



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİOMA VARLIĞINDA DÜŞÜK OVER REZERVİNİN PTEN-AKT-
FOXO3 GEN EKSPRESYONU İLE OLAN İLİŞKİSİ**

Dr. Hamza Furkan Şen

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2020



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİOMA VARLIĞINDA DÜŞÜK OVER REZERVİNİN PTEN-AKT-
FOXO3 GEN EKSPRESYONU İLE OLAN İLİŞKİSİ**

Dr. Hamza Furkan ŞEN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Gürkan UNCU

BURSA – 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
GİRİŞ.....	1
Endometriozis.....	1
Endometriozis Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	1
Endometriozis Etiyolojisi.....	1
Hormonal Etki.....	3
İmmünoloji.....	3
Risk Faktörleri.....	4
Semptom Tanı ve Tedavi.....	7
Endometriozis ve İnfertilite İlişkisi.....	10
Ovaryum Folikülogenez ve Over Rezervi.....	12
Over Anatomisi ve Histolojisi.....	12
Folikülogenez.....	15
Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması ve Over Rezervi....	18
GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	65
Kısaltmalar ve Simgeler.....	65
Şekil Listesi.....	67
Tablo Listesi.....	68
Grafik Listesi.....	69
TEŞEKKÜR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Giriş ve Amaç: Endometriozis, patogenezi tam olarak aydınlatılamamış reproduktif dönemdeki kadınların %5-15'ini etkileyen kronik bir hastalıktır. Endometriozis gelişiminde PTEN geninde meydana gelen mutasyonların ve gen ekspresyonundaki azalmanın etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı endometriozis ve endometrioma etyolojisinde PTEN, AKT ve FOXO3 sinyal yolağında bulunan gen ekspresyonlarının rolü ve düşük over rezervinde bu gen ekspresyonlarının etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Bu prospektif araştırma Mayıs 2019/Nisan 2020 tarihlerinde, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Bilim Dalı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte yürütüldü. Çalışmaya, ovaryan patoloji ön tanısı ile polikliniğe başvuran 18-40 yaş aralığında, endometrioma ve diğer benign over kistleri saptanarak cerrahi uygulanan, endometrioma tanılı 20 hasta (Endo Grup), diğer kist grubuna dahil edilen 20 hasta (Non-Endo Grup) olmak üzere 40 hasta dahil edildi. Cerrahi sırasında kist duvarlarından toplanan doku örneklerinde PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyonları real-time PCR analizi ile değerlendirildi. Her iki grubun gen ekspresyonları karşılaştırıldı.

Bulgular: Endo grup ve Non-Endo grup arasında yaş açısından anlamlı fark saptanmadı. (Sırasıyla, 31.1 (5,8) – 31.2 (6,0) $p=0,937$) Endo grubunun AFC ortalaması Non-Endo grubunun ortalamasından düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p=0,028$) PTEN ekspresyon seviyeleri arasında Endo grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 1,64 katlık düşüş söz konusu idi. AKT ekspresyon seviyesinde Endo grubunda 5,99 kat artış mevcuttu bu artış istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p=0,046$) DOR saptanan hastaların oranları, Endo ve Non-Endo grup için sırasıyla %50 ve %40'tı. DOR olanların PTEN ekspresyonu, NOR olanlardan 4,92 kat azdı bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ($p=0,004$) Serum AMH ile PTEN ekspresyonu arasında pozitif yönlü anlamlı korelasyon saptandı. ($p=0,002$)

Sonuç: Çalışmamızda Endo grubunda AKT ekspresyonu daha yüksek saptanmıştır. Aynı zamanda DOR olanlarda PTEN ekspresyonu daha düşük saptanmıştır. Endometriozis etyolojisinde ve endometriomaya bağlı düşük over rezervinde PTEN, AKT ve FOXO3 sinyal yolağındaki değişimlerin etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: PTEN, AKT, FOXO3, AMH, Endometrioma, Endometriozis, Düşük Over Rezervi

SUMMARY

THE ROLE OF PTEN AKT FOXO3 SIGNAL PATHWAY GENE EXPRESSION IN ENDOMETRIOSIS RELATED DIMINISHED OVARIAN RESERVE

Introduction: Endometriosis a disease which pathogenesis is not totally clarified, affects %5-15 of reproductive age women. Mutations and decreased expression of PTEN gene may be related with pathogenesis of endometriosis. Aim of this research is examining the role of gene expression and influence on the diminished ovarian reserve of PTEN/AKT/FOXO3 signal pathway.

Material and methods: This prospective study was conducted at Bursa Uludag University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, and Department of Histology and Embryology, between May 2019–April 2020. Patients prediagnosed with ovarian pathology and between 18-40 years age were included. We decided recruit 40 patients; 20 patients diagnosed as endometrioma (Endo Group) and 20 patients diagnosed with other benign ovarian cysts (Non-Endo Group) surgically were separated as two groups. Tissue samples were obtained from the cyst wall during the surgery, and gene expression of PTEN, AKT and FOXO3 of the samples was interpreted with real-time PCR analyses. Then the gene expression rate of the two groups was compared.

Results: The mean (SD) age was 31.1 (5,8) and 31.2 (6,0) years in endometrioma and other cyst groups. ($p:0,937$) The mean antral follicle count of the Endo Group was lower than the Non-Endo Group significantly. ($p:0,028$) In the Endo Group, the PTEN expression ratio was lower 1,64-fold than the Non-Endo Group, but it did not reach statistical significance. However, AKT gene expression there was 5,99-fold increase in the endometrioma group. ($p=0,046$) Diminished ovarian reserve ratio within the Endo Group and Non-Endo Group were %50 and %40, respectively. When patients were divided by diminished versus normal ovarian reserve, the PTEN expression ratio of patients with

diminished ovarian reserve was 4,92-fold lower than the normal ovarian reserve group. ($p=0.004$) PTEN expression showed a positive correlation with serum AMH levels. ($p=0.002$)

Conclusion: In our study, AKT expression was higher in the endometrioma group. Meanwhile, PTEN expression was lower at DOR patients. These changes at PTEN, AKT and FOXO3 signal pathway may be related to the diminished ovarian reserve etiology and the endometriosis-related reduction of ovarian reserve.

Key words: PTEN, AKT, FOXO3, AMH, Endometrioma, Endometriosis, Diminished Ovarian Reserve

GİRİŞ

1.1 Endometriozis

1.1.1 Endometriozis Tanımı ve Epidemiyolojisi

Endometriozis (EM), endometrial gland ve stromal dokuların uterin kavite dışında yerleşmesi olarak tanımlanan, reproduktif dönemdeki kadınların yaklaşık %5-15' ini etkileyen kronik bir hastalıktır (1,2). İnfertil kadınlarda bu oran %40 ila %50'leri bulabilmektedir (3).

EM ilk olarak 1860'da Karl Freiherr Von Rokitansky tarafından "*endometrial dokunun uterin kavite dışında herhangi bir yerde ektopik olarak bulunması*" şeklinde tanımlanmıştır (4). Üreme çağındaki kadınları etnik ve sosyo-ekonomik farklılık gözetmeksizin etkileyebilmekte ve eşlik ettiği semptomlar ile günlük yaşamda olumsuzluklara yol açabilmektedir. Endometriozisi olan bir kadın asemptomatik olabileceği gibi sıklıkla kronik pelvik ağrı ve infertilite ile karşımıza çıkabilmektedir (5).

EM en sık pelvik periton olmak üzere over ve rektovajinal septumda görüldüğü gibi peritoneal boşlukta, sezaryen kesi skarında ve hatta vücudun herhangi bir yerinde de gösterilmiştir. Kesin tanı patolojik incelemede endometriotik odakların izlenmesi ile konur (6). İnfertilite nedeni ile başvuran endometriozisli kadınların yaklaşık %40'ı ovaryen endometrioma ile tanı almaktadır (7).

1.1.2 Endometriozis Etiyolojisi

Endometriozis etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte patogenezde rol oynayan çeşitli faktörler mevcuttur.

1.1.2.1 Sampson Retrograd Akım Teorisi

Endometriozis patogeneğinde ilk olarak 1927 yılında John Sampson tarafından ortaya konulan bu teoriye göre, menstrual siklus ile dökülen endometriumun bir kısmının tuba uterinalar aracılığı ile peritoneal boşlukta birikmesi ve pelvik peritona invaze olarak uterin kavite dışında canlılıklarını sürdürmesi söz konusudur. Sampson yaptığı bu çalışma ile ilk defa endometriozis terimini kullanmış ve en çok desteklenen hipotezi ortaya koymuştur (8).

1.1.2.2 Lenfatik ve Vasküler Yayılım

Endometriozisin, akciğer ve perikart gibi ekstrapelvik uzak organlarda saptanması ve pelvik endometriozisi olan hastaların pelvik lenf nodlarında yaklaşık %20-30 oranında endometriozisin bulunması, retrograd akım dışında yayılımın lenfovasküler olabileceğini desteklemektedir (9). Uterin cerrahi öyküsü olanlarda ya da sezaryen skarlarında görülen endometriozisin de hematojen yol ile gelişebileceğini ileri sürmektedir.

1.1.2.3 Çöломik Metaplazi

Bu teoride, periton ve plevrayı kaplayan çöломik epitelden kaynaklı mezotelyal hücrelerin metaplaziye uğraması sonucu endometriozis geliştiği öne sürülmektedir. Bazı hastalarda endometriozisin, mezotelyal hücrelerin spontan ya da indüklenerek metaplaziye uğraması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (10). Yüksek doz östrojen tedavisi alan erkeklerde, menarş öncesi dönemde bulunan kızlarda, postmenopozal kadınlarda nadirde olsa endometriozis görülmesi bu teoriyi destekler niteliktedir (11,12). Ayrıca kollajen ağ içerisinde östrodiol ile kültüre edilmiş over yüzey epitelinde ve stromal hücrelerde, endometrial bez ve stromanın oluştuğu gözlenmiştir (13).

1.1.2.4 İndüksiyon Teorisi

Çöломik metaplazinin devamı niteliğinde olup, eksojen maruz kalınan toksik ajanlar ya da endojen sitokinlerin endometrial metaplaziye neden olabileceği düşünülmektedir (14).

1.1.2.5 Embriyonik Kalıntı Teorisi

Özel bir uyarana ile embriyonik hücre kalıntılarının endometrial dokulara dönüşebileceği ve menarş öncesi kızlarda görülen endometriozis için anlamlı olabileceği bu teori ile desteklenmektedir (15).

1.1.3 Hormonal Etki

Endometrial dokuların uterin kavite dışında canlılıklarını sürdürebilmeleri için birçok faktörün hücre proliferasyonunu ve doku gelişimini uyarması gerekmektedir. Yapılan araştırmalarda endometriotik dokularda artmış östrojen üretimi saptanmıştır. Endometrioziste steroidogenic acute regulatory proteini (StAR) ve aromataz enzimi, östrojen üretimi için önemli rol oynamaktadır (16,17). Endometriotik dokularda artmış aromataz aktivitesi hiperöstrojenik ortamı oluşturmaktadır. Normal endometriumda aromataz bulunmadığından endometriumun östrojen sentezlemesi söz konusu değildir (18). Endometriotik dokularda, adrenal ve over kaynaklı androstenedion aromataz enzimi ile östrona (E1) daha sonra 17 beta hidroksi-steroid dehidrogenaz (17 β HSD) enzimi ile östradiole (E2) dönüşmektedir. Artan östrodiol ve sitokinler siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini aktive ederek prostoglandin E2 (PgE2) üretimini tetiklemektedir. Endometriotik stromal hücrelerde aromataz enziminin potent aktivatörü olan PgE2, pozitif feed back ile östrojen biyosentezini sürekli hale getirir (19,20).

1.1.4 İmmünoloji

Canlı endometriotik dokularda azalmış immün aktivitenin saptanması nedeni ile endometrioziste immün sistem değişikliklerinin rolü olabileceği, düşünülmektedir (21). Azalmış kök hücre sitotoksitesinin, otoplog endometrial hücrelere karşı endometriozisle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (22). Endometriozisli olgularda periton sıvısında makrofajlar, T lenfositler, natural killer (NK) hücrelerinin konsantrasyonlarında artış mevcuttur ancak fonksiyonel olarak biriken endometrial dokular üzerindeki etkilerinin zayıf olduğu öne sürülmektedir (23).

1.1.5 Risk Faktörleri

Erken menarş, geç menopoz gibi östrojen maruziyetini arttıran durumlar endometriozis gelişiminde önemli rol oynamakta (24) ayrıca nulliparite, menoraji, genital trakt obstrüksiyonu, uzun boy, düşük vücut kitle indeksi, alkol ve kafein tüketimi gibi özellikler hastalığın ortaya çıkışına zemin hazırlamaktadır (25,26).

1.1.5.1 Çevresel Faktörler

Günlük yaşamda birçok çevresel toksine maruz kalınmakta ve bu durum olası hastalığa zemin hazırlamaktadır. Çevresel toksinlerin çoğu, uzun yarı ömüre sahip ve canlı organizmada birikebilen faktörlerdir. Bu toksinlerin olası hasarları net olarak bilinmemekle birlikte, dioksin endometriozis etiolojisinde varlığı ispatlanmış bir toksindir (27). Ayrıca annelerinde dietilstilbesterol (DES) maruziyeti olan ve bebeklik çağında soya içerikli mamalar ile beslenen kadınlarda da endometriozis sıklığında artış olduğu gözlenmiştir (28).

1.1.5.2 Anatomik Bozukluklar

İmperfore hymen ve müllerian anomaliler gibi alt genital traktta obstrüksiyona neden olabilecek anatomik bozukluklar retrograd akım ile endometriozis gelişimine ortam hazırlamaktadır (29,30).

1.1.5.3 Genetik Faktörler

Endometriozisli hastaların birinci derece yakınlarında endometriozis öyküsü varlığı ve ikiz eşlerde prevelansın yüksek olması endometriozis risk artışı için genetik faktörlerin varlığını akla getirmektedir (31). Endometriozisi olan ikiz eşler arasında genetik etkilerin değerlendirildiği bir çalışmada, monozigotik ikizlerde %2, dizigotik ikizlerde %0,6'lık bir konkordans olduğu tespit edilmiştir (32). Son yıllarda mitokondrial hasarlanma üzerine yapılan çalışmalarda, mitokondriyal matrix membran protein-1 (MMP-1) mutasyonlarının endometriozisli kadınlarda anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ve etiolojide mitokondriyal bozuklukların da rol alabileceği gösterilmiştir (33). Heterozigosite kaybı ve mikrosatellit instabilite, çoğu tümör tipinde genom boyunca bulunan yaygın genetik değişikliklerdir (34).

PTEN geni, 10q23.3 kromozomunda yer alan bir tümör baskılayıcı gendir (35). 10q23.3'te sık sık heterozigosite kaybı ve PTEN mutasyonları, malignite de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda bulunmuştur. PTEN geninin endometrium kanseri, cowden sendromu, meme, prostat ve over kanseri gibi malignitelerde ekspresyonu araştırılmış ve birçok tümör tipinde PTEN'de daha yüksek delesyon veya mutasyonlar olduğu teyit edilmiştir (36-39). Ayrıca, PTEN'in inaktive oluşu, tümörlerin ortaya çıkması ve ilerlemesi ile ilişkili tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybına yol açabilir.

Endometriozis patogeneğinde PTEN, fosfatidilinositol-3-kinazın (PI3K) ikinci bir habercisi olan fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatı (PIP3) fosforile eden çift fosfataz aktivitesine sahip bir proteini kodlar (40,41). PTEN, PI3K aktivitesini antagonize eder ve Serin/Treonin Kinaz AKT'ı negatif olarak düzenler (42). Fosforile AKT, apoptozu baskılayan ve hücre sağkalımını destekleyen pro-apoptotik faktör Bad gibi proteinlerin aktivitesini düzenler (43).

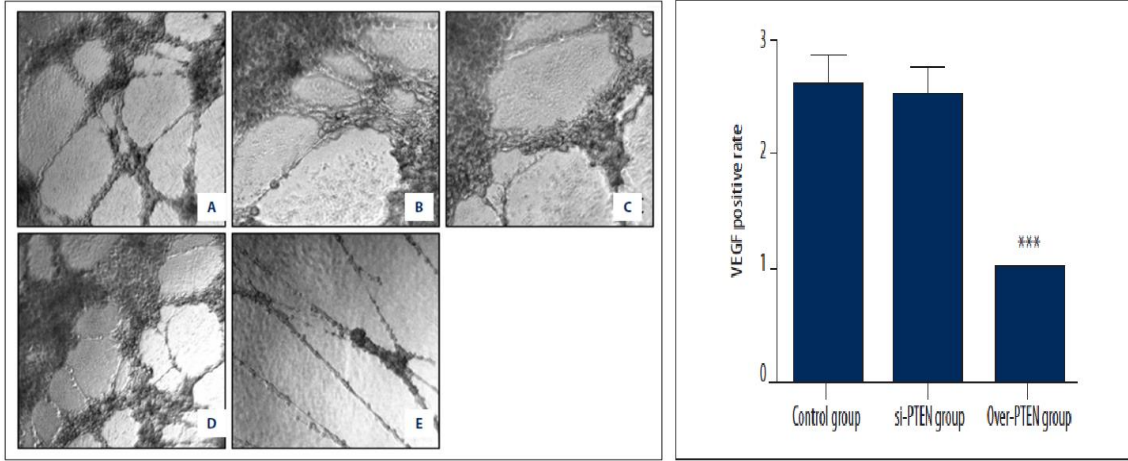
PTEN, endometrial tabakanın düzenlenmesinde rol oynayan başlıca referans genlerden biridir (44). PTEN geni üzerindeki fonksiyonel kayıp PI3K/AKT sinyal yolağının sonradan aktive olması ve herhangi bir tümöral oluşumun gelişmesi adına oldukça önemlidir (45). Bazı endometriozis vakalarında da azalmış PTEN ekspresyonu bildirilmiştir (46-48). Ektopik endometrium dokusunda yapılan PCR analizinde, PTEN de yüksek oranda (%84,4) heterozigosite kaybı tespit edilmiş olup, PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağının endometriozis patogeneğinde rol oynayabileceği vurgulanmıştır (49).

