



**TC.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NORMAL ve DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU
OLUŞTURULAN SIÇAN OVARYUMLARINDA AQP-7, AQP-8 ve
AQP-9'UN İMMÜNOLOKALİZASYONU**

SEVİNÇ ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2016-SİVAS

TC.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NORMAL ve DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU
OLUŞTURULAN SIÇAN OVARYUMLARINDA AQP-7, AQP-8 ve
AQP-9'UN İMMÜNOLOKALİZASYONU

SEVİNÇ ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CELAL KALOĞLU

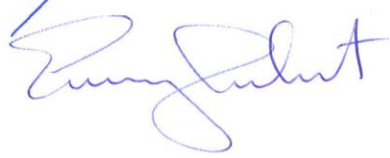
2016- SİVAS

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. Celal KALOğLU



ye Prof.Dr. H.Eray BULUT



ye Prof.Dr. M. Aydın KETANİ



ONAY

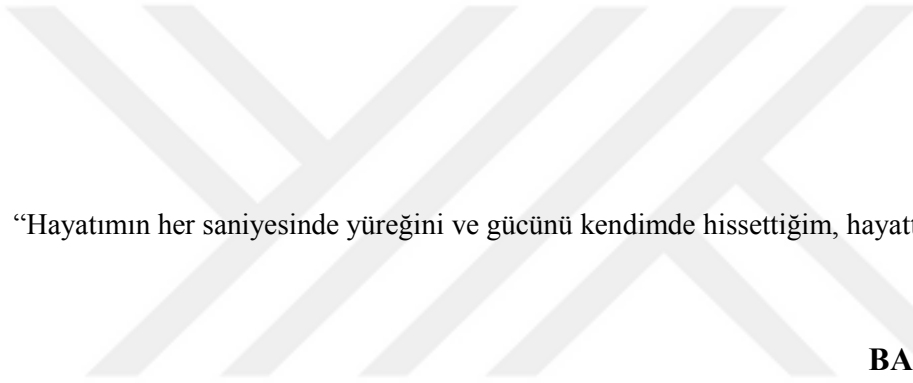
Bu tez çalışması, 03.06.2016 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri yeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Zahid Tefik AğAOğLU
SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Bu çalışma (T-601), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.



“Hayatımın her saniyesinde yüreğini ve gücünü kendimde hissettiğim, hayatta olmayan”

BABAM’A...

ÖZET

NORMAL ve DENEYSEL POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULAN SIÇAN OVARYUMLARINDA AQP-7, AQP-8 ve AQP-9'UN İMMÜNOLOKALİZASYONU

Sevinç ŞİMŞEK

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji-Embriyoloji A.D.

Danışman: Prof.Dr.Celal KALOĞLU

2016

Kronik anovulasyonun nedenlerinden, Polikistik Over Sendromu, amenore, hirsutizm, anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakteristik doğurganlık çağındaki kadınlarda sık görülen endokrin bozukluktur. Bu çalışmada su kanal proteinlerinden aquaporin7, 8, 9'un PKOS'lu sıçan ovaryumlarında immunolokalizasyonları gösterildi.

Sıçanlarda PKOS oluşturmak amacıyla letrozole (1mg/kg) uygulandı. PKOS'lu ve kontrol sıçanlarının ölüm sonrası alınan ovaryum dokularına immunohistokimyasal incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı. Kesitler Olympus marka (BX51, Japon) mikroskopta değerlendirilip uygun alanlardan fotoğraflar alındı.

AQP-7, AQP-8, AQP-9 PKOS'lu ovaryumlardaki kistik foliküllerin yoğun olarak teka tabakalarında eksprese edildi. PKOS'lu ovaryumlarda AQP9 daha çok kortekste ve kan damarlarında, zona pellucidada, ve corpus luteum hücrelerinde eksprese edilirken, kontrol ovaryumlarında ise primer oositte eksprese olmuştur. PKOS'lu ovaryumlarda AQP8 yoğun olarak korteks ve medulla kan damarlarında, primer oositlerde ve granüloza hücrelerinde eksprese edilmiştir. Kontrollerde, yüzey epitelyum tabakasında ekspresyon oluşurken, primer oositlerde zayıf ekspresyon gözlemlendi. AQP7 ekspresyonu PKOS'lu oositlerde daha fazla ortaya çıkarken, kontrollerde korteksin kan damarlarında ve oositlerde daha fazla eksprese olmuştur.

Sonuç olarak, her 3 proteinin ekspresyonları arasındaki önemli farklılık, bu proteinlerin, normal ve PKOS gibi patolojik koşullarda farklı roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. PKOS'lu ovaryumunda farklı hücrelerde aquaporinlerin daha yüksek ekspresyonu, aquaporinlerin normal antrum ve folikül oluşumunu yöneten yüksek su taşınımına ilave olarak patolojik koşullarda da rol alabileceklerini düşündürmektedir. Bu proteinler arasındaki farklı ekspresyonlar, PKOS'ta foliküler yapı değişikliği ile özellikle granüloza ve oositteki morfolojik değişikliklerle ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar sözcükler: Aquaporin-7, Aquaporin-8, Aquaporin-9, ovaryum, polikistik over sendromu, sıçan

ABSTRACT

IMMUNOLOCALIZATION OF AQP-7, AQP-8 and AQP-9 IN NORMAL EXPERIMENTALLY POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME RAT OVARIES

Sevinç ŞİMŞEK

Master of Sciences Thesis, Department of Histology-Embryology

Supervisor: Prof. Dr. Celal KALOĞLU

2016

Polycystic ovarian syndrome that the cause of anovulation, is an endocrine disorder seen in women in the fertility age characteristic with amonerhae, hirsutism, anovulation and large polycystic ovaries. In the present study, immunolocalizations of Aquaporins7, 8 and 9 which were water channel proteins have been demonstrated in rat ovaries with PCOS.

Letrosole (1mg/kg) was applied to rats in order to constitute PCOS in rats. Routin tissue preparation protocols were done in ovarian tissues from the PCOS and the control group animals. Immunohistochemically stained tissue sections were evaluated under an Olympus BX 51 microscope and relevant fields of views were photographed.

AQP7, 8 and 9 were expressed intensively in the theca layer of cystic follicles in the PCOS group ovaries. While AQP9 was expressed in the cortex, blood vessels, zona pellucida and corpus luteum cells, it was expressed in primary oocytes of the control group ovaries. AQP8 was expressed in the cortical and medullar blood vessels and in the primary oocytes and granulosa cells of the ovaries of PCOS group. The expression of AQP8 in the control group was seen in the surface epithelium whereas a weak expression was detected in primary oocytes. AQP7 expression was observed more in the PCOS group ovaries, it was expressed in the cortical blood vessels and oocytes in controls.

In conclusion, the variations in the expressions of those three proteins could suggest that they play different roles in normal and in pathological conditions such as PCOS. Higher expression of aquaporins in ovarian cells of the PCOS group could suggest that they might play roles in pathological conditions in addition to their high water transport during normal antrum and follicle formation. Different expressions among those three proteins in follicular alterations especially in granulosa cells and oocytes in PCOS could suggest their crucial roles on those alterations.

Key Words: Aquaporin 7, Aquaporin 8, Aquaporin 9, ovaries, polycystic ovarian syndrome, rats



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni birçok konuda aydınlatan, yardımcı olan danışman hocam, **Prof. Dr. Celal KALOĞLU'na**,

Her zaman yakın ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen hocalarım, **Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT, Prof. Dr. Emel KOPTAGEL** ve **Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN'a**

İhtiyacım olan yardım ve desteği eksiksiz sunan ve esirgemeyen **Yrd. Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ** ve **Yrd. Doç. Dr. Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN'a**,

Hayatımın her anında iyisiyle ve kötüsüyle benimle olan ve bu yolda bana destek olan candan öte **dostlarıma**,

Hayatımın her safhasında hep anlayışla davranıp, bu zaman zarfı boyunca anlayış kavramının aslında ne kadar önemli olduğunu bana gösterdikleri için, bana her konuda seçme hakkı tanıyıp kararlarıma saygı duydukları ve sonuna kadar bana güvendikleri için **canım ailem'e...**

Teşekkür ederim.

Sevinç ŞİMŞEK

SİVAS, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryumlar	4
2.2. Ovaryum Anatomisi	5
2.3. Ovaryum Histolojisi	5
2.4. Ovaryum Embriyolojisi.....	6
2.5. Ovariyal Döngü	7
2.6. Oosit ve Oogenezis	8
2.7. Folikül ve Folikülogenezis	9
2.8. Polikistik Over Sendromu:	11
2.8.1. Tanım ve Tarihçe:	11
2.8.2. Sıklığı:	12
2.8.3. Familial Görüş:	12
2.8.4. Klinik Bulgular:.....	13
2.9. PKOS'un Patofizyolojisi:	14
2.9.1. Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon:.....	15
2.9.2. Abartılı Adrenarj:	15
2.9.3. İntraoveryan Faktörler :.....	16

2. 9. 4. İnsülin Rezistansı ve Hiperinsülinemi :	16
2. 9. 5. Obezite:	17
2. 9. 6. Genetik faktörler:	17
2. 9. 7. Anormal Granüloza hücreleri:	18
2. 9. 8. Enzimatik Defektler:	18
2. 10. PKOS Patolojisi:	18
2. 11. PKOS'da Hormonal Denge:	19
2. 12. PKOS'da tedavi:	19
2. 13. Aquaporinler	20
2. 13. 1. Plazma Zarı ve Su Taşınması:	20
2. 13. 2. Aquaporinlerin Ana Tipleri ve Fonksiyonları:	24
2. 14. AQP'ler ve Üreme Sistemi:	28
2. 14. 1. Dişi Üreme Sisteminde AQPler:	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3. 1. Kullanılan Cihazlar:	33
3. 2. Kimyasal Maddeler:	34
3. 3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:	36
3. 4. Doku Preparasyonu :	37
3. 5. Semikantitatif Skorlama Yöntemi:	37
3. 6. Işık Mikroskopi:	38
3. 7. İmmünohistokimya Boyama Protokolü :	38
3. 8. İmmunofloresan Boyama Protokolü:	40
4. BULGULAR	42
4.1. Kontrol ve Deney Grubu Morfolojik Bulgular (H&E)	42
4.2 Kontrol Grubu Aquaporin-7 Bulguları	45

4.3 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-7 Bulguları	55
4.4 Kontrol Grubu Aquaporin-8 Bulguları	67
4.5 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-8 Bulguları	77
4.6 Kontrol Grubu Aquaporin-9 Bulguları	87
4.7 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-9 Bulguları	93
5. TARTIŞMA	103
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	119
7. KAYNAKLAR	121
8. EKLER	151
ÖZGEÇMİŞ	153

SİMGELER VE KISALTMALAR

A:	Antrum
CO:	Cumulus Oophorus
CR:	Corona Radiata
PKOS:	Polistik Over Sendromu
ET:	Epitel Tabakası
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
AQP-7:	Aquaporin-7
AQP-8:	Aquaporin-8
AQP-9:	Aquaporin-9
GH:	Granüloza Hücreleri
GL:	Granüloza Lutein Hücreleri
K:	Korteks
KD:	Kan Damarı
M:	Medulla
PFH:	Primer Folikül Hücreleri
PO:	Primer Oosit
SO:	Sekonder Oosit
TA:	Tunika Albuginea
TE:	Teka Eksterna
Tİ:	Teka İterna
TLH:	Teka Lutein Hücreleri
ZP:	Zona Pellucida
H&E:	Hematoksilen ve Eozin

TABLolar ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1. Kontrol Grubunda Semikantitatif Skorlama Yöntemi.....	101
Tablo 2. Deney Grubunda Semikantitatif Skorlama Yöntemi.....	102
Şekil 1. Ovaryumlar	4
Şekil 2. Letrozole'nin kimyasal yapısı	33
Şekil 3. Kontrol ve deney ovaryumlarının morfolojik görüntüsü (H&E) boyama.....	43
Şekil 4. Kontrol grubu ovaryum genel görüntüsünde epitelyum tabakasında kortekste AQP-7 immünolokalizasyonu	47
Şekil 5. Kontrol grubu korteks medullada AQP-7 immünolokalizasyonu.	49
Şekil 6. Kontrol grubu çeşitli foliküllerde (primordiyal primer ve sekonder) AQP-7 immünolokalizasyonu.....	51
Şekil 7. Kontrol grubu tersiyer folikülde ve corpus luteumda AQP-7 immünolokalizasyonu.....	53
Şekil 8. Deney grubu (PKOS) ovaryum genel görüntüsünde ve kistik foliküllerde AQP- 7 immünolokalizasyonu.....	57
Şekil 9. Deney grubu (PKOS) kistik foliküllerde ve epitelyum tabakasında AQP-7 immünolokalizasyonu.....	59
Şekil 10. Deney grubu (PKOS) kortekste, medulla ve corpus luteumda AQP-7 immünolokalizasyonu.....	61
Şekil 11. Deney grubu (PKOS) primordiyal ve primer foliküllerde AQP-7 immünoloklizasyonu.	63
Şekil 12. Deney grubu (PKOS) sekonder ve tersiyer folikülde AQP-7 immünolokalizasyonu	65
Şekil 13. Kontrol grubu ovaryum genel görüntüsünde ve epitelyum tabakasında AQP- 8 immünolokalizasyonu.....	69

Şekil 14. Kontrol grubu kortekste medullada ve primordiyal folikülde AQP-8 immünolokalizasyonu	71
Şekil 15. Kontrol grubu primer folikülerde, sekonder folikülde, tersiyer folikülde AQP-8 immünolokalizasyonu).	73
Şekil 16. Kontrol grubu corpus luteumda AQP-8 immünolokalizasyonu	75
Şekil 17. Deney grubu (PKOS) kistik foliküllerde AQP-8 immünolokalizasyonu.	79
Şekil 18. Deney grubu (PKOS) kortekste, medullada, epitelyum tabakasında AQP-8 immünolokalizasyonu.....	81
Şekil 19. Deney grubu (PKOS) primordiyal, primer, sekonder, tersiyer foliküllerde ve corpus luteumda AQP-8 immünolokalizasyonu.....	83
Şekil 20. Deney grubu (PKOS) çeşitli folikülerde AQP-8 immünolokalizasyonu.....	85
Şekil 21. Kontrol grubu genel ovaryum görüntüsünde, kortekste, medullada, epitelyum tabakasında ve primordiyal folikülde AQP-9 immünolokalizasyonu ..	89
Şekil 22. Kontrol grubu primer foliküllerde, sekonder folikülde, tersiyer folikülde ve corpus luteumda AQP-9 immünolokalizasyonu.....	91
Şekil 23. Deney grubu (PKOS) ovaryum genel görüntüsünde ve kistik foliküllerde AQP-9 immünolokalizasyonu.	95
Şekil 24. Deney grubu (PKOS) epitelyum tabakasında kortekste, medullada, primordiyal foliküllerde, primer folikülerde AQP-9 immünolokalizasyonu....	97
Şekil 25. Deney grubu (PKOS) sekonder folikülde, tersiyer folikülde ve corpus luteumda AQP-9 immünolokalizasyonu.	99

1. GİRİŞ

Stein-Leventhal sendromu yada yaygın adı ile Polikistik Over Sendromu (PKOS) sıklıkla 30 yaş altı kadınlarda, kalın bir over dokusu içinde iyi huylu birçok kist ile karakterize bir hastalıktır. Bu olgularda; kronik anovülasyon, infertilite ve hiperandrojenizm söz konusudur. PKOS üreme çağındaki kadınların %5-10'unu etkilerken, infertilite problemi yaşayan kadınların %70'inde sorun PKOS kaynaklıdır (1).

Hiperandrojenemik kadınların öykülerinde, peripubertal başlayan menstrüel düzensizlik sıklıkla görülen bulgulardan biridir. Bu olguların %80'inde oligo-amenore görülürken, hastaların %20'sinde ise düzenli adetler görülebilmektedir. Vakaların %30'unda ise ciddi disfonksiyonel uterin kanama meydana gelebilmektedir. Bu hastalarda androstenedion'un artmış periferik aromatisasyonundan dolayı, artmış endometrial hiperplazi ve endometrium kanser riski mevcuttur (2, 3, 4). Hiperandrojenemi yanında, genetik olarak kıl foliküllerinin artmış androjen duyarlılığı mevcuttur. Hirsutizm (aşırı tüylenme), PKOS olgularında %70 oranında görülür. Obez kadınlarda bu bulgular daha sıktır. PKOS'lu hastaların %30'unda kistik akne, %10'unda alopesi görülmektedir. Virilizasyon PKOS' da nadir görülmesine rağmen, varlığında overyan veya adrenal neoplaziler, hipertekozis, konjenital adrenal hiperplazi (KAH) veya eksojen androjen alımı gibi nedenlerle birlikte değerlendirilmelidir (2, 5).

PKOS'da %50 oranında android tipte obezite görülür. Android obezitedeki yağ dokusu, metabolik olarak aktiftir. Obez PKOS'lularda genelde insülin yüksekliği, LH, SHBG, IGFBP-1 düşüklüğü tespit edilir (2, 6). PKOS' da %10 oranında galaktore görülür, hiperprolaktinemi ile beraber seyreden glukoz toleransı ile hiperandrojenemi arasındaki ilişki ilk kez 1921'de Archard'ın sakallı, diyabetik bir kadın sunması ile gösterilmiştir. Günümüzde PKOS ile insülin rezistansı arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Bu hastalarda akantozis nigrikans da sık görülür. İnsülin direnci daha çok obez PKOS'lularda tespit edilir. Bu hastalarda, 40'lı yaşlarında %20-40 oranında tip-II diyabet gelişmektedir (2, 7, 8, 9).

Transmembran su akışı, hücre yaşamının temel özelliklerinden birisidir. Moleküllerin taşınmasına ek olarak, ozmotik dengenin korunması için de suyun hücre membranı boyunca doğru hareketi elzemdir. Çoğu hücrede, membran boyunca suyun basit hareketi söz konusu iken, diğer hücrelerde çok büyük miktarda su geçişi vardır. Bu hücreler suyun daha hızlı veya yavaş hareketini sağlayan sıkı bir kontrol mekanizmasına ihtiyaç duyar. İlk kez böyle su geçirgenliği yüksek hücrelerde tanımlanan aquaporinler (11) 25-34 kDa ağırlığında küçük proteinlerdir. Hücrenin hacim ve ozmolaritesini düzenleyen bu hidrofilik integral membran proteinleri çok yüksek miktardaki suyun hızlı bir şekilde hareketini kolaylaştırır (11, 12, 13).

1986'da Benga ve arkadaşları PCMBs (p-(Chloromercuri) benzenesulfonate)'ye bağlanan kırmızı kan hücrelerinde bir membran proteini tanımladılar ve bu proteinin hücre zarlarında su kanallarının varlığını gösteren bir su taşıma inhibitörü olduğuna karar verdiler (14, 15). 1992'de Agre ve çalışma arkadaşları daha sonra AQP1 olarak adlandırılan bir su kanalı proteinini tespit ettiler (16). AQP ailesi yüzlerce üyeye bununla birlikte farklı büyüklüklerde kanallara ve madde seçiciliğine sahiptirler. Bakterilerde, bitkilerde, farklı sınıflara ait hayvanlarda belirlenmişlerdir. Bu protein grupları; tıpkı üre ve gliserol gibi iyonik yüklü olmayan küçük çözünmüş maddeleri taşırlar (17). Bugüne kadar, memelilerde aquaporinlerin 13 izoformu tespit edildi ve bunlardan 12 tanesi dişi ve erkek üreme sistemlerinde saptandı. Bu aquaporinlerin, memelilerin üremelerinde önemli bir rol oynadığının göstergesidir. Aquaglyceroporinler gibi AQP3, 7, 9 ve 10 da dahil olmak üzere non-selektif su kanalları vardır. Bunlar gliserol ile birlikte üre, su ve diğer küçük non-elektrolitlere de geçirgendirler. AQP1 ve 11 Endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi hücre içi organeller içerisinde lokalize olmuştur ve hücre içi su dağıtımına aracılık ederler. AQP6, 8, 12 ise alışılmadık dışında bazı özelliklere sahiptir ve fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (18, 13).

AQP'lerin yapı analizlerinde, 4 bağımsız su kanalı moleküllerinin bir tetramer yapısı oluşturacak şekilde organize oldukları gösterilmiştir. Tetramer içerisindeki merkez gaz ve iyon geçişi için bir tünel oluşturur (19, 20). AQP'lerin bazı alt tiplerinin ise gaz taşınmasının kolaylaştırılmasındaki fonksiyonları gösterilmiştir (21). AQP4, nitrik oksit ve oksijen taşınmasını kolaylaştırır (19). AQP6, Hg bağlanma bölgelerinin

sayısına göre iyonlar için gözenek bölgeleri içerir, aynı zamanda AQP6 burada her monomerle beraber anyon kanal işlevlerine de sahiptir (22, 23).

Folikülogenez sürecinde hızlı bir foliküler büyüme meydana gelir (24) ve antral folikül aşamasında folikül içerisinde sıvı birikimi meydana gelir (25, 26). Bu dönemde granülosa hücreleri su taşınmasında ve antral sıvının oluşumunda önemli fonksiyon görürler (27, 28, 29). Granülosa hücreleri tarafından antral boşluğa gerçekleştirilen su taşıma oranı inülininden 3-5 kat daha yüksektir. Granülosa hücrelerindeki bu yüksek su taşıma oranları bazı AQP tiplerine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. AQP7 ve 9'un sıçan granülosa hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir (30). Diğer taraftan AQP7 ve 8 seviyelerinin folikül gelişimi ile bağlantılı olduğu, östrojen ve progesteron seviyesine bağlı olarak eksprese oldukları ileri sürülmüştür (31). AQP5 primordial foliküllerin yassılaştıran folikül hücrelerinde ve gelişen foliküllerin granülosa hücrelerinde ekspresyonu gözlenmiştir. Domuzlarda AQP9 granülosa hücrelerinde tanımlanmış ve ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (32, 33, 34, 35). AQP9 proteininin aynı zamanda insan granülosa hücrelerinin sitoplazma ve hücre membranında yerleşimi gösterilmiş, çekirdeğinde tanımlanan mRNA'sı ise testosteronla ilişkilendirilmiştir (33).

İlk kez 1935 yılında tanımlanmasına ve günümüzde hipofiz bezinin gonadotropolarından LH ve FSH hormonlarının anormal salgınına bağlı olarak LH'nin overde erkeklik hormonu yapımını artırdığı mekanizması kabul görmesine rağmen, esasen diğer pek çok hormonal hastalık gibi PKOS'un nedeni de tam olarak anlaşılamamıştır (1). Diğer taraftan, PKOS'un moleküler mekanizmasında aquaporinlerin lokalizasyonu ile ilgili çalışmalar çok az sayıdadır. Bu çalışmada hidrofilik integral membran kanal proteinlerinden olan AQP7, AQP8 ve AQP9'un PKOS'lu sıçan ovaryumlarında immunolokalizasyonları gösterilerek PKOS'la olan ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. AQP7, AQP8 ve AQP9 moleküllerinin PKOS'lu sıçan ovaryumlarındaki rollerinin belirlenmesi; büyüme, folikülogenez, oogenez, embriyogenez, hücre adezyonu ve çoğalması süreçlerini açıklayabilir. Ayrıca PKOS'un üreme üzerine olumsuz etkileri izlenebilir ve hastalıkların daha iyi anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde de yardımcı olabilir.

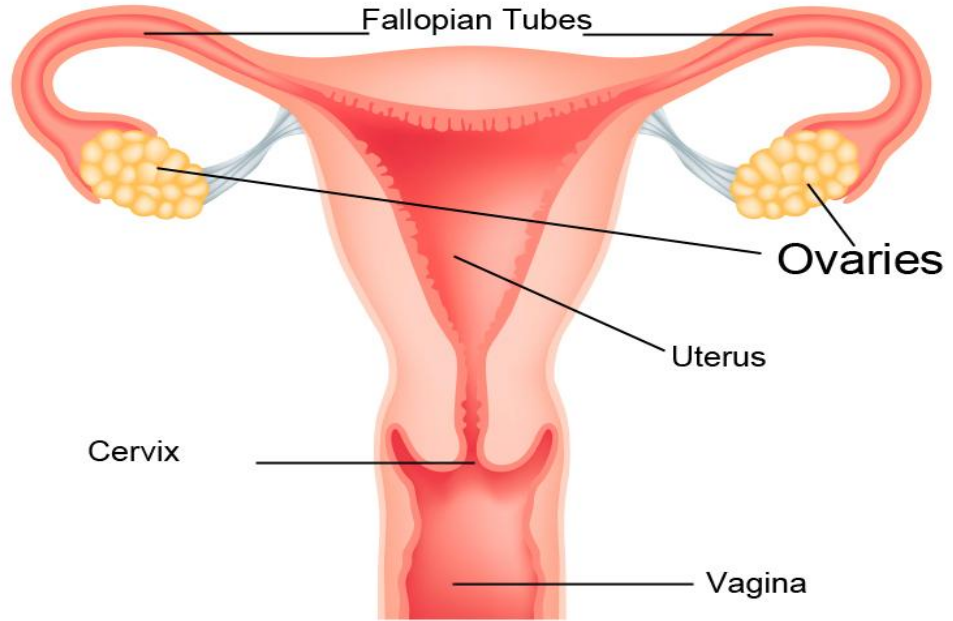
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumlar

Ovaryumlar, pelvis boşluğunun yan duvarlarına dayalı, sağ ve solda olmak üzere iki adettir. Biçim ve büyüklükleri bir bademe benzer (Şekil 1).

Ovaryumların birbiri ile ilişkili iki işlevi vardır. Dişi cins hücrelerini üretir (oogenesis) ve steroid hormonları salgılar (steroidogenesis). Ovaryumlardan salgılanan steroidler, cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasını, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol eder (36).

Ovaryum östrojen ve progesteron hormonlarını salgılayan, genital döngünün düzenlenmesinde görev alan ve kadın genital sisteminin diğer organları üzerinde de etkili olan bir organdır (37).



Şekil 1. Ovaryumlar (<http://www.ncis.com.sg/wbn/slot/u3376/Types%20Cancer%20Collateral/Ov.>)

2.2. Ovaryum Anatomisi

Erişkin kadınlarda ovaryum 3-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde ve 0,5-1,5 cm kalınlığında, yanlardan basık oval biçimli bir organdır. Ağırlığı 4-6 gr kadardır.

Ovaryum normal durumda pelviste fossa ovarica denilen çukurlarda bulunur. Fossa ovarica, pelvisin yan duvarlarında arteria iliaca interna ile arteria iliaca externa arasında bulunur. Ovaryum dıştan, bağ dokusundan yapılmış ve tunica albuginea denilen sert bir zarla sarılmıştır. Bu zar, yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Ovaryumun temel dokusunu yapan stroma ovarii, yapı ve durum bakımından substantia corticalis ve substantia medullarisden oluşmuştur (38).

Ovaryumlar, organa damar ve sinirlerin giriş ve çıkış yaptığı yer olan hilusta bulunan, kan damarlarını ovaryumlara ileten özel bir periton katlantısı olan ve mezovaryum olarak adlandırılan bir askı ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılı olarak bulunmaktadır. Yüzeyi ovulasyon başlamadan önce düzgündür, ovulasyondan sonra ise bu düzgünlük giderek kaybolmaktadır (39, 40).

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, içte medulla, dışta korteksten oluşur. Medulla, zengin kan ve lenf damarları ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks, periferde medullayı sarar ve hücrelerden zengin sıkı bağ dokusuna gömülü ovaryum foliküllerini içerir. Medulla ile korteks arasında belirgin bir sınır yoktur. Hilusta korteks sona erer ve mesovarium medulla ile devam eder. Korteks stroması, iğ biçimli fibroblast benzeri hücreleri ve retiküler lif ağını içerir. Medulla stroması da fibroblastlardan, elastik liflerden ve düz kas hücrelerinden oluşmuştur (36).

Yüzeyi germinal epitel olarak isimlendirilen basit prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitelin altında tunika albuginea adı verilen yoğun bir düzensiz sıkı bağ dokusu yer almaktadır. Bu tabakanın hemen altında da ovaryum foliküllerini içeren korteks bölgesi bulunmaktadır (41).

2.4. Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7.haftasına kadar gonadlar erkeğe ve dişiye ait morfolojik özelliklere sahip değildirler.

Gonadlar, ortaya bir çift uzunlamasına, genital veya gonadal kabartı halinde çıkarlar. Epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşim yoğunlaşmasıyla oluşmuşlardır. Gelişimin 6.haftasına kadar genital sırtlar içinde germ hücreleri yoktur.

İlk eşey hücreleri, gelişimin 4.haftasında vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5.haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır ve 6.haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testise farklanmasında da ilkel germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır.

İlkel cins hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonlar oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda ilkel cins kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evre farklanmamış dönem olarak adlandırılır. Bu gonada da farklanmamış gonad denir (42).

Gametogenezis, özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin oluşum ve gelişme sürecidir. Gametler primordiyal germ hücrelerinden gelişir. Primordiyal germ hücreleri ilk olarak intrauterin 3. haftanın sonunda vitellüs kesesi duvarının allantoise yakın olan kısmında görülür. Transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile incelendiğinde 15-20 µm çapında, yuvarlak şekilli olduğu görülür. Eksantrik yerleşimli, ince granüler kromatine sahip nükleusu vardır. Bir veya iki, geniş nükleolusu bulunur. Primordiyal germ hücrelerinin sitoplazmasında organel azdır. Nükleusa yakın oval veya yuvarlak şekilli, tübülo-veziküler kristallara sahip mitokondriyonlar bulunur. Tek bir Golgi aparatusu, perinükleolar yerleşimli granüler endoplazmik retikulum sisternaları, serbest ribozom, polizom ve veziküller içerir. Primordiyal germ hücreleri sitoplazmasında glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları da yer alır. Primordiyal germ hücreleri ve etrafındaki somatik hücreler arasında yakın temas alanları gözlemlenebilir (43).

3. haftanın sonu, 4. haftanın başlarında primordiyal germ hücreleri ameboid hareketlerle gelişmekte olan barsak dorsal mezenterinden geçerek gelişmekte olan ilkel gonadlara göç eder. TEM ile incelendiğinde fuziform ve irregüler bir şekil aldığı ve psödopodları oluşturan sitoplazmik uzantılar içerdiği görülür. Bu aşamada hala üzerinde çalışılmakta olan kemotaktik faktörler ve sitokinlerin rol aldığı düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar ekstrasellüler matrikste bulunan fibronektinin migrasyona etkileri ile ilgili çalışmalar yapmıştır (8). Primordiyal germ hücreleri yüzeyinde glikokaliks oluşmakta ve bu da ekstrasellüler matrikste, aralarında fibronektinin de bulunduğu makromoleküllere bağlanmasını sağlamaktadır. Glikokaliks, kemotaktik faktör ve sitokinlerin bağlanabilmesi için de imkan sağladığı için önemlidir (43).

Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşamaz ise dejenere olarak yok olurlar. Aynı şekilde gonadların da ileri gelişimi için primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşmış olması gerekmektedir (43, 44, 45, 46). Primordiyal germ hücreleri gelişmekte olan gonadlara ulaşır ulaşmaz oogoniumlara farklılık. Bu arada mitoz ile hızla çoğalarak oogoniumların sayıları artar (43, 44, 45, 46). Oogoniumlar bölünerek hücre kümeleri oluştururlar ve hücreler arası köprüler aracılığı ile birbirleri ile ilişki kurarlar. Bu olaya kolonizasyon adı verilir. Hücreler arası köprülerin hızlı mitoz sonucu sitoplazmaların tam ayrılamamasına bağlı olduğu düşünülmektedir (43).

2.5. Ovariyal Döngü

Pubertenin başlaması ile hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (gonadotropin releasing hormone, GnRH) hipofizin ön lobundaki (adenohipofiz) hücrelerden gonadotropinlerin salgılanmasını uyarır. Follikül uyarıcı hormon (follicle stimulating-hormone, FSH) ve luteinizan hormon (luteinizing hormone, LH) olarak bilinen bu hormonlar, overdeki siklik değişiklikleri uyarır ve kontrol ederler.

Bu gonadotropinler her 28 günde bir tekrarlanan folliküllerin gelişip olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasını içine alan ovaryum siklusunu ve ovaryal siklus ile eş zamanlı olaylanan uterus, uterus tüpleri, vajina ve meme bezlerinde bir dizi değişikliğe neden olan menstruel siklusu hazırlarlar. Diğer bir deyişle, ovaryal

ve menstruel siklusları içine alan ve 28 günde bir tekrarlanan üreme siklusunu düzenlerler (42).

2.6. Oosit ve Oogenezis

Oogenezisi prenatal ve postnatal maturasyon olmak üzere iki evrede inceleyebiliriz. İntrauterin 4. aydan sonra oogoniumlardan primer oositler oluşmaya başlar. Bu arada yüzeyel germinal (kölomik) epitelin proliferasyonu ve invajinasyonları sonucu oluşan follüküler hücreler de oogonia ve primer oosit kümelerini sarmaya başlar. İntrauterin 7. aydan sonra artık hiç oogonia kalmamıştır ve her primer oosit ayrı olarak follükül hücrelerince sarılmıştır. Bu yapı artık primordiyal follükül olarak adlandırılır. Follüküler hücreler ve germ hücreleri arasında desmozom ve geçit bağlantıları (Gap junction) oluşmuştur. Tek katlı yassı follüküler hücreleri çevre bağ dokudan ayıran bazal lamina da oluşmuştur (43). Bu dönemde overde sadece primordiyal follüküller görülür. Artık mitoz ile çoğalma da biter. Primer oositlerin ileri gelişimi follükül hücrelerince salgılanan oosit maturasyonunu engelleyici faktör (OMI) aracılığı ile puberteye kadar engellenir ve I. mayozun profazında (diploten evresinde) duraklar. Oluşan primordiyal follüküllerin bir kısmı atrezi ile kaybolur ve primordiyal follükül sayısı doğuma kadar bir miktar azalır (43, 44, 45, 46).

Yenidoğanın over korteksinde 700.000-2.000.000 civarında primordiyal follükül bulunur. Devam eden atreziler sebebiyle sayı puberteye kadar 400.000'e kadar düşer. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel siklus başında 5-15 follükül gelişmeye başlar ancak bir, nadiren de daha fazlası ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilir. Dominant follükül dışındaki gelişmeye başlayan diğer follüküller atreziye uğrar. Bu şekilde follükül sayısı menapoza kadar gittikçe azalır. Over korteksinde hiç follükül kalmadığı zaman menapoz gerçekleşir. Puberteden menapoza kadar ancak 400-500 follükül ovule olabilecek şansa sahip olur (43, 44, 45, 46, 47).

2.7. Folikül ve Folikülogenezis

Folikül, ovaryumun temel fonksiyonel birimidir. Folikül yapısı, bir oosit ve onu çevreleyen granüloza ve teka hücrelerinden oluşmaktadır. Normal folikülogenez sırasında, her bir folikül içerisinde oositin büyümesi ve olgunlaşması; granüloza ve teka hücrelerinin proliferasyon ve gelişmeleri oldukça koordineli bir şekilde gerçekleşir. Bu koordinasyon ovüle olan oositin fertilizasyona ve sonraki embriyonik gelişime hazır olduğunu gösterir. Folikülün gelişmesi ve sonuçta bu gelişimsel programın başarılı bir şekilde tamamlanması için, folikül yapısı içinde bazı morfolojik ve moleküler değişiklikler meydana gelmektedir (48).

İmmatür oositin mayoz bölünmesini tamamlaması, büyüme ve gelişmesi için granüloza hücrelerine; granüloza hücrelerinin de proliferasyon, differensiyasyon ve fonksiyon görmeleri için oosite ihtiyaçları vardır. Bu çift yönlü etkileşim, gelişim süresince devam etmektedir. Ovariyan foliküllerin gelişimini düzenleyen kompleks hücre-hücre etkileşimleri, endokrin, otokrin, parakrin regülatörler ve oluklu bağlantı tipi hücrelerarası bağlantılar ile olmaktadır. İki foliküler kısım için de esasi olan bu etkileşimde gelişim oranını belirleyen asıl faktörün hangisi olduğunu tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada Eppig ve ark. sekonder folikülden izole ettikleri orta büyüklükteki bir oositi, foliküler gelişimin ilk basamağı olan primordial foliküle transfer etmiş ve bu transferin foliküler gelişimi ve somatik hücre differensiyasyonunu ikiye katladığını görmüşler; sonuçta memeli foliküllerinin gelişimini düzenleyen asıl faktörü oosit olarak tanımlamışlardır (49). Oosit maturasyonu ve folikülogenezis eşzamanlı ve uyumlu bir şekilde oluşur.

Pubertede, gonadotropinlerin etkisi ile primordiyal folikül hücreleri önce tek katlı kübik ardından çok katlı kübik hücreler halini alarak primer folikülleri oluşturur. Folikül hücrelerine artık granüloza hücreleri denmektedir. Primer oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellucida da şekillenmeye başlar. Granüloza hücreleri arasında boşluklar oluşur ve bu boşluklar birleşerek tek bir boşluk olan antrumu meydana getirir. Foliküle artık sekonder veya antral folikül adı verilmektedir. Granüloza hücreleri dışında bazal lamina vardır. Bazal laminanın dış kısmındaki stromal hücrelerden ise teka interna ve teka eksterna tabakaları gelişir. Folikül en gelişmiş halini aldığı anda Graff folikülü adını alır. Ortada geniş bir antrum vardır. Antrumun bir kenarında ortada

primer oosit, primer oositi çevreleyen zona pellüsida ve etrafındaki granüloza hücreleri tarafından oluşturulmuş korona radyata hücreleri bulunur. Bu yapıya kumulüs ooforus kompleksi (KOK) adı verilir. Antrum etrafında çok katlı kübik hücrelerce oluşturulan membrana granüloza tabakası yer alır. En dışta ise teka interna ve eksterna yer alır. Granüloza ve teka hücreleri arasında camsı membran da denilen bazal lamina vardır.

