliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Connexin-43'ün; granuloza hücreleri arasındaki

intersellüler iletişim ve normal folikülogenezis için mutlaka gerekli olan ve granuloza hücrelerinden eksprese edilen bir anahtar gap junctional protein olduğu tespit edilmiştir . Connexin-43 ekspresyonu eksikliğinin zayıf folikülogenezisle birlikte anormal oosit gelişimi ile sonuçlandığı gözlenmiştir (Ackert C. L., ve ark, 2001).

Yapılan son çalışmalar granuloza hücrelerinden Connexin-43 ekspresyonunun apoptotik hücre ölümleri ile ilişkili olduğunu da göstermektedir. Menstrual siklus evresinde, gebelik süresince ve menapoza geçiş döneminde ovaryan hormonların insülin duyarlılığından etkilendiği gösterilmiştir (Bruns C., ve ark, 2004).

Tip I diyabetli kadınlarda disfonksiyon ve menstruasyon düzensizlikleri oranının anlamlı şekilde fazlalığı rapor edilmiştir (Adcock C., ve ark, 2004). Granuloza hücre apoptozisi artışı açıklanamayan infertilite olgulu hastalarda da tespit edilmiştir (Idil M., ve ark, 2004).

Kumulus hücrelerindeki apoptozis artışının, oosit maturasyonu gecikmesine ve sorunlu gebeliğe neden olabileceği açıklanmaktadır (Lee K. S., ve ark, 2001).

Diyabetik hayvanlardan elde edilen ovaryum dokusundaki folliküller de histolojik incelemeler sonucunda daha fazla apoptotik odak saptamışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda hipergliseminin oosit gelişimi ve kumulus hücreleri apoptozis derecesi üzerine zararlı etkisi kanıtlanmıştır (Chang A. S., ve ark, 2005).

Diyabetli kadınlarda oosit kaybı ve düşük riskinin bu nedenden kaynaklanabileceği açıklanmaktadır. İnsanlarda IVF uygulamaları sonucunda, düşük kaliteli oosit gelişimi ve sağlıklı gebeliklerin kumulus hücrelerindeki apoptozis artışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde insan oositleri ile yapılan çalışmalar, küçük çaplı oositler ile zayıf gelişim potansiyeli ve gebelik oranları arasında ilişki olduğunu göstermektedir (Bergh C., ve ark, 1998, Trounson A. O., ve ark, 2003).

Tüm bu sonuçlara dayanarak; ovulasyon ve fertilizasyon esnasında kontrol altında olmayan diyabetik kadınlarda; gelişim gecikmesi, granuloza hücre apoptozisi artışı ve hücre

ölüm denetleme yollarında artış gibi zararlı etkilerin hiperglisemi ve hipoinsülinemiden kaynaklanacağı saptanmıştır (Chang A. S., ve ark, 2005).

Nitrik oksit aktivitesi, kan folikül bariyeri ve ovulasyon regülasyonunu içeren ovaryan fonksiyon ile ilişkili önemli bir mediyatördür. Klinik ve deneysel diyabette nitrik oksit inaktivasyonu nedeniyle endotelial vasküler aktivite bozukluğu tespit edilmiştir (Powers R., ve ark, 2006).

Hipergliseminin DNA hasarına neden olarak oksidatif stres ve hiperketoneminin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Bu artışlarında embriyo malformasyonlarının oranını artırdığı tespit edilmiştir. Vitamin E ve C gibi antioksidanların ise embriyo malformasyonlarını önleyebileceği belirtilmektedir. Maternal diyabetin fetal gelişimi nasıl etkilediği mekanizması ortaya konulabilirse komplikasyonların önlenmesine yardımcı olunabileceği düşünülmektedir. Bu sayede aynı zamanda hem annelerin hem de çocuklarının yaşam kalitelerinin arttırılabileceği belirtilmektedir (Polanco A. C., ve ark, 2005).

2.2.5. Oositlerin Doğum Öncesi (prenatal) Olgunlaşması

Erken fetal yaşamda, oogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalır. *Oogonyumlar doğumdan önce, primer oositleri oluşturmak için hacimce büyür.* **Primer oosit** oluştuğunda, ovaryuma ait stroma hücreleri (bağ dokusu hücreleri) ile çevrelenir. Bu yapı tek tabakalı düzleşmiş folliküler epitel hücrelerini oluşturur. Bu hücre tabakası ile çevrelenmiş primer oosit *primordial germ folikülü* oluşturur.

Puberte boyunca primer oosit büyür, folliküller epitel hücreleri önce kübik sonrada prizmatik bir görünüm kazanır, böylece **primer follikül** oluşur. Primer oosit kısa sürede zona pellusida adı verilen renksiz, hücre içermeyen glikoprotein örtüsü ile çevrelenir. Primer follikülün kübik folliküller epiteli birden fazla kat içerdiğinde, **olgunlaşmış ya da sekonder follikül** adını alır.

Primer oosit ilk mayoz bölünmesine doğumdan önce başlar ancak profaz puberteye kadar tamamlanamaz. Primer oosit puberte boyunca cinsel olgunluğa erişilinceye ve üreme siklusları başlayıncaya kadar profazın diploten evresinde bekler. Primer oositi çevreleyen folliküler hücrelerin oosit maturasyon inhibitörü(OMI) adındaki bir maddeyi salgılayarak, oositin mayotik bölünme sürecini durdurduğu düşünülmektedir (Scott J. R., ve ark, 1990).

2.2.6. Oositlerin Doğum Sonrası (prenatal) Olgunlaşması

Puberte ile başlar, her ay gelişmeye başlayan bir miktar follikülden biri dominant olarak olgunlaşır ve ovulasyon gerçekleşir. Kızlarda intrauterin gelişimde şekillenen primer oosit sayısı sabittir, doğumdan sonra yenileri oluşmaz. Erkeklerde ise puberte sonrasında da primer spermatosit yapımı devam eder. Primer oositler puberteye kadar ovaryum folliküllerinde bekler. Follikül olgunlaştıkça primer oositin boyutları artar, ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve sekonder oosit adını alır. Spermatogenezdeki benzer aşamalardan farklı olarak, oositte sitoplazma eşit olarak bölünmez. Sekonder oosit hemen hemen tüm sitoplazmayı alır, birinci polar cisimciğe(PC) ise çok azı kalır. İlk PC; küçük, 23 kromozom ve 2n DNA içermesi dışında işlevsel olmayan ve kısa süre içinde dejenere olacak bir hücredir. LH etkisi ile sekonder oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar, ancak sadece metafaza kadar ilerlemiş olarak ovulasyon gerçekleşir. Eğer bir sperm sekonder oositin içine girerse, ikinci mayotik bölünme tamamlanır. Sitoplazmanın çoğu bir hücreye yani fertilize olmuş oosite veya olgun ovuma geçer, ikinci PC ise kısa sürede dejenere olan, küçük, 23 kromozom ve ikinci mayoz ile n sayıya düşen DNA içermesi dışında işlevsiz bir hücredir. İkinci PC atıldığında oositin nükleer olgunlaşması yani 23 kromozom ve n DNA içeriğine indirgenmesi tamamlanır (Moore K.L., 2002). Bu nedenle mayoz bölünmeye redüksiyon bölünmesi adı da verilmektedir.

Intrauterin hayatın yedinci ayında her iki ovaryumdaki follikül sayısı 6-7milyon civarındadır. Bunların ancak 2-3 milyon kadarı neonatal döneme kadar canlılıklarını sürdürebilir. Pubertede ise canlı folliküller yaklaşık olarak sayısı 400.000 civarındadır. Her ay yaklaşık 20 kadar follikül hazırlanmaktadır. Hiç gebe kalmayan sağlıklı bir kadının yılda

en fazla 13 kez ovulasyon yapma şansı vardır. Zaman limiti olarak 15-55 yaşları arasındaki seksüel hayat boyunca bir kadının ovaryumlarından 500 civarında bir ovulasyon şansı bulunmaktadır (Cortvrıntd R., ve ark, 1996).

2.3. Oosit Kalitesinin Morfolojik Kriterleri ve Embriyo gelişimi üzerine etkileri

İnsan ve hayvan üreme teknolojileri (oositlerin in vitroda matürasyonu ve fertilizasyonundan hayvanların klonlanmasına kadar) son yıllarda yoğun şekilde gelişme göstermiştir. Bu teknolojilerin prosedürlerinde kullanılan temel şey oositlerdir. Oositlerin kalitesi; monospermik fertilizasyon, erken gelişim, ve embriyoların implantasyonu sonuçları üzerinde en önemli etkiye sahiptir. Bu yüzden; oosit kalitesi oositlerin fertilizasyonunda, iyi kalite embriyo kültüründe ve infertilite tedavisinde belirleyici bir faktördür.

2.3.1. Oosit mayotik matürasyonu

Oosit matürasyonu birbiriyle bağlantılı iki prosesi kapsar: çekirdeğin ve sitoplazmanın olgunlaşması. Memeli oositleri, ovaryen foliküllerde ilk mayotik profazın diploten evresinde görülür. İn vivoda hipofizden salgılanan LH stimülasyonu altında, oosit mayozu yeniden başlatılır. Oositin çekirdeği yapısını değiştirir. Oositin nükleer membranı kaybolur. Mikrotübüller çift kutuplu iğ şeklinde organize olur ve tüm kromozomlar hücre ekvatorunda dizilir. İlk mayotik bölünme oosit içinde devam eder; bu bölünmenin ardından ilk polar cisimcik ayrılır, ve perivitellin aralığa geçer. Ardından; ikinci mayotik bölünme meydana gelir ve metafaz II'de durur. Bu proses, oosit çekirdeğinin matürasyonu olarak bilinir.

Oositin başarılı şekilde döllenebilmesi ve yeni bir cisimcik oluşabilmesi için, oosit çekirdek ve sitoplazmasının aynı anda olgunlaşmış olması gerekir. Eğer oosit sitoplazması olgunlaşmamışsa, embriyo fertilizasyondan sonra normal şekilde gelişmez. Günümüze kadar; oosit sitoplazmasının olgunluğunu belirleyen sadece bir metot bilinmekteydi. Bu da; oosit fertilizasyonun ve embriyo gelişiminin in vitroda gözlenmesidir. Böylece çeşitli çevresel faktörlerin ve matürasyon ortamlarının oosit çekirdeği ve sitoplazmasının olgunlaşması üzerindeki etkisi sadece döllenmiş oosit ve gelişim gösteren embriyo sayısıyla değerlendirilmektedir (. Fan HY. , 2004; Sun QY. , 2003; Krisher RL. 2004).

2.3.2. Oosit kalitesinin embriyo gelişimi üzerindeki etkisi

Sirard ve ark.(2006) oosit kalitesinin; mayozun devam etmesine, zigotun klivajına, embriyonun blastosist evresine kadar gelişimine, uterusu implantasyonuna, ve sağlıklı bebek doğumu üzerindeki etkili olduğunu dikkat çekmiştir. Oosit gelişimine eşlik eden sitoplazma değişiklikleri mRNA transkripsiyonu ve protein sentezidir. Bu hücrel mekanizmalar; oositin mayotik matürasyonu, zigotik genomun aktivasyonu ve blastosist oluşumu için gereklidir. Oosit; her biri hücrenin matürasyonu için uygun durumda olması gereken organellerden oluşan kompleks bir hücredir. Mayotik iğ, stoplazma granülleri, ya da mitokondri gibi oosit bileşenlerinin herhangi bir disfonksiyonu ya da dislokasyonu oosit canlılığını azaltabilir, embriyo gelişimi ve kalitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir.

Oosit kalitesinin embriyo gelişimi üzerindeki önemini dikkate alan bilim adamları uygun kriterler üzerine yoğunlaştılar; bu kriterler morfolojik, hücrel ve moleküler olmak üzere sınıflandırılmışlardır(Trimarchi JR. , 2006; Sirard MA. , 2006).

2.3.3. Oosit kalitesinin morfolojik kriterleri

İn vitroda fertilizasyon öncesinde, oositlerin kalitesi genellikle kümülüs-oosit komplekslerinin yapısına göre değerlendirilmektedir. Bu metot basittir ve oosit kalitesi hakkında bilgi verir.

Oosit kalitesi, kümülüs-oosit kompleksi yapısının, oosit sitoplazmasının, polar cisimcik, perivitellin aralık, zona pelüsida ve mayotik iğün özelliklerinin aynı anda değerlendirilmesiyle daha spesifik şekilde belirlenebilir (Wang Q. ve ark. 2007).

2.3.4. Kümülüs-ooisit kompleksi

Ovaryan follüküllerden toplanan kümülüs-ooisit kompleksleri kümülüsün yoğunluğu ve ooisit sitoplazmasının özelliklerine göre sınıflandırılır. Örneğin; kümülüs-ooisit kompleksleri üç kalite kategorisine göre gruplandırılmıştır:

1. Kategori A kümülüs-ooisit kompleksi. Oosit; en az beş hücre katmanı içeren yoğun bir kümülüsle çevrelenmiştir. Oosit sitoplazması neredeyse transparandır, homojendir ya da sitoplazmanın yüzeyinde koyu bir halka görülmektedir.
2. Kategori B kümülüs-ooisit kompleksi. Kümülüsün yoğunluğu daha azdır. Oosit koyu ve biraz granüler sitoplazmaya sahiptir.
3. Kategori C kümülüs-ooisit kompleksi. Kümülüs hücreleri koyu bir sitoplazma ile genişlemiştir. Oositin koyu ve granüler bir sitoplazması vardır.

Bazı bilim adamları, kategori B'deki kümülüs-ooisit komplekslerine sahip olan oositlerin en yüksek gelişme potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir. İn vitro fertilizasyonun ardından, kategori A ve C kümülüs-ooisit komplekslerine oranla kategori B kümülüs-ooisit komplekslerinden daha fazla oosit gelişimi göstermiştir, ama nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. Kümülüs hücre katmanlarının sayısı oosit kalitesini belirlemede anlamlı bir faktördür. Kaliteye göre insan kümülüs-ooisit komplekslerinin gruplanması ile ilgili mevcut literatürde herhangi bir veri bulamadık (Blondin P., 1995; Mayes MA. , 2001).

2.3.5. Sitoplazma ve polar cisimcik

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunu öncesi ve kümülüs-ooisit kompleksinin kalitesinin değerlendirilmesinin ardından kümlüs hücreleri oositten uzaklaştırılır. Bu; ışık mikroskopu altında oositin yapısal özelliklerinin daha net olarak incelenmesini sağlar.

İnsan oositinin sitoplazması, rengine, granülasyonuna (küçük ya da büyük granüller; homojen granülerlik ya da granüllerin grup şeklinde dağılımına; oositin merkezinde ya da periferinde bulunması), perivitellin aralığın genişliği ve organellerin dağılımı (vakuollere, endoplazmik retikuluma) göre;

Bu morfolojik kriterlere göre insan oositleri aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- 1) normal oositler,
- 2) ekstrasitoplazmik anormallikleri olan oositler (koyu zona pelüsida ve geniş perivitellin aralık),
- 3) intrasitoplazmik anormallikleri olan oositler (koyu ya da granüler sitoplazma ve sitoplazmik fragmanlar)
- 4) şekil anormallikleri
- 5) çoklu anormalliklere sahip oositler

Bazı çalışmalar; normal yapıdaki oositlerden gelişen embriyoların (Grup 1) en iyi uterin implantasyona sahip olduğunu göstermiştir. İntrasitoplazmik anormallikleri olan oositler kötü döllenmiş ve gelişen embriyoların birçok hücresinde yüksek anöploidi sıklığı bulunmuştur.

Nagano ve ark.,(2006) sitoplazmik özellikler ve küçük tersiyer foliküllerden kaynaklanan sığır oositlerinin fertilizasyon sonrası gelişimiyle arasındaki ilişkiyi çalışmıştır. Koyu bir sitoplazmanın lipid birikmesi ve in vitro fertilizasyon sonrası oositlerin iyi bir gelişim potansiyeli olduğunu bulmuşlardır. Açık-renkli sitoplazmanın düşük organel yoğunluğu ve düşük gelişim potansiyelini gösterdiğini bulmuşlardır. Siyah bir sitoplazma yaşlanmayı göstermekte ve düşük gelişme potansiyelini işaret etmektedir.

İlk PC' in morfolojisi insan oositinin postovulatar yaşını gösterir. İlk PC' in dejenerasyonu oositin yaşlı olduğunu gösterir. İlk PC' in şekil(yuvarlak ya da yassı), büyüklük (küçük ya da büyük), yüzey (düz ya da engebeli), sitoplâzmayla bütünlüğü(sağlam ya da fragmante) gibi bazı morfolojik kriterleri oosit kalitesini belirlemede kullanılabilir. Fragmante bir ilk PC' e sahip oositler, normal bir PC' e sahip olanlara oranla fertilizasyon sonrasında daha kötü gelişim göstermiştir.

2.3.6. Perivitellin Aralık Ve Zona Pelüsida

İnsan oositlerinin perivitellin aralığı büyüklük (geniş ya da değil) ve içerik (parçalar var ya da yok) olarak farklılık gösterir. Geniş perivitellin aralığa sahip oositlerin normal perivitellin aralığa sahip olanlara oranla intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası daha kötü geliştiğini belirtmişlerdir. Perivitellin aralığında büyük döküntüler olan oositler döküntü olmayanlara oranla fertilizasyondan sonra daha kötü gelişmiştir. Zona pelüsidanın(ZP) kalınlığı 10 ile 31 µm arasında değişir. Bu sitoplazma çapıyla ilişkili değildir. ZP kalınlığı sperm penetrasyonunu etkiler. Oositler in vitroda, ZP kalınlığı 18.6 µm'nin altında olduğu zaman en iyi döllemeyi göstermektedir. Kalın ZP (22 µm ya da daha kalın), infertil hastalar için, ICSI ile oluşturulmuş embriyoların transplantasyonu için kullanımının bir göstergesi olabilir. ZP kalınlığı ICSI sonrasındaki embryo gelişimi üzerinde etkili değildir (Gabrielsen A.; 2001).

2.3.7. Mayotik İğ

Mayotik iğ; kromozomların oositteki düzgün sıralanmaları ve mayoz sırasındaki ayrılmaları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Mayotik iğ parametreleri (lokasyon ve refraksiyon) sıklıkla oosit kalitesini belirlemede kullanılmaktadır.

Mayotik iğ, oositin fiske edilip floresan boyalarla boyanmasının ardından konfokal bir mikroskopla çalışılır; bu oositin ölümüne neden olur. Bu yüzden; intrasitoplazmik sperm enjeksiyonuyla ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda, iğnenin açısı mayotik iğ ve kromozomlara zarar vermemek için ilk polar cisimciğin pozisyonuna göre ayarlanır. Fakat; ilk polar cisimciğin pozisyonu oositteki metafaz iğinin pozisyonunun spesifik bir göstergesi değildir.

Günümüzde, mayotik iğ ve lokasyonu oosite zarar vermeyen polarize mikroskoplarla incelenebilmektedir. Mayotik iğ için çift kırılımı Polscope mikroskobuyla çalışılabilir. Bilim adamları çift kırımlı iğe sahip oositlerin çift kırılımı olmayan oositlere göre in vitro fertilizasyon sonrası ya da intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu sonrası daha yüksek gelişim potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Moore ve ark.(2002), Polscope ile, oositteki mayotik iğ için lokasyonunun değişebileceğini göstermiştir. Bu yüzden; insan oositlerine ‘kör’ intrasitoplazmik enjeksiyon yapıldığında zarar görebilir. Fakat; oosit içinde mayotik iğ için polar cisimcikten sapması ve oositin gelişim potansiyeli arasında ilişki bulunamamıştır.

Battaglia ve ark.,(1996) iğ anormalliklerine sahip oosit sayısının kadının yaşıyla birlikte arttığını göstermiştir. Bu anormallik; bir ya da daha fazla kromozomun ikinci mayotik bölünme sırasında metafaz plağında yer değiştirmesini belirlemektedir. Bu proses; embriyonun hücrelerindeki anöploidiye katkıda bulunan bir faktördür. Mayotik iğ için yaşlı oositlerde bozulduğu bildirilmiştir.