PTEN ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) arasındaki doğrudan veya dolaylı etkileşimler birçok tümör, anjiogenez, tümör invazyonu ve metastazın oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynar (50). PTEN'in anjiogenezde önemli bir rol oynayabildiğini ve yeni kan damarlarının oluşumunu baskılayarak PI3K/AKT sinyal yolundan VEGF ekspresyonunu düzenleyebileceği gösterilmiştir (51,52). Ektopik endometrial doku üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük PTEN ekspresyonuna sahip dokularda VEGF ekspresyonunun nispeten yüksek olduğu, düşük PTEN seviyeleri saptanan hücrelerde vaskülojenik aktivitenin arttığı ve PTEN'i fazla eksprese eden hücrelere kıyasla önemli ölçüde

artmış anjiogenez sergilediği saptanmıştır. Aynı zamanda PTEN'in artmış ekspresyonunun, ekspresyonu düşük dokulara kıyasla apoptozu önemli ölçüde arttırdığı ve hücre döngüsünü inhibe ettiği gösterilmiştir (53) (Şekil-1).

PTEN, PI3K sinyal yolağının doğal bir inhibitörüdür ve PTEN ekspresyonunun azalmasının bu yolak üzerinden endometrial hücrelerin migrasyonunu stimule edilerek endometriozis gelişimini kolaylaştırdığı düşünülmektedir.

Şekil-1: Anjiogenezin PTEN ekspresyon seviyesi ile değişimi: A'dan E'ye anjiogenezin inhibisyonu, E: over eksprese PTEN grup, azalmış anjiogenez (53).



1.1.6 Endometriozis Semptom Tanı ve Tedavi

1.1.6.1 Endometriozis Semptomları

Endometriozis karşımıza klinik bulgu ve semptom vermeden çıkabileceği gibi sıklıkla hastalar pelvik ağrı ve infertilite nedeni ile başvurmaktadır. Hastalığın evresine de bağlı olarak semptomlar değişkenlik göstermektedir (Tablo-1).

Ağrı, en sık karşılaşılan semptomlardan biri olup, periton sıvısında bulunan çeşitli inflamatuvar sitokinler aracılığı ile ortaya çıktığı düşünülmektedir (25). Endometriozis derinliği ve nöronal tutulum olup olmaması da ağrının şiddetini belirlemede önemli unsurlardır ve bu unsurlara bağlı olarak ağrı şikayeti kronik bir hal alabilir (54). Ağrı ile ilişkili olarak dismenore endometrioziste sıklıkla karşılaşılan bir semptomdur ve primer dismenoreye kıyasla daha fazla ortaya çıkmaktadır. Endometriozisin derinliğine ve lokalizasyonuna bağlı olarak cinsel birliktelik sırasında koital disfonksiyon ve ciddi disparoni yakınması görülebilmektedir (55). İnfertilite ile de yakından ilişkili olup infertil hastaların %20-40'ında endometriozis tespit edilmektedir.

Tablo-1: Endometriozis Semptomları

AĞRI	VAJİNAL KANAMA	BAĞIRSAK/MESANE	DİĞER
Dismenore	Menoraji	İrritabl Bağırsak Semptomları	Depresyon
Disparoni	Polimenore	GİS Kanaması	Miyalji
Diskezi	Metroraji	Dizüri	Atralji
Kronik Pelvik Ağrı		Tenezm	Hemoptizi

1.1.6.2 Endometriozis Tanı Yöntemleri

Endometriozis yüksek oranda pelviste sınırlı olduğundan sadece inspeksiyon ile tanı koymak oldukça güçtür. İnsizyon skar hattı gibi gözle

görülebilecek yerlerde endometriotik odaklar izlenebilir (56). Spekulum ile bakıda, nadir de olsa, endometriotik odaklar izlenebilir. Bimanuel muayene endometriozis tanısı koymak ve hastalıktan şüphelenmek açısından oldukça değerlidir. Bimanuel muayenede fikse, retrovert uterus, özellikle uterus posteriorunda hassasiyet ve skarlaşma endometriozisin klasik pelvik bulgularıdır. Uterosakral ligaman ve cul-de-sac'da nodularite palpe edilebilir. Overler büyük, hassas ve pelvik yan duvara fikse olabilir (57). Bimanuel muayene esnasında ele gelen dolgunluk douglasta baskı yapan endometriomaların bulgusu olabilir.

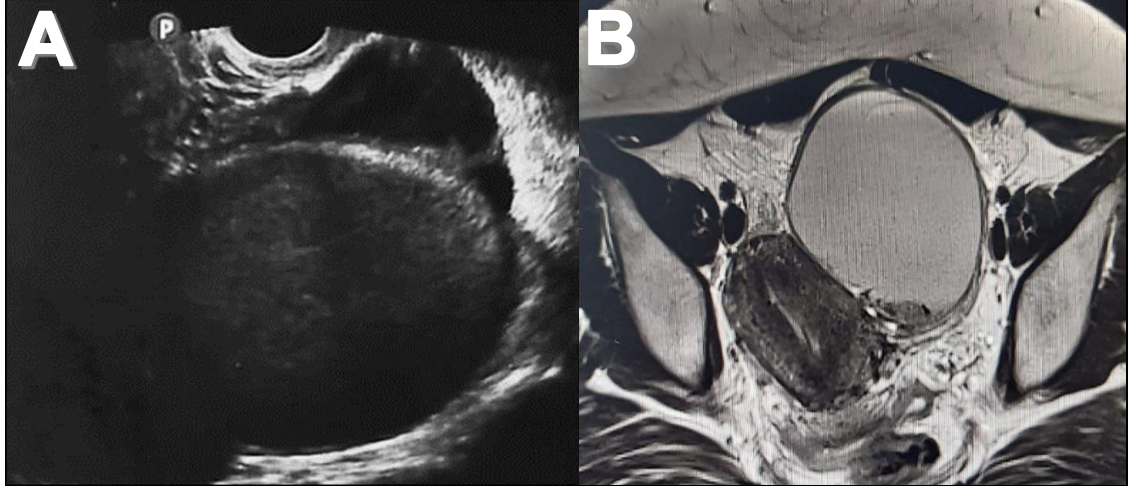
Endometriozis tanısı koyabilmek için birçok laboratuvar testi çalışılmaktadır. İdeal testin kolay çalışılabilen, düşük maliyetli ve hastalığa spesifik olması gerekliliği göz önüne alındığında endometriozis teşhisi için tüm kriterleri karşılayabilen laboratuvar parametresi henüz saptanamamıştır.

Kanser antijen 125 (CA125), yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir. 1980'lerde ilk tanımlanmasından beri epitelyal over kanserleri için tümör markeri (belirteci) olarak kullanılmaktadır. CA125 aynı zamanda endometriozis hastalarında serumda yüksek saptanabilmektedir ancak, bu antijen malignite, enfeksiyon gibi birçok nedenle serumda artan seviyelerde saptanabileceği için endometriozise spesifik bir parametre değildir. Günümüzde Human Epididimal Antijen (HE-4), endometriozisli hastalarda düşük seviyelerde saptanırken, ovaryan malignitesi olan hastalarda yüksek saptanmaktadır. Malignite ekartasyonu için tanı koymada oldukça yardımcıdır (58,59).

Endometriozisten şüphelenildiğinde uygulanılacak ilk görüntüleme işlemi ultrasonografik (USG) değerlendirmedir. Ovaryan patolojilerde 2 cm ve üzeri endometriomaların saptanmasında transvaginal ultrasonografi (Tv-USG) oldukça sensitif ve spesifiktir. Rektal semptomları olan veya virgo hastalarda transrektal görüntüleme tercih edilebilmektedir. Endometriomalar, homojen, düşük ekojeniteli, iyi sınırlı, tipik olarak "buzlu cam" görünümüne sahip kistik lezyonlar olarak karşımıza çıkar. USG ile değerlendirme deneyim gerektirdiği için uygulayan kişiye bağımlı bir yöntemdir. Derin infiltratif endometriozis ve renal sistem tutulumu düşünülen olgularda manyetik rezonans görüntüleme (MRG),

oldukça yarar sağlar (Şekil-2). Ekstrapelvik yerleşimli endometriotik lezyonlarda bilgisayarlı tomografi (BT) fikir verebilir (60,61).

Şekil-2: TV-USG ve MRG'de endometrioma görüntüleri: (A; Tv-USG, B; MRG)



Endometriozis tanısı koyarken fizik ve pelvik muayene, laboratuvar parametreleri, görüntüleme yöntemleri çok değerli bilgiler verir ancak kesin tanı cerrahi uygulanarak dokuların patolojik olarak değerlendirilmesi ile konulur. Cerrahi teknikler arasında en pratik yöntem ise laparoskopidir. Direkt bakıda endometriotik odakların ve endometrioma varlığını değerlendirmesinde oldukça etkilidir ve minimal invaziv cerrahi girişim imkanı sağlamaktadır. Laparoskopi sırasında endometrioma tanısı %97 sensitivite ve %95 spesifiteye sahiptir (62).

1.1.6.3 Endometriozis Tedavisi

Endometrioziste uygulanan tedavi modaliteleri, hastanın yaşı, fertilitte isteği, semptomları ve şiddeti, önceden geçirilmiş operasyonları doğrultusunda seçilmelidir.

Fertilitte isteği bulunmayan hastalarda gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) agonistleri kullanılabilir. GnRH agonistleri, follikül stimule edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) seviyelerini baskılayarak ilerleyen

dönemlerde hipofiz bezinde desensitizasyona sekonder hipogonadotropik etki göstererek tedavide başarılı olmaktadır (63). Tedavinin bırakılması ile çoğunlukla semptomlar nüks etmektedir.

Fertilite isteği bulunan hastalarda ise, hastanın yaşı ve over rezervi doğrultusunda tedavi yöntemine karar verilmelidir. Genç yaşta ve over rezervi iyi olan hastalarda tedavi seçeneği olarak operasyon düşünülebilmektedir (64).

1.1.7 Endometriozis ve İnfertilite İlişkisi

Endometriozis ve infertilite arasındaki güçlü ilişkide ileri endometriozisli hastalarda bozulan pelvik anatomi ve tubal tıkanıklık durumu açıklayabilmektedir ancak hafif endometriozisi bulunan hastalarda net bir mekanizma belirtilememiştir.

Endometriozisle ilişkili infertilite 3 başlık altında açıklanabilmektedir;

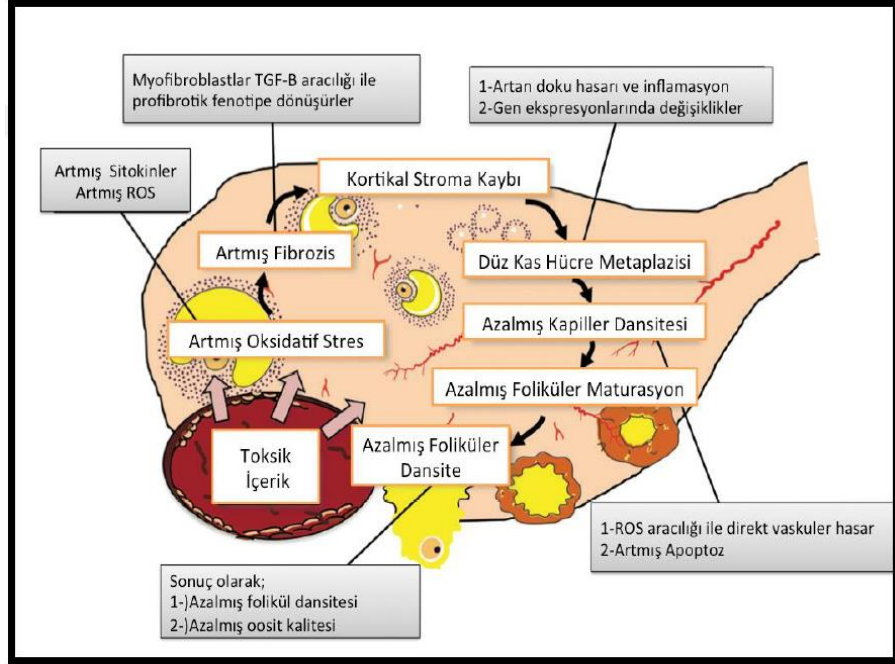
- Ovulasyon sonrası fimbrial uçtan ovum yakalanmasını ve transportunu inhibe eden ya da engelleyen bozulmuş anatomi,
- Azalmış endometrial reseptivite ve bozulmuş implantasyon,
- Oosit gelişimi ya da erken embriyogenezin engellenmesi,

Endometriyal biyopsi örneklerinde sağlıklı kadınlara göre endometriozisli hastalarda gen ekspresyonlarında farklılıklar gözlenmiş olup bu farklılıkların embriyo implantasyonunda olumsuz etkilere sebep olabileceği düşünülmektedir. Özellikle integrin ve selektin ekspresyonlarında azalma gösterilmiştir (65,66).

Endometrioma varlığında kist içeriğinde biriken sıvıda saptanan toksik dozdaki demir molekülleri, sitokinler ve pro-inflamatuar maddeler, çevre dokularda inflamasyona sebep olarak fibrozise ve buna bağlı olarak ovaryan korteks üzerinde follikül dansite kaybına neden olmaktadır. Gelişen fibrozis sonucu hem oosit kalitesi hem de oosit sayısı olumsuz yönde etkilenmektedir (67). Bununla birlikte endometriozisi olan infertil hastalardan elde edilen embriyolar ile tubal faktör nedeniyle infertilite gelişen hastaların embriyoları

karşılaştırıldığında endometriozisli kadınların embriyolarında gelişimin daha yavaş olduğu gözlenmiştir (68) (Şekil-3).

Şekil-3: Ovaryan Endometriozisin Folliküler Etkileri:



(ROS: Reaktif Oksijen Molekülleri, TGF-B: Transforming Growth Factor-B)

Endometrioma varlığının over rezervi üzerindeki etkisi söz konusudur. Önceki çalışmaların çoğu, endometriomaların cerrahi olarak çıkarılmasının over rezervi üzerine etkisine odaklanmıştır. Daha önce endometrioması olan kadınların, daha düşük antral folikül sayısı (AFC) ve serum anti-müllerian hormon (AMH) düzeylerinin gösterdiği gibi sağlıklı kadınlara göre daha düşük over rezervine sahip olduğunu bildirilmiştir (69). Ancak, over rezervindeki bu düşüşün ilerleyici olup olmadığı bilinmemektedir.

1.2 Ovaryum, Folikulogenez ve Over Rezervi

1.2.1 Over Anatomisi ve Histolojisi

Fertilizasyonu sağlayan oositi üreten overler, uterusun lateralinde fossa ovarica (Krause çukuru) denilen çukura yerleşmiş yaklaşık 3-3,5 cm uzunluğunda, 2-2,5 cm genişliğinde, 1-1,5 cm kalınlığında ve 3 ila 5 gr ağırlığında birer organdır (70).

Overler dışta korteks, içte medulla ve rete ovarii (hilus) olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır. Ligamentum latum uteri'nin arka yaprağı, overin mesovariuma bağlanma yeri olan ve içerisinde damar, sinir ve lenfatiklerin bulunduğu bölgeye hilum ovarii denir. Steroidogeneze aktif hale gelme potansiyeli taşıyan hilus hücrelerini içermektedir. Hilar hücreler medullada bulunan epitelioid hücre grubudur. Testisdeki Leydig hücreleri ile benzer hücresel organizasyona sahip olan bu hücreler androjen salgırlarlar (71). Overlerin alt ucu fundus uterinin yan köşesine ligamentum ovarii proprium ile bağlanır. Ligamentum suspensorium ovarii adı verilen periton katlantısı ise overleri pelvisin yan duvarlarına sabitler. Tuba uterina'dan overlere doğru uzanan saçaksı uzantılara fimbria ovarica adı verilir ve karın boşluğuna atılan oositin tuba uterinaya taşınmasını sağlar.

Overler intraperitoneal birer organ olsa da tunika seroza katmanını içermez ve prepubertal döneme kadar dış yüzeyi çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Daha sonra peritoneal dokunun mezotel katmanını farklılaşarak tek katlı kübik epitele dönüşür ve germinal epitel ismini alır.