Gelişen folliküllerden bir tanesi dominant folliküldür ve ovulasyon aşamasına kadar gelebilir. Ovulasyondan sonra geçici glanduler yapıdaki korpus luteumu oluşturur. Antral boşluk kısmı önce kanla dolar, sonra bağ dokusu yapısını alır. Granüloza hücreleri kollabe olarak kıvrımlı bir hal alır ve granüloza lutein hücrelerini oluşturur. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturur. Ovulasyona kadar gelişemeyen diğer folliküller dejenere olarak bağ doku yapısındaki korpus atretikumu oluşturur. Korpus luteum gebelik oluşmaz ise serum seviyesi düşen gonadotropinlerin (Gn), esasen de luteinizan hormonun azalan etkisi sonucunda geriler ve korpus albicansı oluşturur (43, 44, 45, 46).

Follikül gelişiminde puberteden sonra hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden salgılanan follikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH), ayrıca overde sentezlenen otokrin ve parakrin etkili lokal büyüme faktörleri (Growth differentiation factor 9 (GDF9), kemik morfogenetik protein6 (BMP6), kemik morfogenetik protein7 (BMP7), kemik morfogenetik protein15 (BMP15), c-Kit, epitelial growth faktor (EGF), bazik fibroblast growth factor (bFGF), anti-Müllerian hormon (AMH)) rol alır. Bunlar oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde sentezlenip salınabilir. AMH gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde sentezlenip parakrin etki göstererek diğer folliküllerin gelişimini inhibe etmesi ve dominant follikülün belirlenmesi açısından diğer faktörlerden ayrı bir yere sahiptir (50, 51, 52, 53)

2. 8. Polikistik Over Sendromu:

İnfertilite kliniklerine çocuk sahibi olamama şikayetiyle başvuran kadınların %40'ında infertilitenin başlıca nedeni ovulasyon bozukluğudur (54). Anovulatör infertilitenin en sık nedeni (%73) ve doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluk ise polikistik over sendromudur (55, 56).

Oligo-anovulasyon, klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları ve ultrasonografide polikistik overlerle karakterize PKOS'nin etyopatogenezi net olarak bilinmediği için, günümüzde tedavi seçenekleri de genellikle semptomatiktir. Gebelik isteği olan infertil hastalarda ideal tedavi şemasında, düşük maliyetli invaziv olmayan tedavi seçenekleriyle başlamak ve cevap alınmazsa invaziv medikal ve cerrahi seçeneklerin kullanılması uygun olmaktadır (57).

2. 8. 1. Tanım ve Tarihçe:

Kronik anovulasyonun %80 nedeni olan Polikistik Over Sendromu (PKOS), ilk olarak 1935 yılında Irving F. Stein ve Michael L. Leventhal tarafından amenore, hirsutizm, anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakteristik semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (2, 58).

İlk biyokimyasal bozukluk, 1950'lerin ortalarında üriner LH da artış olarak bildirilmiştir (2). Hemen arkasından artmış androjen üretimi sendromun kardinal bulgusu olarak bildirilmiştir (3). Periferik aromatzasyon nedeniyle, Östron (E1)/ Östradiol (E2) oranının, E1 lehine arttığına dikkat çekilmiştir (59). Son olarak bu tanımlara insülin direnci ve hiperinsülinemi de ilave edilmiştir (2, 3). 2003 yılında düzenlenen bir uzman toplantısında, 1990 NIH(National Institutes of Health/ National Institute of Child and Human Development(NIH/NICHHD)) kriterleri yeniden gözden geçirilmiş ve öncekine benzer şekilde diğer etyolojik nedenler ekarte edildikten sonra, sendrom tanısının aşağıdaki üç kriterden ikisinin birlikteliği ile koyulması önerilmiştir (60, 61):

1. Oligo-anovülasyon,
2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları, hiperandrojenemi,
3. Ultrasonografide polikistik overler.

Üreme dönemindeki kadınlar morfolojik ve hormonal kriterler ile değerlendirildiğinde PKOS prevalansı %6-8 arasındadır. Düzenli adet gören kadınların %75'inde ultrasonografik incelemelerinde PKOS saptanmaz (62, 3, 6).

2. 8. 2. Sıklığı:

Reprodüktif yaştaki kadınların yaklaşık %4-12'sinde görülen PKOS, kadınların en sık görülen reprodüktif endokrinopatisidir (63, 64, 65). PKOS'un tahmini sıklığı çalışma yapılan popülasyon ve overlerin ultrasonografik görüntülenmesinin tanı kriterlerine dahil edilip edilmemesine göre değişebilir. Tipik klinik görünümün varlığında sonografik olarak polikistik overlerin görülmesi sendromun tanısını desteklerken, hiperandrojenizm hikayesi olmayan normal ovulatuvar kadınlarda da polikistik overlerin bulunabileceği gösterilmiştir (66). Daha da ötesi PKOS'lu kadınların az bir kısmında ultrasonografi ile takipte normal folikül gelişimi düzenli ovulasyon olduğu görülmüştür (67). Sonuç olarak, tanı için polikistik overin tespiti klinik olarak uygun görülmektedir. Bununla birlikte, polikistik overlerin morfogenezi hastalığın yegane şartı değildir.

2. 8. 3.Familyal Görüş:

PKOS'un ailevi olabileceği bildirilmiştir (68). Hiperandrojenizm, anovulasyon ve polikistik overlerin klinik ve laboratuvar tetkiki kullanılarak yapılan birkaç araştırmada PKOS'un birinci derece akrabalar arasındaki sıklığı araştırılmış ve sonunda etkilenmiş kadınların anne ve kız kardeşlerinde PKOS ihtimalinin normal kontrol kadınlarınkinden yüksek olduğu bildirilmiştir (69). Sonuç olarak yapılan diğer benzer çalışmalar da değerlendirildiğinde bu bulgular göstermektedir ki; PKOS'lu kadınların birinci derece akrabaları PKOS için anlamlı derecede risk altındadırlar. Bu bulgular

hiperandrojeneminin bir genetik temeli olabileceğini, kısmen de hastalığın ailevi olabileceğini desteklemektedir.

2. 8. 4. Klinik Bulgular:

Hiperandrojenemik kadınların öykülerinde, peripubertal başlayan menstrüel düzensizlik sıklıkla görülen bulgulardan biridir ve oligo-amenore şeklinde kliniğe yansır. Oligo-amenore görülme oranının oldukça yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir. Buna rağmen çok az miktardaki hastalarda düzenli adetler görülebilmektedir. Vakaların bir kısmında ise ciddi disfonksiyonel uterin kanama meydana gelebilmektedir. Bu hastalarda androstenedion'un artmış periferik aromatzasyonundan dolayı, artmış endometrial hiperplazi ve endometrium kanser riskinin de mevcut olduğu belirlenmiştir (2, 3, 62).

PKOS'da hirsutizm yüksek oranlarda görülür. Hiperandrojenemi yanında genetik olarak kıl foliküllerinin artmış androjen duyarlılığı mevcuttur. Obez kadınlarda bu bulgular daha sık görülür. PKOS'lu hastaların bir kısmında kistik akne görülürken, çok az bir kısmında alopesi görülmektedir. Virilizasyon PKOS'da nadir görülmesine rağmen, varlığında overyan veya adrenal neoplaziler, hipertekozis, konjenital adrenal hiperplazi (KAH) veya eksojen androjen alımı gibi nedenlerle birlikte değerlendirilmelidir (2, 5).

PKOS hastalarının yarısından fazlasında android tipte obezite görülür. Android obezitedeki yağ dokusu, metabolik olarak aktiftir. Obez PKOS'lularda genelde insülin yüksekliği, SHBG (seks hormon bağlayıcı globulin), IGFBP- 1 (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1) düşüklüğü tespit edilmiştir (2, 6).

PKOS'lu olguların büyük bir çoğunluğunda infertilite probleminin mevcut olduğu bulunmuştur. Buradaki primer defektin anovülasyon olduğu belirlenmiştir. Ayrıca artmış LH seviyelerinin oosit üzerine olumsuz etkilerinden dolayı, artmış spontan abortus oranının mevcut olduğu tespit edilmiştir (2, 70).

PKOS vakalarının çok azında galaktore tespit edilmiştir. Hiperprolaktinemi ile beraber seyreden glukoz toleransı ile hiperandrojenemi arasındaki ilişki ilk kez 1921'de Archard'ın sakallı, diyabetik bir kadın sunması ile gösterilmiştir. Günümüzde PKOS ile insülin rezistansı arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Bu hastalarda akantozis nigrikans da sık görüldüğü belirlenmiştir. İnsülin direnci daha çok obez PKOS'lularda tespit edilmiştir. Bu hastaların, 40'lı yaşlarında belirgin oranlarda tip-II diyabetin geliştiği öne sürülmüştür (2, 7, 8).

2. 9. PKOS'un Patofizyolojisi:

PKOS'un patofizyolojisi, çok sayıda klinik, laboratuvar ve deneysel verilere rağmen halen yeterince bilinmemektedir. PKOS birkaç sistemin bozuk çalışmasının beraber etkisi sonucu ortaya çıkan, multifaktöryel bir hastalık olarak düşünülebilir.

Bu sistemler;

1 - Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon

2- Abartılmış adrenarj

3- İntraoveryan faktörler

4- İnsülin rezistansı ve hiperinsülinemi

5- Genetik faktörler

6- Enzimatik defektler

2. 9. 1. Hipotalamo-hipofizer disfonksiyon:

PKOS olgularında, LH seviyelerinin artması ile anormal serum gonadotropin seviyelerinin kendini gösterdiği bulunmuştur. Bu artışın hipotalamik bir defekte bağlı olduğu öne sürülmüştür. PKOS olgularında LH/FSH oranlarının oldukça yüksek olduğu öne sürülmüştür. PKOS'da yüksek LH seviyelerinin neden olduğu overyan androjenlerdeki artış, LH'nin etkisi ile teka hücrelerinde aşırı sentezlenme ile açıklanabildiği öne sürülmüştür.

Teka hücreleri, granüloza hücrelerinin bazal membranına difüze olan çok miktarda androstenedion ve az miktarda testosteron sentezler. Androjenik prekürsörler FSH etkisi ile granüloza hücrelerinde aromatisasyonla östron ve östradiole dönüştürülürler. Normal FSH etkisi ile birlikte aşırı LH mevcudiyeti teka hücrelerinde abartılı androjen sentezine neden olur. Anovulatuvar sikluslarda kronik olarak yükselmiş E2 (östradiol), hipofizdeki GnRH reseptör sayısını ve hipofizin duyarlılığına artırarak LH'nin pulsatil salınımının artmasına neden olabilir. Çoğu olguda semptomların peripubertal dönemde başlaması, bu dönemde gelişmeye başlayan hipotalamo-hipofizer eksende GnRH salınım frekansı ve amplitüdünün artması ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir (2, 3, 59, 71).

2. 9. 2. Abartılı Adrenarji:

PKOS olgularında semptomların peripubertal başlaması ve adrenokortikotrop hormon (ACTH) stimülasyonu ile adrenal androjen salınımında aşırı artış olması, adrenal bezin erken ve aşırı aktivitesini gösterir. Bu abartılı adrenarjik aktiviteye bağlı, P450 c 17 geniyle kodlanan 17,20 liyaz ve 17 hidroksilaz aktiviteleri artarak androjenlerdeki artış oluşur. Periferik dokularda androjenler östrojene dönüşerek, kan östrojen düzeyini artırırlar. Kronik östrojen artışına bağlı olarak hipofizin GnRH'a duyarlılığı artarak, LH'nin pulsatil salınımı artar. FSH salınımının negatif feed-back ile azaldığı belirtilmiştir (9).

2. 9. 3. İntrooveryan Faktörler :

Androjenler düşük kontranstrasyonlarda aromataz etkisi ile östrojene dönüştürülür ve östron' un (E₁) negatif feed-back etkisi ile FSH düzeyi düşer. PKOS'lularda FSH'ın tam deprese olamaması nedeniyle yeni folikül gelişimi sürekli olarak uyarılır, fakat foliküller tam matürasyon ve ovulasyon safhasına ulaşamazlar. Foliküller 2-8 mm çapında küçük foliküler kistler şeklinde kalıp birkaç ay devamlılık gösterirler. Bir kısım foliküller atreziye giderken, başka bir folikül grubu aynı gelişim paternine girer. Foliküler atrezi overyan stromal dokuyu artırır. Artmış stromal doku, LH uyarımı ile androstenedion (A) ve testosteron (T) sentezini artırır. Artmış androjen seviyesinin; normal foliküler gelişmeyi önlerken, prematür folikül atrezisini indüklediği belirlenmiştir (2, 3).

2. 9. 4. İnsülin Rezistansı ve Hiperinsülinemi :

Non-obez PKOS' lu kadınların az bir kısmında, obez PKOS'lu kadınların ise büyük çoğunluğunda hiperinsülinemi ve insülin direnci görülmektedir (62). İnsülin direnci, insülin reseptörlerinde azalma, postreseptör defekt, reseptöre karşı antikor veya insülin etkisine karşı inhibitörlere bağlı olabildiği öne sürülmüştür (59). PKOS'daki insülin direncinin etyolojisi tam olarak açıklık kazanamamıştır.

Hiperandrojenemik kadınlarda hepatik ve periferik insülin direnci birlikte görülür. İlave olarak bu hastalarda beta hücre defekti de görülür. PKOS' lu kadınların lenfosit, adipoz doku ve periferik kas dokularında insülin etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda insülin sinyalizasyonunda postreseptör bir defekt olduğu ileri sürülmüştür (3).

İnsülin karaciğerden Seks Hormon Bağlayan Globulin (SHBG) ve IGFBP-1' in sentezini azaltarak biyolojik olarak aktif androjenlerin ve östrojenin serbest fraksiyonlarının artmasına neden olur (2).

2. 9. 5. Obezite:

PKOS'lu hastaların yaklaşık olarak yarısı obezdir. Çoğu olguda menstrüel bozukluk başlamadan önce belirgin kilo artışı öyküsü bulunur. PKOS'daki obezite android tipte obezitedir. Bu tip obezitede karın duvarında, visseral mezenterik bölgelerde yağ doku birikimi olur. Bu yağ dokusu katekolaminlere karşı duyarlı olduğundan metabolik olarak aktiftir. Android tipte yağ dağılımı ile birlikte, hiperinsülinemi, glukoz intoleransı, diabetes mellitus (DM) ve androjen yapım hızında artış olur. Androjenlerdeki artış, SHBG düzeyini azaltarak serbest testosteron ve E2 (estradiol) düzeylerinde artışa neden olmaktadır (2, 3, 5).

Zayıf PKOS'lularda serum growth hormon (GH) ve LH düzeyi, obez olgulara göre daha yüksektir. Over granüloza hücrelerinde GH reseptörü bulunmakta ve GH, FSH ile sinerjik etki göstererek IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) sentezinin artmasına, dolayısı ile teka hücrelerinde LH etkisinin artmasına neden olduğu açıklanmıştır (5).

2. 9. 6. Genetik faktörler:

Yapılan bir çalışmada PKOS olgularında, Human Lökosit Antijen Drw-6 (HLA Drw-6) frekansının artış gösterdiği ve PKOS gelişiminin 6. kromozom üzerindeki HLA-Dr bölgesi ile ilişkisinin olduğu belirtilmiştir (72).

Steroid hormonlar, karbonhidrat metabolizması ve gonadotropin sekresyonu ile ilgili aday genler PKOS'un genetik araştırmalarında göz önünde bulundurulmuştur. Bu genler arasında stereoid biyosentezinde rol oynayan CYP17, CYP11A ve CYP21 genleri PKOS 'la ilişkisinin varlığı yönünden incelenmiştir. Kapsamlı çalışmalar olmamakla birlikte CYP11A'nın allelik varyantlarının aşırı androjen sentezinde ve PCOS 'un hirsutizmde rolü olduğuna dair deliller açıklanırken, diğer genlerin bir etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (73, 74, 75, 76).

PKOS'lu kadınlarda insülin direncine eğilim olması nedeni ile karbonhidrat metabolizmasında rolü olan genler incelenmiştir (77, 78). Bu metabolizmada PCOS için

diğer aday genler leptin, resitin ve TNF-alfa'dır. Ancak son ikisi için bir ilişki ortaya konamamıştır(79, 80, 81).

Gonadotropin sekresyonu bakımından PKOS için aday genlerle ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Dopamin GnRH sekresyonunu inhibe ettiğinden dopamin reseptör gen değişiklikleri PKOS'daki artmış LH sekresyonuna katkıda bulunabildiği açıklanmıştır (82).

2. 9. 7. Anormal Granüloza hücreleri:

Yapılan bir çalışmada, PKOS olgularının folikülleri yüksek konsantrasyonda biyoaktif FSH içermelerine rağmen granüloza hücrelerinin FSH'a anormal yanıt gösterdiklerini belirlemişlerdir (83).

2. 9. 8. Enzimatik Defektler:

İnsan overyan teka hücrelerinde yapılan klinik ve *in vitro* çalışmalarda androjen sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan sitokrom P450 c17 alfa enzim sisteminde intrinsik bir anormalliğın olduğu saptanmıştır (84).

2. 10. PKOS Patolojisi:

Polikistik over, makroskobik olarak normal over büyüklüğünün 2-5 katı kadardır. Gros olarak beyaz bir kapsülle çevrilidir. Aynı sayıda primordiyal folikül vardır, ancak gelişen ve atreziye giden follikül sayısı iki kat artmıştır. Mikroskobide yüzeyel korteks, fibrotik ve hiposellülerdir ve damarları içerir. Küçük atrofik foliküllere ilaveten, artmış sayıda luteinize teka interna içeren folliküller de vardır (85). En dıştaki tunika kalınlığı %50, kortikal stroma 1/3 kat, subkortikal stroma 5 kat artmıştır. Stromadaki artış, hem teka hücre hiperplazisine hem de aşırı folikül atrezisine bağlıdır. Over hilus hücre toplulukları (hiperplazi) normalden 4 kat fazladır (86).

2. 11. PKOS'da Hormonal Denge:

PKOS hastalarında östrojen ve androjenlerin günlük ortalama sentez miktarları yüksektir ve bu durum LH uyarısına bağlıdır (83). Dolaşımda testosteron (T), andosterodion (A), dehidroepiandosteron (DHEA) ve dehidroepiandosteron sülfat (DHEAS), 17 OH progesteron ve E2 düzeyleri yüksektir. T, A ve DHEA doğrudan overler tarafından salgılanırken, DHEAS'ın tamamına yakını sürrenallerden salgılanır (87). PKOS'da hiperandrojenemiye adrenal bez de etkili olmakla beraber esas kaynağın overler olduğu belirtilmiştir (88).

Normal kadınlarla karşılaştırınca sürekli anovulasyonu olan PKOS'lu olgularda, LH konsantrasyonunun daha yüksek, FSH konsantrasyonunun ise düşük veya normalin alt sınırında olduğu belirtilmiştir (89). SHBG (seks hormonu bağlayan globulin), karaciğerde sentezlenen, üretimi testosteron tarafından baskılanan, E2 ve tiroksin tarafından stimule edilen bir proteindir ve PKOS olgularının yaklaşık yarısında SHBG azalmış olarak bulunurken (90), total östrojen ise artmış olarak bulunmuştur (89, 91).

FSH düzeyi PKOS hastalarında düşük düzeylerde olduğundan, foliküller gelişmekte olduğu fakat tam olgunluğa erişemediğinden ovulasyonun gerçekleşmediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu durumda artan sürelerde 2-15 mm çapında çok sayıda folikül kistlerinin oluştuğu belirtilmiştir. Atrezi sırasında granüloza tabakasında dejenerasyon oluşmadığı, teka hücrelerinin ise varlığını sürdürdüğü belirtilmiştir ve böylece teka hücrelerinin androjen salgılamaya devam ettiği belirtilmiştir. Bu şekilde yükselmiş olan androjen düzeyleri androjenden östrojene dönüşümünü artırdığı, SHBG sentez düzeyini baskıladığı ve böylece östrojen düzeyinde yükselmeye neden olduğu bildirilmiştir. SHBG de oluşan azalma, serbest testosteron seviyesinde yükselmeye neden olur (92).

2. 12. PKOS'da tedavi:

PKOS'lu olguların %40-70'inde infertilite mevcuttur (2). Dolaşımdaki insülin ve androjenin düşürülmesi, tek başına spontan ovulasyonu sağlayabileceğinden, zayıflama tedavisi PKOS'da ilk seçenek olmalıdır. Ağırlıkta % 5-7 oranında bir azalma

hiperandrojenemiği düzeltmekte, insülin direncini azaltmakta ve spontan ovulasyonu % 70 oranında geri döndürerek, fertilitiyi düzeltmektedir. İdeal zayıflamada amaç, Vücut Kitle indeksini (VKİ) 27'nin altına indirmektir.

PKOS'lu kadınlarda ovulasyon ve gebelik sağlamak için 40 yıla yakın bir sürede, farklı ilaçlar ve tedavi protokolleri geliştirilmiştir. Kullanımının kolay olması, ucuz, etkin, yan etki açısından güvenilir olması ve sıkı takip gerektirmemesinden dolayı ilk seçilecek ilaç Klomifen Sitrattır. (KS) (93, 58, 59, 5, 94). KS'a yanıtızsızlık halinde, KS'la indüksiyon süresini uzatma, KS'a deksametazon ekleme, bromokriptin ekleme, hipofizer desensitizasyon gibi yöntemler denenmesine rağmen, sıklıkla eksojen gonadotropinlere geçiş yapılır. Ovulasyon indüksiyonu ile gebe kalamayan hastalarda ise Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) denenebilir.

2. 13. AQUAPORİNLER

2. 13. 1. Plazma Zarı ve Su Taşınması:

Biyolojik organizmaların korunması, osmotik ve iyonik dengenin sağlanması, çevrede oluşan değişikliklere karşı uyumu onun yetenekleriyle ilgilidir. Vücut, ekstrasellüler sıvı özelliklerini, standart kimyasal konsantrasyonlarını ve uygun sıcaklık ve basınç koşullarını sağlayan düzenleyici mekanizmalara sahiptir, böylece hücreler doğru bir şekilde fizyolojik işlevleri yerine getirebilme yeteneğindedirler (11).

Hayvan hücreleri, hücre içi ve hücre dışı ortamların belirlenmesinden ve ayrılmasından sorumlu olan seçici bir membrana sahiptirler. Bu membran hücre içerisinde yaşamsal öneme sahip parçaları tutma rolüyle beraber çift katlı bir lipoprotein tarafından oluşturulur, hücresel fonksiyonlar için gerekli olan oksijenin, çözülmüş maddeler ve iyonlar gibi maddelerin giriş ve çıkışını düzenler (95). Birkaç istisna dışında, bu tür moleküllerin taşınması transmembran proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Bu proteinler su moleküllerini taşımaktan sorumludur, bu moleküller polar olsalar bile, çok düşük bir aktivasyon enerjisi kullanıldığı için kolaylaştırılmış difüzyona da imkan verirler ($E_a < 5$ kcal/mol) (96). Tüm canlı organizmaların hücreleri, başlıca su olmak üzere benzersiz özelliklere sahip bir maddeden oluşmuştur ve bu gezegendeki yaşamın varlığı için şarttır. Suyun kan plazmasının %95 ini oluşturduğu bilinmektedir ki su hücrelere oksijen ve besin maddelerinin taşınmasından sorumludur. Su insan hücrelerinin

ana bileşenidir ve bir organizma içerisinde bütün fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerle ilişkilidir. Su vücut sıcaklığının düzenlenmesi için izin verir, toksin atılmasından sorumludur (idrar ve ter yolu ile) ve hidrojen bağlayıcı bağlantıları sayesinde ideal bir organik çözücüdür. Hücre dışı ortamda, su turgor basıncını muhafaza etmek amacıyla, farklı eriyiklerin hücre içerisine geçişine izin veren, temel biyolojik bileşen olarak işlev görür (97).

Su moleküllerin membranlar boyunca taşınmasına ek olarak, ozmotik dengenin korunması için de gereklidir. Çoğu hücrelerde, membran boyunca serbestçe su akışı meydana gelir, ozmotik denge sağlanır (bazal geçirgenlik), fakat diğer hücrelerde membran boyunca su akışı için çok büyük bir kontrol vardır, bu da suyun akış hızının daha yavaş veya daha hızlı olmasına sebep olur. Hızlı akış, aquaporinler olarak adlandırılan proteinler aracılığıyla gerçekleşir (11).

Su, oksidasyon metabolizması sırasında oluşan son üründür. Pek çok metabolik tepkimede hem reaktan hemde ürün olarak görev yapar. Enzimlerin aktif bölgesi, suyun reaktan veya ürün olmasına bağlı olarak suyu yapısına kabul eder veya dışlar. Homeostazın devam ettirilmesi için, suyun vücut bölümleri arasında dağılımı, pH dengesi, elektrolit konsantrasyonları sıkı bir şekilde denetlenmektedir (98).

Hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasındaki bu su değişimi polarite farkına rağmen, plazma zarında basit difüzyon yoluyla gerçekleşir (11). Bununla birlikte suyun hızlı hareket etmesini gerektiren, difüzyonun membran kanalları tarafından kolaylaştırıldığı böbrek gibi dokular vardır (97)

Plazma membranı, 2 tabakalı bir lipit, karbonhidrat ve proteinlerden oluşur (99). Zar proteinleri maddelerin taşınmasına olanak tanır (95). Bu taşıma AQP ler olarak adlandırılan proteinler tarafından oluşturulan transmembran kanallar aracılığıyla gerçekleştirilebilir (11). Bu proteinler plazma zarının bir tarafından diğer tarafına suyun pasif hareket etmesine izin verir ve çift katlı lipid tabakasına geçirirler, bunlar aynı zamanda su molekülü için yüksek ölçüde özgül olan bir hidrofilik kanala sahiptirler. Ayrıca, AQP ler extrasellüler (hücre dışı) ve sitoplazmik membranların her ikisinde de karşılıklı birbirine bakan yan kısımlarında etki alanlarına sahiptirler (99).

AQP ailesi yüzlerce üyeye bununla birlikte farklı büyüklüklerde kanallara ve madde seçiciliğine sahiptirler, bakterilerde, bitkilerde, farklı sınıflara ait hayvanlarda belirlenmiştir. Bu protein grupları iyonik yüklü olmayan küçük çözünmüş maddeleri taşırlar, tıpkı üre ve gliserol gibi (17). AQP lerin 10 farklı tipinden daha fazlası dişi ve erkek üreme sistemlerinin her ikisinde dahil olmak üzere birçok memeli sistemlerinde tespit edilmiştir (100). Bu, memelilerin üremelerinde önemli bir rol oynadığının göstergesidir (101).

1991 yılında Smith ve ark. ilk olarak eritrosit membranında Rh (D) antijeni ile birlikte orijinal ismi CHIP28 (kanal bağımlı integral protein, 28 kDa) olan su kanalını tanımlamışlardır (102). 1992 yılında Preston ve ark. *Xenopus* oocytesleri üzerinde CHIP28'i su kanalı molekülü olarak göstermişlerdir (16). 1992' de Agre ve ark. su kanalı proteinlerine aquaporin adını vermişlerdir. (103, 16) 2004 yılında Takata ve arkadaşları memelilerde 11 farklı kanalın fonksiyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bugüne kadar, Aquaporinlerin 13 izoformu memelilerde tespit edildi ve 12 tanesi dişi ve erkek üreme sistemlerinde ifade edildi (104, 13, 18).

Çalışmalar kanalın yapısı, fonksiyon mekanizması, filogenetik ağacı yönünde ilerledikçe aquaporin tipleri arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Mesela; aquaporin 3, 7, 9 suya olduğu kadar gliserole de geçirgenlik gösterir, bu yüzden bunlara aquagilseroporinler de denir. Aquaporin 1, 2, 4, 5 yalnızca suya geçirgendir, suyun önemli olduğu her doku ve organda yaygın dağılım göstermektedir (105). Böbrekte; su reabsorbsiyonunda rol oynayan en az 6 tip mevcuttur (aquaporin 1, 2, 3, 4, 6, 7) (106). Gözyaşı, tükürük, pilorik ve duedonal bezler gibi salgı işlevi gören bezlerde aquaporin 5 in yaygın olarak bulunduğunu Matsuzaki (107), Nejsun (108), Song ve arkadaşları (109) bildirmişlerdir. Peter Agre, su kanal proteinlerini tanımlayarak 2003 yılı Nobel Kimya ödülünü almaya hak kazanmıştır (110).

Aquaporin molekülünde her monomer, 8 adet transmembran segmentten oluşur. Bunlardan 6 tanesi heliks yapıda diğer 2 tanesi ise kısa segmenttir. Kısa segmentlerin 1 tanesi 2-3 diğeri 5-6 helikal segmentler arasındadır. Kısa segmentler asparajin (Asn), prolin (Pro), alanin(Ala) içermektedir. Bunlara kısaca NPA sekansları denilmektedir. NPA içeren kısa heliksler porun ortasına doğru karşılıklı uzanırlar ve böylece yalnızca su geçişine izin veren spesifik bir filtre meydana getirirler. Monomerler arası boşluklar

por görevi üstlenmemiştir. Kanal altında, su gibi küçük moleküllerin geçişine izin veren, özellikle bir boğaz bölgesi mevcuttur. Boğazı meydana getiren yan zincirler fenilalanin (Phe58), histidin (His182), sistein (Cys191) ve arjininden (Arj197) meydana gelmektedir. Aquaporin1 monomerinden uzanan rezidüer genellikle nonpolardır. Fakat su, geçiş esnasında peptid omurgasındaki karbonil grupları ile hidrojen bağı meydana getirir. Ayrıca NPA halkasındaki 2 Asn rezidüsü su ile hidrojen bağı meydana getirir (Asn76, 192). NPA sekansındaki Arj ve His pozitif yük oluşturarak su için itici kuvvet oluştururlar (110).

Aquaporinler, fetal gelişim sürecinde de önemli görevler üstlenirler. Plesanta ve fetal membranlar arasında sıvı alışverişi, deri keratinizasyonundan önce amniyotik sıvı oluşumu, normal beyin gelişiminde serebrospinal sıvı oluşumu ve akciğer gelişimi esnasında sıvı sekresyonu örneklerden bazılarıdır. İmplantasyondan önce blastosit gelişim safhasında kavite, etrafını çevreleyen trofoektoderm epiteli tarafından salınan sıvı ile doludur. Maymunlarda bu sırada eksprese olan aquaporinler bulunmuştur. Aquaporin3 ve 8 trofoektodermin basolateral membranında, aquaporin9 ise apikal membranında baskın olarak bulunmaktadır. Gelişimin ileriki basamaklarında trofoektoderm, koriyon ve plesantayı meydana getirir. İnsanlarda da, AQP1, 3, 8 ve 9 plesanta ve korionda rapor edilmiştir. AQP1 ayrıca korioallontoik membranda da mevcuttur. Son zamanlarda aquaporin8 yumurta plesantasında tespit edilmiştir. Gestasyonun 45. gününden sonra hem su hem de üre geçirgenliğinde rol oynayan aquaporin3 trofoblast hücrelerinde başlıca aquaporindir. Bu dönemlerde bu artışla korele olarak plesanta üresinde hızlı bir artış olur (gebeliğin 100. gününden sonra). Erişkinde böbreğinde proksimal tübülde filtratın %81'i reabsorbe olur. Bu kısımda baskın olan AQP1, ayrıca medullada inen vasa rekta kısmında da bulunur (111).

Hücre fiziolojisindeki öneminin yanısıra, AQP lerin gametlerin dondurularak saklanması sürecinde de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (112). Bu olay membran aracılığıyla su taşınmasında AQPlerin katılımı varsayımına dayanmaktadır, dondurma biyolojisinde kritik bir noktadır çünkü hücre içi buz oluşumunda etkili hücrel bir dehidrasyon ile sonuçlanır (113). Ancak, dondurarak saklama üzerindeki olası etkisine rağmen bu işlem sırasında bu proteinlerin eylemini gösteren az sayıda çalışma vardır.

2. 13. 2. Aquaporinlerin Ana Tipleri ve Fonksiyonları:

Geçirgenliklerine göre, memeli aquaporinleri 3 gruba ayrılmıştır:

- a) Su geçirgen, seçici Aquaporinler (AQP0, AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6 ve AQP8)
- b) Aquagliseroporinler su, gliserol, üre ve diğer çözünmüş maddelere geçirgendir (AQP3, AQP7, AQP9 ve AQP10)
- c) Hücreiçi (subcellular) aquaporinler veya süper-aquaporinler (AQP11 ve AQP12) ki bunlar diğer AQP lerle daha düşük homolojiye sahiptirler (114).

AQP0, daha önceden de ana intrinsik protein olarak bilinen AQP0, kemirgenler, sığırlar ve insanlar gibi çeşitli türlerin göz merceğinde bulunmuşlardır. Gözde göz merceğinin bulunduğu yerde, su akışının hızlı olmasını gerektiren önemli hacim değişiklikleri eşlik eder ve AQP0 hücre membran porları ile su taşınması için gerekli hızı sağlar. Ayrıca göz merceği kan damarlarından yoksun olduğu için, lokal göz mikrosirkülasyonunda da rol aldığı görülmüştür. Kanıt olarak, AQP0'ın su taşınmasıyla ilişkili olması dışında, aynı zamanda göz merceği fibrillerinin birleşim yerlerinin boşluklarında hücre adezyonu hareketinde yapısal bir rol oynadığı öne sürülmüştür (115). Diğer AQP lerin aksine AQP0 ın su geçirgenliği oldukça düşüktür (116).

AQP1, insan eritrositlerinde karakterize olan bu protein ailesinin ilk üyesidir (117). Bu protein başlıca kırmızı kan hücrelerinde, beyin, akciğer ve böbrekler de eksprese edilmiştir ve suyun geri emilimi ve sıvı salgılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Tanımlanmış böbrek AQP leri arasında (AQP1, 2, 3, 4 ve 6), AQP1 en fazla eksprese edilmiştir, özellikle proksimal tübülün yükselen dallarında eksprese edilmiştir (118). Bu protein aynı zamanda kılcal damar endotelinde eksprese edilmiştir, insanda su taşınması için önemli olduğu teyit edilmiştir.

AQP2, başlıca böbrekte eksprese edilmiştir ve proteindeki mutasyon diapedes insipidusla bağlantılıdır (119). Bu mutasyonlar kromozom bölgesi 12q13 te yerleşim yaparlar, erkek ve kadınların her ikisini de etkileyen bu mutasyonlar, su kanallarının fonksiyonlarında bir sapma veya kesintiye yol açarlar. Dolayısıyla bu çalışmalar AQP2

lerin sadece su kanalı olduğunu ve onların işlevlerini düzenlediğini kanıtlamaktadır (120). AQP2 nin üreme kanallarındaki rolü hala tam olarak bilinmesede rete testiste, duktus efferentlerde ve köpeklerin epididimisinde de bulunmuştur (121).

AQP3, böbrek, üriner sistem, solunum sistemi, sindirim sisteminde, deri ve göz gibi geniş çaplı çeşitli organlarda bulunmuştur (122, 123, 124). Çoğu durumda bu protein epitel hücrelerinde veya lümen yüzeyinden eksprese edilmiştir. X leavis oositleri kullanılarak, yapılan çeşitli çalışmalar, bu proteinin, gliserol ve diğer çözünmüş maddelerin - etilen glikol, propilen glikol ve asetamin gibi- taşındığını göstermiştir (125), ki bu aquagliseroprinler içinde kabul edilir bir nedendir.

AQP4, bu proteinin beyinde su dengesinin düzenlenmesiyle ilgili olduğu bilinmektedir, beyinde ödem olunca bu protein ifadesinde bir artış oluşur (123). İnsanlarda, serebral iskemi ve glial tümörlerin oluşumunda ilerlemiş bir AQP4 ekspresyonu doğrulanmıştır (126).

AQP5, başlıca alveolar epitelde, trakea ve bronşların en üst tabakasında belirlenmiştir (17). AQP5 in akciğerlerde su homeostazının muhafaza edilmesinde önemli bir görevi olduğu belirtilmiştir (127). Ağız mukozasında tükürük salınımını, göz yaşı ve tükürük bezlerinin salınımını düzenleyebilir (128, 129). İlginç bir şekilde, AQP5 ekspresyonu sıçan uterusunda, östrojen verilmesinden sonra daha hızlı bir şekilde artmıştır (130).

AQP6, konusundaki çalışmalar, bu proteinin hücre içi vezikül membranlarında özellikle nitrat taşıdığını ortaya çıkarmış ve böbrek kanalında klorür gibi bazı iyonlara geçirgenliğini göstermiştir (17).

AQP10, özellikle jejunumda olmak üzere insanların ince bağırsağında bulunmuştur (131). Aquagliseroprinler gibi ayrı işlev sunarlar ve aynı zamanda emici epitel hücrelerinde de mevcuttur. Bu proteinin diğer bir özelliği, insanlarda, absorpsiyonlarının gliserol türevlerinin varlığında örneğin etilen glikol ve propilendiol varlığında inhibe olmasıdır (132).

