


KABUL VE ONAY

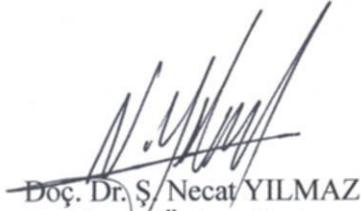
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Diyabetik Farelerin Ovarian Follikül Morfolojisinde ve Zona Pellusida Proteinleri Dağılımında Görülen Değişikliklerin İmmünohistokimyasal ve İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/2010



Prof. Dr. Tülin BAYKAL
Mersin Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Enstitü Müdürü
İmza mühür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm, üzerimde büyük emekleri olan başta tez danışmanım Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tülin Baykal'a, Prof. Dr. Banu Coşkun YILMAZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Ebru Ballı, Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım;

Fluoresan mikroskoplarını kullanmamıza izin veren Doç. Dr. Gökhan Coral'a, floresan mikroskopik değerlendirme sırasında yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Pınar Küce'ye;

Dokuların eldesi ve tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuardaki çalışma arkadaşlarıma ve Nailcan Öztürk'e çok teşekkür ederim.

Tüm bu zorlu dönem boyunca yanımda olup beni destekleyen aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zona Pellusida.....	4
2.2. Zona Pellusida Glikoproteinleri.....	4
2.3. Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Yapısal Özellikleri.....	5
2.4. Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Fertilizasyona Etkisi.....	5
2.5. İnfertilite.....	5
2.6. Diabetes Mellitus Tanısı ve Sınıflaması.....	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi.....	10
3.2. Deneysel diyabet oluşturulması.....	10
3.3. Ovulasyonun uyarılması.....	10
3.4. Overlerin elde edilmesi, fiksasyon.....	10
3.5. İmmünfloresan işaretleme.....	11
3.6. Elektron mikroskopik inceleme.....	12
4. BULGULAR.....	13
4.1. Elektron mikroskopik bulgular:.....	13
4.2. Floresan mikroskopik bulgular:.....	23
5. TARTIŞMA.....	27
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	30
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.1.	Kontrol grubuna ait 3000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü.....	14
Şekil 4.1.2	kontrol grubuna ait 4000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	14
Şekil 4.1.3	Kontrol grubuna ait 15000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü..	15
Şekil 4.1.4	Deney grubuna ait 3000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	16
Şekil 4.1.5	Deney grubuna ait 5000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	17
Şekil 4.1.6	Deney grubuna ait 10000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü...	17
Şekil 4.1.7	Deney grubuna ait 20000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü...	18
Şekil 4.1.8	Deney grubuna ait 3000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	18
Şekil 4.1.9	Deney grubuna ait 7,500 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	19
Şekil 4.1.10	Deney grubuna ait 3000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü....	19
Şekil 4.1.11	Deney grubuna ait 30000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü...	20
Şekil 4.1.12	Deney grubuna ait 5000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü.....	20
Şekil 4.1.13	Deney grubuna ait 1000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü.....	21
Şekil 4.1.14	Deney grubuna ait 3000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü.....	21
Şekil 4.1.15	Deney grubuna ait 5000 büyütmelek elektron mikroskobik görüntü.....	22
Şekil 4.2.1	Kontrol grubuna ait 400 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	23
Şekil 4.2.2	Kontrol grubuna ait 100 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	24
Şekil 4.2.3	Kontrol grubuna ait 100 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	24
Şekil 4.2.4	Deney grubuna ait 400 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	25
Şekil 4.2.5	Deney grubuna ait 100 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	26
Şekil 4.2.6	Deney grubuna ait 40 büyütmelek floresan mikroskobik görüntü.....	26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Sığır Serum Albumini
DM	Diabetes Mellitus
FITC	Florescein Isothiocyanate
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GAD	Glutamik Asit Dehidrogenaz
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
LH	Luteinleştirici Hormon
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
ZP1	Zona Pellusida Glikoproteini 1
ZP2	Zona Pellusida Glikoproteini 2
ZP3	Zona Pellusida Glikoproteini 3

ÖZET

Diyabetik Farelerin Ovaryan Follikül Morfolojisinde ve Zona Pellusida Proteinleri Dağılımında Görülen Değişikliklerin İmmünohistokimyasal ve İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi

Zona pellusida memeli oositinin etrafını saran glikoprotein yapıda yarı saydam bir matrikstir. İnsan ve farelerde ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere üç majör glikoproteinden meydana gelir. Bu glikoproteinlerin her biri, spermin zona pellusidaya bağlanmasında, fertilizasyondan sonra oositin birden fazla spermle döllenesinin engellenmesinde ve implantasyondan önceki embriyonun korunmasında önemli roller oynar.

İnfertilite, ortalama olarak çiftlerin %20'sinde ortaya çıkan erkek veya kadın faktörüne bağlı olabildiği gibi bazen de açıklanamayan nedenlerle ortaya çıkan bir durumdur. Diyabet uzun dönemde çeşitli organlarda yetmezliğe ve fonksiyon bozukluğuna sebep olur. Bu çalışmada diyabetin erişkin dişi farelerde zona pellusida üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada erişkin 12 adet Balb/C dişi fare kullanıldı. Fareler diyabet (n=6) ve kontrol (n=6) grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Diyabet grubuna streptozotosin (200 mg/kg) uygulandı. Hayvanlar 4 hafta sonra ovulasyon indüksiyonunu takiben, sakrifiye edildi. Kontrol grubuna ise sadece ovulasyon indüksiyonu yapılarak hayvanlar sakrifiye edildi. Elde edilen over dokuları elektron mikroskopik ve immünfloresan işaretleme için takip edilerek incelendi.

Elektron mikroskopik incelemelerde diyabetik grupta, granüloza hücrelerinde apoptozisin arttığı, zona pellusidanın morfolojisinde ve oosit sitoplazmasında anormallikler olduğu gözlemlendi. İmmünfloresan işaretlemede diyabet grubuyla kontrol grubu arasında ZP2 antikorunun ekspresyonlarında herhangi bir farklılığa rastlanmadı. Ancak, diyabet grubundaki zona pellusidalarda fragmantasyonlar olduğu görüldü.

Sonuç olarak ZP2 glikoprotein ekspresyonları açısından gruplar arasında fark olmamasına rağmen diyabet grubunda zona pellusidanın yapısının bozulması diyabetin ZP2 dışındaki glikoproteinleri etkilemiş olabileceğini düşündürdü.

Anahtar Sözcükler: Zona Pellusida, Diyabet, Elektron Mikroskopi, ZP2, İnfertilite

ABSTRACT

Immunohistochemical and ultrastructural examination of the alterations in the morphology of the ovarian follicle and distribution of the zona pellucida proteins of the diabetic mice.

Zona pellusida, a semi-transparent matrix in a glycoprotein structure, surrounds the mammalian oocyte. Zona pellusida consists of three major glycoproteins called as ZP1, ZP2 and ZP3. Each of these proteins has crucial roles on sperm binding to zona pellucida, preventing polyspermy after fertilization and protection of the preimplant embryo .

Infertility occurs in the 20% of the couples in the population due to male or female disfunction or sometimes unidentified causes. Diabetes has long term effects on organs as failure and disfunction. The main purpose of this study was to observe the effects of diabetes on the zona pellucida of adult female mice.

Twelve adult Balb/C mice were used for the study. Study design has two groups as diabetes (n=6) and control (n=6). In the diabetes group, 200 mg/kg dose of streptozotosin were administered to each adult female mice and after four weeks, following the ovulation induction, both diabetes and control group animals were sacrificed. Postmortem tissues were than processed for the ultrastructural examination and immunofluorescence staining.

Ultrastructural examination of the diabetes group tissues showed increased apoptosis in the granulosa cells and abnormalities in the morphology of zona pellucida and oocyte cytoplasm. Immunofluorescence staining of ZP2 protein did not show any significant difference between the control and diabetes groups. However, fragmentation in the diabetes group zona pellucida is observed.

Despite there is no difference on the ZP2 glycoprotein expression between the groups, our observation of the ultrastructurally impaired zona pellucida made us to suggest that diabetes might have caused an alternation on the expression of the other glycoproteins.

Key words: Zona pellucida, Diabetes mellitus, Electron microscopy, ZP2, Infertility.

1. GİRİŞ

Zona pellusida memeli oositinin etrafını saran glikoprotein yapıda yarı saydam bir matrikstir. İnsan zona pellusidası yalnızca gelişen oositlerin sentezlediği ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 denen dört glikoprotein içerir (1). Günümüzde, fareler ve diğer türlerde ise bu glikoproteinlerin yalnızca ilk üç tanesi gösterilebilmiştir. Zona pellusida glikoproteinleri türe özgü olarak döllenmiş oosite spermin bağlanmasından sorumludur. Bu glikoproteinler spermi, akrozomal enzimlerinin ekzositoz ile salınması için uyarır ve döllenmiş oosite başka bir spermin bağlanmasını engeller. Genel olarak, her üç glikoprotein oogeneze zona pellusidanın oluşmasında yapısal bir rol oynar. Ayrıca, ZP3 türe özgü davranarak serbest yüzen spermler için primer sperm reseptörü olarak görev yaparken, ZP2 sekonder sperm reseptörü olarak işlev görür ve akrozomla reaksiyona girerek spermi bağlar. Her üç glikoprotein de gelişen oositler tarafından sentezlenir ve salgılanır (2, 3). Normal bir zona pellusidanın varlığı fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için çok önemlidir.

İnfertilite, ortalama olarak çiftlerin %20'sinde ortaya çıkan erkek veya kadın faktörüne bağlı olabildiği gibi bazen de sebebi bulunamayan bir durumdur. Bu durumun tanısı ve tedavisi çoğu zaman zor ve yüksek maliyetli olmaktadır. Önemli orandaki olguda ise tedavi başarısız kalabilmektedir.

Diabetes mellitus (DM), pankreastan insülin sekresyonunun yetersizliği ve/veya dokuların insüline yanıtının bozulmasıyla oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalıktır. Diyabet, Tip 1 ve Tip 2 diyabet olarak sınıflandırılır (4). Bu hastalığın uzun dönem etkileri, retinopati, nöropati ve nefropatiye yol açabilir. Diyabetli insanlarda kardiyovasküler, periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıkların riski artar (5). Ayrıca tip 1 diyabetli kadınlarda polikistik over sendromu sıklığının arttığı, bunun yanı sıra tip 1 diyabetik kadınların normal kadınlara göre daha erken menopoza girdiği ve amenore ve oligomenore gibi menstrüel bozukluklara sahip oldukları da bilinmektedir (6).

Literatürde diyabetin oosit maturasyonunu olumsuz etkilediğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak, diyabetik bireylerin follikülleri ve zona pellusidalarının ince yapısını ve zona pellusida glikoproteinlerinin ekspresyon özelliklerini inceleyen

alışmalara rastlanamamıştır. Bu çalışmada, erişkin diyabetik dişi farelerdeki follikül ve zona pellusida morfolojisinin elektron mikroskobik olarak incelenmesi ve zona pellusida glikoproteinlerinin ekspresyonlarının immün işaretleme yöntemleriyle değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Overe ait follikülün gelişmesi, somatik hücre proliferasyon sürecinin koordinasyonu ile oosit büyümesi ve maturasyonunun farklanmasını gerektirir (7). Granüloza hücreleri ve oosit arasındaki parakrin etkileşim, hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde ve normal folliküler gelişimde önemlidir (8,9). Folliküler gelişim sırasında oosit ve granüloza hücreleri arasındaki etkileşimi düzenlemek de FSH'ın görevidir.

Overe ait folliküller, birinci mayoz bölünmenin diploten evresinde bekleyen bir oosit ve etrafını çevreleyen birkaç yassı folliküler hücreden meydana gelen primordial yapılar olarak gelişmeye başlar. Kemirgenlerde follikül gelişimi doğumdan sonraki birkaç günde eş zamanlı meydana gelirken, evcil hayvanlar ve primatlarda fetal hayatta daha uzun bir sürede oluşurlar (10). FSH ve LH overlerde siklik değişiklikler yaparlar. Bu değişiklikler ovaryan siklus olarak bilinir. Ovaryan siklusta, primordial folliküller daha çok olmak üzere gelişimin her evresindeki folliküller bulunur. Fetal gelişimin 3. ayında overlerde ilk ortaya çıkan primordial folliküllerdir. Bu evredeki primordial folliküllerin gelişimi gonadotropin stimulasyonundan bağımsızdır. Oositi çevreleyen folliküler hücreler mitoz ile çoğalırken, bir yandan da kübik şekilli granüloza hücrelerine farklanırlar ve bundan sonra primer veya pre-antral folliküller olarak tanımlanırlar (11, 12). Follikül, belli bir büyüklüğe ulaştığı anda granüloza hücreleri arasında antrum adı verilen bir boşluk oluşur, daha sonra bu antrum akışkan bir sıvıyla dolar ve bundan sonra follikül antral veya sekonder follikül olarak adlandırılır. Bu evreye ulaşıldığı zaman folliküllerin daha fazla büyümesi ve gelişmesi için gonadotropin gereklidir. Oositin olgunlaşma evresi kemirgenlerde pre-antral follikül sırasında olur. Bu evrede ayrıca zona pellusida oluşmaya başlar ve fertilizasyondan sonra ve erken embriyonik gelişim sırasında embriyo için gerekecek olan m-RNA ve protein üretilir (13). Follikülogenezle ilişkili dinamik değişiklikler endokrin ve over içi mekanizmalarla düzenlenir (14).