Germinal epitelin elektron mikroskopik görüntülerinde, hücrelerin periton boşluğuna bakan üst yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus izlenir. Hücre sitoplazmasında, çekirdek çevresinde yerleşik organeller iyi gelişmiştir. Hücrelerin yan yüzlerinde ise desmozom tipi bağlantı birimleri gözlenir. Germinal epitelin altında, ovaryuma beyazımsı rengini veren ve sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea katmanını bulunur. Damardan yoksun olan ve ovaryum'un yüzeyine zıt olarak yerleşmiş kollajen fibriller içeren bu katman yaşla birlikte kalınlaşır.

Ovaryum histolojik olarak, medulla ve korteks denen, aralarında kesin bir sınır bulunmayan iki farklı bölümden oluşur. Ovaryumun en iç kısmı olan medulla fibroelastik gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medulla stroması, hilustan ovaryuma giren kan ve lenf damarları, sinir demetleri ile intersitisyel hücreler, bağ dokusu hücreleri ve hilar hücrelerinden oluşur. Medullayı çevreleyen ve ovaryumun esas işlevsel katmanı olan korteks ise gelişimin değişik evrelerindeki ovaryum foliküllerini, dejenere olmuş atretik folikülleri, korpus luteum ve korpus albicans yapılarını ve bunlar arasında dağılan sıkı bağ dokusu yapısındaki stromayı içerir. Korteks stromasında ise kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağları ile iç içe stroma hücreleri bulunur (72).

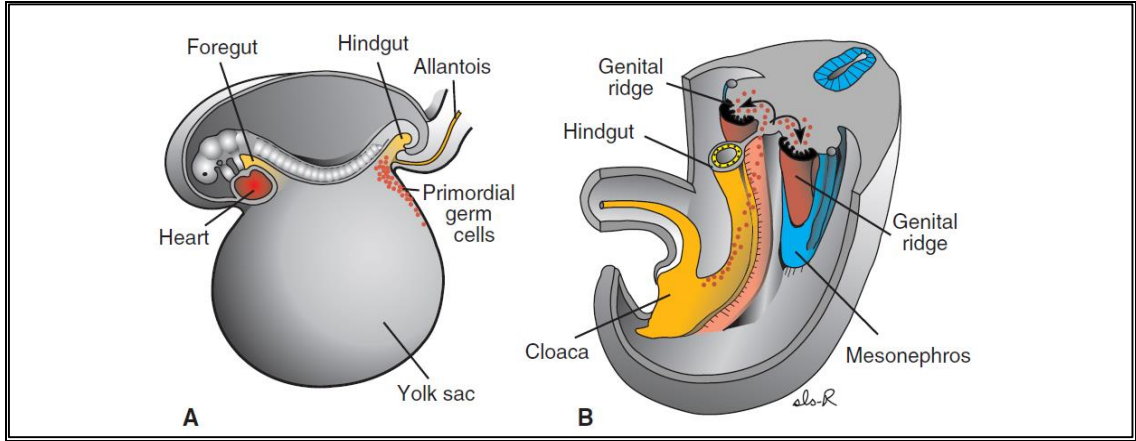
Ovaryumda, histolojik gelişim evresinde göre 3 tip folikül bulunur;

1. Primordiyal Folikül
2. Büyüyen Folikül
 - a. Primer Folikül
 - Unilaminar (tek katmanlı ya da erken) primer foliküller
 - Multilaminar (çok katmanlı ya da geç) primer foliküller
 - b. Sekonder (Antral) Folikül
3. Olgun (Graaf) Folikül

Overlerin gelişimi fetal yaşamda, farklanmamış gonad evresi, farklanma evresi, oogonal çoğalma ve oosit oluşumu evresi (follikül oluşma evresi) olmak üzere dört evrede incelenir.

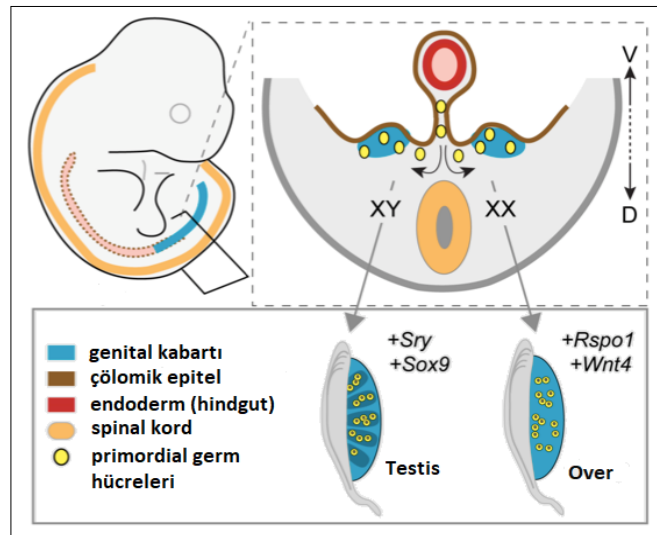
Fetal yaşamın 3-4. haftasında, yolk kesesinin dorsal duvarında endodermal hücreler arasında, primordiyal germ hücreleri (PGH) ortaya çıkar ve bu hücreler ileride oositleri oluştururlar. Fertilizasyondan yaklaşık 6 hafta sonra arka bağırsağın (Hindgut) dorsal mezenteri boyunca göç ederek gonadal kabaarıntıya ulaşırlar (73). PGH'lerinin göçü sırasında cinsiyet tayini de başlamaktadır. Bu aşamada germ hücreleri bipotansiyellidir. Overlerin oluşması ve devamlılığının sağlanması için PGH'ler gereklidir, bulunmaması halinde over dokusu dejenere olur (74) (Şekil-4).

Şekil-4: Primordiyal germ hücrelerinin göçü:



Gestasyonel 6. hafta itibariyle farklılaşmamış evre tamamlanır. Eğer XY kromozomuna sahip bir fetüs var ise gonadal farklılaşma Y kromozomu üzerinde bulunan SRY gen aktivitesi ile testis yönünde olur ve gestasyonel 6.-9. haftalar arasında testiküler farklılaşma gerçekleşir. Ancak XX kromozomuna sahip dişi bir fetüs söz konusu ise SRY gen yokluğunda WNT4 ve RSPO1 gen aktivitesi ile ovaryan farklılaşma gerçekleşir (Şekil-5).

Şekil-5: Embriyonik genital kabartıdan over ve testislerin farklılanması (75):



1.2.2 Folikülogenezis

Pubertenin başlaması ile birlikte hipotalamus-hipofiz-over aksının düzenli çalışması normal bir menstrual sıklusa ve sekonder oositin Graaf folikülünden atılımı ile sonuçlanan ovulasyona neden olur.

Hipotalamus, pulsatil şekilde hipofize salınan GnRh aracılığı ile gonadotropinlerin salgılanmasını düzenlemede kilit rol oynar. Puberte öncesinde, gonadotropinlerce uyarılmayan overler inaktif durumdadır. Bu dönemde oositler, tek kat granüloza hücreleriyle kuşatılmış olan *primordiyal folliküller* halinde bulunurlar (73).

Folikül gelişiminin en erken aşaması olup ve olgun ovaryumda tunika albugineanın hemen altında yer alırlar ve stromadan çevrelerini saran bazal lamina ile ayrılırlar. Folikül içindeki oositin çapı ise, bu aşamada yaklaşık 25µmdir. Embriyonik dönemde primordiyal foliküller içindeki primer oositler, birinci mayoz bölünmeye başlarlar ancak, bölünmenin metafaz ile devam etmesi gerekirken, primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde kalırlar.

Puberte sonrasında ise, hipofiz bezi ön lobundan salınan FSH'nin etkisiyle her menstrual sıklusta 5-15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül büyümeye başlar. Primordiyal folikül büyüyen folikül evresine geldiğinde oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada bazı değişiklikler meydana gelir. Büyümenin ilk belirtisi, 100-150 µm çapına ulaşan primer oositi çevreleyen tek katlı, yassı folikül epitel hücrelerinin kübikleşmesidir. Bu aşamadaki folikül *tek katmanlı (erken/unilaminar) primer folikül* olarak isimlendirilir (76,77).

İlerleyen aşamalarda folikül hücreleri hızlı mitoz bölünmelerle çoğalırlar ve *çok katmanlı (geç/multilaminar) primer folikül* oluşur. Oosit olgunlaşırken primer oosit zona pellusida (ZP) adı verilen oositi çevredeki folikül hücrelerinden ayıran bir katman oluşturur (78). Bu katman glikozamnioglikan ve glikoproteinden zengindir ve granüloza hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder (78).

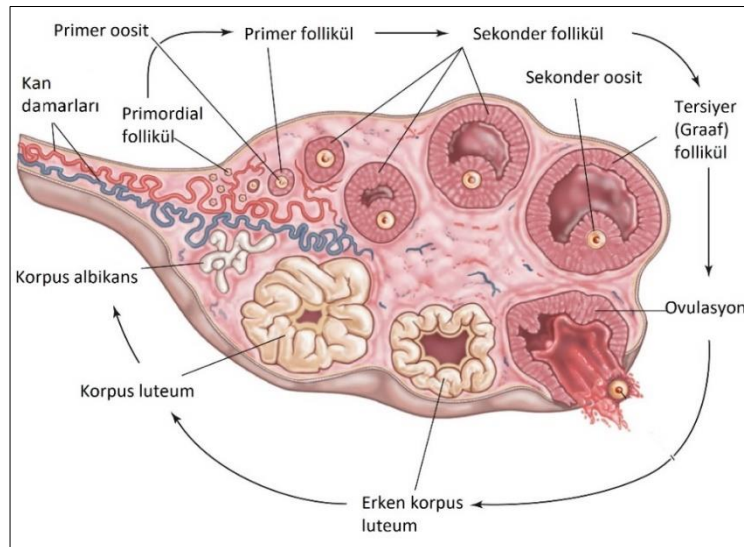
Zona pellusida; dimerik yapıda olan ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere 3 farklı glikoproteinden oluşmakta ve ZP3 spermiyum için, bir reseptör olarak görev yapmaktadır. Bu sırada folikülü çevreleyen stroma hücreleri *teka folikülü* ismi

verilen bağ dokudan bir katman oluşturacak şekilde düzenlenir. Bu katman daha sonra *teka interna* ve *teka eksterna* olarak ikiye ayrılır (79).

Teka interna granüloza hücrelerine komşu iç katmandır. Kübik şekilli salgı hücrelerinden meydana gelir ve bu hücreler farklılaşarak steroid üreten hücrelere dönüşürler. LH reseptörü taşıyan bu hücreler, LH uyarımına yanıt olarak östrojen öncülü androjenleri ve ovulasyon öncesi evrede progesteron, az miktarda follikül sıvısı ile az miktarda intrafolliküler FSH salgırlar. Teka eksterna ise korteks stromasına komşu dış katman olup fibröz bağ dokusu yapındadır ve içerdiği kollajen lifler ile kapsül işlevi görmektedir.

Multilaminar primer folikülün granüloza hücreleri, hipofiz bezi ön lobu bazofilik hücrelerinden salgılanan FSH'nin etkisiyle çoğalmaya devam eder. Granüloza hücre katmanı yaklaşık 6-12 kata ulaştığında, hücreler arası içi sıvı dolu boşluklar belirir. *Folikül sıvısı* (likör foliküli) ismi verilen sıvı ile dolu bu küçük boşluklar birleşerek *antrum* denilen daha büyük bir boşluğu oluştururlar. Folikül sıvısı, kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşur ve hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir. Bu aşamadaki foliküle *sekonder* ya da *antral folikül* denir (78) (Şekil-6).

Şekil-6: Ovarian foliküllerin gelişim döngüsü (78):



Oosit ile bağlantılı oldukları kutupta, oosit çevresinde biriken granüloza hücreleri kümülüs ooforus adı verilen bir tepelik oluşturur. Oositi çevreleyen ve ovulasyonda oosit ile birlikte atılan kümülüs ooforus hücrelerine korona radiata denir. Belirli bir büyüklüğe ulaşan ve antrum oluşan foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerini sürdürebilmek için gonadotropinlere gereksinim duyarlar. Folikülogenezin son aşamasında graaf (preovulatuvar) folikülü primer oositi içinde bulundurur. Over korteks kalınlığı boyunca uzanır, dışı doğru çıkıntı yapar ve yaklaşık 10 mm ya da daha fazla çapa ulaşmaktadır. Antrumun genişlemesiyle incelen granüloza hücre katmanında, hücreler arasındaki boşluklar genişler, oosit ve kümülüs hücreleri ile geriye kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer. Teka katmanı daha belirgin hale gelir. Sitoplazmasında lipid damlacıkları biriken teka interna hücreleri tipik steroid sentezleyen hücre özelliği kazanır (80).

Menstrüel siklusun ortasında gerçekleşen LH miktarındaki ani artış ile birlikte folikül yırtılır, oosit, etrafındaki bir miktar granüloza hücresi ile birlikte dışarı atılır ve ovulasyon gerçekleşmiş olur. Fimbriyalar tarafından tubalara alınan primer oosit 1. Mayoz bölünmeye kaldığı yerden devam eder ve herbiri 23 çift (2n DNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşur. Oluşan bu hücrelerden, sitoplazmanın büyük bölümünü içeren ve hacim olarak büyük olan, *sekonder oosit*, çok az sitoplazma içeren ve sekonder oosite kıyasla oldukça küçük olan diğer hücre ise mayoz bölünmeyi sürdüremeyen *1. kutup cismi* olarak isimlendirilir (81). Birinci mayoz bölünme sonucunda oluşan sekonder oosit hemen ikinci mayoz bölünmeye başlar. Ancak, bu bölünme metafaz evresinde duraklar. İkinci mayoz bölünme, yalnızca sekonder oosit bir spermium ile döllenirse tamamlanır. 2. kutup cismi de bu sırada oluşur. Fertilizasyon gerçekleşmez ise, sekonder oosit ovulasyondan 24 saat sonra dejenere olur. LH'in etkisiyle, sitoplazmalarında sarımsı bir pigment biriken bu hücreler luteal hücrelere dönüşürler. Oluşan bu yapıya *korpus luteum* denir. Korpus luteum'un granüloza hücreleri progesteron ve östrojen salgılamak, Teka interna hücreleri, androstenedion ve testosteron gibi androjenleri salgılar. Gebelik gerçekleştiğinde korpus luteum gebelik korpus luteumu ismini alır ve 4. Aya kadar progesteron üretimine devam eder ardından yavaş yavaş gerileyerek kaybolur (76).

1.2.3 Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması ve Over Rezervi

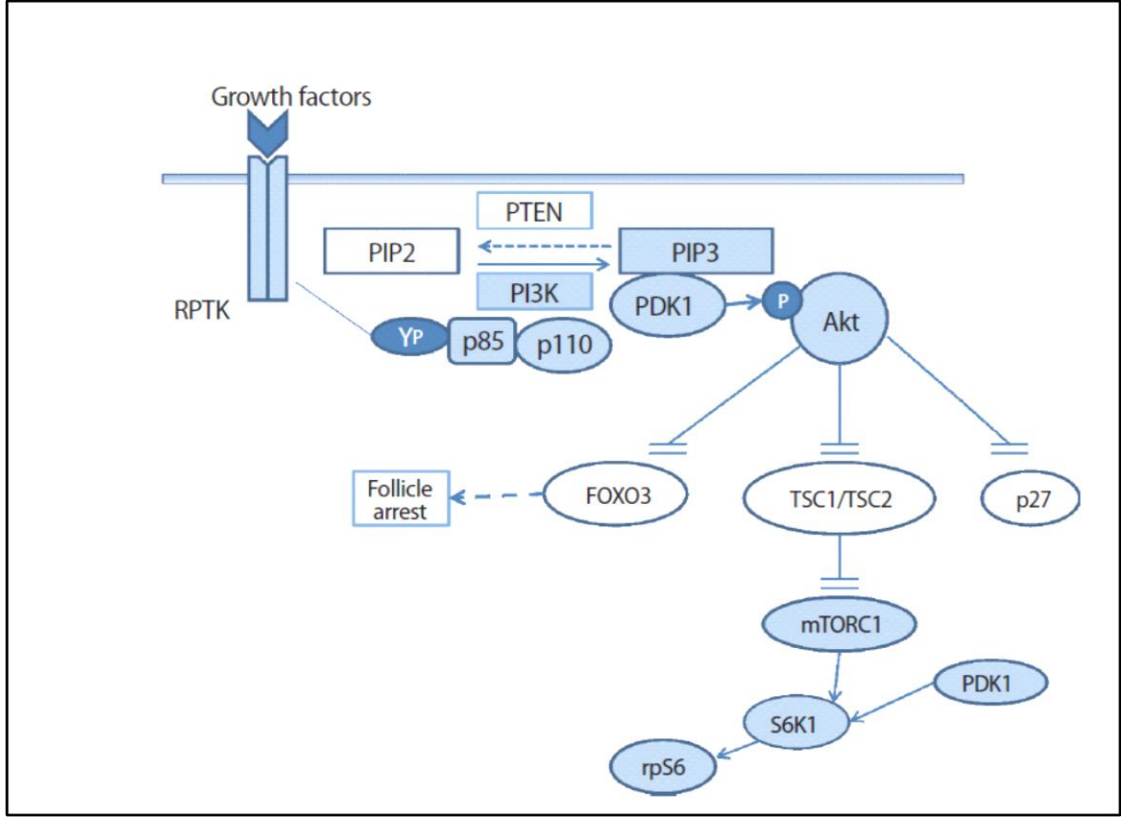
Overde bulunan primordiyal foliküllerin sayısı, over rezervinin esas belirleyicisi konumundadır ve primordiyal foliküllerin düzenlenmesinde oosit ile somatik hücrelerin arasındaki düzenli iletişim ile sağlanır. Bu iletişimi düzenleyen çeşitli mekanizmalar vardır (82). Primordiyal foliküllerin aktivasyonu ve inhibisyonundan sorumlu hücre içi yollar kesin olarak aydınlatılmamış olsa da son yıllarda hem in vitro hem in vivo transgenik hayvan modelleri ile bazı mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır (83,84).