AQP11 VE 12, süper-aquaporinler adında yeni bir aquaporin alt familyasına aittirler (130). AQP11, böbrekler, beyin, karaciğer, testis, kalp, bağırsak ve adipoz

dokularda ifade edilmiştir (133) ama fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (134). Hücre içerisinde AQP11'in işlevini anlamak için daha fazla çalışma gerekmektedir. AQP12, sadece pankreatik asiner hücrelerinde bulunmuştur (134). Belirli bir konumda, bu alt-familyada tespit edilememiştir, ancak pankreastaki varlığı pankreatik hücre sıvıları ve sindirim enzimi salgısında olası bir yolu göstermektedir (135). AQP12 diğer AQPlerle karşılaştırıldığında AQP11 ile (%32 civarında) yüksek bir benzerliğe sahiptir ki en az %15 özdeşlik göstermektedir (41). AQP12 nin yapısal bir özelliği ise diğer bütün bilinen AQPlerden farklı olarak, bir N-terminal sitoplazmik bölgenin eksikliğidir (130).

AQP7

AQP7, ilk olarak sıçan testisinde klonlanmış (136), AQP ailesine ve aquagliseroporin alt grubuna üye olan 269 aminoasit içeren bir proteindir. AQP7, sadece suya değil, aynı zamanda gliserol, üre, arsenik gibi bileşiklere de geçirgendir ve civa kloride duyarsızdır (136, 137, 138).

Üreme sistemi dışındaki dokular arasında, AQP7 böbrek proksimal tübüllerin mikrovilluslarında ve yağ dokusunda yüksek oranda ekprese edilmiştir (139). AQP7 molekülleri, su geçirgenliğine, bunun yanı sıra çözülmüş maddelerin geçirgenliğine katılırlar. Bu protein, başlıca yağ dokusu, testis, kalp, iskelet kası ve böbreklerde belirlenmiştir. AQP7, aynı zamanda düşük moleküler ağırlıkla beraber non-iyonik çözülmüş sürfaktanları taşırlar. Foliküler olgunlaşmada, çalışmalar bu proteinin varlığını granülosa hücrelerinde doğrulamıştır ve antrum oluşumu ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (100).

AQP3'te olduğu gibi, en önemli işlevsel etki ve ilgisi gliserol taşınmasının kolaylaştırılmasıdır. AQP7'nin fizyolojik rolleri yaygın olarak yağ dokusunda çalışılmıştır. AQP7 den yoksun farelerin normal tip farelere göre daha düşük bir plazma gliserol konsantrasyonuna sahip olduğu bulunmuştur. Uzun süreli açlıktan sonra, AQP7 den yoksun farelerin karaciğer adipoz dokusundan gliserol eksikliği hareketi sonucunda aşırı derecede hipoglisemik oldukları gözlenmiştir. Yağ hücresi büyüklüğü artış göstermiştir ve böylece karın içi yağ miktarı da artmıştır (140). Yağ dokusunda, gliserol salgısının daha büyük bir kolaylıkla olması, AQP7 nin varlığına bağlı olarak meydana

geldiği ileri sürülmüştür (141). AQP7'den yoksun farelerde proksimal tübülün gliserolü emmeye yetersizlik gösterdiği bulunmuştur ve böylece gliserol, idrarda tespit edilmiştir ancak glikoz ve gliserol metabolizmasında hiçbir bozulma olmadığı görülmüştür (142). Sıçan ve fare AQP7'nin *Xenopus* oositlerinde ifade edildiği belirlenmiştir (136). Bununla birlikte, insan AQP7 ekspresyonu oosit fonksiyonunun tam bir inhibisyonunu gösterdiği bulunmuştur (143).

AQP8

AQP8, AQP ailesinin bir üyesi olarak kabul edilsede, birincil dizisi bitki tonoplast AQP (TIP)'inine daha yakındır; 4 karşılıklı 6 ekson yapısı vardır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) taşır (144). Pankreatik asiner hücrelerin apikal membranlarında ifade edilmiştir ve kistik fibröz transmembran-iletkenlik regülatörü ile lokalize olabildiği açıklanmıştır (AQP1 ve AQP5 ile beraber). Bu nedenle AQP8 pankreas ekzokrin sekresyonlarının düzenlenmesinde bir rol oynayabilir (145). AQP8, sıçan proksimal tübüllerinde ve böbreğin toplama kanalında düşük seviyelerde bulunur ve karaciğer, testis, mide, bağırsak ve solunum yollarına bağlı hücre tipidir. Ayrıca türler arasında geçirgenlik ve doku lokalizasyonu oldukça farklı varyasyonlarda var gibi görünür (146). AQP8 knockout fareler ise hiç belirgin klinik kusur göstermezler (147).

AQP8, birçok organ ve dokularda, özellikle pankreas, karaciğer, salgı bezleri, böbrekler, testis, epididimis, duodenum, mide, jejunum, akciğer, trakea, ve plesantada ifade edilmiştir (148). Sıçanlarda, farelerde ve insanlardaki bu rekombinant proteinin induksiyonu onun su taşıma üzerindeki etkisini kanıtlamıştır. Buna ek olarak, sıçanlarda ve insanlarda AQP8 üre ve gliserole geçirgen değildir. Ayrıca, insanlarda AQP8 amonyak analoglarına (formamid ve metilamonyum) geçirgendir ve asit-baz dengesi için fizyolojik katkıda bulunmaktadır (148).

AQP9

AQP9, karaciğerde, lökositlerde, testis, beyin ve ovaryumda saptanmıştır (17). Su ve küçük çözülmüş maddelerin geçirgenliğinde yer almaktadır. Beyindeki rolü hala bilinmemekle beraber, laktat ve gliserole geçirgenliğiyle enerji metabolizmasında önemli olabileceği gösterilmiştir (149). AQP9 aynı zamanda domuz yumurtalık kanalı ve uterus; folikül gelişiminden granülosa hücrelerinde lokalize olmuştur (34).

AQP9 lökositlerden (147) ve osteoklastlardan klonlanmıştır ki osteoklast farklılaşmasındaki ifadesinde artış görüldüğü ileri sürülmüştür (150). AQP9 karaciğer hepatositlerinin bazolateral zarında, yüksek şiddette ekspresyon gösterir ki orada bir üre taşıyıcı olarak tanımlanan ve aynı zamanda gliserol alımı metabolizmasına dahil olmuştur. Erkek ratlar da dişilere göre daha muntazam bir ekspresyon gösteren karaciğer AQP9 ekspresyonunda bir cinsiyet farkı vardır (151). Uzun süreli açlık sırasında AQP9'un mRNA ve protein seviyeleri artar ve tekrar beslenme yoluyla karşılanır. Sıçan karaciğerinde AQP9 seviyeleri diabetes mellitusa bağlı olarak artar ve insülinle beraber normal seviyelere tekrar gelir (152, 153). İnsülin yüksek seviyelerine rağmen, obez, insüline dirençli leptin reseptörü mutant farelerde, AQP9 seviyeleri büyük ölçüde artmıştır. AQP9'dan yoksun fareler; anormal gliserol ve glikoz metabolizması göstermezler. Gliserol plazma düzeylerinde belirgin bir artış olduğu halde, üre ve glikoz seviyelerinin normal olduğu bulunmuştur (154). AQP7 ve 9'un her ikisinde arsenit tarafından geçirendir ($AsOH_3$) (138).

2. 14. AQP'ler ve Üreme Sistemi:

Yukarıda da açıklandığı gibi, AQP ler birçok memeli sistemlerinde bulunabilir. Özellikle, AQPler cinsiyetler dikkate alınmaksızın, üreme sisteminin çeşitli organlarında bulunmuştur (155). Böylece memeli üremesinde AQPlerin önemli bir fonksiyonu olduğu gösterilmiştir.

2. 14. 1. Dişi Üreme Sisteminde AQPler:

Dişi (kadın) üreme sisteminde AQPlerin varlığıyla ilgili ilk raporlar, cDNA izolasyonu ve dizisinden sonra insan uterusunda oluşmuştur. Araştırmacılar klonlanmış olan bu DNAnın insan eritrositlerinde bulunmuş olan AQP1 ile %99.8 homolojiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bulunmuş olan AQPlerin arasında 9 izoform, insan, ratlar(sıçanlar) ve fare dişi üreme sistemlerinde ifade edilmiştir (100). Çalışmalar AQP'lerin ekspresyonlarının sıçanların (AQP5 ve 9) (156), farelerin (AQP0, 1, 4, 5) (157); (AQP1, 3, 8) (155), domuzların(AQP1, 5 ve 9) (34) ve insanların uterusunda (AQP1-4) (101) göstermiştir. AQP1 sıçan uterusunda saptanmıştır. Bu proteinlerin lümen içi, bağırsaklar ve kapiller bölmeler arasında su taşınması için bir kontrol sistemini

temsil ettiği öne sürülmüştür (34). Dişi sıçanların tuba uterinasında AQP5, 8 ve 9 un varlığı sadece epitel hücrelerinde gözlenmiştir. Çalışmalar AQPlerin işlevlerinin sadece su taşınmasının olmadığını, aynı zamanda lümen sıvı metabolitlerinin absorpsiyonunda veya salgılanmasında da görev aldığını, aynı zamanda üreme fonksiyonları için uygun bir ortam sağladığını göstermektedir (158).

Sıçanların östrus döngüsü sırasında, AQP9 un bir varyasyonu, proöstrus ve östrus aşamaları esnasında gelişen daha yüksek seviyelerle beraber gözlenmiştir. Bu bulgu, steroid hormonların bu proteinin ifadesini ve tuba uterina lümeninde su taşınmasının kontrolünü düzenleyebildiğini göstermiştir (159).

Skowronski ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, AQP lerin sadece 3 tanesinin (AQP1, 5, 9) dişi üreme organlarındaki ekspresyonu gösterilmiştir. AQP1 ovaryum, tuba uterina ve uterusu lokalizedir. AQP5, bu organların içerisinde mevcut olmasının yanı sıra, aynı zamanda düz kas ve luminal hücreler ve glandular epitel hücreleri ve primordial foliküllerin granüloza hücrelerinde lokalize olmuştur. AQP9 zaten gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinde, tuba uterina ve uterusu ve ovaryum epitel hücrelerinde gözlenmiştir. Bu çalışma aynı zamanda ovaryum AQP9 unun sadece su taşınmasını kontrol etmediğini öne sürmüştür. Bu proteinin güçlü ifadesi ovaryum dokularında, foliküler gelişmede önemli bir etkiye sahip olabilir, çünkü o bir aquagliseroporindir (GLP) ve bu nedenle diğer elektrolitlerin geçişine izin verir. Bu durumda protein, folikül gelişmesi için gerekli olan granüloza hücrelerine yeterli bir östrojen kaynağı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (34).

Çalışmalar, seks hormonlarının AQP genlerinin transkripsiyonlarını doğrudan düzenleyebilir olduğunu öngörmektedir, ama etki dolaylı bir yoldan meydana gelmiş olabileceği de düşünülmüştür (155). AQPlerin yumurtalık folikülleri tarafından üretilen steroid hormonlarının düzenlenmesine katılabileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir (155; 100). Bununla beraber ovaryumdaki AQP lerle ilgili sınırlı veriler bu organdaki ana işlevinin antrum oluşması ve genişlemesi ile ilgili olduğunu göstermektedir (101). Çalışmalar, bu foliküller içerisindeki AQPlerin varlığını antral boşluk içerisine geniş bir su hacminin hızlıca geçmesi için sorumlu olduğunu göstermektedir (117).

İnsan ovaryumunda yapılan bir çalışmada, ovulasyon sırasında foliküllerde, AQP(1-4) ekspresyonları teka ve granüloza hücrelerinde preovulator folikülün farklı zamanlarında gösterilmiştir. Aynı çalışmada, ovulasyonun başında AQP2 ve AQP3'ün ekspresyonlarında keskin bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum foliküler rüptürde AQP lerin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu olayın sonunda yüksek derecedeki AQP1 ekspresyonu, korpus luteum oluşumunda AQP1'in önemli fonksiyonunun olduğunu göstermektedir. Bu nedenle AQP'lerin aynı zamanda ovulasyonda kritik bir anahtar rol sergilediğine inanılmaktadır (101).

Granüloza hücreleri tarafından salgılanan yumurtalık foliküler sıvısında büyük, ozmotik olarak aktif moleküller foliküler sıvı ve sıvı birikmesinin ozmotik geçişlerine katkıda bulunurlar (28, 27). Sıçan granüloza hücrelerinde belirlenen AQP7, 8 ve 9'un antral folikül içerisine su taşınmasına aracılık edebildikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Normal folikülogenez sırasında, sıvı AQP'ler aracılığıyla oluşan hücrelerarası taşıma mekanizmaları ile ovaryum folikülünde toplandığı belirtilmiştir (30). Yapılan bir çalışmada AQP7 ve 8 düzeylerinin foliküler gelişim ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (31). AQP5, domuzların primordial foliküllerin yassılaştırmış folikül hücrelerinde ve gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinde gösterilmiştir (34). AQP9 ekspresyonunun, androjenler tarafından düzenlendiği öne sürülmüştür (32, 35, 33). Çin hamster yumurtalığında AQP1'in aşırı ekspresyonunun hücre su geçirgenliğini, buna bağlı olarak ta hücre ölüm oranını artırdığı öne sürülmüştür (160). AQP4 proteininin foliküler gelişme sırasında antrum oluşumunda önemli olabileceği gösterilmiştir (101). Ovaryumda, AQP1 esas olarak kılcak damarların endotelinde ifade edilmiştir (34). AQP5 ifadesi yumurtalık malignan ve borderline tümörlerde, benign tümörlere göre önemli ölçüde daha yüksektir. AQP5'in özellikle iyi huylu tümörlerin basolateral membranlarında lokalize olduğu belirlenmiştir (161).

Oosit gelişimi, granüloza hücreleriyle koordinelidir. Antrum oluşumu, folikül içinde oosit ile bitişik bir sıvı dolu kavite, bir antral folikülü tanımlar. Antral genişleme, gonadotropin stimülasyonu altında hızlı bir şekilde olur. Suyun hızlı ve daha fazla taşınmasını gerektirir (100). AQP1, 3, 7, 8, 9 mRNA ekspresyonu, olgun fare oositlerinde tanımlanmıştır (162, 163). AQP3 mRNA seviyelerinin oosit olgunlaşması sırasında önemli ölçüde arttığı, oosit olgunlaşması için AQP3'ün en yüksek şekilde

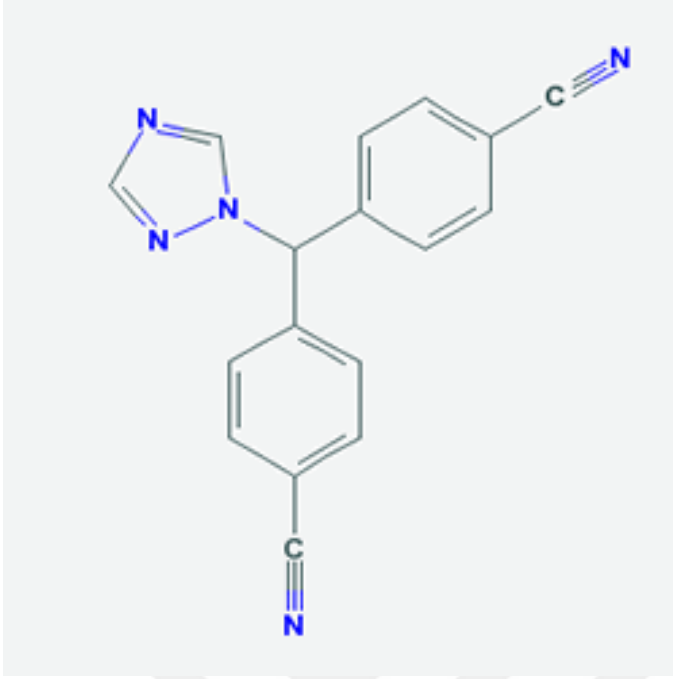
düzenlenmesine ihtiyaç olduğu öne sürülmüştür (164). AQP9 sıçan proöstrus oositlerinde mevcutken, östrus (kızgınlık) oositlerinde mevcut olmadığı belirlenmiştir. Olgunlaşma süreci boyunca, AQP9 transkriptlerinin noksan olduğu bulunmuştur (165). AQP3 ve 7 fare oositlerinde ifade edilmiştir (162) ve sadece suda değil aynı zamanda gliserol ve üre gibi küçük nötr çözücülerde geçirgendirler (166). Yapılan bir çalışmada sıçan AQP3'ünün, zebra balıklarının oositinde su, etilen glikol, gliserol, propilen glikol ve dimetilsülfoksitin geçirgenliğini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (167). Bu şekilde yapılan çalışmalar, çeşitli türlerin oositlerinde çeşitli AQP tiplerinin eksprese olması, oositlerin yaşam kalitelerini yükseltmeleri ve canlılığını sürdürebilmeleri için gerekli olan su ve diğer maddelerin taşınması için AQP'lerin önemli bir rol üstlendiklerini ortaya koymaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen yaklaşık vücut ağırlığı 160-200 gram arasında değişen 8 haftalık *Wistar* albino cinsi 16 adet erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 27.03.2014 tarih ve 65202830/34 sayılı onay belgesi (EK-1) alınmıştır.

Çalışmada kullanılan hayvanlar oda ısısında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyotlar oluşturularak yetiştirilmiştir. Sıçanlar kontrol (n=8) ve PKOS'lu (n=8) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Hayvanlara PKOS oluşturmak üzere letrozole (Chempur, ChemPur GmbH; Germany), 0.9% NaCl (serum fizyolojik) içerisinde çözülerek, 21 gün boyunca günlük 1mg/kg olacak şekildeki konsantrasyonlarla bir oral gavaje yardımıyla hayvanlara ağız yoluyla (oral) uygulandı. 21 gün boyunca uygulanan muamele sonrasında PKOS'lu ve kontrol sıçanlara 200 mg/kg sodyum penta-barbital (U.S.A.) intraperitoneal yolla uygulanarak ötenazi uygulandı. Letrozole (Şekil 2), ticari adı Femara olan, ağız yoluyla alınan steroid olmayan aromataz bir inhibitördür. Östrojenler, aromataz enzim aktivitesi yolu ile androjenlere dönüştürülmek sureti ile üretilir. Ölüm sonrası alınan ovaryum dokularına AQP7, AQP8 ve AQP9 moleküllerini göstermek amacıyla immünohistokimyasal ve immünofloresan incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı.

Mikroskopik değerlendirme için alınan kesitler, Olympus (BX51, Japan) marka mikroskopta değerlendirilip, uygun alanlardan fotoğraflar çekildi.



Şekil 2. Letrozole

3. 1. Kullanılan Cihazlar:

- ❖ Doku takip cihazı (Leica, Germany)
- ❖ Gömme fırını (MKN Taab, UK)
- ❖ Ben Mari (Leica, Germany)
- ❖ Mikrotom (Leica, Germany)
- ❖ pH Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- ❖ Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- ❖ Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)

- ❖ Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)
- ❖ Mikropipetler- 10ul, 20ul, 200ul ve 1000ul- (Gilson, USA)

3. 2. Kimyasal Maddeler:

- ❖ Aquaporin-7 (Bioss, polyclonal, USA)
- ❖ Aquaporin-8 (Bioss, polyclonal, USA)
- ❖ Aquaporin-9 (Bioss, polyclonal, USA)
- ❖ Crystal Mount Aqueous Mounting (Sigma, USA)
- ❖ AEC kromojen (Genemed Biotechnologies, USA)
- ❖ Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- ❖ Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- ❖ Phosphate Buffer Salina (PBS) (Sigma, USA)
- ❖ EDTA (Biooptica, Milano, Italy pH:8)
- ❖ Formaldehit (Merck, Germany)
- ❖ Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- ❖ Di sodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)

- ❖ Paraformaldehit (Merck, Germany)

- ❖ Triton X-100 (Biotech, Canada)

- ❖ Tween-20 (Merck, Germany)

- ❖ Hidrojen peroksit (Sigma, USA)

- ❖ BSA(Bovine Serum Albumine) (Sigma, USA)

- ❖ DAPI (Danvers, USA)

- ❖ Normal Goat Serum (Invitrogen, USA)

- ❖ goat anti-rabbit IgG-TR sc-2780, Texas red konjuge, Santa Cruz

- ❖ HRP-Streptavidin (Biogenex, USA)

- ❖ Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Biogenex, USA)

- ❖ Tris (Merck, Germany)

- ❖ Entellan (Merck, Germany)

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:

1. % 10'luk Tamponlanmış Nötral Formalin (pH: 7.0)

❖ Formaldehit 100cc

❖ Distile Su 900cc

❖ NaH₂PO₄ 4g

❖ Na₂HPO₄ 6.5g

2. 4% Paraformaldehyde in PBS pH 7.4

❖ Distile Su 850ml

❖ Paraformaldehit 40gr

❖ 10 N NaOH 0.1ml

❖ 10X PBS Stock 100ml

3. Tris EDTA Tamponu

❖ Tris 1.211g

❖ EDTA 0.372g

❖ Distile Su 1000cc

❖ pH:9.0 olacak şekilde hazırlandı ve çözeltiliye 0.5 ml Tween-20 eklendi.

4. Yıkama Çözeltisi

- ❖ 1000 ml PBS içinde 5ml Tween-20 çözünerek hazırlandı.

5. Normal Keçi Serum

- ❖ PBS
- ❖ %3'lük keçi serumu

- ❖ %1'lik BSA

- ❖ %0.1'lik Triton X-100

- ❖ %0.05'lik Tween-20

3. 4. Doku Preparasyonu :

Ötenazi sonrasında alınan ovaryum dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin de 36-48 saat ve %4'lük paraformaldehitte +4 derecede 24 saat süre ile fikse edildikten sonra dehidrasyon ve şeffaflandırma basamaklarını takiben parafinde bloklandı.

3. 5. Semikantitatif Skorlama Yöntemi:

Deney ve kontrol gruplarının ovaryum dokularında görüntülenen AQP7, AQP8 ve AQP9 ekspresyonlarının şiddeti semikantitatif skorlama yöntemi ile belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Bütün kesitler birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelenerek, ovaryum dokusunda AQP7, AQP8 ve AQP9 antikorlarının boyanma derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif(-), hafif derecede boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++), yoğun derecede boyanma olmuş ise (+++) boyanma olarak ovaryum dokuları değerlendirildi.

3. 6. Işık Mikroskopi:

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitlere genel morfolojiyi göstermek amacı ile hematoksilin-eozin boyama uygulaması yapıldı. Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskopu ile uygun görüntüler alındı.

3. 7. İmmünohistokimya Boyama Protokolü :

Ovaryum dokusunda AQP7, AQP8 ve AQP9 belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Parafin bloklardan alınan kesitler poly-L-lysine kaplı adhezivli lamalar (Patolab, Türkiye) üzerine alındı. Bir gece 56 derecelik etüvde tutularak parafini giderildi. Kesitler aşağıdaki serilerden geçirilerek saf suya indirildi.

- %100 Alkol..... 5 dk
- %96 Alkol..... 5 dk
- %96 Alkol..... 5 dk
- %70 Alkol..... 5 dk
- %70 Alkol..... 5dk
- Distile su..... 5 dk
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler oda ısısında H₂O₂ (hidrojen peroksit) de 10 dakika bekletildi.
- 2 defa 5'er dk PBS ile yıkandı.

- Antijenin geri dönüşümünü sağlamak için kesitler, içinde EDTA tamponu (pH=8) olan şaleye konularak mikrodalga fırında maksimum ayarda 5 dakikalık, orta ayarda 15 dakika periyotlarla kaynatıldı.
- Mikrodalga fırından çıkartılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Doku örneklerinin etrafı Pappen (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) ile çizildi.
- İmmünohistokimya kabına konulan kesitlere 30 dakika Ultra V Blok (Biogenex, USA UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı.
- +4 derecede nemli ortamda bir gece boyunca kullanıma hazır olmayan primer antikolar(AQP7, AQP8, AQP9) 1:50 oranında pH 7.4 olan PBS ile sulandırılarak uygulandı.
- 3 kere PBS ile yıkandı.
- Dokulara Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Biogenex, USA) oda ısısında 20 dakika nemli ortamda uygulandı.
- 3 kere PBS ile yıkandı.
- 20 dakika Streptavidin Peroxidase (Biogenex, USA, UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) uygulandı.
- 2 kere PBS ile yıkandı.
- 20 dakika AEC Kromojen (Genemed Biotechnologies, USA) dokulara uygulandı.

- Saf su ile çalkalandı.
- 2 dk Hematoxilen ile zıt boyaması yapıldı.
- eşme suyunda bolca yıkandı.
- Preparatlar kurulanıp kapatıcı (Thermo marka Large Volume Vision Mount) ile kapatıldı.
- AQP7, AQP8 ve AQP9 immünolokalizasyonları skortlama yöntemi ile her grup için ayrı ayrı saptandı.

3. 8. İmmunofloresan Boyama Protokolü:

- 10 dk 2 değişim ksilolde deparafinizasyon
- %100'lük alkol..... 2' dk
- %100'lük alkol..... 2' dk
- %95'lik alkol..... 2' dk
- %80'lik alkol..... 2' dk
- %70'lik alkol..... 2' dk
- Distile su 5' dk yıkandı.
- Mikrodalga fırında 2 defa 10'ar dakika sırasıyla maksimum güçte ve 550W'da EDTA tamponu (pH=8) içerisinde epitoplarmn açığa çıkarılması gerçekleştirildi.

- Pappen (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) ile örneklerin etrafı çizildi.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween20) 2 kez 3'dk yıkandı.
- Hidrojen peroksit çözeltisiyle oda ısısında 30'dk nemli karanlık ortamda endojen peroksidaz bloklama
- Kesitlerin immünoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için normal keçi serumu bloklama çözeltisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.(Serum Bloklama)
- Kesitler primer antikorlarla +4 derecede nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları seyreltme oranları; Aquaporin-7 (1:50), Aquaporin-8 (1:50), Aquaporin-9 (1:50). Bütün primer antikorlar pH=7.4 olan PBS çözeltisi ile sulandırıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
- Sekonder antikor (goat anti-rabbit IgG-TR sc-2780, Texas red konjuge, Santa Cruz) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
- 0.5 ug/ml DAPI (Danvers, USA) ile oda ısısında 10 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween20) 2 dakika yıkandı.
- Kapatma medyumuyla kapatma yapıldı.

4. BULGULAR

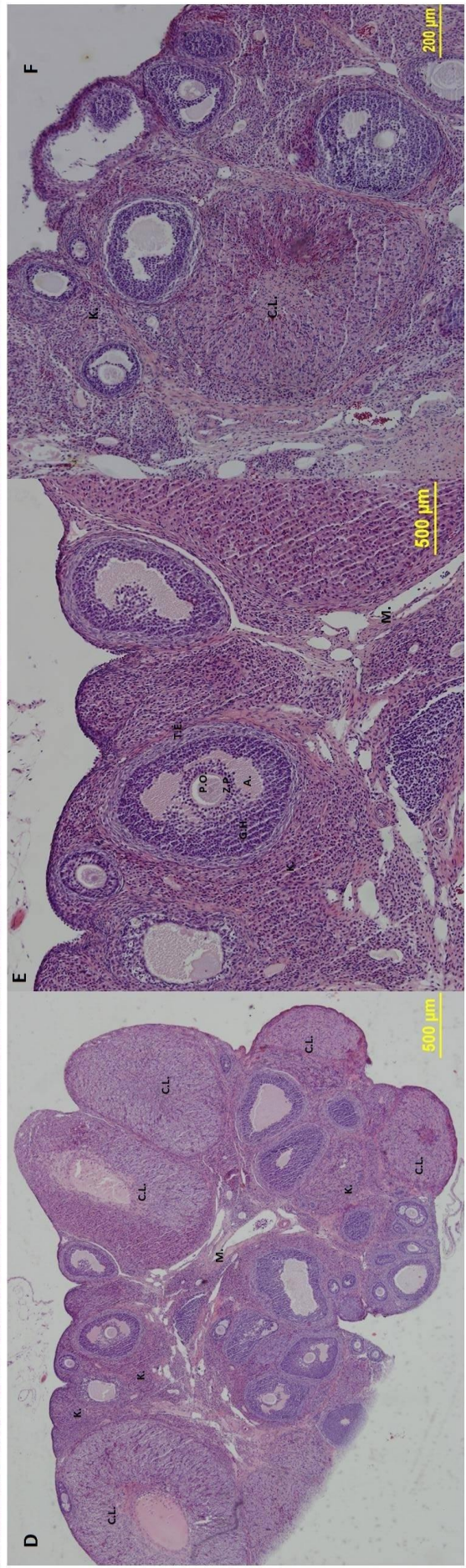
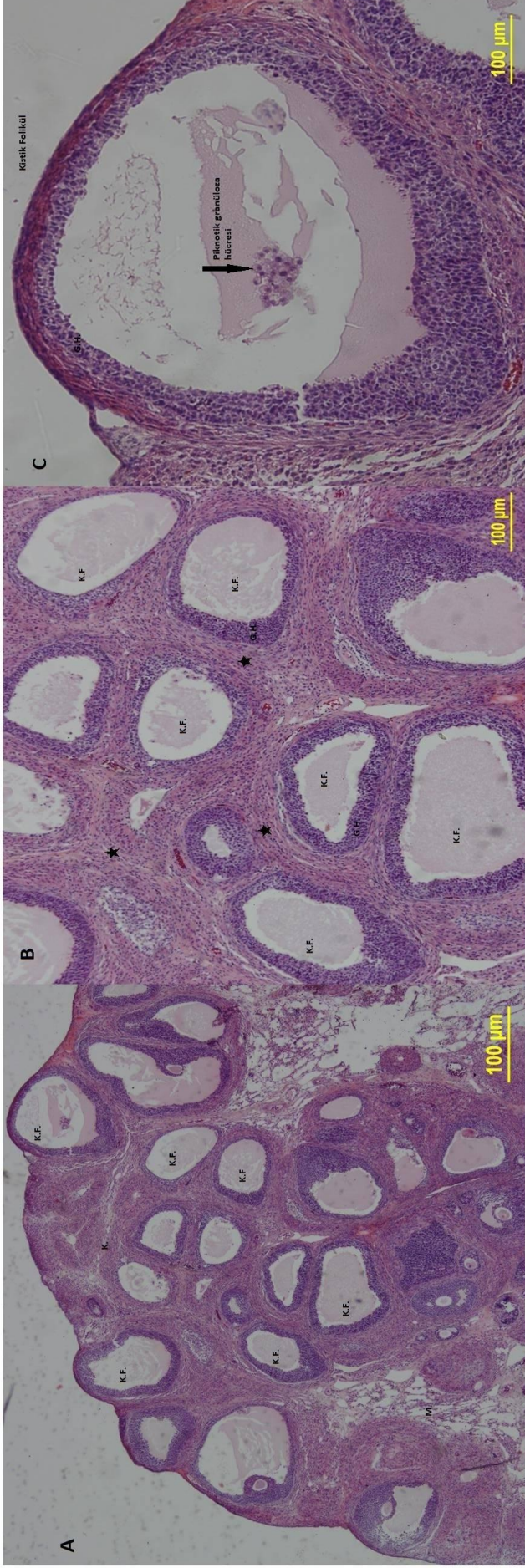
4.1. Kontrol ve Deney Grubu Morfolojik Bulgular (H&E)

PKOS'lu ovaryum dokusuna bakıldığında; kortekste çok sayıda çeşitli büyüklüklerde ve çaplarda kistik foliküllere rastlanılmıştır. Kistik foliküller, genellikle ince bir granüloza tabakası ve kalınlaşmış teka interna hücre tabakasıyla birlikte içi sıvı dolu yapılar halinde gözlemlendi (Şekil3 A, Şekil3 B, Şekil3 C). Normal folikül gruplarında ve corpus luteum yapılarında kontrol ovaryuma oranla oldukça azaldığı veya yer yer hiç olmadığı gözlemlenmiştir. Korteksin stromasında belirgin bir artış olduğu, kistler arası boşlukların bu artan bağ dokusu nedeniyle kapandığı gözlemlenmiştir (Şekil3 B). Yumurta dejenerasyonunun ve piknotik granüloza hücrelerinin bulunduğu foliküllere rastlanılmıştır ve bunlar atretik foliküller olarak sınıflandırılmıştır. Bu hücrelerin sitoplazmaları eozinofilik bir şekilde boyanırken çekirdekleri bazofilik olarak boyanmıştır (Şekil3 C).

Kontrol ovaryum dokusunda ise kortekste gelişimin farklı evrelerinde bulunan çok sayıda foliküllere ve corpus luteuma rastlanılmıştır (Şekil3 D, Şekil3 E, Şekil3 F). Foliküller ise, tek katlı yassı hücreleri ile primordiyal folikül, tek katlı kübik veya oval hücreli folikül, 2 veya 3 hücre tabakasından oluşan çok katlı primer folikül, 2 veya daha fazla tabakalı kübik granüloza hücrelerinden ve belirgin olsada olmasada bir boşluktan (kavite) oluşan antral (sekonder) folikül, tersiyer (graff) folikül olmak üzere gelişimin farklı evrelerinde kortekste yer almışlardır. Kistik foliküllere rastlanılmamıştır (Şekil3 E). Medulla da ise, yer yer kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içeren bir gevşek bağ dokusu olarak gözlemlenmiştir. Yüzeyi germinal epitelyum olarak adlandırılan basit prizmatik epitelyum ile döşeli olduğu, germinal epitelin altında tunika albuginea adı verilen yoğun bir düzensiz sıkı bağ dokusu yer aldığı gözlemlenmiştir (Şekil3 F).

Şekil 3. Deney grubu ve kontrol grubu ovaryumlarda morfolojik görüntüler. Deney grubu (PKOS) ovaryum dokusu (Şekil3 A, Şekil3 B, Şekil3 C). Kontrol grubu ovaryum dokusu (Şekil3 D, Şekil3 E, Şekil3 F). Hematoksilen&Eozin boyaması.





4.2 Kontrol Grubu Aquaporin-7 Bulguları

Kontrol ovaryum dokusunda; epitel tabakasında ve bunun altında yer alan tunika albuginea tabakasında ve aynı zamanda bazal membranda AQP7 immunolokalizasyonu izlenmedi (Şekil4; A-F, immunofloresan boyama L-T). Kortekste ise corpus luteum ve foliküllere oranla aralarda yer alan fibroblast benzeri stromal hücrelerde daha yoğun bir ekspresyon olduğu izlendi. Korteks kan damarı çevresinde ise zayıf bir şekilde lokalizasyon olduğu izlendi (Şekil4; G-K).

Medullaya genel olarak bakıldığında; medullayı oluşturan fibroblast benzeri hücrelerin sitoplazmalarında yer yer orta şiddette ekspresyona rastlanırken, medulla kan damarında ekspresyon gözlenmedi (Şekil5; İmmünohistokimyasal boyama A-H; I, J, M, N; İmmünofloresan boyama K, L, O, P).

Primordiyal folikül hücrelerinde ekspresyon izlenmedi. Primer oositte ise orta şiddette AQP7 immunolokalizasyonu izlendi (Şekil6; İmmünohistokimya boyama A-D; İmmünofloresan boyama E, F).

Tek katlı primer folikülde primer oositte AQP7 ekspresyonu orta şiddette izlendi (Şekil6; I,J; İmmünofloresan boyama M). Çok katlı primer folikülde ise primer folikül hücrelerinde ekspresyon izlenmedi. Primer oositte ise oositin kenarlarında AQP7 ekspresyon şiddeti merkeze doğru olana göre daha fazladır ve genelinde ise oositin orta şiddette bir ekspresyon olduğu izlendi. Zona pellucida da ise ekspresyon izlenmedi. Teka tabakalarında da ekspresyon izlenmedi (Şekil6; H, G İmmünofloresan boyama K, L).

Sekonder folikülde; primer oositte AQP7 immunolokalizasyonu izlendi. Zona pellucida sınırında zayıf bir ekspresyon izlendi. Granülosa hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf şiddette ekspresyon izlendi. Antrumda ekspresyon gözlenmezken, teka eksternanın dış sınırında ekspresyon gözlemlendi (Şekil6; İmmünohistokimya N, O; İmmünofloresan boyama P, R, S,T).