Bu yüzden; oosit morfolojisinin Polscope ile iğ görüntülenmesi ile beraber kesin analizi, oosit kalitesinin ve embriyonik gelişim potansiyelinin değerlendirilmesinde bilgilendirici, invaziv olmayan ve güvenilir bir faktördür (Wang WH. ve ark. 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (07.07.2009 tarih ve 12/ 3 – 2009 sayı).

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, daha önce çiftleşmemiş ve hiçbir deneye alınmamış, 18- 26 gr ağırlığında 8–10 haftalık Cd I ırk dişi fareler kullanıldı. En az iki düzenli 5 günlük östrus siklusu geçiren toplam 31 adet dişi, 10 adet erkek fareyle çalışma gruplarımızı oluşturuldu.

Araştırmada kullanılacak dişi fareler 4 gruba ayırdı. KOH uygulanan, uygulanmayan ve diyabet oluşturulan, oluşturmayan olmak üzere. KOH yapılmayan fare gruplarına her gün aynı saatte vajinal smear alınarak östrus siklus takibi aşağıdaki gibi yapıldı.

3.1.1. Diöstrus:

57 saat süren ve glandular hiperplazi ile başlayan bu devre, korpus luteumdan salgılanan progesteronun etkisi ile smearde bol miktarda, mukus, lökosit ve oval epitel hücreleri şeklindeki değişik hücre tipleri varlığına göre tanımlandı. İki çiftleşme periyodu arasındaki zaman aralığı olup insandaki sekresyon fazına uyan, gebelik olmazsa sona eren bu evrede farelerin proöstrus evresine geçmesi beklendi.

3.1.2. Proöstrus:

12 saat süren ovaryumda olgunlaşan foliküllerin folikül hücreleri ve teka interna hücreleri aracılığıyla salgılanan östrojen etkisiyle glikojen miktarı ve vaginal epitel katlarının artması, preovulatuvar faz olarak değerlendirildi. Bu evre, endometriyum vaskularizasyonu artarken uterus epitelini ve ovidukt epitelinde de silyum epitelini stimüle eden bu östrojenik etkinin göstergesi olan, smearde dış hatları oval, merkezi nukleuslu epitel hücrelerinin varlığı yanısıra lökosit ve mukusun ender görülmesi şeklindeki bulgulara göre saptandı.

3.1.3. Östrus:

14 saat süren kızgınlık evresi olan, hayvandaki östrus davranışlarından 6-10 saat sonra ovulasyonun şekillendiği bu evre vagina epitelinin yüzeyel katlarında kornifikasyon varlığı, hücrelerin nukleuslarını kaybetmiş olması bulgularıyla tespit edildi.

3.1.4. Metöstrus:

21 saat süren korpus luteumun şekillendiği bu evrede vaginal smearde birkaç kornifiye hücre görülürken, lökosit ve mukus bol miktarda gözlemlendi.

Çalışmamızda vaginal eksfoliyatif sitoloji, ovaryum siklusuyla yakından ilişkili olduğundan dolayı kullanıldı. Vaginal smear örneği almak için vaginaya pasteur pipetiyle 0,3cc kadar serum fizyolojik verildi. Lam üzerine yayma yapıp ya taze preparatlarda sitolojik inceleme yapıldı ya da preparatlar boyandıktan sonra incelendi. Farelerde vaginal smearde gelişim dönemine göre fareler oosit toplanması işlemi için kurban edildi.

3.2. Kontrollü Overyan Stimülasyon ve Oosit Toplanması:

KOH oluşturma protokolümüz; McGill Üniversitesi Jinekoloji ve Obstetrik Departmanı Reprodüktif Biyoloji Bölümü, Ri – Cheng Chian ,Ph.D. tarafından geliştirilmiş induksiyon protokolü kullanılmıştır.

3.2.1. Kontrollü Ovülasyon Stimülasyonu:

- Farelere (Dişi olanlar en az 8 - 10 haftalık) birinci gün saat 16.00 – 18. 00 arasında intraperitoneal (i.p) olarak 5.0 IU PMSG enjeksiyonu yapıldı,
- PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra 5.0 IU h CG ile i.p. enjeksiyonu yapıldı,
- Olgunlaşmış oositler h CG den 12- 14 saat sonra toplandı,

3.2.2. Oosit Toplanması:

- h CG enjeksiyonundan 13 – 15 saat sonra dişi fareler sakrifiye edildi,
- Ovidukt ve ovaryumlar çıkarılıp toplama medyumun olduğu dişe aktarıldı,
- Ampul şeklindeki şişkinlikle(Ampulla) oynayıp oosit- kümülüs kompleksi yapıdan kurtarıldı.

3.3. IVF Protokolü :

KOH yapılmış Cd I ırkı dişi fareler h CG' den 13 – 15 saat sonra sakrifiye edilip, ovidukt ve ovaryumları disseksiyoları yapıldı. Aynı gün Cd I ırkı erkek farelerde sakrifiye edilip, epididimis ve vas deferans disseksiyoları yapılır. Aşağıda uygulamanın devamı anlatılmaktadır.

3.3.1. Sperm Toplama:

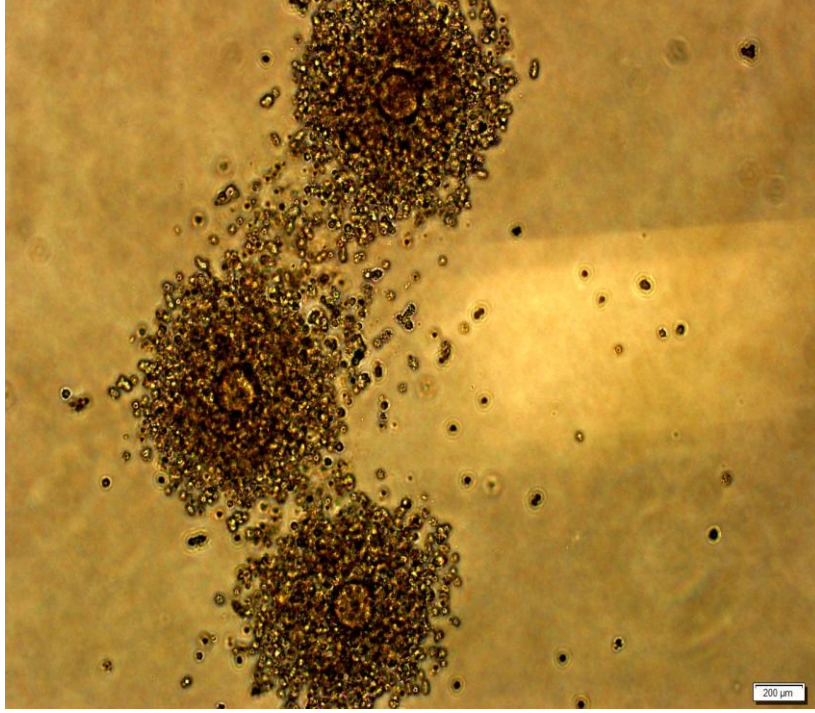
- Çalışmamızda yaşı iki aydan fazla olan erkek fareler kullanıldı,
- Dişi fareler sakrifiye edilmeden bir saat önce erkek fareler sakrifiye edildi,
- Epididimis ve vas deferansı disseksiyo ile alındı,
- Forseps kullanılarak semenler, kapasitasyon medyumuna aktarıldı.

3.3.2. Sperm Kapasitasyonu:

- Sperm en az 45- 60 dakika sperm kapasitasyon medyumunda karbon dioksit kontrollü inkübatörde beklettik,
- Kapasitasyon medyumunda motil sperm sperm pelletinin kenarına doğru yüzerler, çalışma grubumuzda bu spermeleri kullanmaya gayret edildi,

3.3.3. Kümülüs-Oosit Kompleksi Yıkamaı:

- Kompleks bir kez yıkama medyumu ile yıkandı,
- Oositler hyalarunidaz ile kümülüs hücrelerinden kurtarıldı,
- Daha sonra oositler fertilizasyon medyumuna aktarıldı,



Şekil 3.1. Ayıklama işleminden önce Kümülüs - Oosit kompleksi görülmektedir, 40x İverted mikroskop

3.3.4.İnsaminasyon:

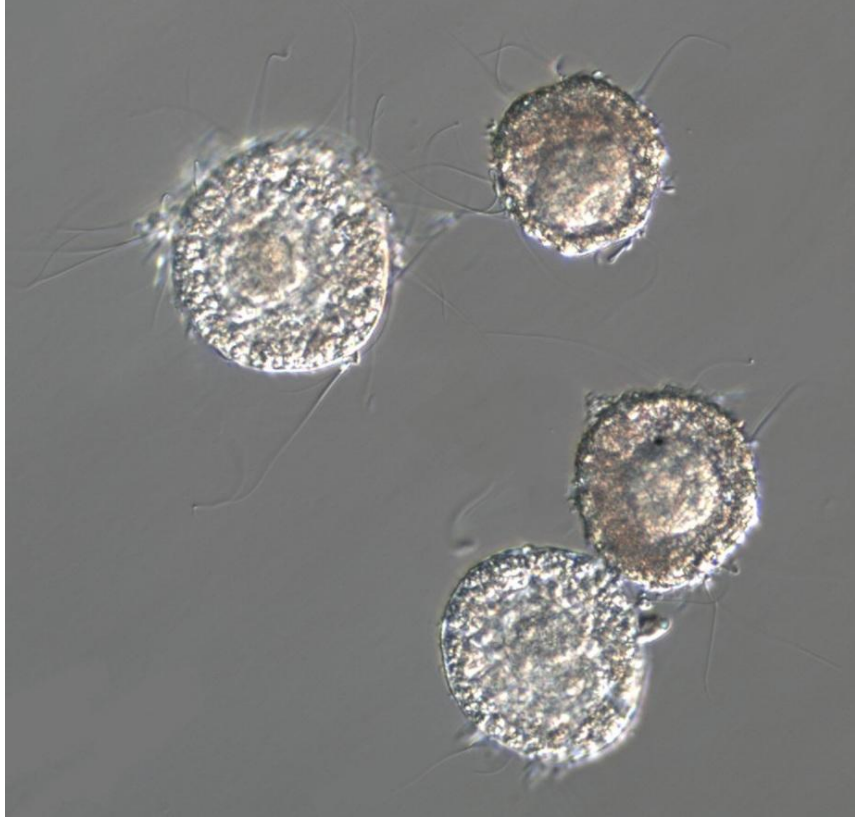
- Sperm konsantrasyonun sayısı önemli gözükmesede, sayısı ml de yaklaşık 1- 25 x 10^6 olmalıdır,
- Pipet ile 10 µl sperm , sperm kapasitasyon drobunun kenarından yumurta olan droba aktarıldı,

3.3.5. Zigot Yıkama ve Embriyo Kùltürü:

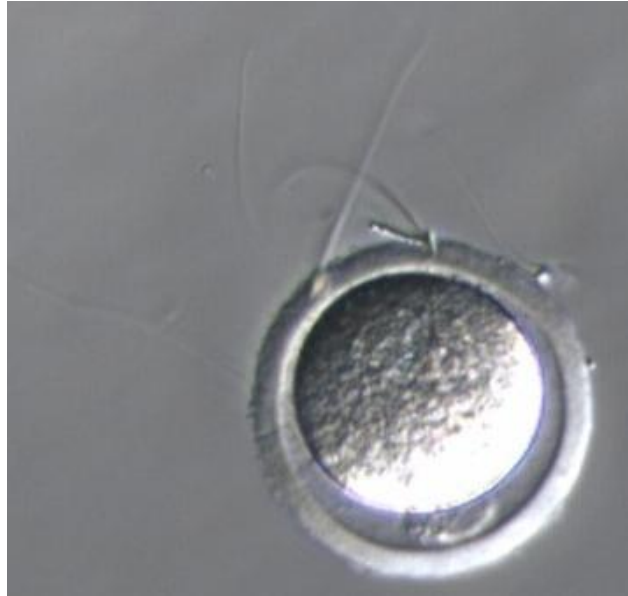
- İnseminasyondan 16-18 saat sonra, yumurtalar sperm ve kümùlùs fazlalıklarından uzaklaştırıldı,
- Yumurtalar dikkatlice fertilizasyon medyumundan kùltür dişlerine aktarıldı,



şekil 3.2. IVF işleminde spermlerin zona pelisudaya penetrasyonu gòr÷lmektedir.10x
İnverted mikroskop



Şekil 3.3.Spermlerin oosit- kümülüs kompleksine penetrasyonu görülmektedir. 10x
İnverted Mikroskobu



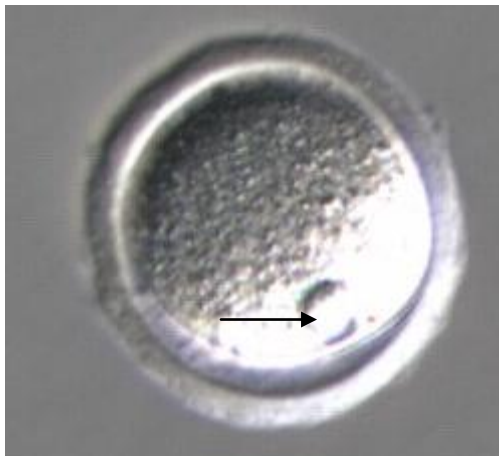
Şekil 3.4.Spermlerin MII oosite penatrasyonu görülmekte,10x inverted mikroskop



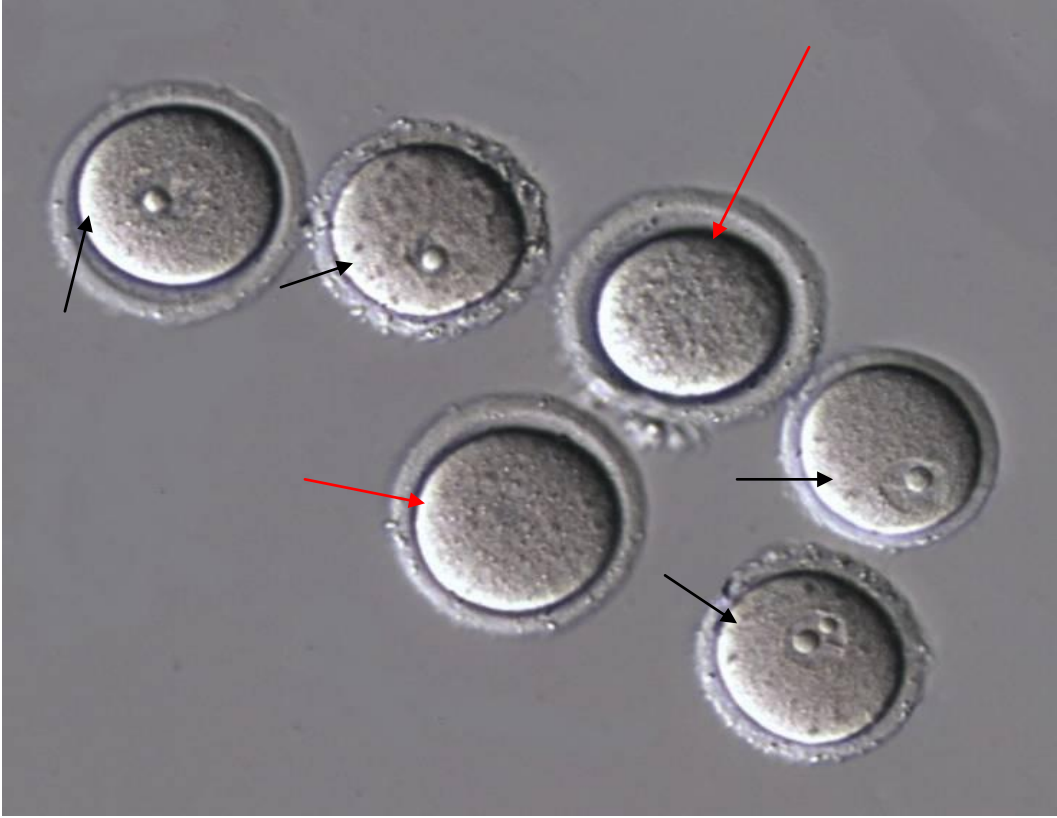
Şekil 3.5. Spermin zona pellisudaya tutunması görülmekte, 10x İverted Mikroskop

3.3.6. Embriyo Kültürü:

- Çalışmamızda embriyolar beş güne kadar kültürize edildi,
- İnseminasyondan 24 saat sonra zigotlar 2 hücreli embriyo safhasına girerler,
- Dördüncü gün 2 hücreli olan embriyolar blastosist aşamasına ulaşabilir,



Şekil 3.6. MII oosit görülmektedir, kutup cisimciği ok ile gösterilmiştir. 10x inverted mikroskop görüntüsü.



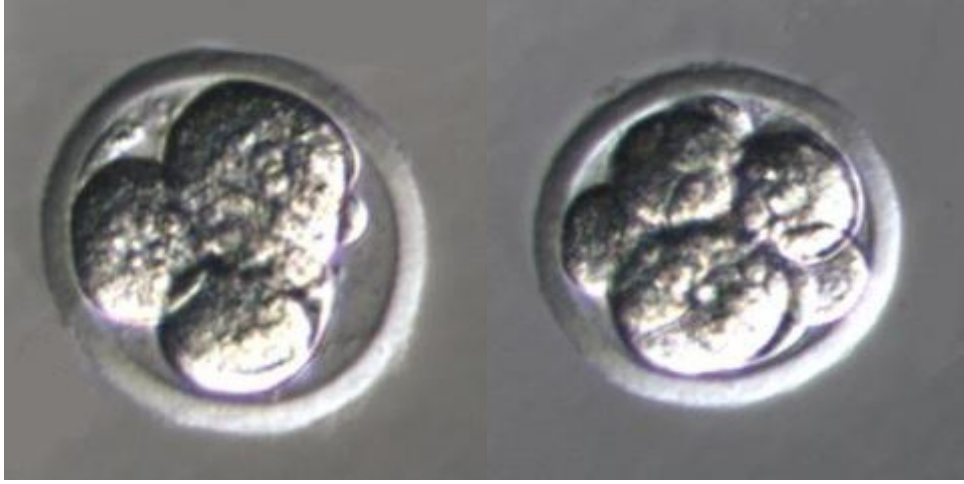
Şekil 3.7. Ayıklama işleminden sonra MI ve GV oositler görülmektedir, MI oositler kırmızı ok ile, Germinal veziküller siyah ok ile gösterilmektedir, 10x inverted mikroskop



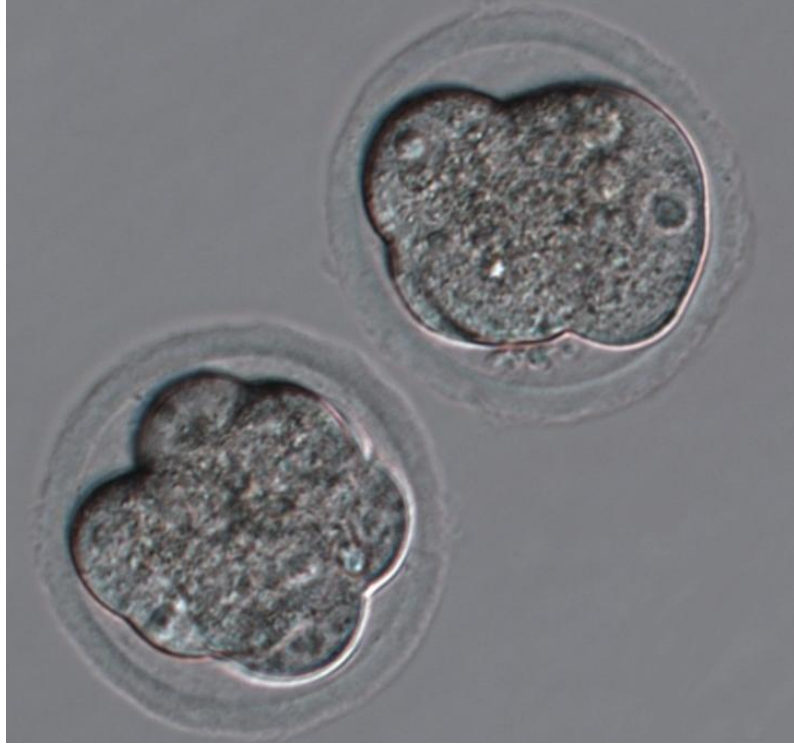
Şekil 3.8. Dejenere oositler görülmektedir, 10x inverted mikroskop .