Hücre içi PI3K sinyal yolağı en önemli mekanizmalardan birisidir. Oositler ve onu çevreleyen granülosa hücreleri arasındaki iletişim büyük ölçüde oosit yüzey reseptörü Kit ve onun bilinen tek ligandı olan KL (Kit ligandı) arasındaki sinyalizasyona bağlıdır. Kit ve KL'nin etkileşimi oositin büyümesi, canlılığı ve foliküllerinin erken gelişimi için gerekli olan PI3K sinyal yolağını aktive eder (85,86).

PI3K sinyal yolağı proliferasyon, canlılık, göç ve metabolizma düzenlenmesi için temel olan kinazlar, fosfatazlar ve transkripsiyon faktörleri içeren çeşitli sinyal moleküllerinden oluşan klasik bir sinyal yolağıdır. PI3K sinyal yolağının bileşenleri olan ve folikül popülasyon dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen moleküller temel olarak PI3K, PIP2, PIP3, AKT, p27, TSC, FOXO3 ve PTEN olarak sayılabilir (87-89) (Şekil-7).

Bu moleküler yolda oluşan bir düzensizlik, primordiyal folikül havuzunun erken aktivasyonuna yol açar. Tüm primordiyal foliküllerin bu şekilde hızlı ve toplu şekildeki aktivasyonu kaçınılmaz olarak folikül havuzunun erken tükenmesine, POF'a ve erken menopoza neden olabilmektedir (90-92).

Şekil-7: Primordiyal foliküllerin aktivasyonunu ovaryan kontrolü (89):



PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağının çalışma mekanizması;

- Memelilerde, insülin ve büyüme faktörleri gibi hücre dışı sinyaller PI3K (fosfatidilinositol-3 Kinaz) sinyal yolağını uyarır (87,88).
- KL ile etkileşen Kit, PI3K'nin p85 alt biriminine bağlanarak PI3K'yi aktive eder. Lipid kinaz özelliğindeki PI3K, PIP2'yi PIP3'e fosforile eder (93).
- PIP3 ise ikinci mesajcı gibi davranarak PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) ve Akt'yi (protein kinase B) birbirine kenetler (93).

PI3K sinyal yolağının önemli bir molekülü olan AKT;

- Siklin bağımlı kinaz (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini (p27) negatif olarak denetleyerek hücre döngüsünü düzenler. p27 primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki en önemli baskılayıcılardan birisidir. p27, TGF- β gibi sinyallere yanıt olarak ifade edilir ve hücre siklusunun G1 fazında kalmasından sorumludur (94).

- AKT memelilerde, TSC1 ve TSC2'nin (tuberous sklerosis complex 1 ve 2) fosforilasyonunu düzenler (95). mTOR (mammalian target of rapamycin), protein sentezi ve hücre büyümesini düzenleyen serin/treonin kinazdır. TSC1 ve TSC2 olmak üzere iki molekül içeren heterodimerik kompleks bir yapı olan TSC primordiyal foliküllerin sessizliği ve aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [70]. S6K1, mTORC1'in ana substratıdır. TSC1 ve TSC2, S6K1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonunu inhibe ederler, böylece primordiyal foliküllerin aktivasyonu engellenir (96,97).
- AKT memelilerde, FOXO transkripsiyon faktörlerini de fosforile edebilir, böylelikle bu faktörlerin apoptotik transkripsiyonel aktivitelerinin inhibisyonuna neden olur.
- PTEN ise, PI3K sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir ve primordiyal folikül havuzunun korunmasında kritik öneme sahiptir (89).

1.2.3.1. Protein Tirozin Fosfat ve Tensin Homoloğu (Pten)

Protein tirozin fosfat ve tensin homoloğu (PTEN) geni, 10q23.3 kromozomunda yer alan bir tümör baskılayıcı gendir. PTEN geninde oluşabilecek mutasyonlar malignite dahil pek çok hastalığa neden olabileceği gibi PI3K sinyal yolağı üzerinden over rezervi ile de ilişkilendirilebilmektedir. PTEN hızlı büyüyen ve bölünen hücreleri önleyerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alır (98). PI3K'in negatif düzenleyicisi olduğu ve primordiyal folikül aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (89). PTEN, hücre polaritesini ve göçünü, hücre döngüsünü, hücre ölümünü kapsamaktadır böylece sitoskeletal reorganizasyona neden olan dış membran fosfolipidleri ve yolakları arasında potansiyel bir bağ sağlar. Adhikari ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada PTEN inhibitörlerinin primordiyal folikülleri aktive edeceğini, büyümelerine izin vereceğini ve foliküllerin FSH'a yanıt verebileceğini düşünmüşlerdir. Bu süreç dormant fazdaki primordiyal foliküllerin erken aktivasyonunu, erken tükenmesini

ve POF'u önler. Bu supresör ve aktivatör sinyallerinin koordineli eylemi folikül büyümesinin başlaması ve devam etmesi için gereklidir (99).

1.2.3.2. Forkhead Box O (Foxo)

FOXO transkripsiyon faktörleri 2 büyük halka ve 3a heliks yapısı içeren 100 aminoasit DNA bağlanma bölgesine sahip bir proteindir. FOX ailesi 44 farklı üyeden ve A'dan S'ye kadar isimlendirilmiş 19 alt gruptan oluşur. 'O' alt grubunun FOXO1, FOXO2, FOXO3 ve FOXO4 olmak üzere 4 üyesi vardır. FOXO3 primordial foliküllerde oosit çekirdeğinde yüksek düzeyde bulunur ve büyüyen foliküllerde düzeyi azalmaktadır (100, 101). FOXO ailesinin hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri ve ROS detoksifikasyonu, hücre ölümü ve hücre farklılaşması gibi birçok hücresel işlevi bulunmaktadır (102,103). FOXO3 transkripsiyon faktörü, farelerde over rezervinin korunması için gereklidir. Farelerde FOXO3'ün azalan ekspresyon düzeyinin, primordiyal foliküllerde apoptozu indüklediği böylece over rezervini azalttığı bilinmektedir (104).

1.2.3.3 Akt

Protein Kinaz B olarak bilinen AKT, glukoz metabolizması, apoptoz, hücre proliferasyonu, farklılaşması, transkripsiyonu ve hücre göçü gibi çoklu hücresel süreçlerde rol oynayan serin/treonin spesifik protein kinazdır. AKT gen ailesinin 3 üyesi vardır. AKT1, apoptoz sürecinin inhibisyonu ile hücre sağkalım yollarında görev alır. Ayrıca iskelet kası hipertrofisi ve genel organ büyümesinde meydana gelen protein sentez yollarını indükler. AKT1 birçok kanser tipinde majör rol oynar. AKT1, anjiyogenez ve tümör gelişiminde de rol oynar. AKT1 yokluğunda farelerde fizyolojik anjiyogenez inhibe edilir, patolojik anjiyogenezi artırır ve tümör büyümesi deri ve kan damarlarında matriks anomalileri ile ilişkilidir (105,106). AKT2, insülin sinyal yolağında önemli bir sinyal molekülüdür. Glukoz transporter 4 (GLUT4) insulinin indüklenmiş translokasyonu aracılığıyla glukoz transportunun gerçekleşmesi için gereklidir. AKT1 null AKT2 normal olan farede glukoz homeostazı stabildir ancak hayvanlar daha küçüktür ve büyüme AKT1 için daha anlamlıdır. Büyük çoğunluğu beyinde eksprese edilen AKT3'ün rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. AKT3 eksikliği olan fareler daha küçük beyne sahiptir (107). PI3K bağımlı AKT aktivasyonu tümör süpresör olan

PTEN aracılığıyla düzenlenir (95). PTEN, PIP3'ün PIP2'ye defosforilasyonunda rol oynayan bir fosfatazdır. Bu durum AKT sinyal yolağından membran lokalizasyon faktörünü kaldırır.

1.2.3.4 Anti-Müllerian Hormon (Amh) ve Over Rezervi

AMH, TGF- β ailesinden dimerik yapıda bir glikoprotein olup 19. Kromozom üzerinde kodlanır (108). AMHR-1 ve AMHR-2 olarak isimlendirilen 2 reseptörü vardır ve reseptörleri ile birlikte granüloza hücrelerinden eksprese edilir. AMH sinyalleri tip 2 transmembran serin tirozinkinaz reseptörüne bağlanıp fosforilleyerek aktif hale getirir. AMH sinyalizasyonu reseptörler tarafından regüle edilen SMAD'ların fosforilasyonu ile ortaya çıkmaktadır (109). AMH'nın primordial foliküldeki rolü ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları, AMH eksikliği olan farelerde, primordial foliküllerin erken tükendiği ve primordial foliküllerin büyümesini inhibe ettiği belirlendi (110). AMH ile kültüre edilen insan over dokusunda da büyüyen folikül sayılarının azaldığı gösterildi (111). Bu çalışmalar neticesinde AMH'nın, folikülogenez üzerinde primordial folikülden primer foliküle geçişi inhibe edici etki yaparak primordiyal folikül havuzunu koruduğu düşünülmektedir.

AMH, primer foliküle geçişi inhibe etmesinin yanında FSH bağımlı folikül büyümesini engelleyerek de over rezervi üzerinde etkili olmaktadır. AMH, gonadotropin bağımsız folikül büyümesi boyunca rol oynamaktadır (112). Primordiyal foliküllerin pregranüloza hücrelerinin farklılaşmasından sonra, primer foliküllerin granüloza hücrelerinde AMH ekspresyonu başlar. Büyük çaplı foliküllerde ise AMH ekspresyonu kaybolur ve FSH-bağımlı evreleri sırasında ekspresyon gözlenmez (113).

AMH seviyelerinin serumda siklusa bağılı olarak değişim göstermediğini bildiren çalışmalar (114,115) olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda serum AMH seviyelerinin erken luteal fazda, erken foliküler faz ile kıyaslandığında hipofizer FSH'a benzer bir patern ile daha düşük olduğu saptanmıştır. Menstrüel

siklus süresince serumdaki değişimin düşük oranda olması nedeni ile over rezervinin değerlendirilmesinde önemli bir belirteçtir (116).

Over rezervini belirlemede antral folikül sayısı (AFC) ve serum AMH seviyesi kullanılmaktadır. AFC, menstrüel siklusun herhangi bir fazında USG eşliğinde, ortalama çapları 2-10 mm arasında değişen foliküllerin toplam sayısını gösterir (117). Her iki overdeki toplam follikül sayısı bazal AFC olarak tanımlanır. Normal şartlarda reproduktif dönemde AFC ve yaş birbiri ile korelasyon gösterir ve primordial folikül havuzunu yansıtmaktadır. İyi bir ovaryan rezerv testi, non-invaziv, güvenilir, ucuz, siklustan bağımsız ve tekrarlanabilir olmalı aynı zamanda canlı doğum olasılığını belirleyebilmeli, ovarian yaşlanma gerçekleşmeden ne kadar süre aynı düzeyde devam edebileceğini öngörebilmeli, planlanan ovarian stimülasyon protokolünde optimal dozu belirleme ve bireysel prognozu öngörmede yol gösterici olmalıdır. Kötü ovaryan yanıtı saptayabilmek için Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM) konsensusu ile Bologna kriterleri belirlenmiştir.

Bologna kriterleri (118);

- Anormal over rezerv testi varlığı (serum AMH<0,5-1,1 ng/mL veya AFC<5-7)
- Daha önce konvansiyonel stimülasyonla <3 oosit eldesi
- Yaş >40 veya DOR için diğer risk faktörlerinin varlığı

1.3 Amaç

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, endometriozis ve endometrioma etyolojisinde PI3K/PTEN sinyal yolağında bulunan PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyonlarının rolünü ve düşük over rezervinde bu gen ekspresyonlarının etkisini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Bilimdalı, Üremeye Yardımcı Tedaviler Merkezi Embriyoloji Laboratuvarı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın protokolü Bursa Uludağ Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 22.05.2019 tarih ve 2019-9/15 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastalardan sözlü bilgilendirmeye ek olarak gönüllü / hasta katılım formları ile yazılı onamları alınmıştır.

Çalışma kapsamında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Genel Jinekoloji, Endometriozis ve İnfertilite polikliniklerine ovaryen patoloji ön tanısı ile başvuran 18-40 yaş aralığındaki hastalar dahil edilmiştir. Ovaryen patolojiler endometrioma ve diğer benign sebepler olmak üzere sınıflandırılmıştır. Bu çalışma endometrioma tanısı ile takip edilen ve cerrahi planlanan hastalar ile diğer benign nedenlerle ovaryen patolojisi olan ve cerrahi planlanan hastaların eksize edilen kist duvarından alınan örneklerde PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyonlarının ve over rezervlerinin karşılaştırılacağı prospektif kohort araştırma olup, 20 hasta ve 20 hasta kontrol olmak üzere toplam 40 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

2.1 Hasta Popülasyonu ve Gruplar

Çalışmaya, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Genel Jinekoloji, Endometriozis ve İnfertilite polikliniklerine ovaryen patoloji ön tanısı ile başvuran 18 – 40 yaş aralığında endometrioma ve diğer benign over kistleri saptanarak cerrahi kararı alınan hastalar dahil edilmiştir. Hastalar yapılan pelvik muayenelerinin ardından transvaginal / suprapubik ultrasonografi ile değerlendirilmiş olup ovaryen patolojileri saptanmıştır. Cerrahi kararı alınan hastalar, endometrioma tanısı alan grup (Endo Grup) ve diğer benign kistlerden oluşan (dermoid kist, basit kist, hemorajik kist, folikül kisti,

müsinöz kistadenom, seröz kistadenom) grup (Non-Endo Grup) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Cerrahi sırasında eksize edilen over kist duvarından alınan doku örnekleri uygun koşullarda saklanarak sonrasında PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyonları açısından değerlendirilmiştir.

Çalışmadan hariç bırakılma kriterleri;

- 40 yaş üzeri hastalar
- Malignite şüphesi olan hastalar
- Operasyon endikasyonu bulunmayan takibi uygun hastalar

Tablo-2: Endo Grup ve Non-Endo Grup Dahil Olma Kriterleri

Endo Grup	Non-Endo Grup
1) 18-40 yaş aralığında olmak	1) 18-40 yaş aralığında olmak
2) Vaka grubu >5 cm endometriomasi olan operasyon endikasyonu bulunan hastalar a. Endometrioma nedeni ile semptomatik hastalar (dismenore, disparoni, kronik pelvik ağrı vb.) b. İnfertilite nedeni ile takip edilen in vitro fertilizasyon (IVF) siklusu başlanacak hastalar	2) Endometrioma dışı over patolojileri nedeni ile operasyon planı olan hastalar a. Benign over patolojisi düşünülen semptomatik hastalar (kronik pelvik ağrı, bası, semtomları, dismenore, disparoni gibi) b. Asemptomatik olup 6 aylık takip süresinde gözlenen kist boyutunda artış ya da semptomatik hale gelen hastalar

2.2 Over Rezervinin Değerlendirilmesi

Over rezervi, ovaryan patoloji saptanması ile birlikte uygulanmakta olan transvajinal / suprapubik ultrasonografide AFC ve buna ek olarak serum AMH

düzeyi saptanarak değerlendirmeye alınmıştır. Düşük over rezervinin tanısı Bologna kriterlerine göre belirlenmiştir.

2.3 Dokuların Elde Edilmesi ve Saklanması

Endometrioma ve diğer over kistleri nedeni ile cerrahi kararı alınan hastalardan laparoskopi / laparotomi ile kist eksizyonu uygulanmasının ardından kist duvarlarından 1 mm lik doku kesitleri alındı ve serum fizyolojik ile muamele edildikten sonra kist içeriği, kan ve fibrin gibi ürünler uzaklaştırıldı. Elde edilen dokular fosfat basınçlı salin (PBS) içeren ependorf tüplerine alınarak mRNA degradasyonunu önlemek amacı ile -80°C'de ultra derin dondurucuda saklandı.

2.4 Rna İzolasyonu

Ultra derin dondurucuda saklanan dokular homojenize edilmesi işleminin ardından PTEN, AKT ve FOXO3 genlerinin ekspresyonlarını değerlendirmek üzere analiz edildi.

Çalışma kapsamında örnek eldesi gerçekleştirilen toplamda 40 hastanın (20 Endo grup, 20 Non-endo grup) kist duvarı dokularından "Quick-RNA TM MicroPrep" (ZYMO RESEARCH CORP., U.S.A) ticari kit yardımı ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tüm örnekler, dondurulup çözme sonrasında 500xG hızında 3 dakika santrifüj edildi, hücrelerin pellet olarak toplanması sağlandı ve dondurma solüsyonu uzaklaştırıldı. Kit içeriğindeki lizis ve yıkama tamponlarına ek olarak, DNase I enzimi uygulaması ile üretici firmanın protokolü takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

2.5 Rna Saflık Tayini

Örneklerin RNA'ları 15 µl RNaz-free su içerisinde elde edilmiş olup, saflıkları 260 nm'de RNA'nın ve 280 nm'de DNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans ölçüldü. 260nm/280nm absorbans oranından RNA saflığı saptandı. O.D. 260/ O.D. 280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan RNA'lar saf olarak kabul edildi.