Tersiyer folikülde; sekonder oositin oolemması ile zona pellucida sınırında zayıf bir ekspresyon izlendi. Zona pellucida da ve granülosa hücrelerinde, antrum, corona radiata, cumulus oophorusta ekspresyon izlenmedi. teka eksterna tabakasında teka

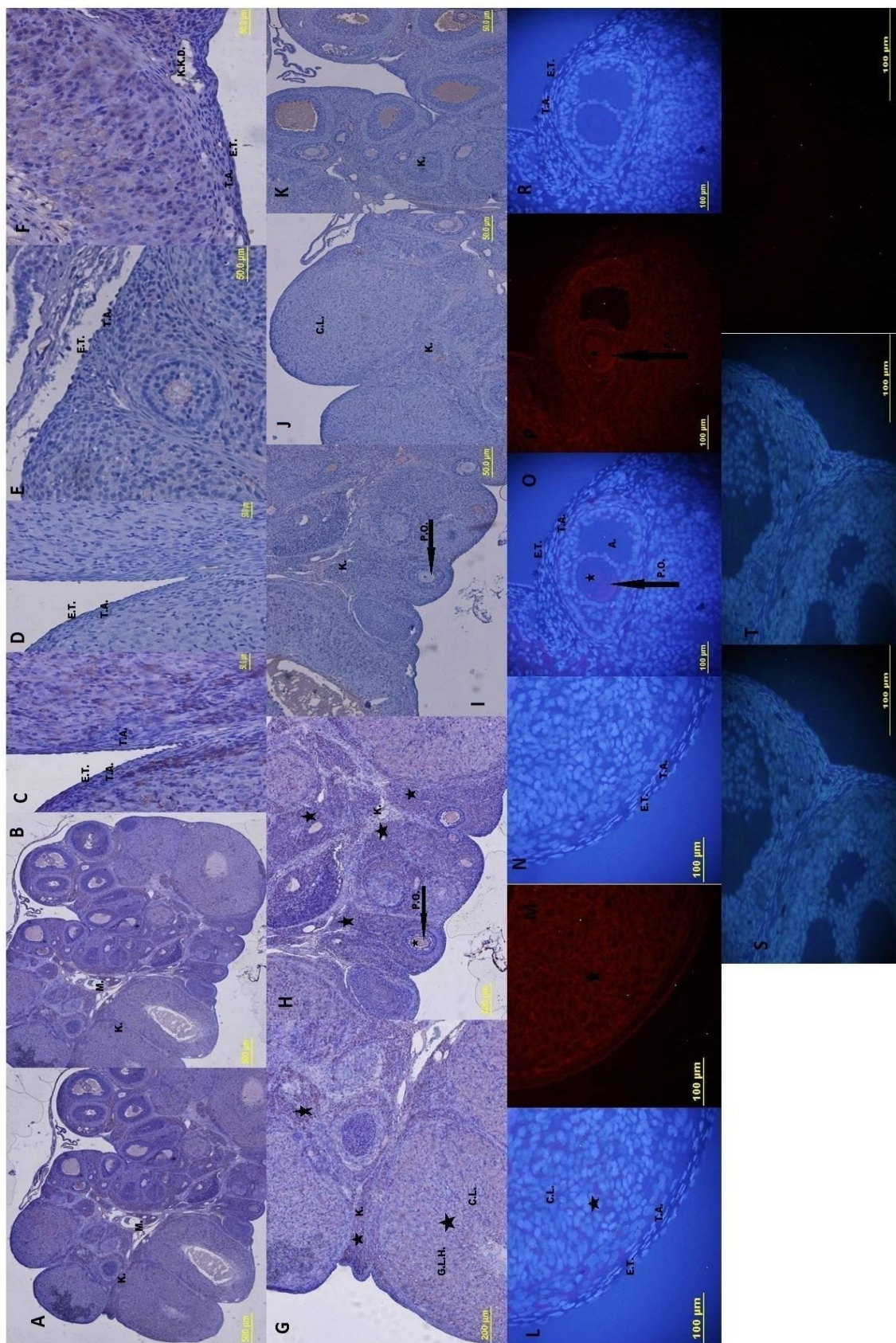
interna tabakasına oranla daha yoğun ekspresyon izlendi (Şekil7; İmmünohistokimyasal A, B).

Corpus luteumda; AQP7 immunolokalizasyonunun yoğun olduğu izlendi. teka lutein hücrelerinde ve granüloza lutein hücrelerinin sitoplazmasında yoğun bir ekspresyon izlendi. Kan damarlarında ise ekspresyon izlenmedi (Şekil7; İmmünohistokimyasal boyama C-K).



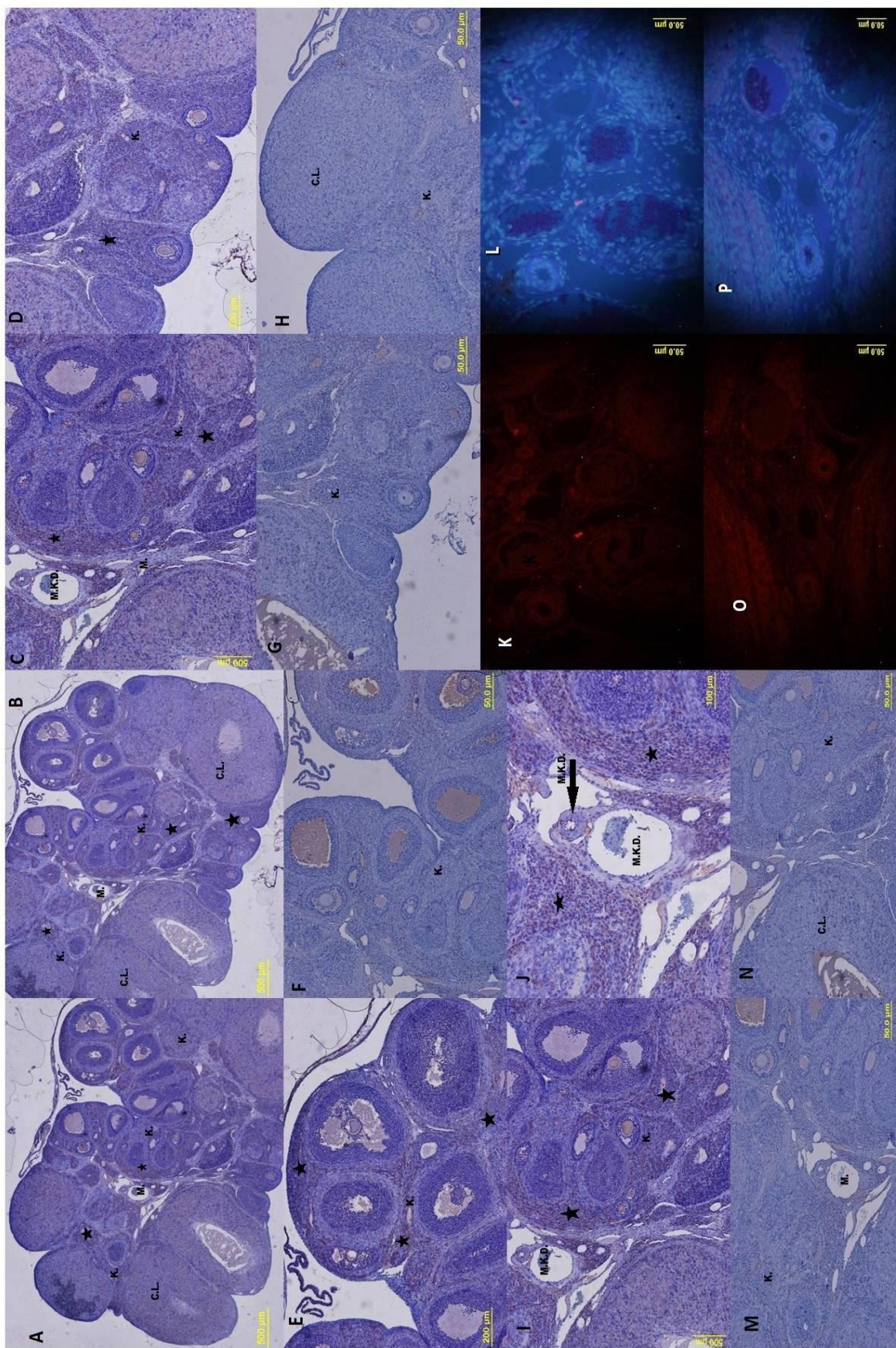
Şekil 4. Kontrol grubu ovaryum genel görüntüsünde AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Medulla; (M), Korteks; (K), Granüloza luteum hücreleri; (GLH), Corpus Luteum; (CL), Primer folikül; (PF), Siyah oklarla gösterilen kortekste yer alan Primer oosit; (PO) (A, B, G, H Antikor boyama)(I, J, K Kontrol boyama). Kontrol grubu epitelyum tabakasında negatif immünolokalizasyonu. Epitelyum tabakası; (E.T.), Tunika Albuginea; (T.A.) (C, F Antikor boyama) (D, E Kontrol boyama). İmmunofloresan boyama da epitel tabakasının negatif immünolokalizasyonu (N,R DAPI boyama), (P,M Texas Red konjuge IgG-TR), (O, L Bindirme), (S, T, V Kontrol Floresans boyama),



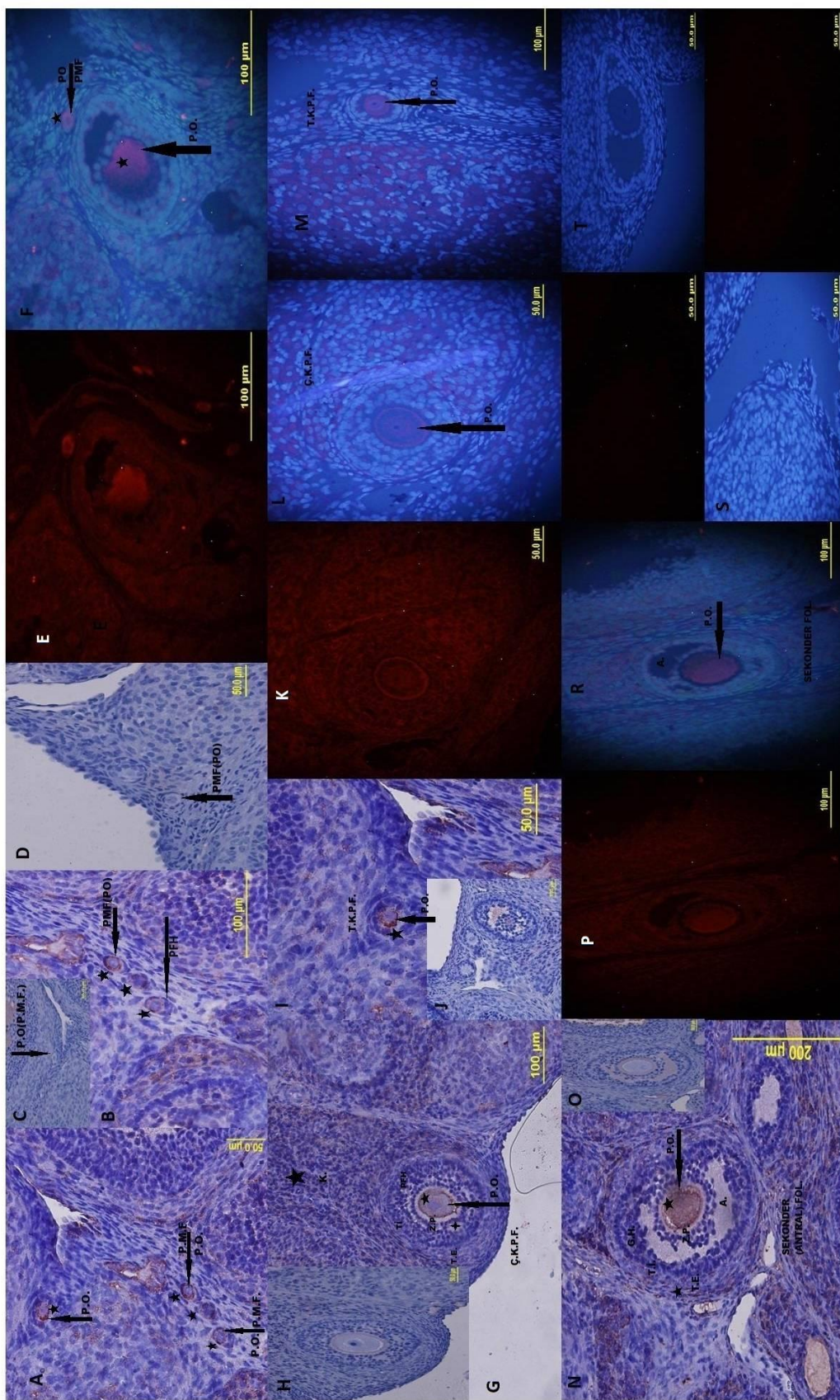


Şekil 5. Kontrol grubu medulla ve korteks bölgesinde AQP-7 nin immünolokalizasyonu (*). Korteks; (K), Medulla; (M, Medulla Kan Damarı; (MKD), Corpus Luteum; (CL), (A, B, C, D, E, I, J Antikor boyama), (F, G,H, M, N Kontrol boyama), (K, L, O, P DAPI boyama, texas red konjuge IgG-TR; floresans boyama).



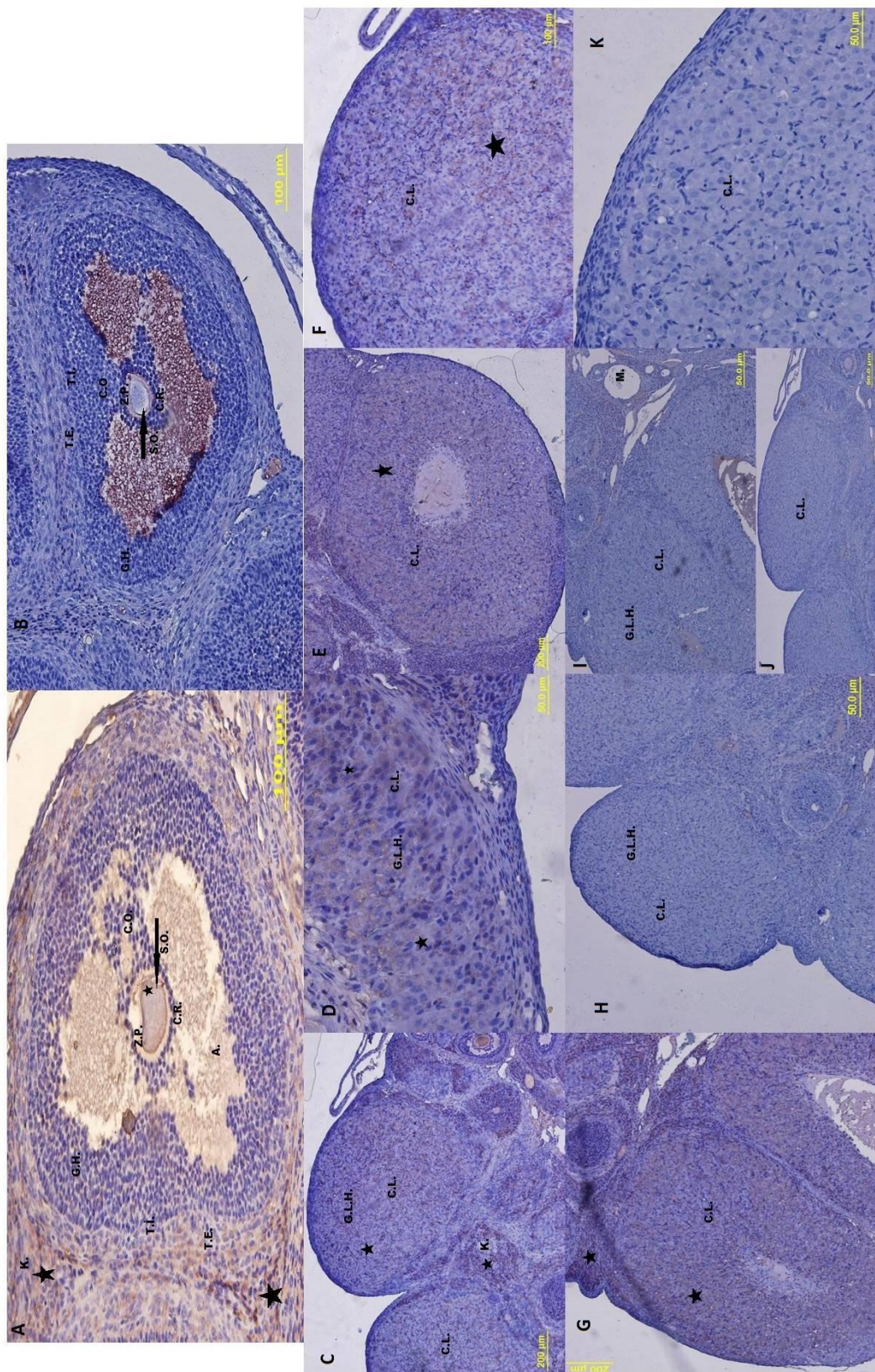


Şekil 6. Kontrol grubu primordiyal(P.M.F.), çok katlı primer(Ç.K.P.F.), tek katlı primer(T.K.P.F.), sekonder(SF) foliküllerde AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Siyah oklarla gösterilen primer oosit; (PO*), primordiyal folikül hücreleri; (PFH), (A, B Antikor boyama; C, D Kontrol boyama; E, F, Floresans boyama, E(texas red IgG-TR), F(texas red+DAPI)). Çok katlı primer folikül ve tek katlı primer folikül; siyah oklarla gösterilen primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücreleri; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE). (G, I, immunhistokimya antikor boyama, H, J kontrol boyama), (K texas red IgG-TR; L, M DAPI + texas red immünofloresans boyama). Sekonder folikül primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE). (N, IHC antikor boyama; O, kontrol boyama), (P, texas red IgG-TR; R, DAPI+Texas red IgG-TR; S, T floresans kontrol boyama).



Şekil 7. Kontrol grubu tersiyer folikülde ve corpus luteumda AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE). Corpus luteumda (CL); granüloza lutein hücresi, (GL), kan damarları; (KD).





4.3 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-7 Bulguları

PKOS'lu ovaryum dokusunda; epitel ve onun altında bulunan tunika albuginea adı verilen tabakada hiçbir ekspresyon izlenmedi (Şekil9; İmmünohistokimyasal boyama I-R; İmmünofloresan boyama S-Y). Kortekste ise, stromal alanlarda yoğun bir şekilde ekspresyon izlendi. Fakat korteks kan damarlarında AQP7 nin immunlokalizasyonu izlenmedi (Şekil10; İmmünohistokimyasal boyama A-E, H, I; İmmünofloresan boyama F,G).

Medullaya ise; medullayı oluşturan medulla kan damarlarında yer yer ekspresyon izlenirken, fibroblast benzeri hücrelerde ekspresyon izlenmedi (Şekil10; İmmünohistokimya boyama K, L, P, R, S; İmmünofloresan boyama M, N).

Primordiyal foliküllerde; primordial folikül hücrelerinde, ekspresyon izlenmedi, primer oositte ise şiddetli ve oldukça yoğun bir AQP7 immunlokalizasyonu izlendi (Şekil11; İmmünohistokimyasal boyama A-E).

Primer folikülde; tek katlı primer folikülde, folikül hücrelerinde ekspresyon izlenmedi. Buna oranla primer oositteki ekspresyonun azalmadan burada da devam ettiği izlendi (Şekil11; İmmünohistokimyasal boyama F; İmmünofloresan boyama I, J). Çok katlı primer folikülde; folikül hücrelerinde zayıf bir ekspresyon izlendi. Primer oositte AQP7 nin oldukça yoğun olan lokalizasyonununun buradada devam ettiği izlendi. Zona pellucida da ekspresyon olmadığı izlendi. Teka interna ve teka eksterna tabakalarında oldukça zayıf ekspresyon izlendi (Şekil11; İmmünohistokimyasal boyama G, H, K; İmmünofloresan boyama L-O).

Sekonder folikülde; primer oositte AQP7'nin immunlokalizasyonu yoğun bir şekilde izlendi. Zona pellucida da ve antrumda ekspresyon izlenmedi. Granüloza hücrelerine ise oosite oranla oldukça zayıf bir ekspresyon izlendi. Teka bağ dokusu geçişlerinde zayıf bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil12; İmmünohistokimya boyama A-C; İmmünofloresan boyama D-K).

Tersiyer folikülde ise; sekonder oositte yoğun bir şekilde AQP7 ekspresyonu izlendi. Cumulus-oosit kompleksinde bir deformasyon oluşumu izlenmesine karşın oosit sitoplazmik boyanmasını korumuştur. Zona da ve granüloza hücrelerinde ve antrumda ve corona radiatada ekspresyon izlenmedi. cumulus oophorusta zayıf ekspresyon varken

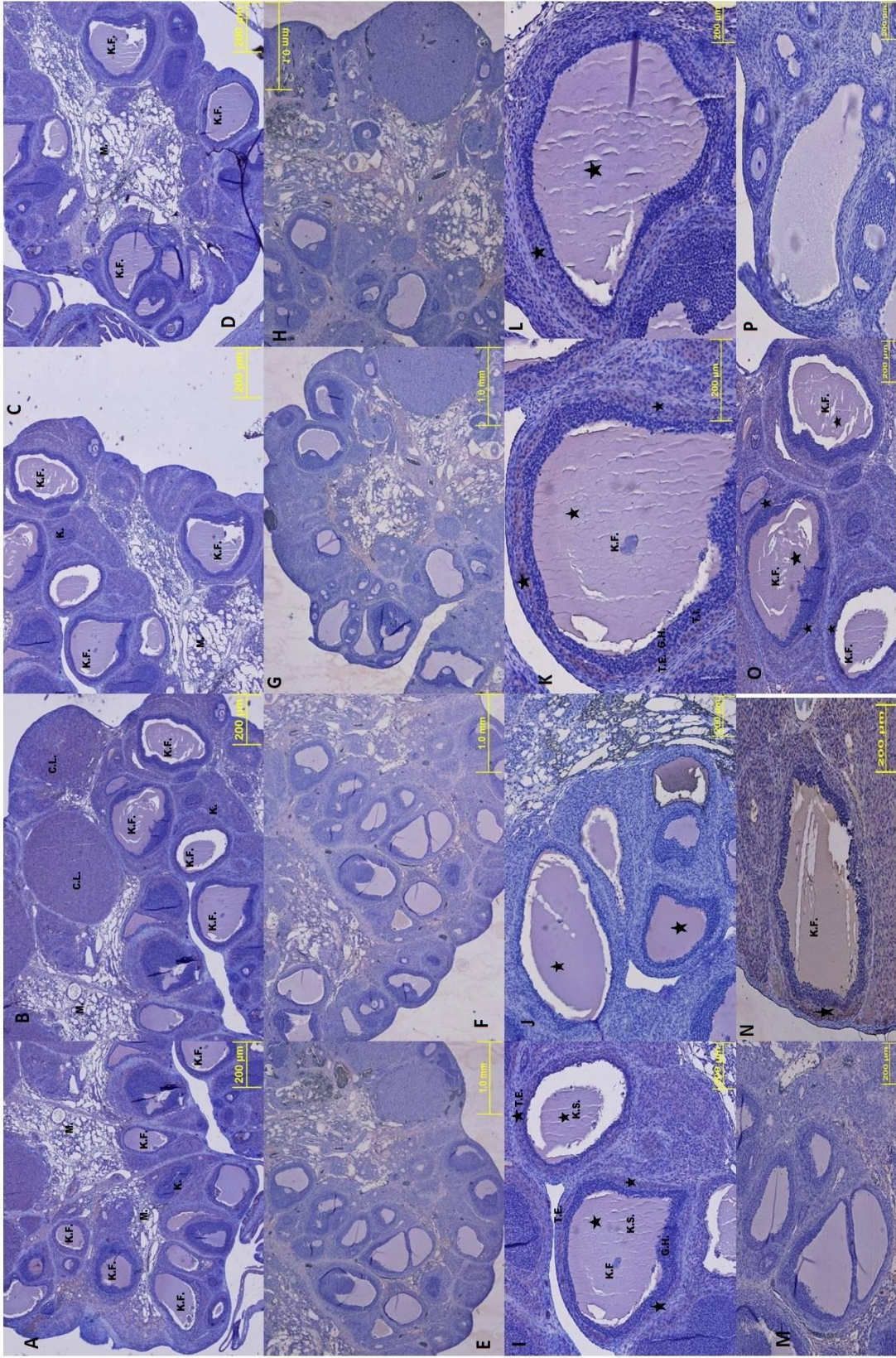
teka eksterna tabakasında daha yoğun bir ekspresyon izlendi. Teka internada ise ekspresyon izlenmedi (Şekil12; İmmünohistokimyasal boyama L, M; İmmunofloresan boyama N-P).

Corpus luteum kan damarında ekspresyon izlenmezken, granüloza lutein hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun bir şekilde AQP7 ekspresyonu izlendi (Şekil10; J, O, T, V, Y).

Kistik yapılarda ise ; teka tabakalarında granüloza hücrelerine oranla daha fazla AQP7 immunolokalizasyonu izlendi (Şekil8; A-P İmmünohistokimyasal boyama; Şekil9; İmmunofloresan boyama A-H).

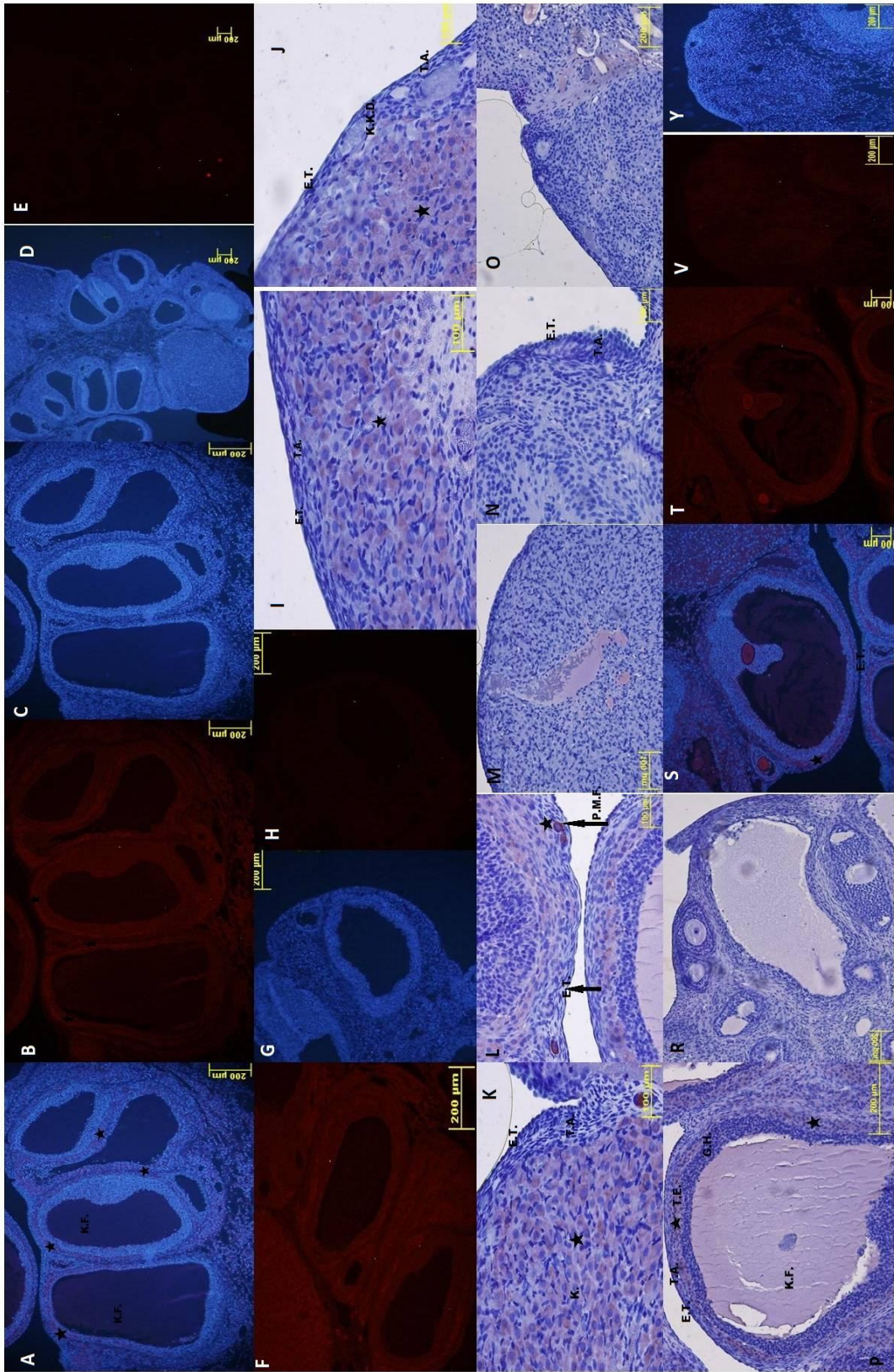
Şekil 8. Deney grubu (PCOS) ovaryum genel görüntüsünde; AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Ovaryuma genel olarak bakıldığında çeşitli büyüklüklerde kistik foliküllere; (KF), çeşitli foliküllere, korteks; (K), medulla; (M), granüloza hücresi; (GH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) rastlanmaktadır. (A, B, C, D, I, K, L, N, O IHC antikor boyama; E, F, G, H, J, M, P kontrol boyama).





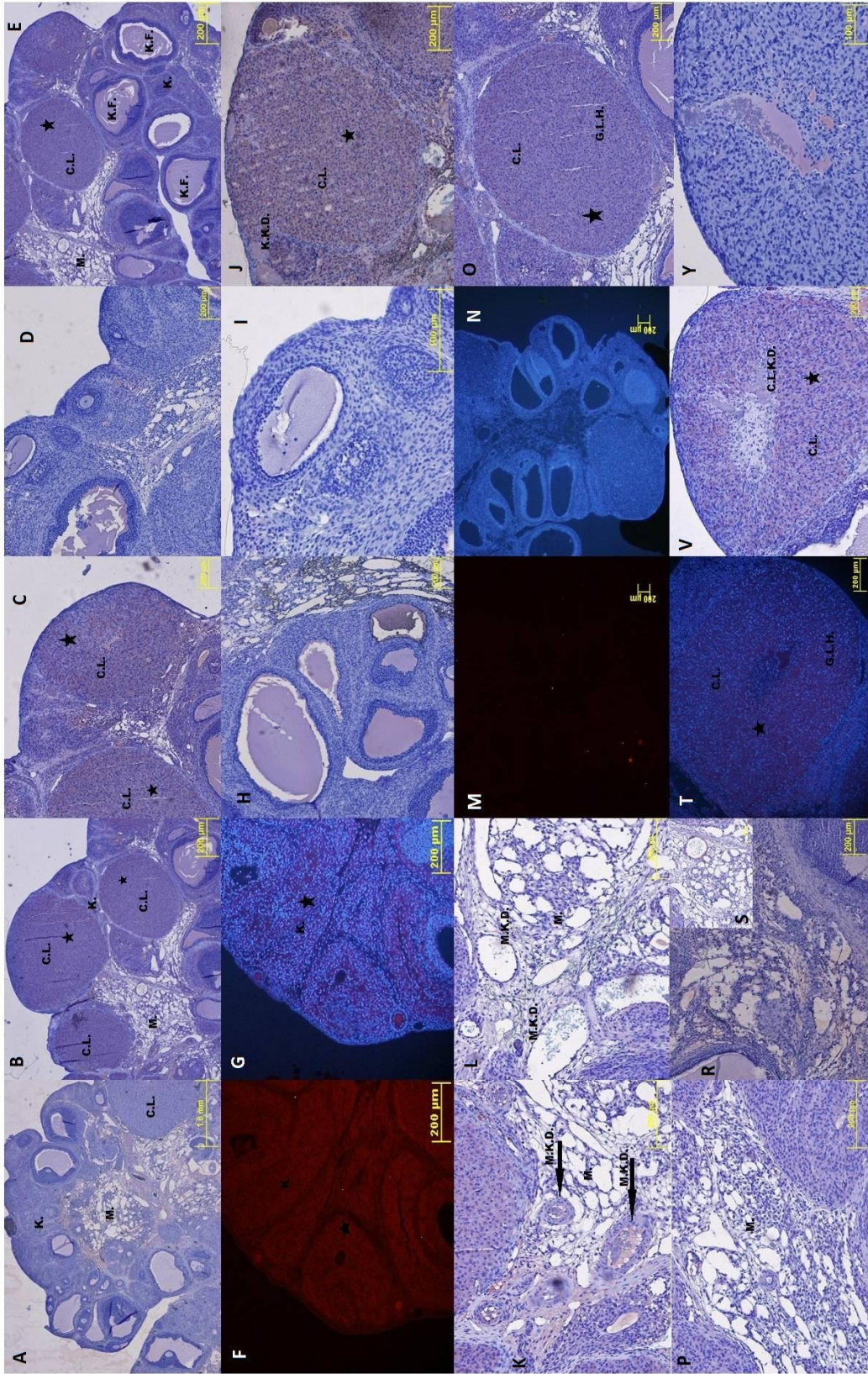
Şekil 9. Deney grubu genel kistik foliküllerde ve epitel tabakasında AQP-7 nin immünolokalizasyonu (*). Kistik foliküllerde; (KF), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE), granüloza hücresi; (GH) (A, DAPI+texas red konjuge IgG-TR; B, F, texas red konjuge IgG-TR; C,D,G, DAPI; H, E kontrol floresan). Epitel tabakasında; (ET), tunika albuginea; (TA), korteks; (K), primordiyal folikül; (PMF) (I, J, K, L, P IHC antikör boyama; M, N, O, R kontrol boyama; S, DAPI+texas red konjuge IgG-TR; T, texas red konjuge IgG-TR; V, Y kontrol floresan boyama).





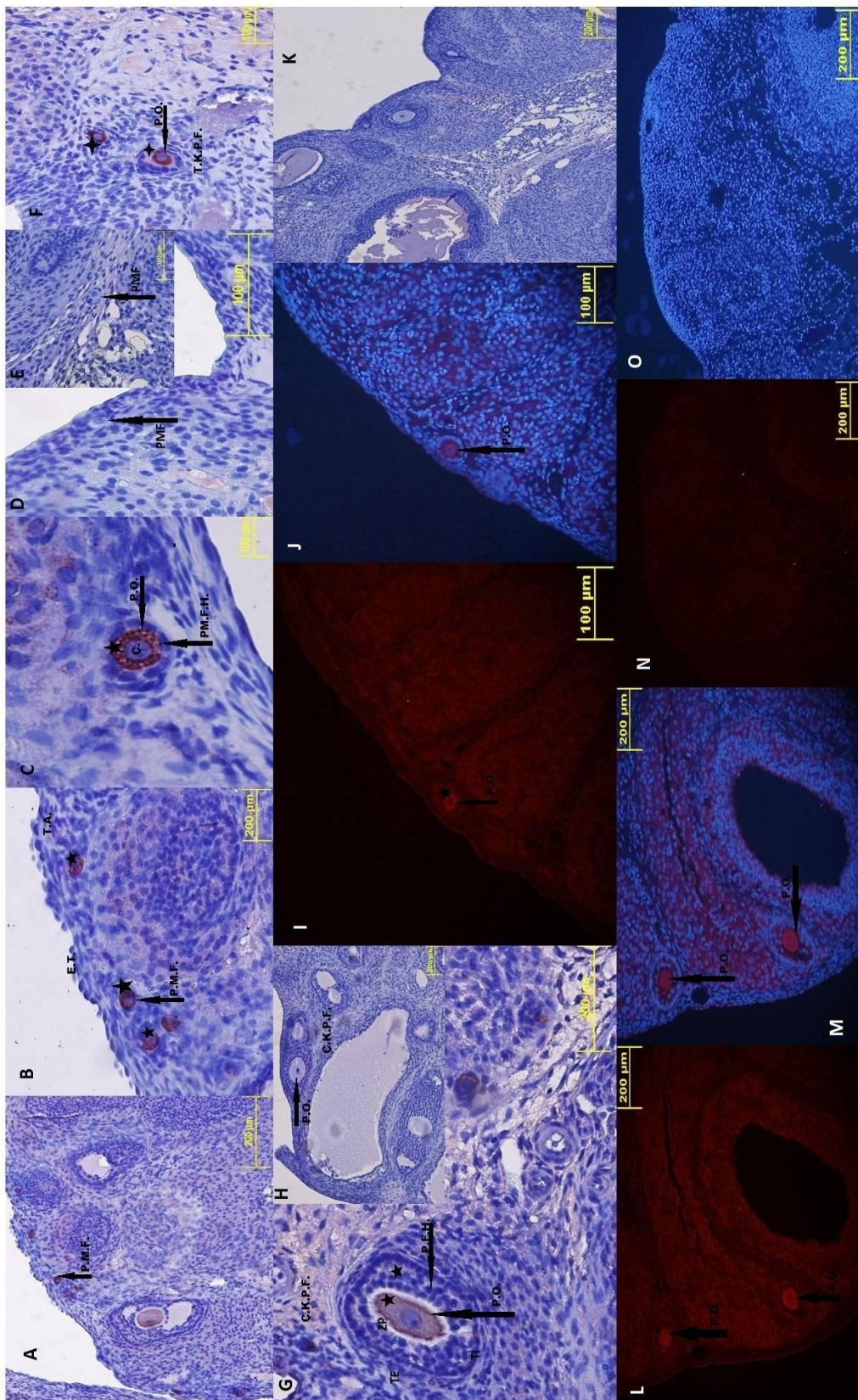
Şekil 10. Deney grubu korteks, medulla ve corpus luteumda AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Corpus luteumda; (CL), granülosa lutein hücresi; (GLH), corpus luteum kan damarı; (CLKD), korteks; (K), medulla; (M), medulla kan damarı; (MKD), kistik folikül; (KF). (B, C, E J, O, V, K, L, S IHC antikör boyama; A, D, H, I, P, R, Y kontrol boyama; G, T texas red konjuge IgG-TR+DAPI; F, texas red konjuge IgG-TR; N, DAPI; M, texas red konjuge IgG-TR).