2.1. Zona Pellusida

Tüm memelilerin yumurtaları zona pellusida denilen ince ekstrasellüler bir örtüyle sarılmıştır, implantasyon öncesi gelişim, fertilizasyon ve oogenez süresince önemli bir rol oynar. Memeli oositlerini, döllenmiş oosite ve gelişimin erken blastokist evresine kadarki embriyoyu bir zona pellusida sarar(15). Fare zona pellusidası yalnızca gelişen oositlerden sentezlenen 3 farklı fibriler glikoprotein içerir ve bu uzun fibriller bir araya gelerek bir matriks oluşturur (16).

Zona pellusida, oogenez, fertilizasyon ve implantasyon öncesi gelişim süresince önemli bir rol üstlenir. Örneğin; döllenmiş oosite spermin bağlanmasını düzenler ve akrozom reaksiyonunu indükler. Zona pellusida döllenmiş yumurtaya başka bir spermin bağlanmasını da önler (17, 18). Zona pellusida, implantasyon öncesi gelişim süresince, embriyonik-embriyonik olmayan eksenin ve birinci bölünme düzleminin hizaya girmesini etkiler. Zona pellusida implantasyon öncesi embriyonun bütünlüğünü de sağlar (19).

Tüm memeli oositleri kalınlığı (~1–25 µm) ve protein içeriği farklı türlere göre değişkenlik gösteren bir zona pellusidaya sahiptir. Fare oositi zona pellusidası ~6,2 µm kalınlıktadır ve ~3,5 ng protein içerir. Zona pellusida esnektir, antikor, enzim ve küçük virüslere geçirgendir. Birbirine bağlı uzun fibrillerden oluşmuştur, indirgenmiş ajanlar, sıcaklık, asit veya bazlar tarafından çözünebilir. Zona pellusida glikoproteinlerinin (ZPGs) non-kovalent etkileşimiyle fibriller bir arada tutulurlar (20, 21).

2.2. Zona Pellusida Glikoproteinleri

Fare zona pellusidası mZP1, mZP2 ve mZP3 olmak üzere 3 glikoprotein içerir. İnsan Zona pellusidası ise hZP1, hZP2, hZP3 ve hZP4 olarak adlandırılan 4 glikoproteinden oluşur. Fare zona pellusida kütesinin %80'inden fazlası mZP2 ve mZP3 ten oluşur. Fare ve insan zona pellusida glikoproteinlerinin polipeptidleri, farklı kromozomlar üzerinde bulunan tek-kopya genleri tarafından kodlanır. ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinin benzerliği farklı tür memelilerde iyi korunurken (~%65–98) ZP1 glikoproteinleri daha az korunur (~%40) (22, 23).

Zona pellusida kalınlığı çevrelediği oositin çapıyla doğru orantılıdır. İnsan ve

fare zona pellusida glikoproteinleri tam gelişen ve gelişmeye devam eden oositler tarafından eş zamanlı olarak sentezlenir. Fare oosit gelişimi süresince protein sentez yaklaşık 40 kat artar ve zona pellusida glikoprotein sentezi bu proteinlerin toplamının yaklaşık %5'i kadarını oluşturur (24).

2.3. Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Yapısal Özellikleri

İnsan ve fare zona pellusida glikoproteinlerinin temel yapısı geçen 25 yıl süresince etraflıca araştırılmıştır. Zona pellusida glikoproteinleri, kuş, kurbağa ve balık yumurtalarının vitellin kaplı glikoproteinleriyle ilişkilidir. Bu ilişki, balık, kurbağa ve kuşların vitellin kaplı glikoprotein genlerini içeren zona pellusida genlerinin filogenetik yapısının anlaşılmasına yardımcı olmuştur (25). Bu vitellin kaplı glikoproteinlerin zona pellusida glikoproteinlerinin polipeptidleriyle ortak özellikleri olduğu ortaya çıkmıştır. Yeni oluşan zona pellusida glikoproteinleri, salgı vezikülleriyle oosit plazma membranına taşınır ve ekstrasellüler boşluğa bırakılır. Bu glikoproteinler bir araya gelerek kalınlaşmış zona pellusidayı oluştururlar (26, 27).

2.4. Zona Pellusida Glikoproteinlerinin Fertilizasyona Etkisi

Zona pellusida glikoproteinleri fertilizasyon sürecine birkaç adımda katılır. Farelerin akrozom reaksiyonunda mZP3, sperm ekzositozunu indükleyici olarak ve sperm için reseptör olarak görev yapar (28, 29). Farelerdeki bulgulara göre, mZP3'e akrozomu sağlam sperm bağlanır, akrozom reaksiyonu tamamlanır. Daha sonra sperm mZP2'ye bağlanır, zona pellusida delinir ve oosit plazma membranı erir. Sperm ve oositin füzyonu zona pellusida glikoproteinlerinin değişmesine neden olur ve serbest yüzen sperm zona pellusidaya bağlanamaz ve daha önce bağlanan sperm zona pellusidayı eritemez (30, 31).

2.5. İnfertilite

İnfertilite, düzenli bir cinsel yaşama sahip üreme çağındaki bir çiftte doğum

kontrol yöntemlerini kullanmaksızın bir yılın sonunda gebeliğin olmaması olarak tanımlanır. Üreme işlevinin eksiksiz ve sorunsuz olarak gerçekleşmesi ise hem kadın hem de erkekte anatomik, fizyolojik, hormonal ve immünolojik sistemlerin tam bir bütünlük ve uyum içerisinde çalışmasına bağlıdır. Aksine bir durum üreme işlevinde bozulma ve kısaca infertilite olarak tanımlanan sorunun yaşanmasına neden olmaktadır (32). İnfertilitenin; ovulasyon problemleri, tubal tıkanıklık, yaşa bağlı faktörler, uterin problemler, tubal ligasyon, vazektomi, açıklanamayan infertilite ve tüberkülozis gibi birçok nedeni vardır (33).

İnfertilite nedenleri 4 büyük kategoride incelenebilir:

- i. Kadın faktörü
- ii. Erkek faktörü
- iii. Çok faktörlü infertilite
- iiii. Açıklanamayan infertilite

Her bir kategorideki etken yüzdesini belirlemek zordur. Fakat infertilite nedenlerinin yaklaşık %35'i kadın faktörlerden, %30'u erkek faktörlerden, %20'si her iki eşte belirlenen anormalliklerden ve %15'i ise araştırma sonrası teşhis konulamayan nedenlerden kaynaklanmaktadır. Bazı çiftlerde, erkek (azospermi ya da ejakulasyon eksikliği) veya kadının (ovaryan başarısızlık, tubal tıkanıklık ya da uterusun olmayışı) kısırlığından dolayı doğal gebelik mümkün olmamaktadır (34). Servikal, uterin, tubal, ovaryan ve peritoneal faktörler (endometriozis v.b) dişi infertilitesine neden olur (35).

2.6. Diabetes Mellitus Tanısı ve Sınıflaması

Diabetes mellitus (DM), insülin eksikliği veya insülinin etkisiz kalması sonucu oluşan, birlikte karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluğunun eşlik ettiği hiperglisemi ile seyreden kronik metabolik bir sendromdur. Diyabet; aşırı su içme ve idrara çıkma, mellitus ise şekerli idrar anlamına gelmektedir (36).

Hastalığın patogenezi klinik tiplere göre farklılık göstermektedir. Tip I DM'de pankreasın β hücrelerinde genetik ve immünolojik faktörler sonucu gelişen harabiyet vardır. Tip II DM'de insüline karşı periferik direnç, insülin sekresyonunda azalma ve aşırı hepatik glikoz üretimi mevcuttur. İnsülin direncinin nedeni periferdeki insülin fonksiyonunun azalması ve hepatik glikoz üretiminin artmasıdır. Tüm bu olaylarda primer

neden kesin bilinmemekle birlikte hastalığın çevresel ve genetik etkiler sonucu geliştiği düşünülmektedir (37, 38).

Günümüzde uzlaşmanın en fazla sağlandığı diabetes mellitus sınıflaması Amerikan Diyabet Derneği tarafından 2000 yılında kabul görmüştür (37).

Diabetes Mellitus sınıflaması

1) TİP I Diabetes Mellitus

a. Otoimmün

b. İdiyopatik

2) TİP II Diabetes Mellitus

a. Periferik insülin direnci

b. İnsülin salınım yetersizliği

3) Diğer özel tipler

a. Beta hücre fonksiyonu ile ilgili genetik bozukluklar

b. İnsülin etkisi ile ilgili genetik bozukluklar

c. Ekzokrin pankreas hastalıkları

d. Endokrinopatiler

e. İlaçlar

f. Enfeksiyonlar

g. İmmün kökenli DM

h. Gestasyonel DM

Tip I Diabetes Mellitus, tüm DM'li olguların % 5-10'unda görülen Tip I DM, pankreasın β hücrelerinin otoimmün ve idiyopatik hasarı sonucu gelişir. İmmün hasarın göstergesi olarak adacık ve insülin otoantikorları ile glutamik asit dehidrogenaz (GAD) ve HLA (insan lökosit antijeni) otoantikorları saptanabilir. Diğer otoimmün hastalıklarla birlikte görülme oranı yüksektir. Daha nadir görülen idiyopatik formunda ise otoimmünite yoktur, beta hücre hasarının nedeni bulunamaz. Tip I DM'li tüm hastalarda diyet ve oral antidiyabetik ilaçlara yeterli yanıt alınmaz ve olguların büyük kısmı insülin replasman tedavisine mutlak gereksinim duyarlar.(33, 34)

Tip II Diabetes Mellitus, en sık görülen bu tip DM'li hastaların %90'nını oluşturur. Değişik derecelerde insülin yetmezliği ve insülin direnci ile karakterizedir. Çogunlugunu obezlerin oluşturduğu hastalar, insülin replasmanına genellikle ihtiyaç göstermezler. Tip I DM'ye göre daha fazla genetik yatkınlık vardır. Tip II DM

gelisiminde vücut kitle indeksinin 25 ve üzeri olması, ailede DM öyküsü ve/veya gestasyonel DM öyküsünün bulunması risk faktörü olarak kabul edilir (35, 36).

Gestasyonel DM, gestasyonel DM gebeliğin başlangıcıyla veya ilk teşhisinde glikoz toleransı bozukluğunun herhangi bir derecesi olarak tanımlanır. Diyabet gebelik öncesi teşhis edilmiş ise pregestasyonel, ilk kez gebelik sırasında tespit edilmiş bir glikoz intoleransı ise gestasyonel diabetes mellitus (GDM) adını alır. GDM gebeliklerin yaklaşık %4'ünde saptanırken, pregestasyonel diyabetin görülme sıklığı yaklaşık 1000 gebelikte 1-3'tür.

İnsanlarda tip 1 diyabet veya insülin bağımlı diyabetin, düşük ve konjenital anomalilerin riskini artırmak gibi nedenlerle gebeliği negatif şekilde etkilediği bulunmuştur. Ayrıca maternal diyabetin, tip 1 diyabet oluşturulan farelerde implantasyon öncesinde embriyo gelişimini olumsuz etkilediği de gösterilmiştir (37, 38). Önceki çalışmalarda diyabetin bir hücreli zigot evresinden önce meydana gelen embriyoyu kötü etkilediği gösterilmiştir. Streptozotosin ve alloxanla indüklenmiş hipoinsülinemik ve hiperglisemik farelerden elde edilen zigotlarda, hCG enjeksiyonundan 48 saat sonra non-diyabetik kontrollerle karşılaştırıldığında iki hücreli evrenin invivo gelişiminin geri kaldığı gözlenmiştir (39). Ayrıca diyabetik ve kontrol farelerden elde edilen 2 hücreli embriyoların kontrol medyumunda invitro kültürleri karşılaştırıldığında diyabet grubunda blastokist evresinin önemli derecede geciktiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada, diyabetik farelerin oositleri de incelenmiştir. Kimyasalla indüklenmiş diyabetik farelerin oositlerinde germinal vezikül yıkımı ve mayoz 1'in önemli derecede aksadığı gözlenmiştir (40, 41). Oositi çevreleyen granüloza hücreleri, oosite yapısal ve hormonal destek sağlar. Bunlar oosit çevresinde çok tabakalı bir formdadır. Granüloza hücreleri ve oosit arasında parakrin sinyalleşme ve gap junctionlarla bir iletişim vardır. Normal granüloza hücre iletişimi ve gelişiminin varlığı oosit gelişimi ve farklanması için önemlidir. Diyabetik farelerde geciken oosit maturasyonu, granüloza hücreleri arasındaki zayıf hücrelerarası haberleşmenin bir sonucu olabilir (42, 43). Konneksin-43, normal follikülogenez ve granüloza hücreleri arasındaki hücrelerarası haberleşme için gerekli olan gap junction anahtar proteindir. Konneksin 43 ekspresyonunun eksikliğinde zayıf follikülogenezle birlikte anormal oositler görülebilir. Ayrıca, diyabetli ve sağlıklı insanların retinal perisitleri karşılaştırıldığında konneksin 43 seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (44, 45, 46).