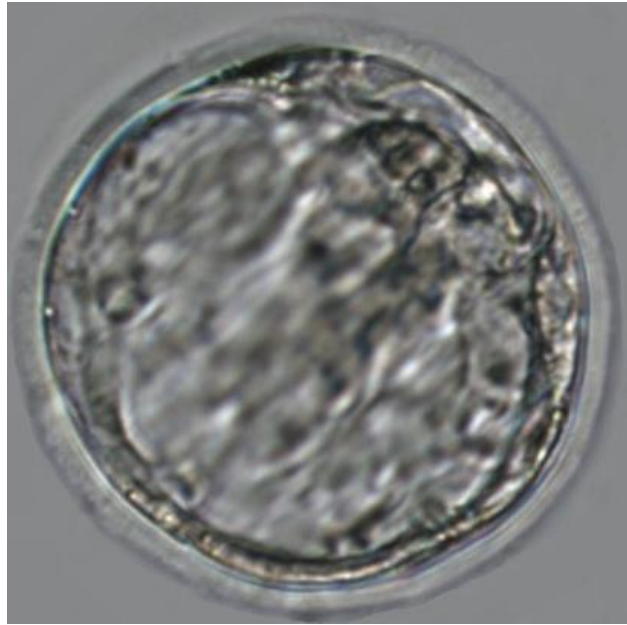
Şekil 3.9. Birinci gün kontrol grubu iki blastomerli embriyolar görülmektedir. 10x inverted mikroskop



Şekil 3.10. Solda dört blastomerli 2.gün , sağda sekiz blastomerli 3. gün kontrol grubu embriyoları görülmektedir, 10x İnverted mikroskop



Şekil 3.11.Kompaklaşmış (üstte sağda) ve morula (solda altta) safhasındaki mebriyolar
Görülmektedir,10x inverted mikroskop



Şekil 3.12. Beşinci gün blastosistgörülmektedir, 40x inverted mikroskop

3.4. Gruplar ve Diyabet Oluşturma Yöntemi:

Çalışmada 31 adet seksüel olarak matür Cd I ırk dişi fareler kullanıldı, dişi fareler dört ayrı çalışma grubuna ayrıldı.

3.4.1. Kontrol Grubu: (n= 5)

Bu gruptaki farelere intraperitoneal olarak (i.p.) olarak sitrat (ph = 4.5) verildi. Östrus siklusu takibi yapıldı ve siklus takibine göre sakrifiye edilip, yumurtalar toplandı.

3.4.2. Stimülasyon Grubu : (n= 8)

Bu gruptaki fareler kontrollü overyan stimülasyon uygulamasına alındı. PMSG ve hCG enjeksiyonlarından sonra fareler sakrifiye edilip oositler toplandı. Bu grup fareler diyabet+stimülasyon çalışma grubunun kontrolü olarak çalışmada değerlendirildi.

3.4.3. Diyabet + Stimülasyon grubu : (n= 10)

Dişi farelere diyabet eldesi için intraperitoneal olarak streptozotosin enjeksiyonu yapıldı. Dişi farelere vücut ağırlıkları ortalaması hesap edilerek streptozotosin konsantrasyonu hesaplanıp bu oranda enjeksiyonu yapıldı. Streptozotosin enjeksiyon miktarı *Animal Models of Diabetic Complications Consortium*' un düşük ve yüksek doz uygulamaları protokolünden yararlanılarak yapıldı. Bizim çalışmamızda 100 mg / kg streptozotosin intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyon yapılmadan önce farelerin kan glukoz seviyelerini ölçüldü , çalışmamızdaki farelerin enjeksiyon öncesi kan glukoz değerlerinin ortalaması 75 mg/ dL olarak ölçüldü. Enjeksiyondan dört gün sonra kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden kan alınarak glukometre ile ölçüldü. Glukoz seviyeleri 200 mg / kg olanlar diyabet olarak kabul edildi. Bizim çalışmamızda enjeksiyondan dört gün sonra yapılan kan glukoz seviyelerinin ortalaması 267 mg / dL olarak ölçüldü. Diyabetin dişi üreme sistemi üzerinde etkili olabilmesi için fareler bir ay 12 şer saat karanlık - aydınlık ortamda bırakıldı . Fareler tekrar glukoz seviyeleri ölçülüp, kontrollü overyan stimülasyon uygulaması yapılip oosit toplanması için sakrifiye edildi.

3.4.4. Diyabet Grubu (n= 8)

Dişi fareler streptozotosin uygulamasından dört gün sonra sonra kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden kan alınarak glukometre ile ölçüldü. Glukoz seviyeleri 200 mg/kg olanlar diyabet olarak kabul edildi. Diyabetin üreme sisteminde tesir edilebilmesi için fareler bir ay 12 şer saat karanlık - aydınlık ortamda bırakıldı. Tekrar glukoz seviyeleri ölçülüp uygun glukoz seviyesinde olanların östrus takibi yapıldı. Uygun durumda olan farelere ostrus siklus takibi yapıldı, uygun durumda bulunanlar oosit toplanması için sakrifiye edildi.

3.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar , Medyumlar ve Cihazlar

3.5.1. PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotropin)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 D-89555 STEINHEIM. Ürün numarası G4527. Folükül stimülasyonu için i.p. olarak kullanılmıştır.

3.5.2. Streptozotosin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 D-89555 STEINHEIM. Ürün numarası S0130. Streptozotosin diyabet elde edilmesi için kullanıldı. Sitrat içinde çözümlü pH: 4,5 olmasına dikkat edildi. Uygulamadan en fazla 10 -15 dakika önce çözümlü, uygulama yapılana kadar karanlıkta saklı tutuldu.

3.5.3. Yıkama Medyumu

Hepes – m HTF buffer , 1 mg BSA / ml. 200 ml. deki solüsyonlarda içindikiler;

• CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.0600	g
• MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.0099	g
• NaCl	1.1875	g
• HEPES	0.9600	g
• Glukoz	0.1000	g
• Penicilin	0.0750	g
• Streptomisin	0.0100	g
• Fenol Red (% 1)	0.0400	ml

3.5.4. Fertilizasyon ve Kapasitasyon Medyumları

- Fertilizasyon Medyum: m- HTF buffer + 4 mg BSA / ml
 - Kapasitasyon Medyum: m -HTF buffer + 9 mg BSA/ ml
 - 200 ml. Solüsyonda içindikiler
- | | | |
|---|--------|----|
| • CaCl ₂ • 2H ₂ O | 0.0600 | g |
| • MgSO ₄ • 7H ₂ O | 0.0099 | g |
| • NaCl | 1.1875 | g |
| • Glukoz | 0.1000 | g |
| • Penicilin | 0.0750 | g |
| • Streptomisin | 0.0100 | g |
| • Fenol Red (% 1) | 0.0400 | ml |

3.5.5. Gelişim Medyumu (KSOM)

- 200 ml deki solüsyonlarda içindikiler
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0600 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0099 g
- NaCl 1.1875 g
- EDTA (disodium tuz) 0.0008 g
- Glukoz 0.1000 g
- Penicilin 0.0750 g
- Streptomisin 0.0100 g
- Fenol Red (% 1) 0.0400 ml
- MEM amino asit (x50) 2.0 ml
- Fenol Red (% 1) 0.2 ml.

3.5.6. Glukometre

Accu – Check Go Roche (mg / dL)

3.5.7. Görüntüleme Sistemi

OCTAX Eyeware MX 2.0

3.5.8. İnkübatörler

SANYO O_2 / CO_2 inkübatör MCO – I8M

3.5.9. Mikroskoplar

Olympus SZX7, ZS61 DF PLAPO/ X-4 Streo mikroskoplar,

Olympus IX71 inverted mikroskop

3.5.10. İstatiksel Veriler

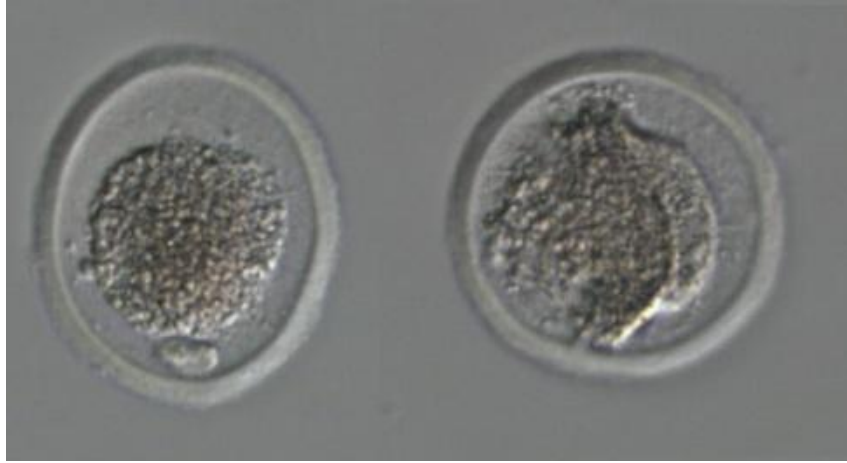
İstatistiksel karşılaştırmalarda orana dayalı 2 örneklem Mann – Whitney U testi kullanıldı. Kontrol ve deney grupları karşılaştırılan değerlerinde p değeri $p < 0,05$ olan sonuçlar, istatistiksel önemi olan farklar olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

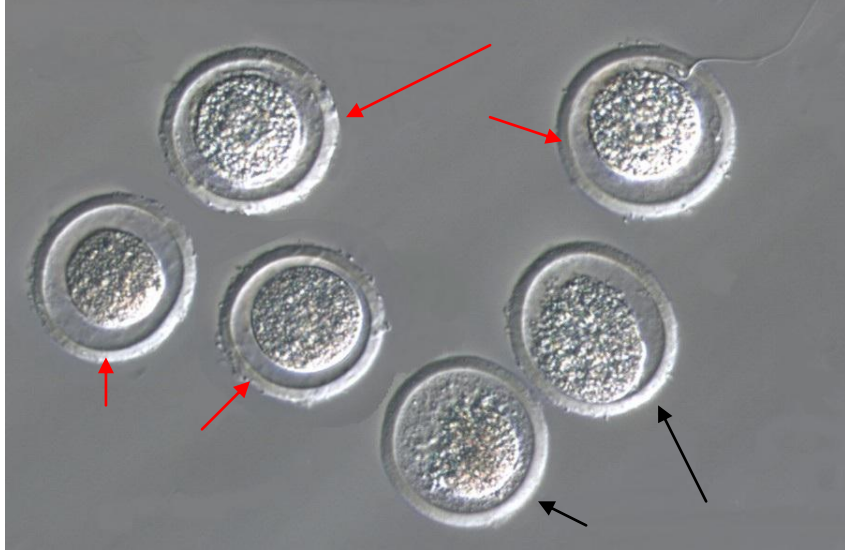
Çalışmamızda dört ayrı grup kullanıldı. Bu gruplar :

1. Grup: Stimülasyon grubu ,
2. Grup : Stimülasyon + Diyabet grubu,
3. Grup :Diyabet grubu + ostrus siklusu takip grubu ,
4. Grup :Kontrol grubu (Ostrus siklusu takip grubu) .

Yukarıda belirtilen 3. ve 4. gruplara kontrollü ovaryan stimülasyon uygulaması yapılmadı, ovaryan gelişim ostrus siklusu takibi ile yapıldı. Sakrifiye edilen bu gruptaki farelerde matur (MII) oosit elde edilemedi. Sadece kontrol grubu farelerden ampulladan 2 oosit elde edildi. Bu oositler ayıklama işleminden sonra incelendiğinde dejenere (DJN) olarak kayıt edildi. Oositler bu gruplarda ovaryan olarak toplandı. Toplanan oosit sayısı ve kalitesi sırasıyla ; 3. grupta sekiz fareden toplam 16 oosit toplandı, toplanan bu oositlerden 3 MI, 7 GV, 6 DJN . 4. grupta beş fareden 10 adet oosit toplandı. Bu oositlerin 2 MI , 5 GV, 3 DJN di.



Şekil 4.1. Doğal siklus takibi 1. grup farelerden ampulladan toplanan Dejenere oositler görülmektedir, 40x inverted mikroskop.



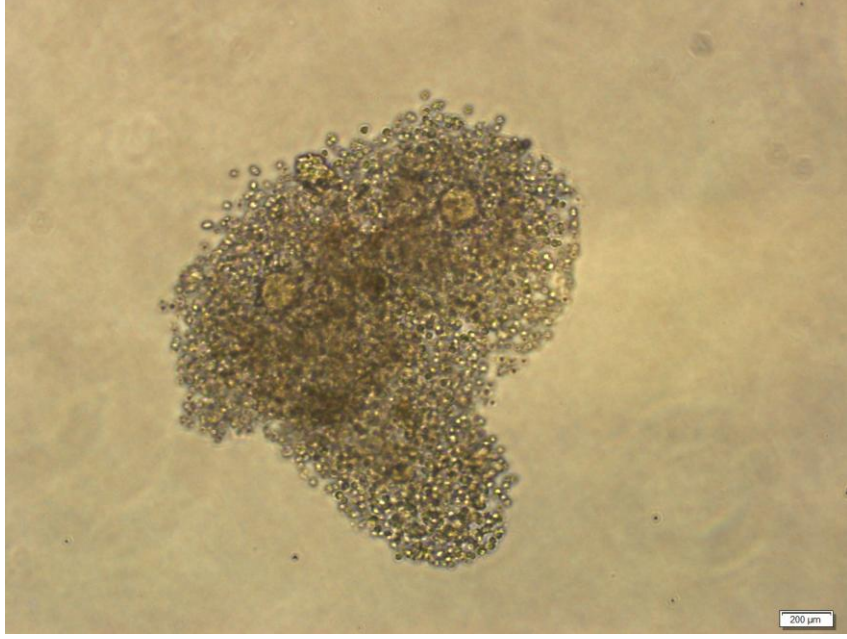
Şekil 4.2. Dejenere (siyah ok ile gösterilmiştir) oositler ve perivitellin aralığı geniş MI oositler (kırmızı ok ile gösterilmiştir) 10x inverted mikroskop.

Kontrollü overyan stimülasyon uyguladığımız 1. ve 2. gruplarda ise oositler ampulladan toplanabildi. Bu gruplardan elde ettiğimiz oosit sayıları ve kaliteleri ise sırasıyla; 1. grupta sekiz fareden toplam 127 oosit topladık. Bunların 82 MII , 10 MI, 10 GV, 25 DJN . 2. grupta ise toplam 10 fareden 120 oosit topladık . Bunların 57 si MII , 10 MI , 47 DJN , 1 tane emty zona elde edildi.

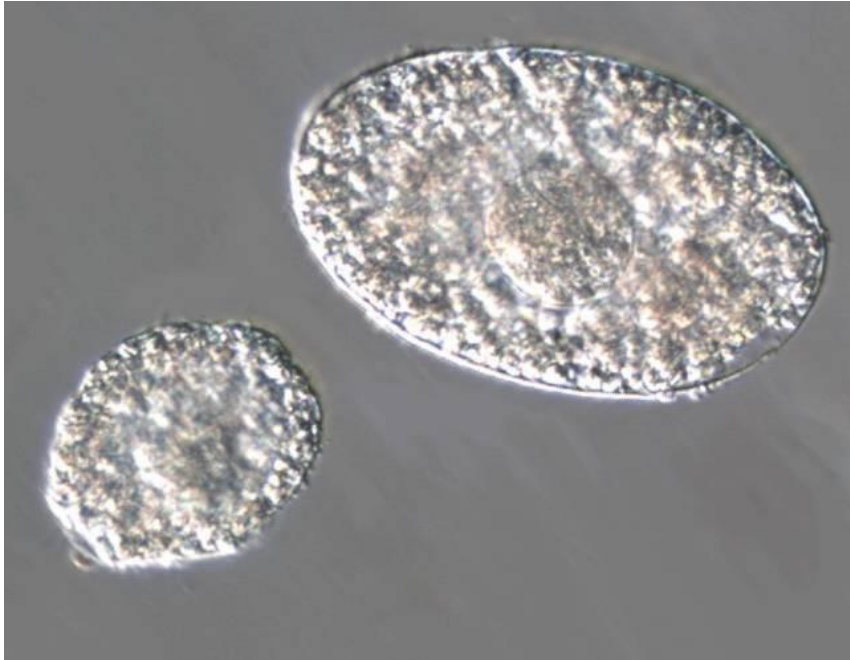
Çalışmamızın istatistiksel bölümü MII oositler baz alınarak yapıldı. 1. ve 2. gruplardaki MII oositler ve IVF uygulaması sonrası gelişen embriyolar istatistiksel karşılaştırma grupları olarak kullanıldı.

Çalışmamızda oosit ve embriyoların farklı kalite kriterlerine bakıldı. Öncelikle farelerden elde edilen M II sayılarını mukayese ettik ayrıca oositlerin kümülüs ile oluşturdukları kompleks durumu aşağıda belirtildiği üzere gradeleme yapılarak sınıflandırıldı.

Kategori A kümülüs-ooisit kompleksi. Oosit; en az beş hücre katmanı içeren yoğun bir kümülüsle çevrelenmiştir. Oosit sitoplazması neredeyse transparandır, homojendir ya da sitoplazmanın yüzeyinde koyu bir halka görülmektedir.

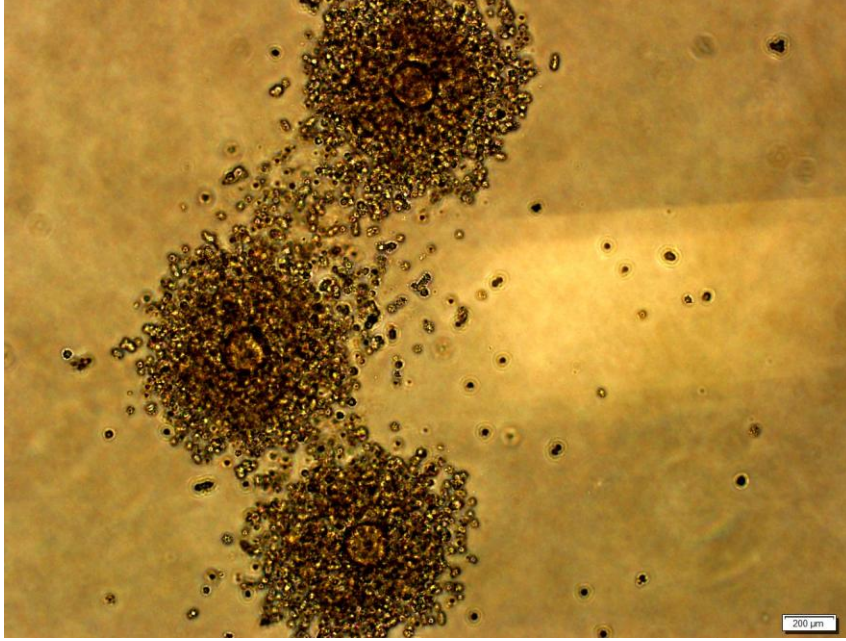


Şekil 4.3. Kategori A kümülüs – oosit kompleksi, parlak stoplazma, yoğun kümülüs hücre dizileri görülmektedir, 10x inverted mikroskop.