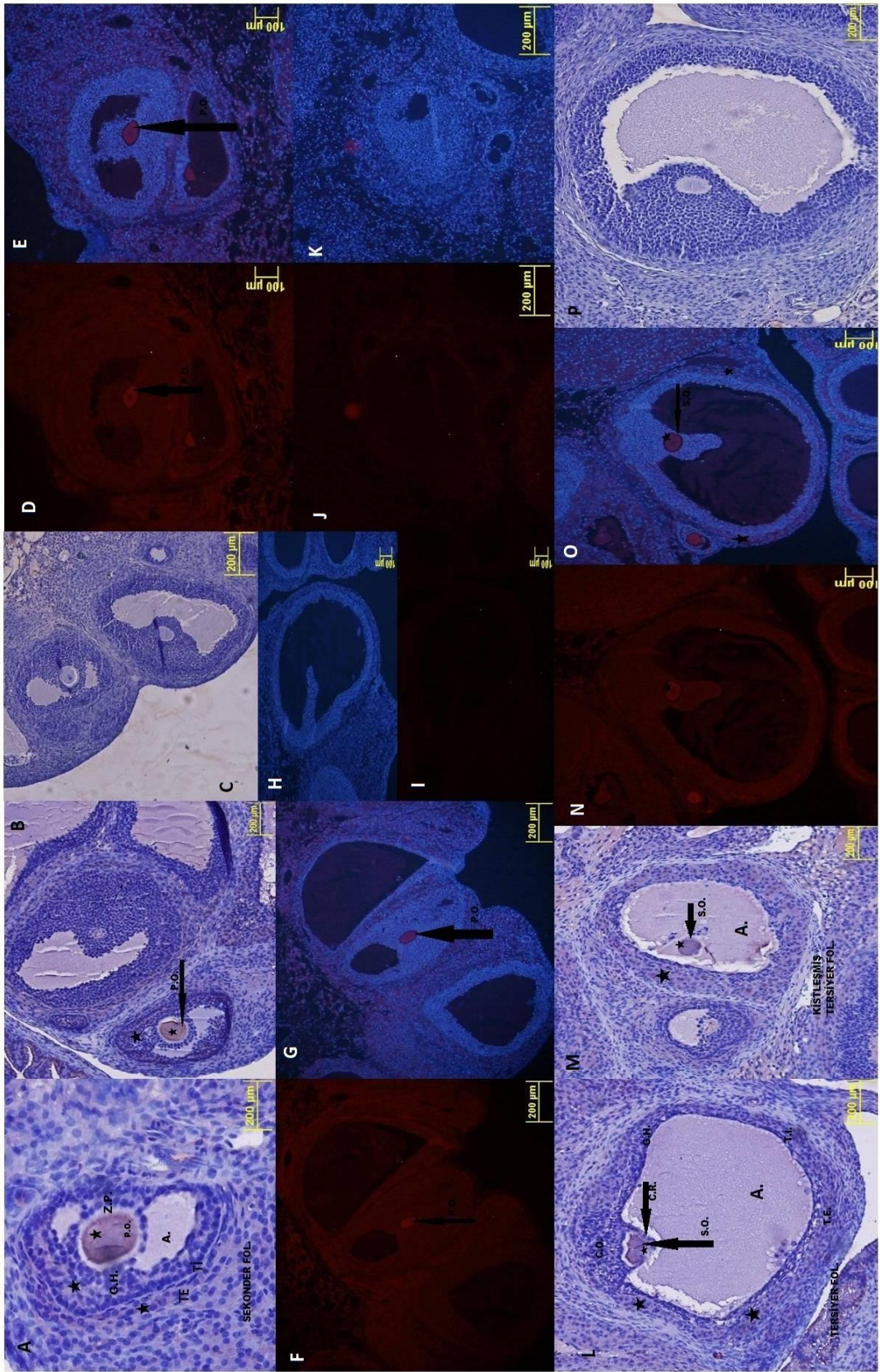
Şekil 11. Deney grubu primordiyal folikül; (PMF), tek katlı primer folikül; (TKPF), çok katlı primer folikül; (ÇKPF) AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Epitel tabakası; (ET), primer oosit; (PO), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücreleri; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE), primordiyal folikül hücresi; (PMFH), çekirdek; (Ç), tunika albuginea; (TA) (A, B, C, F, G IHC antikör boyama; D, E, H, K kontrol boyama; M, N texas red konjuge IgG-TR+DAPI; I, L texas red konjuge IgG-TR; O, DAPI; N kontrol floresan boyama).





Şekil 12. Deney grubu sekonder ve tersiyer folikülde AQP-7 immünolokalizasyonu (*). Sekonder folikülde; primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (A, B IHC antikor boyama; C, kontrol boyama; E, G , DAPI+Texas red IgG-TR; F, D , Texas red IgG-TR; H, K DAPI; I, J kontrol floresan boyama). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (L, M IHC antikor boyama; P, kontrol boyama; N, Texas red IgG-TR; O, Texas red IgG-TR+DAPI).





4.4 Kontrol Grubu Aquaporin-8 Bulguları

Kontrol ovaryum dokusuna baktığımızda; epitelde çok yoğun bir şekilde ekspresyon izlenirken, altında bulunan tunika albugineada ise ekspresyon izlenmedi (Şekil13; İmmünohistokimyasal boyama A-H, K; İmmünofloresan boyama I, J, L, M, N). Kortekse genel olarak bakıldığında; kan damarlarında immunfloresan çalışmamızda AQP8'in yer yer yoğun şiddette ışımalar yaptığı izlendi. Ara bağ dokusunda ise zayıf şiddette ekspresyon izlendi (Şekil13 K; Şekil14; A-D İmmünohistokimyasal boyama; T, I İmmünofloresan boyama).

Medullada; AQP8'in kan damarları endotelinde yer yer zayıf şiddette eksprese olduğu izlenirken, buna oranla fibroblast benzeri bağ doku hücrelerinde daha yoğun eksprese olduğu izlendi (Şekil14; İmmünohistokimyasal boyama E-H, L; İmmünofloresan boyama J, K, M, N)

Primordiyal folikülde, primer folikül hücresinde (PFH) AQP8 immunolokalizasyonu izlenmezken, primer oositte orta yoğunluktaki şiddette lokalizasyonu izlendi (Şekil14; O,P İmmünohistokimyasal boyama; R, S İmmünofloresan boyama). Primer folikülde; tek katlı primer folikülde bulunan primer oositte AQP8 ekspresyonu zayıf bir şekilde olmuştur. PFH de ekspresyon izlenmedi (Şekil15; İmmünohistokimyasal boyama C-D). Çok katlı primer folikülde primer oositte ve zona pellucida da zayıf şiddette ekspresyon izledi, floresan boyamalarda çekirdekte de ışımalar olduğu izlendi. PFH ve teka interna tabakasına oranla teka eksterna tabakasında daha zayıf ekspresyon izlendi (Şekil15; İmmünohistokimyasal boyama A-D, İmmünofloresan boyama E-J).

Sekonder folikülde; oositin oolemması altındaki kortikal bölgesinde orta şiddetli bir ekspresyon izlenirken, zona pellucidada ve antrum da ekspresyon izlenmedi. Teka interna ve eksterna tabakalarında yoğun bir ekspresyon izlenirken, granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf şiddetli ekspresyon izlendi (Şekil15; K-M).

Tersiyer folikülde ise; zona pellucida tabakasında ekspresyon izlenmezken, sekonder oositte oldukça zayıf bir ekspresyon izlendi. Antrumda, granüloza hücrelerinde, corona radiata, cumulus oophorus yapılarında ekspresyon izlenmedi. Teka

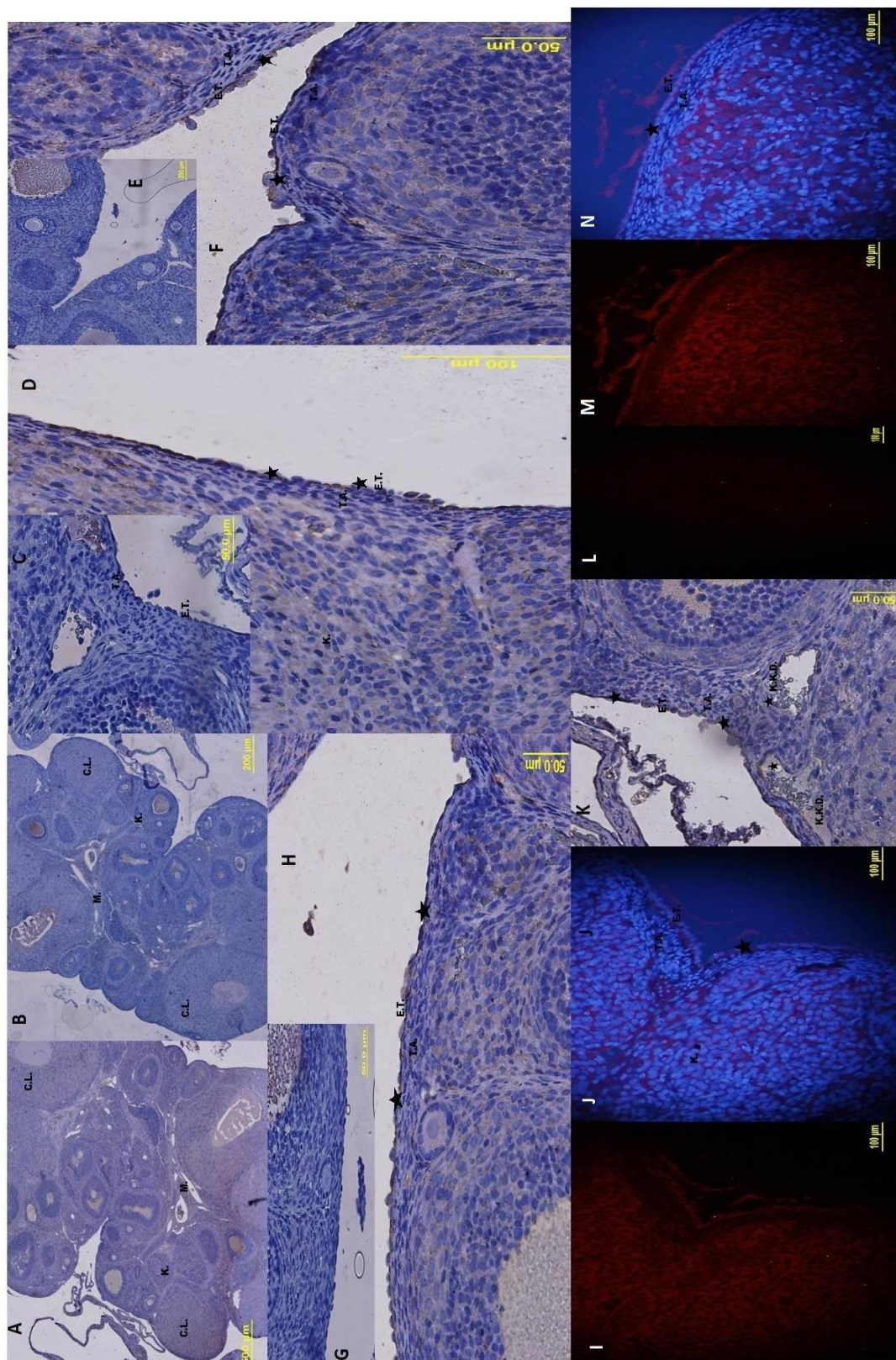
tabakalarının sitoplazmalarında ekspresyon gözlemlenmedi (Şekil15; İmmünohistokimya boyama N, O).

Corpus luteum; corpus luteum kan damarlarında AQP8 immunolokalizasyonu izlenmedi. Teka lutein hücreleri ve granülosa lutein hücrelerinde yoğun bir şekilde ekspresyon izlendi. Teka lutein hücrelerinde granülosa lutein hücrelerine oranla sitoplazmalarında daha yoğun ekspresyon izlendi (Şekil16; İmmünohistokimyasal boyama A-E, J; İmmünofloresan boyama K-R, F-I).



Şekil 13. Kontrol grubu ovaryum dokusunda AQP-8 immünolokalizasyonu (*). Kontrol grubu ovaryum dokusunun genel görüntüsünde immünolokalizasyonu, corpus luteum; (CL), korteks; (K), korteks kan damarı; (KKD), medulla; (M), (A, K IHC antikor boyama; B, kontrol boyama). Kontrol grubu epitel tabakasında AQP-8 immünolokalizasyonu (*). Epitel tabakası; (ET), tunika albuginea; (TA), (H, D, F IHC antikor boyama; G, C, E kontrol boyama; I, M texas red IgG-TR; J,N DAPI+ texas red IgG-TR; L IF kontrol boyama).

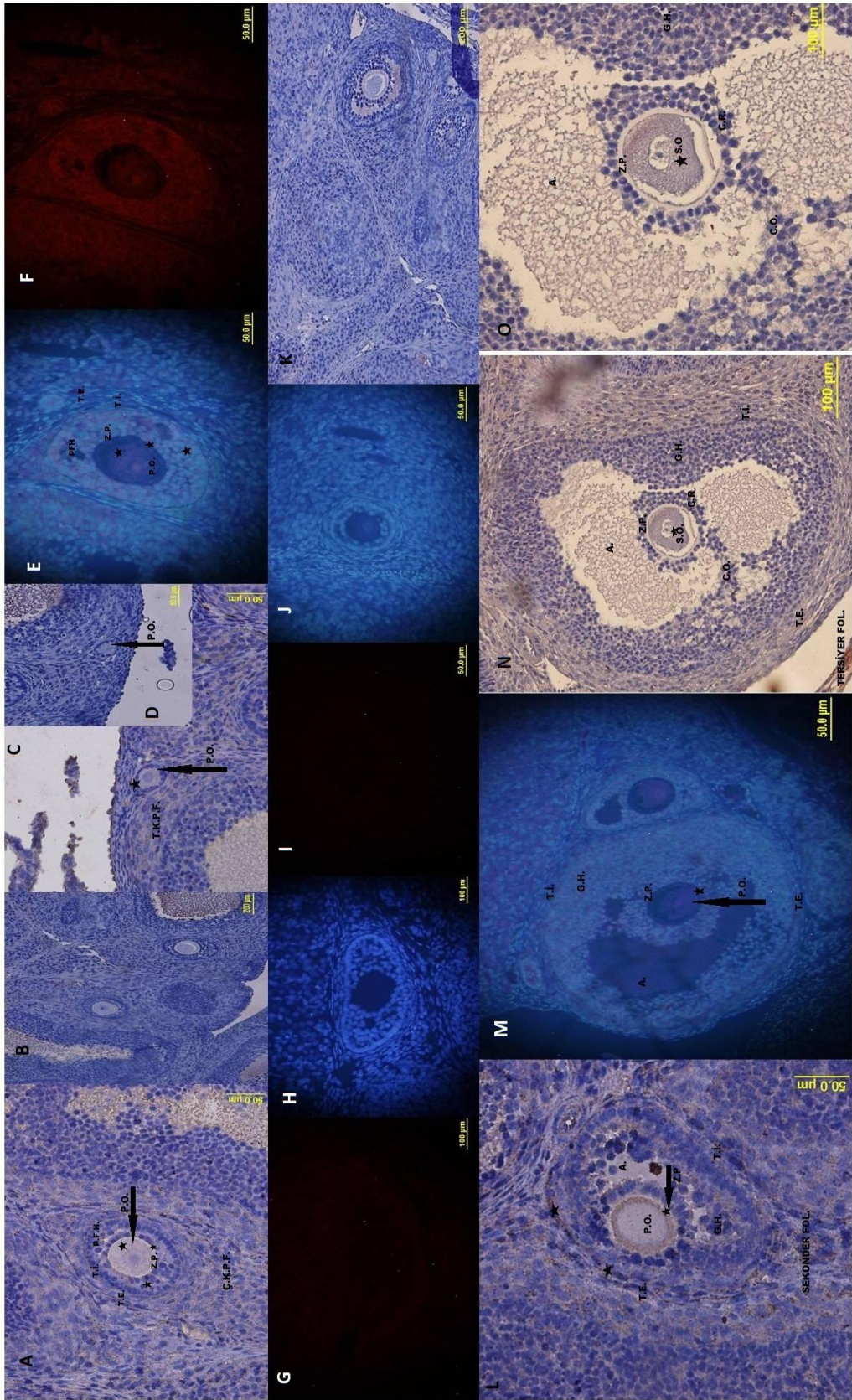




Şekil 14. Kontrol grubu medulla, korteks ve primordiyal folikülde AQP-8 immünolokalizasyonu (*). Korteks; (K), korteks kan damarı; (KKD) (A, C IHC antikor boyama; B, D kontrol boyama; T, I IF DAPI+texas red IgG-TR). Medullada; medulla; (M), medulla kan damarı; (MKD), (E, G, H IHC antikor boyama; F, L kontrol boyama; K, N texas red IgG-TR; J, M DAPI+ texas red IgG-TR). Primordiyal folikül hücresinde; (PMF), (O, IHC antikor boyama; P, kontrol boyama; R, DAPI+ texas red IgG-TR; S, texas red IgG-TR).

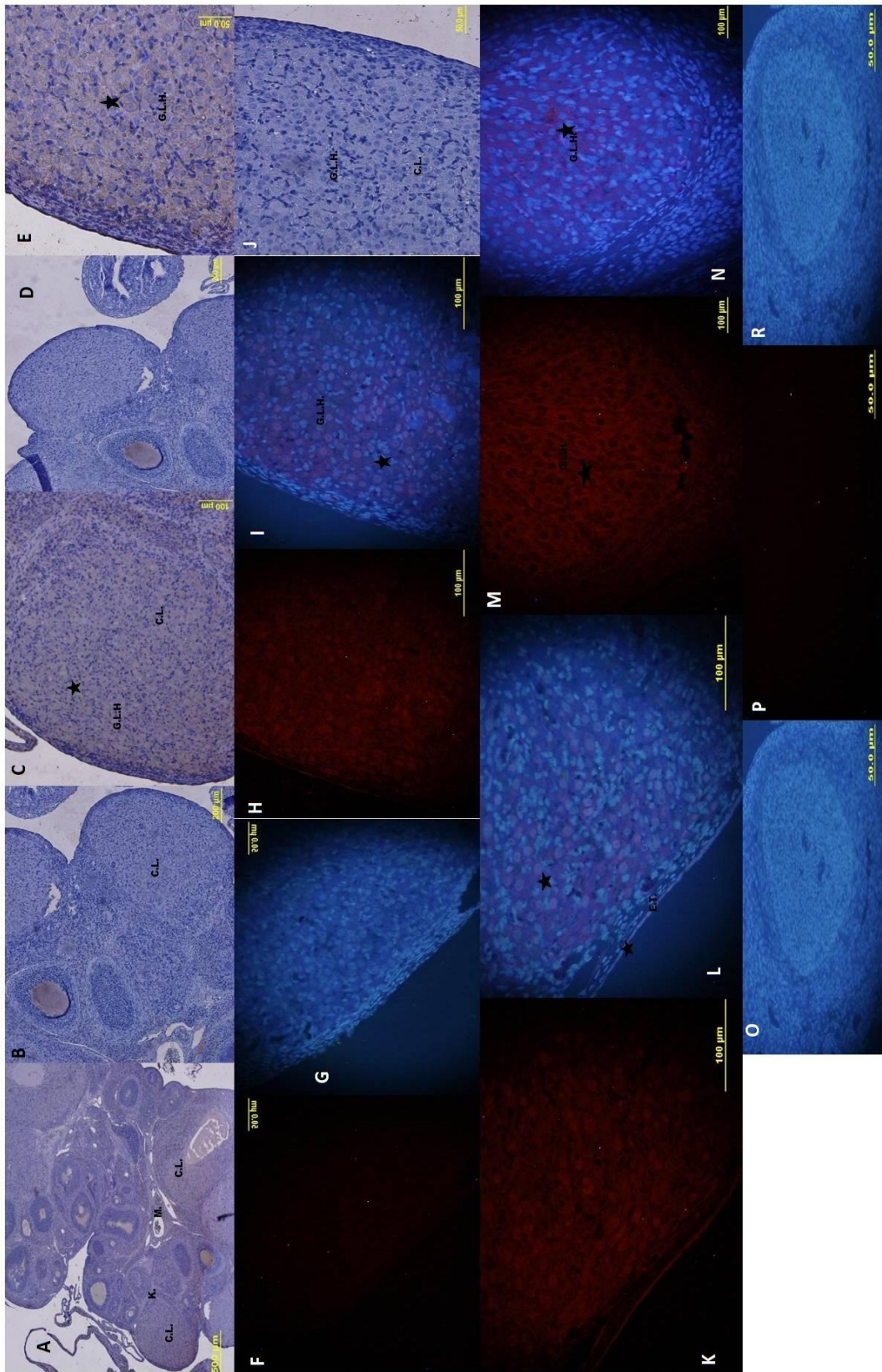


Şekil 15. Kontrol grubu çok katlı primer folikül; (ÇKPF), tek katlı primer folikül; (TKPF), sekonder folikül; (SK), tersiyer folikül; (TF) AQP-8 immünolokalizasyonu (*). Çok katlı primer folikül; primer oosit; (PO), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücresi; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE), (A, IHC antikor boyama; B, kontrol boyama; E, DAPI+ texas red IgG-TR; F, texas red IgG-TR; G, H, I, J kontrol floresan boyama. Tek katlı primer folikül; (TKPF), primer oosit; (PO) (C, IHC antikor boyama; D, kontrol boyama). Sekonder folikülde; primer oosit; (PO), granülosa hücresi; (GH), zona pellucida; (ZP), antrum; (A) teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (L, IHC antikor boyama; K, kontrol boyama; M, DAPI+ texas red IgG-TR). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (N, O IHC antikor boyama).



Şekil 16. Kontrol grubu ovaryum dokusu corpus luteumda; (CL) AQP-8 immünolokalizasyonu(*). Korteks; (K), medulla; (M), granüloza lutein hücresi; (GLH), (A, C, E IHC antikör boyama; B, D, J kontrol boyama; I, L, N DAPI+ texas red IgG-TR; K, M, H texas red IgG-TR; F, G, O, P, R floresan kontrol boyama.





4.5 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-8 Bulguları

PKOS'lu ovaryum dokusunda, epitel ve altında bulunan tunika albuginea tabakasında ekspresyon oluşmadığı izlendi (Şekil18; İmmünohistokimyasal boyama A-E). Kortekste ise, AQP8'in yok denecek kadar zayıf şiddette immunolokalizasyonu izlendi, fakat kortekste kan damarlarında yoğun bir şekilde ekspresyon izlendi (Şekil18; İmmünohistokimya boyama F-H, K-M).

Medullada kortekse oranla hemen hemen aynı şiddette lokalizasyon olduğu izlendi. Bağ dokusundaki fibroblast benzeri hücrelerde çok az şiddette ekspresyon izlenirken, medullayı oluşturan diğer önemli bir yapı olan kan damarlarında yoğun bir şekilde lokasyon izlendi (Şekil18; İmmünohistokimyasal boyama H-J, N,O).

Primordiyal folikülde, primer folikül hücrelerinde ekspresyon izlenmezken, primer oosite orta derecede ekspresyon izlenmiştir (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama F; İmmünofloresan boyama A-E). Primer foliküller; tek katlı primer folikülde primer oositteki ekspresyon yoğundu (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama H-I; Şekil20; İmmünofloresan boyama A-F). Çok katlı primer folikülde ise; AQP8 çekirdekte iyi derecede immunolokalizasyon gösterdi, primer folikül hücrelerinde yoğun bir şekilde AQP8 immunolokalizasyonu izlendi. Primer oosite ise daha az yoğun bir ekspresyon vardı. Zona pellucida da ve teka tabakalarında da az şiddette ekspresyon izlendi (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama G, J; Şekil20 İmmünofloresan boyama A-F).

Sekonder folikülde, primer oositinde, granüloza hücrelerinde, antrum da yoğun bir şekilde ekspresyon varken, zona pellucidasında ise ekspresyon izlenmedi. Teka interna ve eksternada az derecede ekspresyon izlendi (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama G, K; Şekil20 İmmünofloresan boyama G-L)

Tersiyer folikülde; sekonder oosite ve antrum da orta derecede bir ekspresyon izlendi. Zona da, granüloza hücrelerinde, corona radiatada, cumulus oophorusta ekspresyon izlenmedi. Teka interna ve teka eksternada orta dereceli ekspresyon izlendi (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama M; İmmünofloresan boyama N; Şekil20; İmmünofloresan boyama G-L).

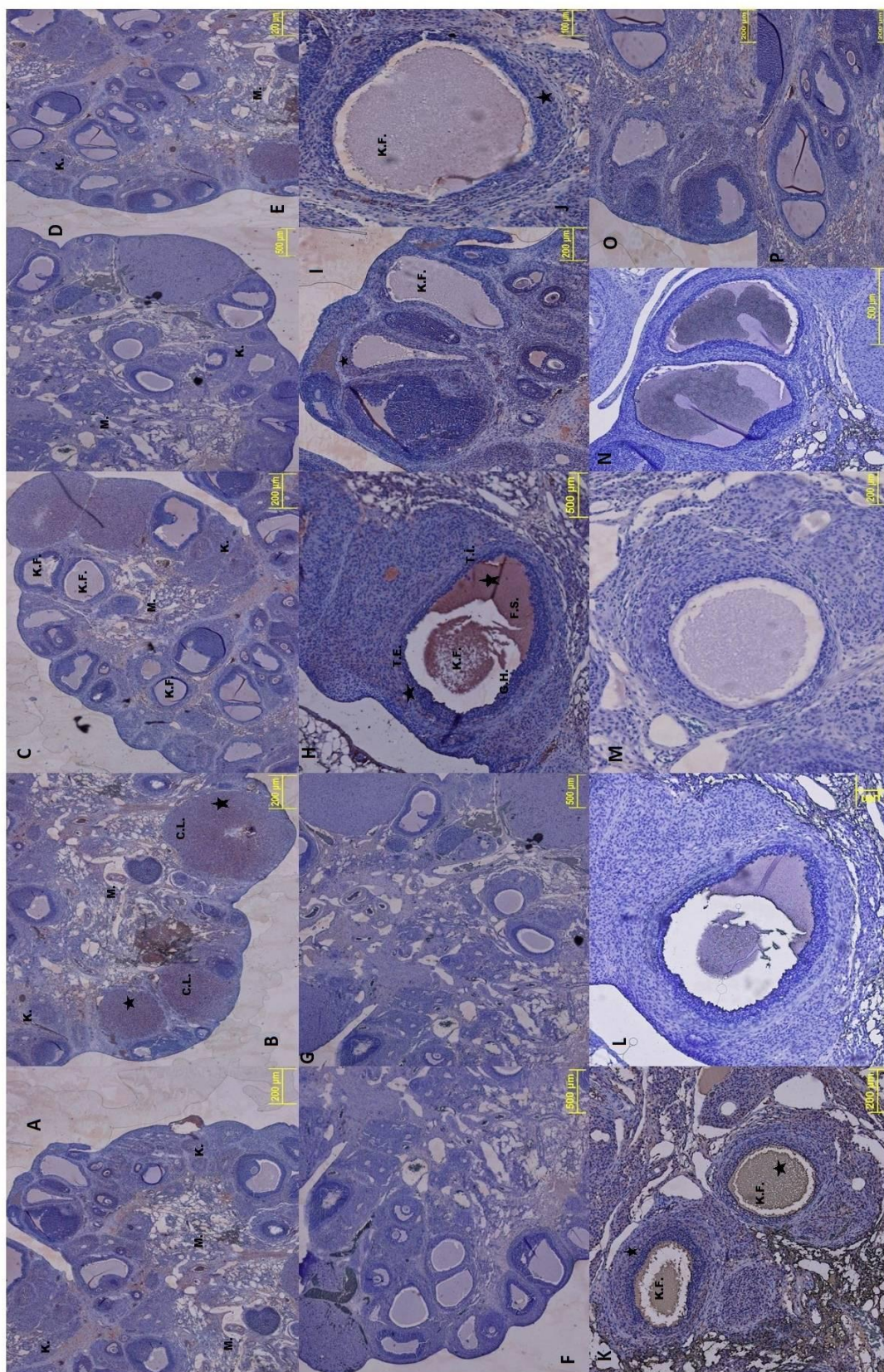
Corpus luteum kan damarlarında yoğun ekspresyon izlendi. Teka lutein ve granüloza lutein hücrelerinde de yoğun ekspresyon olduğu izlendi (Şekil19; İmmünohistokimyasal boyama O, P; İmmünofloresan boyama L).

Kistik yapılarda ise granüloza tabakasında ekspresyon izlenmezken; teka tabakasında gözle görülür orta dereceli bir ekspresyon izlendi (Şekil17; İmmünohistokimyasal boyama A-O).



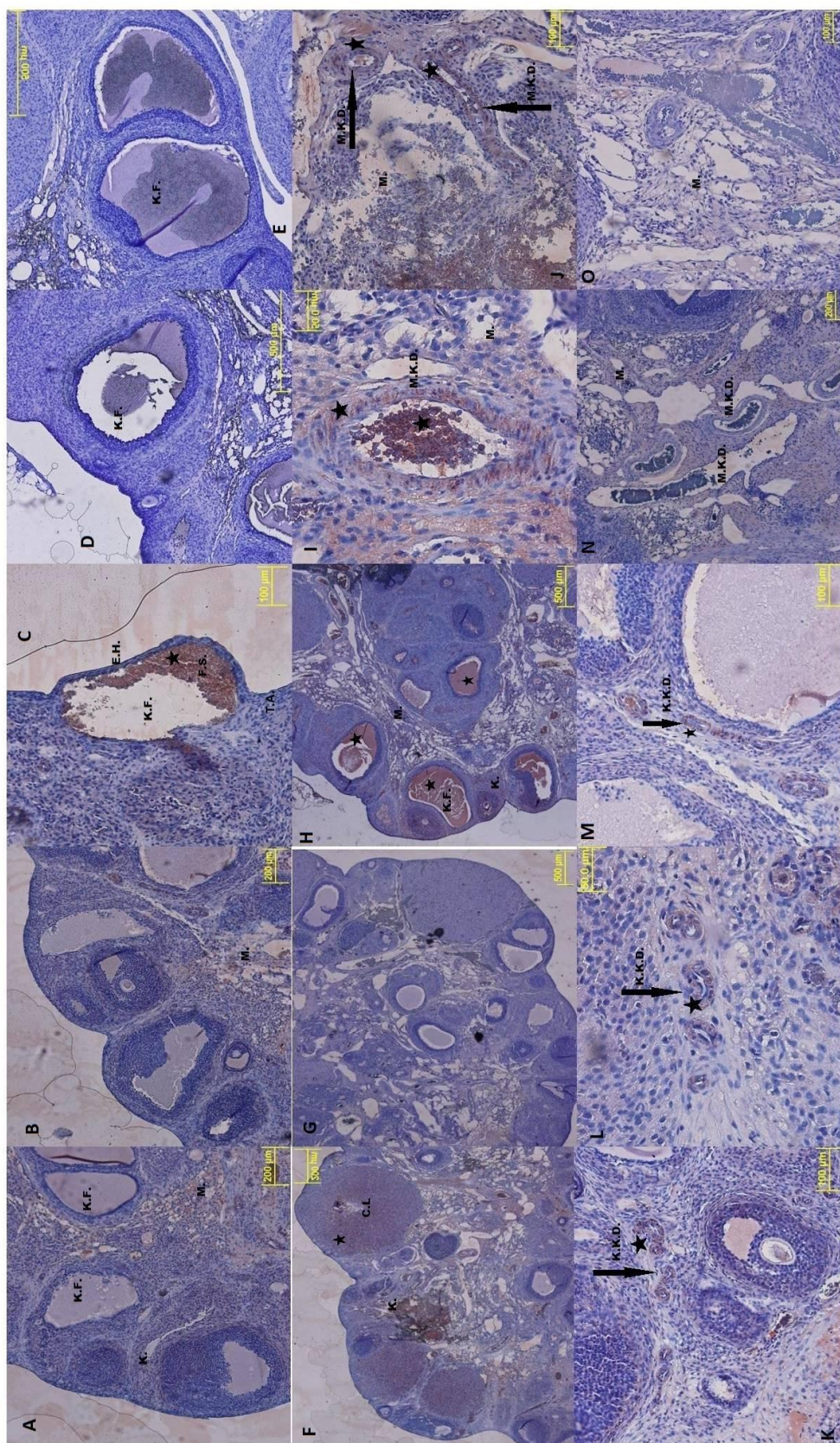
Şekil 17. Deney grubu genel ovaryum görüntüsünde; kistik foliküllerde; (KF), korteks; (K), medulla; (M), corpus luteum; (CL), kistik foliküllerin granüloza hücreleri; (GH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE), folikül sıvısında; (FS) AQP-8 immünolokalizasyonu (*). (A, B, C, E, H, I, J, K, O, P IHC antikor boyama; D, F, G, L, M, N kontrol boyama).





Şekil 18. Deney grubu medulla; (M), korteks; (K), epitelyum tabası(hücre); (EH), tunika albuginea; (TA), corpus luteum; (CL), kistik folikül; (KF), folikül sıvısı; (FS), medulla kan damarı; (MKD), korteks kan damarı; (KKD) AQP-8 immünolokalizasyonu (*). (A, B, C, F, H, I, J, K, L, M IHC antikor boyama; D, E, G, N, O kontrol boyama).

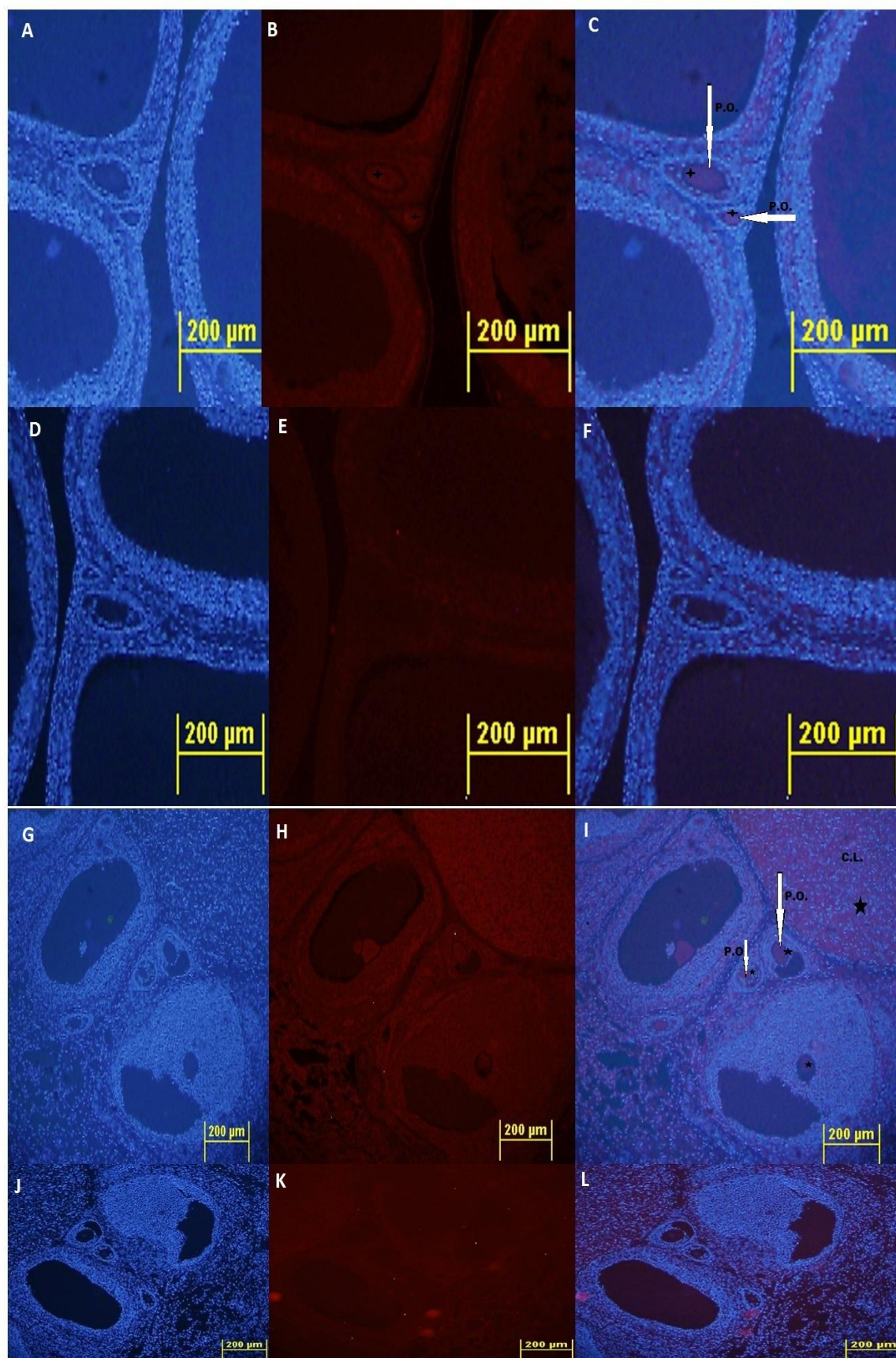




Şekil 19. Deney grubu kortekste yer alan genel ovaryum foliküllerinde AQP-8 immünolokalizasyonu (*). Primordiyal folikülde; (PMF), primer oosit; (PO) (F, IHC antikor boyama). Tek katlı primer folikülde; (TKPF) (I, IHC antikor boyama; H, kontrol boyama). Çok katlı primer folikülde; (ÇKPF), primer oosit; (PO), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücreleri; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (G, IHC antikor boyama; J, kontrol boyama; C, D, E floresan kontrol boyama). Sekonder folikülde; primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (G, K IHC antikor boyama; H, kontrol boyama; A, Texas red IgG-TR+DAPI; B, Texas red IgG-TR). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (M, IHC antikor boyama; N, , Texas red IgG-TR+DAPI). Corpus luteumda; (CL), granüloza lutein hücresi; (GLH) (O, P IHC antikor boyama; L, Texas red IgG-TR+DAPI).

Şekil 20. Deney grubu genel ovaryum görüntüsünde yer alan çeşitli foliküllerde AQP-8 in immüno lokalizasyonu (*). (C, I Texas red IgG-TR+DAPI, B, H Texas red IgG-TR; A, D, G, J DAPI; E, F, K, L kontrol floresan boyama).





4.6 Kontrol Grubu Aquaporin-9 Bulguları

Kontrol ovaryum dokusuna genel olarak bakıldığında, epitelde ve altında bulunan tunika albuginea tabakasında hiçbir ekspresyon izlenmemektedir. Kortekste ve kan damarlarında yok denecek kadar az derecede ekspresyon vardır (Şekil 21; İmmünohistokimyasal boyama A-E).