Daha önce yapılan çalışmalarda hipergliseminin fare blastokistlerinde apoptozisi indüklediği belirlenmiştir. Ancak, hipergliseminin gelişen folliküllerdeki granüloza hücre apoptozisiyle ilişkisinin az olduğu bulunmuştur (47). Açıklanamayan infertilite vakalarında granüloza hücre apoptozisinin arttığı gösterilmiştir (48). Oositin etrafını çevreleyen kümülüs hücreleri apoptozisindeki artışın, düşük gebelik sonuçları ve oosit maturasyonu gecikmesiyle ilişkili olduğu da bildirilmiştir (49, 50).

Omurgalılarda apoptozisin başlamasıyla ilişkili iki temel yolak vardır. Bunlardan ilkinde Bcl-2 ailesinin ölüm-uyaran üyelerinin vasıtasıyla mitokondriyal parçalanma meydana gelir. Böylece mitokondri içerisindeki pro-apoptotik elektron taşıyıcı sitokrom-c serbest kalır. Sitokrom-c prokaspaz-9 ve apoptotik peptidaz uyarıcı faktör-1'le (APAF-1) birleşerek apoptozom adı verilen bileşik molekülü oluşturur ve apoptozom da kaspazları aktive ederek apoptozu başlatır (51). İkincil apoptotik yolak kaspaz-8'in aktivasyon yönünde ve TNF süperailesine ait ligandlar tarafından hücre-ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu kapsar. İki yolağın da Bcl-2 ile homolog domainler taşıyan Bid proteini aracılığıyla birleştiği görülmüştür (52, 53).

Transmisyon elektron mikroskopuyla yapılan bir çalışmada, maternal diyabetin oositlerdeki mitokondriyon yapısı üzerine etkileri incelenmiştir. Diyabetik farelerin oositlerindeki mitokondriyonların bazılarında membranlar arası boşluğun daraldığı ve bir diğer kısmında ise dış membranın rüptüre olmasıyla yalnızca iç membranın görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda, erken dönem embriyolarında yüksek glikoz şartlarında daha fazla trikarboksilik asit (TCA) metabolitlerinin mitokondriyal fizyoloji değişikliklerine neden olduğu da gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise, maternal diyabetin oosit içerisindeki mitokondriyonlarda hem yapısal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu hem de dağılımının bozulduğu gösterilmiştir (54). Oositin fertilizasyon yeteneği ve embriyo kalitesinin belirlenmesinde mitokondriyal durum ve folliküler hücrelerdeki apoptozisin belirteç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. (55)

Diyabetin hormonal düzeni bozduğu hatta bu durumun da böbrek hastalıklarının ve cinsel işlev bozukluğu sıklığının artışında etkisi olduğu öne sürülmüştür. Bu iddiaya dayanarak da over hormonlarının serum konsantrasyonlarından diyabetik renal komplikasyonların önceden anlaşılabilceği de öne sürülmüştür (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilen 12 adet 12 haftalık dişi Balb/C fareleri kullanıldı. Bu fareler kontrol (n=6) ve diyabet (n=6) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

3.2. Deneysel diyabet oluşturulması

Deney grubundaki farelere tek doz olarak 200 mg/kg streptozotosin (Sigma Chemical Co.) sodyum sitrat tampon (pH: 4,4) solüsyonunda çözündürülerek periton içi yolla enjekte edildi. Enjeksiyondan 4 gün sonra kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kontrol grubundaki dişi farelerin tümünün kan glikoz seviyeleri 200 mg/dl den daha düşüktü.

3.3. Ovulasyonun uyarılması

Ovulasyonun uyarılması amacıyla, diyabet grubuna streptozotosin enjeksiyonundan 4 hafta sonra, kontrol grubuna ise beklemeden hayvan başına 10 IU gebe kısırak serum gonadotropini (Folligon, Intervet®) periton içi yoldan enjekte edildi.

3.4. Overlerin elde edilmesi, fiksasyon

Ovulasyon uyarılmasından 48 saat sonra dişi fareler Xsilazin (10 mg/kg) + Ketamin (100 mg/kg) anestezisi ile uyutuldu. Farelerin ağırlı uyarılara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra hayvanların göğüs kafesleri açıldı ve transkardiak yoldan önce %0,9'luk izotonik NaCl çözeltisi, bunu takiben ise %4'lük paraformaldehit +

%0,05 gluteraldehit solüsyonu ile perfüzyon yapıldı. Yeterli perfüzyon ve fiksasyon sağlandıktan sonra, overler iki tarflı olarak çıkartıldı ve overlerden bir tanesi immünfloresan işaretlemeye uygun fiksasyonu sağlamak için %4'lük paraformaldehit çözeltisine diğer over ise elektron mikroskopik incelemeye uygun fiksasyonu sağlamak için %2,5'lik gluteraldehit çözeltisine alındı.

3.5. İmmünfloresan işaretleme

Paraformaldehit çözeltisindeki dokular bir gece buzdolabında +4°C'de bekledikten sonra, 12 saat %20 sükröz, takiben %30'luk sükröz + %0,1'lik sodyum azid solusyonunda bekletildiler. Kesitler alınmadan yaklaşık 30 dk önce, dokular -20°C'ye konarak donmaları sağlandı. Dokulardan kriyostat ile (Leica CM1900, Avusturya-Viyana) 10 µm kalınlığında kesitler adheziv kaplı lamlara alındı.

İşaretleme işlemi yapılmadan önce kesitler lamlar üzerinde pap-pen ile çevrildi. Daha sonra transfer pipetleri kullanılarak 7,4 pH'a sahip PBS solüsyonunda 10 saniye yıkandı. Rat monoklonal anti-ZP2 primer antikoru (Katalog no: sc-32752, Santa Cruz Biotechnology Inc. California U.S.A.) PBS-BSA çözeltisi içerisinde 1/50 oranında dilüe edildi. Primer antikor solüsyonu damlatılan kesitler nemli ortamda 37°C'de iki saat inkübe edildiler. İnkübasyondan çıkarılan kesitler 3x2 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Daha sonra kesitlere FITC konjuge goat anti-rat sekonder antikoru (Katalog no: sc-2011, Santa Cruz Biotechnology Inc. California U.S.A.)1/50 dilüsyonda hazırlanarak damlatıldı ve 90 dakika 37°C'de karanlık ve nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler 3x2 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Son yıkamadan sonra lamlar dikkatlice kurulandı ve çekirdeklerin boyanması için kesitler DAPI içerikli kapatma medyumumu (UltraCruz Mounting Medium, katalog no: sc-24941 Santa Cruz Biotechnology Inc. California U.S.A.) ile kapatıldı. Lamellerin etrafı, kesitlerin hava almaması için tırnak cilası ile izole edildi. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 floresan mikroskop (Olympus GmbH, Germany) ile incelenerek fotoğraflandı.

3.6. Elektron mikroskopik inceleme

Elektron mikroskopik inceleme için alınan dokular öncelikle 1mm³'lük parçalara bölündü ve yaklaşık 4–6 saat %2,5'lik gluteraldehit solüsyonunda tespit edilen dokular fosfat tampon solüsyonuna alındı. Daha sonra dokular aşağıdaki sıraya göre takip edildi.

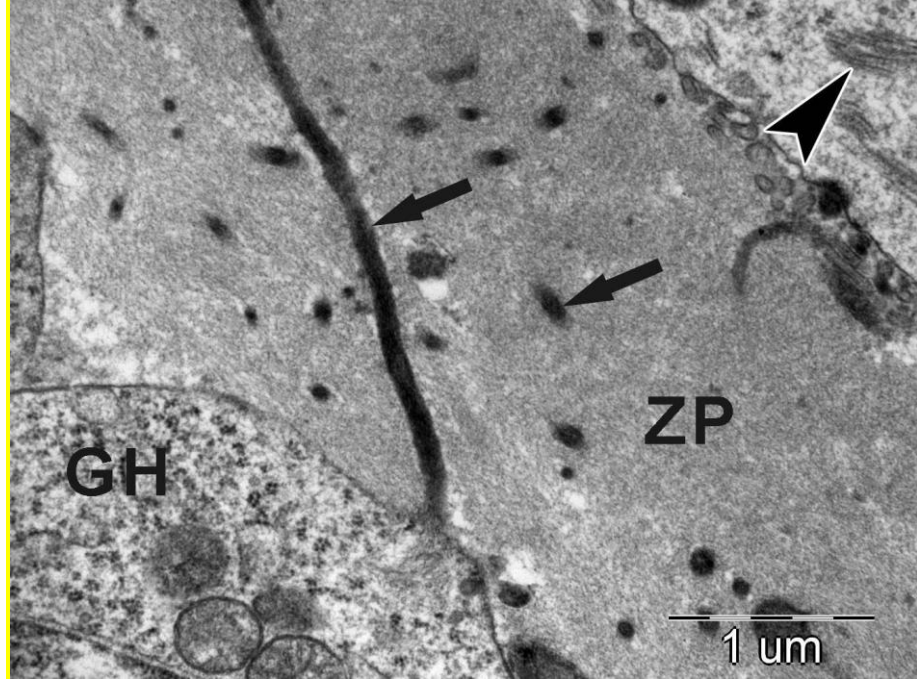
- %1'lik osmium tetraoksit solüsyonunda 1 saat
- Fosfat tamponda 2X10 dakika
- % 50 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 70 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 86 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 96 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4° C'de 15 dakika
- %100 Etil alkolde oda sıcaklığında 15 dakika
- Propilen oksitte oda sıcaklığında 15 dakika
- Propilen oksitte oda sıcaklığında 15 dakika
- Propilen oksit + gömme materyali oda sıcaklığında 30 dakika
- Propilen oksit + gömme materyali oda sıcaklığında 30 dakika
- Saf rezin oda sıcaklığında 1 gece

Bu işlemlerden sonra dokular kapsüller içerisinde epoksi rezine gömülerek 60° C'lik etüvde 24 saat polimerize edildi. Bu bloklardan Leica Ultracut UCT125 ultramikrotom (Leica Avusturya-Viyana) ile 70 nm kalınlığında kesitler 300 gözenekli bakır gridlere alındı ve uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler Jeol JEM1011 transmisyon elektron mikroskopuna eklenmiş Megaview III dijital kamera (Olympus GmbH, Germany) ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

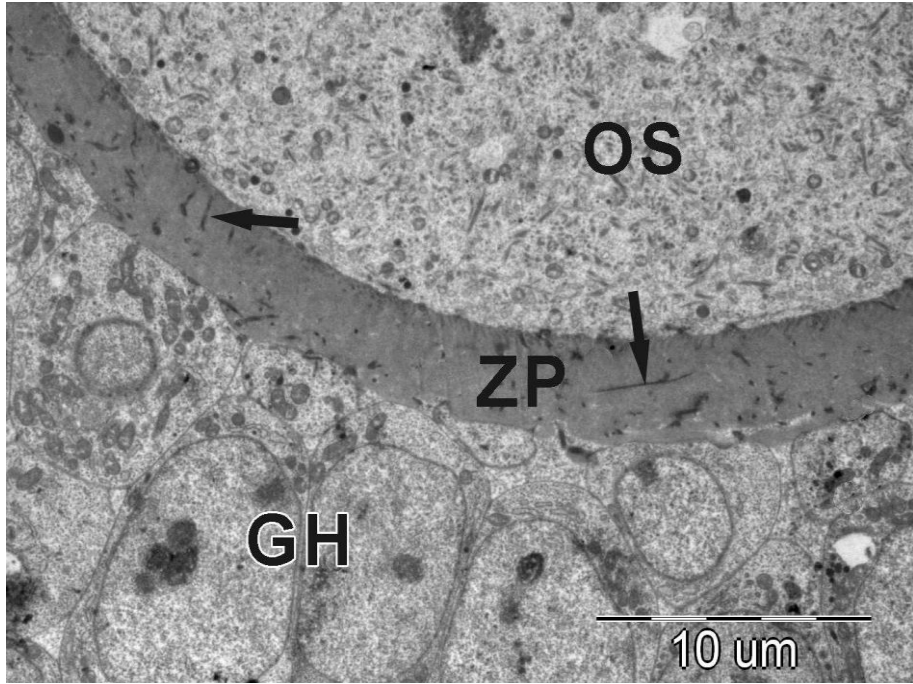
4. BULGULAR

4.1. Elektron mikroskopik bulgular:

Kontrol grubu: Gelişen folliküllerin zona pellusidaları fibriler görünümlü dens bir matriksten oluşmaktaydı ve çok sayıda hücreler arası uzantılara sahipti (Şekil 4.1.1). Zona pellusidanın kalınlığı her yerde homojen olarak izlendi. Fragmentasyon veya yapısal bozukluk bulgularına rastlanmadı. Oosit sitoplazmasında bol miktarda annulate lameller, kümeler halinde veziküller ve diğer hücre organelleri bulunmaktaydı (Şekil 4.1.2). Granüloza hücreleri ise gelişen folliküllerin maturasyonuna göre değişik büyüklüklerde ve düzgün dizilimliydi, ayrıca birbirlerine ve zona pellusidaya sıkı bir şekilde tutunmuşlardı. Bazı granüloza hücreleri, zona pellusida matriksini sentezliyor gibi görünmekteydi. Bu alanlarda zona matriksi ile sentezi yaptığı düşünülen hücre arasındaki sınır belirsizleşmişti (Şekil 4.1.3).