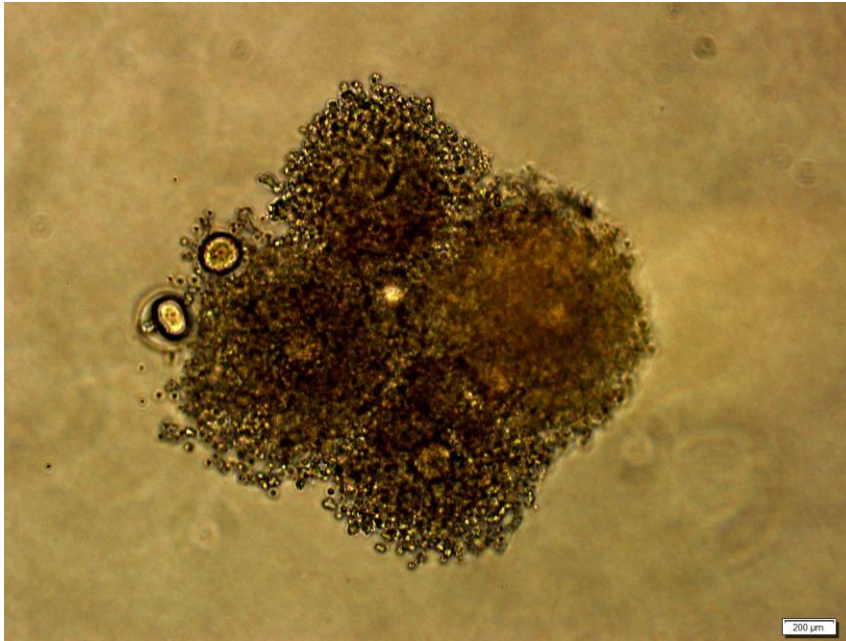


Şekil 4.4. Kategori A kümülüs – oosit kümesi görülmektedir, 40x inverted mikroskop.

Kategori B kümülüs-ooisit kompleksi. Kümülüsün yoğunluğu daha azdır. Oosit koyu ve biraz granüler sitoplazmaya sahiptir.

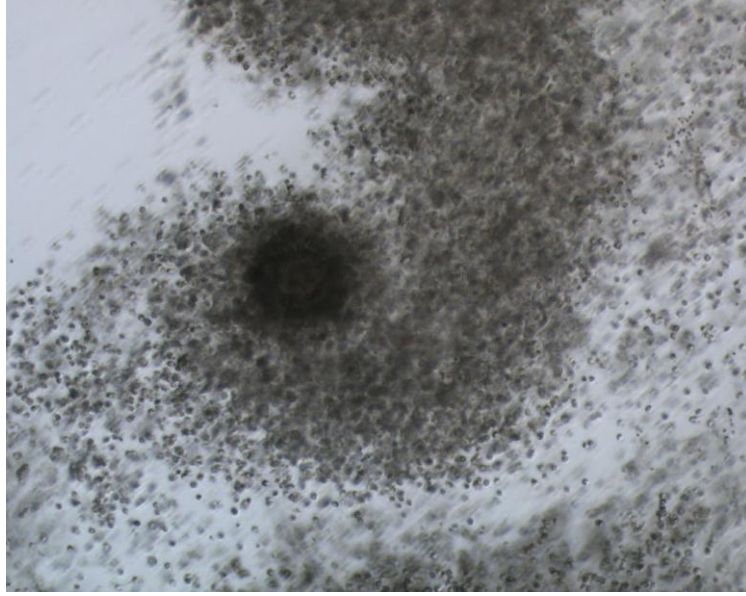


Şekil 4.5.Kategori B kümülüs – oosit kompleksi görülmektedir, 10x inverted mikroskop

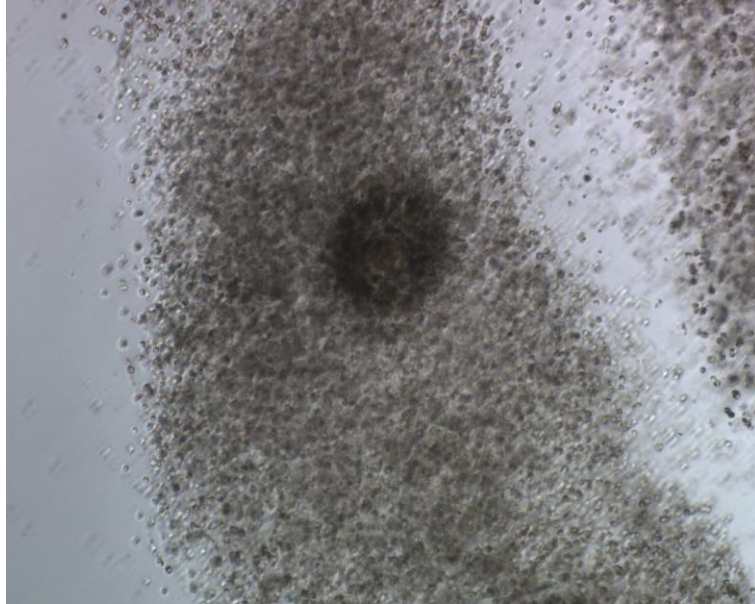


Şekil 4.6.Koyu ve granüler oositler Kategori B kümülüs – oosit kompleksi görülmektedir, 40x inverted mikroskop.

Kategori C kümülüs-oosit kompleksi. Kümülüs hücreleri koyu bir sitoplazma ile genişlemiştir. Oositin koyu ve granüler bir sitoplazması vardır (Blondin and Sandard 1995; Warriach and Chohan 2004; Nagano et al., 2006) .

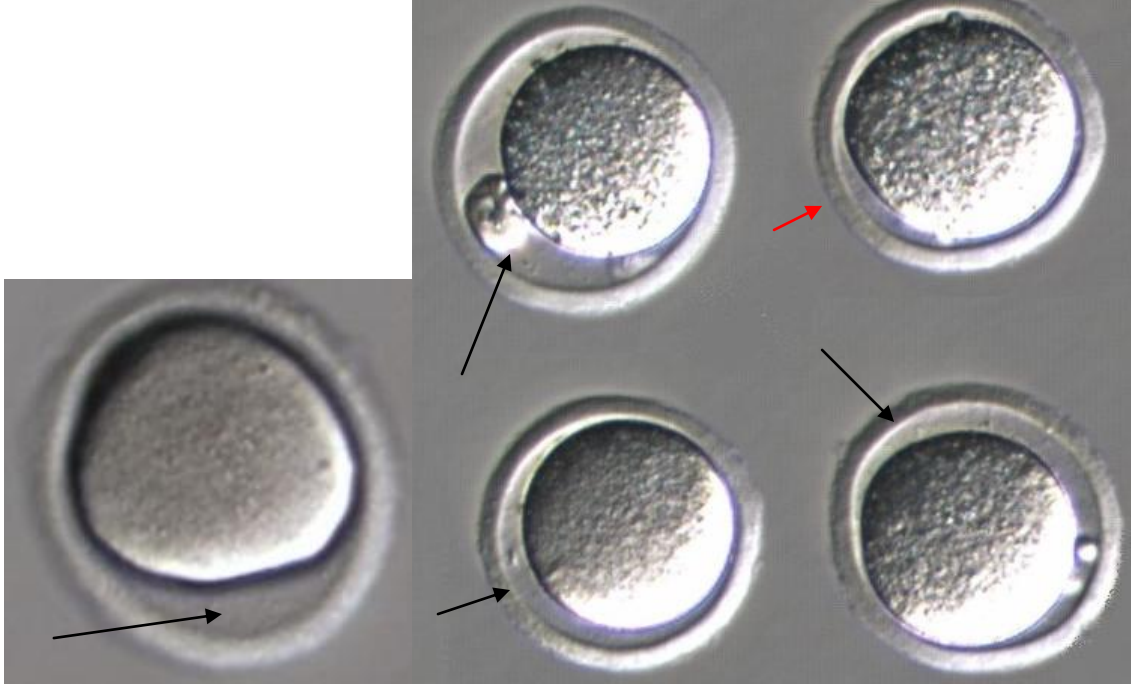


Şekil 4.7. Kategori C kümülüs – oosit kompleksi görülmektedir, 10x inverted mikroskop.



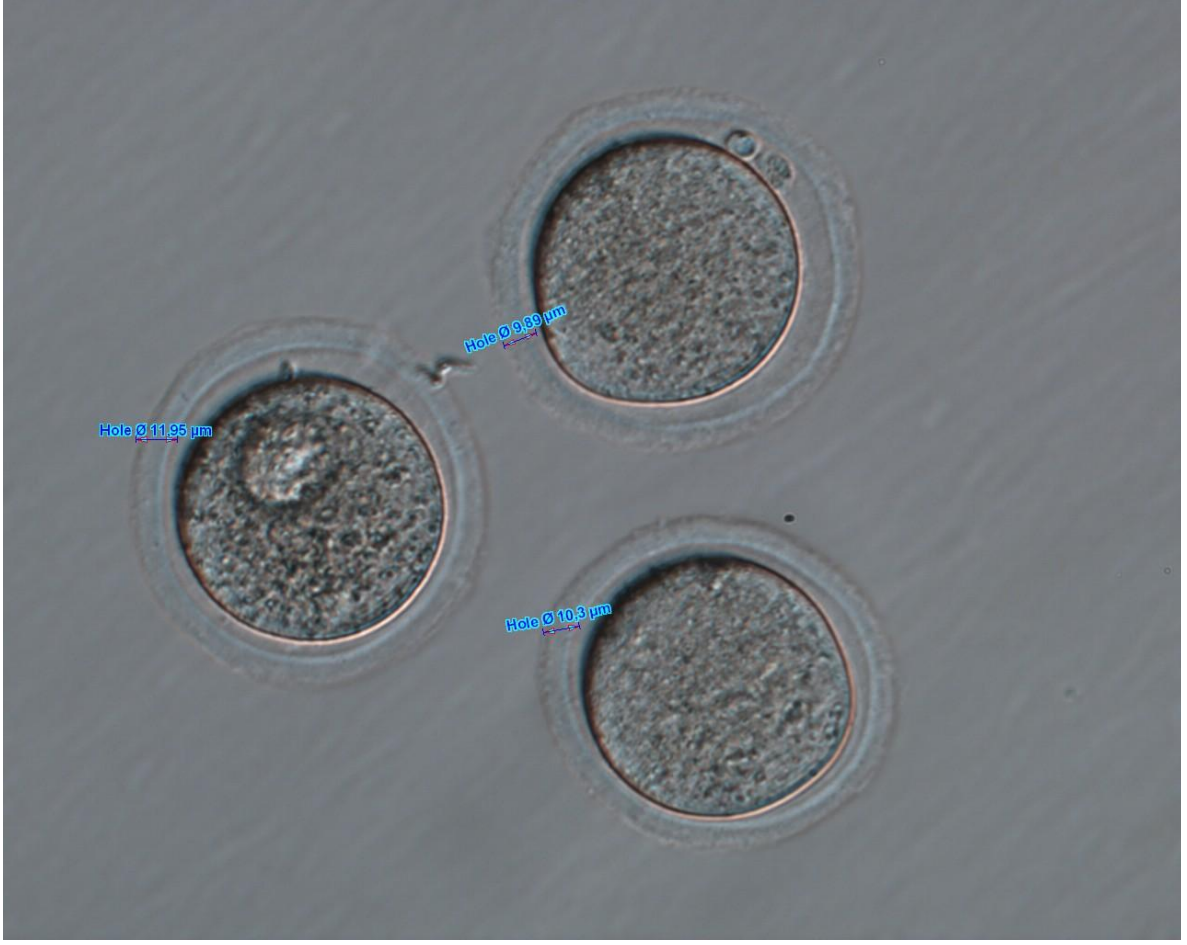
Şekil 4.8. Stoplazması koyu Kategori C kümlüs – oosit kompleksi görülmektedir, 10x inverted mikroskop

Perivitellin aralık durmuna göre ise geniş ve normal aralıklı olma durumlarına göre değerlendirdik . (Xia P., et al., 1997; Hassan-Ali et al., 1998) .

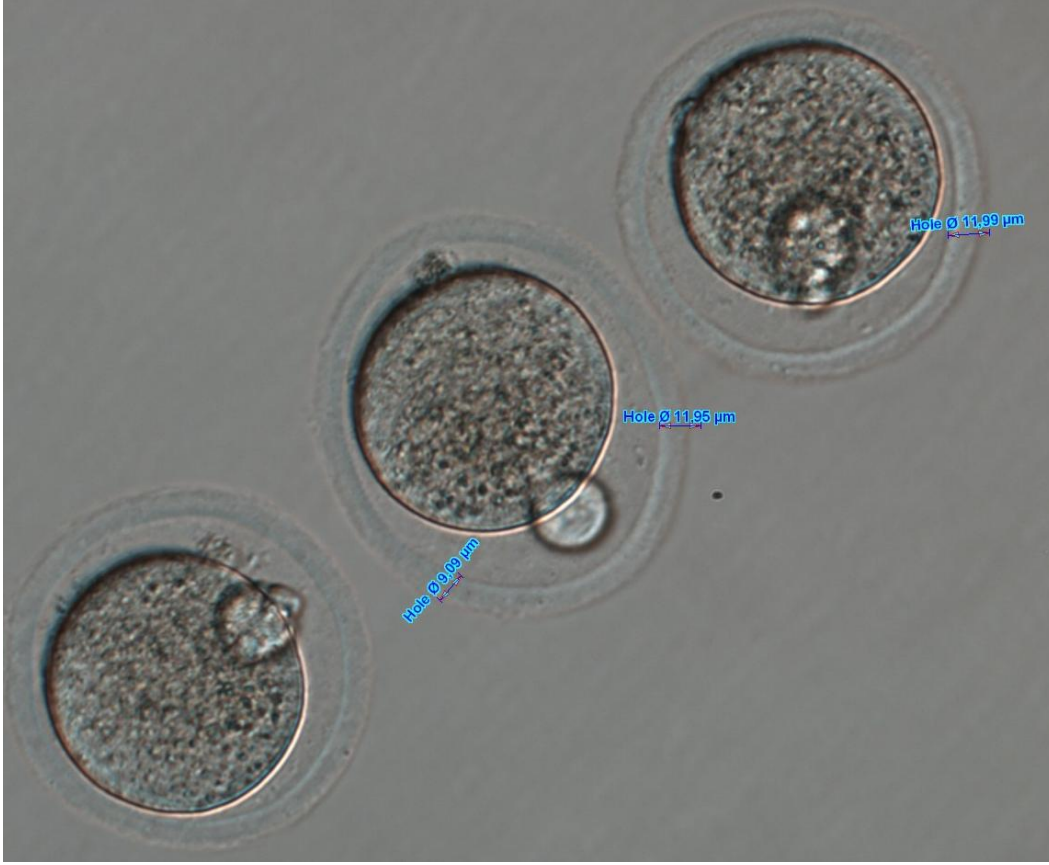


Şekil 4.9. Perivitellin aralığı normal genişlikte olanlar kırmızı ok ile, Perivitellin aralığı daha geniş olan oositler ise siyah ok ile gösterildi,40x inverted mikroskop

Oositlerle yapılan bir diğer kalite kriteri ise zona pellisuda kalınlığı ve düzgün bir yapıda olması durumuydu. Bu kriterlere göre sınıflandırma yapıldı (Gabrielsen et al., 2001).



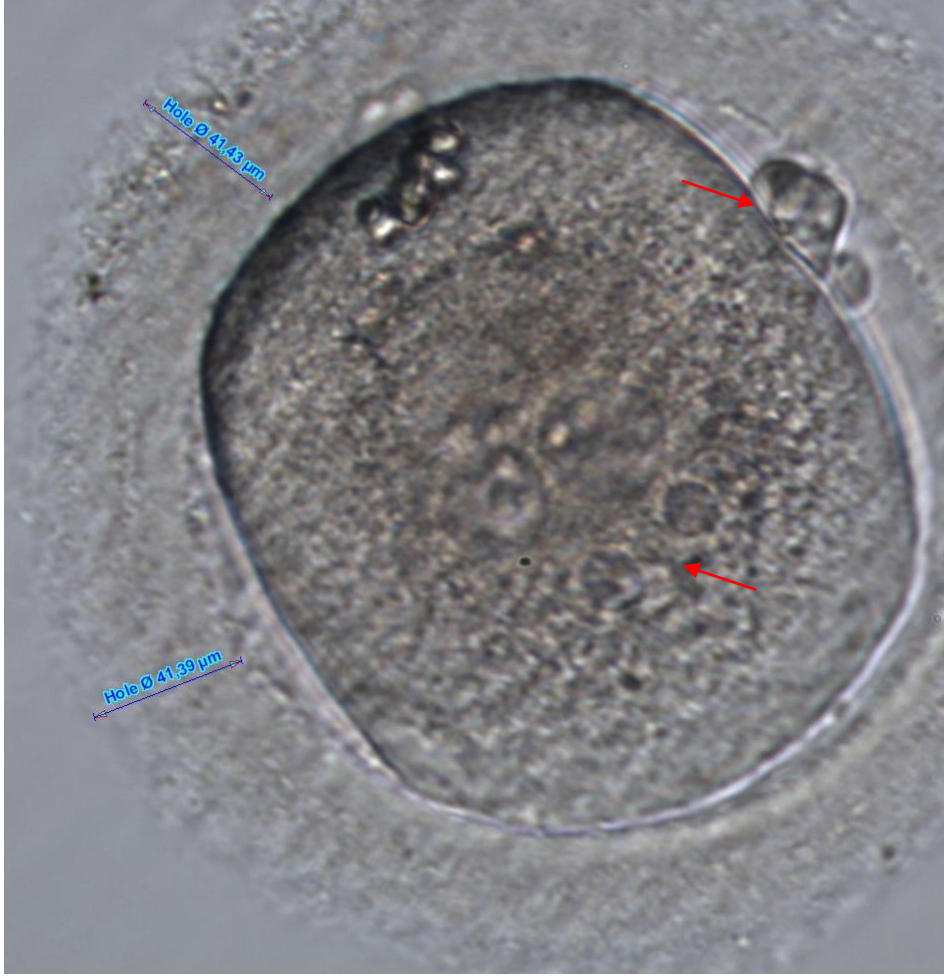
Şekil 4.10 . Zona pellisuda kalınlıkları ölçülmüş oositler görülmektedir,40x inverted mikroskop



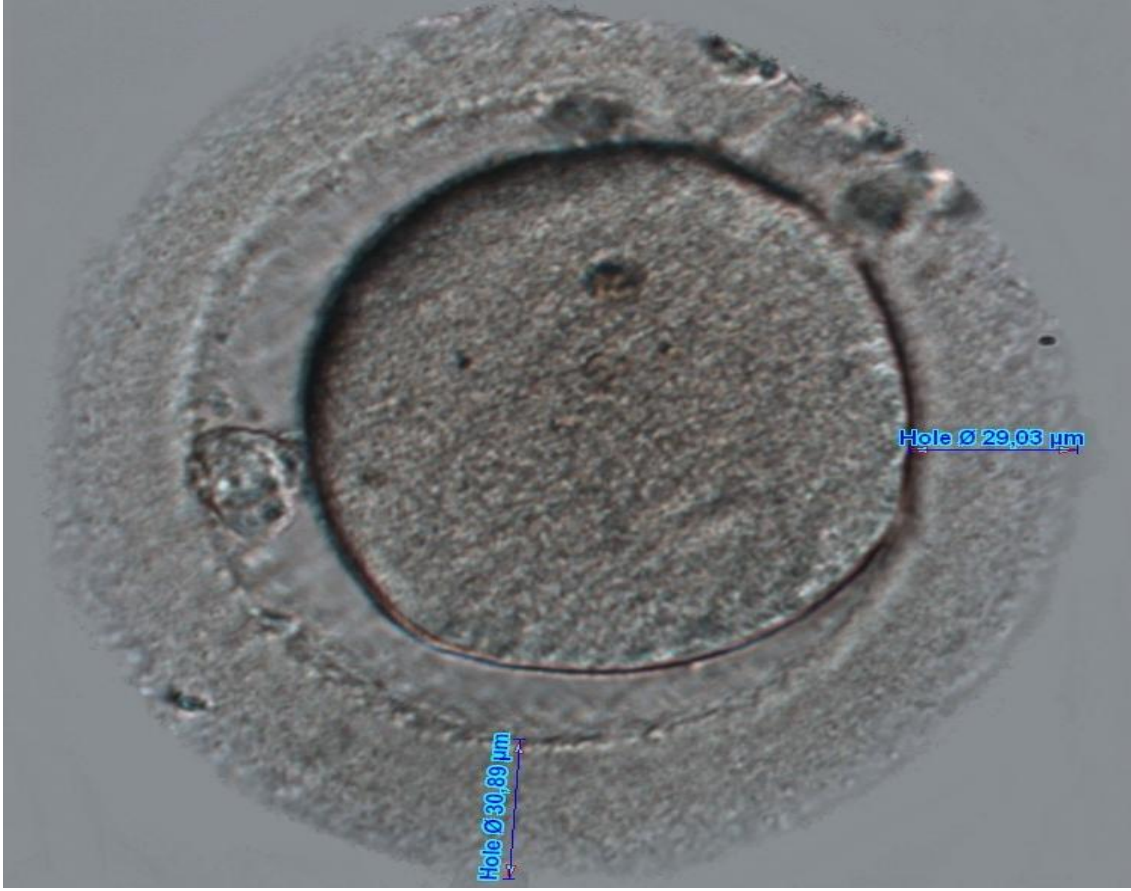
Şekil 4.11. Zona pellisuda kalınlıkları ölçülmüş kontrol grubu MII oositler görülmektedir,40x inverted mikroskop



Şekil 4.12. Diyabet çalışma grubu zona pellisuda kalınlığı ölçümü MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop.