Medullaya bakıldığında; kortekse oranla çok büyük bir farkın olmadığı görülmektedir. Yer yer kan damarlarında hafif şiddette ekspresyon olduğu izlenmektedir. Ara bağ dokusundaki fibroblast benzeri hücrelerde yok denecek kadar az şiddette lokalizasyonlara rastlanmaktadır (Şekil 21; İmmünohistokimyasal boyama F-L).

Primordiyal folikül hücrelerinde ve çekirdekte herhangi bir ekspresyon izlenmemektedir. Primer oositte ise tıpkı PCOS'lu ovaryumdaki gibi kontrol ovaryumda da gözle görülebilecek orta derecedeki bir düzeyde ekspresyon olduğu gözlenmiştir (Şekil21; İmmünohistokimyasal boyama M-S).

Primer folikül; tek katlı primer folikülde ve çok katlı primer folikülde primer oositte AQP9'un yoğun ekspresyonu izlenmiştir. Çok katlı primer folikülde; primer folikül hücrelerinde lokalizasyon izlenmemiştir. Zona pellucidada ekspresyon oluşmamıştır. Teka interna ve eksterna tabakalarında gözle görülür bir lokalizasyon izlenmemiştir (Şekil22; İmmünohistokimyasal boyama A-F).

Sekonder folikül; primer oositteki ekspresyon vardır, tek katlı ve çok katlı primer folikülde yer alan primer oosite oranla daha azalmıştır ve zona pellucidada orta derecede ekspresyon izlenmektedir. Granüloza hücresinde lokalizasyon görülmemektedir. Antrumda orta derecede lokalizasyon bulunmaktadır fakat kontrol boyamalarda da bu lokalizasyon bulunduğu için spesifik değildir. Teka tabakalarında lokalizasyon izlenmemiştir (Şekil22; İmmünohistokimyasal boyama G-J).

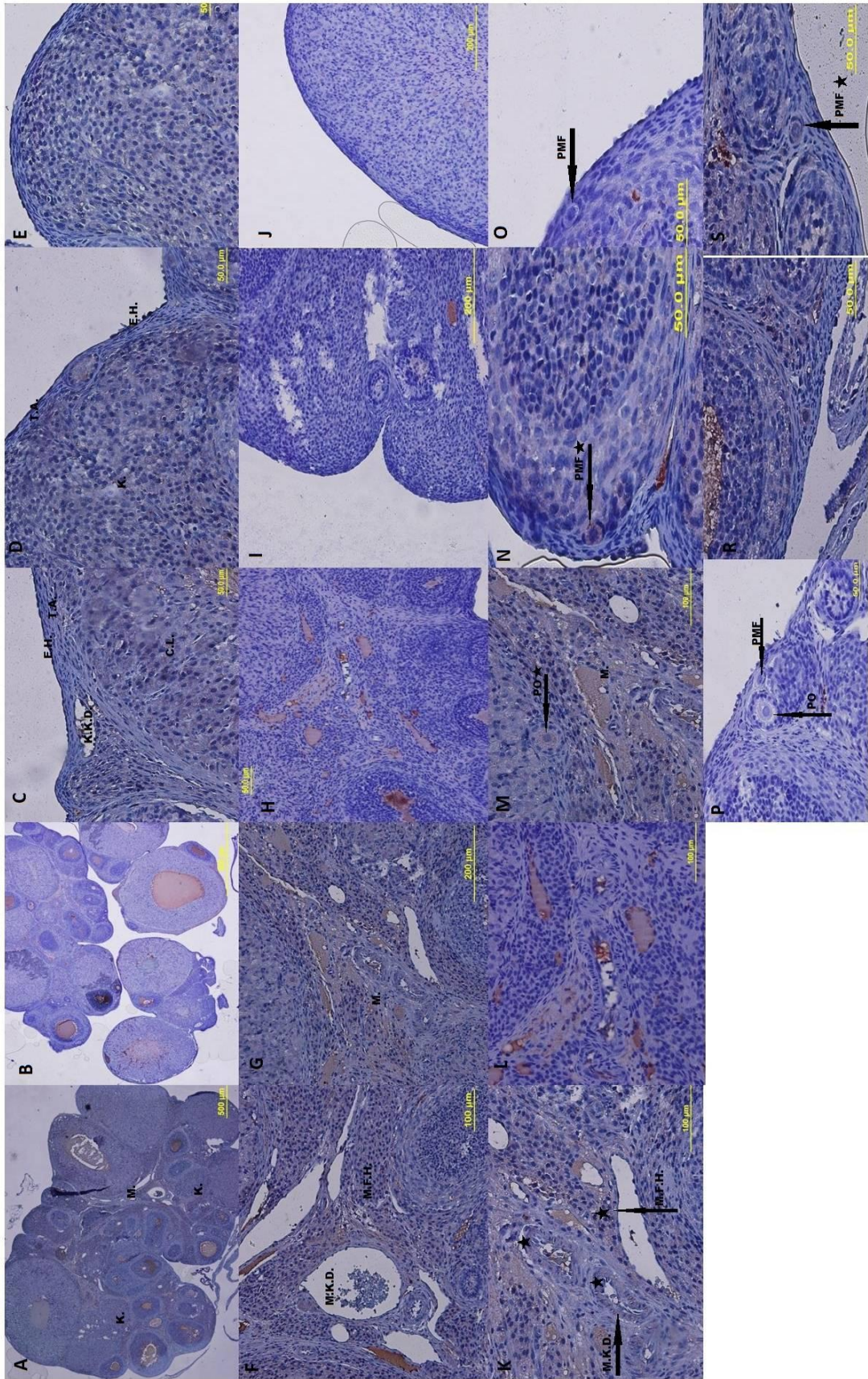
Tersiyer folikül; sekonder oositte AQP9 ekspresyonu izlendi. Zona pellucida da ve cumulus oophorusta ekspresyon izlenmedi. Corona radiatada zayıf ekspresyon izlendi. Antrumda ekspresyon izlendi. Teka eksterna tabakasında ekspresyon izlenirken, teka internada ekspresyon izlenmedi (Şekil22; İmmünohistokimyasal boyama R; İmmünofloresan boyama P, S).

Corpus luteumda; corpus luteum kan damarlarında ekspresyon izlenmedi. Teka lutein hücresi ve granüloza lutein hücrelerinin sitoplazmalarında AQP9'un zayıf immünolokalizasyonu izlendi (Şekil22; İmmünohistokimyasal boyama K-Ö).

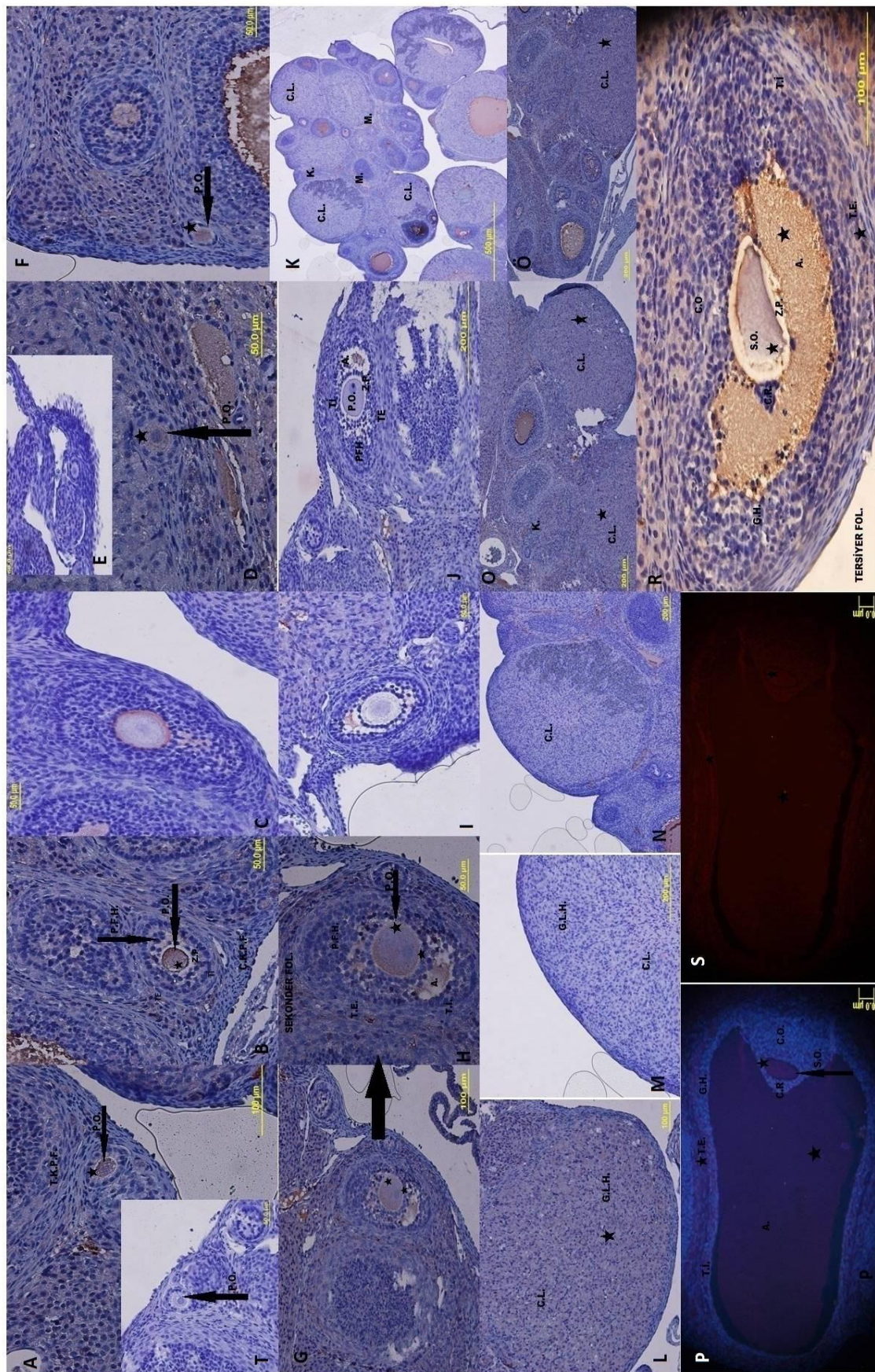


Şekil 21. Kontrol grubu genel ovaryum dokusunda AQP-9 immünolokalizasyonu (*). Korteks; (K), medulla; (M.) (A, IHC antikor boyama; B, kontrol boyama), korteks kan damarı; (KKD), epitelyum hücresi(tabakası)(EH), tunika albuginea; (TA), corpus luteum; (CL), medulla kan damarı; (MKD), medulla fibroblast hücresi; (MFH) (C, D, E, F, G, K IHC antikor boyama; H, I, J, L kontrol boyama); siyah oklarla gösterilen primordiyal folikülde; (PMF) primer oosit; (PO) (M, N, R, S IHC antikor boyama; O, P kontrol boyama).





Şekil 22. Kontrol grubu genel ovaryum dokusunda çeşitli foliküllerde ve corpus luteumda AQP-9 immünolokalizasyonu (*). Tek katlı primer folikülde; (TKPF), primer oosit; (PO) (A, D, F IHC antikor boyama; T, E kontrol boyama). Çok katlı primer folikül; (ÇKPF), primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücreleri; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (B, IHC antikor boyama; C, kontrol boyama). Sekonder folikülde; primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (G, H IHC antikor boyama; I, J kontrol boyama). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (R, IHC antikor boyama; S, texas red konjuge IgG-TR; floresans boyama; P, DAPI+ texas red konjuge IgG-TR). Corpus luteumda; (CL), korteks; (K.), medulla; (M.), granüloza lutein hücresi; (GLH), (O, Ö, L IHC antikor boyama; K, M, N kontrol boyama).



4.7 Deney Grubu (PKOS) Aquaporin-9 Bulguları

PKOS'lu ovaryum dokusunda; epitelyum ve altında bulunan tunika albuginea tabakasında herhangi bir ekspresyon görülmemiştir (Şekil24; A-C İmmünohistokimyasal boyama). Kortekse bakıldığında, kortekste yer alan kan damarlarında net ve belirgin bir şekilde lokalize olmuştur. Korteksteki lokalizasyon epitelyum ve medullaya oranla daha fazla lokalize olduğu görülmektedir (Şekil24; İmmünohistokimyasal boyama E, G, L).

Medullada çok şiddetli olmamakla birlikte ara ara kan damarlarında ekspresyon gerçekleşmiştir. Bazı kan damarlarında lokalizasyon oluşmuştur (Şekil24; İmmünohistokimyasal boyama F, H, I, J).

Primordiyal folikül, primordiyal folikül hücrelerinde hiçbir ekspresyon gözlenmemiştir. Fakat primer oosit sitoplazmasında orta dereceli ekspresyon oluşmuştur (Şekil24; İmmünohistokimyasal boyama L-O).

Primer folikülde, primordiyal folikülden tek katlı primer foliküle geçiş sırasında oositi saran epitel hücreleri kübikleşir, çekirdekler yuvarlaklaşır. Primer oositte de gözle görülecek kadar orta derecede bir AQP9 ekspresyonu gerçekleşmiştir (Şekil24; İmmünohistokimyasal boyama P, R).

Çok katlı primer folikülde ise oositte oluşan ekspresyon ortadan kalkmıştır. Zona pellucidada oluşan ekspresyon devam etmiştir. Çekirdek yada çekirdekçikte herhangi bir ekspresyon oluşmamıştır. Primer folikül hücrelerinde az derecede ekspresyon oluşmuştur. Teka interna ve teka eksterna tabakalarında da ekspresyon söz konusudur (Şekil24; İmmünohistokimyasal boyama R1-T).

Sekonder folikül, primer oositte ekspresyon oluşmamıştır. Çekirdek ve çekirdekçikte ekspresyon söz konusu değildir. Antrumda yani folikül sıvısında lokalizasyon gerçekleşmiştir. Zona pellucida da yoğun bir lokalizasyon görülmektedir. Granülosa hücrelerinde lokalizasyon görülmektedir. Teka interna ve teka eksternada ekspresyon oluşmuştur (Şekil25; İmmünohistokimyasal boyama A, B).

Tersiyer folikülde, sekonder oositin belli bir bölgesinde yok denecek kadar az ekspresyon gözlenirken oositin genelinde ekspresyon gözlenmemektedir. Çekirdek ve

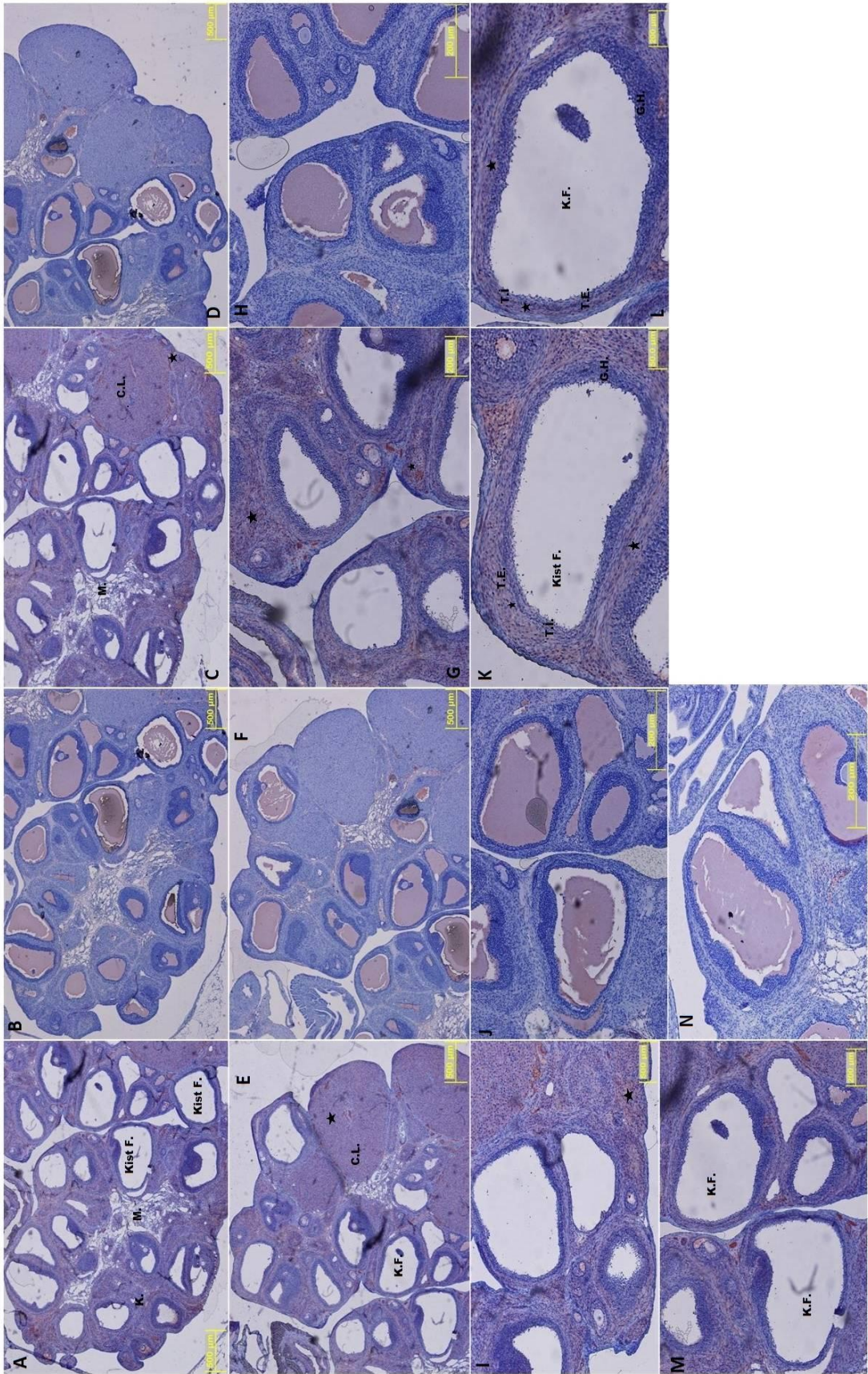
çekirdekçikte ekspresyon söz konusu değildir. Zona pellucidada kontrol boyamaya oranla orta derece bir ekspresyon olduğu gözlenmektedir. Granüloza hücrelerinde ve antrumda lokalizasyon görülmemektedir. Cumulus oophorusta ekspresyon yoktur. Corona radiata tabakasında lokalizasyon görülmemektedir. Az oranda teka tabakalarında ekspresyon oluşmuştur (Şekil25; İmmünohistokimyasal boyama D-G).

Corpus luteum kan damarlarında aşırı derecede ekspresyon oluşmuştur. Teka lutein hücrelerinde ekspresyonu izlenmezken, granüloza lutein hücrelerinde ekspresyon yoğun görüldü (Şekil25; İmmünohistokimyasal boyama C, H-L).

Kistik yapılarda ise, teka tabakalarında orta dereceli ekspresyonlar gözlenmektedir. Granüloza hücrelerinde ekspresyon veya lokalizasyon görümemektedir (Şekil23; İmmünohistokimyasal boyama A-N).

Şekil 23. Deney grubu genel ovaryum görüntüsünde; kistik foliküllerde; (KF), korteks; (K), medulla; (M), corpus luteum; (CL), kistik foliküllerin granüloza hücreleri; (GH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) AQP-9 immünolokalizasyonu (*) (A, C, E, G, I, K, L, M IHC antikor boyama; B, D, F, H, J, N kontrol boyama).



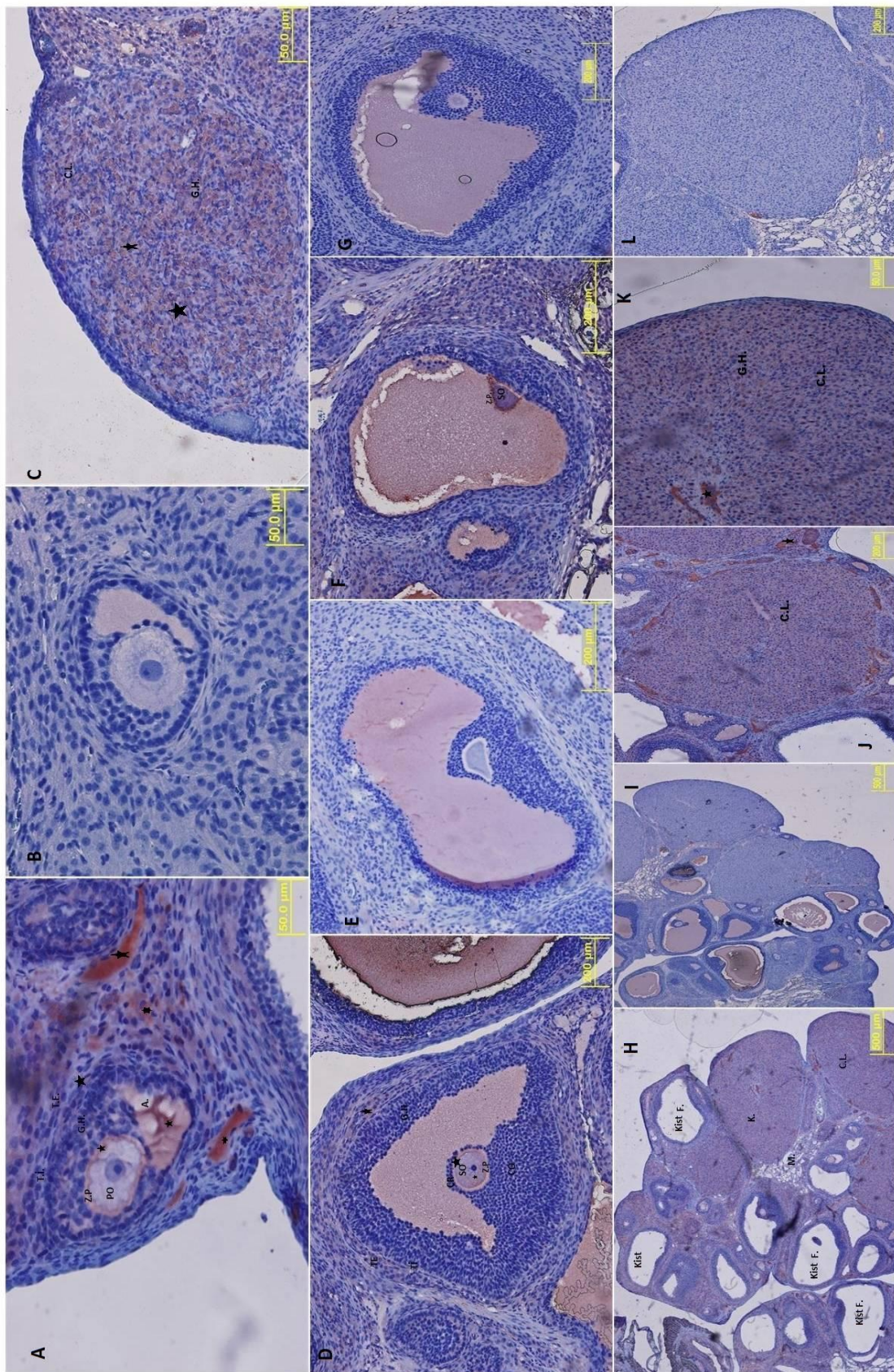


Şekil 24. Deney grubu genel ovaryum görüntüsünde yer alan; epitel tabakasında(hücreleri); (EH), tunika albuginea; (TA), korteks; (K), medulla; (M), kistik foliküller; (KF), korteks kan damarı; (KKD), primordiyal folikül; (PMF), primordiyal folikül hücresi; (PdFH), tek katlı primer folikül; (TKPF), primer folikül hücresi; (PFH), çok katlı primer folikülde; (ÇKPF), primer oosit; (PO), zona pellucida; (ZP), primer folikül hücreleri; (PFH), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) AQP-9' un immüno lokalizasyonu (*). (A, C, E, F, G, H, L, M, R IHC antikor boyama; B, I, J, N, O, P, S, T kontrol boyama).



Şekil 25. Deney grubu genel ovaryum dokusunda yer alan foliküllerde, korteks; (K), medulla; (M) AQP-9 immünolokalizasyonu (*). Sekonder folikülde; primer oosit; (PO*), zona pellucida; (ZP), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (A, IHC antikor boyama; B, kontrol boyama). Tersiyer folikülde; sekonder oosit; (SO), zona pellucida, (ZP), corona radiata; (CR), cumulus oophorus; (CO), granüloza hücreleri; (GH), antrum; (A), teka interna; (Tİ), teka eksterna; (TE) (D, E, IHC antikor boyama; E, G kontrol boyama). Corpus luteumda; (CL), granüloza lutein hücresi; (GLH) (C, H, J, K IHC antikor boyama; I,L kontrol boyama).





Tablo 1. Kontrol Grubunda Aquaporin-7, Aquaporin-8, Aquaporin-9 ekspresyonları

Kontrol Grubu	AQP-7	AQP-8	AQP9
Epitel	-	+++	-
Tunika Albuginea	-	-	-
Korteks	+++	+	++
Korteks Kan Damarı	+	+	-
Medulla	+++	+	++
Fibroblast Benzeri H.	+++	++	+
Medulla Kan Damarı	-	++	+
Primordiyal Folikül			
Primordiyal Folikül H.	-	-	-
Primer Oosit	+++	+	++
Primer Folikül			
Tek Kath Primer F.			
Primer Folikül H.	-	-	-
Primer Oosit	+++	+	++
Çok Kath Primer F.			
Primer Folikül H.	++	+	+
Primer Oosit	++	+	+++
Zona Pellucida	-	+	-
Teka İterna	-	+	-
Teka Eksterna	+	-	-
Sekonder Folikül			
Primer Oosit	+++	+	++
Zona Pellucida	+	++	++
Granüloza Hücresi	+	+	+
Antrum	-	-	++
Teka İterna	-	++	-
Teka Eksterna	+++	++	-
Tersiyer Folikül			
Sekonder Oosit	+	+	+
Zona Pellucida	+	-	+
Granüloza Hücresi	-	-	+
Antrum	-	-	+++
Corona Radiata	-	-	-
Cumulus Oophorus	-	-	-
Teka İterna	-	-	+
Teka Eksterna	+	-	+
Corpus Luteum			
C.L. Kan Damarı	-	-	-
Granüloza Lutein H.	++	+++	+

Tablo 2. Polikistik Over Sendromlu deney grubunda Aquaporin-7, Aquaporin- 8, Aquaporin-9 ekspresyonları

Deney Grubu	AQP-7	AQP-8	AQP9
Epitel	-	-	-
Tunika Albuginea	-	-	-
Korteks	++	+	+++
Korteks Kan Damarı	-	++	+++
Medulla	+	++	+
Fibroblast Benzeri H.	-	+	+
Medulla Kan Damarı	+	+++	++
Primordiyal Folikül			
Primordiyal Folikül H.	-	-	-
Primer Oosit	+++	++	+
Tek Katlı Primer F.			
Primer Folikül H.	-	-	-
Primer Oosit	+++	+++	++
Çok Katlı Primer F.			
Primer Folikül Hücreleri	++	+++	++
Primer Oosit	+++	++	-
Zona Pellucida	-	-	-
Teka İnterna	-	++	++
Teka Eksterna	-	++	++
Sekonder Folikül			
Primer Oosit	++	+++	-
Zona Pellucida	-	-	++
Granüloza Hücresi	+++	+++	++
Antrum	-	-	+++
Teka İnterna	+	+	+
Teka Eksterna	+	+	+
Tersiyer Folikül			
Sekonder Oosit	+++	++	+
Zona Pellucida	-	-	++
Granüloza Hücresi	-	-	-
Antrum	-	-	+
Corona Radiata	-	-	-
Cumulus Oophorus	-	-	-
Teka İnterna	-	-	-
Teka Eksterna	+++	+	+
Corpus Luteum			
C.L. Kan Damarı	-	++	+++
Granüloza Lutein H.	+	++	++

5. TARTIŞMA

Polikistik Over Sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda sık görülen ve üreme fonksiyonunu etkileyen bir endokrin sistem bozukluğudur. Yaklaşık %6-8'lik prevalansı ile anovulatör infertilitenin en sık nedenidir (2, 55, 56).

Polikistik Over Sendromunda meydana gelen morfolojik değişikliklerle ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, moleküler mekanizmasıyla ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. **Bulut G. (2015)** ve arkadaşlarının; PKOS' lu sıçanlarda fibrozis ve inflamasyon üzerine Jun-N-terminal kinase inhibitörünün (SP600125) etkilerini, araştırdıkları çalışmada ovaryumdaki morfolojik değişiklikleri detaylı olarak ele almışlardır (168). Araştırmacılar bu çalışmalarında, ovaryumun tunika albuginea ve stromasındaki fibrozisin anormal ovulasyona neden olduğunu, PKOS'lu grupta normal folikül gruplarında ve corpus luteumda azalma, buna karşın 2 veya 3 hücre tabakalı ince bir granüloza ile birkaç geniş kistik foliküller gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Yumurta dejenerasyonu veya en az bir piknotik granüloza hücresi gözlemlendiği durumlarda, folikül popülasyonlarını atretik olarak sınıflandırdıklarını, aksi halde sağlıklı olarak sınıflandırdıklarını açıklamışlardır. Foliküler atrezinin morfolojik özellikleri, granüloza hücre tabakasında dağınık piknotik nükleus, bazal membrandan ayrılmış granüloza hücre tabakası, parçalanmış bazal lamina ve antrum folikülü içerisinde hücre yıkıntılarının varlığı olarak tanımlamışlardır. Kontrol gruplarında ovaryum kistleri olmadığını, ancak gelişimin farklı evrelerinde çeşitli foliküller ve corpus luteumun varlığını gözlemlediklerini ve bu sonuçların PKOS fenotipinin tam bir indüksiyonunu gösterdiğini açıklamışlardır. Araştırmacılar ayrıca diğer gruplara göre, PKOS grubunda teka tabakası ve stromada tip IV kollajen artışı gözlemlemişlerdir (168). **Gözükara İ. (2016)** ve arkadaşlarının letrozole ile oluşturdukları PKOS sıçan modeli üzerinde ursodeoksikolik asit tedavisinin histopatolojik ve metabolik etkisini araştırmayı amaçladıkları başka bir çalışmada ovum dejenerasyonu veya piknotik granüloza hücreleri varlığında folikül popülasyonunu atretik olarak sınıflandırdıklarını belirtmişlerdir (169). Preantral foliküllerin, tek katlı küboidal granüloza hücreleri görünür bir nükleus ile bozulmamış ve büyümüş bir oosite sahip olduğunu, antral foliküllerin ise 2 veya daha fazla tabakalı küboidal granüloza hücreleri ile boşluk

(kavite) olup olmadığına göre belirtmişlerdir. Kistik foliküller incelmış bir granüloza hücre tabakası, kalınlaşmış bir teka interna hücre tabakası ile içi sıvı dolu geniş bir yapı olarak tanımlamışlardır. PKOS için diğer bulgular kalınlaşmış tunika albuginea tabakası, teka interna hücrelerinde hiperplazi, corpus luteumda azalmanın ise diğer bulgular arasında yer aldığını belirtmişlerdir (169). Biz de letrozole ile PKOS oluşturduğumuz bu çalışmada, diğer çalışmalara benzer şekilde PKOS ile uyumlu foliküler ve kistik morfoloji gözlemledik. Ovaryal foliküller, preantral (görünür çekirdeği ile sağlam, büyütülmüş oosit varlığı ve kübik granüloza hücreleri (tek tabakalı), antral (2 veya daha fazla tabakalı kübik granüloza hücreler, belirgin olsada olmasada bir kavite), ve atretik (piknotik granüloza hücreleri veya yumurta dejenerasyonu varlığında) olarak sınıflandırdık. Ayrıca kistik foliküller azalmış (zayıflamış) granüloza hücre tabakası ve kalınlaşmış teka interna hücre tabakasıyla birlikte içi sıvı dolu yapılar olarak gözlemledik. Yapmış olduğumuz çalışma ile preantral, antral, atretik ve kistik foliküller bu şekilde belirlenmiştir. AQP9, 8 ve 7'nin immüno lokalizasyonlarını PKOS'lu ovaryumların daha çok teka tabakalarında gözlemledik.

AQP'ler çeşitli hücre tiplerinde plazma membranı boyunca ozmotik olarak süren su hareketi için büyük bir yol sağlayan homolog su kanalı proteinlerinin bir ailesidir. AQP'lerin bir dizi spesifik fizyolojik rolleri AQP'lerden yoksun mutant farelerin fenotip analizleri aracılığıyla saptanmıştır. Bu çalışmalarda 13 farklı AQP fonksiyonel olarak başlıca su seçici olanlar AQP 1, 2, 4, 5 ve 8; aquagliseroporinler AQP 3, 7, 9 ve 10 ve belirsiz AQP'ler AQP6, 11 ve 12 olmak üzere 3 alt sınıfta değerlendirilmiştir. Bunlardan aquagliseroporinler gliserol ve diğer küçük çözünmüş maddelere ek olarak suya geçirgen iken, belirsiz aquaporinlerin fonksiyonları ve yerleşimleri henüz bilinmemektedir (105, 170, 106, 135). AQP'lerle ilgili çalışmaların çoğunluğu su sirkülasyonunun fazla olduğu böbrekler ve barsaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar böbreklerde AQP lerin idrar yoğunlaştırma mekanizmasında rol alabileceğini göstermektedir (171). En az 9 tane AQP alt tipinin (AQP1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 ve 11) memeli bağırsağındaki lokalizasyonu gösterilmiştir (172, 173, 174, 175, 131, 176). AQP7 ve AQP8 ince bağırsak ve kolonun apikal membranında lokalize olmuştur (174). AQP9 ince barsağın goblet hücrelerinde lokalize olmuştur. Bağırsak sisteminde

AQP'lerin çoklu ekspresyonuna dayanarak, su taşınmasında önemli bir fonksiyonel rol gerçekleştirebileceği mantıklı ve makul sayılır.

AQP7, ilk olarak sıçan testisinde klonlanmış (136), AQP ailesinin aquagliseroporin alt grubuna üye olan 269 aminoasit içeren bir proteindir. AQP7 sadece suya geçirgen değildir, aynı zamanda gliserol, üre, arsenik gibi bileşiklere de geçirgendir ve civa kloride (HgCl₂) duyarsızdır (136, 137, 138). Northern-blot analiziyle, AQP7 mRNA'sının sıçan böbreğinde, kalbinde, iskelet kasında, adipoz dokusunda ve ince bağırsağında eksprese olduğu ortaya çıkarılmıştır. İmmunohistokimyasal çalışmalar ile spermelerde de AQP7 nin varlığı ortaya koyulmuştur (136, 177, 178, 179, 180). **Laforenza U., ve ark. (2005)** yapmış olduğu bir çalışmada; sıvı salınımı ve absorpsiyonunun fizyolojik mekanizmalarını içerebilecek olan hipotezler altında, mideden rektuma doğru, sıçan gastrointestinal sisteminde AQP7 ekspresyonu ve lokalizasyonunu açıklamışlardır. Sonuçlar, bir apikal AQP7 proteininin hem ince hemde kalın barsağın yüzeysel hücrelerinde eksprese olduğunu göstermiştir, bu da bize bağırsak epiteli içerisinde su ve küçük moleküllerin taşınmasında AQP7 nin bir rolü olduğunu göstermektedir (181).

Yapmış olduğumuz çalışmada hem deneysel olarak oluşturulan PKOS modelinde hemde kontrol grubunda ovaryal yüzey epiteli ve altındaki tunika albuginea tabakasına bakıldığında AQP7 ekspresyonuna rastlanılmamıştır, bu da bize ovaryum dokusu epiteli içerisinde su ve küçük moleküllerin hareketinde (taşınmasında) AQP7 nin bir rolü olmadığını göstermektedir.

Ya-Jing Tan, Xue-Ying Zhang (2015) ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; AQP7'nin dondurarak-saklama (kryopreservasyon) yöntemi sırasında oositlerin hayatta kalması ve hiperozmotik strese toleransta çok önemli bir rol oynadığını açıklamışlardır. Hiperozmotik stres, farklı hücrelerde apoptoza neden olabilir. Ancak, oositler vitrifikasyon aracılığıyla dondurarak-saklama sırasında ozmotik strese tolerans gösterirler. Bunun altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılammamıştır (182). Araştırmacılar bu çalışmada, DMSO, etilen glikol (EG) ve sükröz içeren yüksek konsantrasyonlardaki protektanlar tarafından oluşturulan hiperozmoz etkisindeki fare oositlerinde AQP7 protein seviyelerinin kayda değer bir şekilde yüksek-regülasyona sahip olduğunu açıklarken; AQP3 ve AQP9'un

regülasyonunu bulamadıklarını göstermişlerdir. **siRNA-enjeksiyonu** ile AQP7 ekspresyonu ortadan kaldırılınca, vitrifikasyon sonrası oositlerin hayatta kalma oranlarının önemli derece düştüğünü bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada oositlerde, AQP7'nin neredeyse bütün biyolojik olaylarla ilişkili bir protein olan F-aktin'e bağlandığını göstermişlerdir. Ayrıca, hiperozmotik stres; CPE-bağlayıcı protein (CPEB) ve Aurora A'nın fosforilasyon seviyelerini arttırmaya yönelik düzenleyici olabileceğini ileri sürmüşlerdir. PI3K ve PKC yollarının inhibisyonu, oositlerde CPE-bağlayıcı protein (CPEB) ve Aurora A fosforilasyonunu ve hiperozmotik stres ile indüklenmiş AQP7'nin yüksek regülasyonunun bloke olduğunu bildirmişlerdir, AQP7'nin yüksek regülasyonu vitrifikasyon ile dondurarak-saklama sırasında oositlerin hayatta kalmasında ve hiperozmotik strese toleransın geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Su ve kryoprotektanların plazma membranından geçebilmesi dondurarak-saklama sırasında hücrenin hayatta kalması açısından çok önemlidir (182). Aquaporinler, hücre membranında, özellikle AQP3, AQP7 ve AQP9'u içeren aquagliseroporin alt ailesinin üyeleri, su ve kryoprotektanların hareketini kolaylaştırmada önemli bir rol oynar çünkü aquagliseroporinler sadece su geçirgenliğinde değil aynı zamanda küçük nötral çözümlü maddeleri de geçirirler (100, 183, 184). Daha önceki çalışmalarda da AQP7'nin insan ve fare oositlerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (185-188). Fare oositlerinde, EG, DMSO ve sükröz içeren kryoprotektanların AQP7 ekspresyonunu uyardığını bulmuşlardır. Ancak, bu 3 kryoprotektanla muamele edilmiş gruplar içerisinde, fare oositlerinde AQP7 ekspresyonunun up-regülasyonunu en çok DMSO'nun indüklediğini bildirmişlerdir, bu da artan su taşınımı ve vitrifiye oositlerin düşük hayatta kalma oranları ile ilişkilendirilebileceğini öne sürmüşlerdir (182).