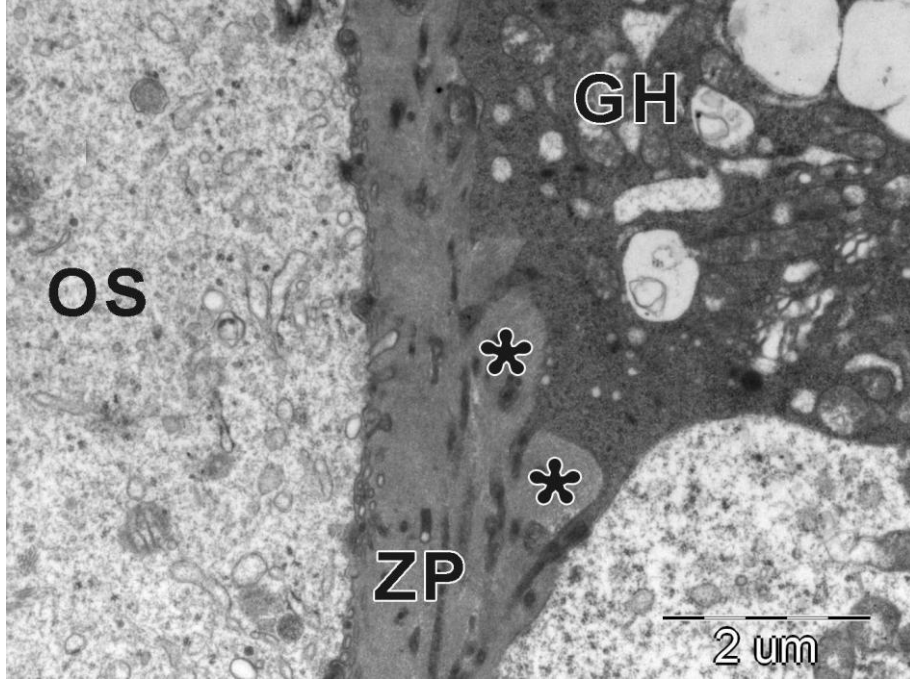


Şekil 4.1.1: Kontrol grubu granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), granüloza hücreleri ile oosit arasındaki mikrovillus benzeri uzantılar (ok) ve annulate lameller (ok başı) (X30,000).



Şekil 4.1.2: Kontrol grubunda normal görünümlü bir follüküle ait granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), oosit ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar (ok) ve

oosit sitoplazmasının (OS) elektron mikrografı (X4,000).



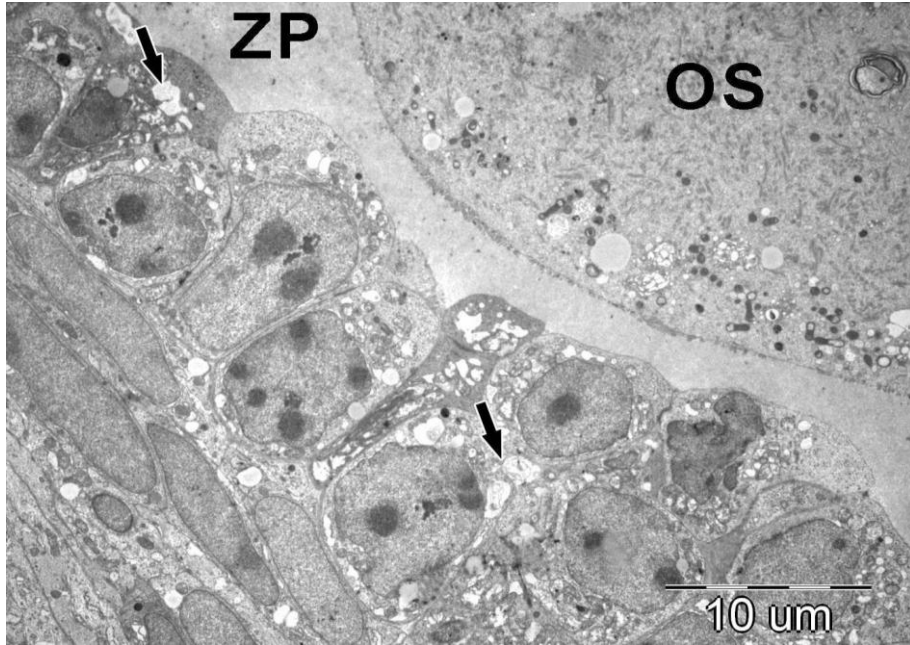
Şekil 4.1.3: Kontrol grubunda zona pellusida (ZP), oosit sitoplazması (OS), granüloza hücreleri (GH) ve granüloza hücreleri tarafından sentezleniyormuş izlenimi veren zona pellusida matriksi (yıldız) (X15,000).

Diyabet grubu: Zona pellusidanın yapısı düzensizlik göstermekteydi ve kalınlığı her yerde aynı değildi (Şekil 4.1.4). Bazı noktalarda zona pellusida bütünlüğü bozulmuştu (Şekil 4.1.5). Bazı folliküllerde zona pellusida ile oosit arasına granüloza hücrelerinin girdiği de izlendi (Şekil 4.1.6). Zona pellusida kontrol grubuna göre daha gevşek bir dokuya sahipti, fibriler yapısını kaybetmişti ve oosit ile granüloza hücreleri arası bağlantıyı sağlayan mikrovillus benzeri uzantıların sayısı da oldukça azalmıştı. Bu uzantı kaybı granüloza hücreleri tarafında daha belirgindi (Şekil 4.1.7).

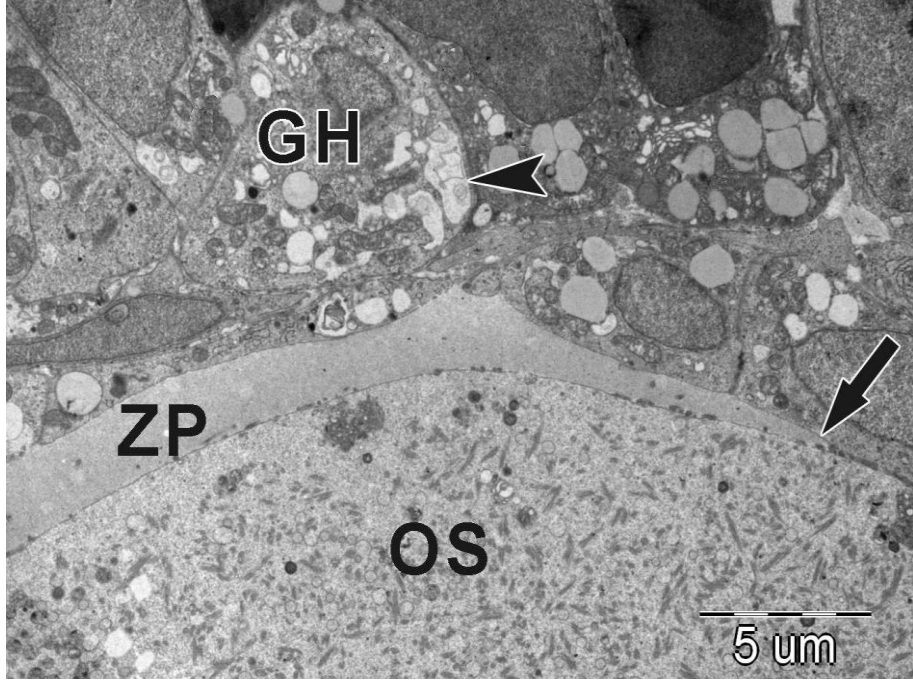
Bu grubun oositlerinde de değişiklikler gözlemlendi. Sitoplazmalarında kümelenmiş halde çeşitli büyüklüklerde veziküller ve multiveziküler cisimler bir arada bulunmaktaydı (Şekil 4.1.8). Bazı oosit sitoplazmalarında artmış vakuoller ve bunların etrafında toplanmış çok sayıda mitokondriyonlar da görüldü (Şekil 4.1.9). Oosit ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta vakuol benzeri genişlemelere rastlandı (Şekil

4.1.10).

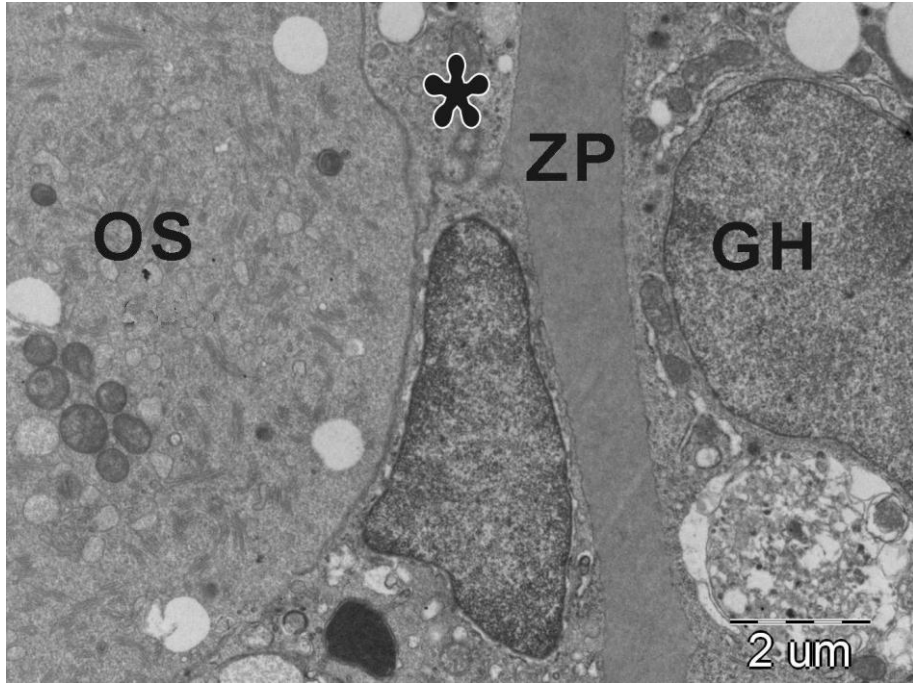
Granüloza hücrelerindeki apoptozis kontrol grubuna göre oldukça artmıştı. Bu artış bazı bölgelerde apoptotik hücre odakları meydana getirecek kadar fazlaydı (Şekil 4.1.11). Korona hücreleri birbirlerine ve zona pellusidaya gevşek bir şekilde tutunmuştu (Şekil 4.1.12). Granüloza hücrelerinin kübik biçimleri ve düzenli dizilimleri bozulmuştu ve vakuolizasyon artmıştı. Bunlara ek olarak bazı granüloza hücrelerindeki mitokondriyonlarda şişme ve krista yapısının bozulmasıyla karakterize değişiklikler de gözlemlendi. (Şekil 4.1.13) Bu grupta atretik folliküllerin sayısı da kontrol grubuna göre oldukça fazlaydı (Şekil 4.1.14 ve Şekil 4.1.15).



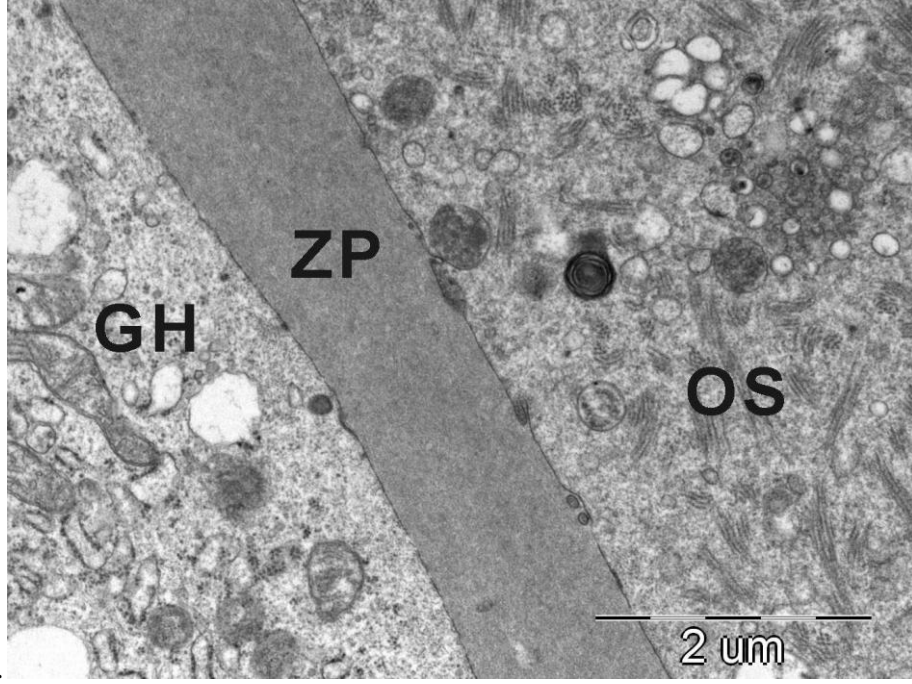
Şekil 4.1.4: Diyabet grubundaki folliküllerde, oosit sitoplazması (OS), düzensiz görünümlü zona pellusida (ZP) ve granüloza hücre sitoplazmasındaki vakuoller (ok) (X3,000).