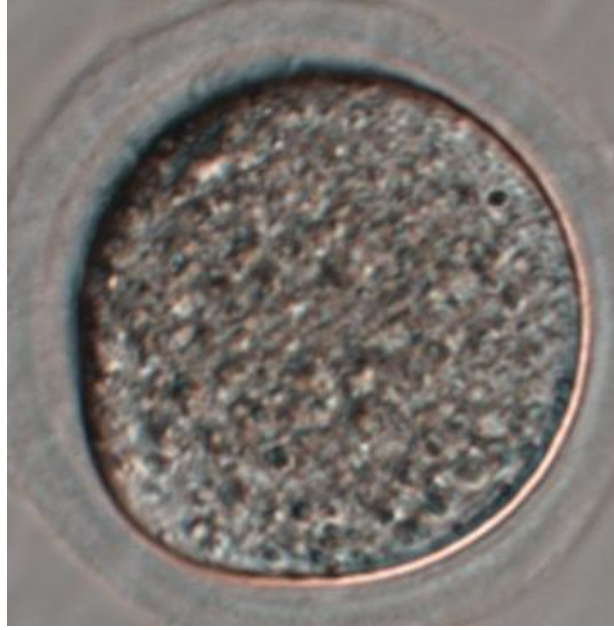


Şekil 4.13. Diyabet çalışma grubu zona kalınlığı fazla olan MII oosit görülmektedir,. Granüler stoplazma ve fragmente polar cisimcik kırmızı oklarla gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop



Şekil 4.14. Diyabet grubu kalın zona pellisudalı MII oosit görülmektedir,40x inverted mikroskop.

Stoplazma granülasyonu oosit kalitesi değerlendirmesi için incelediğimiz kriterlerdendir (Serhal ir kt., 1997; Balaban et al., 1998; Kahraman et al., 2000).

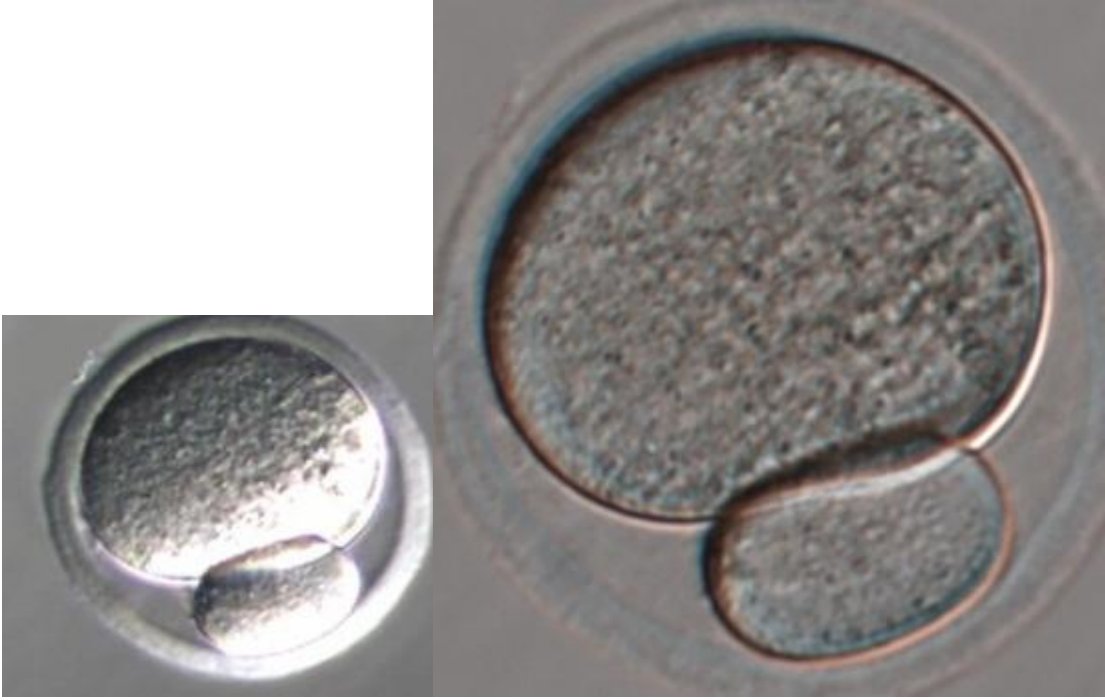


Şekil 4.15 Kontrol grubu az stoplazma granülasyonu görülen MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop



Şekil 4.16. Diyabet grubundaki fazla granüler stoplazmalı MII oositler görülmektedir, 40x inverted mikroskop

PC morfolojisi oosit kalitesi ve maturasyonu kalite kriterlerindedir. Çalışmamızda PC' in normalinden büyük , küçük, fragmante olması durumunu anormal olarak, normal morfolojidekileri normal olarak sınıflandırıp ayırım yaptık (Zeuner A., ve ark. 2003, . Eichenlaub-Ritter, U. ve ark.l. 1995; . Ebner, T. ve ark.. 1999) .



Şekil 4.17. Diyabet çalışma grubu büyük polar cisimciği olan MII oosit görülmektedir.

Solda 10x , sağda 40x inverted mikroskop



Şekil 4.18. Diyabet grubu büyük polar cisimcikli MII oosit görülmektedir, 40x inverted mikroskop

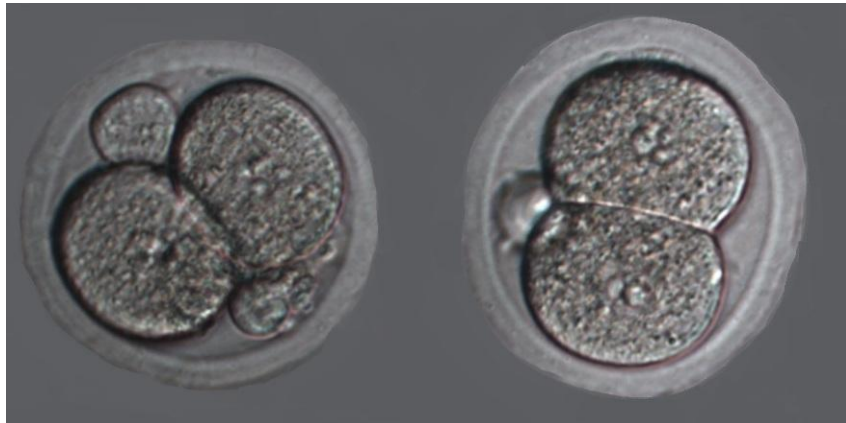


Şekil 4.19. Büyük polar cisimcikli diyabet grubu MII oositler görülmektedir, 10x inverted mikroskop

Embriyolarla ilgili kalite kriterleri ise embriyoların 2. ve 3. gününe ait fragmentasyon durumu, blastomer simetrisi, blastomer sayısı ve blastomer stoplazması parlaklık durumudur. 2. gün 4 hücreli, fragmentasyon içermeyen ve blastomer simetriği gösterip devamında 3. gün 8 hücreli, % 20 veya daha az fragmentasyona sahip blastomer simetrisi gösteren embriyolar Grade A olarak kabul edildi . Diğer gelişim durumlarındaki embriyolar ise Grade B olarak kabul edildi (Daniela ve ark., 2010).



Şekil 4.20. Birinci gün 2 blastomerli kontrol grubu embriyolar, solda fragmentasyon içermeyen embriyo , sağda fragmentasyonlu embriyo görülmektedir,40x inverted mikroskop



Şekil 4.21. Birinci gün 2 blastomerli kontrol grubu embriyolar görülmektedir, 40x inverted mikroskop



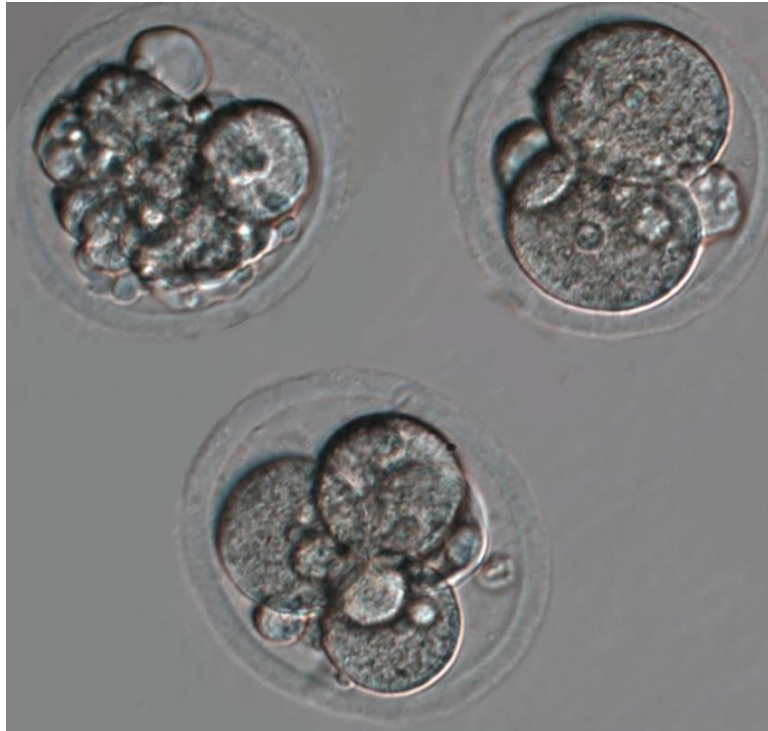
Şekil 4.22. Birinci gün diyabet grubu 2 blastomerli fragmantasyon içeren embriyolar görülmektedir, Fragmantasyonlar ok ile gösterilmiştir. 40x İverted Mikroskop



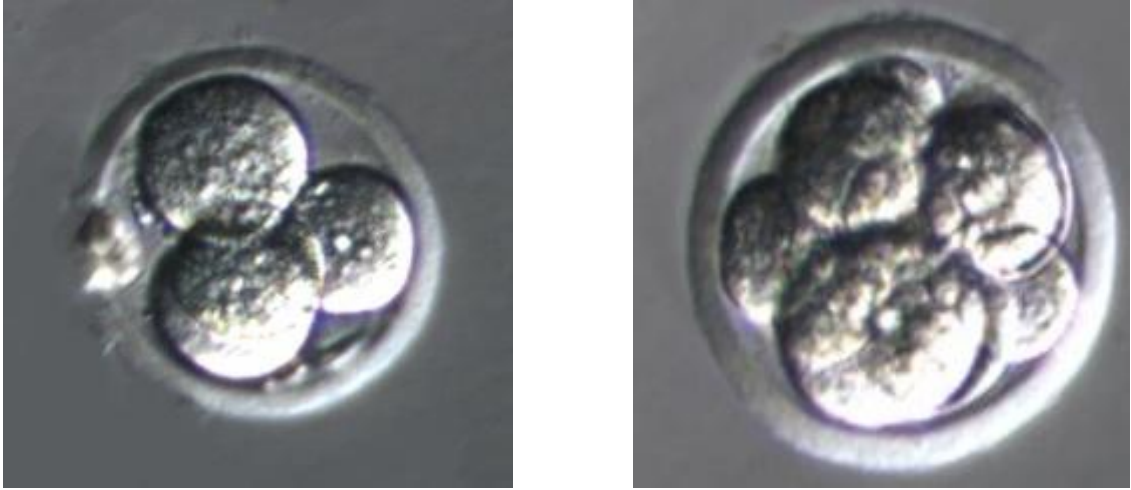
Şekil 4.23. Birinci gün diyabet grubu embriyoları Sol alttaki blastomerleri eşit embriyo görülmekte, sağ üstte farklı büyüklükte blastomer ve fragmantasyon içeren embriyolar görülmektedir, 40x İverted mikroskop



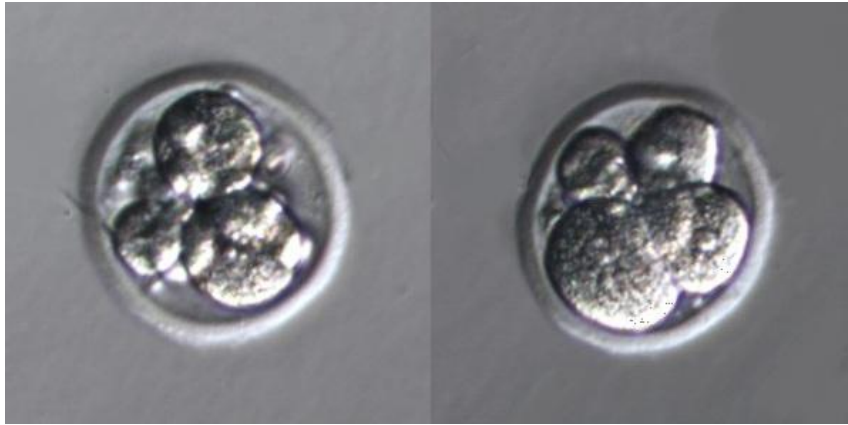
Şekil 4.24. Solda kontrol grubu 2. gün 4 blastomerli embriyo, sağda diyabet grubu 1. gün fragmentasyon içeren embriyo görülmektedir, Fragmentasyon ok ile gösterilmiştir40x
İnverted mikroskop



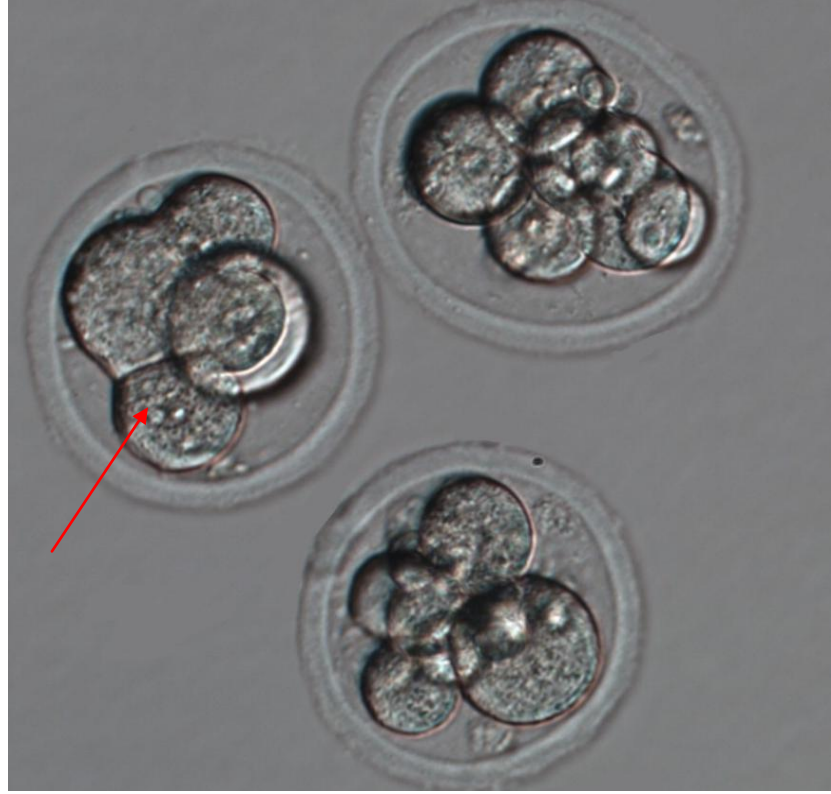
Şekil 4.25. Diyabet grubu 2. gün embriyoları görülmektedir. Aynı gün embriyolarının farklı gelişim ve fragmentasyon durumları görülmektedir. 40x İnverted mikroskop



Şekil 4.26. Kontrol grubu solda 2. gün 4 blastomerli sağda 3. gün 8 blastomerli embriyoları görülmektedir, 40x İverted mikroskop



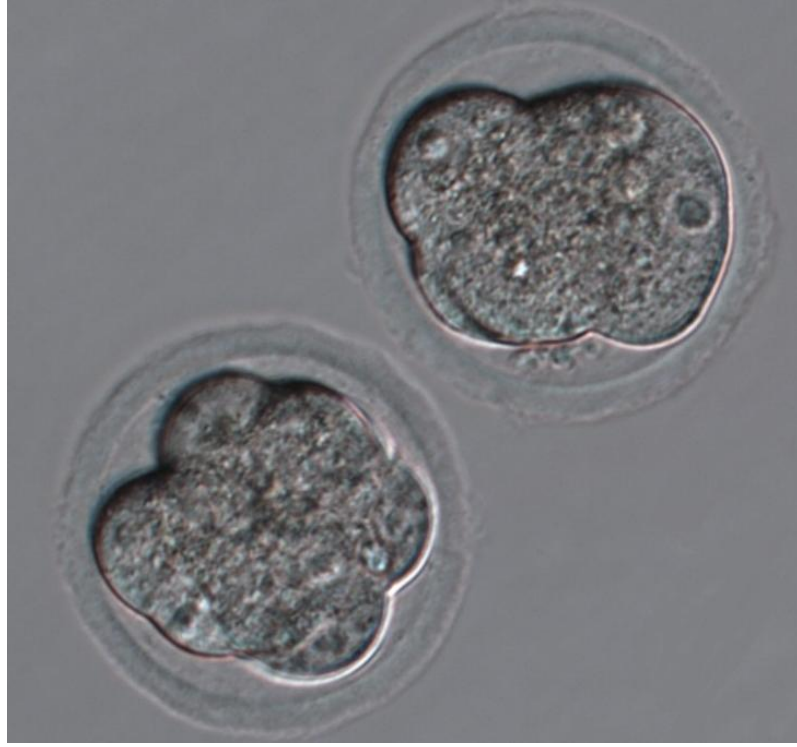
Şekil 4.27. Diyabet grubu 2. gün embriyoları . Farklı büyüklükteki blastomerler ve fragmantasyonlar görülmektedir, 40x İverted mikroskop