2.6 cDna Eldesi

Saflık tayini sonrasında, uygun olan örneklerin “SensiFAST cDNA Synthesis Kit” (BIOLINE LIFE SCIENCE COMP., U.S.A) ticari kit yardımı ile cDNA eldesi gerçekleştirildi. Her örnek için, 5X TransAMP Buffer 4µl Reverse Trascriptase enzimi 1µl, 100 ng/µl olacak şekilde örnek miktarı ve toplam reaksiyon hacmi 20 µl’ ye dH₂O ile tamamlandı. Enzim aktivasyon koşulları olarak; 25°C’de 10 dakika – ilk bağlanma, 42°C’de 15 dakika – revers transkripsiyon, 85°C’de 5 dakika – enzim inaktivasyonu ve 4°C’de reaksiyon sonlanması olarak kit üretici firma protokolü uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri çalışma zamanına kadar -80°C’de saklandı.

2.7 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen cDNA örneklerinden, gerçek zamanlı PCR çalışmasında PTEN, AKT ve FOXO3 genleri çalışıldı. “The SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit” (BIOLINE LIFE SCIENCE COMP., U.S.A) ticari kit yardımı ile gen ekspresyon analizi SYBR Green probları ile gerçekleştirildi. Kit içeriğinde yer alan; 2x SensiFAST SYBER Hi-ROX Mix 10µl, 10µM konsantrasyonunda olarak şekilde Forward ve Revers Primerler (0,4 µl), cDNA örneği ve toplam reaksiyon hacmi 10 µl’ ye dH₂O ile tamamlandı.

Tablo-3: Primer Dizaynı:

Gen	Primer Dizi Bilgisi	Beklenen Gen Ürünü
PTEN	Forward – 5'- GGCACAAGAGGCCCTAGATT	304 baz çifti
	Reverse – 5'- AGGTAACGGCTGAGGGAAGT	
AKT	Forward – 5'- GACCACTGTCATCGAACGCA	127 baz çifti
	Reverse – 5'- TTCAGCCCCTGAGTTGTCAC	
FOXO3	Forward – 5'- GCGTGCCCTACTTCAAGGAT	125 baz çifti
	Reverse – 5'- GCTCTTGCCAGTTCCTCAT	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward – 5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	185 baz çifti
	Reverse – 5'- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	

Hazırlanan reaksiyon karışımı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere, eş zamanlı 96 örnek analizi gerçekleştirilebilen şeffaf kuyucuklar içeren plakaya yüklendi. “The LightCycler® 480 Real-Time PCR System” (Roche Ltd., Switzerland) kullanılarak örneklerin yüklendiği plakalarda enzimatik reaksiyon ve 465-510 nm dalga boyunda ölçümler ile prob ışına oranına bağımlı olarak ekspresyon seviye tayini gerçekleştirildi. Enzim aktivasyon koşulları olarak; 95°C’de 2 dakika – polimer aktivasyonu, 95°C’de 5 saniye – denatürasyon, 65°C’de 20 saniye – polimer bağlanma ve uzama olarak 40 tekrarlayan döngü kit üretici firma protokolü uygulandı. Tüm örnekler ayrı olarak PTEN, AKT ve FOXO3 genleri gen ekspresyon seviyesi, referans gen olan “Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH)” ekspresyonuna göre göreceli olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplandı.

2.8 İstatistiksel Analiz

Ekspresyon analizleri için internet tabanlı Qiagen PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanıldı. İki grup arasında PTEN, AKT ve FOXO3 genlerinin ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden, ekspresyon kat değişim oranı grafikleri oluşturuldu. Qiagen PCR-Data Analiz sisteminde $2\Delta CT$ değerlerinden gen ekspresyon kat değişim oranları belirlendi. GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı ve GAPDH'ye ilişkin göreceli PTEN, AKT ve FOXO3 mRNA ifadeleri $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Veriler SPSS Paket Program 20.0 sürümü ile analiz edildi. Tanımlayıcı verilerin sunumunda sayı, yüzde, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum kullanıldı. Kategorik veriler Ki-Kare Testi ile karşılaştırıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk Testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan değişkenlerin karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasında Farkın Önemlilik Testi, uymayan değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan değişkenler arasında korelasyonun değerlendirilmesinde Spearman Korelasyon Testi kullanıldı. Korelasyon katsayısı 0,00-0,24: zayıf, 0,25-0,49: orta düzeyli, 0,50-0,74: güçlü ve 0,75-1,00: çok güçlü korelasyon olarak değerlendirildi (119). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamıza endometrioma (Endo Grup (n=20)) ve endometrioma dışı ovaryan kist (Non-Endo Grup (n=20)) tanılı olmak üzere toplam 40 hasta dahil edildi. Hasta yaşı bakımından Endo Grup ile Non-Endo Grupları arasında fark saptanmadı ($p=0,937$). Endometrioma grubunun vücut kitle indeksi ortalaması $22,5\pm3,4$ kg/m², Non-Endo Grubunun ortalaması $26,1\pm4,9$ kg/m² idi ve gruplar arasında vücut kitle indeksi Endo Grupta anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0,014$) (Tablo 4).

Endo Grup ile Non-Endo Grup arasında serum AMH ve FSH düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Endo Grubunun AFC ortalaması Non-Endo grubun ortalamasından düşüktü ayrıca serum CA 125 ortalaması daha yüksekti ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,028$, $p=0,0001$ sırasıyla) (Tablo 4).

Tablo-4: Endo Grup ve Non-Endo Grup demografik veriler ve biyokimyasal parametreleri

	Endo Grup	Non-Endo Grup	
	Ort. ± ss	Ort. ± ss	P
Yaş	31,1±5,8	31,2±6,0	0,937
VKİ	22,5±3,4	26,1±4,9	0,014
AMH	2,1±1,7	2,3±2,1	0,968
AFC	5,9±3,8	8,9±4,7	0,028
FSH	7,1±3,4	7,4±5,7	0,270
CA 125	139,8±126,8	33,0±35,8	0,0001

ort.±ss: ortalama±standart sapma, p: İki Ortalama Arasında Farkın Önemlilik Testi, Mann Whitney U Testi, VKİ: Vücut Kitle İndeksi, AMH: serum Anti-Müllerian Hormon, AFC: Antral Folikül Sayısı, CA125: serum Cancer Antijen 125

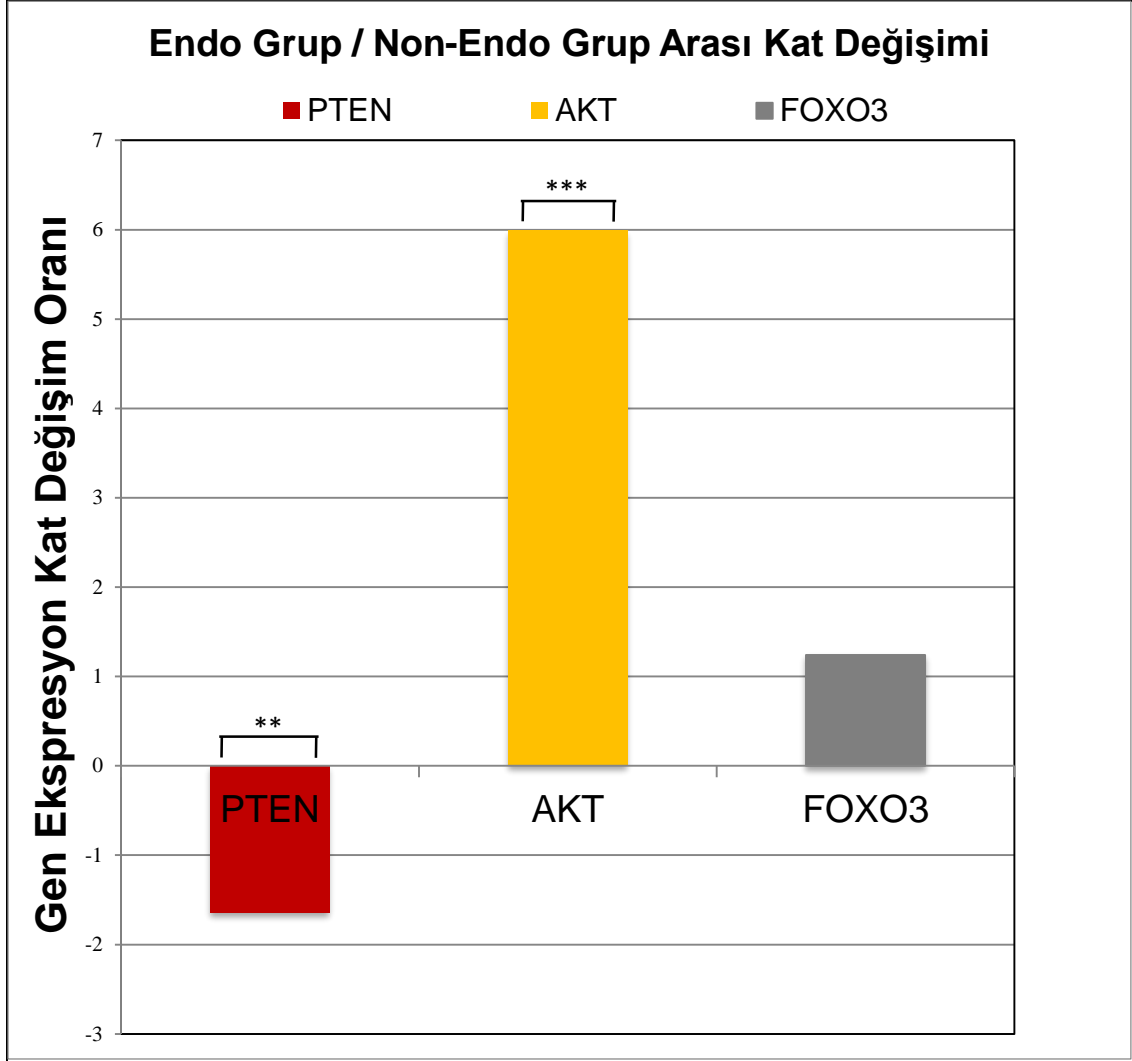
Endo Grup ile Non-Endo Grup arasında PTEN, AKT ve FOXO3 genlerinin ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; Endo Grubunda PTEN gen ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Non-Endo Grubuna göre 1,64 kat düşük olduğu tespit edildi. Grupların FOXO3 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). İki grup arasında AKT gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, Endo Grubunda AKT gen ekspresyonunun Non-Endo Grubuna kıyasla 5,99 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p=0,046$). (Tablo 5 – Grafik 1).

Tablo-5: Endo Grubu ve Non-Endo Grubu gen ekspresyonları

	Endo Grup		Non-Endo Grup		P
	Ort. \pm ss	Ortanca (min-maks)	Ort. \pm ss	Ortanca (min-maks)	
PTEN	2,3 \pm 4,5	0,4 (0,03-19,55)	5,9 \pm 12,5	0,5 (0,07-49,99)	0,461
AKT	49,7 \pm 76,6	10,0 (0,05-225,9)	35,1 \pm 100,5	1,5 (0,05-354,5)	0,046
FOXO3	1,4 \pm 0,7	1,2 (0,5-3,4)	1,0 \pm 0,3	1,0 (0,5-1,7)	0,072

ort. \pm ss: ortalama \pm standart sapma, p: Mann Whitney U Testi

Grafik-1: Endo Grup ile Non-Endo Grup arasında PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değişim seviyeleri



Endo Grubunda PTEN ekspresyon seviyesi NON-Endo Grubuna göre 1,64 kat daha düşük, AKT ekspresyon seviyesi 5,99 kat yüksek izlendi

Endo Grubunun %50,0 'si (n=10) düşük over rezervine (DOR), %50,0'si ise (n=10) normal over rezervine (NOR) sahip hastalardan oluşmaktaydı. Non-Endo Grubunun %40,0'ında (n=8) DOR, %60,0'ında (n=12) NOR saptandı ve gruplar arasında over rezervi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (p=0,751)

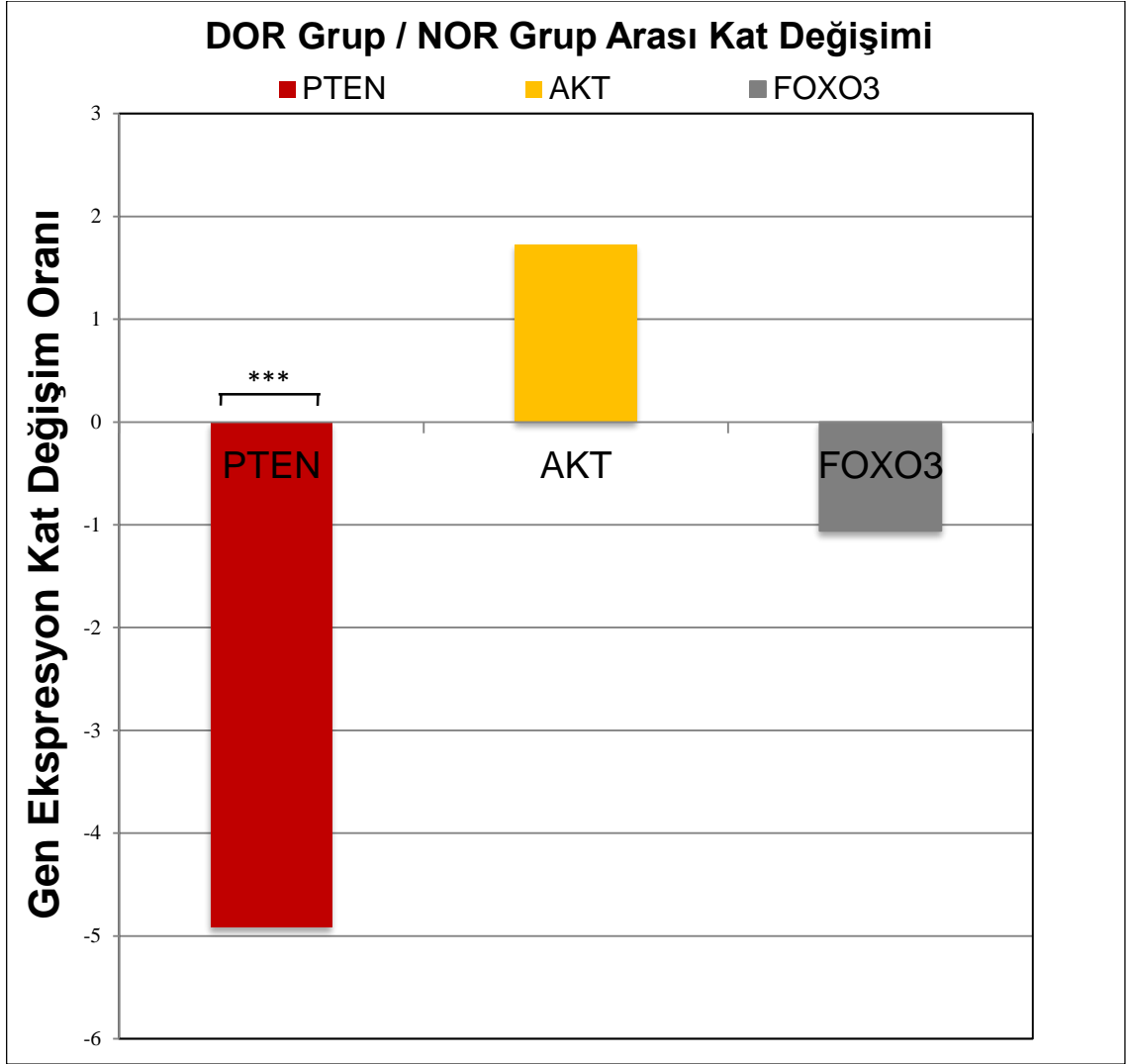
Over rezervi düşük ve normal olan gruplar arasında FOXO3 ve AKT gen ekspresyonu açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Ancak düşük over rezervine sahip hastalarda PTEN gen ekspresyonunun normal over rezervine sahip hastalara kıyasla 4,92 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi ($p=0,004$). (Tablo-6, Grafik-2)

Tablo-6: Düşük Over Rezervi (DOR) ve Normal Over Rezervi (NOR) gruplarının gen ekspresyonları

	DOR (n=18)		NOR (n=22)		P
	Ort. \pm ss	Ortanca (min-maks)	Ort. \pm ss	Ortanca (min-maks)	
PTEN	0,7 \pm 1,2	0,3 (0,03-3,97)	6,8 \pm 12,1	1,4 (0,10-49,99)	0,004
AKT	40,2 \pm 83,7	3,6 (0,05-300,5)	44,2 \pm 94,1	1,6 (0,05-354,5)	0,638
FOXO3	1,1 \pm 0,4	1,1 (0,7-1,8)	1,3 \pm 0,7	1,1 (0,5-3,4)	0,737

ort. \pm ss: ortalama \pm standart sapma, p: Mann Whitney U Testi

Grafik-2: Düşük Over Rezervi (DOR) ve Normal Over Rezervi (NOR) hastalarında PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değışim seviyeleri



