

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİABETES MELLİTUS TİP 1 OLUŞTURULMUŞ ERKEK  
FARELERDEN ELDE EDİLEN SPERMLERİN IVF  
UYGULAMALARINDA FERTİLİZASYON VE EMBRİYO KALİTESİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Begüm ALYÜRÜK

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS TEZİ)  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2011



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

**DİABETES MELLİTUS TİP 1 OLUŞTURULMUŞ ERKEK FARELERDEN  
ELDE EDİLEN SPERMLERİN IVF UYGULAMALARINDA FERTİLİZASYON  
VE EMBRİYO KALİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Begüm ALYÜRÜK**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS TEZİ)  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yard. Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi (Proje No: 2010 / 22) tarafından desteklenmiştir.

KOCAELİ

2011

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

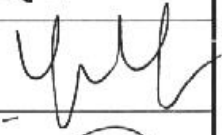

**Tez Adı:** Diabetes Mellitus Tip 1 Oluşturulmuş Erkek Farelerden Elde Edilen Spermilerin IVF Uygulamalarında Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Tez yazarı: Begüm ALYÜRÜK

Tez savunma tarihi: 5 Aralık 2011.

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Yusufhan YAZIR


İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN	
ÜYE(DANIŞMAN):	Yard. Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
ÜYE:	Yard. Doç. Dr. Ünal USLU	

**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım

..12../12/2011

  
Prof. Dr. Umit BIÇER

Enstitü Müdürü

## Özet

### **Diabetes Mellitus Tip 1 Oluşturulmuş Erkek Farelerden Elde Edilen Spermlerin IVF Uygulamalarında Fertilizasyon ve Embriyo Kalitesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi**

Bu çalışmadaki amacımız streptozotosin (STZ) uygulaması ile kronik tip 1 diyabet oluşturulmuş erkek farelerden elde edilen spermlerin morfolojisini, motilitesini, fertilizasyon ve sonrasında oluşan embriyo kalitesini gözlemlemektir.

Çalışmamızda CD-1 ırkı 12 haftalık dişi ve erkek fareler kullanıldı. Erkek fareler kontrol ve diyabet grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Diyabet grubuna sitrat içinde çözünen streptozotosin intraperitoneal olarak uygulanırken, kontrol grubuna sadece sitrat verildi. Streptozotosin ile meydana gelen tip 1 diyabetin kronikleşerek fare üreme sistemine etki edebilmesi için fareler bir ay sonra sakrifiye edildi. Epididimis ve vas deferensleri alınarak spermleri toplandı. Dişi farelere folikül gelişimlerini stimüle etmek amacıyla kontrollü ovaryan stimülasyon uygulandı. Sonrasında ovidukt ve ovaryumları alınarak oositleri toplandı. Kontrol ve diyabet grubunda kullanılacak olan oositler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Diyabet ve kontrol grubuna ait farelerin sperm yaymaları yapıldı. Diff-Quik boyası ile boyanarak morfolojileri değerlendirildi. İki grup arasındaki morfoloji kriterleri kıyaslandı.

Yine bu gruplara ait spermlerin motiliteleri değerlendirildi. En az üç farklı sahada ileri ve düzgün doğrusal hareketli spermlerin sayımı yapılarak oran cinsinden kıyaslandı.

Elde edilen diyabetik ve kontrol grubu spermler ile oosit hücrelerine IVF uygulandı. IVF uygulamasından 16-18 saat sonra fertilizasyon değerlendirilmesi yapılarak döllenmiş embriyolar takip edildi. Kontrol grubu spermlerden oluşmuş embriyolar ile diyabet grubu spermlerinden oluşmuş embriyolar kıyaslandı, bulguları değerlendirildi.

Çalışmamızın sonucunda, diyabetik gruptan topladığımız spermlerin kontrol grubuna göre morfolojik olarak, anormal sperm miktarının daha fazla olduğu, bununla orantılı olarak anormal morfolojiler tek tek değerlendirildiğinde her bir anormal kriterin diyabetli grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdiğini saptadık.

Motilite açısından değerlendirdiğimizde, spermilerin diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yavaş olduğunu tesbit ettik ( $p < 0.0001$ ).

Diyabetik farelerin spermi ile döllenen embriyolarda fertilizasyon oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p = 0.000$ ). Fertilize olan oositlerin oluşturduğu embriyolar, 3. gün sonunda incelendiğinde iyi kalite embriyolar (Grade A) iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı ( $p = 0.376$ ). Fakat kötü kalite embriyoların (Grade B) oranı, diyabetik farelerde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p = 0.001$ ). Bu süre sonunda diyabetik farelerde gelişimi durmuş embriyo oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p = 0.003$ ).

ıkan sonuçlar göstermektedir ki; kronik DM Tip 1 hem sperm morfoloji ve motilitesini hem de fertilizasyon oranını düşürmektedir. Ayrıca embriyo yarıklanma kabiliyetini azaltmakta, gelişimi duran embriyo oranını arttırmaktadır. Ancak iki grup arasında Grade A embriyo oranı açısından anlamlı derecede fark olmaması kullandığımız IVF metodunun doğal yollardan iyi kalite sperm seçme kabiliyetinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tüm bu sonuçlar diyabetin üreme üzerine olumsuz etki gösterdiğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Diff-Quik, DM, kontrollü ovaryan stimlasyon, streptozotosin, IVF.

## **ABSTRACT**

### **Examining the effects of sperms obtained from male mice with Type 1 Diabetes Mellitus on fertilization and embryo quality in IVF treatments**

Our goal in this study is to observe the quality of embryo that occurs after, morphology, motility and fertilization of the sperms obtained male mice which are made chronic type 1 diabetic with streptozotocin (STZ) treatment.

In our study, 12-week female and male CD-1 races mice were used. Male mice were divided into two groups of control and diabetic. Streptozotocin, which dissolves in citrate, was applied as intraperitoneal to the diabetic group whereas only citrate was given to the control group. In order to make type 1 diabetes formed by streptozotocin to become chronic and to effect the reproductive system of the mice, the mice were sacrificed a month later. The sperms of the mice were collected by taking epididymis and vas deferens of the mice. Controlled ovarian stimulation was applied to the female mice in order to stimulate follicle developments of them. Later, oocysts of the mice were collected by taking oviduct and ovaries of the mice. It was recognized that there weren't any considerable differences between oocysts which were going to be used in the control and diabetic groups statistically.

Smear of sperms of the mice belonging to diabetic and control groups are made. Their morphologies are evaluated by staining with Diff-Quik stain. The morphology criteria between the two groups are compared.

The motilities of the sperms again belonging to these groups were evaluated. By counting the numbers of the sperms with forward and normal linear motility at least in 3 different fields, there were compared in terms of ratio.

IVF was treated in oocyst cells and diabetic and control group sperms obtained. Fertilized embryos were followed after making fertilization evaluation 16-18 hours after IVF treatments. The embryos of control group sperms and the embryos of diabetic group sperms were compared and findings were evaluated.

As a result of our study, we found that the sperms we collected from the diabetic group have more abnormal sperms than the sperms of the control group morphologically,

and proportionally, when the morphologies are evaluated one by one, each abnormal criterion of the diabetic group increased significantly in a statistical manner.

When we evaluated in terms of the motility, the sperms of the diabetic group were significantly slower than the ones in the control group ( $p < 0.0001$ ).

In the embryos which were fertilized with the sperms of diabetic mice, the ratio of the fertilization were found considerably lower than the control group ( $p = 0.000$ ). When the embryos made by fertilized oocyst examined at the end of the third day, there weren't any significant difference between the two groups in terms of good quality embryos (Grade A) statistically ( $p = 0.376$ ). However, the ratio of the bad quality embryos (Grade B) was found significantly lower in the diabetic mice in a statistical manner ( $p = 0.001$ ). Besides, the ratio of the embryos of which stopped developing at the end of this time was also found significantly higher in the diabetic mice ( $p = 0.003$ ).

The results show that; chronic DM Type 1 reduces both the ratio of the morphology and the mortality and the ratio of the fertilization of the sperms. Besides, it decreases the cleavage capability of the embryos and increases the ratio of the embryos which stops to develop. However, we think that the reason for not being any significant difference in terms of Grade A embryo ratio between two groups is that IVF method we used have the capability of selecting good quality sperms in natural ways. All these results suggest that the diabetes shows negative effects on reproduction.

**Key words:** Diff-Quik, DM, controlled ovarian stimulation, streptozotocin, IVF.



## TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, beni yönlendiren, fikir ve bilgisini paylaşan, zamanını vererek tezin oluşumunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam

Yard. Doç. Dr. Yusufhan Yazır' a

Eğitimim boyunca destek, deneyim ve bilgi birikimlerini paylaşan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım;

Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz, Prof. Dr. Süreyya Ceylan,  
Prof. Dr. Hakkı Dalçık, Doç Dr Süheyla Gonca ve Doç Dr Serdar Filiz' e

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, tezimle ilgili her türlü sorunda içtenliğiyle öneri ve desteğini veren çok değerli çalışma arkadaşım

Uzm. Biyolog Özcan Budak' a

İstatistiki bilgi ve deneyimiyle çalışmama katkıda bulunan değerli hocam  
Yard. Doç. Dr. Serkan Yılmaz' a, arkadaşım Uzm. Mol. Bio. Ender Yalçınkaya' ya,  
Öğr. Gör. Deniz Oruç' a

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü konuda yanımda olan çok değerli  
arkadaşım Bio. Gözde Yazıcıoğlu' na,

Ayrıca değerli çalışma arkadaşlarım

Uzm. Bio. Elif Gelenli, Bio. Cansu Semiz, Uzm. Bio. Sevilay Erimşah,  
Uzm. Bio. Sema Kurnaz' a

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda  
hissettiğim

Ailem ve yakınlarıma

TEŞEKKÜR EDERİM

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	vix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	4
2.1.1. Testisler .....	5
2.1.1.1. Seminifer Tübüller.....	6
2.1.1.2. Spermatogenez.....	8
2.1.1.3. Spermatozoon .....	10
2.1.1.4. İnterstisyel Doku .....	11
2.1.2. Yardımcı Genital Bezler.....	11
2.1.3. Genital Boşaltım Kanalları .....	11
2.1.4. Penis .....	12
2.2. Dişi Üreme Sistemi.....	12
2.2.1. Ovaryum .....	12
2.2.2. Fallop Tüpleri .....	13
2.2.3. Uterus.....	14
2.2.4. Vajina.....	14
2.2.5. Dış Genital Organlar.....	14
2.3. Fertilizasyon.....	14
2.4. İnfertilite.....	15
2.4.1. İnfertilite Nedenleri .....	17
2.4.1.1. Biyolojik Faktörler.....	18
2.4.1.2. Yaşam Biçimi Faktörleri.....	19
2.4.1.3. Çevresel Faktörler.....	19
2.4.1.4. Fiziksel Faktörler.....	19
2.4.1.4.1. Kadına Bağlı Faktörler.....	19
2.4.1.4.1.1. Ovulatuvar Bozukluklar.....	19
2.4.1.4.1.2. Tubal-Peritoneal Faktörler.....	19
2.4.1.4.1.3. Servikal ve İmmunolojik İnfertilite.....	20
2.4.1.4.1.4. Uterusa Ait İnfertilite Nedenleri.....	20
2.4.1.4.1.5. Vulva ve Vajene Ait İnfertilite Nedenleri.....	20
2.4.1.4.2. Erkeğe Bağlı Faktörler.....	21
2.4.1.4.2.1. Pretestiküler Nedenler.....	21
2.4.1.4.2.2. Testiküler Nedenler.....	22
2.4.1.4.2.3. Posttestiküler Nedenler.....	22
2.4.1.4.3. Açıklanamayan İnfertilite.....	22
2.5. Fare Sperm Değerlendirilmesi.....	22
2.5.1. Fare Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi.....	22
2.5.2. Fare Sperm Motilitesinin Değerlendirilmesi.....	22
2.5.3. Sperm Defektlerinin Sınıflandırılması.....	23
2.6. Diabetes Mellitus.....	24

2.6.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Sınıflandırılması.....	24
2.6.2. Tip I Diabetes Mellitus'un Patogenezi .....	26
2.6.3. Diyabetin Kalp ve Damar Hastalıklarına Etkisi.....	27
2.6.4. Diabetes Mellitus ve Hemostaz Bozuklukları.....	28
2.6.5. Diyabetik Nöropati.....	29
2.6.6. Diabetes Mellitus ve Erektile Fonksiyon Bozuklukları.....	30
2.6.7. Diyabet ve Gebelik.....	31
2.6.8. Diyabet ve İnfertilite.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Deney Hayvanları.....	35
3.2. IVF Protokolü .....	35
3.2.1. Sperm Toplama .....	35
3.2.2. Gradyent .....	35
3.2.3. Sperm Kapasitesi .....	35
3.2.4. Oosit Toplama.....	36
3.2.5. Kumulus-oosit Kompleksi.....	36
3.2.6. İnseminasyon.....	36
3.2.7. Zigotlar .....	36
3.2.8. Embriyo Kültürü.....	36
3.3. Deney Grupları .....	36
3.3.1. Kontrol Grubu: .....	37
3.3.2. Diyabet Grubu : .....	37
3.4. Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi İçin Diff-Quik Boyama.....	38
3.5. Farelerde Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi.....	38
3.6. Farelerde Motilite Tespiti.....	39
3.7. Embriyo Morfolojisinin Belirlenmesi.....	39
3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Medyumlar.....	39
3.8.1. Streptozotosin .....	39
3.8.2. Gebe Kısırak Serum Gonadotropin (Pregnant mare serum gonadotrophin).....	39
3.8.3. İnsan Koryonik Gonadotropin (Human Chorionic Gonadotrophin).....	39
3.8.4. Yıkama Medyumları.....	40
3.8.5. Fertilizasyon ve Kapasite Medyumları .....	40
3.8.6. Klivaj ve Blastokist Medyumu .....	40
3.8.7. Diff-Quik Boyası.....	40
3.8.8. Glukometre.....	41
3.8.9. Görüntüleme Sistemi.....	41
3.8.10. İnkübatörler.....	41
3.8.11. Mikroskoplar.....	41
3.9. İstatistiksel Veriler.....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>64</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>79</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>81</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>97</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
cm	:	Santimetre
dl	:	Desilitre
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
ADA	:	American Diabetes Association
DM	:	Diabetes Mellitus
ED	:	Eretil Disfonksiyon
GIFT	:	Gamete Intra Fallopian Transfer
HIV	:	Human Immunodeficiency Virüs
ICSI	:	Intracytoplasmic Sperm Injection
IU	:	International Ünit
IUI	:	Intrauterin Insemination
IVF	:	In Vitro Fertilization
i.p	:	İntraperitoneal
kDa	:	Kilodalton
kg	:	Kilogram
MESA	:	Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyonu
NO	:	Nitrik oksit
NDDG	:	National Diabetes Data Group
PGD	:	İmplantasyon Öncesi Genetik Tanı
PZD	:	Partial Zona Dissection
SUZI	:	Subzonal Sperm Insemination
STZ	:	Streptozotosin
TEM	:	Transmission Elektron Mikroskop

TESE	:	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TET	:	Tubal Embriyo Transfer
WHO	:	World Health Organization
ZIFT	:	Zygote Intra Fallopian Transfer

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Erkek Üreme Sistemini oluşturan yapıların şematik çizimi.....	4
Şekil 2.2. Testisin içi ve erkek üreme sistemine ait kanallar.....	5
Şekil 2.3. Seminifer tübüldeki spermatojenik hücreler ve sertoli hücresi.....	7
Şekil 2.4. Spermatogenez.....	10
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait normal morfolojideki spermler görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	43
Şekil 4.2. Diyabet grubuna ait normal morfolojideki spermler görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	43
Şekil 4.3. Normal gruptaki kümeleşmiş fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	44
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait amorf fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop .....	45
Şekil 4.5. Diyabet grubuna ait amorf fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop .....	45
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait normal fare spermi (ok) ve çengelsiz başlı fare spermi (ok başı) görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	46
Şekil 4.7. Diyabet grubuna ait çengelsiz fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	47
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait kıvrık orta parçalı spermler (ok) görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	48
Şekil 4.9. Diyabet grubuna ait kıvrık orta parçalı spermler görülmektedir. 10x inverted mikroskop.....	48
Şekil 4.10. Diyabet grubu solda kıvrık orta parçalı sperm, sağda normal sperm (ok başı) görülmektedir. 40x inverted mikroskop .....	48
Şekil 4.11. Diyabet grubuna ait solda (ok ile gösterilmiş) amorf sperm, sağda ise (ok başları ile gösterilmiş) çift kuyruklu sperm gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop.....	49
Şekil 4.12. Kontrol grubu kıvrık kuyruklu spermleri. 40x inverted mikroskop.....	50
Şekil 4.13. Solda diyabet grubu, sağda kontrol grubu kıvrık kuyruklu sperm görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	50

<b>Şekil 4.14.</b> Diyabet grubuna ait solda (ok) kıvrık kuyruklu, sağda ise (ok başı) çift kuyruklu fare spermi görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	51
<b>Şekil 4.15.</b> Diyabet grubuna ait kısa kuyruklu spermiler. 40x inverted mikroskop.....	52
<b>Şekil 4.16.</b> Kontrol grubuna ait fare spermeleri görülmektedir. Üstte solda (kalın ok) normal morfolojideki fare spermi, üstte sağda (ince ok) amorf fare spermi, altta (ok başı) yapışık fare spermeleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	52
<b>Şekil 4.17.</b> IVF işleminde spermin zona pelusidaya penetrasyonları görülmektedir. 10x inverted mikroskop.....	54
<b>Şekil 4.18.</b> Birinci gün, kontrol grubu, iki blastomerli solda fragmantasyon içermeyen, sağda %5 fragmantasyon içeren embriyo görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	55
<b>Şekil 4.19.</b> Diyabet grubu birinci gün embriyoları. Sol üstte fragmantasyonsuz, sağ üstte %10 fragmante, sol altta %30 fragmante, sağ altta %50 fragmante embriyo. Fragmantasyonlar ok ile gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop.....	56
<b>Şekil 4.20.</b> Birinci güne ait solda kontrol grubu, sağda diyabet grubu simetrik embriyoları. 40x inverted mikroskop.....	56
<b>Şekil 4.21</b> Birinci gün asimetrik üç blastomerli kontrol grubu embriyoları. 40x inverted mikroskop.....	57
<b>Şekil 4.22.</b> Birinci gün asimetrik blastomerli diyabet grubu embriyoları. 40x inverted mikroskop.....	57
<b>Şekil 4.23.</b> Kontrol grubu ikinci gün dört blastomerli simetrik embriyolar. 40x inverted mikroskop .....	57
<b>Şekil 4.24.</b> Kontrol grubu ikinci gün asimetrik dört blastomerli embriyolar. 40x inverted mikroskop.....	58
<b>Şekil 4.25.</b> Diyabet grubu ikinci gün asimetrik dört blastomerli embriyolar. 40x inverted mikroskop.....	58
<b>Şekil 4.26.</b> Kontrol grubu ikinci gün embriyoları. Solda fragmantasyonu %15, sağda %30 olan embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	58
<b>Şekil 4.27.</b> Diyabet grubu ikinci gün solda %30 fragmantasyon, sağda %70 oranında fragmantasyon gözlenen embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	59
<b>Şekil 4.28.</b> Diyabet grubu ikinci güne ait embriyoların farklı gelişim durumları görülmektedir. Solda asimetrik 4 blastomerli, sağda ise asimetrik 2 blastomerli gelişimi geri kalmış embriyo görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	59
<b>Şekil 4.29.</b> Solda kontrol grubu, sağda diyabet grubuna ait, üçüncü gün simetrik sekiz blastomerli Grade A embriyolar. 40x inverted mikroskop.....	60

<b>Şekil 4.30.</b> Kontrol grubu üçüncü gün asimetrik blastomerli Grade B embriyolar. 40x inverted mikroskop.....	60
<b>Şekil 4.31.</b> Diyabet grubu üçüncü gün asimetrik blastomerli Grade B embriyolar. 40x inverted mikroskop.....	60
<b>Şekil 4.32.</b> Üçüncü gün, fragmantasyon içermeyen, solda kontrol grubu sağda ise diyabet grubu embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	61
<b>Şekil 4.33.</b> Diyabet grubu üçüncü gün ileri derecede fragmantasyona sahip embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop.....	61
<b>Şekil 4.34.</b> Kontrol grubuna ait üçüncü gün embriyoları. Solda (ince ok) 8 blastomerli Grade A embriyo, ortada döllenmemiş oosit, sağda (ok başı) 2 blastomerli gelişimi durmuş embriyo. 10x inverted mikroskop.....	62



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Fiziksel İnfertilite Nedenleri.....	18
<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol ve Diyabet Grubu Sperm Morfolojisi Yüzdesi.....	42
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Amorf Sperm Yüzdeleri.....	44
<b>Çizelge 4.3.</b> Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Çengelsiz Sperm Yüzdesi.....	46
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kıvrık Orta Parçalı Sperm Yüzdesi.....	47
<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kıvrık Kuyruklu Sperm Yüzdesi.....	49
<b>Çizelge 4.6.</b> Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kısa Kuyruklu Sperm Yüzdesi.....	51
<b>Çizelge 4.7.</b> Sperm Morfolojisi Sonuç ve Değerleri.....	53
<b>Çizelge 4.8.</b> Kontrol ve Diyabet Grubu Hareketli Sperm Yüzdesi.....	53
<b>Çizelge 4.9.</b> Kontrol ve Diyabet Grubu İstatistiksel Verileri.....	62
<b>Çizelge 4.10.</b> Kontrol ve Diyabet Grubu Spermeleri ile Oluşan Embriyoların Minimum ve Maksimum Değerleri.....	63

## 1.GİRİŞ

Diabetes mellitus; protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasının bozukluğu ile seyreden, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların geliştiği kronik ve kompleks bir metabolik hastalıktır (Hsueh et al. 2004). İnsülin bağımlı diabetes mellitus, insülin üretimindeki eksikliğe bağlı kan glukoz seviyelerindeki yükselme ile karakterizedir. Bunun sonucunda organ ve işlev kayıpları meydana gelmektedir (Lebovitz 2004a, 2004b; Pınar 1998).

Diyabet dünyada ve ülkemizde hızla artan bir halk sağlığı problemidir (Wild et al. 2004). Tüm organları etkilediği gibi cinsel organları da etkilemektedir (Sasaki et al. 2003). Diyabetik bireyler diyabetik olmayanlara göre cinsel problemlerle daha sık karşılaşmaktadırlar (Yenigün ve Ener, 2001).

Diyabetik erkeklerde infertilite görülme yaygınlığı olmayanlarına göre daha yüksektir (Sexton and Jarow, 1997) aynı zamanda partnerlerinde kendiliğinden düşük gibi olaylara neden olmaktadır (Babbott et al. 1958).

Spermden kaynaklanan implantasyon öncesi embriyo gelişimini etkileyen faktörler ‘paternal etkiler’ olarak bilinir ve yardımla üreme tekniklerinin başarısızlıklarına neden olurlar (Tesarik, 2005). Erken meydana gelen paternal etki, yarıklanma hızını geciktirir ve embriyoların fragmentasyon oranını artırır (Menezo, 2006). Bu da demek olur ki sperm, ilk yarıklanmayı ve gelişim potansiyelini etkilemektedir (Comizzoli et al. 2000).

Defektif paternal genomun zararlı etkileri, zigotik gen aktivasyonunun anormal olmasına neden olur. Böylece hem in vivo hem de in vitro olarak sekiz hücreli blastomer safhası gecikir, düşük oranda blastokist gelişimi, bozulmuş implantasyon ve gebelik olguları gözlenir (Lee et al. 2009).

Diyabetik sıçanlarda anormal spermler, hareketsiz spermler ve spermlerin yumurtayı dölleme kapasitelerinde azalma gözlenmiştir (Singh et al. 2009) .

Diyabet gibi karbonhidrat homeostazisindeki değişimler laboratuvar hayvanların üreme sistemlerinde bozukluğa yol açmakta, üreme organları üzerine olumsuz etkiler yapmaktadır. Diyabetik erkeklerde sperm kalitesi açısından da dezavantajlar vardır (Niven et al. 1995).

Garcia-Diez ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptığı çalışmada, semen kalitesine bakmak için geleneksel ışık mikroskopu kullanılmıştır. Bütün semen parametrelerindeki azalma tip 1 diyabetle ilgili 2 çalışmada gözlenmiştir. Çoğu çalışmalar göstermiştir ki;

diyabetin semen parametreleri üzerine zıt etkisi vardır aynı zamanda bozulmuş metabolik kontrol ve nöropati ile ilişkilidir (Sexton and Jarow, 1997).

Kim ve Moley' in 2008 yılında yapmış olduğu araştırmada hızlı ilerleyen hareketli spermiler azalmış, durağan spermiler diyabetik bireylerde artmıştır.

Kullandığımız STZ, DNA metillenmesine ve alkalizasyonuna sebep olabilen, ayrıca serbest radikal üretimini arttıran, oksidatif stresi yüksek seviyelere getiren, ipliklerin kırılmasını tetikleyen ve pankreatik beta hücre kaybına neden olan, sitotoksik etkideki geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Bolzan and Bianchi, 2002).

Hayvan çalışmaları göstermiştir ki, STZ ile oluşturulmuş diyabetli hayvanlarda 15 gün sonra sperm sayısı ve kalitesi düşmüştür (Scarano et al. 2006). Feng ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada ise sıçanlarda diyabetin spermatogenesis üzerine anlamlı derecede zararlı etki gösterdiği gözlenmiştir.

TEM görüntüleri, diyabet sonucu hastaların spermilerinde apoptoz ve immün sistemle ilgili hasarlar oluştuğunu, akrozomda, mitokondride, çekirdekte ve plazma membranında değişiklikler meydana geldiğini göstermiştir (Bacetti et al. 2002).

Puberte öncesi hayvanlarda diyabet ile fertilité oranının düşmesi daha çok göze çarpmaktadır (Frenkel, 1978). Kontrol grubuna göre daha az sayıda diyabetik sıçan ejakulasyona ulaşmıştır. Bu da bize diyabetik hayvanlardaki kopulasyon organlarında bozukluklar olduğunu gösterir (Steger et al. 1989). Steger (1990)' da göstermiştir ki STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda plazma testesteron düzeyleri düşmüştür fakat bu tek başına seksüel davranışlardan sorumlu değildir.

STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda aynı zamanda, seksüel olgunlaşma sırasında değişen epididimal epitelin kuruluş ve bakımına zararlı etkileri vardır (Soudamani et al. 2005).

Kim ve Moley (2008) çalışmasında, normal sperm grubunda %88.8 oranında fertilizasyon oranı gözlemiş, %71.7 oranında döllenmiş embriyolar blastokist aşamasına ulaşmıştır. Diğer taraftan, STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerde fertilizasyon oranı anlamlı derecede düşmüştür ve döllenmiş embriyoların sadece %50' si blastokist aşamasına ulaşmıştır. Esasında, kontrol grubu oositleri STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerin spermileriyle döllendiğinde embriyolarda yarıklanma aşamasında fragmantasyon ve kötü kalitede embriyo gelişimi gözlenmiştir.

Diyabetik bireylerde oksidatif stres reaktif oksijen ürünlerinin artması ile artmıştır ve antioksidanlara karşı koruma gücü azalmıştır (Wiernsperger, 2003). Mitokondriyal

DNA mutasyonları diyabetik dokularda artmıştır. Bunun oksidatif stres sonucu meydana geldiği düşünülür (Lee et al. 1997).

STZ ile diyabet oluşturulmuş erkek farelerde IVF oranı oksidatif stres sonucu ölü spermelerin meydana gelmesiyle azalır. Bu farelerden elde edilen spermle döllenmiş oositlerde fragmantasyon ve kötü kalitede embriyo gelişimi gözlenir. Diyabet sonucu azalan spermatogenezis, sperm hareketi ve spermelerin fertilizasyon kapasitesi diyabetlilerde düşmüştür (Kim and Moley, 2008).

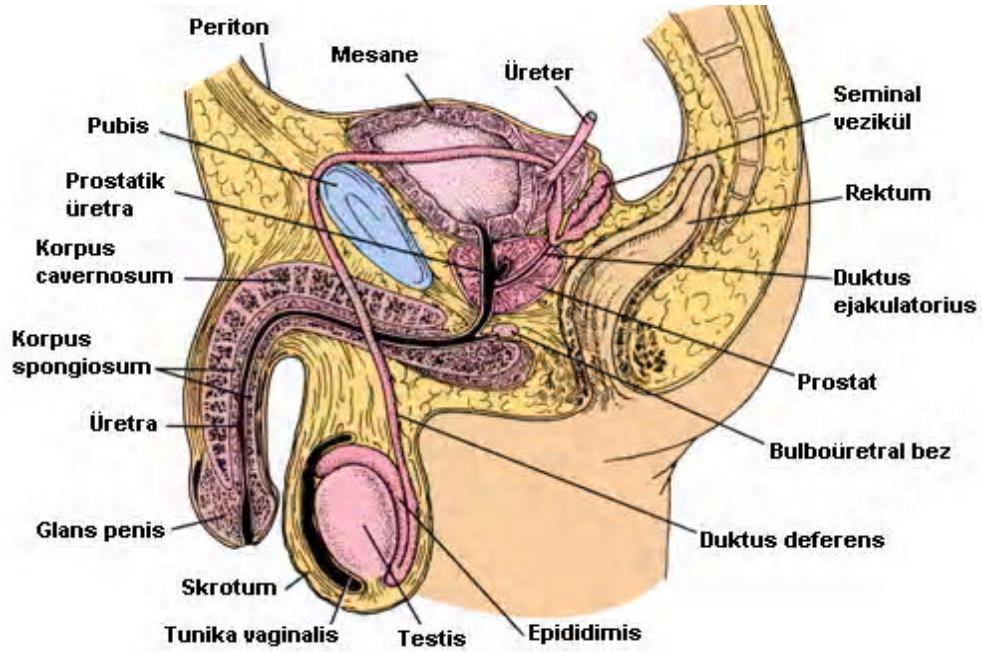
Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda diyabetin, sperm morfolojisi ve motilitesini nasıl etkilediğini ayrıca diyabetik spermle döllenmiş embriyoların fertilizasyon kalitesi üzerine etkilerini incelemek amaçlanmaktadır. Çalışmamız kendi alanında, diyabetle ilişkili sperm ve embriyonun gelişimine dair yol gösterici ve ilgi uyandıran bir çalışma olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sisteminin majör olarak 2 önemli işlevi vardır. Birincisi erkek gametin yani spermin üretimini, beslenmesini ve geçici olarak depolanmasını sağlar. İkincisi erkek seks hormonlarını yapımı ve salgılanmasından sorumludur.

Erkek üreme sistemi; sperm üreten, sentezleyen ve androjenleri salgılayan testislerden, salgıları semen kitlesini oluşturan ve spermatozoona besinler sağlayan prostat bezi, seminal vezikül ve bulbo üretral bezler gibi yardımcı bezlerden, dışarıya spermatozoon taşınmasından sorumlu olan, dış kanallar sistemini oluşturan genital boşaltım kanalları vaz deferens, epididimis, ejakülatuar kanal ve erektil dokudan oluşan penisten oluşur.

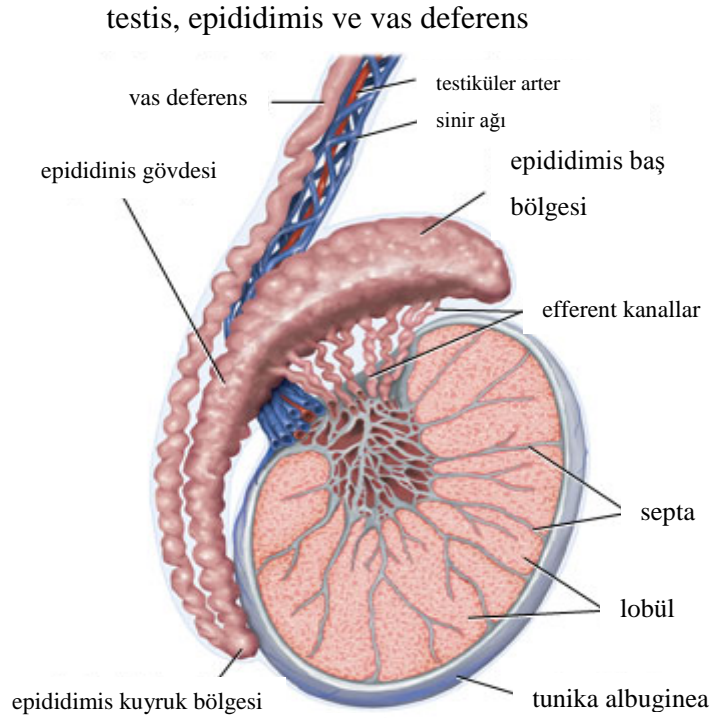


Şekil 2.1. Erkek Üreme Sistemini oluşturan yapıların şematik çizimi (Koyuncu, 2008).

### 2.1.1. Testisler

Testisler; karın boşluğu dışında bulunan skrotum içinde yer alan bir çift organdır. Bu konumları testislerin vücut ısısından 2-3 derece düşük olmasını sağlar. Bu da normal spermatogenezin verimli olarak gerçekleşmesi için gereklidir. Testislerin içinde bulunduğu skrotum, epidermisi çok pigmentli olan ince bir deri tabakasıdır. Erişkinde kıllara bağlı olmayan serbest yağ bezleri, merokrin ve apokrin ter bezleri ve seyrek kıllar içerir (Erkoçak, 1990; Tekelioğlu, 2002).

Testis, tunika albuginea ile çevrelenir. Arka yüzünde tunika albuginea kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur ve buradan bezin içine giren fibröz uzantılar testisi 250-300 adet piramidal lopçuğa böler. Her bir lopçuk bir ila dört arası seminifer tübül içermektedir (Junqueira and Carneiro, 2009).