Çalışmamızda, PKOS'lu sıçan ovaryum dokusuna bakıldığında, primordiyal folikülün oositinde başlayarak tersiyer folikülün oositine kadar çeşitli şiddetlerde AQP7'nin eksprese olduğu görülmüştür. Primordiyal folikülde lokalizasyon görülmesinin nedeni gelişimin erken dönemlerinde AQP7 etkinliğinin fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; PKOS grubunda primordiyal folikülden tersiyer foliküle kadar oositlerde hemen hemen aynı fakat biraz daha fazla AQP7 ekspresyonu oluştuğunu gözledik. PKOS'un oositler üzerinde AQP7'nin ekspresyonunu etkilediğini söyleyebiliriz. Bütün bu kanıtlara dayanarak, oositlerin yaşamlarını devam ettirebilmede AQP7'nin çok büyük bir öneme sahip

olduğunu söyleyebiliriz. Memeli ovaryumunda, oositlerin doğru bir şekilde gelişebilmesi, foliküler sıvı birikimi de dahil olmak üzere foliküller tarafından sağlanan koşullara bağlıdır. Bu nedenle, foliküler su taşınması etkin üreme için önemli bir süreç gibi görünmektedir.

Nisha A. McCONNEL ve ark. (2002) yapmış olduğu bir çalışmada bir ovaryum antral folikülünde su geçirgenliğinin ağırlıklı olarak transselüler yolla ve aquaporinler aracılığıyla olduğunu bildirmişlerdir (30). Ovaryum folikülogenezi, içi sıvı dolu antrumun oluşumu ve genişlemesiyle kısmen karakterizedir. Antrum oluşumu, gonadotropin uyarımı sonrası, folikül genişleme oranı ile folikül büyümesinin preantral fazı süresince yaklaşık olarak 50-kat daha büyük olan çok hızlı bir süreçtir (189). Folikül boyutundaki bu çarpıcı artış, hızlı ve masif bir su taşınımını gerektirir. Araştırmacılar izole ettikleri antral foliküllerin su ve c-inülin (ekstraselüler kısım sınırlanmış kompleks bir şeker) ile su geçirgenlik katsayısını hesapladıkları çalışmada, suyun inüline oranla 3,5 kat daha büyük bir hareket oranına sahip olduğunu ve suyun başlıca transselüler yolla giriş yaptığını ileri sürmüşlerdir (190). **Nisha A. McCONNEL ve ark. (2002)** yapmış olduğu çalışmada 50 mikromolar HgCl₂ (spesifik olmayan bir aquaporin inhibitörü) ile foliküllerin inkübasyon-öncesi azalan su hareketi seviyelerini inülinle göstermişler ve transselüler su hareketinin AQP'ler aracılığıyla olduğunu belirtmişlerdir. HgCl₂, AQP'lerin fonksiyonunu engeller ve hipotonik bir ortamda granüloza hücrelerinin şişmesini önler. Bu çalışmada araştırmacılar Flow sitometri yöntemi ile antral foliküllerin granüloza hücrelerinde AQP7, 8, 9'un varlığını göstererek, folikül içerisine suyun giriş yapabilmesi için potansiyel olarak aracılık eden aday AQP (AQP7, 8, 9)'leri belirlemişlerdir. Buna ek olarak, HgCl₂ varlığında ve yokluğunda hücre hacmindeki değişiklikler ölçülerek izole edilmiş granüloza hücrelerinde AQP'lerin fonksiyonel varlığı tespit edilerek kesinleştirilmiştir. Antral foliküllerde, su geçirgenliğinin genel AQP inhibitörü olan HgCl₂'ün eklenmesi ile önemli derecede düştüğünü bularak açıklamışlardır. AQP7, HgCl₂-duyarsız olan AQP ailesinin 2 üyesinden bir tanesidir (AQP4, 7). HgCl₂ varlığında önerilen hipotonik şişme deneyi, AQP7'nin HgCl₂'e duyarsız olmasından dolayı AQP7 aracılığıyla su hareketinin oluşmasından sonuçlanabileceğini göstererek kanıtlamışlardır (30).

Çalışmamızda, PKOS'lu sıçan ovaryum dokusuna bakıldığında; kontrol grubunun antral folikülünün granüloza hücrelerine oranla daha şiddetli bir AQP7 ekspresyonu olduğu gözlemlenmiştir. Bu da bize PKOS'lu hastalarda antral foliküllere su taşınımının daha yoğun ve hızlı bir şekilde olduğunu gösterebilir. PKOS'un antral foliküllerde AQP7 ekspresyonunu ve fonksiyonunu artırdığı sonucuna varabiliriz. Kontrol grubuna oranla PKOS'lu grubun antral folikülünün teka hücre tabakasında daha yoğun bir şekilde AQP7 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu gözlemimiz izole edilmiş foliküllerde, antral foliküllerde sıvı geçişinin düzenlenmesinde teka tabakasının katkıda bulunabileceğini ileri süren çalışmaların (191, 192) varsayımlarını destekleyebilir. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular sadece antral foliküllerde değil, PKOS'lu grubun tersiyer folikülünün, kontrol gruba oranla teka hücre tabakasında da AQP7'nin daha fazla eksprese olduğunu göstermektedir. Yalnızca granüloza hücrelerinde değil, teka tabakalarında da AQP7'nin sıvı geçişinin regülasyonunda önemli olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, PKOS'lu sıçan ovaryum dokusuna bakılarak AQP8 proteini değerlendirildiğinde, kontrol grubuna oranla PKOS grubunda çok katlı primer folikülün folikül hücrelerinden başlayarak, antral folikülün granüloza hücrelerine kadar daha kuvvetli bir AQP8 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Yine PKOS grubunda antral foliküllere daha yoğun bir su taşınımının gerçekleştiğini, PKOS'un antral foliküllerde AQP7 ekspresyonunu ve fonksiyonunu artırdığını söyleyebiliriz. Çalışmamızda, PKOS'lu sıçan ovaryum dokusuna bakılarak AQP9 proteini değerlendirildiğinde; antral folikülün granüloza hücrelerindeki AQP9 ekspresyonu kontrol grubuna oranla daha yoğun ve şiddetli olduğunu gözlemledik. Bu da yine PKOS grubunda su taşınımının kontrol grubuna oranla daha fazla olduğunu kanısını doğrulamaktadır. Bu 3 grup arasında bir değerlendirme yapılacak olursa; PKOS grubu ovaryum dokusunun antral folikülünün granüloza hücrelerinde; AQP7 ve AQP8 ekspresyonlarının aşağı yukarı aynı şiddetlerde eksprese olduğunu fakat AQP9 un ise bunlara oranla daha az eksprese olduğunu gözlemledik. Kontrol grubunun antral foliküllerinin granüloza hücrelerinde ise; aşağı yukarı AQP7, 8 ve 9 un immünolokalizasyonlarının aynı şiddetlerde olduğunu gözlemledik.

Aquaporin8 geni; 1997’de sıçandan klonlanmıştır (193, 194) ve o günden bu yana cDNA, fare ve insanları da kapsayan diğer türlerden izole edilmiştir (195, 196, 197). Sıçan AQP8 cDNA’sının 263 aminoasitlik (193, 194), insan ve fare cDNA’sının ise, 261 aminoasitlik proteinini kodladığı saptanmıştır (195, 196). Bir bitki su kanalı olan AQP-TIP (%38-41) ve diğer AQP’lerle (%30-37) en yüksek aminoasit sekans homolojisine sahiptir (193, 194, 195, 196). İnsan AQP8’i sıçan ile %74 ve fare AQP8 ile %76 benzerliğe sahiptir (196). İnsan AQP8 geni, 16p12 kromozomunda lokalize olduğu bulunmuştur (198). AQP8’in taşıma seçiciliği tartışmalıdır. Üre taşınması fare AQP8’inde (195) bulunmasına karşın sıçan, AQP8’iyle (194) ilişkilendirilememiştir. Ma ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada; fare AQP8’inin ürenin yanısıra suya da geçirgen olduğunu, fakat gliserole geçirgen olmadığını rapor etmişlerdir (195). İnsan AQP8 proteininin, su-seçici bir kanal olduğu, ne gliserole ne de üreye geçirgen olmadığı ileri sürülmüştür (196). Türler arasında bu farklılıkların nedeni hala belirsizdir.

AQP8 varlığı, sıçan ve farelerin çeşitli organlarında yaygın olarak çalışılmıştır. Sıçan ve farede, AQP8 mRNA’sı testis, pankreas, tükrük bezi, karaciğer ve kolonda (193, 194, 195, 199) ve sıçan AQP8 mRNA’sı jejunumda (199) saptanırken; sıçan AQP8 proteininin hücresel lokasyonu, hepatositlerde, pankreas ve tükrük bezinin asiner hücrelerinde, emici kolonik epitelyal hücrelerde belirlenmiştir (194). Ishibashi ve ark. sıçan AQP8 mRNA’sını, aynı zamanda seminifer tübüllerdeki tüm spermatogoniyal seriye ait hücrelerde saptamış ve spermatogenezin tüm aşamalarında önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir (193). Fare mRNA ekspresyonunun ise, kalp, plesanta, akciğer, böbrek, diyafram, dalak, mide ve beyin de olduğunu ayrıca rapor etmişlerdir (195). AQP8 ile ilgili çalışmalar daha sınırlı sayıda olup, pankreas ve kolonda lokalizasyonu rapor edilmesine rağmen, sıçandakinin tersine testislerde lokalizasyonu belirlenememiştir (193, 196). Western blott yöntemi ile, sıçan AQP8 mRNA’sının karaciğer, testis, kolon ve jejunumda lokalize olduğu gösterilmiştir ve doğrulanan mRNA sonuçları rapor edilmiştir (200). Ayrıca epididimiste de lokalizasyonu gösterilmiştir. Hücresel olarak, hepatositlerde hücre içinde, epididimiste kanal hücrelerinde, testiste spermatogenik hücrelerde, kolon ve jejunumda yüzey epitelyal hücrelerde olduğu gösterilmiştir (200). Su taşınımının yüksek olduğu böbreklerde, farede AQP8 mRNA’sı fonksiyonel olarak su ve üre taşınımı ile ilişkilendirilmiş (195),

sıçanlarda ise fonksiyonel olarak ilişkilendirilemese de, AQP8 ekspresyonu bütün böbrek zonlarında (korteks, medullanın iç ve dış şeritleri) ve total sıçan böbreği bölümlerinin membranında 28 kDa büyüklüğünde bir protein olarak saptanmıştır. Buradaki lokalizasyonunun proksimal tübül hücrelerinde ve toplama kanallarında özellikle intrasellüler olması dikkat çekicidir (200).

Yapmış olduğumuz çalışmada, ovaryum dokularına bakıldığında; hem PKOS deney grubunun hem de kontrol deney grubunun yüzey epitel tabakasına baktığımızda, kontrol grubunun yüzey epitel tabakasında orta dereceli bir AQP8 ekspresyonuna rastlanılmıştır. PKOS grubunda ise, yüzey epitelinde AQP8 ekspresyonu gözlenmemiştir. PKOS'un ovaryum dokusunun yüzey epitelinde AQP8 ekspresyonunu ve fonksiyonunu engellediği kanısına varabiliriz.

AQP8'in, dişi ve erkek üreme sistemindeki varlığı yaygın olarak saptansa da fizyolojik fonksiyonları tam olarak anlayamamıştır. Bu konuda en detaylı çalışmalardan biri Weiheng Su, Ying Quiao ve ark. (201) tarafından gerçekleştirilmiştir. Aquaporin8 eksikliği olan farelerde artan dişi doğurganlığını ele almışlardır. Yapılan bu çalışmada araştırmacılar, öncelikle çapraz döllenme deneylerinde AQP8 eksikliği olan mutant dişi fareler ile yabani tip dişi fareleri doğurganlık açısından karşılaştırmışlardır. Her iki genotipte, AQP8 mutant farelerde, hem döl verme oranında hem de ovule olan oosit sayısında yabani tipe göre artış olduğunu saptamışlardır. Histolojik analizler; mutant AQP8 eksikliği olan dişi ovaryumlarında foliküler olgunlaşma, ovulasyon ve corpus luteumda artış olduğunu doğrularken, RT-PCR, Western blott ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırmacılar, fare ovaryumunun granüloza hücrelerinde AQP8 ekspresyonunu saptamış, AQP8 eksikliği olan farelerden izole edilmiş granüloza hücrelerinde yabani tip farelere göre membran su geçirgenliğinin %45 oranında azaldığını bu çalışma ile rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, foliküler atrezinin her iki genotip açısından araştırılmış olmasında dikkate değerdir. Foliküler atrezi önemli ölçüde granüloza hücrelerindeki apoptozis ile karakterizedir. AQP8 mutant dişi ovaryumlarından elde edilen granüloza hücrelerinde apoptozisin yabani tip farelere göre önemli ölçüde azaldığını belirleyen araştırmacılar, AQP8'in yokluğunun apoptozu azaltarak bu farelerin daha ovulatör ve doğurgan olabileceğini ileri sürmüşlerdir (201).

Çalışmamızda, PKOS'lu grubun granülosa hücrelerinde kontrol grubuna oranla AQP8 ekspresyonunun daha yoğun olduğu belirlendi. PKOS grubu ovaryum dokusunda AQP8'in daha fazla eksprese olduğunu belirledik. Elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak PKOS'un AQP8 ekspresyonunu ve fonksiyonunu artırdığını söyleyebiliriz. PKOS grubunun çok katlı primer folikülünde kontrol grubuna oranla, folikül hücrelerinde yoğun bir şekilde AQP8'in eksprese olduğunu gözlemledik. Sekonder folikülde ise yine kontrol grubuna oranla granülosa hücrelerinde AQP8 ekspresyonunun daha yoğun olduğunu belirledik, PKOS grubunun tersiyer folikülünün granülosa hücrelerinde AQP8 ekspresyonuna rastlamadık, bunu folikül büyüklüğü ve gelişmişliği ile ilişkilendirebiliriz. Kontrol grubunun tersiyer folikülünün granülosa hücrelerinde ise, yok denecek kadar hafif bir ekspresyon olduğunu belirledik. Corpus luteumda ise her iki grupta da yoğun ve aynı derecelerde ekspresyon olduğunu gözlemledik. Bu verilere dayanarak; AQP8' in PKOS'lu ovaryumda daha aktif olduğunu, ekspresyonunda kontrol grubuna göre önemli bir artış olduğu ve su taşınımının granülosa hücrelerinde daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Granüloza hücreleri, gerekli besinleri ve östrojeni sağlaması bakımından oosit gelişimi ve folikül olgunlaşması bakımından önemli bir rol oynar (202, 203). Bu veriye dayanarak; yapmış olduğumuz çalışmada PKOS'lu ovaryumda kontrol grubuna göre oositte, granüloza hücrelerindeki ekspresyona paralel olarak oldukça yoğun bir AQP8 ekspresyonu gözlemledik. Primordiyal folikülden başlayarak sekonder folikülün oositine kadar yoğun bir AQP8 ekspresyonu gözlemledik. Bu verimize dayanarak ta; PKOS'lu ovaryum foliküllerinin oositlerinde kontrol grubuna oranla daha fazla su taşınımının gerçekleştiğini, hastalıkla birlikte AQP8 ekspresyonunun artış gösterdiğini söyleyebiliriz.

Yukarıda bahsetmiş olduğumuz AQP8 eksikliği olan mutant farelerde artan dişi doğurganlığı ile bizim yapmış olduğumuz çalışma karşılaştırıldığında, PKOS grubunda AQP8'in kontrol grubuna oranla daha fazla eksprese olduğunu bulduk. Bu durumda PKOS'un AQP8'in ekspresyonunu artırıcı yönde tetiklediğini söyleyebiliriz. PKOS'lu olgularda anovulasyon, foliküllerde atrezi ve corpus luteum sayısında azalış söz konusu olduğundan, PKOS'lu olgularda AQP8 geni mutant hale getirilerek ovulasyonda, foliküllerin gelişiminde ve ovule olan oosit sayısında artış sağlanabilir.

İnsan ve sıçan AQP9 genleri 1998'de (204, 205) ve diğerleri ise sonradan klonlanmıştır (49). AQP9 cDNA'sının sıçanlarda olduğu gibi insanlarda da 295 aminoasit proteinini kodladığı bulunmuştur (204, 205, 206). İnsan ve sıçan AQP9'u AQP3 (%48-49) ile düşük ölçülü bir homolojiye; AQP7 ile (%45-47) ve diğer aquaporinlerle (%30) civarında bir homolojiye sahiptir. Araştırmacılar AQP3, AQP7 ve AQP9'un aquaporin ailesinin bir alt familyası olduğunu bildirmişlerdir (204, 205). Sıçan AQP9'u insan AQP9 (%75) ile benzer en büyük aminoasit sekansına sahiptir (206). Sıçan AQP9'un su ve çözünmüş maddelerin (carbamidler, polioller, pürinler, pirimidinler) her ikisinde yüksek geçirgenliğe sahiptir (205). Sıçan AQP9'u civa kloride duyarlı olduğu bilinmesine rağmen, insan AQP9'u için çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir (205, 206). Bir floretin ve civaya duyarlı hareketlerde, karbamidler, polioller, pürinler, pirimidinleri de kapsayan geniş bir çeşitlilikte yüklü olmayan çözünmüş maddelerin ve suyun geçişine izin veren diğer AQP9 alt grupları bulunurken, sınırlı olarak su ve üreye geçirgen olan bir grup ta bulunmuştur (204, 207). Insitu-hibridizasyon çalışmalarında insan AQP9'u kromozom 15 q22.1-22.2 de saptanmıştır (207).

Sıçanda AQP9 mRNA'sı sıçan karaciğeri, testisi, beyni ve akciğerinde bulunmuştur (206, 207). Bu dokularda hücre içi lokalizasyon hepatositlerde, seminifer tübüllerin iç yüzeyinde ve interstitial Leyding hücrelerinde in situ hibridizasyon yöntemiyle gösterilmiştir (205). Ayrıca AQP9 astrositlerde belirlendi (205). İnsan AQP9'u northern blot yöntemi ile, periferal lökositlerde, karaciğer, akciğer, dalak (204, 207), ve kemik iliğinde (207) lokalize olmuştur. Sıçan karaciğer ve testisinde AQP9'un mRNA lokasyonu, AQP9'un sıçan karaciğer, testis, dalak ve epididimisinde 27-28 kDa bir protein olduğu immünblot, immünohistokimya yöntemleriyle gösterilerek onaylandı (200). Hücresel lokalizasyonu, başlıca sinüzoidal yüzeylerde, hepatositlerde plazma membranında, epididimiste sterosilyalarda, testislerde interstitial Leyding hücrelerinde olduğu immünohistokimya yöntemleriyle saptandı (200).

P. Ford ve ark. (2000) yapmış oldukları bir çalışmada, farklı olgunlaşma aşamalarında sıçan oositlerinde, su geçirgenliğini ve AQP9 ekspresyonunu araştırmışlardır. Olgunlaşmamış oositlerde (proöstrus), AQP9 mRNA ekspresyonunun mevcut olduğunu bildirirken, olgun oositlerde (östrus) mevcut olmadığını

bildirmişlerdir. Olgunlaşmamış oositlerin su ozmotik geçirgenliğinin daha yüksek olduğunu, civa klorüre ve floretine duyarlı olduğunu bildirirlerken, bunun aksine olgun oositlerin düşük bir su ozmotik geçirgenliğinin olduğunu, civa klorüre ve floretine duyarsız olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar olgunlaşmamış oositlerde, su ve mannitol geçirgenliklerinin olgun oositlere göre daha yüksek olduğunu da tespit etmişlerdir (165).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere bakıldığında; kontrol ovaryumunda primordiyal, tek katlı primer, çok katlı primer ve sekonder foliküllerin olgunlaşmamış primer oositlerinde yukardaki çalışmaya paralel bir AQP9 ekspresyonu gözlenirken, folikül büyüklüğü arttıkça yani tersiyer folikülün oositinde ise AQP9 ekspresyonuna rastlanmadı. Bu bize foliküler gelişimin erken dönemlerinde AQP9'un fonksiyonunun fazla olduğunu; bu foliküllerin olgunlaşmamış oositlerinde, su ve çözünmüş diğer maddelerin geçirgenliğinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile PKOS grubunun karşılaştırılması yapıldığında ise, PKOS'lu ovaryumların primordiyal ve tek katlı primer folikülün olgunlaşmamış oositinde AQP9 ekspresyonu mevcut iken folikül büyüklüğü arttıkça yani çok katlı primer ve sekonder foliküllerin oositlerinde AQP9 ekspresyonunun mevcut olmadığını tespit ettik. **P. Ford ve ark. (2000)** yapmış olduğu çalışmada oositlerin olgunlaşma süreci boyunca su ozmotik geçirgenliğinin azaldığını ve AQP9 ekspresyonunun ortadan kalktığını ileri sürmüşlerdir. Bu veri ile ekspresyonun gerçekleşmediği oositleri ilişkilendirebiliriz. Folikül büyüklüğü ve oositlerdeki olgunlaşma arttıkça PKOS'lu ovaryumların çok katlı primer ve sekonder foliküllerin oositlerinde su ozmotik geçirgenliği azalmış ve AQP9 ekspresyonu ortadan kalkmış olabilir. Yine yapılan bu çalışma ile araştırmacılar streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik sıçanların olgunlaşmamış oositlerinde su ozmotik geçirgenliğinin kontrol oositlerine göre önemli derecede daha düşük olduğunu ileri sürerek bizim de yapmış olduğumuz deneysel PKOS ovaryumlarında elde ettiğimiz verileri desteklemiş olabilirler. Bunun aksine ilginçtir ki PKOS'lu ovaryumların tersiyer foliküllerinin oositinde yok denecek kadar hafif bir AQP9 ekspresyonu gerçekleştiğini de gözlemledik. Bu olayın mekanizmasının doğru bir şekilde aydınlanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu da göz ardı edilemez.

Fan Qui ve ark. (2010) in vitro olarak dihidrotestosteron'un (DHT) PKOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde AQP9 ekspresyonu üzerinde etkilerini inceledikleri bir çalışmada, foliküler sıvıdaki total testosteron (TT), serbest androjen indeksi (SAI), seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG), FSH, LH ve estradiol seviyelerini ölçmüşlerdir. Granüloza hücrelerinde, AQP9 ekspresyonunu belirlemek için realtime PCR ve western blott yöntemleri uygulanmıştır. Araştırmacılar, AQP9 proteininin, insan granüloza hücrelerinin, nükleus, sitoplazma ve hücre zarında lokalize olduğunu bulmuşlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında, PKOS'lu kadınların foliküler sıvılarında, TT, SAI ve LH seviyeleri yüksekken, SHBG seviyesinin en düşük olduğunu bildirmişlerdir. PKOS'lu hastaların granüloza hücrelerindeki AQP9 mRNA seviyesi foliküler sıvıdaki TT, SHBG seviyeleri ve FAI ile ilişkilendirilmişse de bu konunun aydınlatılabilmesi için hala çalışmalara ihtiyaç vardır (33).

Granüloza hücrelerinde, AQP'lerin varlığı başlıca hücrelerarası mekanizma ile antral foliküllere su geçirgenliği ile ilişkili olabilir ve özellikle bu olaya granüloza hücrelerinde AQP7, AQP8 ve AQP9'un aracılık edebileceği ileri sürülmüştür (30). Antral folikül gelişimi, antrum içindeki sıvının giderek artması ve bu artışın folikül çapındaki artışla sonuçlanmasıyla karakterizedir (208). Antral büyüme, gonadotropin stimülasyonu altında hızlı bir şekilde oluşur, su taşınmasının hızlı ve büyük bir şekilde olmasını gerektirir. AQP'lerin 3 izoformu (AQP7, 8, 9) granüloza hücrelerinde bu sıvı artışını ve taşınımını temin edecek şekilde ekspresyon gösterdiği ileri sürülmüştür (100). Diğer taraftan AQP'lerin aşırı-ekspresyonu, granüloza hücrelerinde apoptoz oranının artması ile sonuçlanmıştır (160). Granüloza hücrelerinde AQP9' un ifade edilmesiyle küçük nötr moleküllerin hızlı bir şekilde taşınması folikül gelişiminde önemli olabileceğini düşündürmektedir (100). Az sayıda çalışmada, PKOS ile AQP'ler arasındaki ilişki üzerinde durulmuştur. AQP9 ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlendiği (32, 35) ve granüloza hücrelerinde AQP9 ekspresyonunun folikül gelişimine de dahil olabileceği ileri sürülmüştür (100).

Fan Qui ve ark. (2010) yapmış olduğu bu çalışmada, PKOS'lu hastaların foliküler sıvılarındaki hiperandojenizmin, granüloza hücrelerindeki AQP9'un ekspresyonunu düşürdüğünü, fonksiyonunu bozduğunu ve foliküler gelişimi engelleyebildiğini ve ayrıca PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde AQP9 mRNA

seviyelerinin, kontrol grubuna göre PKOS'lu kadınların granüloza hücrelerinde önemli derecede daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (33). Buna rağmen hormonların AQP9 ekspresyonunu nasıl etkilediği konusyla ilgili bilgiler çelişkilidir. PKOS'lu hastaların düşük sıvı içeriği ile anormal antral foliküllere sahip olmalarının mümkün olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmayla, AQP9 proteininin insan granüloza hücrelerinin hücre membranında, sitoplazmasında ve çekirdeğinde lokalize olduğu ileri sürülmüştür. Granüloza hücre membranında AQP9 ekspresyonu büyük ihtimalle, granüloza hücrelerinin su metabolizmasıyla ilgili olabileceği, sitoplazmada ise steroid hormonların senteziyle ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (33). Suyun hızlı ve masif bir şekilde taşınabilmesi için, gonadotropin uyarımı altında, bir antral folikülün düzenli gelişiminde antral boşluğun büyüklüğünde artışa ihtiyaç vardır, bu süreçte AQP9'un rol oynayabildiği ileri sürülmüştür (30, 100).

Granüloza hücrelerine bakıldığında, kontrol grubuna oranla PKOS grubunun granüloza hücrelerinde, daha yüksek bir AQP9 ekspresyonu gerçekleşmiştir. Aynı zamanda zona pellucida ve antrumda da çok belirgin bir şekilde kontrol grubuna göre daha fazla AQP9 ekspresyonu gerçekleşmiştir. **Fan Qui ve ark. (2010)** yapmış olduğu çalışmada PKOS'un bir belirtisi olan hiperandrojenizmin, granüloza hücrelerinde AQP9 ekspresyonunu ve fonksiyonunu engellediği görüşünü destekleyemeyiz. AQP9 ekspresyonunun androjenler tarafından düzenlenmesi (32, 35) ve PKOS'lu ovaryumun foliküler sıvısındaki hormonların artış göstermesi granüloza hücrelerinde AQP9 ekspresyonunun daha fazla olmasını etkiliyor olabilir. Ayrıca AQP'lerin aşırı ekspresyonu granüloza hücrelerinde apoptoz oranını artırdığını araştırmacılar yapmış oldukları bir çalışmada ileri sürmüşlerdir (160). PKOS'lu ovaryumların granüloza hücrelerinde AQP9 ekspresyonunun yüksek olması bu foliküllerde atrezi oranını artırabileceği fikrini akıllara getirmektedir. Bunun da PKOS'un bir sonucu olan atretik foliküllerin oranının artışına neden olabileceği ileri sürülebilir fakat daha kesin kanıtlara varabilmek için bu konuda daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç olduğu da göz ardı edilemez.

Ovaryum yapılarında, AQP9 ekspresyonunun düzenlenmesinde cinsiyet hormonlarının rolü tam olarak belirlenememiştir. Karaciğerde, AQP9 ekspresyonunun cinsiyet bağımlı farklılıkları Nicchia ve ark. (2001) tarafından rapor edilirken, AQP9

ekspresyonunun androjenlerin kontrolü altında olduğunu ileri sürmüşlerdir (151). Oliviera ve ark. (2005), Picciarelli-Lima ve ark. (2006) gibi araştırmacılar östrojen değişimlerinin kastrasyon sonrası AQP9 ekspresyonu için yeterli olduğunu ileri sürmüşlerdir (209, 210). AQP9'un promotor bölgesi steroid hormon-binding element taşınmasına rağmen (205) AQP9 ekspresyonu androjen etkisiyle ilişkilendirmeyen bazı çalışmalarda mevcuttur. A.Skowronska ve ark. (2015) domuz ovaryumunda AQP9 varlığını gösterse de bu ekspresyonun plazma progesteron ve östrojen seviyeleri ile ilişkili olarak çok değişmediğini rapor etmişlerdir. Buna karşın araştırmacılar, östrojen ve progesteron dengesinin AQP1, 5 ve 9'un düzenlenmesinde önemli olabileceğini ileri sürmüşlerdir (211). Lu XE ve ark. (2007) ise IVF siklusu esnasında, polikistik over sendromlu hastaların granüloza hücrelerinde AQP9'un ekspresyonunu araştırmışlardır. RT-PCR sonuçları ile AQP9 mRNA ekspresyonunu hem kontrol hem de PKOS grubunun antral foliküllerinin granüloza hücrelerinde saptamasına ve büyük (olgun) foliküllerin granüloza hücrelerinde genç (küçük) foliküllerin granüloza hücrelerine göre daha yüksek bir AQP9 ekspresyonu gözlemlenmesine rağmen; bu ekspresyonu foliküler sıvıdaki testosteron, progesteron ve östrojen seviyeleri ile ilişkilendirmemişlerdir (212).

Mevcut çalışmamızda, PKOS ovaryum dokusunun antral foliküllerinin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna oranla daha fazla olan bir AQP9 ekspresyonunu gözlemledik, primer oositlere baktığımızda ise PKOS grubunun antral folikülünün primer oositinde ekspresyon oluşmazken, kontrol grubunun primer oositinde orta şiddette AQP9 ekspresyonunu tespit ettik. Hatta PKOS grubunun çok katlı primer foliküllerin folikül hücrelerinde AQP9 ekspresyonunun kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğunu tespit ettik. Bu foliküllerin primer oositlerine bakıldığında, PKOS grubunun primer oositinde ekspresyon oluşmazken, kontrol grubunun primer oositinde güçlü bir AQP9 ekspresyonunu gözlemledik. Bu foliküllerin oositlerinde AQP9 ekspresyonunun oluşmamasını PKOS'lu ovaryumların foliküler sıvısındaki hiperandrojenizm ile ilişkilendirebiliriz. **Fan Qui ve ark. (2010)** yapmış olduğu çalışmada granüloza hücrelerindeki AQP9 ekspresyonu ve fonksiyonunun foliküler sıvıdaki hiperandrojenizm tarafından baskılandığını ileri sürmüşlerdir (33), oositler üzerinde de böyle bir etki yarattığını söyleyebiliriz. Yine aynı şekilde Speroff L. ve ark. (1973) ile Kousta E. ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada; PKOS olgularında LH

seviyelerinin artması ile oosit üzerine olan olumsuz etkilerinden bahsetmişlerdir (2, 70). Bu veriden yola çıkarak PKOS'lu foliküllerin oositleri, AQP9 ekspresyonu ve artan LH seviyeleri arasında da olumsuz bir ilişki kurabiliriz. PKOS grubunda, kontrol grubuna oranla daha az corpus luteum oluşumu gözlemlerken, aynı zamanda corpus luteum hücrelerinde daha fazla AQP9 ekspresyonu gözlemledik. Verilerimiz AQP9'unda yüksek oranda su taşınımı, antrum oluşumu ve normal folikül gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği fikrini desteklese de kontrol ve PKOS gibi patolojik overlerde AQP9 regülasyonu ile ilgili kesin kanıtlara varmak için önemli sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulduğu aşikardır.

PKOS; hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, insülin rezistansı ve tipII diyabet ile karakterizedir. Son zamanlarda PKOS'lu kadınların, endotelial fonksiyon bozukluğu sergilediği ve ilginç olarak bu fonksiyon bozukluğunun büyüklüğünü hem androjen seviyelerine hemde insülin direncine bağlayan çalışmalar yapılmıştır (213, 214, 215). Rice ve ark. (2005) yapmış olduğu bir çalışma ile anormal glukoz metabolizmasının anovulatr PKOS'lu kadınların granuloza lutein hücreleri tarafından önemli ölçüde bozulmuş insülin ile uyarılan laktat üretimi ile mevcut olduğunu ileri sürmüşlerdir (216). Evanthia Diamanti-Kandarakis ve ark. (2007) yapmış olduğu çalışmada, polikistik ve normal ovaryumlarda gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE) ve reseptörlerinin (RAGE) immunohistokimyasal lokalizasyonlarını belirlemişlerdir (217). AGE proteinlerin ve lipidlerin amino grupları ile indirgeyici şekerlerin enzimatik olmayan reaksiyonundan oluşan reaktif çapraz-bağlayıcı moleküllerdir (218-220). Plazma veya serum AGE'nin seviyeleri hiperglisemi/diyabetli hastalarda yüksek olarak bulunmuştur (219-225). Klinik çalışmalar PKOS'lu kadınlarda androjenler ile serum AGE arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (226). Bu çalışma ile PKOS ovaryumlarının granuloza hücre tabakasında kontrol ovaryuma oranla, daha güçlü bir AGE ve RAGE immünolokalizasyonu olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda da; AQP9, AQP8 ve AQP7'nin PKOS'lu ovaryum dokularının granuloza hücrelerinde kontrol grubuna oranla yüksek ekspresyon gösterdiğini tespit ettik. PKOS'lu ovaryumların antral folikül evresinin granuloza hücrelerinde AQP9, AQP8 ve AQP7'nin fonksiyonunda artış olduğunu ve su taşınımının PKOS ovaryumunun antral folikülünün granuloza hücrelerinde daha fazla olduğunu

söyleyebiliriz. Evanthia Diamanti-Kandarakis ve ark. (2006) çalışmaları ile PKOS da stroma alanlarının artan tipIV kollajen birikimi ile karakterize olduğunu, ve bu olayın genç kadınlarda üreme fonksiyonunda ve ovaryumun hormonal çevresinde düzensizliklere neden olacağını ileri sürmüşlerdir (213).