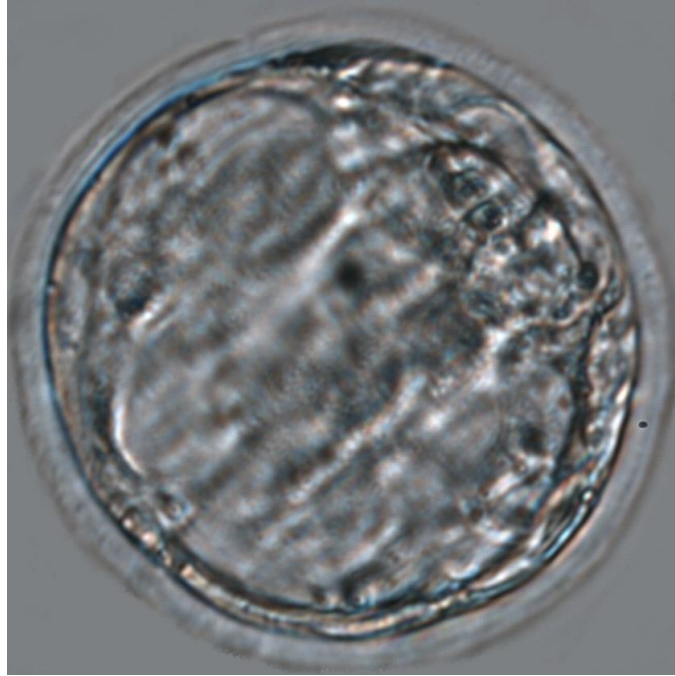
Şekil 4.28 Kontrol grubu 3. gün embriyoları görülmekte. Ok ile gösterilen kompaktlaşmış embriyo; diğer embriyolarda fragmantasyon ve blastomer asimetrisi görülmektedir. 40x İverted mikroskop



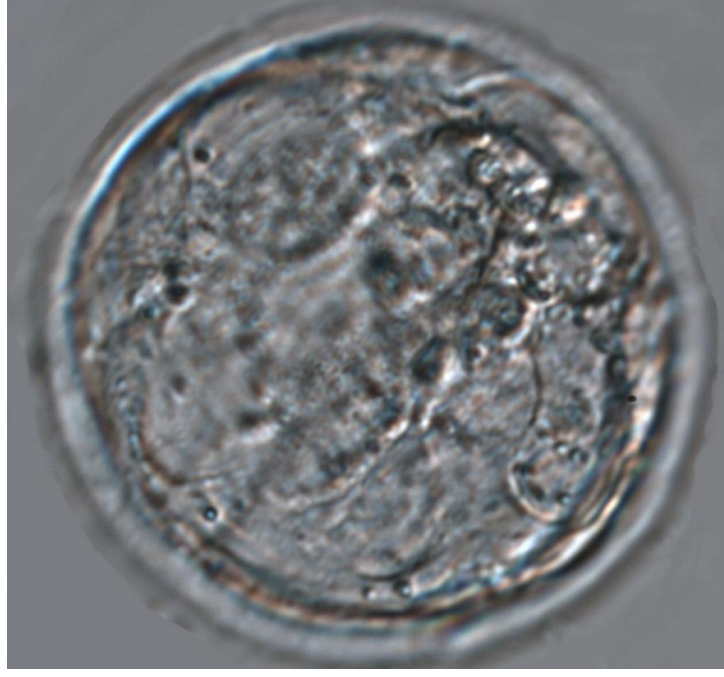
Şekil 4.29. Kontrol grubu 2. gün embriyoları, sağda kompakt solda farklı büyüklükteki blastomerleri olan embriyolar görülmektedir,40x İverted mikroskop



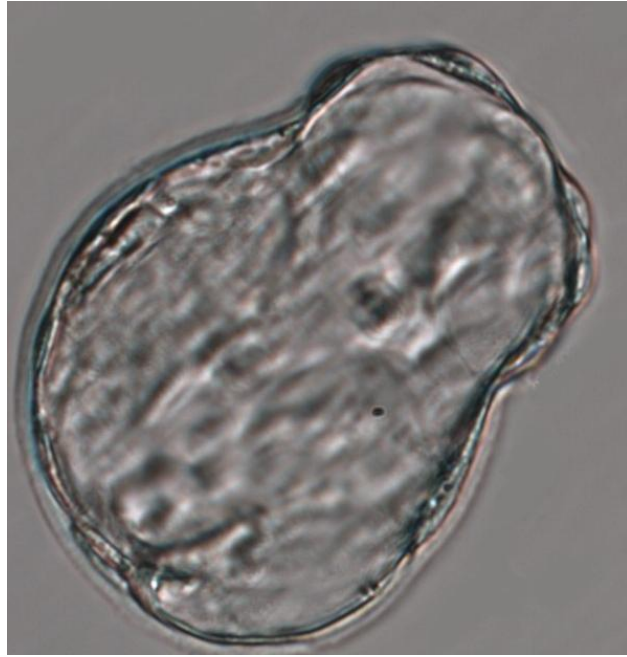
Şekil 4.30 Kontrol grubu 4. gün embriyoları görülmektedir,40x İverted mikroskop



Şekil 4.31 Diyabet grubu 5. gün blastosist görülmektedir,40x İverted mikroskop



Şekil 4.32. Kontrol grubu 5. gün blastosist gösterilmiştir,40x İverted mikroskop



Şekil 4.33. Kontrol grubuna ait hatching aşamasındaki blastosist gösterilmiştir 40x İverted mikroskop



Şekil 4.34. Hatched olmuş kontrol grubu blastosist gösterilmiştir 40x İverted mikroskop



Şekil 4.35. Diyabet grubu hatched olmuş blastosist gösterilmiştir, 40x İverted mikroskop

Tüm bu veriler Mann – Withney U testi ile karşılaştırma yapıldı . Yapılan istatistik tablosu aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge:4.1. Stimülasyon ve Stimülasyon Grubu İstatistik Verileri

	Stimülasyon Grubu n = 8	Stimülasyon + Diyabet Grubu n= 10	P değerleri P < 0,05
oosit sayısı	15,88 ± 1,246	12,00 ± 2,108	0,02
matür oosit sayısı	10,25 ± 2,375	4,50 ± 1,080	0,00
MI	1,25 ± 1,165	1,00 ± 0,667	0,230
GV	1,25 ± 1,282	0,50 ± 0,527	0,640
Djn	3,13 ± 1,727	4,70 ± 1,059	0,025
Ez	,00 ± 0,00	0,10 ± 0,316	0,00
cumulus grade A	4,00 ± 1,309	4,00 ± 1,155	0,859
cumulus grade B	6,25 ± 0,463	1,00 ± 1,054	0,0
cumulus grade C	,00 ± 0,00	0,80 ± 0,789	0,01
PVAk	2,88 ± 0,835	4,00 ± 0,00	0,01
PVAi	7,50 ± 0,53452	1,700 ± 1,059	0,00
Zpd	8,13 ± 0,354	1,70 ± 0,823	0,00
Zpk	2,125 ± 0,354	4,20 ± 0,42	0,00
stoplazman	7,50 ± 0,535	2,00 ± 0,00	0,00
stoplazmag	2,750 ± 0,707	3,70 ± 1,64	0,089
embrgradea	6,25 ± 1,389	1,00 ± 0,00	0,00
embgradeb	4,00 ± 0,00	4,80 ± 1,03	0,024
blastosiste gitme oranı	81,88 ± 8,425	37,40 ± 17,38	0,00

Çalışmamızdaki Stimülasyon ve Stimülasyon + Diyabet gruplarına ait minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 ' te belirtilmiştir.

Çizelge:4.2. Stimülasyon Grubu İstatistik Değerleri

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
Oosit sayısı	8	14	18	15,88	1,246
Matür oosit sayısı	8	7	14	10,25	2,375
MI	8	0	3	1,25	1,165
GV	8	0	3	1,25	1,282
DJN oosit	8	0	6	3,13	1,727
Emty zona	8	0	0	,00	,000
Kümüls grade A	8	2	6	4,00	1,309
Kümüls grade B	8	6	7	6,25	,463
Kümüls grade C	8	0	0	,00	,000
Perivitellin aralık kalın	8	2	4	2,88	,835
PPERivitellin aralık ince	8	7,00	8,00	7,5000	,53452
Zona pelisuda ince	8	8	9	8,13	,354
Zona pelisuda kalın	8	2,00	3,00	2,1250	,35355
Stoplazma normal	8	7	8	7,50	,535
Stoplazma granüler	8	2,00	4,00	2,7500	,70711
Embriyo grade a	8	4	7	6,25	1,389
Embriyo grade b	8	4,00	4,00	4,0000	,00000
Blastosiste gitme oranı	8	70	90	81,88	8,425
Geçerli örnek sayısı	8				

Çizelge4.3. Stimülasyon+ Diyabet Grubu İstatistik Verileri

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
Oosit sayısı	10	10	16	12,00	2,108
Matür oosit sayısı	10	3	6	4,50	1,080
MI oosit	10	0	2	1,00	,667
GV oosit	10	0	1	,50	,527
DJN oosit	10	3	7	4,70	1,059
Emty Zona	10	0	1	,10	,316
KümüLüs grade A	10	2	6	4,00	1,155
KümüLüs grade B	10	0	3	1,00	1,054
KümüLüs grade C	10	0	2	,80	,789
Perivitellin aralık kalın	10	4	4	4,00	,000
Perivitellin aralık ince	10	,00	3,00	1,7000	1,05935
Zona pelisuda ince	10	1	3	1,70	,823
Zona pelisuda kalın	10	4,00	5,00	4,2000	,42164
Stoplazma normal	10	2	2	2,00	,000
Stoplazma granüler	10	3,00	8,00	3,7000	1,63639
Embriyo grade a	10	1	1	1,00	,000
Embriyo grade b	10	4,00	7,00	4,8000	1,03280
Blastosiste gitma oranı	10	20	65	37,40	17,379
Geçerli örnek sayısı	10				

5. TARTIŞMA

Genetik olduğu belirlenen, metabolik bir hastalık olarak tanımlanan diyabet ile ilişkili komplikasyonlar, önemli derecede endişe duyulan halk sağlığı problemleri olarak tanımlanmaktadır (Thang J., 2006).

Gebelikte döneminde diyabetin geç tanımlanması ya da kontrol edilememesi gibi durumlarda ise ciddi doğumsal anomalilerle karşılaşılabilir. Pedersen'in hipotezine göre maternal hipergliseminin fetal hiperinsülinemiye neden olarak yeni doğanda konjenital malformasyonlara yol açtığı öngörülmektedir. Öncelikle fetal hiperinsülinemi, fetal ağırlık artışı nedeniyle güç doğum ya da yeni doğanda pulmoner maturasyon inhibisyonu sonucunda solunum güçlüğü sendromu oluşturabilmektedir (Jovanovic L., 2004, Felson D., 1993).

Önlem olarak günümüzde diyabetik gebeliklerde ekzojen insülin kullanımı ile gebeliklerin başarı ile sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Yine de hala, diyabetik gebeliklerde düşükler, perinatal mortaliteler ve konjenital malformasyonlar gibi şiddetli problemlerin devam ettiği bildirilmektedir. Maternal diyabetin fetal gelişimi nasıl etkilediğine ilgili mekanizmasının ortaya konması ile komplikasyonların önlenmesi sayesinde hem annelerin hem de bebeklerinin yaşam kalitelerinin artırılabilirliği belirtilmektedir. (Evers I. M., 2004; Polanco A. C., 2005).

Tip I diyabetin ovarian fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir. Diyabetik hayvanların ovulasyon oranı normal glikoz seviyeli hayvanlardan daha düşük olarak tespit edilirken, ovarian steroidogenezis değişiklikleri ile atrezi görülme sıklığında da artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Angell C., 1996; Colton A. S., 2002; Cox N. M., 1994. Foreman D, 1993).

Diyabetli hastalarda fertil yaşam süresi boyunca menstruel düzensizlik oranı oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir (Bitar M, 1997).

Tip I diyabetli kadınlarda menstruel düzensizliklerin; hipotalamik gücün azalması ya da olası insülin etkisi sonucunda atrezi oranının artması nedeniyle oosit kalite ve sayısında azalma nedenleriyle açıklanabileceği belirtilmektedir.

Diyabetik durum, oosit maturasyonu ve follükilogenezis sırasında negatif yönde etki ederler. Oositlerin maturasyonu ve gelişim potansiyelleri üzerine zararlı etkide bulunurlar. Süper ovüle olmuş farelerde diyabetin mayozun gelişimi üzerine zararlı etkide bulunduğunu göstermişlerdir (Bordignon V, . 1999) .

Glukoz metabolizmasının oosit gelişimini etkileyen önemli bir noktası oositin mayoz bölünmesini etkilemesidir. Normal olarak oositler ovülasyona kadar profaz I aşamasında bloke edilmişlerdir, gelişimlerine devam ederlerse metafaz II durumuna geçerler. Colton ve arkadaşları (2003) kimyasal olarak elde ettikleri, diyabetik farelerden izole ettikleri oositlerin maturasyonunun, kontrol grubuna göre daha zayıf bir maturasyondur . Buna ek olarak diyabetik farelerin kontrol grubuna göre daha az metafaz II oosit meydana getirme eğiliminde oldukları gösterilmiştir (Blyszczuk P., 2003) .

Aynı durum diyabetik ratlarda da gösterilmiştir. Fakat insülin tedavisiyle negatif etkinin tersine döndürüldüğü gözlenmiştir(Boianı M, . 2005).

Bu çalışmalar açıkça göstermiştir ki, diyabet oositler üzerine mayozun devamı için etkilidir, birçok modelle bu durum çalışılmıştır. Ek olarak mayoz sürecinin zarar görmesi, diyabetik farelerde oositlerin maturasyon kinetiğinin zarar görmesine neden olur. h CG enjeksiyonundan 2 ve 6 cı saatlerinde kontrol grubu farelerdeki oositlerin diyabetik grubundaki farelere göre daha büyük ve daha çok matür oosite sahip olduğu görülmüştür. İnsülin 2 geninin mutasyonu ile diyabetik duruma getirilen farelerin normal kontrol grubundaki farelere göre daha küçük ve daha az sayıda matür oositlere sahip olduğu belirlenmiştir(Bordignon V., 1999).

Yaptığımız çalışmada ; diyabet ve stimülasyon uyguladığımız kontrol grubu farelerden elde ettiğimiz oositleri kıyaslayarak, diyabetin oosit ve embriyo kalitesine etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışma gruplarından elde ettiğimiz oosit sayısı ve bu oositlerin maturasyon kalitesini incelediğimizde, daha önce yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiğini gördük.

Çalışmamızda stimülasyon grubunda 9 fare sakrifiye ettik ve toplam 127 oosit elde edildi , diyabet çalışma grubunda ise toplam 10 fareden 120 oosit elde edildi. Toplanan oosit sayılarının ortalaması stimülasyon grubundaki farelerde $15,88 \pm 1,246$, diyabet grubunda ise toplanan oosit sayısı ortalaması $12,00 \pm 2,108$ dir. Yaptığımız istatistiksel karşılaştırmada ise p değeri $p < 0.02$ olarak anlamlı bulunmuştur.

Çalışmamızda topladığımız oositlerin maturasyon durumlarını karşılaştırdığımızda daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdiğini görmekteyiz. Kontrol grubundaki 127 oositten 82' si MII , 10' u MI , 10' u GV , 25' i DJN. Diyabet grubundaki toplanan 120 oositten 57' si MII, 10MI, 47 DJN ve 1 adet boş (emty) zona toplandı. İstatistiksel olarak stimülasyon grubundan toplanan MII oositlerin ortalaması $10,25 \pm 2,375$, diyabetli grupta MII oosit ortalaması $4,50 \pm 1,080$ ' dir ve p değeri $p < 0.00$, MI oositlerin ortalaması stimülasyon grubunda $1,25 \pm 1,165$, diyabet grubunda ise ortalama $1,00 \pm 0,667$ ' dir. GV oosit ortalaması stimülasyon grubunda $1,25 \pm 1,282$, diyabet grubunda ortalama $0,50 \pm 0,527$ olarak bulundu ve p değeri $p < 0,640$. DJN oosit ortalaması stimülasyon grubunda $3,13 \pm 1,727$, diyabet grubunda ise ortalama $4,70 \pm 1,059$ olarak bulunmuş ve p değeri $p < 0.250$ olarak bulunmuştur.

İstatistiksel veriler ışığında MII ve DJN oositler arasında kontrol ve diyabet gruplar arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Fakat aynı durum MI ve GV oositler arsında bir fark görülmemiştir. Görsel olarak GV yumurtaları takip ettiğimizde bunların zamanla GVBD dönüşmesi aslında bu istatistiksel verileri desteklemektedir. Ayrıca diyabetli grupta boş zona pelisudalı bir oosit toplandı. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar daha önceki araştırmacıların bulgularıyla paralellik gösterdi. Diyabet grubundaki fare sayısı fazla olmasına karşın toplanan oosit sayısı kontrol grubu farelerden toplanılan oosit sayısından daha fazladır. Yine kontrol grubundan toplanılan MII oosit sayısı diyabet grubuna göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Oositler gelişirken, çevreleri granüloza hücreleriyle sarılır, bu hücreler oosit gelişimini destekler ve hormonal gereksinimi sağlarlar. Granülozalar çok tabakalı şekilde oosit etrafında bulunurlar. Çeşitli hücresel bağlantılarla etkileşim içinde bulunurlar ve oosit gelişiminde önemli etkileri bulunur . Diyabetik farelerde granüloza hücreleri

arasında etkileşim engellendiği ve yavaşlatıldığı için bu farelerin oositlerinin de gelişimi çok yavaştır veya gelişim görülmez(Ackert CL2001).

Diyabet nörolojik ve kalp hastalıklarının yanı sıra, düşük , yeni doğan hastalıkları ve ölü doğumlar gibi reproduktif problemlere yol açabilir. Diyabet olgunlaşan yumurta sayısını azalttığı ve embriyonik gelişiminin kötü olmasına neden olduğu görülmüştür . Farelerde streptozotosin kullanılarak oluşturulan tip I diyabet modellerinde, diyabetin oosit maturasyonu üzerine etkili olduğu gösterilmiştir . Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem in vivo hemde in vitroda gonadotropinlerle stimüle edilen oositlerin, kimyasal olarak diyabetik hale getirilen farelerdeki oosit maturasyonu kinetiklerinin hızlanmış ve oosit- kümülüs hücreleri kompleksi daha sıkı hale geldiği gözlenmiştir (Sadler TW, .1988; Becerra JE., 1990; Colton SA., 2002).

Glukoz metabolizmasındaki anormallikler programlanmış hücre ölümünü etkiler. Overyan folüküllerde atresi olarak isimlendirilen apoptosis, genellikle oosit etrafını saran kümülüs tabakalarında gözlenir. Sorunlu hamilelik ve açıklanamayan infertilite apoptosis ile beraber değerlendirilir . Oositlerin gelişimi kümülüs tabakasındaki hücrelerin büyüme ve hormonal destek sağlaması açısından önemlidir. Diyabetik farelerde apoptosis sinyalleri artmıştır (Downs SM.,1997; Downs SM 1999).

Ovülasyon zamanı esnasında oositler kümülüs hücreleriyle beraber geniş hacimde bir yapı oluşturur . Bu yapının etrafı korona hücre tabakalarıyla ışınsal olarak sarılır. Bu yapının varlığı oositlerin maturasyonunun göstergesidir ve bir çok embriyoloji laboratuvarlarında kümülüs oosit kompleksi sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma aşağıdaki gibidir;

A: Şeffaf stoplazma ve ışınsal, parlak kümülüs hücreleri varsa olgun yumurta,

B ve C : Stoplazma kararmış, yoğun şekilde kümülüs hücreleri varsa muhtemelen olgunlaşmamışlardır (Giovanni C., 2004) .

Oosit – kümülüs kompleks yapısının yukarıdaki gibi sınıflandırılmasına karşın, yapılan çalışmalarda; belirtilen üç gruba göre oositler sınıflandırılmış ve embriyo gelişimleri takip edilmiş fakat bu üç grubun arasında embriyo gelişimleri arasında ciddi bir fark olmadığı görülmüştür (A. Borini, M.A, Bonu, R. Sciajno, E. Sereni, and M. Cattoli, yayınlanmayan data). Bu yaklaşım açıkça görülmektedir ki oosit – kümülüs kompleksi sınıflandırılması sadece oosit maturasyonu için özel bir kriterdir.