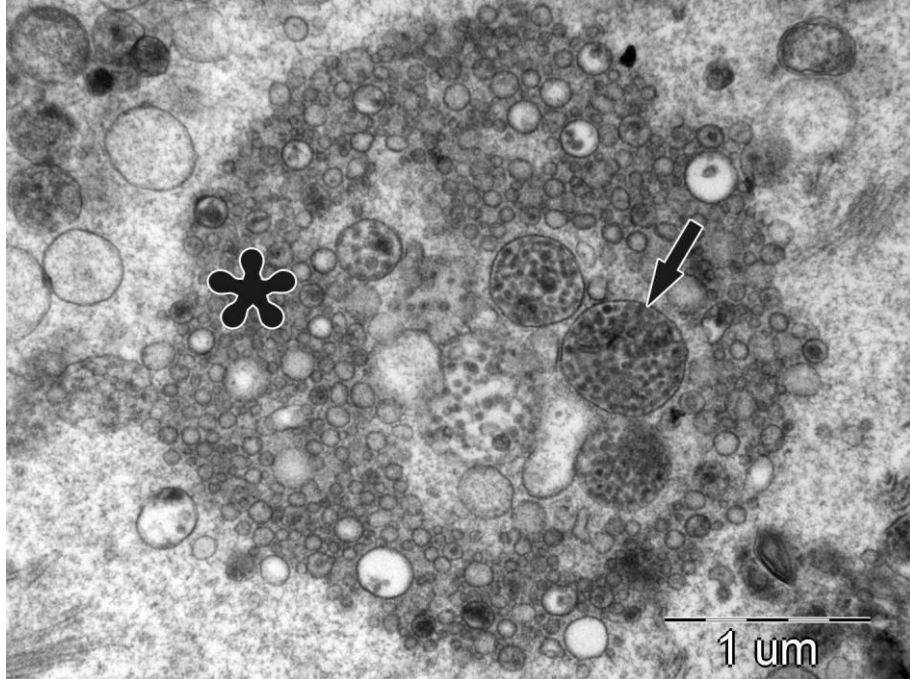
Şekil 4.1.5: Diyabet grubunda bir folliküle ait, oosit sitoplazması (OS), zona pellusida (ZP), bütünlüğü bozulmuş zona pellusida (ok), granüloza hücreleri (GH) ve granüloza hücreleri içerisinde vakuoller (ok başı) (X5,000).



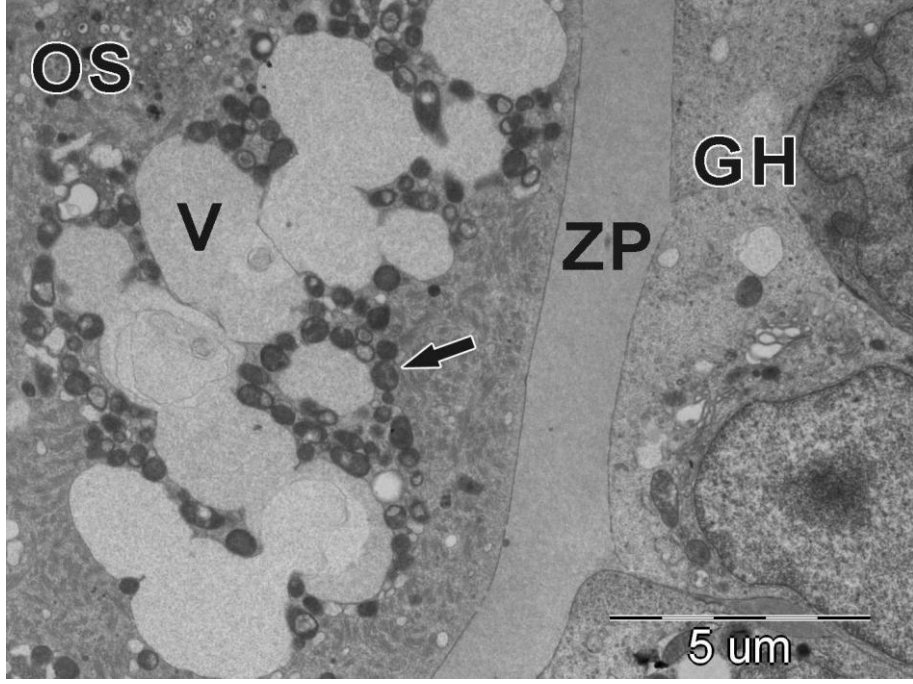
Şekil 4.1.6: Diyabet grubunda, granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), oosit sitoplazması (OS) ve oosit ile zona pellusida arasına giren granüloza hücresi (yıldız) (X10,000)



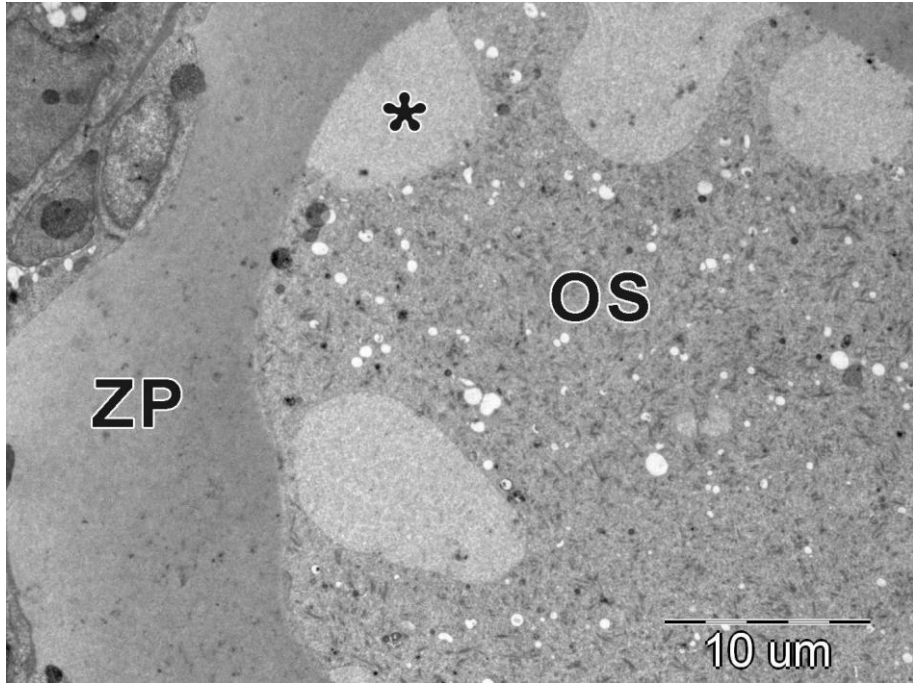
Şekil 4.1.7: Diyabet grubunda, oosit sitoplazması (OS), granüloza hücreleri (GH) ve zona pellusida (ZP) (X20,000).



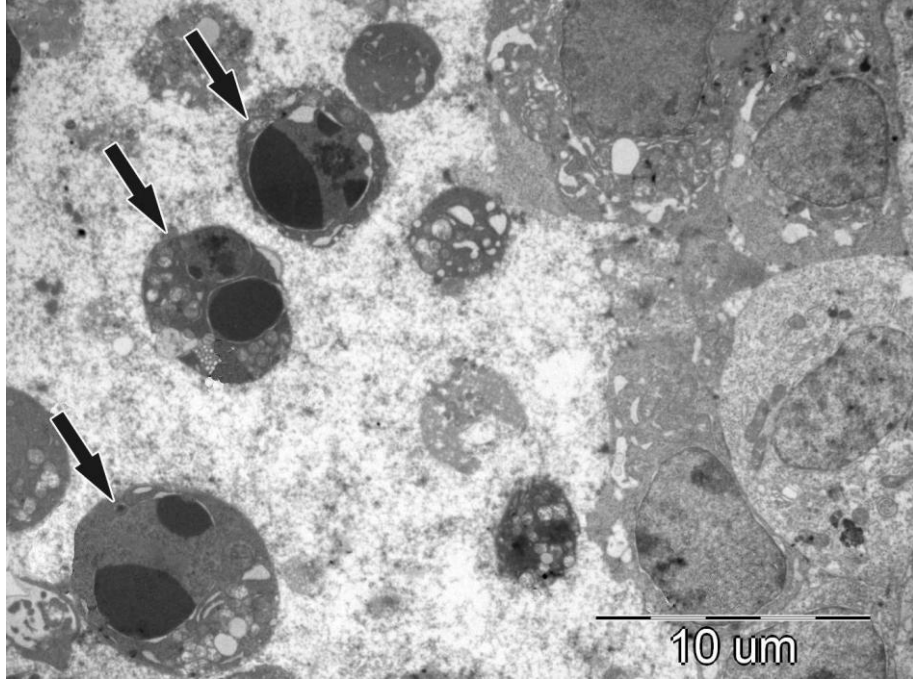
Şekil 4.1.8: Diyabet grubunda oosit sitoplazmasındaki multiveziküler cisimler (ok) ve kümelenmiş veziküller (yıldız) (X30,000)



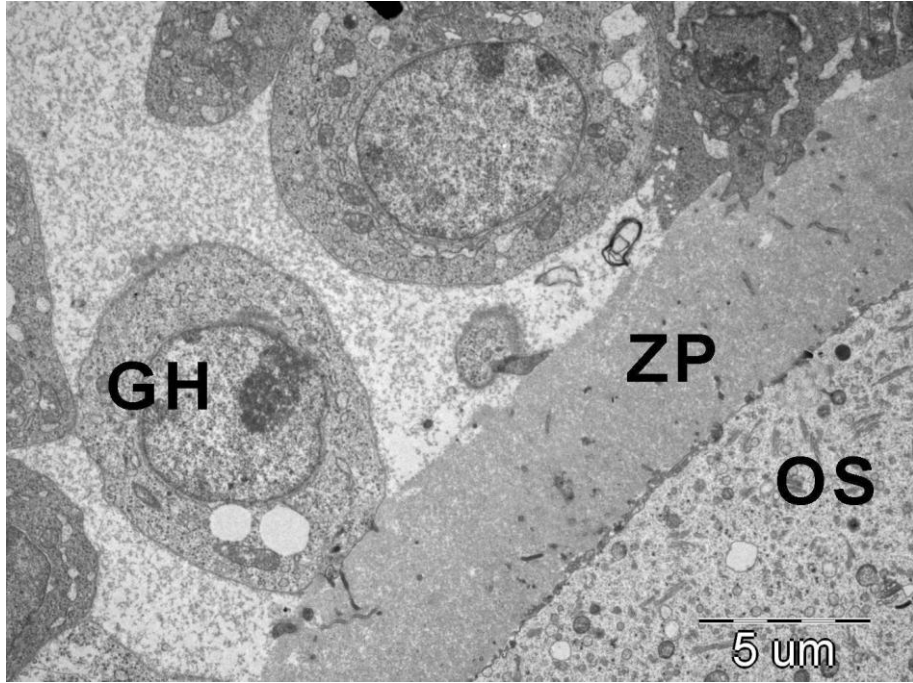
Şekil 4.1.9: Diyabet grubunda, granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), oosit sitoplazması (OS), oosit sitoplazmasındaki vakuoller (V) ve vakuolleri saran mitokondriyonlar (ok) (X7,500).



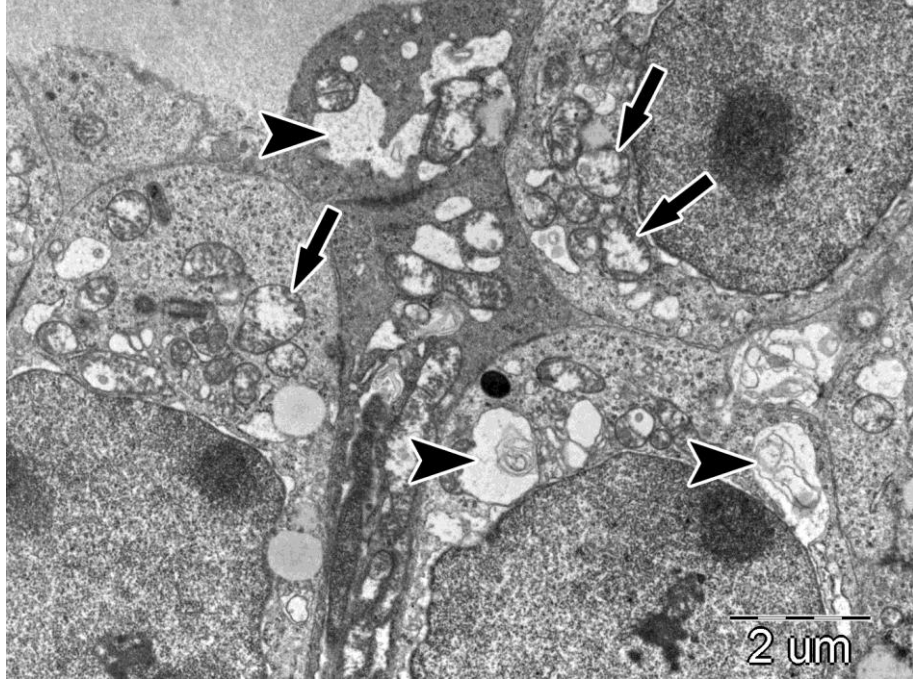
Şekil 4.1.10: Diyabet grubunda düzensiz zona pellusida (ZP), oosit sitoplazması (OS) ve perivitellin aralıkta vakuollerin (yıldız) (X3,000).