Sonuç olarak bu çalışmanın; immunohistokimyasal ve immunofloresan gözlemleri hem kontrol hem de PKOS'lu overlerin farklı hücrelerinde AQP7, 8, 9'un varlığını ortaya koymaktadır. Bu proteinlerin PKOS'lu sıçan ovaryumundaki ekspresyonuyla ilgili çok sayıda çalışma bulunmadığından, elde ettiğimiz sonuçları bu açıdan karşılaştırmak mümkün olamamıştır. Buna karşın her 3 proteinin ekspresyonları arasındaki önemli farklılık, bu proteinlerin, hem normal hem de PKOS gibi patolojik koşullarda farklı roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Sıçan ovaryumunda, özellikle de PKOS'lu gruptaki farklı hücrelerde aquaporinlerin daha yüksek ekspresyonu, aquaporinlerin normal antrum ve folikül oluşumunu yöneten yüksek su taşınımına ilave olarak doğrudan veya dolaylı patolojik koşullarda da rol alabileceğini düşündürmektedir. Aquaporinlerin tüm bu rollerinin daha belirgin olarak tanımlanabilmesi için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- ✓ PKOS'un AQP7, AQP8, AQP9 ekspresyonlarını etkilediği
- ✓ PKOS'un AQP9 ve AQP8'in lokalizasyonunu artırdığı, AQP7 ise sağlıklı korteks stroması (bağ dokusu) hariç çok büyük bir farkın oluşmadığı
- ✓ AQP7, AQP8 ve AQP9 ekspresyonlarının birbirinden farklı olduğu
- ✓ AQP7, AQP8 ve AQP9'un ovulasyon ve foliküler büyümede önemli bir rol oynayabileceği
- ✓ Özellikle primordiyal, primer foliküller ve antral foliküllerin AQP7, AQP8 ve AQP9'u bol miktarda sentezlemeleri hem sağlıklı grubunda hemde PKOS grubunda oosit gelişiminde önemli rollerinin olabileceği
- ✓ Genel olarak PKOS grubunda, AQP9'un boyanma şiddetinin daha yoğun olduğu, sağlıklı grubunda ise genel olarak AQP7'nin boyanma şiddetinin yoğun olduğu
- ✓ Her bir grupta primordial foliküllerde lokalizasyon olmasından yola çıkarak AQP7, AQP8 ve AQP9'un gelişimin erken dönemlerinde etkinliğinin oldukça fazla olması
- ✓ Bütün foliküllere bakıldığında (primordiyalden tersiyer foliküle kadar) foliküllerin çeşitli kısımlarında AQP7, AQP8 ve AQP9'un eksprese olmaları foliküler gelişimin ayarlanmasında etkili olabileceği
- ✓ PKOS grubunda karşılaştırıldığında, AQP9'un en fazla korteks bağ dokusu ve kan damarlarında, corpus luteumda, gelişimin erken dönemlerinde ise oositte ve granülosa hücrelerinde eksprese olduğu; AQP8 ise, korteks kan damarında, çeşitli foliküllerin oositlerinde ve granülosa hücrelerinde, corpus luteumda;

AQP7 ise, foliküllerin oositlerinde, kistlerin teka tabakalarında, corpus luteumda; Sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında, AQP9' un en fazla oositlerde eksprese olduğu; AQP8'in epitel dokusunda, primordiyal folikülün oositinde, ve antral folikülün zona pellucidasında eksprese olduğu; AQP7'nin çeşitli foliküllerin oositlerinde, korteksin bağ dokusunda, corpus luteumda eksprese olduğu

- ✓ Sağlıklı ovaryumların epitel tabakasında (dokusunda) AQP8 ekspresyonu gözlemlenirken PKOS'lu ovaryumların epitel tabakasında ekspresyon olmaması
- ✓ Deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, korpus luteumda AQP9 ekspresyonunun PKOS grubunda kontrol grubuna oranla daha şiddetli olması ve sayıca daha az olması PKOS'un CL üzerinde AQP9 ekspresyonunu etkilediği
- ✓ Deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında; korpus luteumda AQP8 ve AQP7'nin ekspresyonunun her iki grupta da hemen hemen eşit şiddetlerde olmasından dolayı PKOS'un CL üzerinde AQP8 ve AQP7 ekspresyonunu etkilemediği
- ✓ Teka tabakaları olarak karşılaştırıldığında kontrol grubuna oranla; PKOS grubunda AQP9 lokalizasyonu daha fazla gözlemlendiği; AQP8'in sağlıklı grubunun teka tabakalarında daha fazla eksprese olduğu; AQP7'nin ise PKOS ovaryumunun teka tabakalarında daha fazla eksprese olduğu
- ✓ Kistik foliküllerin teka tabakalarında özellikle AQP7 ve AQP9'un yoğun ekspresyonlarının gözlemlendiği,
- ✓ AQP7, AQP8 ve AQP9 içeren mekanizmanın kompleks olduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu Ankara 2. Bölge Genel Sekreterliği Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
2. Speroff L, Glass RH, Kase NG;Clinical Gyneacologic Endocrinology and Infertility. Williams &Wilkins, Baltimore. First Edition, 1973; 256-257
- 3.Taylor Ann E. Polycystic Ovary Syndrome Endocrinol Metab Clin North Am 1998; 27: 877-903
4. Acien P, Ouereda F, Matallin P. et al. İnsulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders.Fertil Steril1999;72:32-40.
5. Futterweit W. Polycystic Ovary Syndrome: Clinical Perspectives and Management. Obstet Gynaecol Survey 1999; 18: 403-413.
6. Chang RJ, Katz SE. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am 1999; 28:397-407.
7. Duran HE, Morshedi M, Kruger T and Oehninger S (2002) Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Hum Reprod Update 8.373-384.
8. Loumaye E. The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophinreleasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1990; 5: 357-376.

- 9.** Anthill L, Ying-Oing D, Ruutiainen K et al. Clinical features and circulating gonadotropin, insulin, and androgen interactions in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril* 1991; 55
- 11.** Agre, P., Kozono, D., 2003. Aquaporin water channels; molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett.* 555 (1), 72-78.
- 12.** Zardoya, R., 2005. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell* 97 (6), 397–414.
- 13.** Nozaki, K., Ishii, D., Ishibashi, K., 2008. Intracellular aquaporins: clues for intracellular water transport? *Pflugers Arch.* 456 (4) 701-707
- 14.** Benga, G., Popescu, O., Pop, VI., Muresan, A., Mocsy, I., Brain, A., Wrigglesworth, J.M., 1986a Water permeability in human erythrocytes: identification of membrane proteins involved in water transport. *Eur. J. Cell Biol.* 41 (2), 252-262
- 15.** Benga, G., Popescu, O., Pop, V.I., Holmes, R.P., 1986b. p-(Chloromercuri)benzenesulfonate binding by membrane proteins and the inhibition of water transport in human erythrocytes. *Biochemistry* 25 (7) 1535-1538.
- 16.** Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., Agre, P., 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387.
- 17.** Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, et al. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1788; 1213-1228.

18. Morishita, Y., Sakube, Y., Sasaki, S., Ishibasi, K., 2004. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 276-279.
19. Wang, Y., Tajkhorshid, E., 2010. Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins* 78 (3), 661–670.
20. Yu, J., Yool, A.J., Schulten, K., Tajkhorshid, E., 2006. Mechanism of gating and ion conductivity of a possible tetrameric pore in aquaporin-1. *Structure* 14 (9), 1411–1423.
21. Herrera, M., Garvin, J.L., 2011. Aquaporins as gas channels. *Pflugers Arch.* 462 (4) 623–630.
22. Hazama, A., Kozono, D., Guggino, W.B., Agre, P., Yasui, M., 2002. Ion permeation of AQP6 water channel rotein. Single channel recordings after Hg activation. *J. Biol. Chem.* 277 (32), 29224-29230.
23. Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T.H., Nielsen, S., Guggino, W.B., Agre, P., 1999. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402, (6758), 184–187.
24. Rodgers, R.J., Lavranos, .C., van Wezel, I.L., Irving-Rodgers, H.F., 1999. Development of the ovarian follicular epithelium. *Mol. Cell, Endocrinol.* 151(1–2), 171-179

25. Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Kot, K., Wiltbank, M.C., Ginther, O.J., 2001 Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod* 64 (2), 432-441
26. Fortune, J.E., Hinshelwood, M.M., Roycroft, J., Vincent, S.E., 1991. Superovulation in cattle: effects of purity of FSH preparation on follicular characteristics in vivo. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)* 75 (228), 55-58
27. Clarke, H.G., Hope, S.A., Byers, S., Rodgers, R.J., 2006 Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction* 132 (1), 119-131.
28. Rodgers, H.F., Lavranos, T.C., Vella, C.A., Rodgers, R.J., 1995. Basal lamina and other extracellular matrix produced by bovine granulosa cells in anchorageindependent culture. *Cell Tissue Res.* 282 (3), 463–471.
29. Rodgers, R.J., Irving-Rodgers, H.F., 2010. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol. Reprod.* 82 (6), 1021–1029.
30. McConnell, N.A., Yunus, R.S., Gross, S.A., Bost, K.L., Clemens, M.G., Hughes, F.M.Jr., 2002. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins. *Endocrinology* 143 (8) 2905-2912.
31. West-Farrell, E.R., Xu, M., Gomberg, M.A., Chow, Y.H., Woodruff, T.K., Shea, L.D., 2009. The mouse follicle microenvironment regulates antrum formation and steroid production: alterations in gene expression profiles. *Biol. Reprod.* 80 (3), 432–439.

32. Pastor-Soler, N.M., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., Breton, S., 2002. Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. *Biol. Reprod.* 66, 1716-1722.
33. Qu, F., Wang, F.F., Lu, X.E., Dong, M.Y., Sheng, J.Z., Lv, P.P., Ding, G.L., Shi, B.W., Zhang, D., Huang, H.F., 2010. Altered aquaporin expression in women with polycystic ovary syndrome: hyperandrogenism in follicular fluid inhibits aquaporin-9 in granulosa cells through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Hum. Reprod.* 25 (6), 1441–1450
34. Skowronski, M.T., Kwon, T.H., Nielsen, S., 2009. Immunolocalization of aquaporin 1, 5, and 9 in the female pig reproductive system. *J. Histochem. Cytochem.* 57 (1), 61–67.
35. Wang, J., Tanji, N., Sasaki, T., Kikugawa, T., Song, X., Yokoyama, M., 2008. Androgens upregulate aquaporin 9 expression in the prostate. *Int. J. Urol.* 15 (10), 936–941.
36. Şeftalioğlu A: İnsan Embriyolojisi. Ankara: Tıp&Teknik Yayıncılık; 1998, 41-42, Ankara.
37. Tanyolaç A: Özel Histoloji. Ankara: Yorum Yayıncılık; 1999
38. Odar İ V: Anatomi Ders Kitabı. Salmanlar Ofset; 1984, 329-331
39. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, (1995).

40. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 2nd Ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia, (2001).

41. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.

42. Sadler T W: Medikal Embriyoloji. Başaklar C (Çev), 11.baskıdan çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2011; 246-247-33

43. Motta PM, Makebe S and Notta SA. The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. Human Reproduction Update. 1997. Vol. 3, No. 3 pp. 281–295.

44. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. 2005. Bölüm 1.

45. Carlson BM. Human Embryology And Developmental Biolgy. Fourth Edition. 2009. Chapter 1.

46. Schoenwolf C, Bleyl B, Brauer R, et al. Larsen's Human Embryology. Fourth Edition. 2009. Chapter 1.

47. Anwar A, Moussa MD. In vitro maturation of oocytes. OBGYN.net Advertisement. Jan: 2002

48. Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. Reviews of Reproduction. 1998; 3: 183-195.

- 49.** Eppig JJ, Wigglesworth, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. PNAS. 2002; 99(5): 2890- 2894.
- 50.** Picton HM , Haris SE, Muruvi W et al. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction. 2008. 136 703–715.
- 51.** Knight PG and Glister C. TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006. 132 191–206.
- 52.** Fortune JE. The Early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal Reproduction Science 78. 2003. 135–163.
- 53.** Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG et al. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. J Anim Sci. 2004. 82:E63-74.
- 54.** Stein IF, Leventhal M . Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935; 28:181-91.
- 55.** Hamilton-Fairley D, Kiddy. D, Watson H, Sagle M, Franks S. Low dose gonadotropin therapy for induction of ovulation in 100 women with PCOS. Human Reproduction 1991;6: 1095-1099
- 56.** Azziz R, Woods KS, Reyna K, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:2745-9

- 57.** Yildiz BO, Chang W, Azziz R. Polycystic ovary syndrome and ovulation induction. *Minerva Ginecol* 2003; 55:425-39
- 58.** Imani B, Eijkemans MJC, Velde ER, et al. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2361-2365.
- 59.** Barnes R, Rosenfield R L. The Polycystic Ovary Syndrome: Pathogenesis and Treatment. *Ann intern Med* 1989; 110: 386-399.
- 60.** Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81:19-25.
- 61.** Rotterdam ESHRE/ASRM Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19:41-7.
- 62.** Acien P, Ouereda F, Matallin P. et al. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril* 1999; 72:32-40.
- 63.** Knochenhauer ES Key TJ, Kahsar-Miller M , ET al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3078-3082, 1998.
- 64.** Farah L, Lazenby AJ, Boots LR, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in

women seeking treatment from community electrologist. *J Reprod Med* 44:870-974,1999.

65. Diamanti-Kandarkis E, Kouli CR, Bergiele AT, et al. A survey of the polycystic ovary in the Greek island of Lesbos: Hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4006-4011,1999.

66. Poison DW, Adams J, Wadsworth J, et al. Polycystic ovaries: A common finding in normal women. *Lancet* 1:870-872, 1988.

67. Mason HD, Wills DS, Beard RW, et al. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: Relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1355-1360,1994.

68. Legro RS, Driscoll D, Strauss JF 3rd et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14956-14960,1998.

69. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: Analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* 84:38-43,1999

70. Kousta E, White DM, Cela E, et al. The prevalence of polycystic ovaries in women with infertility. *Hum Reprod* 1999;14: 2720-2723.

71. Marshall JC and Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 295-323.

- 72.** Hague WM, Adams J, Algar V, et al. HLA associations in patients with polycystic ovaries and in patients with congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol*-1990; 32: 407-415.
- 73.** Gharani N, Waterworth DM, Williamson R, et al. 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4174,1996.
- 74.** Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, et al. 17 α -hydroxylase/17,20-lyase dysregulation is not caused by mutations in coding regions of CYP17. *Pediatr Adolesc Gynecol* 11:133-137,1998. 74
- 75.** Escobar-Moreale HF, Sanmilian JL, Smith RR, et al. The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril* 72:629-638,1999.
- 76.** Witchel SF, Aston CE. The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 13:1315-1317,2000.
- 77.** Sanmilian JL, Sancho J, Calvo RM, et al. Role of the pentanucleotide (tttta)(n) polymorphism in the promoter of the CYP17 gene in the pathogenesis of hirsutism. *Fertil Steril* 75:797-802,2001.
- 78.** Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, et al. Evidence of association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin gene locus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:446-449,2001.

- 79.** Korhonen S, Rompanen EL, Hiltunen M, et al. Lack of association between C-850T polymorphism of the gene encoding tumor necrosis factor-alpha and polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinol* 16:271-274,2002.
- 80.** Tong Y, Liao WX, Roy AC, et al. Association of Acd polymorphisim in the FSH beta gene with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 74:1233-1236,2000.
- 81.** Conway GS, Conway E, Walker C, et al. Mutation screening and isoform prevalence of the FSH receptor gene in women with premature ovarian failure , resistant ovary syndrome . *J Clin Endocrinol Metab* 51:97-99,1999.
- 82.** Legro RS, Muhleman DR, Comings DE, et al. A dopamine D3 receptor genotype is associated with hyperandrogenetic chronic anovulation and resistant to ovulation induction with clomiphene citrate in fanele hispanics. *Fertil Steril* 63:779-784,1995.
- 83.** Chang RJ. Ovarian steroid secretion in PCOS. *Seminars Reprod Endocrinology* 1984; 2: 244-246
- 84.** Gilling-Smith C, Willis DS, Beard R\V, Franks S. Hypersecretion of androstenodione by isolated thecal celis from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1158-1165.
- 85.** Novak's Gynecology; Berek J, Adashi EY, Hillard P. Chapter: 25, 1996; 837
- 86.** Hugheston PE. Morphology and morphogenesis of Stein-Leventhal ovary. *Obstet Gynec Survey* 1982; 37: 59-62

- 87.** Gonzales F, Hatala DA, Speroff L. Basal and dynamic responses to gonadotropin releasing hormone agonist treatment in women with polycystic ovaries with high and low dehydroepiandrosterone sulphate levels. *Am J Obstet Gynec* 1991; 165: 535-541
- 88.** Yen SSC. The PCOS. *Clinical Endoc* 1980; 12: 177-207
- 89.** Rebor RW. Gonadotropin secretion in PCOS. *Seminars Reprod Endoc* 1984; 2: 223
- 90.** Waldstreicher J, Santoro NF, Hail JE, Filicori M. Hyperfunction of the hypothalamic pituitary axis in women with PCOS; indirect evidence of partial gonadotropin desensitization. *J Clin Endoc Metab* 1988; 66: 165-169
- 91.** Rosenfield RL, Barnes RB, Cara JF, Lucky AW. Dysregulation of cytochrome P 450 17a as the cause of PCOS. *Fertility & Sterility* 1990; 53: 785-791
- 92.** Speroff L, Glass R, Kase N. Anovulasyon ve PCOS. in: Erk A (ed.). *Klinik Jinekoloji Endokrinoloji ve İnfertilite*. istanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 1996; 457-482
- 93.** White DM, Polson DW, Kiddy D, et ali. İnduction of ovulation with low-dose gonadotropins in polycystic ovary syndrome: an analysis of 109 pregnancies in 225 women. *Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3821-3824
- 94.** Sagle MA, Hamilton-Fairley D, Kiddy DS, Franks S. A Comparative, randomized study of low-dose human menopausal gonadotropin and folliclestimulating hormone in woman with polycystic ovarian syndrome. *Fertil steril* 1991; 55: 56-60.

- 95.** Chandar N and Viselli S (2010). Cell and Molecular Biology (Lippincott's illustrated reviews series). International edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 96.** Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, et al. (2002). Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 509-515
- 97.** Lehninger AL, Nelson DL and Cox MM (2005). Principles of Biochemistry. 4th edn. W.H. Freeman & Co, New York.
- 98.** Muray R, Granner D K, Mayes P A, Rodwell W. Harper Biyokimya. 25th ed. İstanbul: Nobel Kitabevi, 2004; 15-17.
- 99.** Karp G (2002). Cell and Molecular Biology. 3rd edn. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 100.** Huang HF, He RH, Sun CC, Zhang Y, et al. (2006). Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum. Reprod. Update* 12: 785-795.
- 101.** Thoroddsen A, Dahm-Kahler P, Lind AK, Weijdegard B, et al. (2011). The water permeability channels aquaporins 1-4 are differentially expressed in granulosa and theca cells of the preovulatory follicle during precise stages of human ovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: 1021-1028.
- 102.** Smith BL, Agre P. Erythrocyte Mr 28000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem.* 266: 6407-6415.

- 103.** Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family water channels proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 265: F461
- 104.** Takata K, Matsuzaki K, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of cell membrane. *Prog Histochem Cytochem.* 39:1-83
- 105.** Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, et al. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol (Lond).* 542: 3-16
- 106.** Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, et al. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev.* 82: 205-244
- 107.** Matsuzaki T, Tajika Y, Suzuki T, et al. Immunolocalization of water channel, aquaporin-5 (AQP5) in the rat digestive system. *Arch Histol Cytol.* 66: 307-315
- 108.** Nejsum LN, Kwon T-H, Jensen UB, et al. Functional requirement of aquaporin5 (AQP5) in plasma membranes of sweat glands. *Prot Natl Acad Sci USA.* 99:511-516
- 109.** Song Y, Sonowane N, Verkman AS. Localization of aquaporin5 in sweat glands and functional analysis using knockout mice. *J Physiol.* 541: 561-568
- 110.** Nelson D L, Cox M M. *Principles of Biochemistry.* 4th ed. New York: W H Freeman Company, 2005: 406-409

- 111.** Liu H, Wintour E M. Aquaporins in development, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005: 3:18
- 112.** Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW and Kasai M (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol. Reprod.* 68: 87-94.
- 113.** Mazur P (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949.
- 114.** Murai-Hatano M, Kuwagata T, Sakurai J, Nonami H, et al. (2008). Effect of low root temperature on hydraulic conductivity of rice plants and the possible role of aquaporins. *Plant Cell Physiol.* 49: 1294-1305.
- 115.** Harries WE, Akhavan D, Miercke LJ, Khademi S, et al. (2004). The channel architecture of aquaporin 0 at a 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14045-14050.
- 116.** Liu J, Xu J, Gu S, Nicholson BJ, et al. (2011). Aquaporin 0 enhances gap junction coupling via its cell adhesion function and interaction with connexin 50. *J. Cell Sci.* 124: 198-206.
- 117.** Preston GM, Jung JS, Guggino WB and Agre P (1993). The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* 268: 17-20.
- 118.** Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, et al. (1999). Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 647-663.

- 119.** Deen PM, Verdijk MA, Knoers NV, Wieringa B, et al. (1994). Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264: 92-95.
- 120.** Cheidde L and Schor N (1999). Review: water transporters. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 45: 71-78.
- 121.** Domeniconi RF, Orsi AM, Justulin LA Jr, Beu CC, et al. (2007). Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry. *Anat. Rec.* 290: 1519-1525.
- 122.** Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, et al. (1994). Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 6269-6273.
- 123.** King LS, Choi M, Fernandez PC, Cartron JP, et al. (2001). Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med.* 345: 175-179.
- 124.** Hamann S, Zeuthen T, la Cour M, Nagelhus EA, et al. (1998). Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am. J. Physiol.* 274: C1332-C1345.
- 125.** Yamaji Y, Valdez DM Jr, Seki S, Yazawa K, et al. (2006). Cryoprotectant permeability of aquaporin-3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Cryobiology* 53: 258-267.

- 126.** Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, et al. (2002). Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 72: 262-265.
- 127.** Verkman AS (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118: 3225-3232.
- 128.** Tsubota K, Hirai S, King LS, Agre P, et al. (2001). Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 357: 688-689.
- 129.** Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, et al. (2001). Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients. *Lab. Invest.* 81: 143-148.
- 130.** Ishibashi K (2009). New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. *Handb. Exp. Pharmacol.* 251-262.
- 131.** Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, et al. (2002). Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim. Biophys. Acta* 1576: 335-340.
- 132.** Ishii M, Ohta K, Katano T, Urano K, et al. (2011). Dual functional characteristic of human aquaporin 10 for solute transport. *Cell. Physiol. Biochem.* 27: 749-756.
- 133.** Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, et al. (2006). Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem.* 7: 14.

- 134.** Buffoli B (2010). Aquaporin biology and nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 8: 97-104.
- 135.** Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, et al. (2008). A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu. Rev. Physiol.* 70: 301-327.
- 136.** Ishibashi, K., Kuwahara, M., Gu, Y., Kageyama, Y., Tohsaka, A., Suzuki, F., Marmo, F. And Sasaki, S. (1997) Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. *J. Biol. Chem.* **272**, 20782–20786
- 137.** Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. and Agre, P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 425–458
- 138.** Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. and Rosen, B.P. (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6053–6058
- 139.** King LS, Kozono D and Agre P 2004 From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature rev. Mol. Cell Bioi.* 5687-698
- 140.** Hara-Chikuma M, Sohara E, Rai T, Ikawa M, Sasaki S, Uchida Sand Verkman AS 2005 Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J. Bioi. Chern.* 280 15493-15496.
- 141.** Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J and Fruhbeck G (2006). Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett.* 580: 4771-4776.

- 142.** Sohara E, Rai T, Sasaki S and Uchida S 2006 Physiological roles of AQP7 in the kidney: lessons from AQP7 knockout mice. *Biochem Biophys Acta*. 1758 1106-1110.
- 143.** Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, Matsubara K, Okubo K 1997 Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem Biophys Res Commun*. 241 53-58.
- 144.** Bienert GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Moller 1M, Schjoerring JK and Jahn TP 2007 Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*. 282 1183-92.
- 145.** Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Racz GZ, Varga G, Steward MC and Nielsen S 2003 Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*. 52 1008-16.
- 146.** Elkjaer ML, Nejsum LN, Gresz V, Kwon TH, Jensen UB, Frekjaer J and Nielsen S 2001 Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 281 1047-1057.
- 147.** Ishibashi K, Hara S and Kondo S 2009 Aquaporin water channels in mammals. *Clin. Exp. Nephrol*. 13 107-17.
- 148.** Liu K, Nagase H, Huang CG, Calamita G, et al. (2006). Purification and functional characterization of aquaporin-8. *Biol. Cell* 98: 153-161.
- 149.** Tait MJ, Saadoun S, Bell BA and Papadopoulos MC (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci*. 31: 37-43.

- 150.** Aharon Rand Bar-Shavit Z 2006 Involvement of aquaporin 9 in osteoclasts differentiation.!' Biol. Chem. 28119305-19309.
- 151.** Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M 2001 Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J Histochem Cytochem.* 49 1547-1556.
- 152.** Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K,H, Furuyama N, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Nagaretani H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T and Matsuzawa Y 2002 Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes.* 51 2915-2921
- 153.** Carbrey JM, Gorelick-Fwldman DA, Kozono D, Praetorius J, Nielsen S, Agre P 2003 Aquaglyceroporin AQP9; solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc Natl Acad Sci.* 1002945-2950.
- 154.** Rojek AM, Praetorius J, Frekiaer J, Nielsen N and Fenton RA 2008 A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol.* 70301-327.
- 155.** Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr and Huet-Hudson YM (2003). Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biol. Reprod.* 69: 1481-1487.
- 156.** Lindsay LA and Murphy CR (2007). Aquaporins are upregulated in glandular epithelium at the time of implantation in the rat. *J. Mol. Histol.* 38: 87-95.,
- 157.** Richard C, Gao J, Brown N and Reese J (2003). Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. *Endocrinology* 144: 1533-1541.

- 158.** Kenny DA, Humpherson PG, Leese HJ, Morris DG, et al. (2002). Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. *Biol. Reprod.* 66: 1797-1804.
- 159.** Branes MC, Morales B, Rios M and Villalon MJ (2005). Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: C1048-C1057.
- 160.** Jablonski, E.M., Webb, A.N., McConnell, N.A., Riley, M.C., Hughes, F.M.Jr., 2004. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286 (4), C975–C985.
- 161.** Yang, J.H., Shi, Y.F., Cheng, Q., Deng, L., 2006. Expression and localization of aquaporin-5 in the epithelial ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 100 (2), 294–299
- 162.** Edashige, K., Sakamoto, M., Kasai, M., 2000. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology* 40 (2), 171–175.
- 163.** Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., Ko, M.S., 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* 6 (1), 117–131.
- 164.** Jo, J.W., Jee, B.C., Suh, C.S., Kim, S.H., Choi, Y.M., Kim, J.G., Moon, S.Y., 2011. Effect of maturation on the expression of aquaporin 3 in mouse oocyte. *Zygote* 19 (1), 9–14.

- 165.** Ford, P., Merot, J., Jawerbaum, A., Gimeno, M.A., Capurro, C., Parisi, M., 2000. Water permeability in rat oocytes at different maturity stages: aquaporin-9 expression. *J. Membr. Biol.* 176 (2), 151–158.
- 166.** Hub, J.S., de Groot, B.L., 2008. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (4), 1198–1203.
- 167.** Seki, S., Mazur, P., 2010. The temperature and type of intracellular ice formation in preimplantation mouse embryos as a function of the developmental stage. *Biol. Reprod.* 82 (6), 1198–1205.
- 168.** Gulay Bulut, Zehra Kurdoglu, Yeliz Bozdemir Dönmez, Mertihan Kurdoglu, Remzi Erten Effects of jnk inhibitor on inflammation and fibrosis in the ovary tissue of a rat model of polycystic ovary syndrome *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(8):8774-8785
- 169.** İlay Gozukara, Recep Dokuyucu, Tümay Özgür, Oguzhan Özcan, Neslihan Pınar, Raziye Keskin Kurt, Suna Kabil Kucur & Kenan Dolapçı Histopathologic and metabolic effect of ursodeoxycholic acid treatment on PCOS rat model *Gynecological Endocrinology* 2016 Taylor & Francis.
- 170.** Nielsen J, Kwon TH, Christensen BM, Frøkiaer J and Nielsen S: Dysregulation of renal aquaporins and epithelial sodium channel in lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 227-244, 2008.

- 171.** Kwon TH, Nielsen J, Møller HB, Fenton RA, Nielsen S and Frøkiær J: Aquaporins in the kidney. In: Aquaporins. Handbook of Experimental Pharmacology. Beitz E (ed). Vol 190, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp95-132, 2009
- 172.** Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, Rueckert L, Agre P and LaRusso NF: Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 276: G280-G286, 1999
- 173.** Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H and Takata K: Aquaporins in the digestive system. *Med Electron Microsc* 37: 71-80, 2004.
- 174.** Laforenza U, Gastaldi G, Grazioli M, Cova E, Tritto S, Faelli A, Calamita G and Ventura U: Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract. *Biol Cell* 97: 605-613, 2005.
- 175.** Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K and Yamamoto T: Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 814-819, 2001
- 176.** Laforenza U: Water channel proteins in the gastrointestinal tract. *Mol Aspects Med* 33: 642-650, 2012.
- 177.** Ishibashi, K., Yamauchi, K., Kageyama, Y., Saito-Ohara, F., Ikeuchi, T., Marumo, F. And Sasaki, S. (1998) Molecular characterization of human aquaporin-7 gene and its chromosomal mapping. *Biochim. Biophys. Acta* **1399**, 62–66

- 178.** Nejsum, L.N., Elkjaer, M., Hager, H., Frokiaer, J., Kwon, T.H. and Nielsen, S. (2000) Localization of aquaporin-7 in rat and Mouse kidney using RT-PCR, immunoblotting, and immunocytochemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 164–170
- 179.** Tsujikawa, T., Itoh, A., Fukunaga, T., Satoh, J., Yasuoka, T. And Fujiyama, Y. (2003) Alteration of aquaporin mRNA expression after small bowel resection in the rat residual ileum and colon. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 803–808
- 180.** Wakayama, Y., Inoue, M., Kojima, H., Jimi, T., Shibuya, S., Hara, H. and Oniki, H. (2004) Expression and localization of aquaporin 7 in normal skeletal myofiber. *Cell Tissue Res.* **316**, 123–129
- 181.** Umberto Laforenza, Giulia Gastaldi, Monica Grazioli, Emanuela Cova, Simona Tritto, Alide Faelli†, Giuseppe Calamita‡ and Ulderico Ventura Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract *Biol. Cell* (2005) **97**, 605–613
- 182.** Ya-Jing Tan, Xue-Ying Zhang, Guo-Lian Ding, Rong Li, Li Wang, Li Jin, Xian-Hua Lin, Ling Gao, Jian-Zhong Sheng & He-Feng Huang Aquaporin7 plays a crucial role in tolerance to hyperosmotic stress and in the survival of oocytes during cryopreservation 04 December 2015
- 183.** Zhang, D. Tan, Y. J., Qu, F., Sheng, J. Z. & Huang, H. F. Functions of water channels in male and female reproductive systems. *Mol Aspects Med* **33**, 676–690 (2012).
- 184.** Hub, J. S. & de Groot, B. L. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1198–1203 (2008).

- 185.** Xiong, Y. *et al.* Expression of aquaporins in human embryos and potential role of AQP3 and AQP7 in preimplantation Mouse embryo development. *Cellular Physiol Biochem* **31**, 649–658 (2013).
- 186.** Edashige, K., Sakamoto, M. & Kasai, M. Expression of mRNAs of the aquaporin family in mouse oocytes and embryos. *Cryobiology* **40**, 171–175 (2000).
- 187.** Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. & Ko, M. S. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* **6**, 117–131 (2004).
- 188.** Tan, Y. J. *et al.* Cryoprotectants up-regulate expression of mouse oocyte AQP7, which facilitates water diffusion during cryopreservation. *Fertil Steril* **99**, 1428–1435 (2013).
- 189.** Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N 1988 Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J Reprod Fertil* 82:813–825
- 190.** Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P 1992 Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385–387
- 191.** Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL 2001 Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 142:2468–2480

- 192.** Maravei DV, Trbovich AM, Perez GI, Tilly KI, Talanian RV, Banach D, Wong WW, Tilly JL 1997 Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. *Cell Death Differ* 4:707–712
- 193.** Ishibashi K Kuwahara M Kageyama Y Tohsaka A Marumo F and Sasaki S 1997 Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 714-718
- 194.** Koyama Y Yamamoto T Kondo D Funaki H Yaoita E Kawasaki K Sato N Hatakeyama K and Kihara I 1997 Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver *J Biol Chem* 272 30329-30333
- 195.** Ma T Yang B and Verkman AS 1997 Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon placenta liver and heart *Biochem Biophys Res Commun* 240:324-328
- 196.** Koyoma N Ishibashi K Kuwahara M Inase N Ichioka M Sasaki S and Marumo F 1998 Cloning and functional expression of human aquaporin8 Cdna and analysis of its gene *Genomics* **54**: 169-172
- 197.** Calamita G Spalluto C Mazzone A Rocchi M and Svelto M 1999 Cloning structural organization and chromosomal localization of the Mouse aquaporin8 water channel gene (AQP8) *Cytogenet Cell Genet* **85**: 237-241
- 198.** Viggiano L Rocchi M Svelto M and Calamita G 1999 Assignment of the aquaporin-8 water channel gene (AQP8) to human chromosome 16p12 *Cytogenet Cell Genet* 84: 208-210

- 199.** Koyama Y Yamamoto T Tani T Nihei K Kondo D Funaki H Yaoita E Kawasaki K Sato N Hatakeyama K and Kihara I 1999 Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract *Am J Physiol* **276**: C621-C627
- 200.** Elkjaer M-L Nejsum LN Jensen UB Kwon T-H Frokier J and Nielsen S Localization of aquaporin-8 (AQP8) mRNA and protein in rat kidney and other organs as determined by RT-PCR immunoblotting and immunocytochemistry Abstract MIP 2000 Goteborg Sweden
- 201.** Weiheng Su, Ying Qiao, Fei Yi, Xingang Guan, Di Zhang, Shuzhi Zhang, Feng Hao, Yinghong Xiao, Hongguo Zhang, Lei Guo, Longfei Yang, Xuechao Feng and Tonghui Ma Increased Female Fertility in Aquaporin 8-Deficient Mice *IUBMB Life*, 62(11): 852–857, November 2010
- 202.** Buccione, R., Schroeder, A. C. and Eppig, J. J. (1990) Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43, 543–547.
- 203.** Binelli, M. and Murphy, B. D. (2010) Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1–12.
- 204.** Ishibashi K Kuwahara M Gu Y Tanaka Y Marumo F and Sasaki S 1998 Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the periferal leukocytes permeable to water and urea but not to glycerol *Biochem Biophys Res Commun* 244: 268-274
- 205.** Tsukaguchi H Shayakul C Berger UV Mackenzie B Devidas S Guggino WB Van Hoek AN and Hediger MA 1998 Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel *J Biol Chem* 273: 24737-24743

- 206.** Ko SB Uchida S Naruse S Kuwahara M Ishibashi K Marumo F Hayakawa T and Sasaki S 1999 Cloning and functional expression of rAQP9L a new member of aquaporin family from rat liver *Biochem Mol Biol Int* **47**: 309-318
- 207.** Tsukaguchi H Weremowicz S Morton CC and Hediger MA 1999 Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9 *Am J Physiol* **277**: F685-F696
- 208.** Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991;124:43–101.
- 209.** OLIVEIRA CA, CARNES K, FRANCA LR, HERMO L, HESS RA: Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by estrogen in the efferent ductile epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell* 97: 385-395, 2005.
- 210.** PICCIARELLI-LIMA P, OLIVEIRA AG, REIS AM, KALAPOTHAKIS E, MAHECHA GA, HESS RA, OLIVEIRA CA: Effects of 3-beta-diol, an androgen metabolite with intrinsic estrogen-like effects, in modulating the aquaporin-9 expression in the rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 51, 2006.
- 211.** A. SKOWRONSKA , P. MLOTKOWSKA , M. ELISZEWSKI , S. NIELSEN , M. T. SKOWRONSKI Expression of Aquaporin 1, 5 and 9 in the Ovarian Follicles of Cycling and Early Pregnant Pigs *Physiol. Res.* 64: 237-245, 2015
- 212.** Lu XE, Qian YL, Huang HF. Expression of aquaporin 9 in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome in IVF-cycles *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2007 Sep;36(5):449-53. Chinese.

- 213.** Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Alexandraki K, et al (2006) Short-term effect of orlistat on dietary glycotoxins in healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 55:494–500
- 214.** Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Protogerou A, Piperi C, Papamichael C, Aessopos A, Lekakis J, Mavrikakis M (2005a) Metformin administration improves endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 152:749–756
- 215.** Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ, Jacobs HS (1992) Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 37:119–125
- 216.** Rice S, Christoforidis N, Gadd C, et al (2005) Impaired insulindependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 20:373–381
- 217.** Evanthia Diamanti-Kandarakis · Christina Piperi · Efstratios Patsouris · Penelope Korkolopoulou · Dimitrios Panidis · Leszek Pawelczyk · Athanasios G. Papavassiliou · Antoni J. Duleba Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries *Histochem Cell Biol* (2007) 127:581–589
- 218.** Schmidt AM, Yan S-D, Wautier JL, Stern DM (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84:489–497

- 219.** Schmidt AM, Yan S-D, Yan S-F, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498:99–111
- 220.** Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia* 44:129–146
- 221.** Cerami C, Founds H, Nicholl I, et al (1997) Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13915–13920
- 222.** Rodriguez-Garcia J, Requena JR, Rodriguez-Segade S (1998) Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 44:250–255
- 223.** Nicholl ID, Bucala R (1998) Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:1025–1033
- 224.** Ligier S, Fortin PR, Newkirk MM (1998) A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycated IgG: IgM anti-IgG-AGE. *Br J Rheumatol* 37:1307–1314
- 225.** Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP (1999) The role of oxidative stress and NF-kB activation in late diabetic complications. *Biofactors* 10:157–167
- 226.** Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Creatsas G, Kalofoutis A (2005b) Increased levels of advanced glycation end products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 62:37–43

8. EKLER



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : 65202830/24
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

27.03.2014

Sayın
Prof.Dr.Celal KALOĞLU
Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 27.03.2014 tarihinde Prof.Dr.Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Prof.Dr.Celal KALOĞLU'nun yürütcülüğünü yapmış olduğu 18.03.2014 tarih ve 27 sayılı "Normal ve Deneysel Polikistik Over Sendromu (PCOS) oluşturulan siçan Ovaryumlarında AQP7 ,AQP8 ,AQP9'un immüno lokalizasyonu " isimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Katılmadı
Prof.Dr.Eray BULUT
Üye

Prof.Dr.Mustafa TURAN
Üye

Doç.Dr.Ihsan HUBBEZOĞLU
Üye

Doç.Dr.Züleyha AKIN POLAT
Üye

Doç.Dr.Bülent ŞARAC
Üye

Doç.Dr.Mehmet TUZCU
Üye

Katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye

Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili

Katılmadı
Semiha EKİNCİ
Sivil Üye

Katılmadı
Türhan DUYMUS
Sivil Üye

Haki Kara
Prof.Dr.Haki KARA
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Sevinç ŞİMŞEK
Doğum Yeri ve Tarihi MUT.18.02.1987
Medeni Hali Bekar
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji
Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi biyolog_sevinc@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Sivas Koleji(Özel Bilgi Anadolu Lisesi), 2005
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
2011

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencisi, 2016