**Şekil 2.2.** Testisin içi ve erkek üreme sistemine ait kanallar

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/173003/ductus-deferens>

### 2.1.1.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübül; seminifer epitelyum ile döşeli altında tip I kollajen ile fibroblastların bulunduğu bağ dokusundan oluşur. Seminifer epitel adı verilen karmaşık yapıda çok katlı bir epitel tabakası ile döşelidirler. Bir tübülün toplam uzunluğu 30-70 santimetre arasındadır. Bu tübüller ileri derecede kıvrımlıdır ve uçlarına doğru daralarak düz tübüller (tubuli rekti) adını alır. Bu tübüller seminifer tübüleri rete testise bağlar. Sperm, rete testisten eferent kanallar (duktuli eferents) adı verilen yaklaşık 12 kısa tübüle girer. Böylece sperm epididimisin baş kısmına ulaşır (Moore and Dalley, 1995; Kierszenbaum, 2006; WHO, 2002).

Seminifer tübüllerin merkezi bir lümeni vardır ve iki belirgin hücre popülasyonundan meydana gelmiştir. Bunlar; (1) Somatik Sertoli Hücreleri ve (2) Spermatogenik Hücrelerdir.

#### (1) Somatik Sertoli Hücreleri;

Bazal laminadan lümeneye doğru uzanan hücrelerdir. Bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır, sitoplazmaları eozinofiliktir ve çekirdekçik belirgindir (Erkoçak, 1990; Tekelioğlu, 2002). Mitotik aktiviteleri olmadığı için çoğalamazlar.

Komşu sertoli hücreleri bazal membrana yakın alanda birbirlerine sıkı bağlantılar ile bağlanmıştır. Bu sayede kan-testis bariyeri oluşur. Bu bariyer immünolojik koruma sağlar. Sertoli hücreleri ayrıca spermatogenik hücrelerinin beslenmesinde görev alır ve mekanik destek vererek hücrelerin lümeneye doğru hareketine aktif olarak katılırlar. Ayrıca spermiyogenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma artıklarını fagosite ederler.

Sertoli Hücreleri anti-müllerian hormon, androjen bağlayıcı hormon, inhibin ve aktivin salgılar.

-Anti-müllerian hormon; embriyo gelişiminde salgılanır. Müller kanalının oluşumunu baskılar. Böylece embriyo gelişimi erkek olarak tayin edilir (Gartner and Hiatt, 2001).

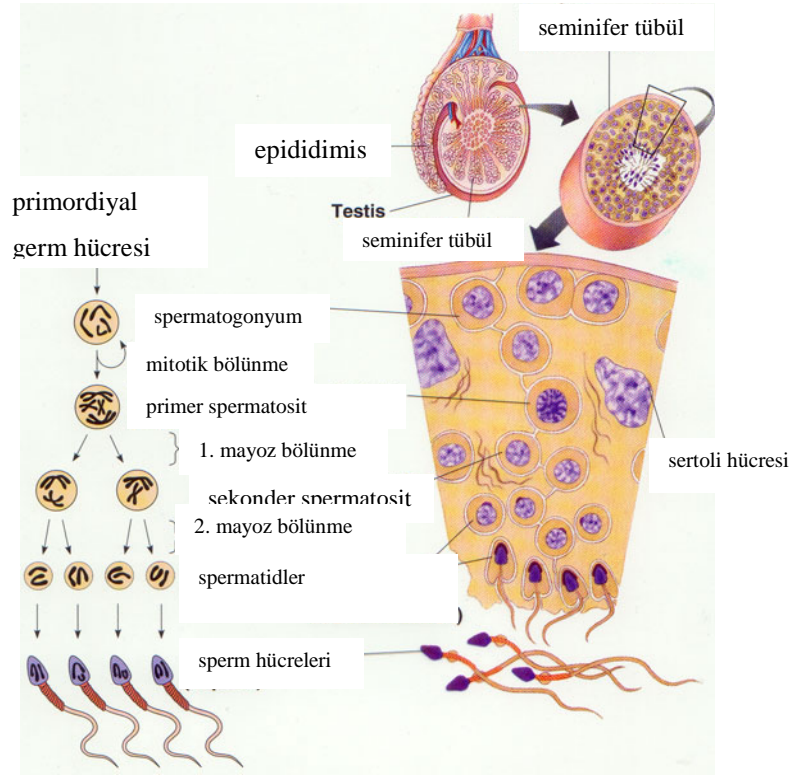
-Androjen bağlayıcı hormon; leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine oradan da epididimise iletilmesine yardımcı olur (Gartner and Hiatt, 2001; Waart et al. 2006).

Hipotalamustan salgılanan GnRH hormonu hipofizden FSH ve LH hormonunun salgılanmasını sağlar. LH hormonu leydig hücresinden testosteron salgılanmasını artırırken hipofizden salgılanan FSH hormonu seminifer tübüllerde sperm üretimini sağlar. FSH

hormonunun etkisiyle testislerdeki sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin isimli hormonlar salgılanır.

-İnhibin; Hipofizden FSH hormonu salgılanmasını azaltır.

-Aktivin; Hipofizden FSH hormonu salgılanmasını artırır.



**Şekil 2.3.** Seminifer tübüldeki spermatojenik hücreler ve sertoli hücresi  
<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>

## (2) Spermatojenik Hücreler

Spermatojenik hücreler seminifer tübül epitelinin büyük çoğunluğunu oluşturan hücrelerdir. Bu hücreler bazaldan lümeneye doğru farklılaşır ve olgunlaşmanın evreleri sıralanırlar. Bu sıra; spermatogonium, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatid ve spermatozoon şeklindedir (Özdamar, 2002).



### 2.1.1.2. Spermatogenez

Spermatogonyumdan spermatozoon oluşumuna kadar erkek eşey hücrelerinin gösterdiği histolojik süreç spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatositogenez, mayoz bölünme ve spermiyogenez olmak üzere birbirini takip eden üç evreye ayrılır (Gartner and Hiatt, 2001).

-Spermatositogenez: Spermatogoniumların mitozla çoğalması ve primer spermatozoonlara farklılaşması dönemidir.

-Mayoz Bölünme: Primer spermatozoonun birinci mayoz bölünmeyi geçirmesiyle sekonder spermatozoon; sekonder spermatozoonun da mayozun ikinci olgunluk bölünmesini göstermesiyle spermatidler meydana gelir.

-Spermiyogenez: Spermatidler belirgin hücresel değişikliklere uğrayarak spermatozoonlara dönüşürler.

Hücreler birbirleriyle spermatogoniumdan itibaren sitoplazma köprüleriyle bağlantılıdır. Spermatozoonun lümene atılmasına kadar sitoplazma devamlılığı devam eder. Böylelikle hücreler birbirleriyle iletişim halinde kalır ve eşzamanlı gelişim görülür (Gartner and Hiatt, 2001).

Erkek eşey hücrelerinin spermatozoon olana kadar geçirdiği süreç şu şekildedir;

Spermatogonyumlar; Spermatogonyal kök hücrelerden köken alan diploid germ hücreleridir. Bu hücreler puberteden itibaren testosteron etkisiyle başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler (Sermin, 1990). İki temel spermatogonyal hücre tipi gözlenmektedir. Bunlar; (1) tip A spermatogonyum ve (2) tip B spermatogonyum. Germinal epitelin bazal membranına komşu yerleşimli Tip A spermatogonyum denilen ilkel spermatogonyum 4 kez mitozla bölünerek 16 adet, daha farklılaşmış hücreler olan Tip B spermatogonyumu meydana getirir. B tipi spermatogonyumlar, primer spermatozoonlara farklılaşan öncül hücrelerdir. Ortalama 24 günlük bir süre sonra Sertoli hücre bariyerini geçen her spermatogonyum mitoz bölünmeler geçirir ve primer spermatozoonu oluşturur.

Primer Spermatozoonlar; Spermatozoon serinin en büyük hücreleridir. Diploid sayıda kromozom içerir ve spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle oluşur. Çekirdekleri iri, vesikül görünümündedir (Gartner and Hiatt, 2001).

Sekonder spermatozoonlar; Haploid sayıda kromozom içerirler. 24 günün sonunda primer spermatozoonlar birinci mayoz bölünmeyi geçirir ve her bir primer spermatozoonun iki sekonder spermatozoonu oluşur.

Spermatidler; Haploid sayıda kromozom içeren, sekonder spermatositlerin mayozun ikinci olgunluk bölünmesi sonucu oluştur ve küçük, yuvarlak hücrelerdir. Kuyrukları geliştikçe bunlar sertoli hücrelerinin apikal kısımlarında çıkıntılar şeklinde görülür (Karacagil, 2002). Spermiyogenez sonunda spermatidler olgun germ hücreleri olan spermatozoonlara dönüşürler.

### **Spermiyogenez**

Spermiyogenez; sperm üretilmesinin son aşamasıdır ve ovuma erkek DNA' sını aktarmak için geçirilen spermatazoon dönüşme süreci olarak adlandırılır. Bu süreçte hücre bölünmesi meydana gelmez.

Spermatidlerin yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları vardır ve boyutları küçüktür. Spermiyogenez; akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bölümünün kaybolmasını içeren bir süreçtir. 3 evreye ayrılır:

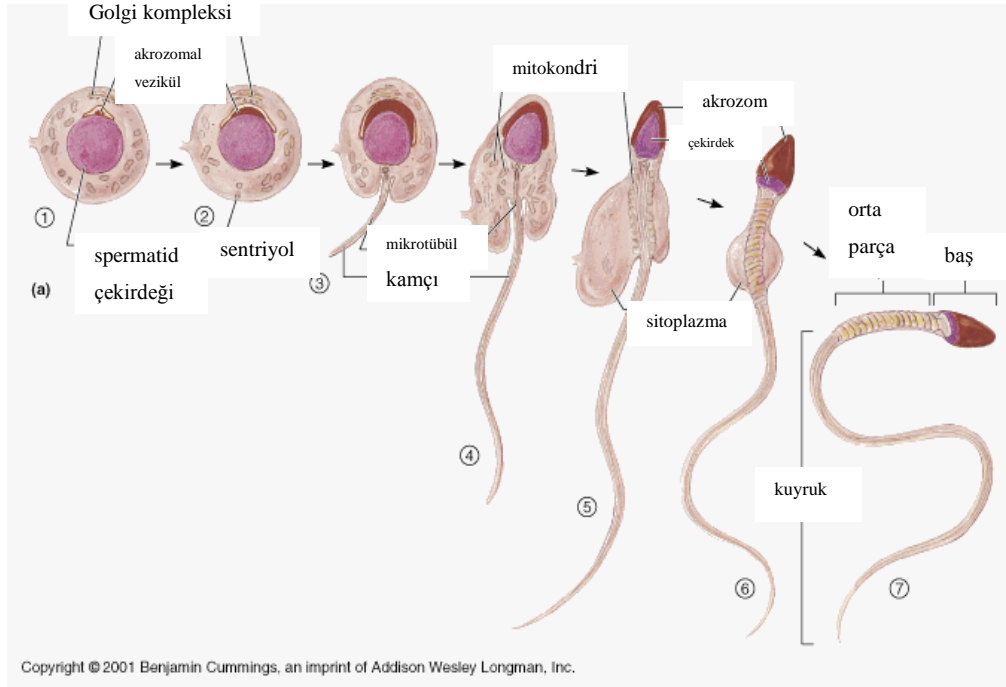
**(1)Golgi Fazı:** Spermatid sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir golgi kompleksi, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar, mitokondriler ve düz endoplazmik retikulum tübüllerini ihtiva eder. Granüler endoplazmik retikulum (GER) ile üretilen hidrolitik enzimler Golgi kompleksine gelir ve burada zarla çevrili küçük proakrozomal granüller adı verilen küçük ve PAS pozitif granüller birikir. Bu proakrozomal granüller birleşir ve tek bir akrozom granülü oluştururlar.

Bu sırada sentriyoller hücrenin ters kutbuna doğru hareket eder. Arka arkaya durarak proksimal ve distal sentriyolleri yaparlar (Gartner and Hiatt, 2001; Waart, 2001).

**(2)Akrozomal Faz:** Akrozom vezikülü ve granülü yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplar ve akrozom adını alır. Akrozom, asit fosfataz, nöraminidaz, hiyalüronidaz, ve proteaz gibi hidrolitik enzimler içermesiyle özel bir lizozom olarak işlev görür. Bu enzimler yumurta çevresindeki korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirir. Spermatozoonların bir yumurta hücresi ile karşılaştıklarında akrozom enzimlerinin hücre dışına boşlatmasıyla akrozomal reaksiyon gerçekleşir. Spermiyogenez olayında akrozom oluşmasının ardından kromozom hacmi ve çekirdek hacmi azalır. Çekirdek yassılaşır, türe özgü seklini alır. Aynı zamanda mitokondriler çekirdeğin hemen altında aksonemayı silindirik şeklinde sarar. Sonuçta kamçı şekillenir (Gartner and Hiatt, 2001). Kamçının proksimal kısmı etrafında mitokondriyumlar toplanır ve orta parçayı oluşturur. Bu bölge sperm hareketleri için enerji kaynağıdır. Kamçı hareketlerinin kaynağı

ise dinein adlı ATPaz aktivitesine sahip bir protein, ATP ve mikrotübüllerdir. Akrozom granülü vezikülün içini doldurur ve akrozomun yapımı tamamlanır (Tekelioğlu, 2002).

**(3)Olgunlaşma Fazı:** Sertoli hücresi ile bağlantı bozulur, olgunlaşan spermatozonlar tübülün lümenine bırakılırlar. Artık sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Erkoçak, 1990; Özdamar, 2002).



**Şekil 2.4.** Erkek Üreme Sistemini oluşturan yapıların şematik çizimi  
<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes2%20spermatogenesis.htm>

### 2.1.1.3. Spermatozoon

Olgun erkek üreme hücreleridir. Erişkin insan spermi yaklaşık 50-70  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır. Baş, boyun kısmı, orta parça ve kuyruktan oluşmaktadır. (Gartner and Hiatt, 2001)(6).

**Baş;** Çekirdek ve akrozomdan oluşan spermin baş kısmı, yoğunlaşan çekirdeği taşır. Sperm başı farklı memeli türlerinde çeşitlilik gösterir. Akrozom zarla çevrilidir ve çekirdeğin 2/3'lük ön kısmını saracak şekilde başın ön kısmına yerleşmiştir (Snell, 1998). Akrozom glikoprotein yapısındadır ve eritici enzimler içerir.

**Boyun kısmı;** Bu bölge başı kuyruğa bağlar ve kısadır. Bir çift sentriyol içerir. Distal sentriyolden çıkan mikrotübüller 9+2 şeklinde düzenlenerek aksonemayı yaparlar. Aksonemanın çevresi yoğun fibröz yapıda halkalarla çevrilidir. Bölgede sitoplazma artığı şeklinde fazla sitoplazma kısımları gözlenir.

**Orta parça;** Bu parça spermatozoona enerji sağlayan, dairesel düzenlenmiş mitokondri içerir. Bu bölümün yapısı bütün memeli türlerinde aynıdır. 5-7 µm uzunluğundadır.

**Kuyruk;** Esas parça ve son parçadan oluşmaktadır

**Esas parça;** Kuyruğun en uzun bölümüdür ve yaklaşık 45 µm'dir. Aksonema ve dış lifler burada da devam eder. Bunların dışında enine bu parçayı çevreleyen fibröz yapıda halkalar vardır.

**Son parça;** Fibröz kılıfın sonlandığı kuyruk kısmıdır. 5-7 µm uzunluğundadır. Sadece aksonemden oluşur. Bu nedenle silyuma benzer (Hassa, 2003).

#### **2.1.1.4. İnterstisyel Doku**

İnterstisyel (testisin ara dokusu) dokunun içerisinde; leydig hücreleri, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenşim hücreleri, fibroblastlar, lenf damarları, sinirler ve bol kılcal damarlar bulunur (Erkoçak, 1990; Tekelioğlu, 2002). Kütlesinin yaklaşık %25-30'unu gevşek bağ doku oluşturur.

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki üçgenlerde gruplanırlar. Testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından sorumludurlar. Üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir (Erkoçak, 1990; Tekelioğlu, 2002). Leydig hücrelerinin nöroendokrin ve parakrin fonksiyonlara sahiptir. Parakrin salgılarına oksitosin, b-endorfin, substans-P örnek olarak verilebilir. İki çekirdekli olabilirler. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikuluma sahiptirler. Ayrıca golgi kompleksi, asidofil sitoplazmalarında yağ damlacıkları ve tübüler tip kristal mitokondriler de içerirler.

#### **2.1.2. Yardımcı Genital Bezler**

Yardımcı genital bezler; prostat bezi, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerdir.

Prostat bezi; 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezden oluşur. Prostat bezi, prostat sıvısını üretir ve bu sıvıyı ejakülasyon sırasında fırlatır.

Seminal veziküller; sarımsı renkte ve visközdür. Spermatozoonları aktive eden prostaglandin, inozitol, sitrat ve çeşitli proteinleri içeren salgı üretmektedir.

Bulboüretal bezler; bu bezin salgısı, kayganlaştırıcı işlev gören berrak bir mukustur.

#### **2.1.3. Genital Boşaltım Kanalları**

Bunlar testiste üretilen spermatozoonları penise doğru taşıyan kanallar olan duktus epididimis, duktus deferens ve üretra' dır.

Duktus epididimis, oldukça kıvrımlı bir kanal olup, spermin kanallara ilerlemesine yardım eder. Aynı zamanda duktus epididimisin yalancı çok katlı stereosilyalı prizmatik epiteli, spermatogenez sırasında oluşan artık cisimleri sindirmeye yardımcı olur. 3 bölüme ayrılır; kaput (baş), korpus (gövde), kauda (kuyruk) (Fawcett, 1962).

Duktus deferens, kalın duvar ve düz kas tabakası içeren epididimisi takip eden kanaldır. Duktus deferensin kalın düz kas tabakası, ejakulasyon sırasında spermatozoonların fişkirtülmesini sağlar.

Prostatik üretra ise; duktus deferensin prostata açıldığı bölgedir.

#### **2.1.4. Penis**

Penis; üç erektil doku kitlesi ve üretrayı içermektedir. Dıştan deri tabakası ile sarılmıştır. Bu silindirlerden ikisi penis korpus kavernozumları, üçüncüsü ise ventral olarak yerleşen korpus spongiyozum olarak isimlendirilir. Korpus kavernozumları, tunika albuginea adı verilen tıkız bağ dokusu ile çevrilidir.

Penisin arteriyel kan akımı iç arterlerden gelir. Bunlardan penisin derin ve dorsal arterleri çıkar.

Penisin ereksiyonu, penisin arteriyel kaslarının aldıkları sinirsel uyarılar ile penisin damar boşluklarının duvarlarındaki düz kasların kasılması ile kontrol edilir. Penis yumuşak durumda iken kan akımı çok azdır. Parasempatik uyarılar, kavernöz düz kasın ve penil damarların gevşemesini sağlar ve ereksiyon oluşur. Kavernöz boşluklarda ve penil arterlerdeki bu genişleme sonucu kan akımında artış meydana gelir ve penis sertleşir.

Ejakülasyon ve orgazmdan sonra parasempatik aktivite azalır ve penis yumuşak haline geri döner.

#### **2.2. Dişi Üreme Sistemi**

Dişi üreme sistemi 2 ovaryum, 2 tuba uterina (ovidukt, fallop tüpleri), uterus, vajina ve dış genital organlardan oluşur.

##### **2.2.1. Ovaryum**

Ovaryum; dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki farklı katmandan oluşmuştur. Kortekste, primordiyal foliküllerden Graaf foliküllerine kadar değişik gelişim aşamalarındaki yumurta bulunur. Daha alttaki medulla tabakası ise kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusundan oluşur.

Embriyonik hayatın birinci ayından sonra primordiyal germ hücreleri (oogonyumlar) vitellüs kesesi endoderminde ortaya çıkarlar. Bu hücreler birkaç defa mitoz

bölünme geçirirler. Fetal hayatın beşinci ayına kadar mitoz bölünmeler devam eder. Bu süreç itibariyle her bir ovaryum 3 milyonun üzerinde oogonyum ihtiva eder. Bazı oogonyumlar fetal hayatın üçüncü ayından itibaren birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Böylece primer oositler haline gelirler. İnsan fetusunda bu süreç gebeliğin yedinci ayının sonuna kadar devam eder. Bu dönem içinde birçok primer oosit “atrezi” denilen dejenerasyon süreci ile ortadan kaybolur.

Erişkin, normal bir kadının iki ovaryumundaki toplam folikül sayısı yaklaşık 400.000 kadardır. Bu foliküllerin önemli miktarı kadının doğurganlık süreci boyunca atreziye uğrar.

Ovaryum folikülleri; bir folikül ile bunları çevreleyen bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş granuloza hücreleriyle (folikül hücreleri) çevrili bir oositten meydana gelir.

A- Primordiyal Foliküller: Tek sıra yassı folikül hücreleri ile çevrili primer oositten oluşur. En çok doğum öncesi döneminde bulunur.

B- Büyümekte Olan Foliküller: Folikül hücreleri mitozla çoğalarak çok katlı granuloza tabakasını oluştururlar. Bu foliküller “Primer folikül” olarak isimlendirilir. Foliküller büyüdükçe granuloza hücrelerinin arasında folikül sıvısı toplanmaya başlar. Bu sıvılar birleşerek “antrum” adını verdiğimiz tek bir boşluk meydana gelir. Dış kısmında ise folikülün bitişiğinde folikülü çevreleyen stroma farklılaşarak “teka interna” ve “teka eksterna” tabakalarını oluşturur. Bu özelliklerinden dolayı bu foliküle “sekonder folikül” adı verilir.

C- Olgun Foliküller: Ovum etrafındaki granuloza hücreleri zona pellusidaya doğru uzayarak “korona radiata” yı oluşturur. Bu tabaka ovum ovaryumu terk ederken ona eşlik eder.

### **2.2.2. Fallop tüpleri**

Büyük hareketlilik gösteren, müsküler özellikteki bir kanaldır. Bir ucu uterusun iç kısmına, diğer ucu ovaryum yakınında periton boşluğuna açılır. Serbest ucu çok sayıda parmaksı uzantılardan oluşan “fimbriya” denilen saçaklanma gösterir.

Fallop tüplerinin duvarı üç tabakadan yapılmıştır. Bunlar; mukoza, muskularis ve visseral peritondan oluşan serozadır. Mukoza, en çok ampulla bölgesinde katlantılar içerir. Mukoza epitelindeki silyalar ve bunların arasına serpiştirilmiş seketuvar hücreler ovum için koruyucu ve besleyici özellik gösterirler. Bu bölge, ovum veya zigotun uterusu doğru yönelimine yardım eder. Buna ilaveten spermin kapasitasyonuna yardımcı olurlar.

Fallop tüpleri, ovaryum tarafından serbest bırakılan ovumu yakalayarak uterusu doğru taşır.

### **2.2.3. Uterus**

Gövde (korpus) ile serviksten oluşan bir organdır. Fallop tüplerinin uterusu girdiği bölgenin yukarısında kalan gövde bölümüne “fundus” adı verilir. Uterus duvarı dışta bulunan perimetriyum, uterusun farklı bölümlerine göre ya seroza (bağ dokusu ve mezotel) ya da adventisyadan (bağ dokusu) yapılıdır. Diğer uterus katmanları ise, kalın bir düz kas tabakası olan miyometriyum ile endometriyum ya da uterus mukozasıdır.

### **2.2.4. Vajina**

Vajina (Latince, kılıf anlamına gelir) duvarında bezler yoktur ve üç tabakadan oluşur: Tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya. Erişkin bir kadında vajina mukozasının epiteli çok katlı yassı epiteldir. Hücreleri az miktarda keratohiyalin içerebilir. Vajinadaki asidik ortam bazı patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir etki sağlar. Vajinanın kas tabakası birbirlerinden kesin bir sınırla ayrılmayan iki düz kas tabakasından oluşur. Tunika adventisya, kalın elastik liflerden zengin tıkkız bağ dokusundan oluşur ve vajinayı çevre dokularla birleştirir.

### **2.2.5. Dış Genital Organlar**

Dış genital organlar diğer adı ile “vulva”; labia minörler, labia majörler, klitoris ve bazı bezlerden meydana gelmiştir.

Klitoris ve penis, histolojik yapı ve embriyonik köken bakımından birbirinin eşidir. Klitoris çok tabakalı yassı epitel ile örtülüdür. Küçük dudakların iç ve dış yüzeylerinde yağ ve ter bezleri bulunur. Büyük dudaklar, bol miktarda yağ dokusu ve ince bir düz kas tabakası içeren deri katlanmalarıdır. Dış genital organlarda, cinsel uyarılma fizyolojisine katkıda bulunan Pacini ve Meissner cisimcikleri gibi çok sayıda duysal sinir sonlanmaları bulunur (Junqueira and Carneiro, 2009).

## **2.3. Fertilizasyon**

Fertilizasyondan önce meydana gelen iki olay sperm maturasyonu ve dişi üreme kanallarında sperm kapasitasyonudur.

Sperm epididimisi geçerek kuyruğa yakın bölgesinde depolanmayı içeren iki haftalık olgunlaşma sürecini tamamlayarak döllenme için gerekli olan ileri hareket kabiliyetini kazanır. Ejekulasyondan sonra uterusu kapasitasyon sürecine giren sperm, fallop kanalında oositin fertilizasyonunu gerçekleştirir.

Fertilizasyon yeteneğine sahip sperm hem maturasyonunu hem de kapasitasyon sürecini sperm-oosit füzyonundan önce tamamlamalıdır. Kapasitasyon in vitro koşullarda meydana gelebilir ve in vitro fertilizasyon gerçekleşebilir.

Fertilizasyon süreci akrozom reaksiyonu, ZP3 bağlanması ve sperm-oosit füzyonu olarak üçe ayrılır.

Akrozom reaksiyonu ile korona radyataya yaklaşan sperm, akrozomal içeriğin salınmasıyla akrozom reaksiyonunu gerçekleştirir. Hiyalüronidaz enziminin rol oynadığı bu reaksiyonda korona radyata hücreleri arasındaki materyal erir.

Bu olaydan sonra sperm zona pellusidaya ulaşır. Zona pellusidanın üç glikoproteininden biri olan ZP3' e bağlanır. Bu bağlanmada akrozim adında, sperm başının zonaya girişini kolaylaştıran, iç akrozomal membrandan salınan enzimin salınımı gerçekleşir.

Bunların neticesinde zona pellusidayı geçen ilk sperm, oositin plazma membranıyla birleşir ve plazma membranı altındaki kortikal granüllerin  $Ca^{+2}$  bağımlı ekzositozunu uyarır. Plazma membran füzyonu hücre yüzey molekülü olan disintegrin tarafından uyarılır.

## **2.4. İnfertilite**

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide (haftada iki gün) bulunmasına rağmen gebe kalamamasıdır (Kışnişçi ve ark. 1996). Üreme çağındaki çiftlerde infertiliteye rastlanma oranı yaklaşık %10-15' tir. İnfertilitenin nedenleri ve sıklıkları toplumlara göre farklılık göstermektedir. Çiftlerin % 40-50' sinde kadın, % 30-40' mndan erkek, % 10-15 çiftte ise mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (Kışnişçi ve ark. 1996; Shoham et al. 1991).

Günümüzde infertilitenin değişik etmenlerden dolayı hızlı bir şekilde artmasıyla bilim adamlarının ilgisi bu yöne doğru kaymış ve bu yönde değişik teknikler geliştirmişleridir. Bununla paralel yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesi, medyanın yardımıyla üreme teknikleri hakkında bilgilendirdiği çiftlerin sayısındaki artış ve de bu konuyla ilgili yardım arayışı içinde olan çiftlerin başvurularındaki artışta bu tekniklerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Ayrıca 30 yaşından sonra kadınların infertilite oranının hızla arttığı da bilinmektedir (Speroff et al. 2007).



İnfertiliteye çare olarak geliştirilen yardımcı üreme teknikleri; Intra Uterin Insemination (IUI), Gamete Intrafallopian Transfer (GIFT), Zygote Intrafallopian Transfer (ZIFT), Tubal Embriyo Transferi (TET), In Vitro Fertilization (IVF), Partial Zona Dissection (PZD), Subzonal Sperm İnseminasyonu (SUZI) ve İntrastoplazmic Sperm İnjeksiyonu (ICSI)’ dur. Bunlardan IVF en sık kullanılan yöntemdir.

#### **Intra Uterin İnseminasyonu (IUI);**

İnfertilite olgularında ilk tedavi seçeneği olarak kullanılan, düşük maliyetli fakat etkili bir yöntemdir (Alıcı ve ark. 2000; Kılıç ve ark. 2005).

IUI; Uterus içine, oosite yakın bir yere, bir kanül vasıtası ile laboratuvar ortamında işleminden geçirilmiş kaliteli spermlerin bırakılmasıdır (Akyüz, 2003; Dikencik, 2001; Günalp ve Yücel, 2006). Böylece konsantre ve motil spermler fertilizasyon için doğal konumunun yakınına yerleştirilmiş olur (Dikencik, 2001; Günalp ve Yücel, 2006).

#### **Gamet Intra Fallopian Transfer (GIFT);**

Sperm ve oositin tubanın ampullasına yerleştirilerek fertilizasyon oluşturulması esasına dayanır. En az bir adet normal fallop tüplerine ihtiyaç vardır. IVF’ ten farkı fertilizasyonun in vivo olmasıdır böylece fertilizasyon doğal ortamda gerçekleşmiş olur (Dikencik, 2001).

#### **Zigot Intra Fallopian Transfer (ZIFT);**

Başarısız GIFT uygulamalarında, oositlerin döllenmediği ve ağır erkek infertilitesi gibi fertilizasyonun azaldığı durumlarda tercih edilir. Tek dezavantajı hastanın iki kademeli operasyon geçirmek zorunda oluşudur (Demircan ve ark. 1992; Dikencik, 2001).

#### **Tubal Embriyo Transferi (TET);**

4-8 hücre sayısına ulaşmış döllenmiş yumurta fallop tüplerine bırakılır. Spermin direkt olarak sitoplazma içine yerleştirilmesi esasına dayanır.

#### **In Vitro Fertilizasyon (IVF);**

IVF yöntemi, laboratuvar ortamında yumurta ve spermin döllenmesi demektir. Bir ya da daha fazla yumurta ultrasonografi eşliğinde, iğne vasıtasıyla ve anestezi altında yumurtalıklardan toplanır. Erkeğin spermleri ile laboratuvar ortamında döllendirildikten sonra döllenmiş embriyolar bir katater yardımı ile yaklaşık 3-5 gün sonra ana rahmine verilir.

IVF yönteminin aşamaları; foliküllerin geliştirilmesi, yumurtaların toplanması, spermlerin hazırlanıp yumurtaların döllendirilmesi, gerekliyse embriyo zarının inceltmesi (assisted hatching yöntemi) ve embriyoların transferidir.

Başlangıçta sadece tubal faktörlere bağlı infertilitesi olan hastalar için kullanılan bu teknik, günümüzde endometriyozis, peritoneal faktör, erkek faktörü, açıklanamayan infertilite, immunolojik faktörler için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Dikencik, 2001; Günalp ve Yücel, 2006).

Şiddetli erkek infertilitesinde ve konvansiyonel IVF uygulamalarında sonuç alınamayan durumlarda kullanılmak üzere mikromanüplasyon teknikleri şunlardır:

**Partial Zona Dissection (PZD):** Spermin oosite ulaşabilmesi için zona pellusidada spermin geçebileceği bir açıklık oluşturulduktan sonra oositin insemine edilmesidir (Kişnişçi ve ark. 1996).

**Subzonal Sperm İnseminasyonu (SUZI):** Spermlerin zona pellusida bariyerini aşarak direk olarak perivitellin aralığa bırakılmasıdır (Kişnişçi ve ark. 1996).

#### **Intrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI):**

Tek bir spermin çok ince bir pipet yardımıyla oosit sitoplazmasına enjekte edilmesidir. Günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk kez Lazendorf ve arkadaşlarınca 1988 yılında yapılmış, ilk insan gebeliğine ise 1992 yılında Palermo ve arkadaşlarınca ulaşılmıştır (Güenalp ve Yücel, 2006).

Aynı zamanda geliştirilen diğer teknolojiler de; testislerden sperm çıkartılması; TESE, mikroskopik epididimal sperm aspirasyonu; MESA, yardımcı embriyo tutunma tekniği (assisted hatching) ve implantasyon öncesi genetik tanı (PGD)' dir.

#### **2.4.1. İnfertilite nedenleri**

İnfertilite nedenleri; biyolojik faktörler, yaşam biçimi faktörleri, çevresel faktörler ve fiziksel faktörler olmak üzere dört temel kısımda ele alınır. İnfertilite en sık fiziksel faktörlere bağlı olarak gözlenir. Bunlar; ovulatuvar bozukluk, tubal ve peritoneal faktörler ve erkek faktörleridir. Bunların sıklığı yaşla birlikte değişmektedir. Genç kadınlarda ovulasyon bozuklukları çok siktir, tubal ve peritoneal patoloji genç ve yaşlılarda eşit sıklıktadır. Erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite yaşlı çiftlerde daha sık olarak görülmektedir.

**Çizelge 2.1.** Fiziksel İnfertilite Nedenleri (Miller et al. 1999)

1. Kadına ait nedenler (% 40-45)
Ovulatuvar (% 30-40)
Tubal/Peritoneal Faktör (% 20-40)
Servikal ve İmmünolojik Faktörler (% 1-2)
Diğer
2. Erkeğe ait nedenler (% 30-40)
3. Açıklanamayan (% 10-15)

**2.4.1.1. Biyolojik Faktörler**

**Yaş**

Kadın doğurganlığı menarşla birlikte başlar, yirmili yaşlarda zirveye ulaşır, menepoza kadar yavaş yavaş azalır ve menepozla sonlanır. Yaşla birlikte erkeklerde sperm kalitesi, dişilerde ise oosit sayısı ve kalitesi düşmektedir. Gebeliklerini otuzlu yaşlardan sonraya erteleyen kadınlarda fertilitedeki azalmaya bağlı olarak gebelik şansı da azalır (Akyüz, 2003; Dicker ve ark. 1991; Erdem ve Yıldırım, 2003; Eskenazi et al. 2003, Montella et al. 2000; Orshan, 2008; Plas et al. 2000).

**Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar**

Birden fazla cinsel partneri olan insanlar, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar açısından risk altındadır. Pelvik enfeksiyonlara müdahale edilmezse zamanla fallop tüpleri tıkanabilir veya daralabilir böylelikle fertilizasyon azalabilir (Coskun ve ark. 2005; Orshan, 2008).

Afrika; infertilite oranının en yüksek olduğu ülkelerin başını çekmektedir. Burada yapılan bir çalışmada, HIV enfeksiyon oranının infertil kadınlarda fertil kadınlara oranla önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Favot et al. 1997).

**Genetik Faktörler**

Genetik faktörler de infertiliteye neden olabilmektedir. Örneğin erkekte Klinefelter sendromu ve kistik fibrozis genetik kökenlidir. Kistik fibrozis bilateral vas deferens yokluğu ile ilgilidir. Kadında ise Turner adı verdiğimiz X kromozomlarından birinin bozuk ya da olmamasına bağlı olarak gelişen sendrom infertiliteye neden olmaktadır (Koşar ve Özçelik, 2007; Orshan, 2008; Şahin, 2006).

#### **2.4.1.2. Yaşam Biçimi Faktörleri**

Obezite; erkekte testesteron seviyesinde ve de semen kalitesinde azalmaya, kadında ise polikistik over sendromuna neden olarak infertiliteyi olumsuz yönde etkilemektedir (Kort ve ark. 2006; Renato ve ark. 2008).

Ayrıca sigara kullanımıyla da fertilitate olumsuz yönde etkilenmektedir. Üstelik kalp, akciğer ve kan damarları da alkol, sigara gibi bireyin yaşam kalitesini etkileyecek seçimler sayesinde olumsuz yönde etkilenir (Joesoef, 1994; Laurent, 1992; Orshan, 2008).

#### **2.4.1.3. Çevresel Faktörler**

Sıcaklık, travma, ışın gibi fiziksel çevre koşulları fertilitate karşı önlem alınmadığı takdirde tehlike oluşturmaktadır. Ayrıca kimyasal etkenler ve stres, ekonomik düzey gibi psikolojik etkenler de kadın ve erkek infertilitesine neden olan çevresel faktörlerdendir (Orshan, 2008).

Hava kirliliği, karbondioksit ve kurşun, nikel gibi metallere maruz kalmak sperm DNA harabiyetlerine neden olacağından erkek üremesi için toksiktir (Cemal ve ark. 2007).

#### **2.4.1.4. Fiziksel Faktörler**

##### **2.4.1.4.1. Kadına Bağlı Faktörler**

Bozuk endometrial gelişim, anovulasyon, tümör gibi çeşitli uterin faktörler kadın infertilitesine neden olan karmaşık faktörlerdir. Bunun gibi vajinal ve spermin serviksten geçişini etkileyen servikal faktörler kadında infertiliteye neden olmaktadır (Akyüz, 2003).

##### **2.4.1.4.1.1. Ovulatuvar Bozukluklar**

Kadına bağlı infertilitenin % 30-40'ını ovulatuvar bozukluklar oluşturur. Ovulasyon, hipotalamus, hipofiz ve over döngüsünün düzenli çalışmasıyla sağlanır. Bu aksın herhangi bir aşamasındaki bozukluk sonucu, anovulasyon oluşabilir (Hoff ve ark. 1983; WHO, 1980). Ovulatuvar bozukluklar, anovulasyon, amenore ve adet düzensizlikleriyle kendini gösterir.

##### **2.4.1.4.1.2. Tubal-Peritoneal Faktörler**

Tubalarda tıkanıklık veya hasar sonucu meydana gelen anomalilerdir. Kadın infertilitesinin % 20-40 oranında tubal ve peritoneal faktörler sorumludur (Berek, 1998; Blackwell, 1989; Musich and Behrman, 1983; Speroff et al. 2007).

Pelvik inflamatuvar hastalık (PID), fallop tüpleri, uterus ve pelvik organların enfeksiyonudur. Genellikle serviksten başlayan bu hastalık sonrasında tüplere ve overlere yayılır. Tedavi edilmediği takdirde tüplerde yapışıklığa ve dolayısı ile infertiliteye neden olur (Akyüz, 2003).

Fallop tüplerinin motilitesi, içindeki sıvının aktivitesi ve tüp içindeki epitel hücrelerinin silier aktivitesindeki hasar infertiliteye zemin hazırlamaktadır (Kavlak, 1999).

Tubal faktörlerin tedavisi cerrahi olarak yapılmaktadır. Yardımla üreme tekniklerindeki başarı oranlarının giderek artmasıyla, tubal faktör infertilitesinde cerrahi yaklaşım endikasyonları giderek azalmaktadır (Berek, 1998).

#### **2.4.1.4.1.3. Servikal ve İmmunolojik İnfertilite**

Servikte ve servikal mukusta meydana gelen bozukluk, sperm geçişini etkileyeceğinden infertiliteye neden olmaktadır.

Ovulasyona yakın dönemlerde servikal mukus incelik ve 12-72 saatlik zaman diliminde spermin iletimi kolaylaşır (Akyüz, 2003; Kavlak, 1999).

Serviks inflamasyonunda ya da enfeksiyonunda spermlerin yapısı değişebilir ve penetrasyonu zorlaşabilir. İmmunolojik infertilite yönünden değerlendirmek için, antisperm antikörlerin tanısında sperm aglütinasyon, sperm kompleman bağımlı immobilizasyon, miks aglütinasyon testleri gibi çok çeşitli testler mevcuttur. Bu testler, IVF ile fertilizasyon başarısı düşük olan çiftlerde doğrudan ICSI yapılması için yol gösterici olabilir (Forti and Krausz, 1998). Servikal faktörün, infertilite üzerine etkisi post koidal test adlı klasik bir yöntemle değerlendirilebilir. Test 3-4 günlük cinsel perhiz sonrası yapılan, servikal kanaldan alınan, servikal mukus ve spermlerin incelenmesidir (Aksu, 2006).

#### **2.4.1.4.1.4. Uterusa Ait İnfertilite Nedeni**

Gebeliğin oluştuğu ve geliştiği organ olduğu için çok önemlidir. Uterusta herhangi bir defektin olması infertiliteye sebep olmaktadır (Aksu, 2006; Akyüz, 2003; Orshan, 2008).

Uterus mukozasının uterus dışında başka bir bölgede bulunmasına endometriozis adı verilir. Kadınların %25' inde endometriyozis gözlenmektedir (Akyüz, 2003).

Uterusa ait miyomlar kesin bulgular olmamakla birlikte infertiliteye neden olmaktadır. Ayrıca travma ve enfeksiyona bağlı uterin yapışıklıklarında fertiliteye olumsuz etki ettiği bilinmektedir (Aksu, 2006).

#### **2.4.1.4.1.5. Vulva ve Vajene Ait İnfertilite Nedenleri**

Vulva ve vajene ait anatomik bozukluklar spermin vajene girmesini önleyeceğinden infertiliteye sebebiyet vermektedir (Kavlak, 1999).

Aynı zamanda vajende meydana gelen enfeksiyon sonucu, vajen pH'ı asidik hale gelebilir böylelikle spermin uterusu geçişi engellenebilir (Akyüz, 2003).

#### **2.4.1.4.2. Erkeğe Bağlı Faktörler**

Normal fertil bir erkekte günde 120 milyon adet sperm yapılmaktadır. Üreme çağındaki erkeklerin infertilite olgularına bakıldığında, infertiliteye sahip yaklaşık %90 kadar erkeğin infertilite nedeninde bozulmuş spermatogenez vardır (Bernard et al. 2002).

Özellikle spermin yapı, kalite ve hareketliliğinde meydana gelen bozukluklar erkek infertilitesinin başlıca nedenlerindedir (Urman, 1997). Sperm miktarı, mililitredeki ya da tek bir ejakulasyondaki sperm sayısıdır. Normal sperm sayısı bir ejakulasyonda 20 milyon/ml' dir (Akyüz, 2003; Orshan, 2008). Hacimde meydana bağlı azalmalar sonucu ejakulasyon problemleri ortaya çıkar. Bu nedenle normal sperm hacminin en az 2 ml olması gerekmektedir (Orshan, 2008).

Travma veya vücut ısısını arttıran herhangi bir nedenden dolayı sperm motilitesi düşmektedir (Akyüz, 2003; Orshan, 2008). Bu yüzden spermlerin vücut ısısından daha düşük sıcaklıkta bekletilmesi gerekir (Akyüz, 2003). Normal morfolojideki ve sayıdaki sperm miktarı en az % 60 olmalıdır (Akyüz, 2003; Orshan, 2008).

Radyasyon, aşırı ilaç ve alkol kullanımı da infertiliteye neden olmaktadır (Perk et al., 2005). Ayrıca genişlemiş testis venleri ile karakterize olan toplumda sık rastlanan varikozel hastalığının ise infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Akyüz, 2003; Reşorlu ve ark. 2006).

Özetle erkeğe ait bazı infertilite nedenleri şunlardır;

- Semifer kanallarda, tübüllerde ya da damarlardaki tıkanıklık,
- Otoimmün nedenlerden kaynaklanan hareketsiz spermler
- Sperm hücrelerinin yapısını değiştiren spermatogenezdeki bozukluk
- Seminal plazmanın kalitesinde meydana gelen değişiklik
- Ejekulasyon problemleri
- Sperm depolanması hasarları (Akyüz 2003; McKinney et al. 2005).

Erkek infertilitesindeki etyolojik gruplar testislere göre pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olarak sınıflandırılmaktadır.

##### **2.4.1.4.2.1. Pretestiküler Nedenler**

Pretestiküler nedenler, primer spermatogenezin etkilendiği patolojilerdir. En sık endokrin ve kromozomal nedenlere bağlı olur. Testisin kendisini ilgilendiren patoloji yoktur. Bu durumlara örnek olarak Kleinfelter sendromu, hiperprolaktinemi, diabetik nöropati verilebilir.

#### **2.4.1.4.2.2. Testiküler Nedenler**

Bizzat testisin kendisini ilgilendiren patolojilerdir. Primer spermatogenez etkilenir. Bu durumlara örnek olarak varikosel, radyasyon, ısı, enfeksiyon, konjenital patolojiler örnek verilebilir.

#### **2.4.1.4.2.3. Posttestiküler Nedenler**

Bunun nedenleri, obstrüksiyon bozukluğundan ve ejakülasyon disfonksiyonundan kaynaklanabilir. Örnek olarak, aksesuar bez enfeksiyonları, immunolojik nedenler, epididimal konjenital anomaliler ve enfeksiyonlar verilebilir.

#### **2.4.1.4.3. Açıklanamayan İnfertilite**

Yaklaşık % 10-15 oranında görülen açıklanamayan infertilite, kadın ve erkeklerin fertilitate testlerinin normal olmasına karşı gebeliğin oluşmadığı durumları ifade eder. Tek başına olduğunda infertiliteye neden olmayan bir durum birkaç faktörün bir araya gelmesiyle infertilite oluşturabilir.

Psikolojik sebepler de açıklanamayan infertiliteye sebep olabilmektedir. Bu yüzden bireyler fiziksel değerlendirilmelerinin yanı sıra psikolojik açıdan da değerlendirilmelidir (Kızılkaya, 1992; Oğuz, 2004; Orshan, 2008).

### **2.5. Fare Sperm Değerlendirilmesi**

#### **2.5.1. Fare Sperm Morfolojisinin Belirlenmesi**

Spermilerin morfolojik değişkenlikleri, sperm morfolojisinin değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Buna rağmen zona pellusida yüzeyinden ve kadın üreme yolundan elde edilen, yumurtayı dölleyebilen spermilerin morfolojisinin esas alınmasıyla normal bir spermatozoonun görünümü belirlenmiştir (Fredricsson and Bjork, 1977; Liu and Baker, 1992; Menkveld et al. 1990; Mortimer et al. 1982).

Bazı laboratuvarlarda ise Diff-Quik adlı hızlı boyama yöntemi kullanılmaktadır. Bu boyalarla başın akrozomal bölgesi soluk mavi, post-akrozomal bölgesi koyu mavi, orta kısım hafif kırmızımsı, kuyruk kısmı ise mavi olarak boyanır (Kruger et al. 1987).

#### **2.5.2. Fare Sperm Motilitesinin Belirlenmesi**

Her spermatozoanın motilitesi a, b, c ya da d olarak derecelendirilir.

- a. Hızlı ileri hareketli
- b. Yavaş veya tembel ileri hareketli
- c. Yerinde hareketli
- d. Hareketsiz

Fare spermasındaki motilite dinamiği insan, köpek, kedi, boğa, aygır, gibi baş kısmı oval yapıdaki diğer spermalardan farklıdır. Fare spermasının baş kısmı orak şeklinde olup asimetrik yapısı ve kuyruğun kendine has hareketinden dolayı medyum içerisinde aşağı ve yukarı olmak üzere hareket eder. Kuyruk spiral bir dönme hareketinden ziyade daha karmaşık bir hareket dinamiği gösterir (Woolley, 2003).

Farelerde spermatozoonlar ileri doğru düzgün doğrusal hareketin dışında, baş kısmında yer alan apikal kanca yardımıyla diğer spermatozoonlara tutunarak 10 – 50 hücreli motil gruplar oluşturup hareket edebilme yeteneğine sahiptir. Bu olay, motilite muayenesinde aglütinasyon gibi görülse de aslında normal bir görünümdür (Moore et al. 2002).

### **2.5.3. Sperm Defektlerinin Sınıflandırılması**

Spermilerin normal morfolojik değerleri belirlenirken kesin kriterler kullanılmalıdır (Menkveld et al., 1990). Bir spermatozoonun normal olarak kabul edilebilmesi için sperm başı, boynu, orta kısmı ve kuyruğu normal kriterlerde olmalıdır. Sperm değerlendirmesinde bir kaç farklı kriter vardır. "Kruger kriterleri" özellikle spermdeki şekil bozukluklarını göz önüne alan mikroskopik bir değerlendirme metodudur. Özel bir boyama sonrası sperm şekil (morfoloji) özellikleri incelenerek sperm örneğinin fertilitate (doğurganlık) kapasitesi belirlenir. Normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir.

Defekt kategorileri şu şekildedir;

#### **a) Baş defektleri:**

- I. Akrozom anormallikleri; Spermin yumurtaya girmesi için gerekli enzimleri içeren önemli bir bölge olduğundan, akrozom anormallikleri spermin yumurtaya bağlanmasında sorun yaratır. Globozpermia, akrozom yokluğu anlamına gelmektedir ki böyle anomaliye sahip spermilerin dölleme kabiliyeti yoktur.
- II. Çekirdek anormallikleri; DNA içerik bozukluğu anlamına gelmektedir. Bu da sağlıklı bir embriyo gelişimini engellemektedir.
- III. Sitoplazmik artıklar; spermin olgunlaşmadığı anlamına gelmektedir. Genelde orta kısım çevresinde bulunurlar. Sperm baş alanının 1/3' den büyük olanlardır.

Baş defektlerine; geniş, küçük, yassı, yuvarlak, armutlaşmış, şekilsiz, vakuollü, küçük akrozomal bölge içeren başlar ve çift başlar örnek olarak verilebilir.



**b) Boyun ve orta kısım defektleri:** Orta parça, mitokondrilerin olduğu önemli bir kısımdır. Buradaki anormallikler enerji desteğinin noksanlığına neden olmaktadır. Bu durum hareketliliği direkt etkilemektedir.

Kalın, şekilsiz orta kısım, anormal derecede ince veya başa asimetric girişli orta kısım, bükük boyun, boyun ve orta kısım defektlerine örnek olarak verilebilir.

**c) Kuyruk defektleri:** Sperm başının tam ortasından çıkmadığında yani aksı bozuk olduğunda spermin ileri yönde hareket yeteneği düşmektedir

Kısa, kırık, birden çok, kırık veya bükük kuyruklar, düzensiz genişlikte kuyruklar, halkalı kuyruklar bu defektlere örnek verilebilir. Sadece kuyruğu olan spermatozoalar 'pinhead' defektini oluşturanlar, kopuk veya serbest sperm başları spermatozoalar olarak kabul edilmezler.

## **2.6. Diabetes Mellitus**

### **2.6.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Sınıflandırılması**

Diabetes mellitus (DM), karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozukluğu ile seyreden, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların geliştiği kronik ve kompleks bir metabolik hastalıktır (Hsueh et al. 2004; Lebovitz, 2004a; Pınar, 1998; Tanyeri, 1996). Diyabet, insülinin fonksiyonel yetmezliği sonucu oluşur ve oluşturduğu komplikasyonlar nedeniyle işlev ve organ kayıplarına yol açar (Pınar, 1998; Lebovitz, 2004a, 2004b).

İlk kez 1979 yılında National Diabetes Data Group (NDDG) ve daha sonra World Health Organization (WHO) tarafından 1985 yılında diyabetin geniş bir sınıflandırılması yapılmıştır. WHO' nun yaptığı sınıflandırmaya göre diyabet terminolojik olarak insüline bağımlı (IDDM) ve insüline bağımlı olmayan (NIDDM) olarak adlandırılmıştır. (NDDG, 1979; WHO, 1985). Daha sonra American Diabetes Association (ADA) tarafından 1998 yılında yeni bir sınıflandırılma önerilmiştir. Bunlar insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan sınıflandırılma yerine tip I ve tip II diyabet terminolojisidir.

Tip 1 (IDDM), pankreastan salgılanan insülinin yokluğuna veya eksikliğine bağlı olarak gelişir. Dolayısıyla fonksiyonel  $\beta$  hücresi ya hiç yoktur ya da oldukça azdır. Bu yüzden tedavisinde mutlaka insülin gereklidir. Her yaş grubunda ortaya çıkabilir. Bu grup içinde en sık pankreas beta hücrelerinin idiopatik otoimmün yıkımı gözlenmektedir.

Tip 2 (NIDDM), toplumda en sık görülen diabetes mellitus tipidir. Genellikle polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıkar. Pankreas insülin üretir fakat insülin direncinde veya salgısında bozukluk mevcuttur. İnsülin tedavisi çoğu kez gerekli değildir.

NIDDM aynı zamanda obezite ile yakından ilişkilidir. Obezite insülin direncini arttırarak hiperglisemiye ağırlaştırır. Bu yüzden obez NIDDM' de insülin direnci daha önemliken (Golay et al. 1988), non obez NIDDM' de insülin sekresyon bozukluğu ön plana geçer (Reaven et al. 1989).

Diyabet dünyada ve ülkemizde hızla artan bir halk sağlığı problemidir. Dünyada 2000 yılında 171 milyon olan diyabetli sayısının 2030 yılında 366 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Wild et al. 2004).

Diyabet tüm organları etkilediği gibi cinsel organları da etkilemektedir (Pınar, 1998; Sasaki et al. 2003; Saenz de Tejada and Goldstein, 1998; Yılmaz ve İmamoğlu, 2000). Cinsel problemlerin oluşmasına neden olan başlıca etkenler diyabet süresi, kronik komplikasyon (özellikle nöropati ve anjiyopati) varlığı, hastanın yaşı, diyabet süresi, alkol alımı, ilaç ve sigara kullanımınıdır. Bu fizyolojik faktörlerin yanı sıra psikolojik etkileri de hastanın cinsel yaşamını ve üreme sistemini etkileyebilmektedir (Kadıoğlu ve Kaplancan, 1997; Vinik and Richardson, 1998; Yenigün ve Ener, 2001).

Uzun süre diyabeti olan erkeklerin yaklaşık yarısında erektil disfonksiyon 'ED' görülür (Kendirci ve Kadıoğlu 2002, De Berardis ve ark. 2002). Ve erkeklerde diyabeti olan bireylerin olmayanlara göre 3 kat daha ED görüldüğü saptanmıştır (Feldman et al. 1994; Johannes et al., 2000; McKinley, 2000).

ED, genellikle birden fazla etkenin bir araya gelmesi ile oluşur. Doku proteinlerinde glikolizasyonun son ürünlerinin birikimi ile başlayan bu süreç sonunda düz kaslarda, endotele bağımlı gevşeme azalır. Bunların yanı sıra mikroanjiyopati, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanımı gibi faktörler de vasküler yetersizlik ortaya çıkarır ve riskleri arttırır (Kendirci ve Kadıoğlu, 2002; McKinley, 2000). Diyabetik mikroanjiyopatide penis kanlanması azalır, hemostaz mekanizmasında ve oksijen taşınmasında değişiklikler oluşur, damar duvarının bazal membranında kalınlaşma meydana gelir (Goldstein et al. 2003). Diyabetlilerde testiküler fonksiyonun ve testosteron düzeyinin azaldığı düşünülmektedir (Kendirci ve Kadıoğlu, 2002; McKinley, 2000).

Diyabet erkek bireyleri etkilediği kadar dişi bireyleri de etkilemektedir. Diyabetik kadınlarda nörolojik, psikolojik, vasküler bozukluklar gözlenmektedir (Goldstein et al. 2003; Yıldız ve Pınar, 2004).

### **2.6.2. Tip 1 Diabetes Mellitus'un Patogenezi**

Tip 1 diyabet; pankreatik beta hücrelerinin yıkılmasına bağlı olarak meydana gelen, insülin yetersizliği ile ortaya çıkan bir durumdur. Diyabet popülasyonunun yaklaşık %10' unu oluşturur. Yapılan çalışmalar Tip 1 diyabetin, klinik semptomlar ortaya çıkmadan uzun bir prelinik sürecinin olduğunu göstermiştir. Prelinik dönemden klinik döneme geçiş süresince insülin gereksinimini arttıran çeşitli faktörler mevcuttur. Bu faktörler stres, bakteriyel, viral enfeksiyonlar olabilir. Diyabet yaşı başlangıcı da bu süreci arttırabilir. İnsüline bağlı tip 1 diyabetin gelişimine neden olan en önemli neden otoimmün yıkımdır. Beta hücrelerine organizmanın savunma sistemi immun saldırıda bulunur. Sağlam beta hücrelerinin oranı %20' lere düşene kadar diyabet semptomsuz seyreder. Ve bu oranın altına düştüğünde Tip 1 diyabet semptomları ortaya çıkar (Eisenbarth, 1986).

Tip 1 diyabet patogenezi şu şekilde sınıflandırılabilir;

#### **a) Genetik Yatkınlık ve İmmunogenetik Patogenezi :**

Tip 1 diyabet, ailesel geçiş oranı yüksek bir hastalıktır. Tip 1 diyabetin gelişme risklerini arttıran 14 gen saptanmıştır. Bu genler içinde en önemlisi IDDM1' dir. IDDM1 geni, 6. kromozomun kısa kolunda bulunan HLA (Human Leucocyte Antigen) bölgesini ile ilişkilidir.

#### **b) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu :**

Beta hücrelerinin virüs veya toksinlerle doğal yapısı bozulur ve buna karşılık antijenik peptidler ve sitokinler salgılamaya başlar. Bunların salgılanmasıyla immun sistem elemanlarının uyarılması gerçekleşir (Busehard et al. 1990; Harrison et al. 1989).

#### **c) Beta Hücre İmmütoleransının Bozulmasına Neden Olan Etkenler :**

Sağlıklı insanlarda hücresel bütünlüğü bozan birçok faktör immütoleransın bozulmasına neden olur. Beta hücrelerinin immütoleransının bozulmasına ve otoimmüntenin aktivasyonuna neden olan etkenlere örnek olarak toksinler, virüsler ve bazı gıda maddeleri örnek olarak verilebilir.

Virüsler, beta hücrelerini yıkıma uğratabilirler veya infekte edebilirler. Beta hücrelerini infekte eden virüsler ya spesifik veya nonspesifik otoimmünte yoluyla ya da direkt lizis yaparak etkili olurlar (Garstein, 1994; Karam et al. 1992; Malaisse et al. 1982).

#### **d) İnsulitis ve Beta Hücre Ölümü :**

Geç faz aktif dönem, infiltrasyon ve inflamatuvar dönemi ya da insülitis olarak adlandırılır. Adacıkların sindiriminde makrofajlar, CD8 sitotoksik T lenfositleri, CD4 lenfositleri, NK hücreleri ve B lenfositler görev alır ve yıkıma uğratır.

#### **e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikorları :**

Son yıllarda otoimmün T hücreleri ile reaksiyona giren birçok beta hücre antijeninin tanımlaması yapılmıştır. İnsülin 69kDa adacık hücre otoantijeni (ICA69), 38kDa adacık mitokondriyal otoantijen (Imogen), glutamik asit dekarboksilaz GAD65 ve GAD67 gibi proteinler beta hücre antijeni olarak rol oynayabilirler (Beckeskov et al. 1990; Karounos et al. 1990; Palmer, 1987; Pietropaolo et al. 1993; Roep et al. 1991; Shimada et al. 1993; Tisch et al. 1993).

### **2.6.3. Diyabetin Kalp ve Damar Hastalıklarına Etkisi**

Diyabetiklerde, kardiyovasküler hasar insidansı bütün yaşlarda ve iki cinsiyette yüksektir. Kadınlar ortalama 3 kat, erkeklerde ise ortalama 2 kat risk gözlenir.

Bozulmuş glukoz toleransı ve aynı zamanda diyabetli olmayan hiperglisemide kardiyovasküler problemler açığa çıkar (DCCT Research Group, 1993; Yenigün, 1995; Yenigün, 1997).

Diyabet hastalığında morbidite ve mortaliteye yol açan nedenler arasında en sık periferik damar hastalıkları ve serebrovasküler hastalıklar gelmektedir. Diyabet hastalarda bu riskler diyabet olmayanlara göre yaklaşık 2-4 kat daha yüksektir.

Total kolesterol, HDL kolesterolü, VLDL kolesterolü, trigliserid, kan basıncı ve hematokrit gibi aterojenik risk faktörleri diyabetlilerde diyabet olmayanlara göre daha fazladır.

Diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlar; diyabetik makroanjyopati ve diyabetik mikroanjyopati ile ifade edilebilir. Diyabetik makroanjyopatik değişimlere hızlanmış arteriyoskleroz ve arteroskleroz ile diyabetik metabolik bozukluklar neden olur.

Bunlara karşılık, diyabetik mikroanjyopatide direk olarak diyabeti akla getiren patolojik damar bozuklukları ve diyabete has özellikler mevcuttur.

Kanda yükselen glikoz seviyesi eritrositlerin yetenekleri olan esneklik ve eğilip-bükülebilmelerini azaltarak dokulara oksijen taşıyabilmesini engeller ve de kapiler bazal membranı kalınlaştırarak membranın kimyasal alt yapısını bozmaktadır.

Diabetes mellitus' lu hastaların kalpleri histolojik olarak incelendiğinde, perivasküler ve interstisyel fibröz, küçük damar duvarlarında kalınlaşma ve intima

proliferasyonu aynı zamanda lipid ve glikoprotein birikimi gözlenmiştir (James et al. 1985).

Diyabetin en önemli sonuçlarından biri mikrovasküler komplikasyonlardır. Uzun süre boyunca devam eden bu hastalıkta büyük küçük bütün kan damarları anormalleşir (Yenigün, 1995; Yenigün, 1997). Dolayısı ile damarın ana görevi olan damarların ihtiyacı olan besinleri sağlamak ve spesifik dokulardan artık materyali almak aksar veya gerçekleşemez hale gelir (Green and Lattimer, 1986).

Bir diğer faktör de, diyabetin mikroanjyopatide vasküler hücrelerde meydana getirdiği değişikliklerdir. Bunlar genel olarak koagülasyon, permeabilite, rejenerasyon, akım ve kontraktilite son olarak insülin reseptörlerinin uyarılması olmak üzere sınıflandırılabilir.

#### **2.6.4. Diabetes Mellitus ve Hemostaz Bozuklukları**

Tromboembolik olaylar diyabetik hastalarda daha çabuk gelişmektedir. Prokoagulan aktivitesinin artışı kardiyovasküler problemleri de beraberinde getirir ve buna bağlı mortalite ve morbidite oranları artar. Diyabetik hastalarda hemostaz bozukluğu nefropati, retinopati ve aterogenezin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Vine and Samama, 1993).

Diyabetiklerde koagülasyon faktörleri olan faktör VII, faktör VIII, faktör X, faktör XI, faktör XII ve fibrinojen diyabetik olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur (Coriello, 1993; Kassler et al. 1998). Diyabetiklerde fibrinojen, vasküler komplikasyonu olan hastalarda daha belirgindir. Ayrıca hasta olmayan normal kişilerde de açlık glisemisi ve faktör VII düzeyleri arasında direk ilişki mevcuttur (Coriello, 1993).

Diyabetiklerde tromboksan sentezi, trombosit hacmi, trombosit agregasyon ve adezyonu artmıştır. Metabolik kontrol iyileştiğinde, trombosit hiperaktivitesinde olumlu yönde gelişme olmaktadır (Vicari and Macagni, 1990).

Normal ve patolojik durumlarda organizmada, damar içi ve dışındaki fibrini eriterek yok eden sisteme fibrinolitik sistem adı verilir. Bu sistemin, diyabetik hastalarda aktivitesinin azaldığı ile ilgili çalışmalar kaydedilmiştir (Keskin ve ark. 1995). Fibrinin normal jel yapısı, normalden daha farklı ve kalın aynı zamanda fibrinolitik enzimlerin nüfusunun engellenerek fibrinolizisi bozduğu belirlenmiştir (Jorneskog, 1996).

Vasküler hemostazın sağlanmasında endotel hücrelerin önemli rolleri mevcuttur. Endotelin-I ve angiotensin II; endotel hücrelerinde sentezlenen, vazokonstriksiyonun yanısıra trombosit agregasyonuna ve hücre proliferasyonuna yol açan kuvvetli

vazokonstriktör maddelerdir. Bunların tersine hücre proliferasyonunu engelleyen ve vazodilatasyon yapan prostoglandin 12 (PG12) ve nitrik oksitte (NO) endotel hücrelerinden sentezlenir (Wu and Thiagarajan, 1996).

Tip 2 diyabetlilerde hiperglisemi, NO ve PG12 sentezinin ve trombomodulin ekspresyonunun azalmasına, endotel hücre doku faktörü ekspresyonunun da artmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda tip 2 diyabetlilerde kanda endotelin-I sentezi artar (Kessler et al. 1998).

Aynı zamanda diyabetlilerde görülen artmış oksidatif strese bir hemostaz bozukluğudur. Serbest radikallerin üretimi hiperglisemi ve metabolik kontrolle orantılıdır (Coriello, 1993).

### **2.6.5. Diyabetik Nöropati**

Diyabetik nöropatide; otonomik sinir sistemi disfonksiyonu, segmental demiyelinizasyon, duyu ve motor nöron defektleri aynı zamanda schwann hücre fonksiyonunda anormallikler mevcuttur.

Diabetes mellitus' un santral sinir sistemini etkilediği bilinmektedir. Aşırı derecede insülin tedavisi ve oral ajanlar beyni geçici olarak zedeleyebilmektedir, diyabet nöbet prevalansını da arttırabilmektedir. Ayrıca, kronik ensefalopati, kan akımı ve metabolizma bozuklukları, akut etkisi olarakta nöbetler, koma ve bilinç bozuklukları diyabet sonucu gözlemlenebilir.

Nöropati ve hipergliseminin artışı ile ilişkisi birçok araştırmacı tarafından desteklenmiştir (DCCT Research Group, 1988; Pirart, 1978). Glisemik kontrol yapılması, glisemik düzeyin sinir fonksiyonlarını da etkileyebileceği açısından yararlıdır. Diyabetik kontrol yapılmadığı takdirde erken ve ciddi komplikasyonlar gözlemlenebilir. Akut ağrılı nöropatinin ve ağır nöropatinin glisemik kontrol ile düzeldiği belirlenmiştir (Thomas and Tomlinson, 1993). Devamlı subkutanoz insülin infüzyonu ile yapılan kısa süreli çalışmalarda sinir ileti değerlerinin düzeldiği belirlenmiştir. Hiperglisemi, pankreatik transplantasyon ile düzeltildiğinde nöropatik ilerleme durmuş fakat tam olarak iyileşmemiştir (Kennedy, 1990). Bunun nedeni sinir hasarını geri döndüremesidir (Boulton et al. 1985; Service et al. 1985).

Diyabetik insanlarda serbest oksijen radikallerinin özellikle de süperoksit gibi serbest radikallerin arttığı düşünülmektedir. Bu gibi radikaller sinir hasarını arttırabilir veya sinir kan akımını da NO yapımını engelleyerek azaltabilirler (Cameron et al. 1994; Gingliano et al. 1996; Wohaieb et al. 1987).

Diyabetik nöropatinin evreleri şu şekildedir;

Nöropati yok, asemptomatik nöropati, semptomatik nöropati, sakatlık yapan nöropati.

#### **2.6.6. Diyabetes Mellitus ve Eretil Fonksiyon Bozuklukları**

Eretil disfonksiyon (ED), yeterli cinsel ilişki için gerekli ereksiyonu devam ettirememeye ve/veya sağlayamama olarak tanımlanır. 1970' lerin başına kadar erektil disfonksiyonun neredeyse tamamının nedeninin psikojenik olduğu kabul edilmekteydi. Fakat bu yıldan sonra organik nedenlerin %85' lere kadar çıktığının belirlenmesi ile tedavi olanakları genişletilmiştir (Meuleman and Diemont, 1995).

Diyabetik hastalarda ED' nin temel fizyopatolojik faktörleri nörojenik, vaskülojenik ve psikojeniktir. Nörojenik faktörde, otonomik sinirlerin aracılık ettiği olaylarda hasar veya bozukluk meydana gelmektedir. Vaskülojenik faktörde, hem vazovazomlarda iletim bozukluğu vardır hem de endotelial kaynaklı düz kas gevşemesinde problem mevcuttur (Southam and Gartwaite, 1993; Williams and Pickup, 2004c; Yenigün ve Ener, 2001; Yaman, 2002; Yıldız ve Pınar, 2004b).