DOR Grubunda, NOR grubuna göre PTEN gen ekspresyonunda 4,92 kat düşüş, AKT gen ekspresyonunda 1,73 kat yükseklik, FOXO3 gen ekspresyonunda 1,06 kat düşüş saptandı

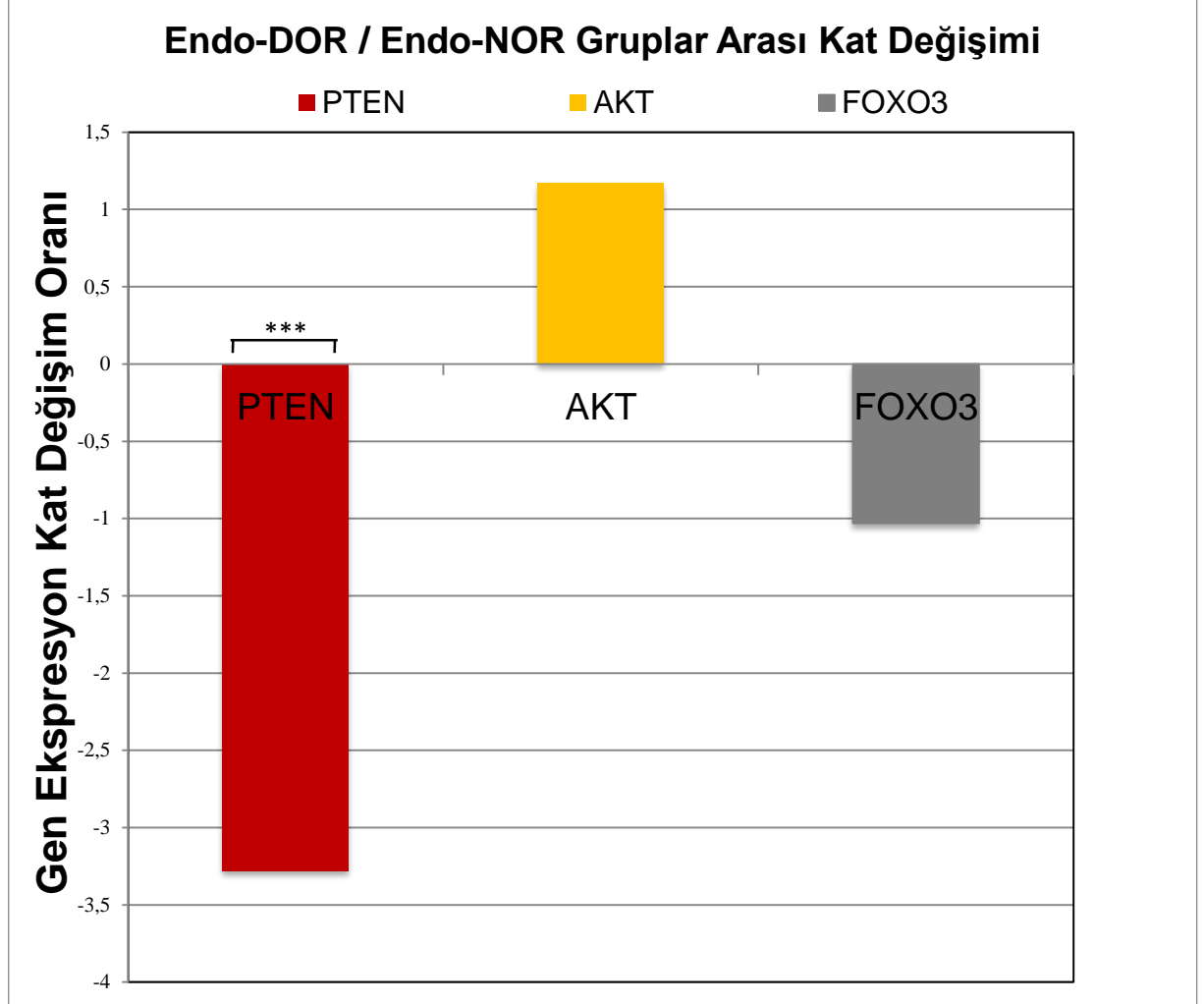
Endometrioma grubu kendi içerisinde over rezervine göre Endo-DOR ve Endo-NOR alt gruplarına ayrılıp karşılaştırıldığında Endo-DOR grubunda Endo-NOR'a göre PTEN gen ekspresyonunun 3,28 kat düşük, AKT gen ekspresyonunun 1,17 kat yüksek ve FOXO3 gen ekspresyonunun ise 1,03 kat düşük olduğu saptandı. Ancak gruplar arasında tüm gen ekspresyon düzey karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0,05$) (Tablo-7, Grafik-3)

Tablo-7: Endometrioma grubunda, düşük over rezervi (Endo-DOR) ve normal over rezervi (Endo-NOR) hastalarının gen ekspresyonları

	Endo DOR (n=10)		Endo NOR (n=10)		P
	Ort. ± ss	Ortanca (min-maks)	Ort. ± ss	Ortanca (min-maks)	
PTEN	0,9±1,5	0,2 (0,03-3,97)	3,5±5,9	1,1 (0,11-19,55)	0,190
AKT	40,9±67,5	8,3 (0,10-181,44)	58,4±87,4	10,0 (0,05-225,86)	0,971
FOXO3	1,3±0,4	1,2 (0,8-1,8)	1,5±0,9	1,3 (0,5-3,4)	0,912

ort. ± ss: ortalama±standart sapma, p: Mann Whitney U Testi

Grafik-3: Endometrioma Grubunda, düşük over rezervi (Endo-DOR) ve normal over rezervi (Endo-NOR) PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değişim seviyeleri



Endo-DOR Grubunda, Endo-NOR grubuna göre PTEN gen ekspresyonunda 3,28 kat düşüş, AKT gen ekspresyonunda 1,17 kat yükseklik, FOXO3 gen ekspresyonunda 1,03 kat düşüş saptandı

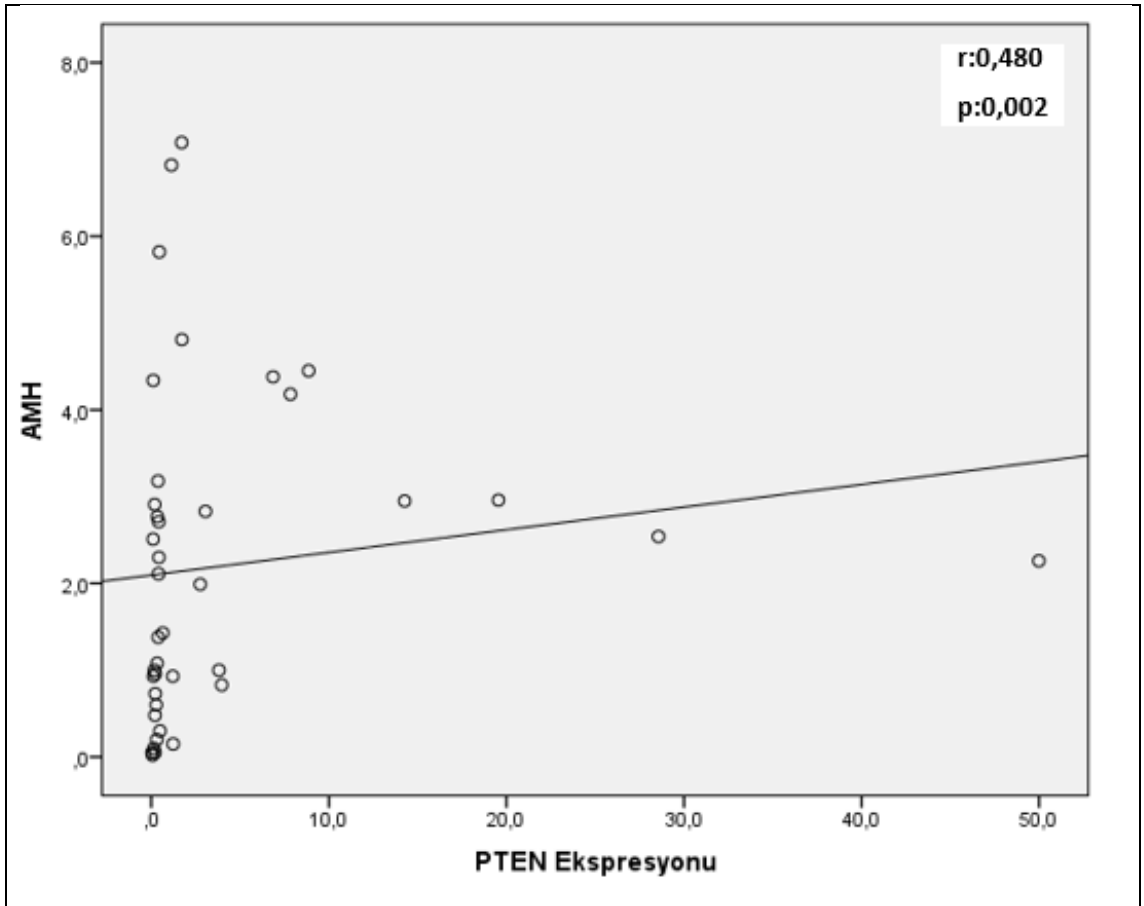
Hastaların PTEN gen ekspresyonu ile serum AMH düzeyi arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde pozitif yönlü orta düzeyli anlamlı korelasyon saptandı. ($r:0,480$, $p:0,002$) Serum AMH düzeyi ile FOXO3 ve AKT gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon tespit edilmedi ($p>0,05$) (Tablo-8, Şekil-8).

Tablo-8: Çalışma grubunda serum AMH düzeyi ile gen ekspresyonlarının korelasyonu

AMH	PTEN	FOXO3	AKT
r	0,480	0,232	0,036
p	0,002	0,150	0,826

r: korelasyon katsayısı, p: Spearman Korelasyon Testi

Şekil-8: Serum AMH düzeyi ile PTEN gen ekspresyonu korelasyonu



r: korelasyon katsayısı, p: Spearman Korelasyon Testi. AMH: anti-Müllerian Hormon, PTEN: Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu

TARTIŞMA VE SONUÇ

Endometriozis, ovaryan endometrioma ile seyreden over rezervini azaltarak infertiliteye neden olabilen oluşum ve gelişim mekanizması tam olarak aydınlatılmamış bir hastalıktır. Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ile hem hormonal düzensizlikler hem de çeşitli sinyal yolları ve sitokinlerin endometriozis gelişimine neden olduğu vurgulanmıştır. PI3K-PTEN-AKT sinyal yolağı ortaya koyulan majör hücre içi sinyal yollarından biridir.

Çalışmamızda, endometrioma (n=20) ve overin diğer benign patolojileri (n=20) nedeni ile opere edilen toplam 40 hastadan elde edilen kist duvarı doku örnekleri PTEN, AKT ve FOXO3 genleri ekspresyon seviyeleri açısından karşılaştırdık. Endo-Grup ve Non-Endo Grup olmak üzere iki gruba ayrılan hastalar gen ekspresyon seviyeleri ile kıyaslandığında PTEN gen ekspresyonunun endometrioma grubunda, Non-Endo gruba göre 1,64 kat daha düşük olduğunu tespit ettik. Ayrıca Endo-Gruba, AKT gen ekspresyon seviyesi Non-Endo Gruba kıyasla 5,99 kat daha yüksekti ($p<0,05$). Bu bulgular endometriozis patogeneğinde, PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağının oluşum ve gelişim sürecinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

Endometrial hücrelerin spontan apoptozunun, endometriyal dokunun normal yapısını ve işlevini sürdürmede anahtar bir faktör olduğu ve anormal apoptozun, endometriyal hücrelerin uterus boşluğunun dışında implantasyonuna ve hayatta kalmasına yol açabileceği gösterilmiştir. Ektopik endometriyal hücrelerin anti-apoptotik kabiliyeti, endometrioziste apoptozu inhibe ederek arttırılır. Bu nedenle, endometriyal hücrelerin proliferasyonu ve ölümü arasındaki denge bozulur ve hücre ölüm hızı proliferasyon oranından azalır ve endometriyal hücrelerin hayatta kalma süresi uzar, bu hücrelerin uterus boşluğunun dışına çoğalmasını ve implantasyonunu kolaylaştırır (120,121).

Endometriozisli kadınlardan alınan endometriyal hücre örneklerinin, çoğalma ve ektopik bölgelerde implant yapma ve hayatta kalma kabiliyetini

arttırdığı, Bcl-2 gibi anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunun arttığı, BAX gibi pre-apoptotik faktörlerin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (122). Ektopik endometrium ve endometriotik dokularda değişen apoptoz, endometriozis patofizyolojisinin bazı yönlerini aydınlatmaktadır. Son yapılan çalışmalar genetik faktörlerin endometriozise karşı bireysel duyarlılığı etkileyebileceğini düşündürmektedir. PTEN geni gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun genetik değişiklikler ve endometriozisin başlaması, kalıcılığı ve ilerlemesi için muhtemel olabileceği ortaya konulmuştur (123-125).

PTEN, apoptozu artırma amacı ile PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağını negatif olarak düzenleyerek hücre mitozunu inhibe eder (126). Bu sinyal yolağı, hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve apoptozun indüksiyonuna olanak sağlamaktadır (127,128). PTEN inhibisyonu, ektopik endometriyal hücrelerin anti-apoptotik kabiliyetini arttırdığı ve hücre döngüsü düzenleyici mekanizmalarında değişikliklere neden olduğu ve endometriotik dokuların implantasyonuna yol açtığı, Juan LV ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladığı çalışma ile tespit edilmiştir (53). Başka bir yayında, PTEN'in integrin aracılı hücre yayılmasını engelleyebileceğini ve sonuç olarak endometriyal hücrelerin adezyon kapasitesini azaltabileceğini göstermiştir. PTEN'in ekspresyonunda meydana gelen azalma ile, ektopik endometriyal hücrelerin büyümesine neden olan olan endometriyal hücrelerin invazyon ve metastaz kabiliyetinin artışı ortaya konulmuştur (129). Bizim çalışmamızda da endometrioma grubunda PTEN'de gösterdiğimiz ekspresyondaki azalma endometriozis ve endometrioma oluşumunda yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Anjiogenez, endometriotik dokuların oluşumu ve gelişiminde merkezi rol oynamaktadır ve yeni damarların oluşumu endometriozis ve endometrioma patogenezinde kilit noktalardan biridir (130). Anjiyogenez, vasküler endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve hücre dışı matris yıkımı gibi birçok adımı içeren karmaşık bir süreçtir ve anjiyogenezin düzenlenmesinde çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve cinsiyet hormonları yer almaktadır aynı zamanda PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağı da etkinleştirilmektedir. Kim ve diğ. AKT aktivitesinin artmasının ektopik endometriyal doku oluşumu üzerinde etkisi

olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada, AKT inhibitörü (MK-2206) AKT aktivitesini azaltarak insan endometriotik hücre proliferasyonunun, hastalısız endometrial hücrelere kıyasla azaldığı ve AKT inhibitörü ile ektopik lezyonların sayısının da azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca allelerden birinde silinme olan PTEN gen heterozigositesi olan farelerin, uterus dokularının otolog implantasyonundan sonra PTEN intakt farelere kıyasla daha fazla ektopik lezyon oluşturduğu saptanmıştır (131).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) yaygın olarak en önemli pro-anjiyojenik faktör olarak kabul edilmektedir. VEGF-VEGFR ile birlikte PI3K etkinleştirir ve PIP2'yi fosforilasyon yoluyla PIP3 üretmek için aktive eder. PIP3, VEGF sentezini arttırmak için PI3K/PTEN/AKT sinyal yoluyla alt hedef proteinlere etki eder, böylece kan damarlarının oluşumunu artırılır (132). Juan LV ve Ark. yapmış olduğu çalışmada PTEN ekspresyonundaki azalmanın anjiyogenezi önemli ölçüde artırdığını, aşırı ekspresyonunun anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmektedir. Morfolojik olarak bakıldığında PTEN'in anjiyogenez üzerindeki inhibitör etkisini doğrudan göstermektedir (53). Bu bulgular da PTEN'in sadece ektopik endometriyal hücrelerin apoptozunu artırarak değil, aynı zamanda VEGF üzerinde etkili olarak endometriotik lezyonların oluşumunu da engelleyebileceği yorumunu ortaya çıkarmaktadır. S. Govatati ve Ark. PTEN ekspresyon kaybı olan ötopik endometrial dokularda AKT fosforilasyonunun arttığını göstermiştir (49). AKT aktivasyonu genel olarak, PTEN inhibisyonu sonrası gerçekleşen PI3K'nın indüklenmesinin sonucudur. PDK1 ve PDK2 gibi kinazların fosforilasyonu ile aktive olan AKT daha sonra kinaz aktivitesi ile fonksiyonlarını yerine getirmektedir. PI3K-bağımlı Akt aktivasyonu, PIP3'ü PIP2'ye geri fosforillemek için bir fosfataz görevi gören ve böylece PI3K/AKT sinyal yolağında membran lokalizasyon faktörünü kaldıran PTEN tarafından düzenlenir (45). Azalan PTEN ekspresyonu ve bunu sonucunda AKT aktivitesinin indüklenmesi, ektopik bölgelerdeki endometriotik hücrelerin adezyonu, artmış anjiyogenez ve artan hücre proliferasyonuna bağlanabilir.