Biz çalışmamızda; kümülüs-oosit komplekslerini üç kalite kategorisine göre gruplandırdık:

- Kategori A kümülüs-oosit kompleksi. Oosit; en az beş hücre katmanı içeren yoğun bir kümülüsle çevrelenmiştir. Oosit sitoplazması neredeyse transparandır, homojendir ya da sitoplazmanın yüzeyinde koyu bir halka görülmektedir.
- Kategori B kümülüs-oosit kompleksi. Kümülüsün yoğunluğu daha azdır. Oosit koyu ve biraz granüler sitoplazmaya sahiptir.
- Kategori C kümülüs-oosit kompleksi. Kümülüs hücreleri koyu bir sitoplazma ile genişlemiştir. Oositin koyu ve granüler bir sitoplazması vardır.

Bazı bilim adamları, kategori B'deki kümülüs-oosit komplekslerine sahip olan oositlerin en yüksek gelişme potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir. İn vitro fertilizasyonun ardından kategori A ve C kümülüs-oosit komplekslerine oranla kategori B kümülüs-oosit komplekslerinden daha fazla oosit gelişim göstermiştir, ama nedeni hala tam olarak bilinmemektedir. Kümülüs hücre katmanlarının sayısı oosit kalitesini belirlemede anlamlı bir faktördür. Oosit kalitesinin, oosit daha fazla hücre katmanı ile çevrelendiğinde daha iyi olduğu bildirilmektedir. Kaliteye göre insan kümülüs-oosit komplekslerinin gruplanması ile ilgili mevcut literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır(Mayes MA. , 2001).

Çalışmamızda kontrol ve diyabetik gruplara ait kümülüs – oosit kompleklerini A, B ve C olarak sınıflandırdık. Bu gruplar arasında kıyaslamada diyabetik ve kontrol gruplarının B ve C grupları arasında istatistiksel analizi anlamlı bulunmuştur; sırasıyla p değerleri $p < 0.00$ ve $p < 0.01$ ' dir. A grubunda ise istatistiksel analiz anlamlı bulunmadı. Daha önce yapılan çalışmalarda B grubuna ait kümülüs – oosit kompleksi özelliğine sahip oositlerin gelişim potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda kontrol grubuna ait B grubu oosit – kümülüs kompleksi ortalaması $6,25 \pm 0,463$ diyabet grubu ortalaması $1,00 \pm 1,054$ ' dir.

İyi kaliteli matür bir oosit düzgün küresel şekli, düzenli ve devamlı bir zona, tek parçalı PC ve şeffaf, homejen içinde yabancı parçacık içermeyen stoplazmasıyla karakterize edilir(Giovanni C.,2004).

İnsan oositlerinin perivitellin aralığı büyüklük (geniş ya da normal) ve içerik (parçalı ya da tek) olarak farklılık gösterir. Geniş perivitellin aralığa sahip oositlerin normal perivitellin aralığa sahip olanlara göre daha kötü geliştiği belirtilmiştir. ZP'nın kalınlığı 10 ile 31 μm arasında değişir. Bu stoplazma çapıyla ilişkili değildir. ZP'nın kalınlığı sperm penetrasyonunu etkiler. Oositlerin in vitroda, zona pelüsünün kalınlığı 18.6 μm 'nin altında olduğu zaman en iyi döllenmeyi gösterdiği gözlenmiştir. Kalın zona pelüsida (22 μm ya da daha kalın), sperm penetrasyonunu zorlaştırır (Eichenlaub-Ritter U., 1995; Ebner T, 2000 ; Ebner T. , 2002).

Oositlerin etrafındaki kümülüs hücreleri uzaklaştırıldığında oosit morfolojisi daha açık bir şekilde görülür. PC varlığı oosit maturasyonu için bir kanıttır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda PC morfolojisi ve oosit maturasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. PC gelişim aşamalarına girmesede fare oositleri üzerinde yapılan çalışmalarda oosit maturasyonu bu hipotezle pozitif ilişkili olduğu dikkati çekmektedir. Bu hayvanlarda büyük polar sicimcik varlığında mayotik iğ yerleşiminin düzgün olmadığı gözlenmiştir . Eichenlaub ve arkadaşları (1995) , PC dejenerasyonunun in vitro da ovulasyon sonrası yaşlanmayı ve fertilizasyon eksikliğine neden olduğunu göstermişlerdir. Ebner ve arkadaşları(1999) randomize yapmış oldukları çalışmada polar cisimcik morfolojisinin embriyo gelişimi durumunu belirleyici bir kriter olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında normal büyüklükte ve düzgün şekilli PC sahip oositleri transfer etmişler

kontrol olarak ise, fragmantasyonlu polar cisimciğe sahip embriyoları seçmişlerdir. Bu iki grup arasında fertilizasyon oranları ve ikinci gün emriyoları arasında belirgin bir fark olmamasına rağmen, gebelik ve implantasyon oranlarında ciddi farklar gözlemlemişlerdir(Zeuner A. ve ark. 2003) .

Daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalarda, aynı çalışmacılar bulgularını genişleterek normal büyüklükteki polar cisimciğe sahip oositlerle, fragmante PC'e sahip olan oositlerin fertilizasyon ve blastosist gitme oranlarına baktıklarında yine normal büyüklükteki polar cisimciğe sahip oositlerin daha yüksek gelişim gösterdiklerini bulmuşlardır (Ebner, T. ve ark. 2002).

Bu çalışmalara zıt olarak Verlinsky ve arkadaşları (2003)prospektif çalışmalarında farklı morfolojik özelliklere sahip (normal,düzensiz,fragmante) PC're sahip oositleri takip edip bu oositlerin fertilizasyon, embriyo kalitesi, 3. gün blastomer sayıları ve blastosiste gitme oranlarını karşılaştırmışlar ve araların da anlamlı farklar bulamamışlardır.

Kümüls hücreleri ayıklandıktan sonra oositler incelendiğinde genellikle farklı tip anormallikler gözlenmektedir. Uzun ,ince ve deforme zona, stoplazma merkezinde granülasyon, genişlemiş perivitellin alan ve bu alandaki stoplazmik döküntüler örnek verilebilir.Bu belirtilen dismorfizm özellikleri oosit ve embriyo gelişiminin tamamlanmasını yavaşlattığı gösterilmiştir. Serhal ve arkadaşları (1997) çalışmalarında granülasyon içeren ve içermeyen oositlerin gelişimlerini takip etmişler. Fertilizasyon ve grade I embriyo oranları birbirlerine yakın olmasına karşın transfer sonrası hamilelik oranlarının stoplazma granülasyonu içermeyen oositlerde daha yüksek olduğu bulmuşlardır .

Balaban ve arkadaşları (1998)farklı tip anomalilikleri karşılaştırmış (koyu zona, büyük previtellin aralık, koyu toplazma, şekil anomalileri, stoplazmik inklusyonlar ve iki anomalinin beraber görüldüğü vakalar) , bu gruplar arasında fertilizasyon, bölünme ve yüksek kalite embriyolara ulaşma oranları arasında ciddi bir fark bulamamışlardır. Benzer şekilde hamilelik ve implantasyon , düşük oranlarının normal veya anormal oositler arasında fark görmemişlerdir.

Bu tarz çalışmalardan çıkan genel düşünce oosit morfolojisi ve gelişim yeteneği arasında pozitif bir ilişki bulunduğudur. Bu pozitif ilişki morfolojik iyi kalite gösteren oositlerin fertilizasyonlarını devamında embriyo gelişimlerinde iyi olduğunun kanıtıdır.

Çalışmamızda perivitellin aralık, stoplazma maturasyonu, polar cisimcik ve zona pelisuda durumuna göre incelemeler yapıldı. İstatiksel analizde perivitellin aralığının geniş ve normal olması durumu, stoplazmanın normal ve granüler olması durumu, PC'in normal ve büyük + parçalı olması durumunu, zona pelisudanın normal kalınlıkta düzgün ve kalın olma durumunu diyabetik ve kontrol çalışma gruplarında karşılaştırdık.

Diyabetik ve kontrol grupları arasında perivitellin aralığının durumunu karşılaştırdığımızda p değeri perivitellin aralığının normal olması $p < 0.00$, geniş olan perivitellin aralık için ise $p < 0.01$ olarak bulunmuştur. İstatiksel olarak iki grup arasında p değeri anlamlı çıkmış, kontrol grubunda perivitellin aralığının normal olma ortalaması kontrol grubunda $7,50 \pm 0,53452$, diyabet grubunda $1,700 \pm 1,059$ belirgin olarak kontrol grubunda perivitellin aralığının morfolojisinin daha düzgün olduğunu bulduk.

Stoplazmanın normal ve granüler olma durumunu karşılaştırdığımızda ise kontrol grubundaki oositlerin stoplazmalarının diyabet grubuna göre normal stoplazmaya sahip olduğunu bulduk. Bu iki grup arasında yapılan istatiksel p değerleri stoplazmanın normal olanlarda $p < 0.00$, Granüler stoplazmalı olanlarda ise $p < 0.089$ olarak bulunmuştur. Stoplazmanın normal olma durumu istatiksel olarak anlamlı bulduk, fakat granüllü stoplazma durumu ise istatiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı..

Zona pelisuda kalın ve düzenli olmayan, normal kalınlıkta ve düzgün olarak iki grup olarak sınıflandırıp istatistiksel değerlendirme yapıldı. Zona kalınlığını $18.6 \mu\text{m}$ 'nin altı ve üstü olarak kalın ve ince olarak belirlendi . Kontrol ve diyabetik gruplar arasında normal ve anormal karşılaştırmalarının istatiksel p değerleri sırasıyla $p < 0.00$ ve $p < 0.00$ ' dır ve anlamlı olarak bulundu. Kontrol grubu oositlerinin morfolojik olarak zona pelisuda kalitesinin diyabet grubuna göre daha iyi olduğu görüldü.

Gustavo S. R., ve arkadaşları (2007), oosit ve embriyo kalitesi üzerine yapmış oldukları çalışmalarda, embriyo kalitesini sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada embriyo kalitesi stoplazmik fragmentasyon yüzdesi, blastomer simetrisi ve sayılarıyla belirlendi .

Embriyolar ikinci gün dört hücreli, simetrik blastomerli ve fragmantasyon göstermesi, üçüncü gün sekiz veya daha çok hücreli % 20 veya daha az fragmantasyon göstermesi iyi kalite embriyo olarak sınıflandırılmıştır(Veeck LL, 1999).

Bu çalışmada embriyo kalitesi Grade A ve B olmak üzere sınıflandırıldı. Grade A grubunda, belirtilmiş literatüre paralel olarak ikinci gün dört hücreli, simetrik blastomerli ve fragmantasyon içermemesi ve üçüncü gün sekiz veya daha çok hücreli % 20 veya daha az fragmantasyon içermesi, Grade B grubunda ise bu kalite kriterlerine uyumlu olmayan ikinci sınıf ve daha kötü embriyolar gruplandırıldı.

Çalışmamızda Grade A ve Grade B embriyolarının istatistiksel bulguları kontrol ve diyabetik grupta anlamlı çıkmıştır. Sırasıyla p değerleri Grade A grubu embriyolar için $p < 0.00$, Grade B grubu embriyoları için $p < 0.024$ tür. Embriyo kalitesi ve gelişiminin kontrol grubunda daha iyi olduğu görüldü.

Embriyoların blastosiste ulaşma oranları embriyo kalitesinin bir göstergesidir. Diyabet, polar cisimcik üzerine negatif etkide bulunmaktadır. PC'in normalden büyük ve fragmante olmasına neden olur. Normal büyüklükteki polar cisimciği fragmante olan oositlerin fertilizasyon ve blastosist oranlarına baktıklarında yine normal büyüklükteki polar cisimciğe sahip oositlerin daha yüksek oranlarda bulduklarını gösterdiler (Ebner, T. *et al.* 2002).

Bu çalışmalara zıt olarak Verlinsky ve arkadaşları (2002)prospektif çalışmalarında farklı morfolojik özelliklere sahip(normal,düzensiz,fragmante) PC' in takip edip bu oositlerin fertilizasyon,embriyo kalitesi, 3. gün blastomer sayıları ve blastosiste gitme oranlarını karşılaştırmışlar ve araların da anlamlı farklar bulamamışlardır.

Streptozotosin ile indüklenen diyabetik gebe sıçanlardan elde edilen geç morula ve blastosistlerde, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücrelerinin incelenenip karşılaştırıldığı çalışmalarda, gebeliğin beşinci gününde toplanan maternal diyabete maruz kalmış blastosistlerin iç hücre kitlesinde kontrol grubu sıçanlardan toplanan embriyolara göre belirgin şekilde hücre azalması görüldüğü; trofoektoderm hücre popülasyonunun ise değişmeden kaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada iki grup arasında gözlenen bu farklılıkların gebeliğin beşinci gününde toplanan morula evresi embriyolarda, iç hücre

kitlesi ve trofoektoderm differensiyasyonunun henüz tamamlanamadığı için görülemediği açıklanmıştır (Pampfer S .1990)

Yaptığımız bu çalışmada kontrol ve diyabet grupları embriyolarının blastosiste gitme oranlarına karşılaştırıldı. Kontrol grubunda % 81.88± 8.425, diyabetik grupta ise %37,40 ± 17,38 olarak bulundu. Bu grupları kıyasladığımızda p değerleri $p < 0.00$ olarak bulduk. Çıkan sonuca göre p değerlerine baktığımızda kontrol grubundaki değerlerin blastosiste gitme oranlarının diyabetik gruba göre daha yüksek olduğu görüldü.

6. SONUÇ

Diyabet, oositlerin maturasyonu, gelişim potansiyelleri ve follikülogenezis üzerine olumsuz etkisi bulunur. Diamend ve arkadaşları (2008) süper ovüle olmuş farelerde diyabetin mayoz gelişimi üzerine zararlı etkisi bulunduğu göstermişlerdir.

Son on yılda glisemi sorunlu kadınların hamilelik süresince kontrol altında tutulduklarında, düşük ve yeni doğan hastalık ve anomalilerinde azalma olduğu görülmektedir. Klinik çalışmalar bunu gösterecek hala bu grup hamile kadınlar komplikasyonları taşıma eğilimindedirler ve hamilelik döneminde takip altında olmalarına karşın diyabetin neden olduğu düşükler ve anomaliler görülmektedir . Bu durum anne kaynaklı diyabetlerin kalıcı ve geri dönüşümsüz olarak üreme sistemleri üzerine etkili olduğunu gösterir (Diamend ve ark. 2008).

Herhangi bir manupülasyon işleminden ve oositlerin fertilizasyonundan önce, oositlerin kalitesi kesinlikle incelenmelidir. Çünkü embriyo gelişiminde bu büyük etkiye sahiptir. Oositlerin in vitro olarak fertilizasyona uygunluğu; kümülüs-oosit kompleksi yapısı, oosit sitoplazması, PC, perivitellin aralık, ZP, ve mayotik iğn özelliklerinin eş zamanlı olarak ayrıntılı incelenmelidir.

Bu çalışmada diyabetin embriyo kalitesi üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. t Bu etkileri daha iyi belirleyebilmek için, çalışmamızda oosit evresinden başlatıp fertilizasyon , embriyo gelişimi ve blastosist aşamasına kadar takip edildi.

Kontrol ve diyabet grubundaki farelerden topladığımız oositleri ve embriyoları morfolojik olarak karşılaştırdığımızda; kontrol grubu oositlerin morfolojik kalite açısından diyabet grubuna göre daha iyi kalitede olduğu gösterildi.

KOH açısından baktığımızda ise diyabet grubunda denek sayısı fazla olmasına karşın toplanan oosit sayısının kontrol grubuna göre daha az olduğu görüldü.

Sonuç olarak diyabetin ovulasyon dönemine kadar etkili olduğu, daha sonra ovule olan oosit sayısına ve oositlerin maturasyonunu etkilediğini, fertilizasyon sonrası embriyo

aşamasında ise maturasyon eksikliği oluşturduğu , embriyo kalitesini ve blastosiste ulaşma oranlarında olumsuz etkide bulunduğunu tespit ettik.

7. KAYNAKLAR

- Ackert C., Gittens J., O'Brien M., Eppig J., Kidder GM. (2001). Intercellular Communication Via Connexin43 Gap Junctions Is Required For Ovarian Folliculogenesis In The Mouse. *Dev Biol*, 233: 258–270.
- Adisakwattana S., Roengsamran S., Hsu W. H. (2005). Yibchock-Auns.: Mechanisms of Antihyperglycemic Effect of P-Methoxycinnamic Acid in Normal And Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Life Sciences*.
- Angell C. A., Tubbs R. C., Moore A. B., Barb C. R., Cox N. M. (1996). Depressed Luteinizing Hormone Response To Estradiol In Vivo And Gonadotropin- Releasing Hormone In Vitro In Experimentally Diabetic Swine. *Domest Anim Endocrinol*, 13:453-463.
- Arnot A. M, Vanderkerckhove P., Debono M. A., Rutherford A. J. (1995). Follicular Volume And Number During In Vitro Fertilization: Association With Oocyte Development Capacity And Pregnancy Rate. *Hum Reprod*, 10: 256–261.
- Arrais R. F., Dib S. A. (2006). The Hypothalamus-Pituitary-Ovary Axis And Tip 1 Diabetes Mellitus: A Mini Review. *Human Reproduction*, 21 (2): 327-337.
- Balaban B., Et Al. (1998). Oocyte Morphology Does Not Affect Fertilization Rate, Embryo Quality And Implantation Rate After Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum. Reprod*. 13: 3431–3433.
- Becerra JE., Khoury MJ., Cordero JF., Eriksson JD. (1990). Diabetes Mellitus during Pregnancy And The Risks Due Specific Birth Defects: A Population Based Case-Control Study. *Pediatrics*, 85: 19.
- Bergh C., Broden H., Lundin K., Hamberger L. (1998). Comparison Of Fertilization, Cleavage And Pregnancy Rates Of Oocytes From Large And Small Follicles. *Hum Reprod.*, 13: 1912–1915.
- Bitar M. S. (1997). The Role of Catecholamines in The Etiology of Infertility in Diabetes Mellitus. *Life Sciences*, 61 (1), 65-73.
- Blades R. A., Bryant K. R., Whitehead S. A. (1985). Feedback Effects Of Steroids And Gonadotrophin Control in Adult Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Diabetologia*, 28 (6): 348-54.
- Blondin P., Sirard MA. (1995). Oocyte And Follicular Morphology As Determining Characteristics For Developmental Competence In Bovine Oocytes. *Mol Reprod Dev*, 41: 54-62.