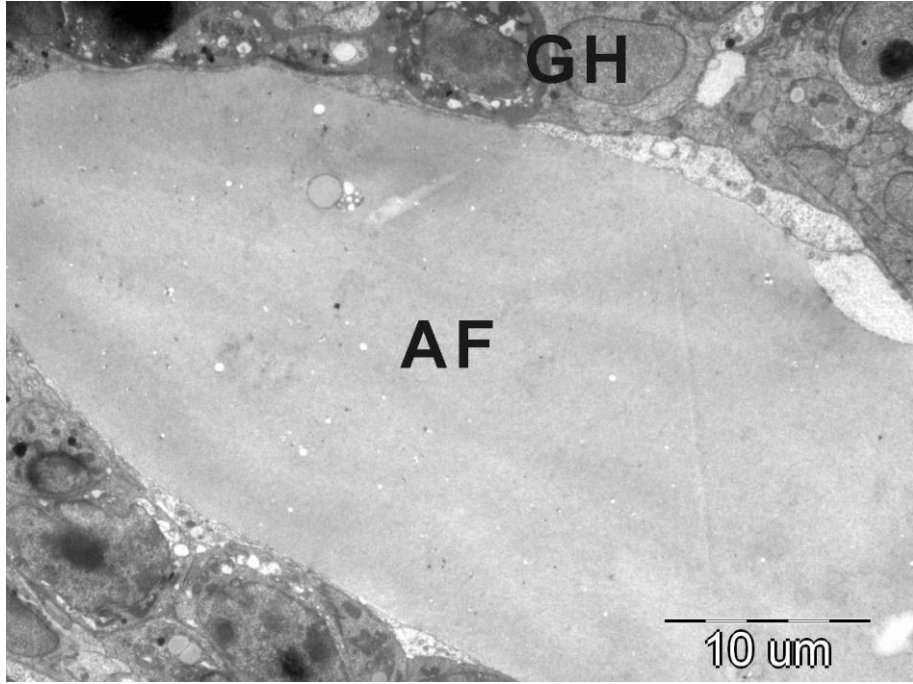
Şekil 4.1.11: Diyabet grubundaki apoptotik granüloza hücreleri (ok) (X30,000).



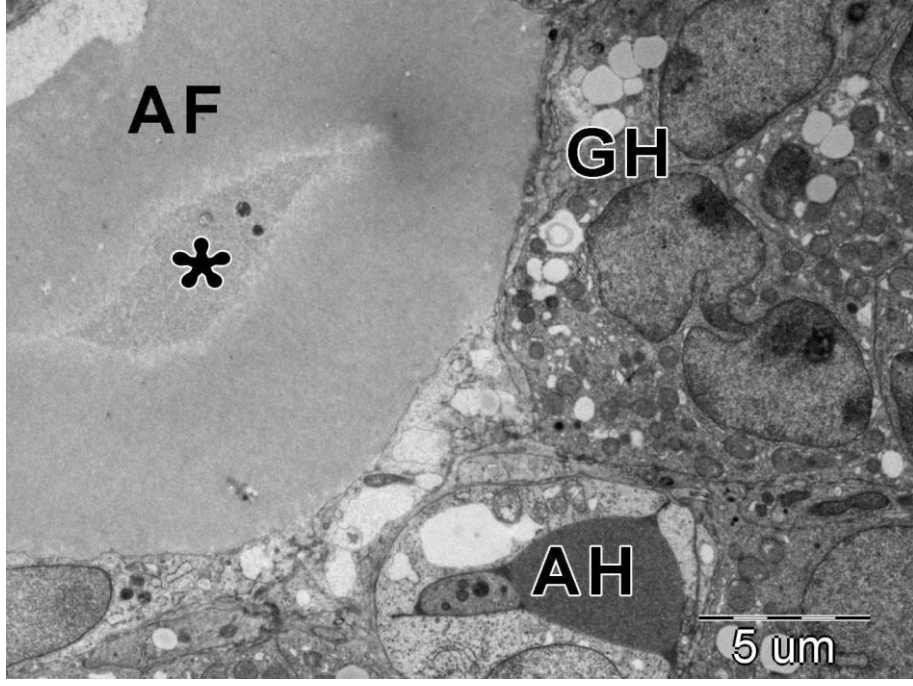
Şekil 4.1.12: Diyabet grubunda, oosit sitoplazması (OS), zona pellusida (ZP) ve gevşek düzenlenmiş granüloza hücreleri (GH) (X5,000).



Şekil 4.1.13: Diyabet grubundaki granüloza hücrelerinde şişmiş ve krista yapısı bozulmuş mitokondriyonlar (ok) ile hücre içi vakuoller (ok başı) (X10,000).



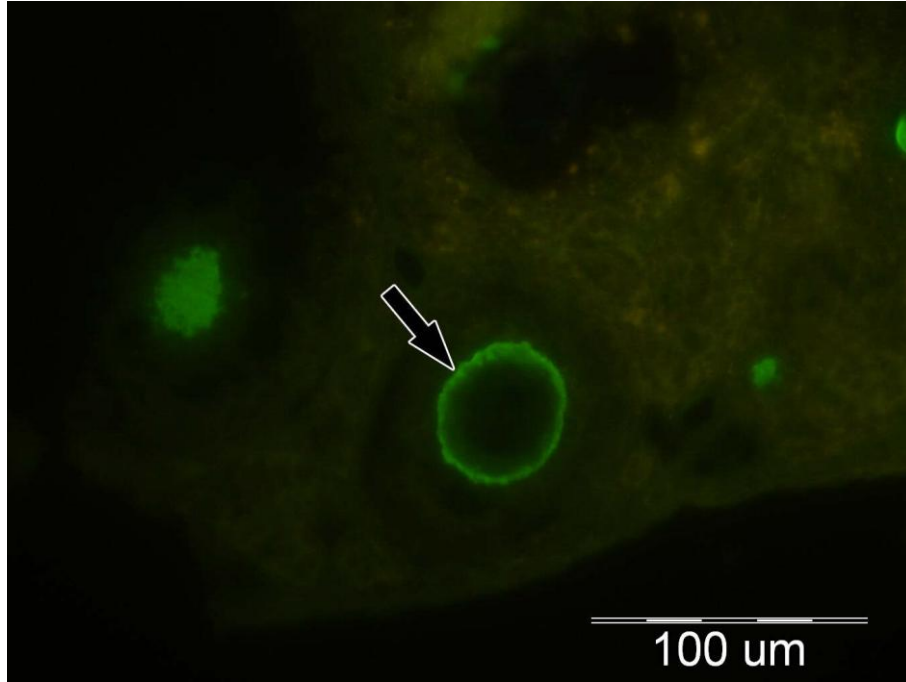
Şekil 4.1.14: Diyabet grubunda, granüloza hücreleri (GH) ve atretik follikül (AF) (X3,000)



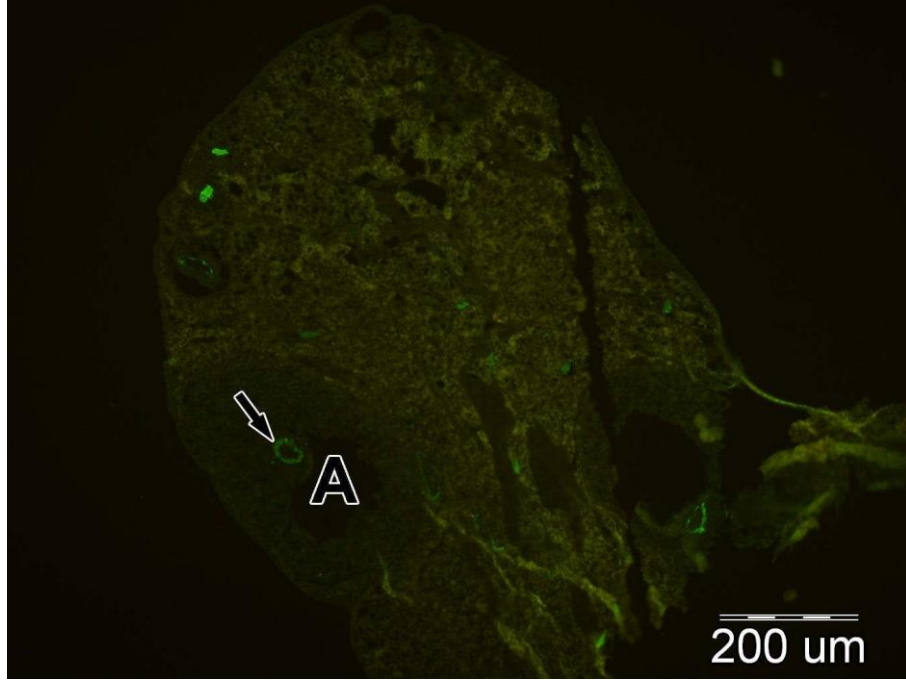
Şekil 4.1.15: Diyabet grubunda, granüloza hücreleri (GH), apoptotik hücre (AH), atretik follikül (AF) ve oosit kalıntısı (yıldız) (X5,000).

4.2. Floresan mikroskopik bulgular:

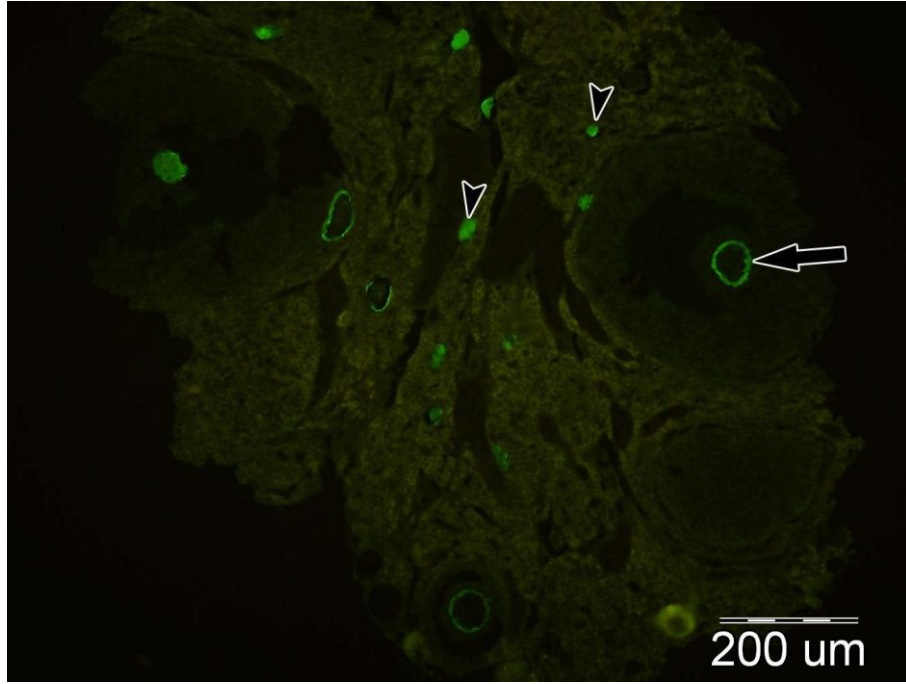
Kontrol grubu: Anti-ZP2 antikoruna ile zona pellusidaların belirgin olarak işaretlendiği görüldü. Zona pellusidalar çoğunlukla düzgün görünümündü ve bütünlükleri bozulmamıştı (Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.2). Kesitte atretik folliküllere ait olduğu düşünülen zona pellusida kalıntıları da bulunmaktaydı. Bu yapılar da anti-ZP2 antikoruna ile belirgin bir şekilde işaretlenmişti (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.1: Kontrol grubunda anti-ZP2 antikoruna ile işaretlenmiş zona pellusida (ok) (X400).