Gentillini D. ve Ark.'ları yaptıkları bir çalışmada, büyüme faktörlerinin endometriyal stromal hücrelerin dinamik davranışının çok güçlü destekleyicileri olduğunu ve hem PI3K/AKT hem de ERK1/2 sinyal yollarını aktive ederek

hücre migrasyonunu indüklediklerini göstermişlerdir. PI3K/AKT ve ERK1/2 sinyal yollarının spesifik inhibitörlerini kullanarak yaptıkları araştırmalar ile büyüme faktörünün neden olduğu hücre motilitesi yanıtları için her iki yolun aktivasyonunun gerekli olduğunu saptamışlardır (133). Endometrioziste hücre sağkalımı, proliferasyonu, göçü ve istilasının düzenlenmesi ile ilişkili olarak, Rai ve Shivaji 2011 yılında yayınladıkları çalışmada, DJ-1 proteininin etkili olduğunu göstermişlerdir (134). Oksidatif stres aracılı hücre ölümüne karşı koruma sağlayan DJ-1 proteini, PTEN'in işlevini negatif etkileyerek PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağını düzenler. DJ-1'in aşırı ekspresyonunun fosforile AKT seviyelerini arttırdığı ve PTEN seviyelerini azalttığını böylece bu hücresel süreçleri düzenlediği sonucuna varmışlardır.

Çalışmamız, endometrioma grubunda, kontrol gruba göre düşük PTEN ve yüksek AKT gen ekspresyon seviyeleri EM patogenezinde PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağının anjiogenez, hücre proliferasyonu ve apoptozis üzerindeki etkisini araştıran yayınları desteklemektedir. Bu nedenle, özellikle PTEN ekspresyon durumundaki değişikliklerin ve sonrasında meydana gelen diğer faktörlerle olan bağlantıları ile endometriozis oluşumunu ve gelişimini etkilediği düşünülebilir.

Endometriozis tanısı koymada yardımcı olabilecek önemli bir laboratuvar parametresi olan serum CA125 düzeyi değerlendirildiğinde Endo-Grubunda, Non-Endo Gruba kıyasla anlamlı yüksek serum CA125 değerleri saptadık (ort:139,8 – 33,0 U/ml, p=0,0001). Bu bulgular EM'de artan serum CA125 seviyesini gösteren çalışmalar ile uyumludur (58, 59). Benzer şekilde Koninckx ve ark., pelvik ağrı veya infertilite için laparoskopi uygulanan 384 hastadan oluşan bir kohortta endometrioma ve derin infiltratif endometriozis vakalarında CA-125'in plazma konsantrasyonlarını yüksek bulmuşlardır (135).

Over rezervi, folikül aktivasyonunun sürekli baskılanmasıyla sürdürülen uykuda primordial foliküllerden oluşur. Primordial foliküllerin aşırı aktivasyonu, primer folikül sayılarının erken tükenmesine neden olur, bu da over rezervinin azalmasına neden olur. Endometrioziste daha önce primordial folikül oranının düşük olduğu, endometriomalı kadınlarda büyüyen foliküllerin yüksek olduğunu ve endometriomalı kadınlarda POF gelişen hastalara benzer bir mekanizmanın

olası over rezerv düşüşünden sorumlu olduğu ileri sürülse de tam olarak netlik kazanmamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda endometriozis ve PI3K/PTEN/AKT kaskadı arasındaki ilişki araştırılmış olup, normal, eutopik ve ektopik endometriyumdaki AKT fosforilasyon seviyelerini karşılaştırılmıştır. Ancak bu sinyal yolağının over rezervi ve AMH değerleri ile olan korelasyonu belirsizliğini korumaktadır. Over rezervindeki azalmanın inflamatuvar reaksiyonlara ek olarak PI3K/PTEN/AKT yolağı üzerinden de etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Endometrioma varlığının, over rezervinde azalma ile ilişkili olduğu desteklenmektedir (69). Ayrıca endometriomaların serum AMH düzeylerinde sağlıklı kontrollere kıyasla daha hızlı bir düşüşle ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Endometriomaların over rezervini, çevre yumurtalık korteksinin kist tarafından sıkıştırılması dolaşımı engelleyerek folikül kaybına neden olması ile ve endometriotik odaklardaki inflamatuvar reaksiyonun ve gelişen fibrozisin foliküler hasarlanmaya yol açmasıyla etkileyebileceği düşünülmektedir (136). Bizim çalışmamız da endometrioma grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha düşük serum AMH seviyesi ve daha düşük AFC ile ilişkiliydi. Ayrıca hastalar over rezervine göre gruplandırıldığında, DOR grubunun PTEN ve FOXO3 gen ekspresyonları seviyeleri NOR grubuna göre sırasıyla 4,92 – 1,06 kat daha düşük, AKT gen ekspresyonu ise 1,73 kat daha yüksekti. Over rezervinin en önemli belirteçlerinden olan serum AMH ile PTEN ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptadık. PTEN ekspresyon seviyesinde azalma ve PTEN ekspresyonunun AMH ile korelasyonu primordiyal folikül havuzununun aktivasyonu ile over rezervini etkileyebileceği sonucunu ortaya çıkarabilmektedir.

Over rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin çoğunluğu reproduktif dönem boyunca uyur durumda beklerken, bir grup primordiyal folikülde ergenlik evresinden başlayarak, oosit, granüloza hücreleri ve folikülü çevreleyen stromal hücrelerdeki değişimleri kapsayan bir büyüme ve aktivasyon sürecine girer. Bu süreçte otokrin–parakrin şekilde hareket eden bazı ekstraselüler matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri rol oynar (137,138). Bu faktörleri kapsayan hücre içi sinyal yolları henüz net olarak gösterilmemiş olsa da bazı hayvan

çalışmalarında primordiyal folikül havuzunun büyümesini, aktivasyonu ve atrezisini gösteren çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir. Bu mekanizmalardan en önemli hücre içi sinyal yolağı PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağıdır. Hsueh A.J.W., Kawamura 2015 yılında yayımladıkları çalışmada primordiyal foliküllerin aktivasyon ve atrezi sürecini tanımlamışlardır (139). Bu sinyal yolağında primordiyal folikül havuzunun dinamiklerinin düzenlenmesinde, PTEN, AKT ve FOXO3 başlıca rol oynayan temel moleküllerdendir.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve apoptozu gibi birçok hücre sel süreçlerde kritik rol oynayan ve tümör baskılayıcı bir gen olduğu bilinen PTEN, PI3K sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Mutant fareler üzerinde yapılan birçok çalışmada, PTEN'in bu sinyal yolağında bulunan diğer moleküller ile koordinasyonlu çalışması ile primordiyal foliküllerin aktivasyonunu ve büyümesini baskılayarak folikül havuzunu ve dolayısı ile over rezervini bu şekilde koruduğu gösterilmiştir.

PTEN ekspresyonunda meydana gelen artış ile AKT ekspresyonu baskılanır. AKT hücre siklusu, anjiogenez, büyüme, gelişme, farklılaşma ve apoptoz gibi pek çok önemli noktalarda görev almaktadır. Aynı zamanda hücre siklusunun G1 fazında kalmasından sorumlu olan ve primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki en önemli baskılayıcılardan birisi olan p27'yi inhibe eder. Rajareddy, S. ve Ark.'ları, farelerde p27 gen ekspresyonunda meydana gelen azalma ile primordiyal folikül havuzunun erken aktive olduğunu ve yetişkinlik döneminde fonksiyonel foliküllerin azaldığını tespit etmişlerdir (140). Aşırı aktivasyonun over rezervinde azalmaya neden olabileceğini desteklemektedirler.

AKT, primordiyal foliküllerin arrestinden (uyku halinde kalması) ve aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan TSC'nin fosforilasyonunu düzenler. TSC molekülü, S6K1'in fosforilasyonunu mTORC1 yolağı üzerinden inhibe ederek primordiyal foliküllerin aktivasyonunu engeller. PTEN molekülü TSC'ye benzer şekilde aynı inhibisyonu PDK1 yolağı üzerinden sağlar. PTEN, PDK1 inhibisyonu ile S6K1'in fosforile olmasını engeller. Daha açık bir ifadeyle, primordiyal havuzun korunması için PTEN molekülünün PDK1'i baskılaması gerekmektedir. PTEN ve TSC1 geni silinmiş farelerle yapılan çalışmalarda, PTEN

ve TSC1 yokluğunun primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyona neden olduğu ve buna bağlı olarak primordiyal folikül rezervin tükendiği gösterilmiştir (141-142).

FOXO3 primordiyal foliküllerde oosit çekirdeğinde yüksek düzeyde eksprese edilen ve over rezervinin korunmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Akt memelilerde, FOXO3'ü fosforile ederek bu faktörün apoptotik transkripsiyonel aktivitesini etkileyebilir. Farelerde FOXO3'ün azalan ekspresyonunun, primordiyal foliküllerde apoptozu indüklediği ve böylece over rezervini azalttığı bilinmektedir (143). Kemirgenler üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, PTEN, TSC1 ve FOXO3 genlerin oosit-spesifik delesyonunun dormant primordiyal foliküllerin toplu aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (144).

Castrillon ve Ark. FOXO3 kaybı olan dişi farelerin fonksiyonel yumurtalık foliküllerinin erken tükenmesinin yanı sıra sekonder infertilite sergilediğini göstermişlerdir (100). FOXO3 foliküler büyümenin en erken aşamalarında foliküler aktivasyonun baskılayıcısı olarak işlev görür. Ancak matür oositlerde foliküler atrezi üzerindeki kesin etkisi belirlenmemiştir. FOXO3 ayrıca domuz over foliküllerinde eksprese edildiğini ve granulosa hücrelerinde apoptozu indüklediğini, böylece foliküler atrezi başlatıcısı için bir aday olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (145). Belirtilen raporlar, memelilerde yumurtalık folikül rezervinin bakıcısı olarak FOXO3'ün rolünü vurgulamaktadır. Bir başka çalışmada daha düşük bir FOXO3 mRNA ekspresyonunun daha az sayıda geri kazanılmış olgun oosite neden olduğunu göstererek bu bulguları daha da desteklemeye yardımcı olur (146). Çalışmamızda da ortaya koyduğumuz veriler ışığında FOXO3 ekspresyonundaki azalma düşük over rezervi ve düşük serum AMH değerleri ile ilişkilendirilebilir. Tüm bu veriler FOXO3'ün insan folikülogenezinde kritik rol üstlendiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızın güçlü yanları arasında, insan over kist duvarı dokularından kesitler alınarak canlı örneklerde endometriozis patogenezini moleküler düzeyde araştırılmış olması, prospektif bir çalışma oluşu ve PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon seviyeleri ile serum AMH düzeyinin korelasyonunu değerlendiren ilk çalışma olması sayılabilir. Vaka popülasyonu

açısından çok geniş kapsamlı olmaması da çalışmamızın zayıf özellikleri arasında gösterilebilir.

Sonuç olarak, endometriozis patogeneğinde PTEN ve AKT genlerinin ekspresyonunun etkisini gösterdik. Düşük PTEN ve yüksek AKT seviyeleri hücre büyümesi, apoptozis ve anjiogenezi etkileyerek endometriotik dokuların oluşumuna ve gelişimine neden olduğunu düşünmekteyiz. PTEN düzeylerindeki değişikliklerin diğer mekanizmalar ile birlikte PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağı üzerinden AKT aktivasyonu ile birlikte endometriozis arasında bağlantı olabileceğı düşünmekteyiz. Aynı zamanda endometrioma varlığında gelişen düşük over rezervinin inflamatuvar reaksiyon ve fibrozisin yanı sıra yine PI3K/PTEN/AKT sinyal yolağı aktivasyonu ile meydana geldiğı söylenebilir. PTEN ve FOXO3 genlerinin ekspresyonunda gerçekleşen azalma ve AKT aktivasyonunun primordiyal foliküllerin erken aktive olması ile primordiyal folikül havuzunun tükenmesi ile ilişkilendirmekteyiz.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile endometriozis etyopatogeneğinde rol oynayan pekçok faktör içerisinde hücre içi sinyal yollarının ve genetik moleküllerin etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bununla birlikte hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunun ve inhibisyonunun endometrioma gelişimi ile beraber over rezervi üzerinde de olası etkisi söz konusudur.

KAYNAKLAR

1. Ballard KD, Seaman HE, de Vries CS, Wright JT. Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case control study part 1. *BJOG* 2008; 115:1382–91.
2. Gylfason JT, Kristjansson KA, Sverrisdottir G, Jonsdottir K, Rafnsson V, Geirsson RT. Pelvic endometriosis diagnosed in an entire nation over 20 years. *Am J Epidemiol* 2010; 172:237–43.
3. Nezhat C, Nezhat F, Nezhat C. Endometriosis: ancient disease, ancient treatments. *Fertility and sterility* 2012; 98: S1-62.
4. Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril* 2009; 92: 68-74.
5. Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2014; 29: 400-12.
6. Houston DE, Noller KL, Melton LJ, Selwyn BJ, Hardy RJ. Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979. *American journal of epidemiology* 125, 1987; 959-969.
7. Kasapoglu I, Ata B, Uyaniklar O, Seyhan A, Orhan A, Yildiz Oguz S, Uncu G. Endometrioma-related reduction in ovarian reserve (ERROR): a prospective longitudinal study. *Fertil Steril*. 2018; 110(1):122–127.
8. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 14. 1927; 422-469.

9. Moore JG, Binstock MA, Growdon WA. The clinical implications of retroperitoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1988; 158 (6 Pt 1): 1291-8.
10. Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances, *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:214.
11. Martin JD, Jr, Hauck AE. Endometriosis in the male. *Am Surg* 1985; 51:426.
12. Schiffrin BS, Erez S, Moore JG. Teen-age endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116:973.
13. Matsuura K, Ohtake H, Katabuchi H, Okamura H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47 (Suppl 1):18.
14. Bontis JN, Vavilis DT. Etiopathology of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997; 816: 305-9.
15. Marsh EE, Laufer MR. Endometriosis in premenarcheal girls who do not have an associated obstructive anomaly. *Fertil Steril* 2005; 83(3):758-60.
16. Fang ZJ, Yang S, Gurates G, Tamura M, Simpson ER, Evans D, Bulun SE. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue. *J Clin Endocrinol. Metab* 2002; 87: 3460 – 3466.
17. Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zha J, Sebastian S. Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 79: 19–25.

18. Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Seminars in reproductive medicine* 2003; 21: 413-19.
19. Hinshelwood MM, Agarwal VR, Zhao Y, Carr BR, Bulun SE. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 600–606.
20. Tsai SJ, Wu MH, Lin CC, Sun HS, Chan HM. Regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5765 – 5773.
21. Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P. High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Human Reproduction* 2002; 17: 2715-24.
22. Osterlynck D, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer cell activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56:45-51. 45.
23. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585 – 596.
24. Nnooaham KE, Webster P, Kumbang J, Kennedy SH, Zondervon KT. Is early age at menarche a risk factor for endometriosis? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Fertil Steril* 2012; 98: 702-12.
25. Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *The New England journal of medicine* 2010; 362: 2389-2398.
26. Hediger ML, Hartnett HJ, Louis GM. Association of endometriosis with body size and figure. *Fertility and sterility* 2005; 84: 1366-74.

27. Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Seminars in reproductive medicine* 2003; 21: 145-154.
28. Upson K, Sathyanarayana S, Scholes D, Holt VL. Early-life factors and endometriosis risk. *Fertility and sterility* 2015; 104: 964-971.
29. Breech LL, Laufer MR. Obstructive anomalies of the female reproductive tract. *The Journal of reproductive medicine* 1999; 44, 233-240.
30. Schattman GL, Grifo JA, Birnbaum S. Laparoscopic resection of a noncommunicating rudimentary uterine horn. A case report. *The Journal of reproductive medicine* 1995; 40, 219-220.
31. Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 327-31.
32. Treloar SA, O'Connor DT, O'Connor VM, Martin NG. Genetic influences of endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril* 1999; 71: 701-710.
33. Govatati S, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. Mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase alterations are associated with endometriosis. *Mitochondrion* 2013; 13: 782-790.
34. Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BA, von Deimling A, Wiestler OD. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 1994; 6:152–156.
35. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:283–296.

36. Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Jones JR, Whittaker SJ. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 2000; 95:2937–2942.
37. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S, Yokoyama T, Yamakawa H, Furukawa T, Sato M. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997; 17:143–144.
38. Canbay E, Kahraman OT, Bugra D, Caykara B, Seyhan MF, Bulut T, Yamaner S, Ozturk O. Increased gastric cancer risk with PTEN IVS4 polymorphism in a Turkish Population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17:249–253.
39. Zhang HY, Liang F, Jia ZL. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol Lett* 2013; 6(1): 161–68.
40. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273:13375–8.
41. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; 100:387–390.
42. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95:29–39.
43. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couple's survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91:231–241.