Penil ereksiyon, nitrik oksit aracılığı ile korpus kavernozumda vasküler düz kas gevşemesini takiben dokunun genişlemesi sonucu oluşur. Nitrik oksit (NO) hem vasküler endotelden hem de parasempatik sinir sonlanmalarından salınmaktadır. NO, cGMP üretimini arttıran guanilat siklazı stimüle eder. cGMP düz kas gevşemesini tetikleyen sekonder mesajcıdır. (Williams and Pickup, 2004). Doku proteinlerinde biriken ileri derecede glikolize olmuş son ürünler, endotele bağımlı düz kas gevşemesini ve NO aktivitesini azaltmaktadır.

Diyabetik hastalarda erektil disfonksiyon prevalansı yüksektir (%33-%75) (McCulloch DK et al. 1980). Eretil disfonksiyon sıklığı yaşla birlikte artış göstermektedir. Yaşları 20-24 arasındaki diyabetik erkeklerden oluşan bir grup erkeğin %5.7' si impotent iken, 55-59 arasındakilerin % 52.4' ü impotenttir. Bu popülasyon 5 yıl sonra tekrar incelenmiş ve potent olan hastaların % 28' i impotent hale gelmiştir. Bu çalışma, erektil disfonksiyonun diyabetik hastalarda progresif bir seyir izlediğini göstermesi bakımından önemlidir (McCulloch et al. 1980).

Diyabette ortaya çıkan erektil disfonksiyon geri dönüşümsüzdür. Bu hastalarda gözlenen ED' de kan şekeri kontrolü ve hastalığın süresi önemlidir. Fakat, bunlar kontrol altında tutulsa bile yaşlanma ve genetik faktörlerden dolayı ED kaçınılmaz bir hal alır.

Yaşın artışıyla birlikte vasküler, hormonal ve nörojenik yaşlanma olmakta böylece orgazma ulaşma süresi ve ejakulat atım gücü azalmaktadır.

Libidonun yaşla azalması sadece testislerden salgılanan testesteron seviyesinin azalmasına bağlı değildir. Bu olay aynı zamanda androjen reseptör duyarlılığının azalması, periferik ve santral mediatörlerin değişmesiyle de ilgilidir.

Diyabette seks hormonları bayanlarda ve erkeklerde gonadal disfonksiyondaki değişikliklerle ilişkilidir. Diyabetik bayanlarda, temel olarak ovaryumlar etkilenir. Farelerde, ovaryumlar üzerinde diyabetin olumsuz etkisi gözlenmiştir. Aynı zamanda, estradiol seviyeleri diyabetli bayanlarda düşüktür ve estradiolün bazı etkilerine karşı direnç gelişmiştir. Diyabetik erkeklerde ise, total ve serbest testesteron düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Bu olay hipotalamo-hipofizer disfonksiyon sonucunda testiküler steroidogenez ve testesteron salgısında azalma ile ilgilidir. Testesteronun, diyabetik erkeklerde leptin üretimini inhibe edip insülin direnci azaltabilmesi diyabetik erkeklerde olumlu bir etkidir. Sonuç olarak diyabetik bayan ve erkeklerde gözlenen libido, ereksiyon bozuklukları, hormonal değişiklikler, vajinal kuruluklar olumsuz etkiler yaratmaktadır.

#### **2.6.7. Diyabet ve Gebelik**

Diyabet kadınlarda gebelik fetus ve anne için sakıncalı olabilmektedir. Özellikle IDDM' li kadınların menstruel problemlerden dolayı gebe kalmaları zorlaşabilir. Eğer gebelik olursa glisemi kontrolleri zorlaşır ve bazı komplikasyonlar hız kazanabilir. İnsülin hassaslığı ve glukoz toleransı bozular. Fetusta konjenital malformasyon riski, metabolik ve gelişimsel problemler maternal diyabetle birlikte artış gösterir (Reece, 1988).

Gebelikte anne ve fetusun gelişimlerini sağlayabilmek için gebeliğin ilk dönemlerinde plasentadan fazla miktarda östrojen ve progesteron salgılanır. Östrojenlerin zayıf anti-insülin etkileri vardır. Ayrıca, gebe kadınlarda prolaktin ve kortizol düzeyleri de artmaktadır. Diyabetik durumla beraber karbonhidrat metabolizması değiştiğinden, pankreatik  $\beta$  hücreleri hipertrofiye uğrar ve glukozu insülin yanıtı artar. Ve gebeliğin 12. haftasında glukoz en alt seviyelere iner (Lind et al. 1973).

IDDM' li kadınlarda gebeliğe bağlı lipolizis sonucu ketoasidoza yatkınlık artar. (Buschard et al. 1987; Hare, 1994). Ayrıca, gebeliğe bağlı insülin direncini önlemek için de insülin üretimini arttırmalıyız.

Genç diyabetik kadınlarda GnRH salınımındaki bozuklukların oligo veya amenoreden sorumlu olduğu düşünülür. NIDDM' li kadınlarda anovuluar siklus, infertilite, polikistik over sendromu ve obezite insidansı daha yüksektir. Buna rağmen



günümüzde diyabetik kadınların çoğunda fertilitéyle ilgili bir problemle karşılaşılmamaktadır (Griffin et al. 1994).

### **2.6.8. Diyabet ve İnfertilite**

Dünya genelinde DM yaygınlığının gözükmesi, erkeklerin yaşlarının artmasıyla birlikte artar. Diyabetik hastaların yaklaşık %90' ı seksüel fonksiyon açısından sıkıntı çekmektedir. İnfertilite ise hala dünyanın en gelişmiş ülkelerinde bile gözlenen büyük bir sağlık problemidir (Hull et al. 1985; Schidmt and Munster, 1995).

Diyabetik erkeklerde yaklaşık %40-50 arasında gözlenen sperm düzensizlikleri, infertiliteye neden olan faktörlerin başında gelir (Thonneau et al. 1991; Sharlip et al. 2002).

STZ ile oluşturulmuş DM' lu sıçanlarda meydana gelen seksüel fonksiyon bozukluklarının, nöroendokrin ve üreme yolu ekseninin bozukluğundan olduğu düşünülür. Merkezi sinir sistemine bağlı değişmeler, endokrin fonksiyon ve seksüel tahrik, seksüel fonksiyonun bozukluğunu etkiler (McVary et al. 1997).

Bazı araştırmacılar, sperm konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın, hipergliseminin spermatogenezin geç evrelerinde meydana gelen şiddetli etkisinden dolayı olduğunu düşünür. Bunun nedeni muhtemelen reaktif oksijen ürünlerinin artışıdır. Bu tip oksidatif hasarlar sperm hareketliliğini kaybetmeye de sebep olabilir ( Aitken and Sawyer, 2003; Oehninger et al. 1995; Sikka, 2001).

Diyabet spermatogenezin endokrin kontrolü üzerine etkilidir (Baccetti et al. 2002; Ballester et al. 2004; Daubress et al. 1978; Dinulovic and Radonjic, 1990; Garcia-diez et al. 1991; Handelsanman et al. 1985). Diyabet gibi karbonhidrat homeostazisindeki değişimler, laboratuvar hayvanların üreme sistemlerinde bozukluğa yol açmakta, sadece hipotalamik döngünün değil, üreme organları üzerine de olumsuz etkiler yapmaktadır (Ali ve ark. 1993; Handselman et al. 1985; Niven et al. 1995; Vignon et al. 1991).

Diyabet vücutta ve üreme organlarında kilo kaybına neden olur. Bu değişiklikler metabolik değişimler ile ilişkilidir. Örnek olarak; testesteron düzeyinin düşmesi verilebilir. Diyabet; erkeklerde testiste ve epididimiste azalmış semen sayısına neden olarak iktidarsızlık, kısırlık, geriye ejakulasyon, fertilitede ve libidoda azalma meydana getirir (Cameron et al. 1990; Jiang, 1996).

DM, erkek üreme yollarını birçok faktöre bağlı olarak etkileyebilir. Bu faktörler; spermatogenez olayında var olan endokrin kontrol, direk olarak bozulmuş spermatogenez, bozulmuş penil ereksiyon ve ejakulasyon olabilmektedir (Sexton and Jarow, 1997).

Tip 1 diyabetlilerde hiperglisemi; enerji düzeyi ve sperm konsantrasyonunu da etkiler. Bu hastalıkta, epididimis ve spermatozoadaki ATPaz ve fosfotaz enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu gibi faktörler spermin hareketi ve yeteneğini etkilemektedir (Scarano et al. 2006).

Çalışmalar sonucu diyabetik farelerin spermleriyle döllenmiş oositlerde, genellikle fragmantasyon oranında artış ve kötü kalitede embriyo gelişimi gözlenir. Spermatogenezin moleküler mekanizması olumsuz yönde etkilenmiş, spermlerin hareketi ve fertilizasyon kapasitesi bu farelerde azalmıştır (Kim and Moley, 2008).

STZ ile diyabet oluşturulmuş modellerde diyabetin, seksüel olgunlaşma sırasında değişen epididimal epitelin kuruluş ve bakımına zararlı etkileri vardır. STZ ile diyabet oluşturulmuş bütün sıçanlarda seminifer tübül dejenerasyonları gözlenmiştir. Bu hastalık tipik olarak; üreme hücre nekrozlarına, hücre lümenlerindeki hücresel azalmaya, seminifer tübüllerindeki spermatogonyum kaybına, seminifer tübül atrofisine ve tunika albuginea kalınlaşmasına neden olmaktadır.

Diyabet, leydig hücre fonksiyonunda değişikliklere yol açar. Bunlar proliferasyon, farklılaşma ve hücre fonksiyonları ile ilgilidir (Coskun ve ark. 2005). Leydig hücrelerinde anormal fibroblastik durumlar gözlenmiş, fibroblastik dejenerasyon bazı araştırmalarda kontrol grubuna ve diğer deneysel gruba göre STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta daha belirgindir (Cameron et al. 1985; Shrilatha and Muralidhara, 2007). Üstelik androjen sentezinde de azalmalara neden olur. Bunlar birlikte, erkek üremesinde azalmaya neden olur (Oksanen, 1975).

Diyabet; pituitar, testiküler değişimlere neden olmuştur (Steger and Rabe, 1997). Bu hastalık serumdaki LH' in seviyesini azaltır ki bu hormon Leydig hücre fonksiyonunu düzenleyen hormondur (Benítez and Perez-Diaz, 1985; Steger and Rabe, 1997). Hayvan deneyleri; gonadotropinin salgısının azalmasının diyabeti tetiklediğini göstermiştir (Johnson and Sidman, 1979; Rossi and Bestetti, 1981). Aynı zamanda diyabetli bireylerde üreme hücreleri ve sertoli hücre vakuolizasyonunda artmıştır. Çoğu araştırmaların sonuçları, diyabetin sıçanlarda üreme performansını azalttığı yönündedir.

Genetik bütünlük ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki son 50 yılda iyice araştırılır hale gelmiştir (Evenson and Wixon, 2006; O'brein and Zini, 2005). Çoğu çalışma göstermiştir ki infertil erkeklerde hasarlı DNA miktarı fazladır (Evenson et al. 1999; Kodama et al. 1997; Spano et al. 2000; Zini et al. 2001). DNA hasarının meydana gelmesi, sperm çekirdeğinde hasara neden olarak fertilizasyon kapasitesinin düşmesine neden olur.

Diyabetlilerde; çekirdek ve mitokondriyal DNA hasarlı sperm oranında anlamlı bir artış gözlemlendi (Agbaje et al. 2007). Bunlar azalmış embriyo kalitesi ile düşük implantasyon oranları ve olası çocukluk hastalıkları ile ilişkilendirilir (Henkel et al. 2003; Morris et al. 2002). Sperm çekirdek DNA (nDNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) kalitesine bakılarak sperm kalitesi belirlenebilir. Sperm nDNA fragmentasyonu, mtDNA delesyon numarası ve büyüklüğü birlikte ele alındığında bunlar üreme için prognostik değer taşırlar (Lewis et al. 2004). Diyabette sperm DNA fragmentasyonu olasılığının artmasıyla, fertilizasyonda olumsuzluklar gözlemlendiği düşünülmektedir.

Ejekulattaki semen kalitesi sperm sayısına, hareketine ve morfolojisine göre belirlenir. Semen parametreleri, erkek fertilizasyon potansiyeli hakkında bize en iyi fikri vermektedir (Bostofte et al. 1982; Chan et al. 1989; Eggert-Kruse et al. 1996; Enginsu ve ark. 1991; Kruger et al. 1988; Obelet et al. 1994; Rogers et al. 1983; Wichmann et al. 1994).

10' u normal 9' u hasta erkeğin spermi TEM ile incelendi ve sperm kontrollere göre diyabetlilerde apoptoz ile ilgili defektlerin daha çok olduğu gözlemlendi. Akrozom şeklinde %78 oranında bozulma gözlemlendi. Çekirdek anormallikleri %74, hatalı mitokondriyal birleşmeler %45 oranında gözlemlenmiştir. TEM görüntüleri göstermiştir ki, çoğu diyabetik hasta spermde şiddetli defektler mevcuttur. Diyabet sonucu, apoptoz ve immun sistemle ilgili hasarlar oluşur. Akrozomda, çekirdekte, mitokondride ve plazma membranında değişiklikler meydana gelir (Baccetti et al. 2002).

Diyabet ile yapılan çalışmalarda normal sperm grubunda daha yüksek fertilizasyon oranı gözlemlenirken, diyabet grubunda bu oranın daha düşük olduğunu, ayrıca blastokiste gitme oranının da düştüğünü gösteren araştırmalar mevcuttur (Kim and Moley, 2008).

Diyabetlilerde oksidatif stres reaktif oksijen ürünlerinin artması ile artmış, antioksidanlara karşı koruma gücü azalmıştır (Giron et al. 1999; Wiernsperger, 2003). Lipid oksidasyonu, proteini ve diğer DNA gibi makromoleküller diyabet geliştikçe artar (Ohkawa ve ark. 1979). Bunun oksidatif stres sonucu meydana geldiği düşünülür (Lee et al. 1997). Sperm DNA'sındaki ve lipid yapısındaki oksidatif stres motiliteyi engeller ve insan fertilitasını azaltır (Chen et al. 1997; Kao et al. 1998).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışma, Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak yapıldı (Proje No: 2010/22). Deney hayvanları olarak, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsünden temin edilen, CD-1 ırkı, 15-25 gr ağırlığında 12 haftalık fareler kullanıldı. Fareler deneysel tıp araştırma ve uygulama birimi olan DETAB' da bakıldı ve sakrifikasyon zamanına kadar burada tutuldu.

Çalışmada 25 dişi, 20 erkek fare kullanıldı. Erkek ve dişi fareler ayrı kafeslerde tutuldu. Temel olarak erkek fareler diyabet ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Dişi farelere oositlerinin gelişmesi için kontrollü ovaryan stimülasyonu uygulandı. Deney süresince hayvanlar normal çeşme suyu ve yem fabrikasından elde edilen yemlerle beslendi.

#### 3.2. IVF Protokolü:

##### 3.2.1. Sperm Toplanması:

- Öncelikle 12 haftalık CD-1 ırkı erkek fareler sakrifiye edildi.
- Epididimis ve vas deferens disseksiyon ile alındı.
- Farelerin epididimleri, 90 derece açı verilmiş iğne uçları (insülin enjektör uçları) ve forsepsler ile özellikle kaudal epididimisten ve vas deferensten spermler sıvazlanarak toplandı. Alınan organlar kurumaması için yıkama medyumu ile sürekli olarak ıslatıldı.
- Yıkama medyumu ile toplanan spermler boş bir tüpe aktarıldı.

##### 3.2.2. Gradyent:

- 1 ml %90' lık gradyent boş tüpe yavaşça eklendi. Üzerine 1 ml %50' lik gradyent karışmaması için yavaşça eklendi. Son olarak gradyentlerin üzerine 1 ml sperm eklendi.
- 1200 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü, altta 0.5 cc kalan bulut şeklinde spermlerin üzerine gazlanmış yıkama medyumu eklendi ve 1800 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki süpernatant alındı.
- Pellet kapasitasyon medyumuna alındı.

##### 3.2.3. Sperm Kapasitasyonu:

- Spermler 1-1.5 saat boyunca kapasitasyon medyumunda %5' lik karbondioksit bulunan kontrollü inkübatörde bekletildi.

- Motil spermiler genellikle medyumun yüzeyine çıktıkları için tekrar pipetaj yaparak tüm spermiler arasından, seçim yapmadan spermiler alındı.

#### **3.2.4. Oosit Toplanması:**

- Sakrifiye edilen dişi farelerin fallop kanalları ve ovaryumları çıkarıldı, içinde yıkama medyumunu bulunan petri kabına aktarıldı.
- Stereo mikroskop altında bu kanallar yıkandı ve çıkan oosit-kumulus kompleksleri içinde gazlanmış yıkama medyumunu bulunan daha küçük petri kabına alındı.

#### **3.2.5. Kumulus-oosit kompleksi:**

- Kumulus-oosit kompleksi bir kez yıkama medyumunu ile yıkandıktan sonra fertilizasyon medyumuna aktarıldı.

#### **3.2.6. İnseminasyon:**

- Fertilizasyon medyumunu, petri kabına 150 µl gazlanmış yıkama medyumunu konularak hazırlandı. Kuyucuklar, üzerini kaplayacak şekilde yağla örtüldü.
- Her bir kuyucukta dört oosit bulunan fertilizasyon medyumuna, ml' deki sperm sayısı 1 milyon olacak şekilde, pipet ile oosit başına 10µl sperm koyuldu.
- İnkübatörde kapasite edilen spermiler oosit başına bu oranlarda verilmek üzere hesaplanır.

#### **3.2.7. Zigotlar:**

- Döllenme inseminasyondan 16-18 saat sonra kontrol edildi ve sitoplazmada iki pronükleus, perivitellin aralıkta iki polar body bulunan zigot döllenmiş kabul edildi.
- 24. saatte ise bölünen embriyolar 2 hücreli aşamada olmalılar.
- Bu aşamada zigotlar dikkatlice fertilizasyon medyumundan alınıp bir gün önce hazırlanıp gazlanmış olan embriyo klivaj (embryo bölünme) medyumuna aktarıldı.
- Embriyo klivaj medyumunu 2. günün sonunda değiştirilir.

#### **3.2.8. Embriyo Kültürü:**

- Zigotlar embriyo gelişimini incelemek amacıyla 4. güne kadar inkübe edildi.
- Embriyolar ikinci günde dört, üçüncü günde sekiz hücreli aşamaya gelir.

### **3.3. Deney Grupları:**

Erkek ve dişi fareler ayrı kafeslerde tutulmak koşuluyla, 25 adet dişi 20 adet erkek toplam 45 adet CD1 ırkı fare kullanıldı. Ölen ve diyabet olmayan fareler deneye dahil edilmedi. Sonuç olarak erkek fareler her bir grupta 10'ar adet olmak üzere diyabet ve kontrol grubu olarak ikiye ayrıldı.

Dişi farelerin tümüne kontrollü ovarıan stimölasyonu uygulandı:

Kontrollü ovarıan stimölasyon oluşturma protokolü; McGill Üniversitesi Jinekoloji ve Obstetrik Departmanı Reprodüktüf Biyoloji Bölümünden Ri – Cheng Chian , Ph.D. tarafından geliştirilmiş ve çalışmamızda referans olarak kullanılmıştır.

### **PROTOKOL**

1.Gün: Dişi farelere saat 18.00' de intraperitoneal (i.p) olarak 5 IU(100 µl) PMSG (gebe kısrak serum gonadotropini) enjekte edildi.

3.Gün: Dişi farelere saat 18.00' da i.p yolla 5 IU(100 µl) hCG (insan koryonik gonadotropini) enjekte edildi. Bu işlem gonadotropin enjeksiyonundan yaklaşık olarak 48 saat sonra yapıldı.

4. Gün: Olgunlaşmış oositleri toplamak amacıyla hCG enjeksiyonundan 12-14 saat sonra dişi fareler sakrifiye edildi.

#### **3.3.1. Kontrol Grubu:**

Kontrol grubundaki erkek farelere yeni hazırlanmış sitrat (ph 4.5) tamponu intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Erkek farelerin sakrifikasyon zamanı, dişi farelere stimölasyon protokolü uygulanan zaman ile denk getirildi. Sakrifiye edilen erkek farelerden spermler toplandı.

#### **3.3.2. Diyabet Grubu:**

Diyabet grubu erkek farelere 100 mg/kg olmak üzere sitrat tamponu (ph' ı 4.5) içinde çözülen streptozotosin (Sigma Chemical Co. Ltd) verilerek diyabet yapıldı. STZ intraperitoneal olarak, erkek farelerin vücut ağırlıklarının ortalaması hesap edilerek verildi. STZ miktarını belirlemek için Animal Models of Diabetic Complications Consortium (www.amdcc.com)' un düşük ve yüksek doz uygulamaları protokolünden yararlanıldı. STZ verilmesinden 7 gün sonra kan şekeri analizi için kuyruk veninden kan örneği alındı ve glukoz seviyesi 200 mg/dl olan fareler diyabet kabul edildi. Kronik diyabetin oluşması için fareler 20 gün daha bekletildi. Bu koşullara uyan fareler sakrifiye edildi ve spermleri toplandı.

### **3.4. Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi İçin Diff Quik Boyama**

- 1) Bu işlem için önce semen hematokrit pipeti ile bir damla lam üzerine yayıldı. Daha sonra bir başka lamel yardımıyla ince, homojen yayma yapıldı
- 2) Lam kuruması için oda ısısında 20 dakika bekletildi
- 3) Kuruyan preperatlar Diff-Quik fiksatif solüsyonuna batırılarak 15 saniye bekletildi
- 4) Lamlar; absorban kağıt üzerine diklemesine yerleştirilerek fazla solüsyon akıtıldı
- 5) Fikse olan spermeler nükleus boyaması için 10 saniye süreyle nükleus solüsyonuna batırıldı. Fazla solüsyon absorban kağıtın üzerine konularak akıtıldı
- 6) Daha sonra 5 saniye süreyle sitoplazmik boyaya batırıldı
- 7) Fazla boyayı atmak için lamlar akan sudan 10-15 kez geçirildi
- 8) Suyu akıtmak için lamlar dik konumda yerleştirildi ve tamamen kurumaları sağlandı
- 9) Değerlendirme; 1000 büyütmede immersiyon yağı ve objektifi kullanılarak yapıldı.

### **3.5. Fareye ait Spermelerin Morfolojik Değerlendirilmesi**

Özellikle kaudal epididimden alınan, sperm yayma yöntemi ile hazırlanan ve Diff-Quik boyası ile boyanan preperatlarda her bir kontrol grubundan 4 yayma hazırlandı. Her bir yaymanın düzenli olarak değiştirilen bölgelerinden 200 adet olmak üzere kontrol grubu için toplam 800 adet, aynı Şekilde diyabet grubu için toplam 800 adet sperm sayıldı. Kim ve arkadaşlarının (1999) kriterlerine göre normal ve anormal spermeler saptandı, literatüre uygun olarak sınıflandırıldı. Bunlar normal, küçük başlı, amorf, anormal engelli (kr veya çengelsiz) baş, kıvrık kuyruk, kısa kuyruk, çift baş veya çift kuyruklu Şeklinde değerlendirildi. Değerlendirilen spermeler arasında kıvrık orta parçalı spermeler sıkça görüldüğü için bu anomali de eklenerak kriterler tarafımızdan modifiye edildi. Anormal morfolojideki sperm sayısı yüzde oran cinsinden ifade edildi. Tüm sperm morfolojileri 1000 büyütmede işık mikroskobu altında belirlenmesine rağmen, çekilen fotoğraflar invert mikroskop ile görüntüleme sistemi yardımıyla çekilmiştir.

### **3.6. Farelerde Motilite Tespiti**

Motilite tespitinde kullanılan araçların temiz olmasına dikkat edildi. Epididimden ve vas deferensten elde edilen spermelerden bir damla lama damlatılarak faz kontrast mikroskop altında, 200 büyütmede sayıldı. Progresif motil sperm oranları yüzde cinsinden belirlendi.

### **3.7. Embriyo Morfolojisinin Belirlenmesi**

Embriyo kalitesi; blastomerlerin sayısı, büyüklüğü, perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyonların büyüklüğü ve miktarına göre değerlendirildi.

Grade A embriyo (iyi kalite embriyo); blastomerler yuvarlak ve eşit büyüklükte, fragmantasyonu olmayan veya %20' nin altında olan, 2. gün 4 blastomer, 3. gün 8 blastomer içeren embriyolardır.

Grade B embriyo; Grade A' nin dışında kalan, blastomerleri eşit büyüklükte olmayan, fragmantasyonu %20' den fazla olan, 2. gün 4 hücrenin altında 3.gün 8 hücrenin altında blastomere sahip olan embriyolardır.

### **3.8. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Medyumlar**

#### **3.8.1. Streptozotosin**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 D-89555 STEINHEIM. Ürün numarası S0130, gramajı 500 mg. Diyabet eldesi için kullanılan kimyasal sitrat buffer içinde çözüldü ve pH' ının 4.5 olmasına dikkat edildi. Uygulamadan yaklaşık 10 dakika önce hazırlandı ve karanlık ortamda tutuldu.

#### **3.8.2. Gebe Kısarak Serum Gonadotropin (Pregnant mare serum gonadotrophin-PMSG)**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 D-89555 STEINHEIM. Ürün numarası G4527, gramajı ise 50IU. Bu kimyasal folikül stimülasyonu için kullanıldı ve sodyum klorür ile seyreltildi.

#### **3.8.3. İnsan Koryonik Gonadotropin (Human Chorionic Gonadotrophin-hCG)**

Foliküler olgunlaşmayı ve ovulasyonu tetiklemek için Ovitrelle Flakon kullanılmıştır. Birim miktarı 250 mikrogram.



#### **3.8.4. Yıkama Medyumları**

Sperm ve oosit yıkamak için Hapes tamponlu HTF veya sadece HTF medyumları kullanıldı.

Irvine Scientific marka (2511 Daimler Street Santa Ana, California 92705-5588) Hapes medyumunu kullanıldı. Ürün numarası 9319.

Life Global marka HTF medyumunu kullanıldı. Katalog numarası GMHT-100, birim miktarı ise 100 ml.

HTF medyumunun içine, aseptik koşul yaratmak ve yapışmayı önlemek amacıyla, 1:10 oranında HSA medyumunu konuldu. Katalog numarası 9988, birim miktarı 12x5 ml.

#### **3.8.5. Fertilizasyon ve Kapasitasyon Medyumları**

Fertilizasyon ve kapasitasyon için Life Global marka HTF medyumunu kullanıldı. Katalog numarası GMHT-100, birim miktarı 100 ml.

Sodyum klorid, potasyum klorid, kalsiyum klorid, potasyum fosfat, magnezyum sülfat, sodyum bikarbonat, glukoz, laktat sodyum tuzu, sodyum piruvat, gentamisin, fenol kırmızısı.

#### **3.8.6. Klivaj ve Blastokist Medyumunu**

Embriyo klivajı ve blastokist gelişimi için Life Global marka Global medyumunu kullanıldı. Katalog numarası LGGF-100, birim miktarı ise 100 ml. Medyumun içeriği:

Sodyum klorid, potasyum klorid, kalsiyum klorid, potasyum fosfat, magnezyum sülfat, sodyum bikarbonat, glukoz, laktat sodyum tuzu, sodyum piruvat, amino asitler, EDTA, gentamisin, fenol kırmızısı.

#### **3.8.7. Diff-Quik Boyası**

Sperm morfolojisi değerlendirilmesi için Tech-Lab' ın ürettiği Diff-Quik boya kullanıldı. Katalog numarası T30525C. Boyanın içeriği;

- Diff-Quik fiksatif;  
Triarilmetan boyası  
Metanol
- Diff-Quik solüsyonu I (eozinofilik)  
Ksantin boyası  
ph tamponu  
Sodyum azid
- Diff-Quik solüsyonu II (bazofilik)  
Tiazin boyası

pH tamponu

### **3.8.8. Glukometre**

Accu-Check Go Roche (mg/dl)

### **3.8.9. Görüntüleme Sistemi**

OCTAX Eyeware MX 2.0

### **3.8.10. İnkübatörler**

SANYO O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> inkübatör MCO-18M

### **3.8.11. Mikroskoplar**

Olympus IX71 inverted mikroskop

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

Olympus CX31 faz kontrast mikroskop

### **3.9. İstatistiksel Veriler**

Her iki grup arasındaki sperm morfolojisini ve anormal kriterler arasındaki farkı belirlemek için MedCalc version 12.0.3' ün Chi-Square (Ki-kare,  $\chi^2$ ) testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  sağlayan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar olarak kabul edilmiştir.

Oosit sayılarının ve embriyo oranlarının karşılaştırıldığı istatistiksel veriler SPSS 13.0' ın nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve diyabet gruplarının değerleri karşılaştırıldığında  $p < 0.05$  gözlenen p değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar olarak kabul edilmiştir.

#### 4. BULGULAR

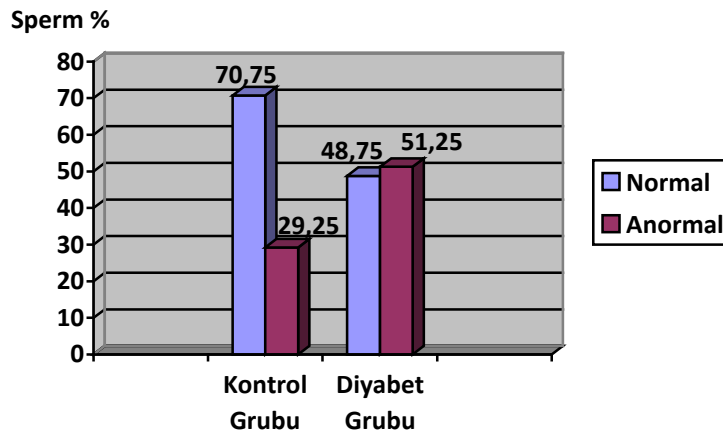
Çalışmamızda iki grup mevcuttur. Bu gruplar:

1. Grup: Kontrol Grubu
2. Grup: Diyabet Grubu

10 adet kontrol, 10 adet diyabet grubu erkek fare sakrifiye edildikten sonra spermler epididimin kaudal bölümünden ve vas deferensten alındı. Hazırlık işlemlerinden geçirildikten sonra bir kısmı ile morfolojik değerlendirme için yayma yapıldı. Morfoloji, Kim' in kriterlerine göre değerlendirildi. Normal ve anormal spermler saptanarak oran cinsinden karşılaştırıldı. Bir kısmı ise motilite değerlendirmesi için lama yayıldı. İki grubun progresif motil spermleri oran cinsinden karşılaştırıldı. Spermlerin kalan kısmı ise IVF işlemine tabi tutularak fertilizasyon oranları, Grade A ve Grade B embriyolar sayılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Bunlara ek olarak her iki grup arasında gelişimi durmuş embriyo oranları belirlendi.

Morfoloji değerlendirmesi için her bir gruptan 800 adet olmak üzere toplam 1600 adet sperm sayıldı. Bulgularımız sonucunda normal morfolojiye sahip spermlerin sayısı kontrol grubunda 566, diyabet grubunda 390 olarak sayıldı. Bu veriler oransal olarak kontrol grubunda %70.75, diyabet grubunda %48.75' dir. Anormal sperm sayıları ise kontrol grubunda 234, diyabet grubunda 410 olarak saptandı. Oransal olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunda %29.25, diyabet grubunda ise %51.25 oranında saptandı (Çizelge 4.1). Kontrol ve diyabet grubuna ait normal morfolojideki spermler sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2' de gösterilmiştir. Semende görülen anormal spermler diyabet grubunda kontrol grubuna oranla yüzde 75.21 oranında arttığı saptanmıştır. Bu değerlerin istatistiksel açıdan anlamlılığına bakıldığında ( $\chi^2 = 79.589$ ,  $p < 0.0001$ ) ortaya çıkan değerler anlamlı olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** Kontrol ve Diyabet Grubu Sperm Morfolojisi Yüzdesi



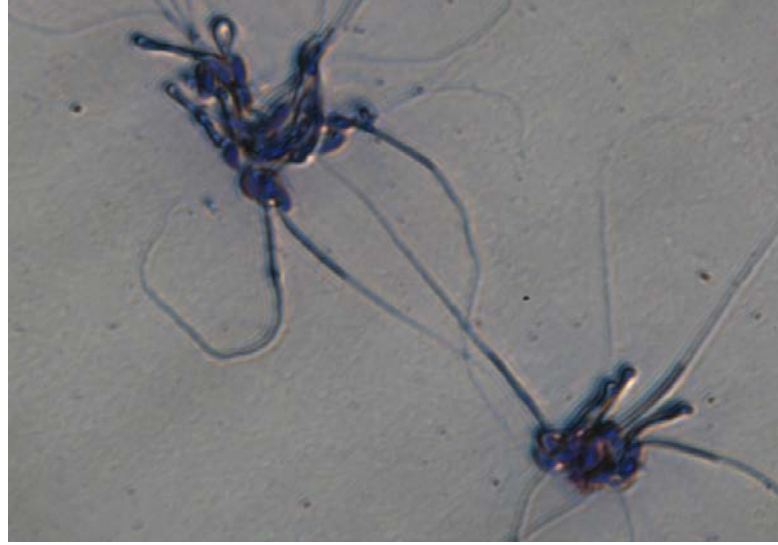


**Şekil 4.1.** Kontrol grubuna ait normal morfolojideki spermler görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.2** Diyabet grubuna ait normal morfolojideki spermler görülmektedir. 40x inverted mikroskop

Gözlemlerimiz sonucunda, fare spermlerini baş kısmında yer alan apikal kanca yardımıyla birbirlerine tutundukları için bazı kısımlarda 10-50 hücreli küme şeklinde spermler olduğunu gördük (Şekil 4.3).