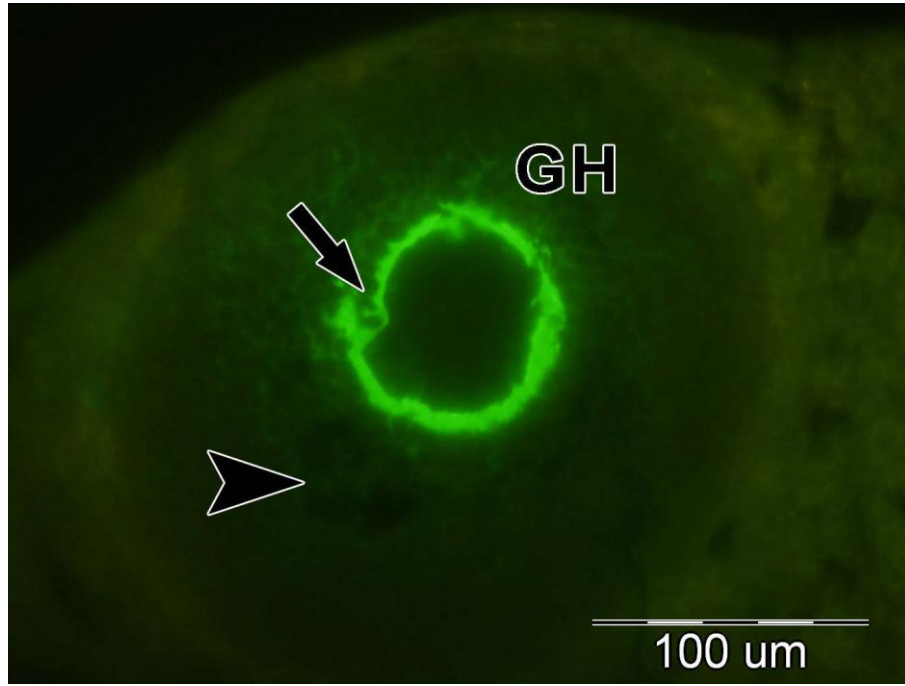


Şekil 4.2.2: Kontrol grubunda ZP2 pozitif zona pellusida (ok) ve antrum (A) (X100).

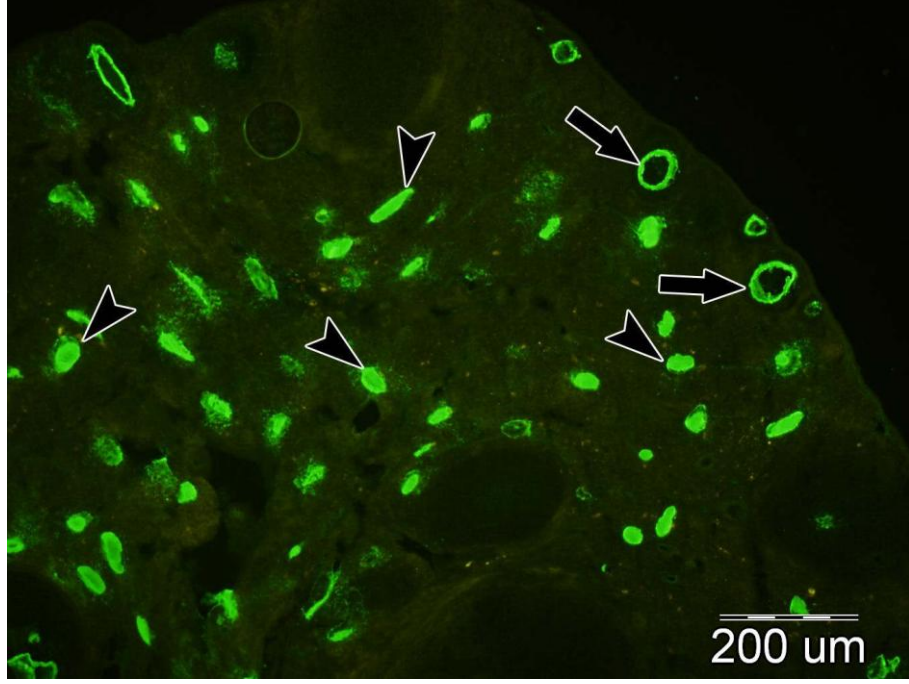


Şekil 4.2.3: Kontrol grubunda ZP2 pozitif zona pellusida (ok) ve atretik follüküller (ok başı) (X100).

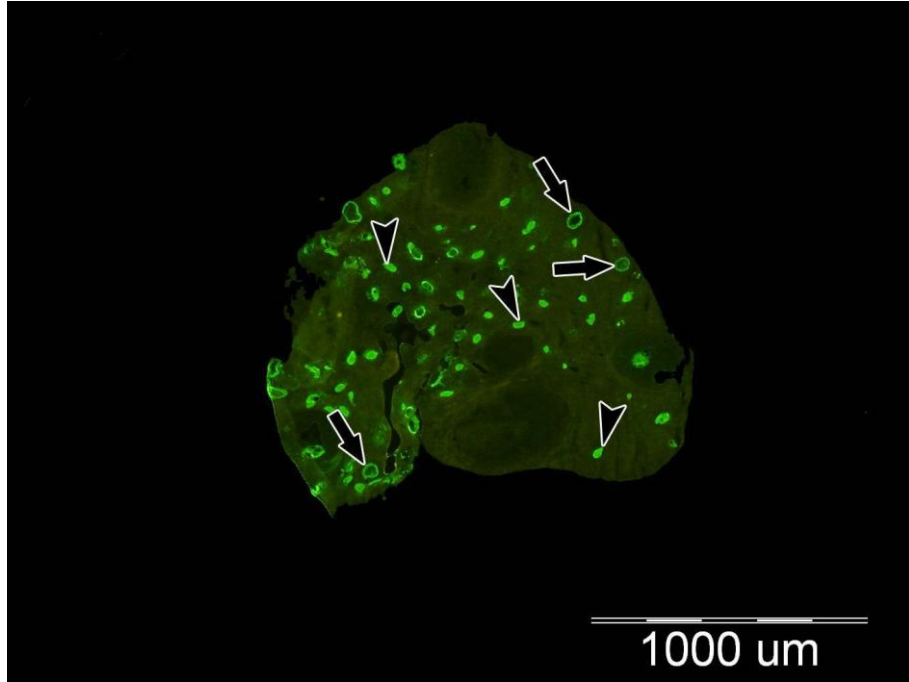
Diyabet grubu: Bu grupta da zona pellusidalar anti-ZP2 antikoru ile kuvvetli pozitif olarak işaretlenmişti ancak, işaretlenme yoğunluğu bakımından iki grup arasında farklılık saptanmadı. Zona pellusidaların kontrol grubuna göre daha düzensiz yapıda olduğu ve yer yer fragmantasyon gösterdiği belirlendi. Bazı follüküllerde zona pellusidayı çevreleyen granüloza hücrelerinde zayıf işaretlenmeye rastlandı (Şekil 4.2.4). Overdeki atretik follükül sayısı oldukça artmış olarak görüldü (Şekil 4.2.5 ve Şekil 4.2.6).



Şekil 4.2.4: Diyabet grubunda ZP2 pozitif fragmente olmuş zona pellusida (ok), granüloza hücreleri (GH) ve antrum (ok başı) (X400).



Şekil 4.2.5: Diyabet grubunda ZP2 pozitif zona pellusida (ok) ve atretik follüküller (ok başı) (X100).



Şekil 4.2.6: Diyabet grubunda ZP2 pozitif zona pellusida (ok) ve atretik follüküller (ok başı) (X40).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, diyabetin gelişen folliküllerdeki zona pellusidanın morfolojisine ve glikoprotein yapısına bir etkisi olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Morfolojik değerlendirme için transmisyon elektron mikroskopla inceleme yapılırken, glikoprotein içeriğın değerlendirilmesi için ise anti-ZP2 antikoru ile immünfloresan işaretleme yapıldı.

Zona pellusidanın fertilizasyondaki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Normal bir zona pellusidanın varlığı fertilizasyonun gerçekleşebilmesi için gereklidir. Zona pellusida insanda ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 glikoproteinlerinden oluşurken, farelerde ise ZP1, ZP2 ve ZP3 glikoproteinlerinden meydana gelir. Bu glikoproteinlerin sentez yerinin insanlarda granüloza hücreleri ve oosit olduğu, farelerde ise yalnızca oositler olduğu bildirilmekle birlikte bizim çalışmamızın elektron mikroskopisinde fare zona pellusidasının granüloza hücreleri tarafından da üretildiğini gösteren bulgulara rastladık.

Diyabetin karbonhidratlar, yağlar ve proteinler üzerine etkileri vücutta çeşitli seviyelerde birçok bozukluğa neden olur. Son yapılan çalışmalarda diyabetli farelerde oositin büyüme ve olgunlaşmasının veya mayoz 1'in tamamlanmasının geciktiği rapor edilmiştir (48). Diyabetin oosit ve kümülüs hücreleri arasındaki geçit bağlantıları (gap junction) ile olan iletişimi azalttığı bunun sonucunda hücrelerde apoptozisin arttığı ve oosit gelişiminin geri kaldığı da öne sürülmüştür (57, 58). Bizim çalışmamızda da, diyabet grubundaki granüloza hücrelerinde apoptozisin arttığı ve hem granüloza hücreleri arası hem de granüloza hücreleri ile zona pellusida arasındaki bağlantıların zayıfladığını gözlemledik. Ayrıca granüloza hücreleriyle oositin doğrudan ilişki kurmasını sağlayan ve zona pellusida içerisinde yer alan hücreler arası uzantıların da bu grupta oldukça azaldığını izledik. Bu durum, gelişmekte olan oositin granüloza hücrelerinden gelen parakrin sinyal desteğini kaybetmiş olabileceğini ve buna bağlı olarak da oositin etkilenerek infertiliteye yol açabileceğini düşündürdü.

Zona pellusida glikoproteinlerinin eksikliğinde zona pellusidanın yapısının bozulduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir (30). Zona pellusida glikoproteinleri fertilizasyonda önemli roller oynar. ZP3 glikoproteini akrozom reaksiyonunda primer reseptör olarak, ZP2 glikoproteini ise sekonder reseptör olarak işlev görür. Dolayısıyla

zona pellusida glikoproteinlerindeki herhangi bir eksiklik veya defekt fertilizasyonun gerçekleşmesini olumsuz yönde etkiler (59). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre diyabet ZP2 glikoprotein ekspresyonunda önemli bir değişikliğe yol açmadığı halde diyabetik gruptaki zona pellusidaların morfolojileri bozulmuştu, fibriler görünümlü yapısını ve bazı bölgelerde bütünlüğünü kaybetmişti. Bu durumun diyabetin ZP2 glikoproteininden çok ZP1 ve ZP3 glikoproteinlerini etkilemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca bu çalışmada sadece ZP2 ekspresyonu ve zona pellusida ince yapısı değerlendirilmiş zona pellusida ile sperm etkileşimini gösteren işlevsel deneyler yapılmamıştır. Belki de diyabetin etkisiyle ZP2 glikoproteininin ekspresyonundan çok işlevinde bozulmalar meydana gelmektedir. Yaptığımız elektron mikroskopik incelemede diyabet grubunda yalnızca zona pellusidalarda değil oosit ve granüloza hücrelerinde de anormallikler bulunmaktaydı.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, diyabetin oosit matürasyonunu geciktirdiği, mitokondriyonlarında işlevsel ve yapısal bozukluklara yol açtığı, ayrıca mayoz mekiğinin yapısının ve kromozom düzenlenmesinin bozulduğu da gösterilmiştir (60, 61). Sunulan çalışmada bunlara ek olarak ZP2 için yapılan işaretleme sonuçları değerlendirildiğinde, diyabetik grupta pozitif olarak işaretlenen atretik folliküllerin sayısı kontrol grubuna göre belirgin olarak artmıştı.

Diyabetin mitokondriyon dış zarındaki porların geçirgenliğini arttırdığı ve böylece sitokrom-c'nin sitoplazmaya geçtiği bunun da apoptozise yol açtığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada diyabetin oosit mitokondriyon dış membranlarının parçalanmasına yol açtığı gösterilmiştir (61). Çalışmamızda, diyabete bağlı mitokondriyal hasar sonucu granüloza hücrelerinde apoptozun artmış olabileceğini düşündük. Ayrıca bulgularımızda mitokondriyal anormallikler yanında diyabetin oositlerde sitoplazmik vakuollere ve artmış veziküler birikimlere de yol açtığı saptandı.

Diyabetin cinsiyet hormonlarını da etkilediği bilinmektedir. Hatta bu bozulmanın diyabetik böbrek hastalığı gelişme riskini arttırabileceği de öne sürülmektedir. Çalışmamızdaki diyabetik grupta follikülogenez, oogenez ve zona pellusida yapısında bozulmalar saptandı. Diyabetin doğrudan bu bozulmadan sorumlu olabileceği gibi, hormonal düzensizliğe yol açarak da bu süreçleri etkileyebileceğini ve dolayısıyla infertiliteye katkısının olabileceğini de düşündük.

Chang ve arkadaşları, diyabetin granüloza hücrelerinde apoptozisi arttırdığını

bildirmişlerdir. Bizim elektron mikroskopik bulgularımız da bu durumu desteklemekteydi. Diyabetik grubun granüloza hücrelerinde apoptotik odaklar oluşturacak kadar çok sayıda apoptoza rastlandı. Ayrıca granüloza hücrelerinin morfolojilerinde anormallikler yanı sıra birbirleriyle ve zona pellusida olan bağlantılarında da ayrılmalar saptandı.

Elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde diyabetin zona pellusida yanında oosit ve granüloza hücrelerini de etkileyerek infertiliteye yol açabileceği görüşüne varıldı.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Yapılan elektron mikroskopik incelemede diyabetin zona pellusidalar üzerinde zararlı etkileri olduğu, zona pellusidaların morfolojilerinin, kalınlığının, bütünlüğünün ve fibriler yapısının bozulduğu görüldü. Bütünlük bozulmasına bağlı olarak granüloza hücrelerinin perivitellin boşluğa girdiği de izlendi.
2. Granüloza hücreleri ile oosit arasında parakrin iletişimi sağlayan ve oosit gelişimi ve devamlılığı için gerekli olan hücreler arası mikrovillus tarzı uzantıların oldukça azaldığı belirlendi.
3. Diyabet grubunun oosit sitoplazmalarında kümeler halinde veziküller, artmış vakuoller ve bu vakuollerin çevresinde kümelenmiş çok miktarda mitokondriyonlar gözlemlendi. Perivitellin aralıkta sıvı birikimine bağlı olarak vakuol benzeri genişlemeler de bulunmaktaydı.
4. Elektron mikroskopik incelemede, kontrol grubunun granüloza hücrelerinde hemen hiç apoptotik hücreye rastlanmazken diyabet grubunun granüloza hücrelerinde odaklar oluşturacak kadar çok sayıda apoptotik hücre görüldü.
5. Kontrol grubu granüloza hücreleri düzgün biçimli, birbirleriyle ve zona pellusidaya sıkı bağlantılı olarak gözlenirken diyabet grubunda granüloza hücrelerinin morfolojileri çoğunlukla anormaldi. Granüloza hücrelerinin kendi aralarında ve zona pellusidaya olan bağlantılarında zayıflama ve ayrılmalar gözlemlendi.
6. Önceki çalışmaların sonuçlarına göre zona pellusida matriksinin farelerde yalnızca oositlerden sentez edildiği kabul edilmekteyken bizim elektron mikroskopik bulgularımız granüloza hücrelerinden de sentez edildiğini düşündürdü.
7. Yapılan immünfloresan işaretlemede, kontrol grubuyla diyabet grubu arasında, ZP2 glikoproteinlerinin ekspresyonlarının farklılık göstermediği belirlendi.
8. ZP2 ile işaretlenen zona pellusidalar diyabetik grupta daha kötü morfolojiye ve fragmantasyonlara sahipken, kontrol grubunun bulguları daha normaldi.
9. Literatürde diyabetin zona pellusidalar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Sunduğumuz çalışma bu konuda sınırlı bir ön değerlendirme olarak kabul edilebilir, ancak bu konunun daha geniş kapsamlı

araştırılmaya ihtiyacı vardır.

- 10.** Granüloza hücreleri ile oositler arasındaki parakrin iletişimi sağlayan hücreler arası uzantıların diyabet grubunda belirgin biçimde azaldığı görüldü. Daha önceki çalışmalarda bu iletişimin bozulduğunu gösteren işlevsel analiz sonuçları da bildirilmiştir ancak, ne bizim bulgularımızda ne de literatürde bu durumun nedenlerini açıklayabilecek herhangi bir bilgiye ulaşamadık. Bu yüzden bu iletişim bozulmasının nedenleri ile ilgili daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine de ulaştık.
- 11.** ZP2 glikoproteinini ekspresyonu bakımından kontrol ve diyabet grupları arasında farklılık saptayamamakla birlikte, diyabet grubunun zona pellusidalarında yapısal anormalliklere rastladık. Diyabetin bu anormalliklere yalnızca ZP2 glikoproteinini değil ZP1 ve ZP3 glikoproteinlerini de etkileyerek neden olabileceğini düşündük. Literatürde bu olası etkiyi inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızın devamında diyabetin ZP1 ve ZP3 glikoprotein ekspresyonlarına olası etkisinin de değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaştık.

KAYNAKLAR

1. **L.LeeÁvre, S.J.Conner, A.Salpekar, O.Olufowobi, P.Ashton, B.Pavlovic, W.Lenton, M.Afnan, I.A.Brewis, M.Monk, D.C.Hughes and C.L.R.Barratt.** Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum reprod.* **2004**;19(7):1580–6.
2. **Jurrien Dean.** Biology of Mammalian Fertilization: Role of the Zona Pellucida. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.* **1992**, 1055–1059.
3. **S.V. Prasad S.M. Skinner C. Carino N. Wang J. Cartwright B.S. Dunbar.** Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* **2000**;166:148–164
4. **A. Willcox , S. J. Richardson, A. J. Bonet, A. K. Foulis and N. G. Morgan.** Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* **2009**;155(2):173–81
5. **Alberti K.G.M.M., P.Z. Zimmet.** Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. **1998** *Diabet. Med.* 15: 539–553
6. **Wiesław Zarzycki & Magdalena Zieniewicz.** Reproductive disturbances in type 1 diabetic women. *Neuroendocrinol Lett.* **2005**; 26(6):733–73
7. **Moley KH, Schreiber JR:** Ovarian follicular growth, ovulation and atresia. Endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Adv Exp Med Biol.* **1995**, 377:103–119.
8. **Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ:** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* **1990**, 43:543–547.
9. **Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ:** Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro.* *Biol Reprod.* **1992**, 46,1196–1204
10. **Van den Hurk R, Abir R, Telfer EE, Bevers MM:** Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update* **2000**, 6:457–74.
11. **Michael H. Ross, Wojciech Pawlina:** Histology: a text and atlas. 5. Baskı, *Lipincott Williams & Wilkins*, **2005**
12. **Keith L. Moore.** The developing human: clinically oriented embryology. 6. baskı, *W. B. Saunders Company*, **1998**
13. **Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Giubert J, Beaujean N, Szollosi MS, Debey P:** Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod* **1999**, 60:580–587.
14. **Fiona H, Thomas and Barbara C Vanderhyden.** Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2006**, 4.19
15. **Wassarman, P. M.** Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* **1988** 57, 415–522.
16. **Jefrey D. Bleil and Paul M. Wassarman.** Syntesis of zona pellusida proteinsby denuded and follicle-enclosed Mouse oocytes during culture in vitro. **1980**, *Cell Biology* 77(2), 1029–1033

17. **Wassarman, P. M.** Contribution of Mouse Egg Zona Pellucida Glycoproteins to Gamete Recognition During Fertilization. **2005**, *Journal Of Cellular Physiology* 204:388–391.
18. **K.Bogner, K.-D.Hinsch1, P.Nayudu, L.Konrad, C.Cassara and E.Hinsch.** Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. **2004** *Molecular Human Reproduction* Vol.10, No.7 pp. 481–488
19. **Tracy Rankin, Selma Soyal, Jurrien Dean.** The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. **1999**, *Molecular and Cellular Endocrinology* 163 (2000) 21–25.
20. **B. S. Dunbar, S. Avery, V. Lee, S. Prasad, D. Schwahn, E. Schwoebel, S. Skinner and B. Wilkins.** The Mammalian Zona Pellucida: its Biochemistry, Immunochemistry, Molecular Biology, and Developmental Expression. **1994**, *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 331–47
21. **David P. L. Gren.** Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction.* **1997**, 2, 147–156
22. **P.M. Wassarman, L. Jovine and E. S. Litscher.** Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res.* **2004**, 105:228–234
23. **Olga Epifano, Li-fang Liang, Mary Familiari, Malcolm C. Moos, Jr and Jurrien Dean.** Coordinate expression of the three zona pellucida genes during Mouse oogenesis. *Development* 121(7), **1995** 1947–1956
24. **Litscher ES, Qi H, Wassarman PM:** Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2, and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes. **1999**, *Biochemistry* 38,12280–12287.
25. **Wassarman, P. M** Zona Pellucida Glycoproteins. *J Biol Chem.* **2008**, 5;283(36):24285–9
26. **Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM.** The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. **2002** *Nat Cell Biol.* 4(6):457–61
27. **Callebaut, I., Mornon, J.P., and Monget, P.** Isolated ZP-N domains constitute the N-terminal extensions of Zona Pellucida proteins. **2007**, *Bioinformatics* 23, 1871–1874
28. **Yi-Nan Lin, Angshumoy Roy, Wei Yan, Kathleen H. Burns and Martin M. Matzuk.** Loss of Zona Pellucida Binding Proteins in the Acrosomal Matrix Disrupts Acrosome Biogenesis and Sperm Morphogenesis. **2007**, *Molecular And Cellular Biology*, p. 6794–6805
29. **George S. Salzman, Jeffrey M. Greve, Richard J. Roller and Paul M. Wassarman.** Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the Mouse. **1983**, *The EMBO Journal* Vol.2 No.9 pp.'451–1456
30. **Tracy Rankin, Prue Talbot, Eric Lee and Jurrien Dean.** Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. **1999**, *Development* 126, 3847–3855
31. **Debra A. Gook, D.H. Edgar, J. Borg1, and M. Martic.** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. **2008**, *Human Reproduction* Vol.23, No.2 pp. 394–402
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Infertility>
33. **Kubilay Vicdan ve Ahmet Zeki Işık.** İn vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. 1. baskı: *Çağdaş Medikal Kitabevi*, **1999**
34. **Gianni Fortiand Csilla Krausz.** Evaluation and Treatment of the Infertile Couple. *J Cli Endoc Metab.* **1988**, 83(12): 4177–4188.

35. **Thurmond AS.** Imaging of female infertility. *Radiol clin North am.* **2003**;41(4):757–67.
36. **Peksen Y.** Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi. Gülman B, Ed. *Diyabetik Ayak.* 2.Baskı, *Samsun: Ofset,* **2000**,11–26.
37. **Alvin C.** Diabetes Mellitus. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Lango D, *Harrison.*15thEd., New York: McGraw-Hill Company, **2000**:2114-2125.
38. American Diabetes Association. Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care,* **2004**;27,5–14.
39. **Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS.** Moleculer mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med,* **2001**; 345:971–977.
40. Report of the Expert Comitetee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care,* **2001**; 24,5–20.
41. **Windebank AJ, Feldman EL.** Diabetes and the Nervous System. In: Aminoff MJ (ed).*Neurology and General Medicine.* 2nd Ed, New York: Churchill Livingstone, **2001**:341–364.
42. **Altıntas Y.** Diabetes Mellitus Tanımı, Tanısı ve Sınıflaması. Yenigün M, Altıntas Y. *Her Yönüyle Diabetes Melitus.* Nobel, **2001**,51–53
43. **Greene, MF.** Spontaneous abortions and major malformations in women with diabetes mellitus. *Semin Reprod Endocrinol,* **1999** 17.127–136
44. **Farrell T, Neale L, Cundy, T.** Congential anomalies in the offspring of women with type I, type II and gestational diabetes. *Diabet Med,* **2002** 19.322–326
45. **Diamond MP, Moley KH, Pellicer A, Vaughn WK, DeCherney AH.** Effects of streptozotocin and alloxan-induced diabetes mellitus on Mouse follicular and early embryo development. *J Reprod Fertil,* **1989** 86,1–10
46. **Colton SA, Pieper GM, Downs SM.** Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biol Reprod* **2002** 67.220–230
47. **Colton SA, Humpherson PG, Leese HJ, Downs SM.** Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biol Reprod,* **2003** 69.761–770
48. **Aimee S. Chang, Alexis N. Dale, and Kelle H. Moley.** Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development, and Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology,* **2004** 146(5):2445–2453
49. **Idil M, Cepni I, Demirsoy G, Ocal P, Salihoglu F, Senol H, Elibol F, Irez T.** Does granulosa cell apoptosis have a role in the etiology of unexplained infertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2004** 112:182–184
50. **Ackert CL, Gittens JEI, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM.** Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol* **2001**233:258–270
51. **Bishobric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA.** Molecular mechanisms of apotosis in the cardiac myocyte. *Curr opin pharmacol.* 1(2):141-50, **2001**.
52. **Li A, Sato T, Haimovici R, Okamoto T, Roy S.** High glucose alters connexin 43 expression and

gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003** 44,5376–5382

53. Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *J Histochem Cytochem* **2004** 52,1199–1207
54. Chi MM, Hoehn A, Moley KH. Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology. *Am J Physiol Endocrinol* **2002**, 283(2):E226–32
55. **Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19(1):1–12**
56. Maric C, Sullivan S. Estrogens and the diabetic kidney. *Gend Med.* **2008**;5 Suppl A:S103–13
57. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cell apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* **2001** 18,490–498
58. Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Litzistorf Y, Ladewig A, Durrenberger M, Guggenheim R, Miny P, Holzgreve W, De Geyter C. Characteristics of an immortalized human granulosa cell line. COV 434. *Mol Hum Reprod*, **2000** 2,146–153
59. Boris Baibakov¹, Lyn Gauthier, Prue Talbot, Tracy L. Rankin and Jurrien Dean. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. **2007**, *Development* 134, 933–943
60. Ann M. Ratchford, Cybill R. Esguerra, and Kelle H. Moley. Decreased Oocyte-Granulosa Cell Gap Junction Communication and Connexin Expression in a Type 1 Diabetic Mouse Model. **2008**, *Molecular Endocrinology* 22(12):2643–2654
61. Wang Q, Ratchford AM, Chi MM, Schoeller E, Frolova A, Schedl T, Moley KH. Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol. Endocrinol.* **2009**, 23(10):1603-12

ÖZGEÇMİŞ

08.06.1982'de Gaziantep'te doğdu. İlk, ortaokul ve lise eğitimini Gaziantep'te tamamladı. 2000 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2005 yılında mezun oldu. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Tezsiz Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve halen eğitime devam etmektedir.