44. Tang JM, He QY, Guo RX. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer*. 2006; 51(2):181–91.
45. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2110–2115.
46. Martini M, Ciccarone M, Garganese G, Maggiore C, Evangelista A, Rahimi S, Zannoni G, Vittori G, Larocca LM. Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer* 2002; 102:398–406.
47. Zhang H, Zhao X, Liu S, Li j, Wen Z, LiM. 17bE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasingPTENvia NFkB-dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 317:31–43.
48. Rai P, Shivaji S. The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One* 2011; 6: e18074.
49. Govatati S, Kodati VL, Deenadayal M. Mutations in the PTEN tumor gene and risk of endometriosis: A case-control study. *Hum Reprod* 2014; 29(2): 324–36.
50. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 102: 19–65.
51. Li L, He F, Litofsky NS. Profiling of genes expressed by PTEN haploinsufficient neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24(4): 1051–61.

52. Zhao M, Bai H, Wang E. Electrical stimulation directly induces preangiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci* 2004; 117(3): 397–405.
53. Juan Lv, Qiaoying Zhu, Xuemei Jia, Ningzhu Yu, and Qian Li. In Vitro and In Vivo Effects of Tumor Suppressor Gene PTEN on Endometriosis: An Experimental Study. *Med Sci Monit* 2016; 22: 3727–3736.
54. Siquara De Sousa AC, Capek S, Amrami KK, Spinner RJ. Neural involvement in endometriosis: Review of anatomic distribution and mechanisms. *Clinical anatomy* 2015; 28: 1029-1038.
55. De Graaff AA, Van Lankveld J, Smits LJ, Van Beek JJ, Dunselman GA. Dyspareunia and depressive symptoms are associated with impaired sexual functioning in women with endometriosis, whereas sexual functioning in their male partners is not affected. *Human reproduction (Oxford, England)* 2016; 31: 2577-2586.
56. Zhu L, Wong F, Lang JH. Perineal endometriosis after vaginal delivery-clinical experience with 10 patients. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 2002; 42: 565-567.
57. Riazi H, Tehranian N, Ziaei S. Clinical diagnosis of pelvic endometriosis: a scoping review. *BMC Womens Health* 2015; 15: 39.
58. Santulli P, Streuli I, Melonio I. Increased serum cancer antigen-125 is a marker for severity of deep endometriosis. *Journal of minimally invasive gynecology* 2015; 22: 275-284.
59. Zhang Y, Qiao C, Li L, Zhao X, Li Y. Serum HE4 is more suitable as a biomarker than CA125 in Chinese women with benign gynecologic disorders. *African health sciences* 2014; 14: 913-918.

60. Exacoustos C, Meanganaro L, Zugi E. Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology* 2014; 28: 655-81.
61. Di Paola V, Manfredi R, Castelli F. Detection and localization of deep endometriosis by means of MRI and correlation with the ENZIAN score. *European journal of radiology* 2015; 84: 568-574.
62. Vercellini P, Vendola N, Bocciolone L. Reliability of the visual diagnosis of ovarian endometriosis. *Fertility and sterility* 1991; 56: 1198-1200.
63. Brown J, Pan A, Hart RJ. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010; 12: CD008475.
64. Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Barbara G, Crosignani PG. Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs* 2009; 69: 649–75.
65. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Human reproduction update* 2002; 8: 95-103.
66. Kao LC, Germeyer A, Tulac S. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144: 2870-2881.
67. Sanchez AM, Vigano P, Somigliana E. The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. *Human reproduction update* 2014; 20: 217-230.

68. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Human reproduction (Oxford, England)* 1995; 10: Suppl 2, 91-97.
69. Uncu G, Kasapoglu I, Ozerkan K, Seyhan A, Oral Yilmaztepe A, Ata B. Prospective assessment of the impact of endometriomas and their removal on ovarian reserve and determinants of the rate of decline in ovarian reserve. *Hum Reprod* 2013; 28: 2140–2145.
70. Putz R, Pobst R. *Sabotta Atlas of Human Anatomy*. 13th edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
71. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 3rd edition. USA: Elsevier's; 2007. 489-500.
72. Cochard LR, Netter FH. *Netter's atlas of Human Embryolog*. 1st edition. USA: Icon Learning Systems Medimedia; 2006.
73. Liu YX. Advanced studies on ovary physiology in China in the past 30 years. *Sheng Li Xue Bao* 2016; 68(4):366-84.
74. Merchant-Larios H, Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. *Prog Clin Biol Res* 1981; 59B:383-92.
75. "Sex development Genetics and Biology" NHMRC Australia, erişim 15 Temmuz, 2015.<http://www.dsdgenetics.org/index.php?id=25>.
76. Junqueira LC, Carneiro J. *Dişi üreme sistemi (çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S.)*. *Temel Histoloji Text and Atlas*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. 435-42.
77. Chowdhury I, Thomas K, Thompson WE. Prohibitin (PHB) roles in granulosa cell physiology. *Cell Tissue Res* 2016; 363(1):19-29.

78. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 6th edition. USA: Lippincot Williams & Wilkins; 2011. 726-757.
79. Yılmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, Morrison SJ. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. Nature 2006; 441(7092), 475-82.
80. Tanyolaç A. Özel Histoloji. Ankara: Yorum Basımevi; 1999. 144-152.
81. Wathen NC, Perry L, Lilford RJ, Chard T. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. Br Med J 1984; 288:7.
82. Chang E, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR, Yoon TK, Choi Y, Lee WS. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/ AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. Plos One 2015; 10(12).
83. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine Reviews 2000; 21(2), 200-14.
84. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99(5), 2890-4.
85. Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordiyal Oocytes in Neonatal and Adult Mammals. Journal of Reproduction and Devolopment 2010; 56(6), 559-566.
86. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz JR. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. Reviews of Reproduction 2000; 5(3), 143-52.

87. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2010; 21(2), 96-103.
88. Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Developmental Biology* 2006; 299(1), 1-11.
89. Kim J. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 2012; 39(1), 10-14.
90. John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology* 2008; 32(1), 197–204.
91. Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hamalainen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, Huhtaniemi I, Liu K. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics* 2009; 18(15), 2813–2824.
92. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary From Genesis To Revelation. *Endocrine Reviews* 2009; 30(6),624-712.
93. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573), 1655-7.
94. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction* 2010; 25(12), 2944–2954.

95. Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology* 2005; 281(2), 160-70.
96. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307(5712), 1098-1101.
97. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124(3), 471-84.
98. Sansal I, Sellers WR. The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *American Society of Clinical Oncology* 2004; 22(14), 2954- 2963.
99. Adhikari D, Gorre N, Risal S. The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One* 2012; 7: e 39034.
100. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, De Pinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003; 301(5630), 215-8.
101. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24(50), 7410-7425.
102. Tran H, Brunet A, Grenier JM. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002; 296 (5567), 530-534.

103. Sandri M, Sandri C, Gilbert A. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; 117(3), 399-412.
104. Pelosi E, Omari S, Michel M, Ding J, Amano T, Forabosco A, Schlessinger D, Ottolenghi C. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nature Communications* 2013; 4,1843.
105. Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, Byzova TV. "Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo". *Nat. Med* 2005; 11: 1188–96.
106. Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. "Akt1 in endothelial cell and angiogenesis". *Cell Cycle* 2006; 5:512–8.
107. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D, Hemmings BA. "Physiological functions of protein kinase B/Akt". *Biochem. Soc. Trans* 2004; 32:350–4.
108. Peluso C, Fonseca FL, Rodart IF, Cavalcanti V, Gastaldo G, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B. AMH: An ovarian reserve biomarker in assisted reproduction. *Clin Chim Acta* 2014; 437:175-82.
109. Ivana Z, Dubravka T, Zeljka B, Ivana K. Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochemia Medica* 2011; 21(3):219–30.
110. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002; 124: 601-9.
111. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen AP, Hovatta O. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod* 2006; 21:2223-7.

112. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Hum Reprod Update* 2014; 20(3):370-8.
113. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of antiMullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007; 22:1837.
114. La Marca A, Grisendi V, Griesinger G. How Much Does AMH Really Vary in Normal Women? *Int J Endocrinol* 2013; 959487.
115. Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10):4057-63.
116. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S. AntiMullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2007;22(3):76671.
117. Ruess ML, Kline J, Santos R, Levin B, Timor-Tritsch I. Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:624.
118. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011; 26:1616–24.
119. Gazanfer AKSAKOĞLU. Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri. İzmir: 2001; 308.

120. Harada T, Kaponis A, Iwabe T. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2004; 10(1): 29,38.
121. Nishida M, Nasu K, Ueda T. Endometriotic cells are resistant to interferon gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: A possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(1): 29–34.
122. Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baranao R. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1b and vascular endothelial growth factor in endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Hum Reprod* 2003; 18,1767±1771.
123. Kosugi Y, Elias S, Malinak LR, Nagata J, Isaka K, Takayama M, Simpson JL, Bischoff FZ. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180,792±797.
124. Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, Thomas EJ, Campbell IG. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res* 1998; 58,1707±1712.
125. Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, Campbell IG. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid, but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998; 58,2095±2097.
126. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. *Dermatol Res Pract*, 2012; 354191.
127. Li XT, Wang HZ, Wu ZW. miR-494-3p regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by PTEN/AKT signaling in human glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(5): 679–87.

128. Tan W, Gu Z, Shen B. PTEN/Akt-p27(kip1) signaling promote the BM-MSCs senescence and apoptosis in SLE patients. *J Cell Biochem* 2015; 116(8): 1583–94.
129. Zheng W, Baker HE, Mutter GL. Involution of PTEN-null endometrial glands with progestin therapy. *Gynecol Oncol* 2004; 92(3): 1008–13.
130. Taylor RN, Yu J, Torres PB. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 2009; 16(2): 140–46.
131. Kim TH, Yu Y, Luo L. Activated AKT pathway promotes establishment of endometriosis. *Endocrinology* 2014; 155(5): 1921–30.
132. Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 2002; 277(13): 10760–66.
133. Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vignano` P, Di Blasio AM. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* 2007;13: 317–322.
134. Rai P, Shivaji S. The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One* 2011; 6: e18074.
135. Koninckx PR, Riittinen L, Seppala M. CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 1992; 57: 523–530.
136. Jayaprakasan K, Becker C, Mitral M. On behalf of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The effect of surgery for endometriomas on fertility. *BJOG* 2017; 1471-0528.

137. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(22), 10280-4.
138. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproductive Update* 2005; 11(5), 461–471.
139. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews* 2015; 36(1), 1–24.
140. Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P, Liu K. P27kip1 (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B) Controls Ovarian Development By Suppressing Follicle Endowment And Activation And Promoting Follicle Atresia In Mice. *Molecular Endocrinology* 2007; 21(9):2189-202.
141. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews* 2009; 30(5), 438-64.
142. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008; 319(5863), 611-3.
143. Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Molecular Endocrinology* 2002; 6(3), 580-99.

144. Novella-Maestre E, Herraiz S, Rodríguez-Iglesias B, Diaz-Garcia C, Pellicer A. Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients. *PLoS One* 2015; 10(5).

145. Matsuda F, Inoue N, Maeda A. Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* 2011; 57: 151–158.

146. Hikaru Yamamoto, Yoshiki Yamashita. Lower FOXO3 mRNA expression in granulosa cells is involved in unexplained infertility. *J Obstet Gynaecol Res* 2017; 43(6):1021-1028.

EKLER

Kısaltmalar Ve Simgeler

EM	: Endometriozis
DOR	: Düşük Over Rezervi
PTEN	: Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu
PI3K	: Fosfotidil-inositol-3 Kinaz
AKT	: Protein Kinaz B
FOXO3	: Forkhead Box O3
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
AFC	: Antral Folikül Sayısı
PIP2	: Fosfotidil-inositol Bifosfat
PIP3	: Fosfotidil-inositol Trifosfat
PDK1	: Fosfotidil-inositol Bağımlı Kinaz
POF	: Prematür Ovaryan Yetmezlik
StAR	: Steroidenic Acute Regulator Protein
E1	: Estron
E2	: Estrodiol
17 βHSD	: 17 Beta Hidroksi Steroid Dehidrogenaz
COX2	: Siklooksijenaz 2
PGE2	: Protoglandin E2
NK	: Natural Killer

DES : Dietilstilbesterol

MMP1 : Matrix Membran Protein 1

CA125 : Kanser Antijen 125

HE4 : Human Epididimal Antijen 4

USG : Ultrasonografi

Tv-USG : Transvajinal Ultrasonografi

MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme

GnRH : Gonadotropin Relasing Hormon

FSH : Folikül Stimüle Edici Hormon

LH : Luteinizan Hormon

PGH : Primordiyal Germ Hücreleri

ZP : Zona Pellüsida

KL : KIT Ligand

CDK : Siklin Bağımlı Kinaz

mTOR : Mammalian Target of Rapamycyn

IVF : In Vitro Fertilizasyon

PBS : Fosfat Basınçlı Salin

RT-PCR : Real Time PCR

GAPDH : Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz

Şekil Listesi

Şekil-1: Anjiogenezin PTEN ekspresyon seviyesi ile değişimi

Şekil-2: TV-USG ve MRG'de endometrioma görüntüleri

Şekil-3: Ovaryan Endometriozisin Folliküler Etkileri

Şekil-4: Primordiyal germ hücrelerinin göçü

Şekil-5: Embriyonik genital kabartıdan over ve testislerin farklılanması

Şekil-6: Ovarian foliküllerin gelişim döngüsü

Şekil-7: Primordiyal foliküllerin aktivasyonunu ovaryan kontrolü

Şekil-8: Serum AMH düzeyi ile PTEN gen ekspresyonu korelasyonu

Tablo Listesi

Tablo-1: Endometriozis Semptomları

Tablo-2: Endo Grup ve Non-Endo Grup Dahil Olma Kriterleri

Tablo-3: Primer dizaynı

Tablo-4: Endo Grup ve Non-Endo Grup demografik veriler ve biyokimyasal parametreleri

Tablo-5: Endo Grubu ve Non-Endo Grubu gen ekspresyonları

Tablo-6: Düşük Over Rezervi (DOR) ve Normal Over Rezervi (NOR) gruplarının gen ekspresyonları

Tablo-7: Endometrioma grubunda, düşük over rezervi (Endo-DOR) ve normal over rezervi (Endo-NOR) hastalarının gen ekspresyonları

Tablo-8: Çalışma grubunda serum AMH düzeyi ile gen ekspresyonlarının korelasyonu

Grafik Listesi

Grafik-1: Endo Grubu ile Non-Endo Grup arasında PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değişim seviyeleri

Grafik-2: Düşük Over Rezervi (DOR) ve Normal Over Rezervi (NOR) hastalarında PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değişim seviyeleri

Grafik-3: Endometrioma Grubunda, düşük over rezervi (Endo-DOR) ve normal over rezervi (Endo-NOR) PTEN, AKT ve FOXO3 gen ekspresyon kat değişim seviyeleri

TEŞEKKÜR

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi almaya başladığım ilk günden itibaren bilgisi ve tecrübesi ile desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitim ve çalışma yaşantımda her zaman yol gösteren ve bana ışık tutan, mesleki ve manevi anlamda üzerimde sayısız emeği bulunan başta tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gürkan UNCU'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen, mesleki gelişimimde çok büyük katkıları olan Prof. Dr. Hakan OZAN ve Prof. Dr. Kemal ÖZERKAN hocalarıma; ihtiyacım olduğunda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, çalışma disiplinleri ve becerileri ile bana örnek olan Doç. Dr. Işıl KASAPOĞLU, Dr. Öğr. Üy. Adnan ORHAN ve Öğr. Gör. Dr. Kiper ASLAN'a teşekkürü borç bilirim.

Üstün mesleki bilgi birikimi ve becerisi ile eğitimime sağladığı katkıların yanı sıra; sevgili oğlumun, benim ve ailemin değişmez bir parçası olması yolunda desteği ve emeği ile her zaman yanımda olan Doç. Dr. Bilge ÇETİNKAYA DEMİR hocama ayrıca teşekkür etmek isterim.

Tezimi hazırlamada, değerli bilgileri ile katkı sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Berrin AVCI'ya, araştırmanın başından itibaren emeğini ve ilgisini eksik etmeyen, sabırla ve azimle yanımda olan Uzm. Dr. Buse YÜKSEL, Araş. Gör. Dr. Cihan ÇAKIR ve Araş. Gör. Gökten KUŞPINAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma görevliliği sürecimde meslektaş olmaktan öte, arkadaş ve kardeş olarak birlikte çalıştığım arkadaşlarım Op. Dr. Nergis DÜZOK, Dr. Sevdener MERT, Dr. Oğuzhan YÜRÜK, Dr. Bahadır KOŞAN, Dr. Ayşenur KAYA ve Dr. Özge ALBAYRAK olmak üzere tüm hemşire, ebe ve sağlık personeline teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak mesleğe başlamamda en büyük örnek ve yol gösterici olan ablam Op. Dr. İdil ÖZTÜRK olmak üzere, beni bugünlere getiren sevgili aileme, hayatımı anlamlı kılan gösterdiği sabır ve sevgi ile her zaman desteğini yanımda hissettiğim, motivasyon ve enerji kaynağım sevgili eşim Gizem Ezgi ŞEN' e ve en büyük sabrı ve hoşgörüyü gösteren biricik oğlum Kuzey Mert ŞEN' e teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

28.02.1990 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Balıkesir Atatürk İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2008 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 6 yıllık tıp eğitimi aldım. 2014 yılında Balıkesir Gönen Devlet Hastanesi'nde mecburi hizmete başladım. 2015 Tıpta Uzmanlık Sınavı ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nı kazanarak uzmanlık eğitimime başladım. Uzmanlık eğitimim boyunca ulusal kongrelere katıldım.