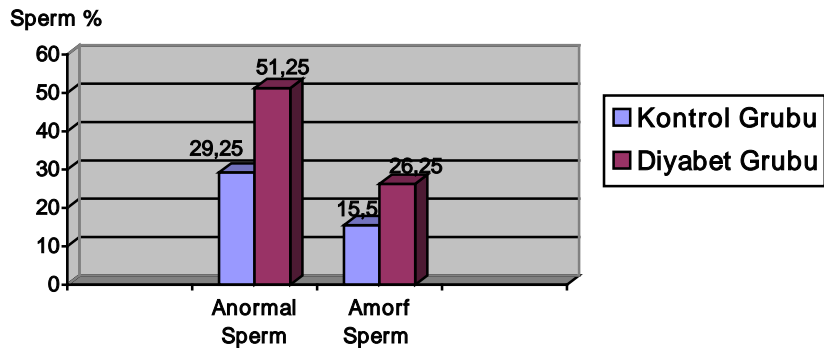


**Şekil 4.3.** Normal gruptaki kümeleşmiş fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop

Elde edilen spermleri amorf spermler (Şekil 4.4, Şekil 4.5), çengelsiz spermler (Şekil 4.6, Şekil 4.7), kıvrılmış orta parçalı spermler (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10), kıvrık kuyruklu spermler (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14) ve kısa kuyruklu spermler (Şekil 4.15) olarak ayrıntılı morfolojik kriterler ile değerlendirdiğimizde, diyabet grubunda kontrol grubuna göre artış gözlemlendi.

Çalışmamızda anormal spermler arasında değerlendirilen amorf sperm sayısı kontrol grubunda 127, diyabet grubunda 210 adet tespit edilmiştir. Oranları ise kontrol grubunda %15.5 diyabet grubunda %26.25 olarak bulundu (Çizelge 4.2, Çizelge 4.7). Bu değerler istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında çıkan fark anlamlıdır ( $\chi^2 = 45.534$ ,  $p < 0.0001$ ). Yapılan yaymalarda istisna olarak çift kuyruklu spermler de gözlemledik (Şekil 4.11, Şekil 4.14).

**Çizelge 4.2.** Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Amorf Sperm Yüzdeleri





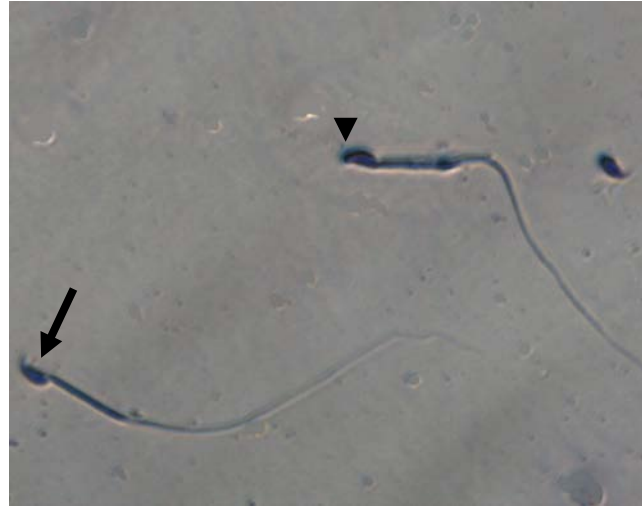
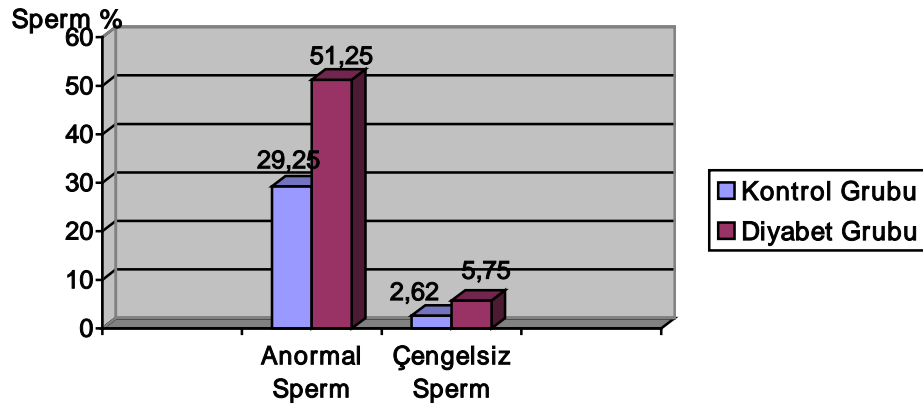
**Şekil 4.4.** Kontrol grubuna ait amorf fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.5.** Diyabet grubuna ait amorf fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop

Anormal spermler grubuna dahil çengelsiz sperm sayıldığında kontrol grubu farelerde (Şekil 4.6) 21, diyabet grubu farelerde ise (Şekil 4.7) 46 adet olduğu tespit edildi. Oranı kontrol grubu farelerde %2.62, diyabet grubu farelerde ise %5.75 olarak saptandı (Çizelge 4.3, Çizelge 4.7). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $\chi^2 = 18.752$ ,  $p < 0.0001$ )

**Çizelge 4.3.** Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Çengelsiz Sperm Yüzdesi



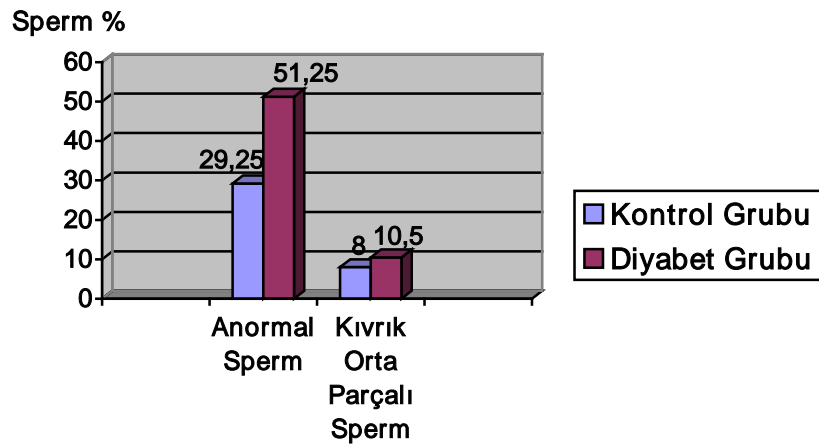
**Şekil 4.6.** Kontrol grubuna ait normal fare spermi (ok) ve çengelsiz başlı fare spermi (ok başı) görülmektedir. 40x inverted mikroskop



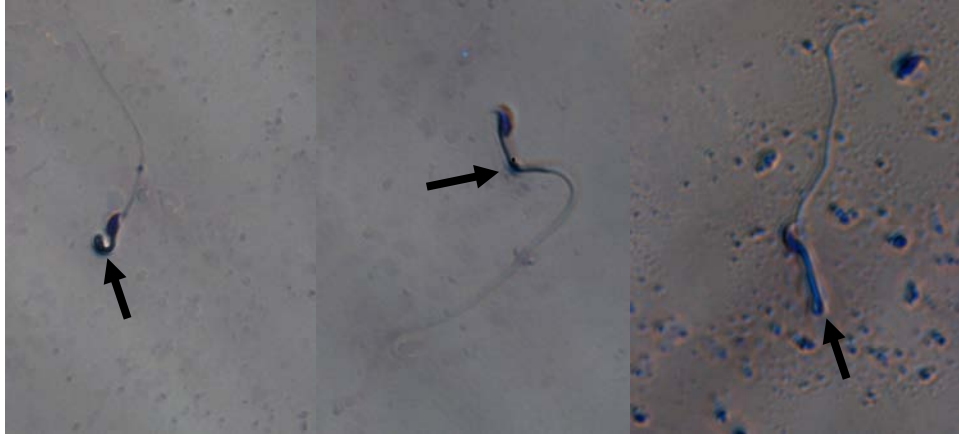
**Şekil 4.7.** Diyabet grubuna ait çengelsiz fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop

Bulgularımızda sıklıkla rastladığımız anormal spermlerden olan kıvrık orta parçalı spermlerin kontrol grubunda 64 (Şekil 4.8), diyabet grubunda 84 adet olduğunu (Şekil 4.9, 4.10) tespit ettik (Çizelge 4.7). Bu defekt, kontrol grubunun %8' ini, diyabet grubunun ise %10.5' ini oluşturmaktadır (Çizelge 4.4, Çizelge 4.7). Çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $\chi^2 = 12.683$ ,  $p=0.0004$ )

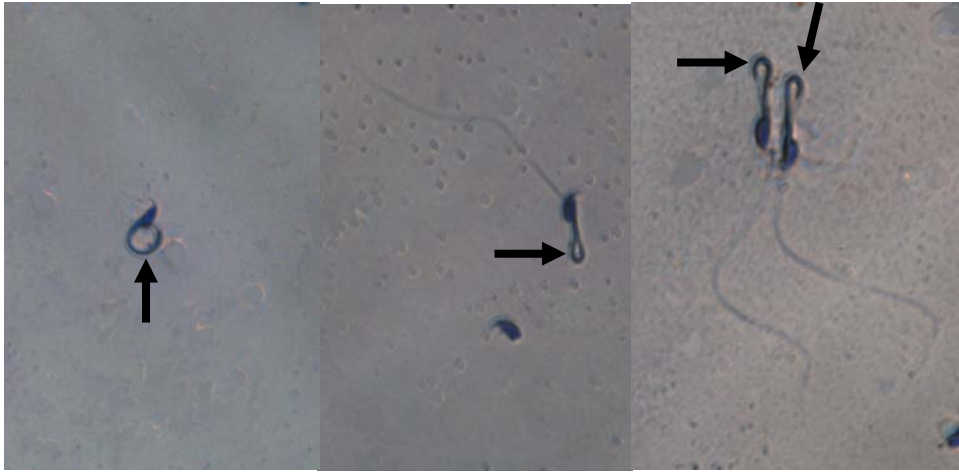
**Çizelge 4.4.** Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kıvrık Orta Parçalı Sperm Yüzdesi







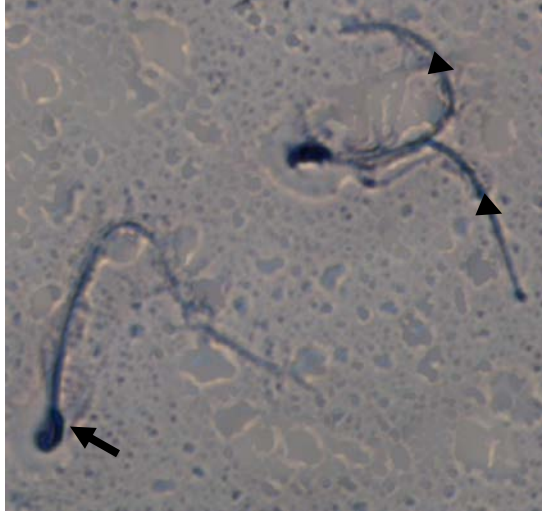
**Şekil 4.8.** Kontrol grubuna ait kıvrık orta parçalı sperm (ok) görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.9.** Diyabet grubuna ait kıvrık orta parçalı sperm (ok) görülmektedir. 10x inverted mikroskop



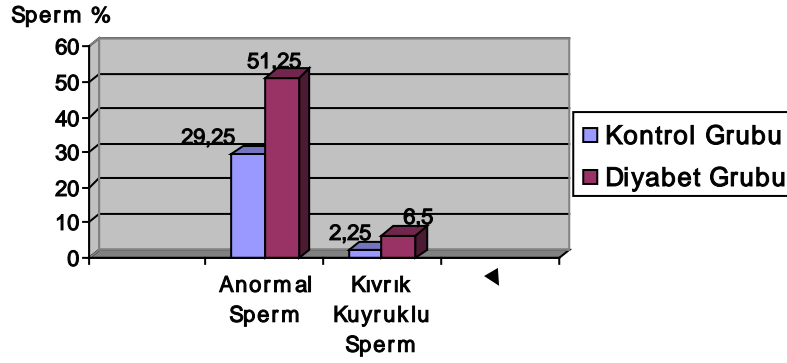
**Şekil 4.10.** Diyabet grubu solda kıvrık orta parçalı sperm, sağda normal sperm (ok başı) görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.11.** Diyabet grubuna ait solda (ok ile gösterilmiş) amorf sperm, sağda ise (ok başları ile gösterilmiş) çift kuyruklu sperm gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop

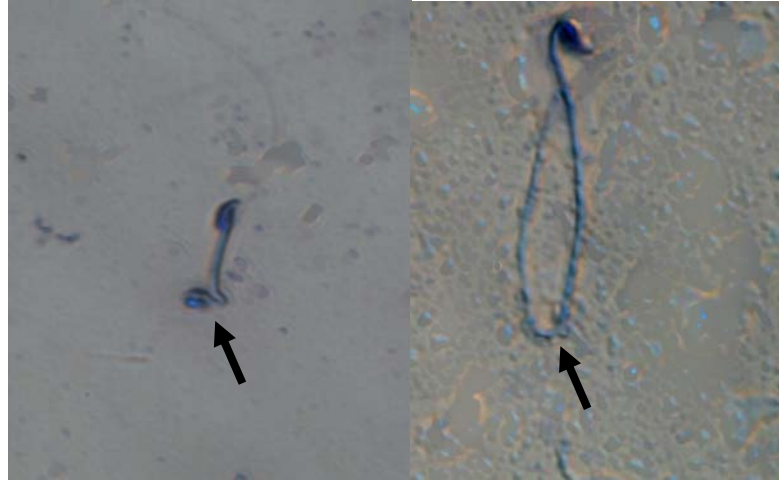
Kim' in kriterlerine göre kıvrık kuyruklu sperm sayısını kontrol grubunda 18 (Şekil 4.12), diyabet grubunda 52 (Şekil 4.13), oranını ise sırasıyla %2.25 ve %6.5 olarak bulduk (Çizelge 4.5, Çizelge 4.7). Çıkan veriler istatistiksel olarak anlamlıdır ( $\chi^2=28.484$ ,  $p<0.0001$ ).

**Çizelge 4.5.** Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kıvrık Kuyruklu Sperm Yüzdesi





**Şekil 4.12.** Kontrol grubu kıvrık kuyruklu spermleri. 40x inverted mikroskop



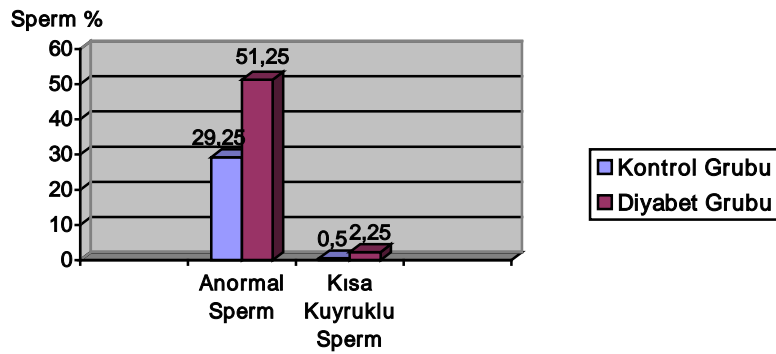
**Şekil 4.13.** Solda diyabet grubu, sağda kontrol grubu kıvrık kuyruklu sperm görülmektedir. 40x inverted mikroskop

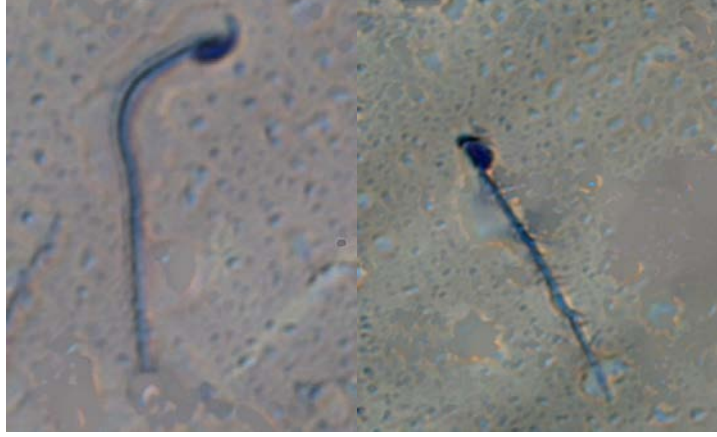


**Şekil 4.14.** Diyabet grubuna ait solda (ok) kıvrık kuyruklu, sağda ise (ok başı) çift kuyruklu fare spermı görülmektedir. 40x inverted mikroskop

Kısa kuyruklu sperm sayısını kontrol grubunda 4, diyabet grubunda 18 (Şekil 4.15) tespit ettik. Tüm spermier içindeki oranı kontrol grubunda %0.5, diyabet grubunda %2.25' tir (Çizelge 4.6, Çizelge 4.7). Bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlılığına bakıldığında çıkan değer  $\chi^2 = 13.245$  ve  $p=0.0003$  olarak anlamlı bulunmuştur. Sperm morfolojisine ait bulunan tüm sonuç ve değerler Çizelge 4.7' de verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Kontrol ve Diyabet Gruplarındaki Anormal Sperm ve Kısa Kuyruklu Sperm Yüzdesi





**Şekil 4.15.** Diyabet grubuna ait kısa kuyruklu spermler. 40x inverted mikroskop



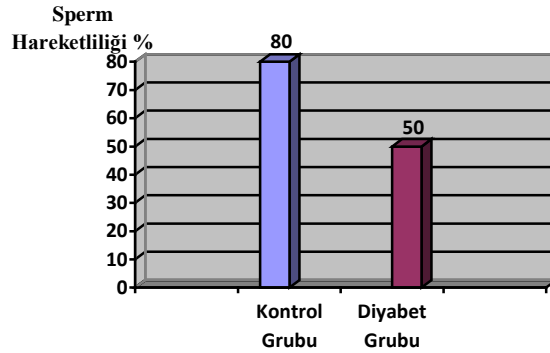
**Şekil 4.16.** Kontrol grubuna ait fare spermleri görülmektedir. Üstte solda (kalın ok) normal morfolojideki fare spermi, üstte sağda (ince ok) amorf fare spermi, altta (ok başı) yapışık fare spermleri görülmektedir. 40x inverted mikroskop

**Çizelge 4.7.** Sperm Morfolojisi Sonuç ve Değerleri

	Normal		Anormal		Amorf		Çengelsiz		Kıvrık Orta Parça		Kıvrık Kuyruk		Kısa Kuyruk	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Kontrol Grubu	566	70.75	234	29.25	127	15.87	21	2.62	64	8	18	2.25	4	0.5
Diyabet Grubu	390	48.75	410	51.25	210	26.25	46	5.75	84	10.5	52	6.5	18	2.25
$\chi^2$	79.589				45.534		18.752		12.683		28.484		13.245	
p	p<0.0001				p<0.0001		p<0.0001		p=0.0004		p<0.0001		p=0.0003	

Fare sperm motilitesi, lam alanı içindeki hızlı ileri ve yavaş ileri hareketli spermelerin sayısına bakılarak değerlendirildi. Kontrol ve diyabet gruplarının her birinden 800 sperm değerlendirildi. Progresif motil spermeler; kontrol grubunda yüzde 80, diyabet grubunda ise yüzde 50 oranında gözlemlendi (Çizelge 4.8). Diyabet grubunda motilite kontrol grubu spermelerine oranla yüzde 37.5 azalmıştır. Çıkan sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $\chi^2=156.926$ ,  $p<0.0001$ ).

**Çizelge 4.8.** Kontrol ve Diyabet Grubu Hareketli Sperm Yüzdesi

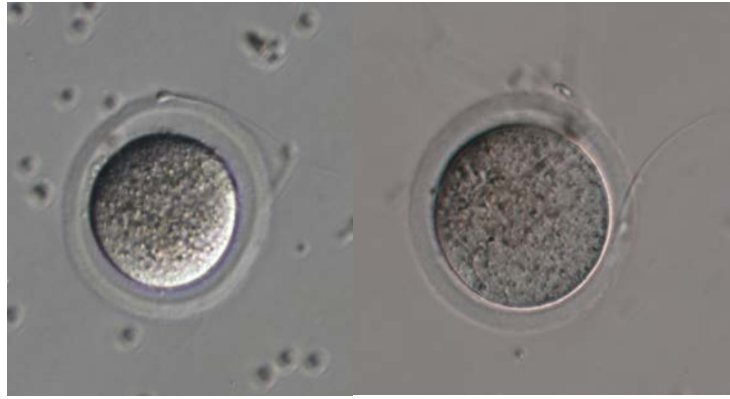


Morfoloji ve motilite değerlendirmesinden sonra kalan spermeleri, stimülasyon uygulanmış dişi fare oositlerinde IVF işlemi için kullandık. Toplam 25 dişi farenin 12 tanesinden elde edilen 130 oosit, kontrol grubu spermeleri ile döllenmek için ayrıldı. Kalan 13 dişi fareden elde edilen 134 oosit, deney grubu spermeleri ile döllenmesi için ayrıldı. Bu iki grup arasındaki oosit sayıları normal dağılım göstermektedir. Kontrol grubu spermeleri ile döllenecek olan dişi farelerden ortalama  $10.83 \pm 0.44$ , diyabet grubu spermeleri ile döllenecek olan dişi farelerden ortalama  $10.30 \pm 0.42$  adet oosit çıkmıştır. Kontrol ve diyabet grubu spermeleri ile döllenecek olan oosit sayıları arasındaki fark anlamsızdır ( $p=0.406$ ). Bu değerlendirme bize deneyin sağlıklı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulmuş erkek farelerde görsel olarak kilo kaybı, halsizlik ve özellikle burun kenarlarında tüy dökülmesi gözlemledik.

Kontrol grubu spermleri ile döllenmeye bırakılan 130 oositin 87'si, diyabet grubu spermleri ile döllenmeye bırakılan 134 oositin 68'i döllenebilmiştir. 2 pronukleus ve 2 polarbody içeren zigotlar fertilizasyonu gerçekleştirmiş zigotlar olarak kabul edildi. IVF işlemi uygulanan oositlere, spermin penetrasyonları görülmektedir (Şekil 4.17).

Fertilizasyon oran ortalaması kontrol grubunda 66.72, diyabet grubunda 51.14'tir. Bu oran, diyabet grubunda anlamlı derecede düşüktür ( $p=0.000$ ) (Çizelge 4.9). Bu veriler bize, diyabetik farelerde fertilizasyon kalitesinin anlamlı derecede düştüğünü gösterir.



**Şekil 4.17.** IVF işleminde spermin zona pelusidaya penetrasyonları görülmektedir. 10x inverted mikroskop

Döllenme sonucunda elde ettiğimiz embriyoların kalitesi Daniel' in kriterine göre; blastomer sayısı, blastomer büyüklüğü ve perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyonlara göre değerlendirildi. Embriyolar Grade A ve B olarak ikiye ayrıldı. Blastomerleri eşit büyüklükte, sitoplazmada fragmantasyonu %20'nin altında olan, 3. gün 8 blastomer içeren embriyolar Grade A; blastomerleri eşit büyüklükte olmayan, sitoplazmasındaki fragmantasyon oranı %20'den fazla olan ve 3. günde 8'den daha az sayıda blastomere sahip embriyolar ise Grade B olarak kabul edildi.

3. gün kontrol grubunda fertilize olan 87 embriyonun 16'sı Grade A, 44'ü Grade B, 27'si ise gelişimi durmuş embriyodur. Diyabet grubunda fertilize olan 68 embriyonun, 9'u Grade A, 24'ü Grade B, 35'i gelişimi durmuş embriyodur.



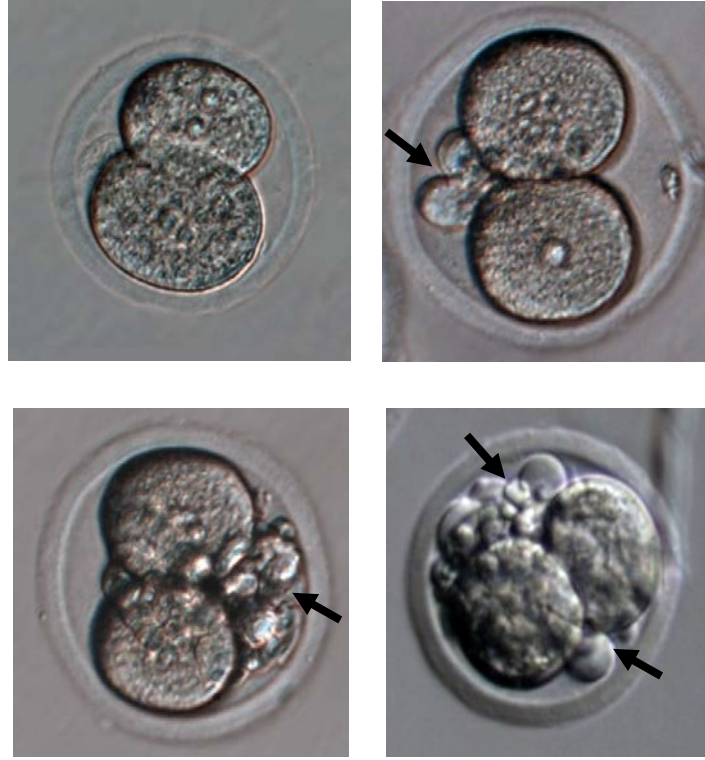
Kontrol grubunda Grade A olarak değerlendirilen embriyoların oran ortalaması 17.84, Grade B olarak değerlendirilen embriyoların oran ortalaması 51.67, gelişimi durmuş embriyoların oran ortalaması ise 30.48' dir. Diyabet grubunda Grade A olarak değerlendirilen embriyoların oran ortalaması 11.75, Grade B olarak değerlendirilen embriyoların oran ortalaması 34.85, gelişimi durmuş embriyoların oran ortalaması ise 53.38' dir. Bu veriler sonucu iki grup arasındaki Grade A embriyo oranı  $p=0.376$  çıkmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grade B embriyo oranı  $p=0.001$  ve gelişimi durmuş embriyo oranı  $p=0.003$  olarak bulunmuştur. Bu iki değer istatistiksel açıdan anlamlıdır (Çizelge 4.9).

Embriyoların fragmentasyon oranları birinci günde değerlendirildiğinde değişik derecelerde fragmentasyon oranları (Şekil 4.18, 4.19) ve değişik büyüklükte blastomerler (Şekil 4.20, 4.21, 4.22) gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.18.** Birinci gün, kontrol grubu, iki blastomerli solda fragmentasyon içermeyen, sağda %5 fragmentasyon içeren embriyo görülmektedir. 40x inverted mikroskop

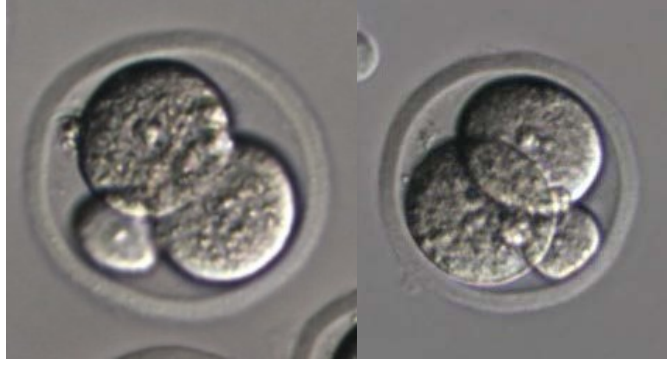




**Şekil 4.19.** Diyabet grubu birinci gün embriyoları. Sol üstte fragmentasyonsuz, sağ üstte %10 fragmente, sol altta %30 fragmente, sağ altta %50 fragmente embriyo. Fragmentasyonlar ok ile gösterilmiştir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.20.** Birinci güne ait solda kontrol grubu, sağda diyabet grubu simetrik embriyoları. 40x inverted mikroskop

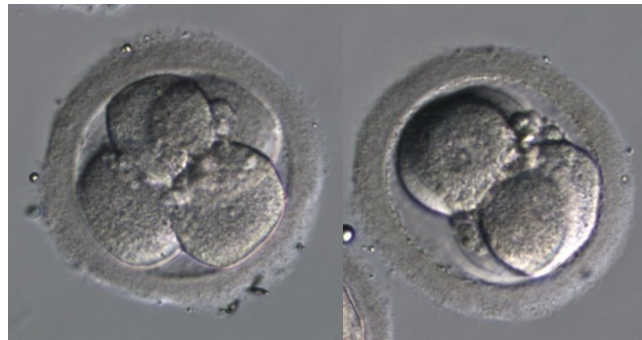


**Şekil 4.21.** Birinci gün asimetrik üç blastomerli kontrol grubu embriyoları. 40x inverted mikroskop

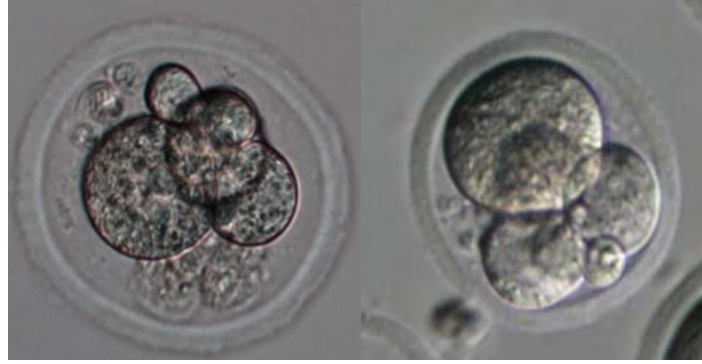


**Şekil 4.22.** Birinci gün asimetrik blastomerli diyabet grubu embriyoları. 40x inverted mikroskop

İkinci gün embriyolarının fragmantasyon oranları değerlendirildiğinde eşit (Şekil 4.23 ) veya değişik büyüklükte blastomerler (Şekil 4.24, 4.25) ve değişik derecelerde fragmantasyon oranları (Şekil 4.26, 4.27) gözlemledik.



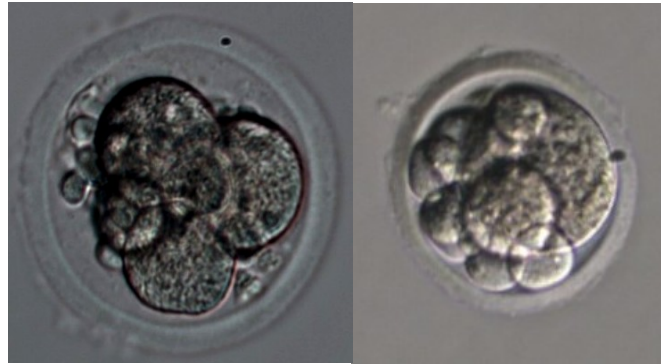
**Şekil 4.23.** Kontrol grubu ikinci gün dört blastomerli simetrik embriyolar. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.24.** Kontrol grubu ikinci gün asimetrik dört blastomerli embriyolar. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.25.** Diyabet grubu ikinci gün asimetrik dört blastomerli embriyolar. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.26.** Kontrol grubu ikinci gün embriyoları. Solda fragmentasyonu %15, sağda %30 olan embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop.



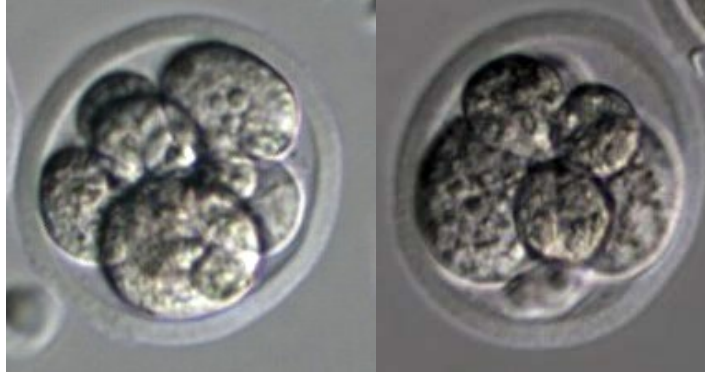
**Şekil 4.27.** Diyabet grubu ikinci gün solda %30 fragmentasyon, sağda %70 oranında fragmentasyon gözlenen embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.28.** Diyabet grubu ikinci güne ait embriyoların farklı gelişim durumları görülmektedir. Solda asimetrik 4 blastomerli, sağda ise asimetrik 2 blastomerli gelişimi geri kalmış embriyo görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.29.** Solda kontrol grubu, sağda diyabet grubuna ait, üçüncü gün simetrik sekiz blastomerli Grade A embriyolar. 40x inverted mikroskop

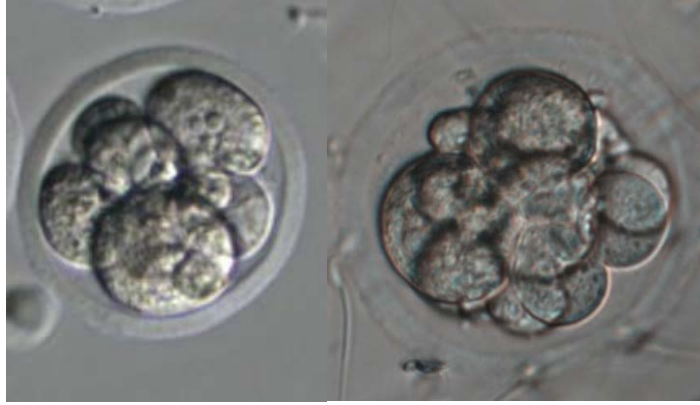


**Şekil 4.30.** Kontrol grubu üçüncü gün asimetrik blastomerli Grade B embriyolar. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.31.** Diyabet grubu üçüncü gün asimetrik blastomerli Grade B embriyolar. 40x inverted mikroskop





**Şekil 4.32.** Üçüncü gün, fragmantasyon içermeyen, solda kontrol grubu sağda ise diyabet grubu embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.33.** Diyabet grubu üçüncü gün ileri derecede fragmantasyona sahip embriyolar görülmektedir. 40x inverted mikroskop



**Şekil 4.34.** Kontrol grubuna ait üçüncü gün embriyoları. Solda (ince ok) 8 blastomerli Grade A embriyo, ortada döllenmemiş oosit, sağda (ok başı) 2 blastomerli gelişimi durmuş embriyo. 10x inverted mikroskop

**Çizelge 4.9.** Kontrol ve Diyabet Grubu İstatistiksel Verileri

	Fertilizasyon Oranı (Ortalama±Standart Sapma)	3. Gün Grade A Embriyo Oranı (Ortalama±Standart Sapma)	3. Gün Grade B Embriyo Oranı (Ortalama±Standart Sapma)	Gelişimi Durmuş Embriyo Oranı
Kontrol Grubu Spermleriyle Döllenmiş Oositler (n=130)	66.72 ± 5.46	17.84 ± 12.4	51.67 ± 10.26	30.48±15.51
Diyabet Grubu Spermleriyle Döllenmiş Oositler (n=134)	51.14 ± 10.28	11.75 ± 10.23	34.85 ± 9.82	53.38±16.59
p Değerleri	0.000*	0.376	0.001*	0.003*

Yukarıdaki  $p < 0.05$  olan değerler anlamlıdır.