- Blyszczuk P., Czyz J., Kania G. (2003). Expression Of Pax4 In Embryonic Stem Cells Promotes Differentiation Of Nestin-Positive Progenitor And Insulin-Producing Cells. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 100: 998–1003.
- Boiani M., Schöler H. R. (2005). Regulatory Networks In Embryo-Derived Pluripotent Stem Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 872-881.
- Bordignon V., Clarke H. J., Smith L. C. (1999). Developmentally Regulated Loss And Reappearance Of Immunoreactive Somatic Histone H1 On Chromatin Of Bovine Morula-Stage Nuclei Following Transplantation Into Oocytes. *Biol. Reprod*, 61: 22–30.
- Bruns C. M., Kemnitz J. W. (2004). Sex Hormones, Insulin Sensitivity, And Diabetes Mellitus. *Ilar J*, 45 (2): 160-9.
- Cawood E. H. H., Bancroft J., Stell J. M. (1993). Perimenstrual Symptoms in Women With Diabetes Mellitus And The Relationship to Diabetic Control. *Diabet Med*, 10: 444–448.
- Chang A. S., Dale A. N., Moley K. H. (2005). Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development And Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology*, 146 (5): 2445-2453.
- Chi MM., Pingsterhaus J., Carayannopoulos M., Moley KH. (2000). Decreased Glucose Transporter Expression Triggers BAX-Dependent Apoptosis in The Murine Blastocyst. *J Biol Chem*, 275: 40252–40257.
- Colton S. A., Humpherson P. G., Leese H. J., Downs S. M. (2003). Physiological Changes in Oocyte-Cumulus Cell Complexes From Diabetic Mice That Potentially Influence Meiotic Regulation. *Biol. Reprod.*, 69, 761–770.
- Colton S., Pieper G., Downs S. (2002). Altered Meiotic Regulation in Oocytes From Diabetic Mice. *Biol Reprod*, 67: 220–231.
- Cortvrindt R., Smits J., Steirteghem A. C. (1996). In Vitro Maturation, Fertilization And Embryo Development Of Immature Oocytes From Early Preantral Follicles From Prepuberal Mice in A Simplified Culture. *Human Reproduction*, 11 (12): 2656-2666.
- Cox N. M., Muerer K. A., Carlton C. A., Tubbs R. C., Mannis D. P. (1994). Effects Of Diabetes Mellitus During The Luteal Phase Of The Oestrus Cycle Onpreovulatory Follicular Function, Ovulation And Gonadotrophins In Gilts. *J Reprod Fertil*. 101: 77-86.
- Daniel SAJ., Armstrong DT. (2010). Gore-Langton RE. Growth And Development Of Rat Oocytes In Vitro. *Gamete Res*, 24:109–21.

- Diamond MP., Moley KH., Pellicer A., Vaughn WK., Decherney AH. (2008). Effects Of Streptozotocin And Alloxan-Induced Diabetes Mellitus on Mouse Follicular and Early Embryo Development. *J Reprod Fertil*, 86:1–10.
- Downs S. (1997). Involvement Of Purine Nucleotide Synthetic Pathways in Gonadotropin-Induced Meiotic Maturation In Mouse Cumulus Cell-Enclosed Oocytes. *Mol Reprod Dev*, 46: 155–167.
- Downs S., Utecht A. (1999). Metabolism Of Radiolabeled Glucose By Mouse Oocytes And Oocyte Cumulus Cell Complexes. *Biol Reprod*, 60: 1446–1452.
- Dufresnes E., Vanderhayden I., Robin D., Delcourt J., Pampfer S., De Hertogh R. (1993). Glucose and Pyruvate Metabolism in Preimplantation Blastocysts from Normal and Diabetic Rats. *J Reprod Fertil*, 98: 169–177.
- Ebner T., Et Al. (1999). Elective Transfer Of Embryos Selected On The Basis Of First Polar Body Morphology is Associated With Increased Rates Of Implantation And Pregnancy. *Fertil Steril*, 72: 599–603.
- Ebner T., Moser M., Sommergruber C., Yaman C., Pflieger U., Tews G. (2002). First Polar Body Morphology And Blastocyst Formation Rate In Icsi Patients. *Hum Reprod*, 17: 2415–8.
- Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Feichtinger O., Tews G. (2000). Prognostic Value Of First Polar Body Morphology On Fertilization Rate And Embryo Quality In Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod*, 15: 427-30.
- Eichenlaub-Ritter U., Schmiady H., Kentenich H., Soewarto D. (1995). Recurrent Failure In Polar Body Formation And Premature Chromosome Condensation In Oocytes From A Human Patient: Indicators Of Asynchrony In Nuclear And Cytoplasmic Maturation. *Hum Reprod*, 10: 2343-9.
- Evers I. M., Valk H., Visser G. (2004). Risk Of Complications Of Pregnancy In Women With Type 1 Diabetes: Nationwide Prospective Study In The Netherlands, *Bmj*. 17: 328 (7445).
- Farrell T., Neale L., Cundy T. (2002). Congenital Anomalies in The Offspring of Women With Type I, Type II and Gestational Diabetes. *Diabet Med.*, 19: 322–326.
- Felson D. T., Zhang Y., Hannan M. T., Anderson J. J. (1993). Effects Of Weight And Body Mass Index On Bone Mineral Density In Men And Women: The Framingham Study. *J Bone Miner Res*, 8: 567-573.

Foreman D., Kolettos E., Garris D. R. (1995). Diabetes Prevents The Normal Responses Of The Ovary To Fsh. *Endocr Res*; 19: 187-205.

Forti G., Krausz C. (1998). Evaluation and Treatment of The Infertile Couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83 (129: 4177-4188).

Gabrielsen A., Lindenberg S., Petersen K. (2001). The Impact Of The Zona Pellucida Thickness Variation Of Human Embryos On Pregnancy Outcome In Relation To Suboptimal Embryo Development. A Prospective Randomized Controlled Study. *Hum Reprod*, 6:2166-70.

Garris D. R., Whitehead D. S., Morgan C. R. (1984). Effects Of Alloxan-Induced Diabetes On Corpus Luteum Function In The Pseudopregnant Rat. *Diabetes*, 33: 611-615.

Giovanni C., Elena S., Lucia S., Silvia M., Immacolata I., Andrea B. N.Y. (2004). *Acad. Sci.*, 1034: 132–144.

Greene M. (1999). Spontaneous Abortions And Major Malformations in Women With Diabetes Mellitus. *Semin Reprod Endocrinol*, 17: 127–136.

Griffin M. L., South S. A., Yankov V. I., Booth R. A., Asplin C. M., Veldhuis J. D., Evans W. S. (1994). Insulin-Dependent Diabetes Mellitus And Menstrual Dysfunction. *Ann Med*, 26: 331–340.

Gustavo S. R., Et Al. (2007). Occurrence of Fertilization and Qualitative Embryo Classification on 2nd and 3rd Day Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University Of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Hassan-Ali H., Hisham-Saleh A., El-Gezeiry D., Baghdady I., Ismaeil I., Mandelbaum J. (1998). Perivitelline Space Granularity: A Sign Of Human Menopausal Gonadotrophin Overdose In Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod*, 13:3425-30.

Hovav Y., Almagor M., Kafka I., Elvaghish G., Yaffe H. (1995). In Vitro Fertilization and Embryo Transfer in Uncontrolled Diabetes Mellitus. *J. Assist Reprod Genet*, 12 (6) : 392-3.

Idil M., Cepni I., Demirsoy G., Ocal P., Salihoğlu F., Senol H., Elibol F., Irez T. (2004). Does Granulosa Cell Apoptosis Have A Role In The Etiology of Unexplained Infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 112: 182–184.

Jovanovic L. (2004). Advances In Diabetes For The Millennium: Diabetes In Women. *Medgenmed*. 6 (3): 3.

Kahraman S., Yakin K., Donmez E., Samli H., Bahce M., Cengiz G., Et Al. (2000). Relationship Between Granular Cytoplasm Of Oocytes And Pregnancy Outcome Following Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod*,15: 2390-3.

Kjaer K., Hagen C., Sando S. H., Eshoj O. (1992). Epidemiology of Menarche And Menstrual Disturbances in An Unselected Group of Women With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Compared To Controls. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 524–529.

Kristina L., Aleksandras V., Angelija V., Vidmantas L. (2009). Department Of Histology And Embryology, Kaunas University Of Medicine, Department Of Anatomy And Physiolog. Lithuanian Veterinary Academy, Lithuaniamedicina. Kaunas.

Kutteh WH., Schoolcraft WB., Scoot RT J. (1999). Antihydrial Antibodies Do Not Affect Pregnancy Outcome in Women Undergoing Assisted Reproduction. *Hum. Reprod*, 14 (11): 2886-90.

Lea RG., Mccracken JE., Mcintyre SS., Smith W., Baird JD. (1996). Disturbed development of The Preimplantation Embryo in Insulin-Dependent Diabeticbb/E Rat. *Diabetes*, 45: 1463–1470.

Lee K. S., Joo B. S., Nay. J., Yoon M. S., Choi O. H., Kim W. W. (2001). Cumulus Cell Apoptosis As An Indicator To Predict The Quality Of Oocytes And The Outcome Of Ivf-Et. *J Assist Reprod Genet*, 18: 490–498.

Liu J., Elst, J., Broecker R., Dhont M. (2001). Live Offspring By In Vitro Fertilization Of Oocytes From Cryopreserved Primordial Mouse Follicles After Sequential In Vivo Transplantation And In Vitro Maturation. *Biology Of Reproduzution*; 64: 171-178.

Marti R., Das K. U., Ghosh D. (2005). Attenuation of Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Streptozotocin- Induced Diabetic Rats By Aqueous Extract of Seed of Tamarindus Indica. *Biol. Pharm.Bull*; 28 (7): 1172-1176.

Mayes M., Sirard M. (2001). The Influence Of Cumulus-Oocyte Cmplx Morphology And Meiotic Inhibitors On The Kinetics Of Nuclear Mturation I Cattle. *Theriogenology*, 55: 911-22.

Moley K. H., Vaughn W. K., Decherney A. H., Diamond M. P. (1991). Effect of Diabetes Mellitus on Mouse Pre-Implantation Embryo Development, *J Reprod Fertil*, 93:325-332.

Moley K., Chi M., Knudson C., Korsmeyer S., Mueckler M. (2001). Hyperglycemia Induces Apoptosis in Preimplantation Embryos Via Cell Death Effector Pathways. *Nat Med.*, 12: 1421–1424

Moley K., Chi M., Mueckler M. (1998). Maternal Hyperglycemia Alters Glucose Transport and Utilization in Mouse Preimplantation Embryos. *Am J Physiol*, 275: E38–E47.

Moore K. L. (2002). Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri, Türkçe 1. Baskı. Nobel Matbaacılık, İstanbul.

Nakahora K., Saito H., Satio T., Ito M., Ohta N., Takahashi T., Hiroi M. (1997). The Incidence Of Apoptotic Bodies In Membrana Granulosa Can Predict Prognosis Of Ova From Patients Participating In In Vitro Fertilization Programs. *Fertil Steril*, 68: 312–317.

Nataprawira D. S., Harada T., Sekijima A., Mio Y., Terakawa N. (1992). Assessment Of Follicular Maturity By Follicular Diameter And Fluid Volume in a Program Of in Vitro Fertilization And Embryo Transfer. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol*, 18: 225–230.

Pampfer S., De Hertogh R., Vanderheyden I., Michiels B., Vercheval M. (1990). Decreased Inner Cell Mass Proportion In Blastocysts From Diabetic Rats. *Diabetes*, 39 (4): 471-6.

Pampfer S., Dehertogh R., Vanderheyden I., Michiels B., Verchaval M. (1990). Decreased ICM Proportion In Blastocysts From Diabetic Rats. *Diabetes*, 39: 471–476.

Pasquali R., Pelusi C., Genghini S., Cacciarini M., Gambineri A. (2003). Obesity And Reproductive Disorders In Women. *Human Reproduction Update*, 9 (4): 359-372.

Polanco A. C., Revilla M. C., Palomino M. A., Islas A. (2005). Effect Of Maternal Diabetes On Human And Rat Fetal Development. *Ginecol Obstet. Mex.* 73 (10): 544-52.

Powers R., Chambers C., Larsen W. J. (2006). Diabetes Mediated Decreases in Ovarian Superoxide Dismutase Activity Are Related To Blood Follicle Barrier And Ovulation Defects. *Endocrinology*, 137: 7.

Ramachadran B., Ravi K., Narayanan V., Kandaswamy M., Subramanian S. (2004). Protective Effect Of Macrocyclic Binuclear Oxovanadium Complex Of Oxidative Stress In Pancreas Of Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Chemico-Biological Interactions*, 149: 9-21.

Sadler T., Hunter E. I., Balkan W., Horton W. (1988). Effects Of Maternal Diabetes On Embryogenesis. *Am J Perinatol*, 5: 319–326.

Sakamaki H., Akazawa S., Ishibashi M., Izumino K., Takino H., Yamasaki H., Yamaguchi Y., Goto S., Urata Y., Kondo T., Nagataki S. (1999). Significance of Glutathione-Dependent Antioxidant System in Diabetes-Induced Embryonic Malformations. *Diabetes*, 48: 1138-1144.

- Schalkwijk C. G., Stehouwer C. D. (2005). Vascular Complications in Diabetes Mellitus: The Role of Endothelial Dysfunction. *Clin. Sci (Lond)*, 109: 143-59.
- Schuetz A. W., Whittingham D. G., Snowden R. (1996). Alterations in The Cell Cycle of Mouse Cumulus Granulosa Cells During Expansion And Mucification in Vivo And in Vitro. *Reprod Fertil Dev.*, 8: 935–943.
- Scott J. R., Hodgen G.D. (1990). The Ovarian Follicle: Life Cycle of E Pelvic Clock. *Clin Obstet Gynecol*; 33: 551.
- Serhal PF., Ranieri DM., Kinis A., Marchant S., Davies M., Khadum IM. (1997). Oocyte Morphology Predicts Outcome Of Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod*, 12:1267-70.
- Sliwa L. (2001). Substance P And B-Endorphin Act As Possible Chemoattractants of Mouse Sperm. *Archives Of Andrology*, 46: 135-140.
- Soria B., Bedoya F. J., Martin F. (2005). Gastrointestinal Stem Cell I. Pancreatic Stem Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289: 177-180.
- Soussis I., Trew G., Matalliotakis I., Margara R., Winston RM. (1998). *J Assist Reprod. Genet.*, 15 (6):378-80.
- Speroff L., Glass N.H., Kase R.G. (1999). *Clinical Gynaecologic Endocrinology And Infertility*. 6 Th Edition, 84, 171, 213, 236, 1013, 1097, 1133.
- Strotmeyer E., Steenkiste A., Foley T., Berga S., Dorman J. (2003). Menstrual Cycle Differences Between Women With Tip 1 Diabetes And Women Without Diabetes. *Diabetes Care*, 26: 1016-1021.
- Tatewaki R., Otani H., Tanka O., Kitada J. A. (1989). Morphological Study On The Reproductive Organs As A Possible Cause Of Developmental Abnormalities In Diabetic Nod Mice. *Histol. Histopathol.*; 4: 343-358.
- Thang J., Kusaka I., Massey A., Rollins S., Zhang J. (2006). Increased Rhoa Translocation In Aorta Of Diabetic Rats. *Acta Pharmacologica Sinica*; 27 (5), 543-548.
- Trounson A. O., Gosden R. G. (2003). *Biology And Pathology Of The Oocyte*. Cambridge, Uk: Cambridge University Press, 307–309.
- Veck L. (1999). Abnormal Morphology Of The Human Oocyte And Conceptus. In: *An Atlas Of Human Gametes And Conceptuses*. Carnforth, Lancashire, United Kindom: Parthenon, 57–68.

Vercheval M., De Hertogh R., Pampfer S., Vanderheyden I., Michiels B., De Bernardi P., De Meyer R. (1990). Experimental Diabetes Impairs Rat Embryo Development During The Preimplantation Period. *Diabetologia*, 33 (4), 187-91.

Verlinsky Y., Et Al. (2003). Is There Any Predictive Value Of First Polar Body Morphology Forembryo Genotype Or Developmental Potential *Reprod. Biomed. Online.*, 7: 336–341.

Warriach HM., Chohan KR. (2004). Thickness Of Cumulus Cell Layer is A Significant Factor İn Meiotic Competence Of Buffalo Oocytes. *J Vet Sci*, 5:247-51.

Wentzel P., Ejdesjö A., Eriksson U. (2003). Maternal Diabetes in Vivo and High Glucose In Vitro Diminish Gapdh Activity İn Sıçan Embryos. *Diabetes*, 52: 1222-1228.

Wittmaack F. M., Kreger D. O., Blasco L., Tureck R. W., Mastroianni J. R. L., Lessey B. A. (1994). Effect Of Follicular Size On Oocyte Retrieval, Fertilization, Cleavage And Embryo Quality İn İn Vitro Fertilization Cycles: A 6 Year Data Collection. *Fertil Steril*, 62: 1205–1210.

Xia P. (1997). Intracytoplasmic Sperm İnjection: Correlation Of Oo-Cyte Grade Based On Polar Body, Perivitelline Space And Cytoplasmic İnclusions With Fertilization Rate And Embryo Quality. *Hum Reprod*, 12:1750-5.

Yeshaya A., Orvieto R., Dicker D., Karp M., Ben-Rafael Z. (1995). Menstrual Characteristics Of Women Suffering From İnsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Int J Fertil*, 40: 269–273.

Yılmaz S. (2003). Normal ve Diabetik Rat Karaciğer Dokusunda Piruvat Kinazın Bazı Kinetik Özelliklerinin Karşılaştırılması. *Turk J Vet Anim Sci; Tübitak*, 27: 991-997.

Yuan YQ., Van Soom A., Leroy Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y. (2006). Relationship Between Bovine Oocyte Morphology And İn Vitro Developmental Potential. *Zygote*, 14:53-61.

Zeuner A., Muller K., Reguszynski K., Jewgenow K. (2003). Apoptosis Within Bovine Follicular Cells And Its Effect On Oocyte Development During İn Vitro Maturation. *Theriogenology*, 59: 1421-33

Zhang H., Vollmer M., De Geyter M., Litzistorf Y., Ladewig A., Durrenberger M., Guggenheim R., Miny P., Holzgreve W., De Geyter C. (2000). Characteristics Of An İmmortalized Human Granulosa Cell Line *Cov* 434. *Mol Hum Reprod*; 2: 146–153.

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen, K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 2001;16:2166-70.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:348-53.

Asuaki K., Vemera T., Minaguchi H. Occult Hyperprolactinemia in infertile women. *Fertil Steril*. 1993; 80: 423-7.

Zollner U., Lanig K., Steck T., Dietl J. Assessment of endocrine status in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. *Arch Gynecol Obstet*. 2001; 265(1): 16-20.

Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004;70:535-47.

Sun QY, Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev* 2003;49: 347-59.

Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004; 82: E14-23.

Trimarchi JR, Keefe DL. Assessing the quality of oocytes derived from in vitro maturation: are we looking under the lamppost? *Fertil Steril* 2006; 85: 839-40.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006; 65: 126-36

Wang Q, Sun QY. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 2007;

Nestler JE., Clone JN., Blackward WG. The central role of obesity (hyperinsulinemia) in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161: 1093.

Poretsky L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin resistant states. *Endocrinol Rev*. 1991;12:3.

Yarali H., Gürkan T. Polikistik over sendromu. In: Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi, Kısınkçı H., Gökşin H., ve ark. Güneş Kitapevi, Ankara 1996; 1184-91.

Hasegawa I., Murakawa H., Suzuki M., Yamamoto Y., Kurabayashi T., Tanaka K. Effect of tioglitazone on endocrine and ovulatory performance in women with insulin resistance related to polycystic ovarian syndrome. *Fertl Steril.* 1999; 71: 323-7.

Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 2006;14:53-61.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özcan BUDAK
Doğum yeri ve tarihi : KOCAELİ 1979
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : EVLİ
Askerlik Durumu : 2008 Yılında yapıldı
Çalıştığı kurum : KOÜ Tıp Fak. Hast. Tüp Bebek Merkezi
İletişim Adresi ve telefonu : KOÜ Tıp Fak. Hast. Tüp Bebek Merkezi Umuttepe
Kampüsü KOCAELİ Tel: 0546 895 18 73
Yabancı dili : İngilizce, 2008 ÜDS (80 PUAN)
Unvanları : GebzeYüksek Lisans Biyoloji Bölümü bitirildi (2008)
Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen – Edebiyat A.D
Biyoloji Bölümü Mezunuyum (2004)
Marmara Üniversitesi Sağ. Hiz. MYO
Tıbbi Laboratuar Mezunuyum (1999)
Mesleki Deneyimi : Son iki yıldır Embriyoloji ve Androloji
laboratuarlarında aktif olarak çalışmaktayım. Ayrıca özel kuruluşlarda sekiz yıl Biyokimya
ve Mikrobiyoloji laboratuar deneyimine sahibim.