Çalışmamızdaki kontrol ve diyabet grubu spermeleri ile oluşan embriyoların minimum ve maksimum değerleri Çizelge 4.10' da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Kontrol ve Diyabet Grubu Spermeleri ile Oluşan Embriyoların Minimum ve Maksimum Değerleri

	Kontrol Grubu ile Dölllenmiş Dişi Fare Oositleri (n= 130)		Diyabet Grubu ile Dölllenmiş Dişi Fare Oositleri (n=134)	
	Minimum	Maksimum	Minimum	Maksimum
Oosit Sayısı	9	13	8	14
Fertilizasyon Sayısı	5	9	4	7
Fertilizasyon Oranı	55.5	75	40	70
Grade A Embriyo Sayısı	0	3	0	2
Grade A Embriyo Oranı	0	42.8	0	28.5
Grade B Embriyo Sayısı	3	5	1	3
Grade B Embriyo Oranı	33.3	66.6	20	50
Ölü Embriyo Sayısı	0	4	2	4
Ölü Embriyo Oranı	12.5	50	33.3	75



## 5. TARTIŞMA

Diyabet, dünyada ve ülkemizde hızla artan bir halk sağlığı sorunudur (Wild et al. 2004). Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozukluğu ile seyreder. Kardiyovasküler, endokrin, sinir ve üreme sistemi gibi birçok sistemde problemlere neden olmaktadır. Makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların geliştiği kronik bir hastalıktır (Lebovitz, 2004a, b; Pınar, 1998).

Diabetes mellitus' a sahip bireylerin sayıları her geçen gün artmaktadır. WHO' nun 2002 yılında yayınladığı raporlara göre 2000 yılında DM' lu hastaların sayısı 177 milyon iken, 2011 yılının ağustos ayında bu sayı 346 milyon olarak belirlenmiştir. 2004 yılında 3.4 milyon kişinin yüksek kan şekeri nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. WHO, ölümlerden meydana gelen bu sayının 2030 yılında ikiye katına çıkacağını tahmin etmektedir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>).

Diabetes mellitus kronikleştiğinde birçok sistemde olduğu gibi üreme sisteminde de hasar yaratmaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan birçok çalışmada diyabetik hayvanların testiküler fonksiyonunda bozukluk, spermiyogenezde azalma ve anormallikler görülmüştür (Murray et al. 1983; Scarano et al. 2006; Seethalakshmi et al. 1987).

Bu etkileri yüzünden biz de çalışmamızda, dünyada yaygın olarak görülen bir hastalık olan Diabetes mellitus' un fare spermleri ve üreme üzerine olan olumsuz etkilerini araştırmayı amaçladık.

İnsan spermleri veya oositleri ile yapılması mümkün olmayan tüm araştırmalar için kemiriciler çok iyi bir kaynaktır. Kemiriciler üzerinde yapılan deneyler ile embriyo toksisiteleri, yeni IVF uygulama protokolleri ve benzer deneysel çalışmalar gerçekleştirilebilir. Ancak fare, kobay, sıçan, tavşan gibi her bir cinsin ovulasyon indüksiyonuna farklı yanıtlar verdiği gözlenmiştir. Ayrıca her bir türün ayrı soyları da farklı yanıtlar vererek bu farklılığı daha da arttırmaktadır (Kaya, 2006).

Biz deneysel çalışmamızda, literatürde birçok çalışmada verimli ovulasyon indüksiyonu ve diyabet sürecinin kolay gerçekleşebilmesi açısından tercih edildiği gibi CD-1 ırkı dişi ve erkek fareler kullandık (Hayashi et al. 2006; Ho et al. 2001; Huang et al. 2008; Imaeda et al. 2002; Jefferson et al. 2005; Rossini et al. 1977; Wright et al. 1988; Rydgren et al. 2007; Sanguinetti, 1995; Sugimoto 2007).

Kontrollü ovaryan stimülasyon oluşturma protokolü; McGill Üniversitesi Jinekoloji ve Obstetrik Departmanı Reprodüktif Biyoloji Bölümünden Ri – Cheng Chian , Ph.D. tarafından geliştirilmiş ve çalışmamızda referans olarak kullanılmıştır. Birçok

araştırmacının tercih ettiği bu protokole göre; 5 IU Gebe Kısrak Serum Gonadotropini i.p yolla enjekte edildikten 48 saat sonra 5 IU insan koryonik gonadotropini enjekte edildi. (Kim and Moley, 2008; Moley et al. 1991; Wang et al. 2006; Ward, 2005). Çalışmalarda deney hayvanının cinsine göre tercih edilen protokolün de değiştiğini görmekteyiz. Bu yüzden bazı çalışmalarda farklı dozajlarda stimülasyon protokolleri uygulanmıştır (Ertzeid and Storeng, 2001; Jefferson et al. 2005; Johnson and Sidman, 1979).

Bazı araştırmacılara göre, kontrollü ovaryan stimülasyon klinik olguları ve embriyo implantasyon olgularını anlamlı derecede etkileyebilir. Stimülasyon ile östrojenin fizyolojik düzeyi, endometriyal homeostaz ve uterin reseptivitesi değişebilir ve bu değişimler klinik olgulara neden olabilir (Forman et al. 1988; Simon et al. 1995; Yu et al. 2000). Stimülasyonun klinik vakalara ters yönde etkisi yaşlı partnerlerde artmış, gençlerde ise dengelenmiştir (Elizur et al. 2005).

Literatürdeki çoğu araştırmacı gibi, kemirgenlerde diyabet oluşturma modeli olarak, STZ' ni tercih ettik (Amaral et al. 2006; Bolzan and Bianchi, 2002; Frenkel et al. 1978; de la Garza-Rodea et al. 2010; Giron et al. 1999; Imaeda 2002; Kim and Moley, 2008; Mallidis et al. 2009a; Shrilatha and Muralidhara, 2007; Sudha, 2000; Steger, 1990; Tanaka et al. 2001; Sanguinetti, 1995; Scarano et al. 2006; Soudamani et al. 2005). Bazı araştırmacılar ise diyabet oluşturma modeli olarak alloxanı (Abdel-Barry et al. 1997; El-Demerdash et al. 2005; Kirchick et al. 1979; Rao et al. 1999) tercih etmiştir.

Hayvan çalışmaları göstermiştir ki STZ ile oluşturulmuş diyabetik hayvanlarda 15 gün sonra sperm sayısı ve kalitesi düşmüştür (Amaral et al. 2006; Ballester et al. 2004; Scarano et al. 2006). Biz de çalışmamızda spermleri toplar ve değerlendirirken üreme sisteminin etkilenmesi için kronikleşme sürecini bekledik. Bu amaçla fareleri bir ay sonra sakrifiye ederek spermlerini topladık.

Sexton ve Jarow 1997 yılında yaptığı bir çalışmada, diyabetin vücutta yaptığı zararlı etkilerin arasında metabolik kontrolün bozulması ve nöropatinin görülmesinin diyabetin kronikleştiğinin bir göstergesi olduğunu; semen parametreleri üzerinde de olumsuz etkilerinin bu dönemde sıklıkla görüldüğünü ortaya koymuştur.

Shrilatha ve Muralidhara' nın 2007 yılında yaptığı çalışmada, yüksek doz STZ ile diyabet oluşturulan hayvanların (150-200mg/kg), Lubec ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışmada uyguladıkları daha düşük doz (40-50 mg/kg) STZ ile oluşturulan diyabetik hayvanlara göre, oksidatif stres seviyelerinde artış gözlemiştir. Bunun için biz de diyabeti oluşturabilecek en düşük ve ideal dozda STZ enjekte ederek kimyasalın negatif

etkisini en aza indirmek istedik. Bunun için STZ miktarını 100mg/kg olarak verdik (Arora et al. 2009; Budak 2010; Hayashi et al. 2006; Kim and Moley, 2008, Sanguinetti, 1995). Kan glukoz düzeyi  $\geq 200$ mg/dl olan fareleri diyabet kabul ettik (Budak, 2010; Kim et al. 2006; Wright, 1988).

Çalışmamızda paternal kaynaklı diyabetin erkek üreme hücresi olan spermin morfolojisini, hareketliliğini ve bu spermlemlerle döllenmiş oositten embriyo oluşma oranını ve embriyo kalitesini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Tip 1 DM' un semen parametreleri ile ilgili yapılan çalışmalarda araştırmacılar farklı görüşler belirtmiştir.

Işık mikroskopunun kullanıldığı, Tip 1 DM' la ilgili insan semen kalitesine bakmak için yapılan iki çalışmada semen parametrelerinde tip 1 diyabet sonucu azalma gözlenmiştir (Garcia-Diez et al. 1991; Padron et al. 1984).

Bu iki çalışmadan farklı olarak, Handelsman ve arkadaşları (1985) yılında, diyabetik erkeklerde anlamlı olan azalmanın sadece semen hacmi ve toplam sperm üretimi olduğunu iddia etmiştir.

Ali ve arkadaşları ise 1993 yılında, DM' lu bireylerde sperm konsantrasyonu ve toplam sperm üretiminde artış olduğunu, sperm morfolojisinde değişiklik olmadığını, fakat hareketliliğinde düşüş olduğunu gözlemlemiştir.

Vignon ve arkadaşları (1991), diyabetin insanlarda spermatogenez ve hipotalamik-pituiter ve testiküler sistem üzerine anlamlı derecede zararının olmadığını söylemişlerdir. Yapılan çalışmada, 24-40 yaşları arasında, 2-30 sene boyunca diyabet olan diyabet ve sağlıklı erkeklerin semenlerine bakılmıştır. Diyabetli bireylerde yüksek sperm sayısı ve konsantrasyonu gözlemlenirken, sperm hareketliliğinde bir değişim gözlemlenmemiş, anormal sperm ise bizim sonuçlarımıza benzer olarak diyabetik hastalarda sağlıklılara oranla yüksek oranda gözlenmiştir. Vignon' un bulguları bazı araştırmacılarla olduğu gibi bizim bulgularımızın bir kısmıyla da çelişmektedir (Bacetti et al. 2002; Sexton and Jarrow, 1997). Vignon ve arkadaşları (1991) ayrıca, çalışmaya ait diyabetik erkeklerin hiçbirine kısır diyemeyeceklerini ve bu erkeklerin diyabet olduğu halde baba olabildiklerini gözlemlemiştir. Bu durum bize dişi üreme sisteminin, spermlemler arasında iyi kalitedeki spermi seçebilme yeteneğinden kaynaklanmış olduğunu düşündürmüştür.

Diyabetin deneysel modelini gösteren çalışmalarda, STZ ile diyabet oluşturulmuş erkek kemirgenlerde fertilizasyonda azalma gözlenmiştir (Frenkel et al.1978; Paz et al.1978). Buna rağmen bazı araştırmalar spermatogenez ve sperm fonksiyonu ile direk

ilişkilidir (Ballester et al. 2004; Eltseva et al. 1993; Scarano et al. 2006). Çalışmamızda diyabet ile ilgili araştırmacıların üzerinde durduğu fertilizasyon ve sperm kalitesini ele alarak, hem iki faktör arasında bağlantı kurmayı hem de embriyonun üçüncü güne kadar olan süreçteki gelişimini incelemeyi uygun gördük. Çalışmamızda Padron (1984) ve Vignon (1991)' a paralel olarak, STZ ile DM oluşturulmuş farelerde sperm morfolojisinin anlamlı derecede bozulduğunu gözlemledik. Değerlendirdiğimiz her bir anormal morfoloji diyabetik farelerde istatistiksel açıdan anlamlı derecede artmış, kontrol grubuna göre anormal morfolojide istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlenmiştir ( $p < 0.0001$ ).

Wyrobek ve Bruce 1975 yılında yaptığı çalışmada; çeşitli kimyasal ajanların farelerdeki farklı sperm anormallikleri üzerine etkisine bakmış, topladığı spermeler Eosin Y ile boyanarak her bir gruptan 2000 adet sperm sayılmış ve morfolojileri tespit edilmiş. Çalışmamıza benzer olarak kullandıkları morfoloji kriterleri; normal sperm, çengelsiz başlı fare sperm, amorf sperm ve çift kuyruklu fare spermidir. Bunun dışında, muz başlı fare sperm, kendi üstüne kıvrılmış sperm de değerlendirdikleri morfoloji kriterleri arasındadır. Sonuç olarak, farklı kimyasal ajanların farklı sperm morfolojisi bozukluklarına yol açtığı ve bu kimyasal ajanların teratojenik, karsinogenik ve mutajenik etkiler yaratabileceği yönündedir. Biz de bu çalışmaya benzer olarak diyabetin sperm morfolojisi üzerine etkisine baktık. Farklı olarak Eosin Y yerine, IVF merkezlerinde sıklıkla kullanılan Diff-Quik boyasını kullandık.

Wyrobek ve Bruce' un kullandığı morfoloji kriterlerinden farklı olarak, diyabet ile kontrol grupları arasında kıvrılmış orta parçalı sperm, kıvrık ve kısa kuyruklu sperm de değerlendirmeye aldık. Bulgularımız sonucunda değerlendirdiğimiz amorf sperm, çengelsiz sperm, kıvrılmış orta parçalı sperm, kıvrık ve kısa kuyruklu sperm diyabetik farelerde sırasıyla %26.25, %5.75, %10.5 %6.5 ve %2.25 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise bu oranlar sırasıyla %15.87, %2.62, %8, %2.25 ve %0.5' tir. Aynı morfoloji kriterleri her iki grup arasında kıyaslandığında çıkan farkların her biri istatistiksel açıdan anlamlıdır.

Kim ve arkadaşları 1999 yılında, sıçanlara intravenöz yolla farklı dozlarda antikanser ajanı olan DA-125' i vererek testiküler sitotoksiteyi araştırmıştır. Sperm morfolojilerini kriter olarak kullandığımız bu çalışmada; normal sperm, küçük kafalı sperm, çift başlı sperm, amorf sperm, çengelsiz sperm, kıvrık ve kısa kuyruk kriterleri kullanılmıştır. Bulgulara göre; kontrol ve deney grubu sıçanlarında bahsedilen morfoloji kriterleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklar gözlenmemiştir.

El-Seedy ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada, karsinojenik bir kimyasal olan üretan ve tümör oluşturuvcu bir kimyasal olan indoksan kullanmış, bunların fare sperm morfolojisi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bulgularında, üretan ve benzer olarak indoksanın, normal gruptaki fare spermelerine göre sperm kalitesini anlamlı derecede olumsuz yönde etkilediğini saptamışlardır. Her iki deney grubunda baş ve kuyruklarda görülen sperm morfolojisinin, normal gruba göre  $p < 0.001$  değeri ile anlamlı derecede bozulduğu gözlenmiştir. Kullandığımız ortak morfolojiler normal sperm, amorf baş ve çengelsiz spermelerdir. Değerlendirme yaparken, kriterleri tek tek ele almak yerine, sperm morfolojilerini normal ve anormal olmak üzere iki temel grupta toplamışlar, anormal morfoloji kriterlerini de baş ve kuyruk anormallikleri olarak ikiye ayırmışlardır. Biz çalışmamızda sperm morfoloji kriterlerini daha fazla gruba ayırarak, Tip I DM' un hemen tüm alt grupları içeren genel morfolojik bozukluğa mı yol açıyor, yoksa belirli bazı alt gruplarda morfolojik anormallikler mi yaratıyor görmek istedik ve gördük ki tüm alt grupları içeren genel bir sperm morfoloji bozukluğuna yol açıyor. Diyabetin sperm morfolojisinde gösterdiği bu bozukluklar, diğer bazı araştırmacıları destekler niteliktedir (Bacetti et al. 2002; El-Seedy et al. 2005; Padron et al. 1984; Vignon et al. 1991). Bazı araştırmacılar ise diyabetin sperm morfolojisi üzerine etkisinin bulunmadığını iddia etmişlerdir (Ali et al. 1993; Scarano et al. 2006).

Scarano ve arkadaşları (2006), STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların, epididimal spermin kalitesini, sayısını, organ ve vücut ağırlıklarını araştırmış, diyabetik sıçanlarda organ ve vücut ağırlıklarının düştüğünü belirtmiştir. Bu değişikliklerin serum insülin azalmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Sperm morfolojisini normal ve anormal olmak üzere ikiye ayırmışlar, bu iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edememişlerdir. Diyabet oluşma süresine baktığımızda spermelerin bir hafta daha erken toplandığını görüyoruz ki bu da bize oluşan diyabetin henüz kronikleşerek üreme sistemine zarar vermediğini düşündürmektedir. Diyabet kronikleşmediği için sperm morfolojisi etkilenmemiştir. Ayrıca çalışılan deney hayvanının sıçan olması hem kronikleşme için bekleme süresinin daha da uzaması gerektiğini, hem de farelerin STZ' ne karşı direncinin sıçanlara oranla daha düşük olma ihtimali nedeniyle morfolojide değişiklik gözlenmemiş olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda sperm morfolojisinin diyabetik farelerde bozulduğunu belirtmiştik. Fakat anormalliklerin etiolojisinin nedeni tam olarak bilinmemekte, bu bozulmanın çeşitli sebeplerden dolayı meydana gelebileceğini düşünmekteyiz. Giron ile arkadaşlarının (1999)

ve Wiernsperger' in (2003) yaptıkları çalışmalarda, diyabetik bireylerde reaktif oksijen radikallerinin artması ile oksidatif stresin arttığını ve antioksidanların koruma gücünde azalma meydana geldiğini gözlemledikleri, bize sperm morfolojisinin bozulmasının bu sebeple olabileceği ihtimalini düşündürüyor. Lee ve arkadaşları (1997), diyabetik dokularda mitokondriyal DNA mutasyonlarının arttığını belirtmiştir. Bu da bize oksidatif stresin mitokondriyal DNA ile ilişkilendirilebileceğini düşündürür. Spermin barındırdığı mitokondriyal DNA' da, diyabetin etkisiyle mutasyonların meydana geldiğini varsayarsak, sperm morfolojisinde meydana gelebilecek anormallikler de göz ardı edilemeyecek gerçeklerdendir. Ayrıca diyabetin sperm parametresine negatif yönde etki ettiği diğer görüşler ise Chen ile ark. (1997) ve Kao ile arkadaşları (1998)' ndan gelmiştir. Yaptıkları çalışmada oksidatif stresin; sperm DNA' sına ve spermin lipid yapısına hasar vererek, spermin hareket kabiliyetini engellediğini ve fertilitiyi azalttığını belirtmişlerdir (Chen et al. 1997; Kao et al. 1998).

Kim ve Moley, 2008 yılında yaptığı çalışmada, iki farklı Tip 1 diyabetik fare modeli kullanmış, STZ ile oluşturulmuş Tip 1 diyabet fare modeli ve bunun kontrol grubu ile, bizim çalışmamızdan farklı olarak, testisten eksprese edilen glukoz transferini kolaylaştırıcı elementlerden olan SLC2A' ye bakmış, bu iki grubu karşılaştırmıştır. Diyabetiklerde, kaudal epididimal sperm konsantrasyonunun azaldığını, progresif yönde hareket gösteren spermelerin %50 oranında düştüğünü, hareketsiz spermelerin sayısının ise arttığını belirtmiştir. Bu verilerin sonucu olarak Kim ve Moley; diyabet ile sperm hareketliliğinin ve SLC2A ekspresyonunun değişmesi sonucunun, subfertiliteye neden olabileceğini belirtmiştir. Benzer olarak biz de fare sperm motilitesini değerlendirdiğimiz çalışmamızda, kontrol grubu farelerde %80, diyabet grubu farelerde %50 hareketlilik saptayarak motilitenin düştüğünü gözlemledik. Yani kontrol grubuna oranla diyabetik farelerin sperm hareketliliğinde %37.5 oranında azalma saptadık. Çıkan bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.0001$ ) ve Kim ve Moley (2008)' i destekler niteliktedir.

Bazı araştırmacılar diyabetin, spermatogenezisin endokrin kontrolü üzerinde hipotalamo-hipofizer sistemindeki bozukluğun etkili olduğunu belirtmektedir (Baccetti et al. 2002; Ballester et al. 2004; Daubress et al. 1978; Dinulovic and Radonjic, 1990; Garcia-diez et al. 1991; Handelsanman et al., 1985). Bazı araştırmacılar ise bunun aksine DM ile karbonhidrat dengesindeki değişimlerin üreme sisteminde bozukluğa yol açtığını, sadece hipotalamik döngünün değil, üreme organlarını da olumsuz yönde etkilediğini söylemektedir (Ali et al. 1993a; Handselman et al. 1985; Niven et al. 1995; Vignon et al.

1991). Hatta bazı araştırmacılar hayvan deneyleri ile göstermişlerdir ki hipotalamo-hipofizer döngünün bir sonucu olan, gonadotropin salgısının azalması diyabeti tetiklemektedir (Johnson ve Sidman, 1979; Rossi and Bestetti, 1981). Bu sonuç bize DM' un hem bu döngüyü bozduğu hem de bozulan döngü sonucu diyabetin tetiklendiği, bunun olumsuz etkisi olarak, kısır bir döngüye girildiğini göstermektedir. Frenkel ve arkadaşları 1978 yılında, puberte öncesi hayvanları diyabet yaparak fertilitte oranlarının azaldığını açıkça gözlemlemişleridir. Bazı araştırmacılar, DM hastalarının yaklaşık %90' ında, hiperglisemiden kaynaklı testiküler fonksiyon bozukluğu olduğunu ve bu nedenle libido ve infertilitede düşüş ve kısırlık olduğunu gözlemlemişlerdir (Cameron et al. 1990; Jiang, 1996).

Steger ve arkadaşlarının 1989 yılında, STZ ile oluşturulmuş diyabetik yetişkin sıçanlarda nöroendokrin ve seksüel davranışlarla ilgili yaptıkları çalışmada kontrol grubuna oranla daha az sayıda diyabetik sıçanın ejakulasyon yapabildiğini gözlemlemişlerdir. Ve bu kopulatuvar davranışlarının, diyabetik bireylerde testesteron seviyelerinin düşmesi sebebiyle gerçekleştiğini düşünmüşlerdir.

Aynı alışmacı 1990 yılında yaptığı bir başka çalışmasında, STZ ile DM oluşturulmuş sıçanlarda testesteronun plazma seviyelerinin düştüğünü tespit etmiş ve bu düşüklüğün tek başına olmasa da başka mekanizmalarla birlikte bozulmuş kopulatuvar davranışlardan sorumlu olabileceğini düşünmüştür. Benzer olarak Sudha ve arkadaşları (2000), serum testesteron ve FSH düzeyinin diyabetik sıçanlarda düştüğünü gözlemlemiştir

Kniel ve arkadaşlarına göre (1986), STZ, kopulatuvar fonksiyon bozukluğunu tetikler bu olay testesteron cevabının tetiklenmesinden kaynaklanabilir ve bu göstermektedir ki diyabetlilerde kopulatuvar davranışların tetiklenmesi direk veya indirek olarak insülin veya glukozun adrenerjik aktivitesine bağlıdır.

Soudamani ve arkadaşlarına göre (2005), STZ ile oluşturulmuş diyabetlilerde, diyabetin seksüel olgunlaşma sırasında değişen epididimal epitelin oluşum ve işlevine zararlı etkileri vardır. Literatürdeki çalışmalardan bazıları, yüksek dozda STZ' nin, erkek kemirgenlerde testiküler testesteron üretimini azalmasına neden olduğunu (Sanguinetti et al. 1995; Scarano et al. 2006) ayrıca STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, doğurganlık davranışlarında, fertilizasyon kapasitesinde ve ejakulasyonda değer kayıpları olduğunu gözlemlemiştir (Hassan et al. 1993; Scarano et al. 2006).

Cameron ve arkadaşları (1985), diyabetik hastalarda seminifer tübül epitelinde hücre ve spermatid azalması gözlendiğini belirtmiştir. Bazı tübüllerin duvarlarında aşırı

derecede duvar kalınlaşması ve spermatogenik hücrelerin azaldığını gözlenmiştir. Ayrıca küçük venül ve arteriyol duvarlarında da kalınlaşma olduğunu ve sonuç olarak, diyabet grubunda testiküler morfolojinin bozulduğunu gözlemlemişlerdir.

Bacetti ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı bir çalışmada; tip 1 diyabetten etkilenen 24 diyabetik ve 22 kontrol grubu erkeklerin hipotalamik-pitüiter ve testis metabolizmasına bakılmış ve karşılaştırma yapılmıştır. DM' a sahip erkeklerde, kontrol grubuna göre, seminal plazma hacminde, sperm konsantrasyonunda veya toplam sperm sayısında bir değişiklik olmadığını, ancak sperm hareketliliğinin  $p<0.05$  değeri ile anlamlı derecede düştüğünü söylemiştir. Bulgularımız bu yönüyle çalışmaya benzerlik göstermektedir. Çalışmamızdan farklı olarak TEM kullandıkları çalışmada, olgunlaşmamış spermler ve diyabet sonucu apoptoz ve immün sistemle ilgili hasarlar bulunduğunu; akrozomda, çekirdekte, mitokondride ve plazma membranında değişiklik olduğunu tespit etmişlerdir. Diyabet erkeklerdeki üreme bozukluklarının, hipotalamik, pitüiter, testiküler hasarlar sonucu oluşabileceğini, hasarlı spermatogenezisin belki de direk testiküler etkiler sonucu oluşabileceğini düşünmüşlerdir. Ayrıca gonadotropin yanıtın azalması ile spermlerde anormallikler oluşabileceğini belirtmişlerdir.

Amaral ve arkadaşları (2006); spontan diyabetik ve STZ ile oluşturulmuş Tip 1 diyabetik erkek sıçanlarda diyabetin oksidatif strese etkisini ve bunun sperm kalitesini nasıl etkilediğine bakmışlar. Sperm hareketliliğinin bir ve üç aylık STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, beş aylık kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düştüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların kontrol grubuna oranla sperm hareketliliğinde istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşüş olduğunu belirtmişlerdir ( $p<0.01$ ). Çalışmamızda sperm hareketliliği Amaral ve arkadaşlarının bulgularına benzerdi.

Murray ve arkadaşlarının (1985), diyabetik sıçanların testiküler histolojisini ve görüntüsünü değerlendirdiği çalışmasında, sperm içeriği diyabetik sıçanlarda anlamlı derecede düşmüştür, bunun sonucunda oligozoospermi gözlenmiştir. Dinulovic ve Radonjic (1990) ise, diyabetik hastaların spermleri klinik olarak incelendiğinde, hareketlilik bakımından astenozoospermia ile ilişkilendirilebileceğini söylemiştir.

Sperm hareketliliğinin değerlendirildiği Niven ve arkadaşlarının (1995) çalışmasında çalışmamızın sonuçlarından farklı olarak, tip 1 diyabetik ve sağlıklı erkeklerin sperm hareketliliği kıyaslandığında sonuçlar Vignon ve arkadaşlarına (1991) benzer çıkmıştır. Üstelik sperm hareketliliği, yaş ve diyabet süresi arasında bir ilişki



bulunamamıştır. Bu sonucu, herhangi bir komplikasyon olmamasına bağlı olarak diyabetin sperm hareketliliğini etkilemediğine bağlamışlardır.

Diyabetle sperm ilişkisine ait bir diğer çalışmayı da Silva ve arkadaşları yapmış (2000), diyabetle birlikte geriye ejakulasyon sonucu asperminin meydana geldiğini ve diyabetik erkeklerde geriye ejakulasyon insidansının arttığını belirtmiştir. Farklı olarak diyabetik erkeklerde ejakulat sorunu olmadığı müddetçe genelde spermlerinin normal olduğundan fakat anejakulasyonun sperm kalitesi ve sperm patolojisi üzerine olumsuz etkisinin bulunduğu bahsetmiştir. Bu olumsuzlukların sadece anejakulasyon sonucu olmayabileceğini de belirtmişlerdir.

Seethalakshimi ve arkadaşları da (1987), insülin tedavisinin vücudun ağırlığını özellikle de üreme organlarının ağırlıklarını düzenlediğini belirtmişlerdir. İnsülin ve testosteron tedavisinin, epididimis ve sperm olgunlaşmasında olumlu rol oynadığını söylemişler, ayrıca diyabetin testiküler fonksiyonlara zıt etki gösterdiğini gözlemlemişler buna rağmen diyabetin epididimise etkisini henüz yeterli derecede açıklayamamışlardır.

Kullandığımız STZ, DNA metillenmesine ve alkalizasyonuna sebep olabilen, serbest radikal üretimini arttıran, oksidatif stresi yüksek seviyelere getiren, kromatin ipliklerin kırılmasını tetikleyen ve pankreatik beta hücre kaybına neden olan, sitotoksik etkide geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Bolzan and Bianchi, 2002; Herr et al. 1967; Weiss, 1982).

Farklı dozlarda STZ ile Imaeda (2002), (STZ; 150mg/kg) ve Tanaka (2001), (STZ; 65mg/kg) tarafından yapılan çalışmaların her ikisinde de, farelerin somatik organlarında STZ sonucu anlamlı derecede genotoksik etkiler gözlenmiştir. Imaeda bu analizi tek hücreli jel elektroforezi ile yapmış, karaciğer ve pankreasta DNA hasarı tespit etmiştir. Chinnasamy ve arkadaşları, 1998 yılında, yaklaşık dört hafta geçtikten sonra STZ' nin sıskalığa ve hiperglisemiye neden olduğunu belirtmiştir. Bunun nedenini ise diyabetin metabolik komplikasyonlar oluşturmaya bağlamıştır. Çalışmamızda benzer olarak STZ ile oluşturulmuş diyabetik erkek farelerde halsizlik ve tüy dökülmesi gözlemledik (Bernat et al. 2000; Chinnasamy et al. 1998; Julie et al. 2002; Vsevolod et al. 2001).

Shrilatha ve Muralidhara (2007) çalışmasında; STZ ile diyabet oluşturulmuş farelerde testis ve epididimal spermi incelemişler. Bulgularında, STZ' nin anlamlı derecede nokta mutasyonlara sebep olduğunu belirtmiştir. Bununla beraber, erkeklerde 4-5 haftada testiste meydana gelen çeşitli patolojik lezyonlar, değişen androjen seviyeleri ve azalan spermatogenez sonucu gebelik oranlarında anlamlı derecede düşüş gözlemişlerdir.

Literatürde yapılan bazı çalışmalar, sperm konsantrasyonunda meydana gelen azalmanın hipergliseminin, spermatogenezinin geç evrelerinde meydana gelen şiddetli etkisinden dolayı olduğunu, bunun nedeninin muhtemelen reaktif oksijen ürünlerinin artmasından dolayı olabileceğini söylemektedir. Araştırmacılar, bu tip oksidatif hasarların, sperm hareketliliğini kaybetmeye de sebep olabileceğine değinmişlerdir (Aitken and Sawyer, 2003; Oehninger et al. 1995; Sikka 2001). O'Neill ve ark. (2009), bu durum ile ilgili, STZ ile diyabet oluşturulmuş DM' lu farelerde erkek üreme sistemindeki oksidatif stres ortamı, tam olarak diyabetin sonucu değildir fakat bu durum içeriklerin birlikte aktivasyonu ve kombinasyonu ile tetiklenmektedir şeklinde belirtmiştir. DNA hasarının meydana gelmesi, sperm çekirdeğinde hasara neden olarak fertilizasyon kapasitesinin düşmesine neden olur (Aitken and Sawyer, 2003).

Üreme hücrelerinin fertilizasyonu, glukoz metabolizması ile direk ilişkilidir. Glukoz, spermin zonasına bağlanması için gerekli bir metabolittir. Urner ve Sakkas (1996)' ın çalışmaları, glukozun erkek fertilizasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Sakkas ve arkadaşları (1993), Urner' i destekler nitelikte, fruktoz gibi diğer heksozların değil fakat glukozun başarılı bir fertilizasyon için gerekli bir medyum elemanı olduğunu söylemiştir. Böylece embriyonun canlılığına katkıda bulunulur. Bununla bağlantılı, Gardner ve arkadaşlarının (1998) çalışmasında, blastokistlerin glukoz içeren aynı zamanda geliştirilmiş kültüre konulduktan sonra yapılan transferi, hamilelik ve implantasyon oranını arttırmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız 25 dişi farenin 12' sinden çıkan oosit sayısı 130' dur. Bunlar kontrol grubu spermleri ile döllendi. Kalan 13 fareden elde edilen oosit sayısı 134' tür. Bunlar da diyabet grubu spermleri ile döllendi. Bu iki grup arasında çıkan oosit sayısı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.406$ ). Bu da bize kullanılan oositlerin arasında fark olmadığını ve deneyin sağlıklı olduğunu göstermektedir.

Kim ve Moley (2008) yılında, STZ ile diyabet oluşturulmuş Tip 1 diyabetik farelerle, diyabet olmayan kontrol grubu farelerin fertilizasyon oranını değerlendirmiş, kontrol grubu farelerin fertilizasyon oranını %88.8, diyabetik farelerin fertilizasyon oranını %43.6 bularak, diyabetik farelerin fertilizasyon oranında anlamlı derecede azalmaya dikkat çekmiştir. Biz de çalışmamızda bu oranları, kontrol ve diyabet gruplarında sırasıyla %66.72 ve %51.14 bularak, istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalma olduğunu gözlemledik ( $p=0.000$ ). Diyabetik farelerde fertilizasyon oranında görülen bu azalma, Kim ve Moley'in (2008) bulgusunu destekler niteliktedir. Ayrıca Kim ve Moley diyabetik

farelerle kontrol grubu farelerin blastokiste gitme oranına bakmışlar ve bu oranın diyabetik grupta düştüğünü gözlemlemişlerdir. Kim ve Moley' den farklı olarak diyabet ve kontrol grubu fareler arasında hem sperm morfolojisini, hem 3. günde yani olası transfer gününde Grade A embriyo, Grade B embriyo ve gelişimi durmuş embriyoları değerlendirdik. Çalışmamızda embriyo kalitesi; blastomer simetrisine, sayısına ve sitoplazmik fragmantasyon yüzdesine göre belirlendi. Embriyolar üçüncü gün sekiz veya daha çok blastomerli, blastomer büyüklükleri aynı ve % 20'den az fragmantasyon içeriyorsa iyi kalite embriyo olarak sınıflandırılmıştır. Geriye kalan embriyolar Grade B olarak kabul edildi (Budak ve ark. 2010; Daniel, 1989). Grade A embriyo oranında anlamlı bir fark olmadığını ( $p=0.376<0.05$ ), Grade B embriyo oranında diyabet grubunda anlamlı derecede düşüş olduğunu ( $p=0.001<0.05$ ), gelişimi durmuş embriyo oranının ise diyabet grubunda anlamlı derecede yüksek bulunduğunu ( $p=0.003>0.05$ ) gözlemledik. Sonuçlar değerlendirildiğinde görülmektedir ki, fertilizasyon oranı ve embriyoların canlılığı diyabetik farelerde anlamlı derecede düşmüştür. Bu da bize diyabetin, fertilizasyon kalitesini olumsuz yönde etkilediğini gösterir.

Grade A embriyo oranının diyabet grubunda daha az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gözlemledik. Bunun nedeninin oositin etrafında bulunan granüloza hücreleri, zona pellusida ve oositin IVF işlemi sırasında iyi kalitedeki spermi seçebilme yetisi ile diyabetik hayvanların semeninde normal farelere göre daha az olsa da normal morfolojideki spermlerin bulunması olduğunu düşünüyoruz. Bu seçim yeteneği ile semende az olsa da iyi kalitedeki spermlerin oositi dölleyebilecek ve iyi kalitede embriyo oluşumuna katkıda bulunacaktır. Bu sonuç bizde göstermektedir ki diyabetli bireyler de fertil olabilmektedir.

Grade A embriyo sayısı her iki grupta az olmasının nedeni olarak hayvanları sakrifiye ettiğimiz birimle, laboratuvar arasında bir mesafe bulunması, dış ortam, sıcaklık ve ışık gibi faktörlerden, yumurta ve spermlerin etkilenmesi olabilir.

Grade B embriyoların oranının kontrol grubunda yüksek (51.67), diyabet grubunda düşük (34.85) olması ise fertilizasyondan sonra gelişimi duran embriyo oranının diyabetik farelerde oldukça yüksek (53.38) olmasından kaynaklanmaktadır. Bu da bize, diyabetik olmayan embriyoların, daha fazla yarıklanabildiğini ve ilerlemesini sürdürebildiğini, diyabet olanlara göre embriyo gelişim özelliklerini yitirmeyip, daha olumlu özellikler taşıdığını düşündürmektedir.

İmplantasyon öncesi embriyo gelişimini etkileyen spermden kaynaklanan faktörler ‘paternal etkiler’ olarak bilinir ve yardımcı üreme tekniklerinin başarısına engel olurlar (Sakkas et al. 2004; Tesarik et al. 2002; Tesarik, 2005). Menezo 2006 yılında, erken meydana gelen paternal etkilerin, yarıklanma hızını geciktirdiği ve embriyoların fragmentasyon oranını arttırdığını söylemiştir. Bu da bize spermin ilk yarıklanmayı ve gelişim potansiyelini etkilediğini göstermektedir (Comizzoli et al. 2000; Eid et al. 1994). Sakkas ve ark. (2004), epidemiyolojik çalışmalar sonucu fetal gelişimin üzerinde spermden kaynaklanan faktörler olduğunu, Menezo (2006) ise, döllenmenin erken evrelerinde meydana gelen paternal etkinin embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilediğini belirtmiştir. Menezo’ nun yaptığı çalışmaya göre, spermin yapısında meydana gelen anormallikler, döllenmeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Kötü kalitedeki blastokist gelişiminin, bozulmuş sperm kalitesiyle ilişkili olduğunu söylemiştir.

Bu çalışmalarla paralel olarak, Göker ve arkadaşları (2002), ICSI yöntemini kullanarak yaptığı çalışmada, normal ve anormal spermeler kullanarak fertilizasyon oranlarına ve embriyo kalitesine bakmış, azalmış sperm kalitesinin düşük fertilizasyon oranına neden olduğunu belirtmiştir. Kontrol grubundaki fertilizasyon oranını, anormal spermle döledikleri deney grubuna oranla daha yüksek bulmuştur ( $p<0.0001$ ). Lee ve arkadaşları’ da (2009) Göker’ e (2002) paralel olarak; ICSI yöntemini kullanarak araştırdığı paternal etkinin, zigotik gen aktivasyonunun anormal olmasına neden olabileceğini, böylece sekiz hücreli blastomer safhasının gecikeceğini, düşük oranda blastokist gelişimi, bozulmuş implantasyon ve gebelik olgularının in vitro ve in vivo’ da gözleneceğini belirtmiştir. Defektif sperme sahip hastalardan elde edilen düşük embriyo gelişiminin, sentrozom fonksiyon bozukluğundan veya oosit aktive edici faktörden kaynaklanmış olabileceğini söylemişlerdir. Bu iki araştırmacının sonuçlarına benzer olarak biz de diyabetik grup spermelerle dölenen oositlerin fertilizasyon oranını anlamlı derecede düşük bulduk ( $p=0.000$ ) fakat yöntem olarak spermi bizim seçtiğimiz ICSI yerine, kısmen de olsa oositin seçebildiği IVF’ i kullandık. İyi kalitedeki embriyolar gruplar arasında anlamsızken, fertilizasyon ve gelişimi geri kalmış embriyo oranlarının diyabetli grupta anlamlı olarak düştüğünü tesbit ettik.

Erkeğe bağlı ciddi sorunlarda kötü kalitede embriyolar meydana gelmekte ve fertilizasyon oranları ciddi şekilde düşmektedir (Miller and Smith, 2001). Benzer olarak Singh ve arkadaşları (2009), STZ ile oluşturulan diyabetik albino sıçanlarda, spermelerin yumurtayı dölleme kapasitelerinde azalma gözlemiştir.

Janny ve Menezo (1994) belirtmiştir ki anormal sperm, IVF embriyolarının gelişimini etkilemiştir. Spermden salınan sitoplazmik faktörler (özellikle sentrozom ve oosit aktive edici faktörler) oositin kalsiyum mekanizmasından sorumlu olduğu için embriyo kalitesi, sperm çekirdek hasarından negatif yönde etkilenmektedir. Tesarik ve arkadaşlarına (2005) göre, bu etkiler fertilizasyondan sonra tek hücreli zigotta algılanabilir. Belirli hastalardan tekrarlanarak elde edilen anormal spermler sonucunda, yüksek oranda anormal pronükleer morfolojide olan zigotlar, akabinde yavaş yarıklanmış embriyo, yüksek fragmantasyonlu ve blastomer düzensizlikleri gözlenmiştir. Nasr-Esfahani ve ark. (2005), çalışmamıza benzer şekilde erken paternal defektlerde kötü kalitede zigot, kötü kalitede embriyo morfolojisi ve yavaş yarıklanma hızı saptamıştır. Bu patoloji spermin daha çok sitoplazmik faktörleri ile ilişkilendirilmiştir.

Paternal etkiler, preimplantasyon embriyo gelişimine etki ettikleri için yardımcı üreme tekniklerinde tekrarlayan düşüklere neden olmaktadır (Jones et al. 1998; Palermo et al. 1992; Tesarik, 2005). Buna zıt olarak, Bukulmez ve ark. (2001) ile Goker ve ark. (2002) tarafından semen parametrelerinin azalan implantasyon veya gebelik potansiyeli ile ilişkili olmadığı raporlanmıştır. Bu tartışma sperm kalitesinin potansiyel etkisinin birçok faktörden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Maternal açıdan diyabetin etkisine bakacak olursak literatürde yer alan Moley ve arkadaşlarının (1991) yaptığı çalışmada, dişi diyabetik farelerin ve kontrol grubu farelerin in-vivo ve in-vitro' da, 24-48-72 saat sonraki embriyo gelişim değerleri, embriyo gelişim hızı değerlendirilmiş, diyabetin fertilizasyon kapasitesine olumsuz etki gösterdiği kaydedilmiştir. Diyabetin maternal etkisinin incelendiği bu çalışmada, STZ ile diyabet oluşturulmuş dişi farelerin fertilizasyon oranı ve blastokist aşamasına ulaşması olumsuz yönde etkilenmiştir. Diyabetik dişi farelerde, 68 embriyonun 28'i (%41) blastokist aşamasına ulaşmışken, kontrol grubunda 81 embriyonun 68' i (%84) blastokist aşamasına ulaşmıştır. Doğal yöntemle döllenildiğinde diyabetli farelerde normal gruba göre, fertilizasyon oranı anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir. Fertilizasyon oranının diyabetik farelerde düşmesi çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda ele aldığımız gelişimi durmuş embriyo oranlarını, Moley ve arkadaşları da değerlendirmiş, fakat onlar bizden farklı olarak döllenmemiş oositleri de katmış, bir hücreli oosit durumunu, döllenmemiş veya döllense bile farklılaşmamış zigotlar olarak ele almıştır. Biz ise bundan farklı olarak gelişimi durmuş embriyoları, döllenen ve döllendikten sonra gelişimi durmuş, yarıklanma ve ilerleme özelliğini kaybeden embriyolar olarak ele aldık.

Moley' in sonuçlarına göre bir hücreli durumu, kontrol grubunda %7, diyabet grubunda ise bu oranın %25 olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise, kontrol grubunda gelişimi durmuş embriyo oranı %31, diyabet grubunda ise %51 olarak istatistiksel açıdan sonuç anlamlı çıkmıştır ( $p=0.003$ ). Ayrıca Moley çalışmasında (1991), doğal yolla dölleme oranı ve embriyo gelişimi, laboratuvar ortamındaki dölleme oranına göre daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Aynı in vitro koşullarına alınan embriyo hızına bakıldığında diyabetikler, diyabetik olmayanlara göre daha yavaş tespit edilmiştir.

Maternal etkinin incelendiği bir diğer çalışmada, Budak ve arkadaşları, 2010 yılında, ovaryan stimülasyon uygulanmış dişi CD-1 ırkına 100mg/kg STZ ile tip 1 diyabet oluşturmuş, oosit ve embriyo kalitesi üzerine etkileri incelenmiştir. IVF protokolü, STZ dozajı ve kontrollü ovaryan protokolü çalışmamıza benzerdir. Çalışmada embriyo kalitesi Grade A ve Grade B olarak değerlendirilmiş, sonuçlar diyabet grubunda Grade A ve Grade B embriyolarda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Sakkas ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada, farklı erkeklerden elde edilen benzer ya da farklı semen parametrelerine ait spermle, aynı kadının yumurtalarını döllemiş, oluşan embriyoların kalitesine bakmışlardır. Sonuç olarak erken embriyo gelişiminin paternal olarak etkilenebileceğini belirtmişlerdir. Embriyo gelişim farklılıklarının nedeninin, henüz yeterince aydınlatılmış olmamasına rağmen sperm kalitesinden kaynaklanabileceğini, bunun için sperm yapısındaki moleküler içeriğin tam olarak bilinmesi gerektiğini söylemişlerdir.

Literatürdeki diğer çalışmada, jel elektroforezi ve PCR yöntemini kullanarak, diyabetik erkeğin sperm yapısı incelendiğinde, sperm çekirdeğinin DNA fragmentasyonunda ve mitokondriyal DNA delesyonunda artış gözlenmiştir. Meydana gelen DNA hasarlarının, erkek üreme sisteminini etkilediğini düşünmüşlerdir. Literatürde bununla ilişkili olarak; sperm çekirdeğindeki DNA fragmentasyonunun, mitokondriyal DNA delesyon numarası ve büyüklüğü ile birlikte ele alındığında bunların üreme için prognostik değer taşıdığını belirtmiştir (Lewis et al. 2004).

Literatürdeki bu verilere dayanarak; çalışmamızda diyabetin, sperm morfolojisi ve motilitesini nasıl etkilediğini ayrıca diyabetik spermle döllemiş embriyoların fertilizasyon potansiyeli üzerinde nasıl etkili olduğu incelenmiştir. Çıkan sonuçlar göstermektedir ki; DM Tip 1 kronikleştiğinde ve tedavi edilmediğinde hem sperm morfoloji ve motilitesini hem de fertilizasyon oranını düşürmektedir. Ayrıca embriyo yarıklanma kabiliyetini azaltmakta, gelişimi duran embriyo oranını arttırmaktadır. Ancak

iki grup arasında Grade A embriyo oranı açısında istatikseld anlamalı fark olmaması, diyabetli grupta semende normal spermlerin de bulunması ve kullandığımız IVF metodunun doğal yollardan bu iyi kalite sperm seçme kabiliyetinden kaynaklanıyor olabilir.

Tüm bu sonuçlar diyabetin erkek üreme sistemi üzerine ve dolayısıyla fertilizasyona ve embriyo kalitesi üzerine olumsuz etki gösterdiğini düşündürmektedir. Çalışmamız kendi alanında, diyabetle ilişkili sperm ve embriyonun gelişimine dair yol gösterici ve ilgi uyandıran bir çalışmadır.

## 6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada, diyabetik sperm morfolojisine ve motilitesine, bu spermlele dölllenmiş oositten elde edilen embriyoların fertilizasyon oranına, kalitesine ve gelişimi duran embriyoların oranına bakıldı.

Kontrol ve diyabet gruplarındaki farelerden topladığımız spermleri ve bunlardan IVF yöntemi ile oluşan embriyoları karşılaştırdığımızda;

1. Diyabet grubu spermlerin morfolojisinin daha fazla anormal sperm içerdiği tespit edildi.
2. Diyabetik spermlerin motilitesinin, kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi.
3. Diyabetik hayvanların gösterdiği fertilizasyon ve Grade B oranının anlamlı derecede düştüğü tespit edildi.
4. Grade A embriyo oranları diyabetiklerde kontrol grubuna göre daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.
5. Diyabet grubu embriyolarının canlılık özelliğinin ve yarıklanabilme potansiyelinin daha düşük olduğu ve gelişimi duran embriyoların bu grupta anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak kronik Tip 1 Diabetes Mellitus oluşturulmuş farelerin sperm kalitesi ve bu spermlele döllenen oositlerin oluşturduğu embriyoların canlılığı ve kalitesinin düştüğü, ancak iyi kalitede embriyo oranlarını değıştirmedeğı saptanmıştır.

Semende bulunan spermlerin bir kısmının iyi kalitede olması ve bu spermlerin diğı üreme sisteminde doğal yollarla öncelikle seçilerek dölllenmeyi gerçekleştirdiğı bilinmektedir. İyi kalite embriyo oranlarının bu yüzden değışmediğini düşünmekteyiz. Yine bu sebeple bu bireyler infertil olmamaktadır. Ancak iyi kalitedeki sperm miktarının da önemli olduğu açıktır. Bu yüzden bu hastalarda kan glukoz düzeylerinin kontrol altında tutulması son derecede önemlidir.

Çalışmamızdan çıkan bir diğere önemli sonuç ise diyabetli erkek bireylere uygulanacak yardımla üreme metodu olarak IVF' in tercih edilmesi, spermlerin kısmen de olsa doğal yollarla seçilmesi ile embriyo canlılığını, kalitesini ve sonuç olarak gebeliğı değıştirebilecek önemli bir unsur olabileceğidir.

Dolayısıyla Diabetes Mellitus hastalığına sahip erkek bireylerin sperm seçimi ve iyileştirme işlemlerine daha fazla özen gösterilmeli, granüloza hücrelerinin ve zona pellusidanın seçme işlemine katılabilmesi için teknik seçiminde ICSI yerine IVF ile dölllenmenin gerçekleştirilmesi tercih edilmelidir.



Diabetes Mellitus ve üreme üzerine yapılacak çalışmalar devam etmelidir. Özellikle erkek bireylerde sperm morfoloji ve motilite bozukluğunun nedenlerinin belirlenmesi için spermde bulunan reseptörlerin incelenmesi umut vaad edecektir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abdel-Barry J. A., Abdel-Hassan I. A., Al-Hakiem M. H. H. (1997) Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 58(3): 149-155.
- Agbaje I. M., Rogers D. A., McVicar C. M., McClure N., Atkinson A. B., Mallidis C., Lewis S. E. (2007) Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function, *Human Reproduction*, 22: 1871–1877.
- Aitken R. J. and Sawyer D. (2003) The human spermatozoon—not waving but drowning, *Adv Exp Med Biol*, 518: 85–98.
- Aitken R. J., Clarkson J. S. and Fishel S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function, *Biology of Reproduction*, 41: 183–197.
- Aksu T. (2006) Uterus Kaynaklı İnfertilite Nedenleri. İçinde: Beksaç M.S. (Ed.), *Jinekoloji; Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji*. Ankara: Medikal Network; 966-975.
- Akyüz A. (2003) İnfertil Çiftin Araştırılması. 3.Uluslararası Üreme ve Aile Planlaması Kongresi, 20-23 Nisan Ankara, s.32-35.
- Alicı B., Özkara H., Önal B., Akkuş E., Hattat H. (2000) Total motil sperm sayısının intrauterin inseminasyon başarısına etkisi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 31(2): 61-65.
- Ali S. T., Shaikh R. N., Siddiqi N. A. and Siddiqi P. Q. (1993) Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy, *Arch. Androl.*, 30: 47–54.
- Amaral S., Moreno A. J., Santos M. S., Seica R., Ramalho-Santas J. (2006) Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes, *Theriogenology*, 66: 2056–2067.
- American Diabetes Association. (1998) Economic consequences of diabetes mellitus in the US in 1997. *Diabetes*.
- Arora S., Ojha S. K. and Vohora D. (2009) Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice, *Global Journal of Pharmacology*, 3 (2): 81-84.
- Babbott D., Rubin A., Ginsburg S. J. (1958) The reproductive characteristics of diabetic men, *Diabetes*, 7: 33–35.
- Baccetti B., La Marca A., Piomboni P., Capitani S., Bruni E., Petraglia F., De Leo V. (2002) Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality, *Human Reproduction*, 17: 2673–2677.
- Bacckeskov S., Aastoot H. J., Christgau S., Reetz A., Solimena M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., De Camilli P. (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156.
- Ballester J., Munoz M. C., Dominguez J., Rigau T., Guinovart J. J., Rodriguez-Gil J. E. (2004) Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms, *Journal of Andrology*, 25: 706–719.
- Benítez A., Perez-Diaz J. (1985) Effect of streptozotocin-diabetes and insulin treatment on regulation of Leydig cell function in the rat, *Horm Metab Res*, 17: 5–7.
- Berek J. S. (1998) İnfertilite. İçinde: Berek J. S: İnfertilite. Adashi E. Y., Hillard P. A., Novak Jinekoloji, Nobel Kitabevi, 12.Baskı, 918-925, İstanbul.

- Bernard Jegou, Charles Pineau, Jorna Toppari. (2002) Spermatogenesis in vitro in mammals. In Assisted Reproductive Technology. Jonge C. D, Barrat C. L. R., eds. Cambridge University Pres: Cambridge, 3-25.
- Blackwell R. E. (1989) Clinical Aspects Of Aging Of The Female Reproductive System. In: Steinkampf MP. Infertility: Causes, Diagnosis And Treatment. In: Soules M (ed), Problems In Reproductive Endocrinology And Infertility, New York, NY.
- Bolzan A. D. and Bianchi M. S. (2002) Genotoxicity of streptozotocin, Mutation Research 512: 121–134.
- Bostofte E., Serup J., Rebbe H. (1982) Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty year follow-up period, Int. J. Androl., 5: 379-386.
- Boulton A. J. M., Knight G., Drury J., Ward J. D. (1985) The prevalence of symptomatic diabetic neuropathy in an insülin treated population, Diabetes Care, 8: 125-8.
- Budak Ö. (2010) Şeker hastalığının “Diabetes mellitus tip 1” kontrollü ovaryum stimülasyonu uygulanmış fare oosit ve embriyoları üzerindeki etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Danışman: Prof. Dr. Süreyya Ceylan, Kocaeli.
- Bukulmez O., Yucel A., Yarali H., Bildirici I., Gurgan T. (2001) The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 94: 250–5.
- Buschard K., Buch I., Molsted-Pedersen L., Hougaard P., Kühl C. (1987) Increased incidence of true type I diabetes acquired during pregnancy, BMJ, 294: 275-9.
- Busehard K., Danisbo P., Röpke C. (1990) Activated CD4+ and CD8+ T-lyphocyet in newly diagnosed type I diabetes: A prospective study. Diabetic Med, 7(2): 132-136.
- Cameron D. F., Murray F. T., Drylie D. D. (1985) Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men, The Anatomical Record, 213: 53-62.
- Cameron D. F., Rountree J., Schultz R. E., Repetta D. and Murray F. T. (1990) Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBWOR diabetic rats, Am J Physiol, 259: 881–889.
- Cameron N. E., Cotter M. S., Archibald V., Dines K. C., Maxfield E. K. (1994) Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow, and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats, Diabetologia, 37: 449-59.
- Cameron P., Proctor K., Coburn W., Forde N. (1985) Sexual orientation and sexually transmitted diseases, Nebraska Medical Journal, 70: 292-299. Care., 21: 296-309.
- Cemal H., Karatekelioğlu E., Atar E. (2007) Erkek fertilitelerini etkileyen beslenme, çevresel faktörler ve diğer nedenler. Androloji Bülteni, Sayı 28, s.39-43.
- Ceriello A. (1993) Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects, Diabetologia 36: 1119-25.
- Chen C. S., Chao H. T., Pan R. L. and Wei Y. H. (1997) Maintenance of human sperm motility and prevention of oxidative damage through co-culture incubation, Andrologia, 29: 227–233.
- Chen C. S., Chao H. T., Pan R. L. and Wei Y. H. (1997) Hydroxyl radical induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm, Biochem Mol Biol Int, 43: 291–303.
- Chian R. C., Huang J. Y. J., Gilbert L., Son W. Y., Holzer H., Cui S. J., Buckett W. M., Tulandi T., Tan S. L. (2009) Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes, Fertility and Sterility, 91(6): 2391-98.

- Chinnaswamy N., Fairbairn L. J., Laher J., Willington M. A and Rafferty J. A. (1998) Modulation of O6-alkylating agent induced clastogenecity by enhanced DNA repair capacity of bone marrow cells, *Mutat Res*, 416: 1–10.
- Christianson J. A., Riekhof J. T. and Wright D. E. (2002) Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice, *Experimental Neurology*, 179 (2003) 188–199.
- Comizzoli P., Marquant-Le Guienne B., Heyman Y., Renard J. P. (2000) Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes, *Biol Reprod*, 62: 1677±1684
- Corea L., Bentivoglio M., Verdechia P., Motolese M. (1985) Plasma norepinephrine and left ventricular hypertrophy in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol*, 53:1299-303.
- Coşkun O., Kanter M., Korkmaz A., Oter S. (2005) Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in ratpancreas, *Pharmacol Res*, 51 (2): 117–123.
- Coşkun E., Öskan S., Vural B. (2005) Impact of genital infection on fertility. *Journal Of The Turkish German Gynecological Association*, 6(3): 197-203.
- Daniel S. A. J., Armstrong D. T. (1989) Gore-Langton RE. Growth and development of rat oocytes in vitro, *Gamete res.*, 24: 109-21.
- Daubresse J. C., Meunier J. C., Wilmotte J., Luyckx A. S and Lefebvre P. J. (1978) Pituitary–testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence, *Diabete Metab.*, 4: 233–237.
- DCCT Research Group. (1988) Factors in development of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of diabetes control and complications trial (DCCI'), *Diabetologia*, 37: 476.
- De Berardis G., Franciosi M., Belfiglio M., Di Nardo B., Greenfield S., Kaplan S. H., Pellegrini F., Sacco M., Tognoni G., Valentini M., Nicolucci A. (2002) Erectile dysfunction and quality of life in type 2 diabetic patients: A serious problem too often overlooked. *Diabetes Care*, 25: 284-291.
- de la Garza-Rodea A. S., Knaän-Shanzer S., den Hartigh J. D., Verhaegen A. P. L., van Bekkum D. W. (2010) Anomer-Equilibrated Streptozotocin Solution for the Induction of Experimental Diabetes in Mice (*Mus musculus*), *Journal of the American Association*, Volume 49, Number 1, January, pp.40-44(5).
- Demircan A., Kervancıoğlu E., Yazıcıoğlu E., Curry M., Barblett H., Çamlıbel T., Djahanbakhcho O., Atasü O. (1992) Erkek infertilitesi tedavisinde yeni bir yöntem: (Zygote Intrafallopian Transfer) Zift-olgu takdimi. *Türkiye Klinikleri J.Gynecol Obstetric*, 2(4): 279-283.
- Dicker D., Goldman J. A., Ashkenazi J., Feldberg D., Shelef D., Levy T. (1991) Age and pregnancy rates in vitro fertilization. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, Volume 8, Number 3, 141-144.
- Dikencik B. (2001) Yardımcı Üreme Teknikleri, İçinde Beji N.K. (Ed.), İnfertilite Sorunu, Yardımcı Üreme Teknikleri Ve Hemşirelik Yaklaşımı. F.N. Hemşirelik Yüksek Okulu Yayın No:4, Emek Matbaacılık, İstanbul, s.25-55.
- Dinulovic D., Radonjic G. (1990) Diabetes mellitus/male infertility, *Arch Androl.*, 25: 277 293.
- Dong Q., Lazarus R. M., Wong L. S., Vellios M. and Handelsman D. J. (1991) Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat, *J. Endocrinol.*, 131: 49–55.
- Eggert-Kruse W., Schwarz H., Rohr G., Demirakca T., Tilgen W., Runnebaum B. (1996) Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception, *Hum. Reprod.*, 11: 139-146.
- Eid L. N., Lorton S. P., Parish J. J. (1994) Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo, *Biol Reprod* , 51: 1232-1237.

- Eisenbarth G. S. (1986) Type 1 Diabetes Mellitus; A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*, 314: 1360-68.
- El'tseva T. V., Adamskaya E. I., Peryshkova T. A., Babichev V. N. (1993) Disturbance of neuroendocrine regulation of sexual behavior of male rats with streptozotocin diabetes, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 23: 538–544.
- El-Demerdash F. M., Yousef M. I., El-Naga N. I. A. (2005) Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats, *Food and Chemical Toxicology*, 43(1): 57-63.
- El-Seedy A. S., Taha T. A., El-Seehy M. A. B. and Maklouf A. A. (2005) Ultrastructure sperm defects in male mice during carcinogenicity of urethane and indoxan, *Arab J. Biotech.*, Vol. 9, No. (1): 27-4.
- Elizur S. E., Lerner-Geva L., Levron J., Shulman A., Bider D., Dor J. (2005) Factors predicting IVF treatment outcome: a multivariate analysis of 5310 cycles. *Reprod Biomed Online* 10: 645–9.
- Enginsu M. E., Dumoulin J. C. M., Pieters M. H. E. C., Bras M., Evers J. L. H., Geraedts J. P. M. (1991) Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick staining: correlation of morphology with fertilization in vitro, *Hum. Reprod.*, 6: 854-858.
- Erdem M. ve Yıldırım M. (2003) İleri yaş infertilitesi. *Türk Fertilite Dergisi*, 11: 185-192.
- Erkoçak A. (1990) Özel Histoloji, Genital Sistem, Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, 2. baskı, 166-194, Ankara.
- Ertzeid G. and Storeng G. (2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*, 16(2): 221- 225.
- Eskenazi B., Wyrebek A. J., Slotter E., Kidd S. A., Moore L., Young S., Moore D. (2003) The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2): 447-454.
- Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., Angelis P., Claussen O. P. (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic, *Hum Reprod*, 14: 1039–1049.
- Evenson D. P., Wixon R. (2006) Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility, *Theriogenology*, 65: 979–991.
- Favot I., Ngalula J., Mgalla Z., Klokke A. H., Gumodoka B., Boerma J. T. (1997) HIV infection and sexual behaviour among women with infertility in Tanzania: A hospital-based study, *international journal of epidemiology*, Vol. 26, No 2, 414-419.
- Fawcett D. W. (1986) *A Textbook of Histology*, 12th edition, Chapman and Hall, New York, p.801.
- Feldman H. A., Goldstein I., Hatzichrstou D. G., Krane R. J., McKinlay J. B. (1994) Impotence and its medical psychosocial correlates; Results of the massachusetts male aging study. *J Urol*, 151: 54-61.
- Feng S. L., Li S. H., Wang Y., Chen C. C., Gao B. (2001) Effect of ligustrum fruit extract on reproduction in experimental diabetic rats, *Asian J Androl* , 3: 71-3.
- Forman R., Fries N., Testart J., Belaisch-Allart J., Hazout A., Frydman R. (1988) Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation, *Fertil Steril*, 49: 118–22.
- Forti G., Krausz C. (1998) Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(129): 4177-4188.
- Fredricsson B., Bjork R. (1977) Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertility and Subfertility*, 28: 841-5.

- Frenkel G. P., Homonnai Z. T., Drasnin N., Sofer A., Kaplan R., Kraicer P. F. (1978) Fertility of the streptozotocin diabetic male rat, *Andrologia*, 10: 127–136.
- Garcia-Diez L. C., Corrales Hernandez J. J., Hernandez-Diaz J., Pedraz M. J., Miralles J. M. (1991) Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility, *Arch Androl*, 26: 119-128.
- Gardner D., Vella P., Lane M. (1998) Culture and transfer of blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers, *Fertil Steril*, 69: 84–8.
- Gartner L. P. and Hiatt, J. L. (2009) *Renkli Histoloji Atlası. Dışı Üreme Sistemi. Çeviri Editörleri: Dağdeviren A., Müftüoğlu S., Karabay G., Güneş Tıp Kitabevleri. Dördüncü Baskı. p.487-508.*
- Gartner L. P., Hiatt J. L. (2001) *Color Textbook Histology*, W. B. Saunders Company, 2. baskı New York 487-508.
- Gerstein H. C. (1994) Cow's milk exposure and type 1 diabetes mellitus- a critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care*, 17: 13-19.
- Gingliano D., Ceriello A., Paolisso G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care*, 19: 257-67.
- Giron M. D., Salto R., Gonzalez Y., Giron J. A., Nieto N., Periago J. L., Suarez M. D., Hortelano P. (1999) Modulation of hepatic and intestinal glutathione S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats, *Chemosphere*, 38: 3003–3013.
- Goker E. N., Sendag F., Levi R., Sendag H., Tavmergen E. (2002) Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameters and testicular sperm, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 104: 129–36.
- Golay A., Felber J. B., Jequier E., DeFronzo R. A., Ferrannini E. (1988) Metabolic basis of obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diab Metab Rev.*, 4.
- Goldstein I., Munnariz R. M., Ellsworth P. I. (2003) Advances in sexual medicine for men and women: Expanding the role of the urologist. 98th. Annual Meeting, Los Angeles.
- Greene D. A. (1985) Acute and chronic complications of diabetes mellitus in older patients, *American J. Med*, May. 16, Vol.80, p. 39-52.
- Greene D. A. and Lattimer S. A. (1986) Biochemical alterations and complications in diabetes in diabetes. *Clin. Chemistry*, Vol.32, No.10 (B), p.42-46.
- Griffin M. L., South S. A., Yankov V. I., Booth R. A. Jr., Asplin C. M., Veldhuis J. D., Evans M.S. (1994) insulin-dependent diabetes mellitus and menstrual dysfunction, *Ann Med*, 26: 331-40.
- Günalp S. ve Yücel A. (2006) Erkek İnfertilitesi-I: Androlojik Değerlendirme. İçinde Bektaş M.S. (Ed.), *Jinekoloji; Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji. Medikal Network; 987-1011, Ankara.*
- Handelsman D. J., Conway A. J., Boylan L. M., Yue D. K., Turtle J. R. (1985) Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study, *Andrologia*, 17: 488–496.
- Hare J. V. V. (1994) Diabetes and pregnancy. In: Kahn CR, Weir GC, eds. *Joslin's diabetes mellitus. Lea&Febiger*, 13th edition, 889-899.
- Harrison L. C., Campbell I. L., Allison J., Miller J. E. A. P. (1989) MHC Molecules And B-cell Destruction. Immune And Non Immune Mechanisms. *Diabetes*, 38: 815-818.
- Hassa H. (2003) İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, *Hikmet H.*, 87:105-115, Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskişehir.

Hassan A. A., Hassouana M. M., Taketo T., Gagnon C. and Elhiali M. M. (1993) The effect of diabetes on sexual behaviour and reproductive tract function in male rats, *J Urol*, 149: 148–154.

Hayashi K., Kojima R., Ito M. (2006) Strain Differences in the Diabetogenic Activity of Streptozotocin in Mice, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (6): 1110-19.

Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M., Stalf T., Hoogendijk C., Mehnert C., Menkveld R., Schill W. B., Heptinsall R.H. (1983) *Pathology of the Kidney*. 3 th edition. Vol. 3., p.33-37.

Herr R. R., Jahnke J. K. and Argoudelis A. D. (1967) The structure of streptozotocin, *Journal of the American Chemical Society*, 89: 4808–4809.

Ho E., Quan N., Tsai Y. H., Lai W. and Bray T. M. (2001) Dietary Zinc Supplementation Inhibits NF\_κB Activation and Protects Against Chemically Induced Diabetes in CD1 Mice. *Experimental Biology and Medicine*, 226:103-111.

Hoff J. D., Quigley M. E., Yen S. S. C. (1983) Hormonal dynamics at midcycle: A reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*, 57(4): 792-6.

Hsueh W. A., Moore L., Bryer-Ash M. (2004) *Tip 2 Diyabet Güncel Tanı ve Tedavi*. Çev.Ed: Karpuz H., Karpuz V., Çev: Taşçılar K., Kahraman N., Ağaç M. T., Duygu E. Rotamat Reklam Matbaacılık Ltd. Şti., İstanbul.

<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes2%20spermatogenesis.htm>

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/173003/ductus-deferens>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.

<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/index.htm>

Huang J. Y. J., Chen H. Y., Park J. Y. S., Tan S. L., Chian R. C. (2008) Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification, *Fertility and Sterility*, 9(4): 1424-32.

Hull M. G., Glazener C. M., Kelly N. J., Conway D. I., Foster P. A., Hinton R. A., Coulson C., Lambert P. A., Watt E. M., Desai K. M. (1985) Population study of causes, treatment and outcome of infertility, *Brit Med J (Clin Res Ed)*, 291: 1693–1697.

Imaeda A., Kaneko T., Aoki T., Kondo Y., Nakamura N. and Nagase H. (2002) Antioxidative effects of fluvastatin and its metabolites against DNA damage in streptozotocin-treated mice, *Food Chem Toxicol*, 40: 1415–1422.

James B. Wyngaarden., Lloyd H. Smith. (1985) *Cecil Textbook of Medicine*, 17th edition. W.B. Saunders Company, p.1430-1435.

Janny L. and Menezo Y. J. (1994) Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation, *Molecular Reproduction and Development*, 38: 36–42.

Jefferson W. N., Padilla-Banks E. and Newbold R.R. (2005) Adverse Effects on Female Development and Reproduction in CD-1 Mice Following Neonatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein at Environmentally Relevant Doses. *Biology of Reproduction*, 73:798–806

Jette N. T., Glass R. H. (1972) Prognostic value of the postcoital test. *Fertil Steril*, 23: 29-32.

Jiang G.Y. (1996) *Practical diabetes*, People's Health Publishing House, Beijing, 1st Edition, p. 295.

Joesoef M. R., Beral V., Aral S. O., Rolfs R. T., Cramer D. W. (1994) Fertility and use of cigarettes, alcohol, marijuana and cocaine. *Annals Of Epidemiology*, 4(5): 423.

- Johannes C. B., Araujo A.B., Feldman H. A., Derby C. A., Kleinman K. P., McKinley J. B. (2000) Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: Longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol*, 163(2): 460-463.
- Johnson L. M. and Sidman R. L. (1979) A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant Mouse, *Biol. Reprod.*, 20: 552–559.
- Jones G. M., Trounson A. O., Lolatgis N., Wood C. (1998) Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer, *Fertil Steril*, 70: 1022–9.
- Jorneskog G., Egberg N., Fagrell B. (1996) Altered properties of the fibrin gel structure in patients with NIDDM, *Diabetologia*, 39 (12): 1519-23.
- Junqueira L. C. and Carneiro J. (2009) *Temel Histoloji, Text and Atlas. Erkek ve Dişi üreme sistemi. Çeviri Editörleri; Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu, Prof. Dr. Yener AYTEKİN Nobel Kitabevleri, ISBN:978-975-420-699-9. Eleventh Edition Mc Graw – Hill Companies.*
- Kadioğlu A., Kaplancan T. (1997) Diyabet ve erektil disfonksiyon. *Aktüel Dergisi*, 9(1): 632-637.
- Kaemmerer H. and Mitzkat H. J. (1985) Ion change chromatography of amino acids in ejaculate of diabetics, *Andrologia*, 17: 485–487
- Kao S. H., Chao H. T., Wei YH. (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa, *Molecular Human Reproduction*, 4: 657–666.
- Karacagil M., Tatlısen A., Gülmez İ., Ekmekçioglu O., Demirci D. (2002) Üroloji Ders Notları. E.Ü.T.F. Yayınları Kayseri, s.280-284.
- Karam J. H., Martin J. M., Knip M., Ilonen J., Robinson B. H., Savilahti E., Akerblom H.K. and Dosch H-M. (1992) A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin –dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med*, 327: 302-307.
- Karounos D. G., Neil L. J., Thomas J. W. (1990) Autoantibodies present at onset of Type 1 diabetes recognize multiple islet cell antigens. *Autoimmunity*, 6(1-2): 79-91.
- Kavlak O., Saruhan A. (2002) İnfertil kadınlarda yalnızlık düzeyi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 41(4): 229-232.
- Kaya M. (2006) Deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan farelerde sigara dumanının ve E vitamininin IVF parametreleri ( fertilizasyon oranı, klivaj oranı, embriyo gelişim oranı ) üzerine etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Danışman: Prof. Dr. Hikmet Hassa.*
- Kendirici M., Kadioğlu A. (2002) Diyabetik kadın ve erkekte cinsel fonksiyon bozuklukları patofizyolojisi. *Androloji Bülteni*, 10: 19-21.
- Kennedy W. R., Navarro X., Goetz F. C., Sutherland D. E., Najarian J. S. (1990) Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy, *N Engl J Med*, 322: 1031.
- Keskin A., Sermez Y., Özgen G., Büyükkeçeci F., Yılmaz C. (1995) Fibrinolytic activity in type 2 diabetes mellitus and the effect of glycemic control on fibrinolytic parameters, *Turk J Med Res*, 13 (2): 74-77.
- Kessler L., Wiesel M. L., Attali P., Mossard J. M., Cazenave J. P., Pinget M. (1998) Von Willebrand factor in diabetic angiopathy, *Diabetes Metab*, 24 (4): 327-36.
- Khaki A., Fathiazad F., Nouri M., Khaki A. A., Maleki N. A., Khamnei H. J., Ahmadi P. (2010) Beneficial Effects of Quercetin on sperm parameters in streptozotocin –induced diabetic male rats, *Phytother. Res. J. Vol.*, 24(9): 1285-1291.



Kılıç S., Beytur A., Altınoluk B., Beytur L., Oğuz F., Atmaca R. (2005) İnfertilite nedeniyle eş spermi ile uygulanan 78 intrauterin inseminasyon (IUI) siklusunun sonuçları ve IUI başarısını etkileyen faktörler: Retrospektif bir çalışma, Türk Üroloji Dergisi, 31(4): 516-523.

Kızılkaya N. (1992) İnfertil çiftlerin ilgileri, uygulamaları ve infertilitenin psikososyal değerlendirilmesi. Hemşirelik Bülteni, 6, 25-26, 44-45.

Kierszenbaum A. L. (2006) Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviri Editörü: Demir R., Palme Yayımcılık, 3.baskı, Ankara.

Kilo C. (1985) Value of glucose control in preventing complications of diabetes. American J. Med, August 23, Vol. 79, p.33-37.

Kim J. C., Kim K. H. and Chung M. K. (1999) Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod. Toxicol*, 13: 391–397.

Kim N. N., Stankovic M., Cushman T. T., Goldstein I., Munarriz R. and Traish A. M. (2006) Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers. *BMC Physiology*, 6:4 doi:10.1186/1472-6793-6-4.

Kim S. T. and Moley K. H. (2008) Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression, *Reproduction*, 136 (3): 313 - 322.

Kirchick H. J., Keyes P. L. and Frye B. E. (1979) An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare's serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone, *Endocrinology*, 105: 1343–1349.

Kişnişçi H. A., Gökşin E., Durukan T., Üstay K., Ayhan A., Gürkan T., Öneroğlu L. S. (1996) Erkeğe Bağlı İnfertilite, *Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ed. Ankara: Güneş, 1119-1129, 1287.

Kniel P. C., Junker U., Perrin I. V., Bestetti G. E. and Rossi G. L. (1986) Varied effects of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rat, *Laboratory Investigation*, 54: 523–530.

Kodama H., Yamaguchi R., Fukuda J., Kasai H., Tanaka T. (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients, *Fertil Steril*, 68: 519–524

Kort H. I., Massey J. B., Elsner C. W., Mitchell-Leef D., Shapiro D. B., Witt M. A., Roudebush W. E. (2006) Impact of body mass index values on sperm quantity and quality, *Journal of Andrology*, 27(3): 450-2.

Koşar P. A., Özçelik N. (2007) Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 14(3): 48-51.

Koyuncu İ. (2008) Varikoselli hastalarda sperm morfolojisinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Prof. Dr. Saim Özdamar, 2008, 63 sayfa.

Kretser D. M., Baker H. W. G. (1996) Human Infertility: The Male Factor. In *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Adashi E. Y., Rock J. A., Rosenwaks Z.,(eds). Lippincott-Raven: New York., 2031-61.

Kruger T. F. (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology, *Reproductive Biomedicine Online*, 7: 477–484.

Kruger T. F., Ackerman S. B., Simmons K. F., Swanson R. J., Brugo S. S., Acosta A. A. (1987) A Quick Reliable Staining Technique For Human Sperm Morphology *Archives Of Andrology*, 18: 275-7.

Kruger T. F., Acosta A. A., Simmons K. F., Swanson R. J., Matta J. F., Oehninger S. (1988) Predictive value of abnormal morphology in in vitro fertilization, *Fertil. Steril*, 49: 112-117.

Kruger T. F., Menkveld R., Stander F. S., Lombard C. J., Merwe J. P., Zyl J. A., Smith K. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, *Fertil. Steril*, 46: 1118-1123.

- Laurent S. L., Thompson S. J., Addy C., Garrison C. Z., Moore E. E. (1992) An epidemiologic study of smoking and primary infertility in women. *Fertility And Sterility*, 57(3): 565-72.
- Lebovitz H. E. (2004a) Diabetes Mellitus'un Tam Ve Sınıflaması. İçinde: Diabetes Mellitus ve İlgili Sorunların Tedavisi. Ed: Satman İ., Çev: Sağlam H., Sigma Publishing Danışmanlık ve Organizasyon Dış Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 5-7.
- Lebovitz H. E. (2004b) Glisemik Kontrol Ve Diyabetin Kronik Komplikasyonları. İçinde: Diabetes Mellitus ve İlgili Sorunların Tedavisi. Ed: Satman İ., Çev: Sağlam H., Sigma Publishing Danışmanlık ve Organizasyon Dış Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 246-251.
- Lee P. D., Giudice L. C., Conover C. A. and Powell D. R. (1997) Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216: 319–357.
- Lee S. H., Song H., Park Y. S., Koong M. K., Song I. O., Jun J. H. (2009) Poor sperm quality affects clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection in fresh and subsequent frozen–thawed cycles: potential paternal effects on pregnancy outcomes, *Fertility and Sterility*, Vol. 91, No. 3.
- Lewis S. E., O'Connell M., Stevenson M., Thompson-Cree L., McClure N. (2004) An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction, *Hum Reprod*, 19: 1385–1394. Epub 2004 Apr 29.
- Lind T., Billewicz W. Z., Brown G. (1973) A serial study of changes occurring in the oral glucose tolerance test during pregnancy, *J Obstet Gyneacol Br Commonw*, 80: 1033-9.
- Liu D. Y., Baker H. W. G. (1992) Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertility And Sterility*, 50: 782-8.
- Lubec B., Hermon M., Hoeger H. and Lubec G. (1998) Aromatic hydroxylation in animal models of diabetes mellitus, *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12: 1581–1587.
- Malaisse W. J., Malaisse-Lagae F., Şener A., Pipeleers D. G. (1982) Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 927-930.
- Mallidis C., Agbaje I., O'Neill J., McClure N. (2009b) The influence of type 1 diabetes mellitus on spermatogenic gene expression, *Fertility and Sterility*.
- Mallidis C., Green B. D., Rogers D., Agbaje I. M., Hollis J., Migaud M., Amigues E., McClure N., Browne R. A. (2009a) Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus, *International Journal of Andrology*, 32: 156–165.
- McCulloch D. K., Campbell I. W., Wu F. C., Prescott R. J., Clarke B. F. (1980) The prevalence of diabetic impotence, *Diabetologia*, 18: 279-83.
- McCulloch D. K., Young R. J., Prescott R. J., Campbell I. W., Clarke B. F. (1984) The natural history impotence in diabetic men, *Diabetologia*, 26: 437-40.
- McKinley J. B. (2000) The worldwide prevalence and epidemiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 12(4): 6-11.
- McKinney E. S., James S. R., Murray S. S., Ashwill J. W. (2005) *Maternal-Child Nursing*. Philadelphia: Elsevier's Health Sciences Rights Department.
- McVary K. T., Rathnau C. H., McKenna K. E. (1997) Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR rat: a role of central neuropathy, *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 272: R259–R267.

- Menezo Y. J. (2006) Paternal and maternal factors in preimplantation embryogenesis: interaction with the biochemical environment, *Reprod Biomed Online*, 12: 616–21.
- Menkveld R., Stander F. S. H., Kotze T. J. V. W., Kruger T. F., Van Zyl J. A. (1990) The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5: 586-92.
- Meuleman J. E., Diemont L. W. (1995) Investigation of Erectile Dysfunction: diagnostic testing for vascular factors in erectile dysfunction, *Urol Clin North Am*, 22: 803-819.
- Miller J. E., Smith T. T. (2001) The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro, *Hum Reprod.*, 16: 918–24.
- Miller J. H., Weinberg R. K., Canino N. L., Klein N. A., Solues M. R. (1999) The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, 181: 952.
- 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. Fert.*, 93: 325-332.
- Montella K. R., Keely E., Laifer S. A., Lee R. V. (2000) Evaluation and management of infertility in women: The internist's role. *Annals Of Internal medicine*, 132: 973-981.
- Moore H., Dvorakova K., Jenkins N., Breed W. (2002) Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Letters to Nature*, 418, 174-177.
- Moore K. L., Dalley A. F. (1995) Clinically Oriented Anatomy, Williams & Wilkins, Int ed.: 278-281, 307-313.
- Morris I. D., Ilott S., Dixon L., Brison D. R. (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development, *Human Reproduction*, 17: 990–998.
- Mortimer D., Leslie E. E., Kelly R. W., Templeton A. A. (1982) Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *Journal Of Reproduction And Fertility*, 64: 391-9.
- Murata M., Takahashi A., Saito I., Kawanishi S. (1999) Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin, *Biochem Pharmacol* 57: 881–887.
- Murray F. T., Cameron D. F., Orth J. M. (1983) Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat, *Metabolism*, 32 (1): 141–147.
- Murray F. T., Cameron D. F., Orth J. M., Katovich M. J. (1985). Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat: Alterations of testes morphology, serum testosterone and LH, *Horm Metab Res*, 17: 495–501.
- Murray N., Frischauf A. M., Lehrach H., Poustka A. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences, *Journal of Molecular Biology*, 170(4): 827-842.
- Musich J., Behrman S. (1983) Surgical management of tubal obstruction at the uterotubal junction. *Fertil Steril*, 40: 423-440.
- Myrup B., Rossing P., Jensen T., Gram T., Kluft C. and Jespersen J. (1995) Procoagulant activity and intimal dysfunction in IDDM, *Diabetologia* 38(1): 73-78.
- Nasr-Esfahani M. H., Salehi M., Razavi S., Anjomshoa M., Rozbahani S., Moulavi F., Mardani M. (2005) Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI, *Reproductive Biomedicine Online* 11: 198–205
- National Diabetes Data Group. (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28: 1039-57.

- Nikolettos N., K pker W., Demirel C., Schopper B., Blasig C., Sturm R., Felberbaum R., Bauer O., Diedrich K. and Al-Hasani S. (1999) Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology, *Human Reproduction*, Vol. 14 (1): 47-70.
- Niven M. J., Hitman G. A. and Badenoch D. F. (1995) A study of spermatozoal motility in type 1 diabetes mellitus, *Diabet. Med.*, 12: 921-924.
- O'Brien J., Zini A. (2005) Sperm DNA integrity and male infertility, *Urology*, 65: 16-22.
- O'Neill J., Czerwiec A., Agbaje I., Glenn J., Stitt A., McClure N. and Mallidis C. (2009) Differences in mouse models of diabetes mellitus in studies of male reproduction, *international journal of andrology*, 32: 18.
- Oehninger S., Blackmore P., Mahony M. and Hodgen G. (1995) Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa, *J Assist Reprod Genet*, 12: 41-47.
- Oğuz Deniz H. (2004) İnfertilite Tedavisi G ren Kadınlarda İnfertilitenin Ruh Sağlığına, Evlilik İlişkileri ve Cinsel Yaşama Etkileri. Uzmanlık Tezi, Danışman:Prof. Dr. Mazhar Osman, Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 12. Psikiyatri Birimi, 2004, İstanbul.
- Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- Oksanen A. (1975) Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats, *Horm Res*, 6: 138-144.
- Ombelet W., Bosmans E., Janssen M., Cox A., Vlasselaer J., Gyselaers W., Vandeput H., Gielen J., Pollet H., Maes M., Steeno O., Kruger T. (1997a) Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing, *Hum. Reprod.*, 12: 987-993
- Ombelet W., Fourie F. L., Vandeput H., Bosmans E., Cox A., Janssen M., Kruger T. (1994) Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study, *Hum. Reprod.*, 9: 1479-1484 on spermatogenic gene expression, *Fertil Steril*, 92: 2085-7.
- O'Neill J., Czerwiec A., Agbaje I., Glenn J., Stitt A., McClure N., Mallidis C. (2010) Differences in mouse models of diabetes mellitus in studies of male reproduction, *Int J Androl*, 33(5):709-16
- Orshan S. A. (2008) *Maternity, Newborn And Women's Health Nursing*, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins a Wolters Kluwer business.
-  nem K., Kadioğlu A. (2005) Diyabet-Kadın erkek cinsel fonksiyonu, *Diyabet forumu*, 1: 31-39.
-  zdamar S.,  etin N., Sorkun H. (2002) Genel Embriyoloji, E. .T.F Yayınları, Kayseri, s.4-15.
- Padron R. S., Dambay A., Suarez R. and Mas J. (1984) Semen analyses in adolescent diabetic patients, *Acta Diabetol. Lat.*, 21: 115-121.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A. C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte., *Lancet*, 340: 17-8.
- Palmer J. P. (1987). Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM, *Diabetes Metab. Rev.*3, 1005-15.
- Paz G., Homonnai Z. T., Harell A., Kraicer P. F. (1978) Improvement in the fertility of streptozotocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotropin, *Israel Journal of Medical Sciences*, 14: 1073-1078.
- Perk H., Soyupek S., Oksay T. (2005) Erkek infertilitesine neden olan fiziksel ajanlar, ila lar ve toksinler. *Androloji B lteni*, Sayı 23, 305-310.
- Pınar R. (1998) *Diabet ve Y netimi*, Merve Matbaacılık, 36, 58-9, İstanbul.

- Pietro Paolo M., Castano L., Babu S., Suelow R., Kuo Y., Martin S., Powers A., Prochazka M., Naggert J., Leiter E., Eisenbarth G. (1993) Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). *J Clin Invest*, 92: 359-371.
- Pirart J. (1978) Diabetes mellitus and its degenerative complications. A prospective study of 4000 patients observed, *Diabetes Care*, 1: 168-88, 252-63.
- Plas E., Berger P., Hermann M., Pflüger H. (2000) Effect of aging on male fertility. *Experimental Gerontology*, Volume 35, Issue 5, 543-551.
- Polotsky V. Y., Wilson J. A., Haines A. S., Scharf M. T., Soutiere S. E., Tankersley C. G., Smith P. L., Schwartz A. R. and O'Donnell C. P. (2001) The Impact of Insulin-Dependent Diabetes on Ventilatory Control in the Mouse, *American Journal Of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 163, pp 624–632.
- Rao B. K., Kesavulu M. M., Giri R., Rao C. A. (1999) Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica charantia* Hook. fruit powder in alloxan-diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1): 103-109.
- Reaven G. M., Hollenbeck C. B., Chen Y-DI. (1989) Relationship between glucose tolerance, insulin secretion and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia*, 32: 52-9.
- Reece E. A. (1988) The history of diabetes mellitus. In: Reece E. A., Coustan D. R., ed. *Diabetes Mellitus in Pregnancy*, New York: Churchill Livingstone, 3-15.
- Renato P., Laura P., Alessandra G. (2008) Obesity And Infertility. *Current Opinion In Internal Medicine*, 7(1): 23-28.
- Reşorlu B., Yaman Ö., Özayar A., Özden E., Yeşil M. (2006) Bilateral intratestiküler varikosel. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 59: 77-79.
- Roep B. O., Kallan A. A., Hazenbos W. L., Bruining G. J., Bailyes E. M., Arden S. D., Hutton J. C., de Vries R. R. (1991) T-cell reactivity to 38 kD insulin-secretory-granula protein in patients with recent-on – set type 1 diabetes. *Lancet* 337: 1439-1441.
- Rogers B. J., Bentwood B. J., Van Campen H., Helmbrecht G., Soderdahl D., Hale R. W. (1983) Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity, *J. Androl.*, 4: 119-125.
- Rossi G. L. and Bestetti G. (1981) Morphological changes in the hypothalamic–hypophyseal gonadal axis of male rats after twelve months of streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, 21: 476–481.
- Rossini A. A., Like A. A., Chick W. L., Appel M. C. and Cahill G. F. (1977) Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 6, pp. 2485-2489.
- Rydgren T., Vaarala O. and Sandler S. (2007) Simvastatin Protects against Multiple Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes in CD-1 Mice and Recurrence of Disease in Nonobese Diabetic Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(1): 180-5.
- Saccharo W. R., Messias A. G., Oliva S. U., Klinefelter G. R., Kempinas W. G. (2006) Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats, *Int J Androl*, 29 (4): 482–488.
- Saenz de Tejada I., Goldstein I. (1998) Diabetic Penile Neuropathy. *Urol Clin N Am.*, 15: 17-22.
- Sakkas D., D'Arcy Y., Percival G., Sinclair L., Afnan M., Sharif K. (2004) Use of the egg-share model to investigate the paternal influence on fertilization and embryo development after in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, *Fertil Steril*, 82(1): 74–9.
- Sakkas D., Urner F., Menezes Y. and Leppens G. (1993) Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro, *Biology of Reproduction*, 49: 1288–1292

- Sanguinetti R. E., Ogawa K., Kurohmaru M. and Hayashi Y. (1995) Ultrastructural changes in mouse Leydig cells after streptozotocin administration, *Experimental Animals*, 44: 71–73.
- Sasaki K., Yoshimura N., Chancellor M. B. (2003) Implications of diabetes mellitus in urology. *Urol Clin N Am*, 30: 1-12.
- Scarano W. R., Messias A. G., Oliva S. U., Klinefelter G. R. and Kempinas W. G. (2006) Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats, *International Journal of Andrology*, 29: 482–488
- Schmidt L., Munster K. (1995) Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970–1992: a review of concepts, measurements and results, *Hum Reprod*, 10: 1407–1418.
- Seethalakshmi L., Menon M. and Diamond D. (1987) The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat, *J. Urol.*, 138: 190–194.
- Sermin P. (1990) *Histoloji, Uludag Üniversitesi Yayınları*, 1. baskı, s.260-287.
- Service F. J., Rizza R. A., Daube J. R., and Dyck P. J. (1985) Improved nerve conduction and vibration sense in diabetic neuropathy, *Diabetologia*, 28: 722.
- Sexton W. J., Jarow J. P. (1997) Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function, *Urology*, 49: 508–513.
- Sharlip I. D., Jarow J. P., Belker A. M., Lipshultz L. I., Sigman M., Thomas A. J., Schlegel P. N., Howards S. S., Nehra A., Damewood M. D., Overstreet J. W., Sadosky R. (2002) Best practice policies for male infertility, *Fertil Steril*, 77: 873–882.
- Shimada S., Takei L., Kasatani T., Nomaguchi H., Ishii M., Ozawa Y. (1993) Heat shock protein and insulinitis in NOD mice. *Autoimmunity*, 15:80.
- Shoham Z., Di Carlo C., Patel A., Conway G. S., Jacobs H. S. (1991) Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. *Fertil Steril*, 56: 836-841.
- Shrilatha B. and Muralidhara. (2007) Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin – induced diabetic mice: in progression and genotoxic consequences, *Report. Toxicol*, 23 (4): 578-587.
- Shrilatha B., Muralidhara. (2007a) Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin diabetic rat, *International Journal of Andrology*, 30: 508–518.
- Shrilatha B., Muralidhara. (2007b) Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences, *Reproductive Toxicology*, 23: 578–587.
- Shrivastav P., Swann J., Jeremy J. Y., Thompson C., Shaw R. W. and Dandona P. (1989) Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM, *Diabetes Care*, 12: 742–744.
- Sikka S. C. (2001) Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, *Curr Med Chem*, 8: 851–862.
- Silva P. D., Larson K. M. U., Van Every M. J., Silva D. E. (2000) Successful treatment of retrograde ejaculation with sperm recovered from bladder washings – a report of two cases, *J Reprod Med*, 45: 957-60
- Simon C., Cano F., Valbuena D., Remohi J., Pellicer A. (1995) Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients, *Hum Reprod.*, 10: 2432–7.

- Singh S., Malini T., Rengarajan S., Balasubramanian K. (2009) Impact of experimental diabetes and insulin replacement on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats, *Journal of Cellular Biochemistry*, 108: 1094–1101.
- Snell R. S. (1998) *Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Fonksiyonel Anatomi*, Çeviri Editörü: Yıldırım M., Nobel Tıp Kitabevleri ve Yüce Yayıncılık, 2. baskı, İstanbul, s.316-320, 357-361.
- Soria B., Roche E., Berná G., León-Quinto T., Reig J. A. and Martín F. (2000) Insulin-Secreting Cells Derived From Embryonic Stem Cells Normalize Glycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, *Diabetes*, Volum 49.
- Soudamani S., Malini T. and Balasubramanian K. (2005) Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies, *Endocr Res*, 31 (2): 81–98.
- Southam E., Gartwaite J. (1993) The No-cGMP signalling pathway in rat brain, *Neuropharmacology*, 32: 1267-1277.
- Spano M., Bonde J. P., Hjøllund H. I., Kolstad H. A., Cordelli E., Leter G. (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team, *Fertil Steril*, 73: 43–50.
- Speroff L., Glass N. H., Kase R. G. (2007) *Clinical Gynaecologic Endocrinology And Infertility*, 7nd edition, Baltimore: Williams & Wilkins, p.84, 171, 213, 236, 1013, 1026, 1142, 1143, 1075, 1097, 1133.
- Steger R. W. (1990) Testosterone replacement fails to reverse the adverse of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 35: 577–582.
- Steger R. W., Amador A., Lam E., Rathert J., Weis J., Smith M. S. (1989) Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats, *Endocrinology*, 124: 1737–1743.
- Steger R. W., Rabe M. B. (1997) The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function, *Proc Soc Exp Biol Med*, 214: 1–11.
- Sudha S., Valli G., Julie P. M., Arunakaran J., Govindarajulu P., Balasubramanian K. (2000) Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin replacement on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats, *Exp Clin Endocrinol Diabet*, 108: 14–20.
- Sugimoto H., Grahovac G., Zeisberg M. and Kalluri R. (2007) Renal Fibrosis and Glomerulosclerosis in a New Mouse Model of Diabetic Nephropathy and Its Regression by Bone Morphogenic Protein-7 and Advanced Glycation End Product Inhibitors. *Diabetes*, 56: 1825–1833
- Şahin F. İ. (2006) Erkek infertilitesinde genetik yaklaşım, *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, Cilt 3, Sayı 3, 147-151.
- Tanaka M., Nakaya S., Kumai T., Watanabe M., Matsumoto N. and Kobayashi S. (2001) Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Endocrinol Res*, 27: 109–117.
- Tanyeri F. (1996) Diabetes mellitus' un sınıflandırılması ve prevalansı. *Aktüel Tıp Dergisi*, 7(1):500-503.
- Taylor C. T. (2002) Diabetes and assisted reproductive technology, *Br J Diabetes Vasc Dis*, 2: 247–53.
- Tekelioglu M. (2002) Özel Histoloji, İnce yapı ve gelişme, *Erkek Üreme Sistemi*, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1. baskı, 231-244, Ankara.
- Tesarik J. (2005) Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo, *Reproductive Biomedicine Online*, 10: 370–375.
- Tesarik J., Mendoza C., Greco E. (2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI, *Hum Reprod.*, 17: 184–9.

The Diabetes and Complication Trial Reserch Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes. Dermendez G., Nodas J., Sa'pi. Z.: Lipoblastoma-like lipatrophy inducet by human insülin: Morphological evidende korlocal dedillereution of adipocysts?. Diabetologia, 954, 2000.

Thomas P. K. and Tomlinson D. R. (1993) Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In Dyck PJ and Thomas PK (eds): Peripheral Neuropathy. W.B. Saunders Company, Philadelphia vol (2): 1219-1250.

Thonneau P., Marchand S., Tallee A. (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989), Hum Reprod, 6: 811–816.

Tisch R., Yang X.D., Singer S., Fugger L., McDevitt H. O. (1993) Characterization of beta islet cell autoantigens targeting murine IDDM. Autoimmunity, 15:81.

Urman B. (1997) İnfertilite. Aile Planlamasında Temel Bilgiler. T C. Sağlık Bakanlığı, Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, İnsan Kaynağını Geliştirme Vakfı, Damla Matbaacılık, Reklamcılık ve Yayıncılık Tic. Ltd. Sti, İstanbul, 251-262.

Urner F. and Sakkas D. (1996) Glucose participates in sperm–oocyte fusion in the mouse, Biology of Reproduction, 55: 917–922.

Vicari A. M., Macagni A. (1990) Primary platelet activation in recent –onset type I diabetes mellitus, Scand J Clin Lab Invest, 50: 429-432.

Vignon F., Le Faou A., Montagnon D., Pradignac A., Cranz C., Winiszewsky P., Pinget M. (1991) Comparative study of semen in diabetic and healthy men, Diabete Metab., 17: 350–354.

Vine A. K., Samama M. M. (1993) The role of abnormalities in the anticoagulant and fibrinolytic systems in retinal vascular occlusions. Surv Ophthalmol, 37:283-92.

Vinik A., Richardson D. (1998) Erectile dysfunction in diabetes. Diabetes Reviews, 6(1): 16-33.

Wart J. V., Kruger T. F., Lombard C. J., Ombelet W. (2001) Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): A structured literature review. Human Reproduction Update, 7(5): 495-500.

Wang Y., Ock S. A., Chian R. C. (2006) Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development in vitro, 12(3): 304-10.

Ward M. A. (2005) Intracytoplasmic Sperm Injection Effects in Infertile azh Mutant Mice. Biology of Reproduction, 73: 193–200.

Weiss R. B. (1982) Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy and toxicity, Cancer Treat Rep. 66: 427–438.

WHO Laboratuvar el kitabı. (2002) İnsan Semeni Ve Sperm-Servikal Mukus Etkilesimi Değerlendirilmesi, Çeviri Editörü: Günalp S., Tıp Teknik Kitabevi, 4. baskı, Ankara.

Wichman L., Isola J. and Tuohimaa P. (1994) Prognostic variables in predicting pregnancy. A prospective follow up study of 907 couples with infertility problems, Hum. Reprod., 9: 1102 1108

Wiernsperger N. F. (2003) Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy, Diabetes & Metabolism, 29: 579–585.

Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. (2004) Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, 27: 1047-1053.

Williams G., Pickup J. C. (2004c) Diyabette cinsel sorunlar. İçinde: Diyabet El Kitabı. Çeviren: Karşıdağ K. Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts, s.203-210.



- Wohaieb S. A., Codin D. V. (1987) Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of insulin treatment, *Diabetes*, 36: 1014-18.
- Woolley D. M. (2003) Motility of the spermatozoa at surfaces. *Reproduction*, 126(2): 259-270
- World Health Organization. (1980) Temporal relationships between ovulation and defined changes in the concentration of plasma estradiol 17 $\beta$  luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and progesterone. *Am J Obstetrics and Gynecology*, 138: 383-390.
- World Health Organization. (1985). WHO Study Group. Diabetes mellitus. Geneva. Tech Rep Ser., 727: 1-113.
- World Health Organization. (2002) Diabetes: the cost of diabetes, Fact sheet No. 236.
- Wright J. R., Lefkowitz J. B., Schreiner G. and Lacy P. E. (1988) Essential fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in CD-1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp. 6137-6141.
- Wu K. K., Thiagarajan P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis, *Annual Review of medicine*, 47: 315-331.
- Wyrobeck A. J. and Bruce W. R. (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice, *Proc Nat Acad Sci, (USA)* 72: 4425-4429
- Yaman M. Ö. (2002) Erektile disfonksiyon ve diabetes mellitus, *Vicena*, 2 (10): 11.
- Yenigün M. (1995) Diabetes Mellitusun Geç Komplikasyonları, Her Yönü İle Diabetes Mellitus Kitabından. Çeviri Editörü: Yenigün M: Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s.546-584.
- Yenigün M. (1997) Diabetes Mellitus' ta Mikro Ve Makro Anjiyopati: Metabolik Yönleri İle Diabetes Mellitus Ve Hipertansiyon. Çeviri Editörü: Yenigün M., Mart Matbaacılık, İstanbul, 216-249.
- Yenigün M. (1997) İnsülin Direnci Sendromu. Metabolik Yönleri ile Diyabet ve Hipertansiyon. Çeviri Editörü: Yenigün M. Mart Matbaacılık, İstanbul.
- Yenigün M. (1997) Mikro Ve Makroanjiyopatiler: Kardiyovasküler Diabet. Edt. Yenigün M., İ.Ü.Basımevi İstanbul, 546-584.
- Yenigün M., Ener M. (2001) Diabetes Mellitus Ve Erektile Fonksiyon Bozuklukları. İçinde: Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Ed: Yenigün M, Altuntaş Y. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 479-504.
- Yıldız H., Pınar R. (2004b) Diyabetli kadınlarda ihmal edilen bir konu: Cinsel yaşam. *Hemşirelik formu* 7 (3): 11-13.
- Yılmaz C., Yılmaz M. T., İmamoğlu Ş. (2000) Diabetes Mellitus 2000. Gri Tasarım, İstanbul, 73-84.
- Yu Ng E. H., Yeung W. S., Yee Lan L. E., So W. W., Ho P. C. (2000) High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles, *Hum Reprod*, 15: 250-5.
- Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M. T. (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men, *Fertil Steril*, 75: 674-677.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

26 Mart 1986' da İzmit' te doğdu. İlk öğrenimini, İgsaş İlköğretim Okulu' nda tamamladı. Orta öğrenim ve liseyi Kocaeli Anadolu Lisesi' nde tamamladı. Yüksek öğrenimini Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü' nde 2009 yılında tamamladı. Aynı zamanda Selçuk Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünde yan dal yaptı. 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı.