MESANE AĞRI SENDROMU/İNTERSTİSYEL SİSTİT (MAS/İS) HASTALIĞINDA DAİRESEL RNA'LARIN (circRNA'ların) POTANSİYEL BİYOMARKER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Merve DEMİRBAĞ KARAALİ

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE AĞRI SENDROMU/İNTERSTİSYEL SİSTİT (MAS/İS) HASTALIĞINDA DAİRESEL RNA'LARIN (circRNA'ların) POTANSİYEL BİYOMARKER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Merve DEMİRBAĞ KARAALİ

0000-0002-2874-0241

Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
(Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(2. Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

MESANE AĞRI SENDROMU / İNTERSTİSYEL SİSTİT (MAS/İS) HASTALIĞINDA DAİRESEL RNA'LARIN (circRNA'ların) POTANSİYEL BİYOMARKER OLARAK ARAŞTIRILMASI

Merve DEMİRBAĞ KARAALİ

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Mesane Ağrı Sendromu/İnterstisyel Sistit (MAS/İS), hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen, bakteriyel enfeksiyon veya tanımlanabilir bir patolojik neden olmaksızın idrar sıklığı, aciliyet, noktüri ve pelvik ağrı ile karakterize kronik bir hastalıktır. MAS/İS'ın patogenezi ve patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte ürotelyum yüzeyini kaplayan glikozaminoglikanların eksikliği, immünolojik etiyoloji, aktif mast hücreleri, nöral değişiklikler ve enflamasyonu içeren çeşitli teoriler öne sürülmektedir. Hastalığın tanısında altın standartlar yoktur ve klinisyenler tedaviye başlamak için eşlik eden hastalıklardan ortak olan birkaç semptomu ekarte etmek durumundadır. Erken tanıdaki komplikasyonlar tedaviyi zorlaştırmakta ve hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Dolayısıyla hastalığın altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve etkili tedavi stratejilerinin belirlenebilmesi için tanısal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Vücut sıvılarında stabilite, korunma ve yüksek bolluk gibi özellikleri ile dairesel RNA'lar (circRNA'lar), çeşitli hastalıkların teşhisi, izlenmesi ve prognozu için biyobelirteçler olarak büyük potansiyel sunmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, potansiyel bir biyobelirteç olan circRNA'ların, MAS/İS'in tanısı ve patogenezi üzerindeki rolü araştırıldı. Bu amaç kapsamında, sağlıklı ve hasta bireylerden elde edilen kan/doku örneklerinden circRNA, miRNA ve mRNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi yapıldı. Ardından literatür taraması ve biyoinformatik analizler sonucu belirlenen 11 aday circRNA'nın ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenerek sağlıklı ve hasta bireyler arasındaki ifade farklılıkları kıyaslandı. Elde edilen sonuçlar, circPTPN22 ve circMYBL2'nin hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İnterstisyel sistit, mesane ağrı sendromu, dairesel RNA, mikro RNA, Biyobelirteç

2024, x + 94 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF CIRCULAR RNAs (circRNAs)AS POTENTIAL BIOMARKERS IN BLADDER PAIN SYNDROME / INTERSTITIAL CYSTITIS (BPS/IC) DISEASE

Merve DEMİRBAĞ KARAALİ

Bursa Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI

Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome (IC/BPS) is a chronic disease characterized by urinary frequency, urgency, nocturia, and pelvic pain in the absence of bacterial infection or an identifiable pathological cause, significantly impacting patients' quality of life. The pathogenesis and pathophysiology of IC/BPS remain incompletely understood, with various hypotheses proposed, including a deficiency in glycosaminoglycans covering the urothelial surface, immunological etiology, activated mast cells, neural alterations, and inflammation. Currently, there are no established gold standards for diagnosing the disease, and clinicians must exclude several comorbid conditions with overlapping symptoms before initiating treatment. Challenges in early diagnosis complicate therapeutic interventions and further reduce patients' quality of life. Therefore, diagnostic biomarkers are essential for elucidating the underlying mechanisms of the disease and developing effective therapeutic strategies. Due to their stability, protection, and high abundance in bodily fluids, circular RNAs (circRNAs) offer great potential as biomarkers for the diagnosis, monitoring, and prognosis of various diseases. The present dissertation investigates the role of circRNAs as potential biomarkers in the diagnosis and pathogenesis of IC/BPS. In this context, circRNA, miRNA, and mRNA were isolated from blood/tissue samples obtained from healthy and diseased individuals, followed by cDNA synthesis. Subsequently, the expression levels of 11 candidate circRNAs, identified through literature review and bioinformatics analyses, were determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and compared between healthy and diseased individuals. The findings indicate that circPTPN22 and circMYBL2 may serve as potential biomarkers for elucidating the pathogenesis of IC/BPS.

Key words: Interstitial cystitis, bladder pain syndrome, circular RNA, micro RNA, Biomarker

2024, x + 94 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ilgisini ve desteğini asla esirgemeyen, her konuda gösterdiği anlayış ve bilgi birikimiyle beni yönlendiren kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na teşekkürlerimi sunarım.

Gerek tez çalışmam gerek akademik çalışmalarımda, doktora eğitimimin her aşamasında sabrı ve değerli katkılarıyla bana yol gösteren, her türlü sorunda kapısını çaldığım, kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilimsel ve deneysel anlamda bilgilerini esirgemeyen, her türlü olumsuzlukta başvurmaktan çekinmediğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sırasında aynı çalışma ortamını paylaştığım, desteğini ve yardımını esirgemeyen başta Sımpel PANTIR RETZEP olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel süreçlerinde laboratuvar imkanlarını ve bilgilerini sunan değerli hocalarım Doç. Dr. Figen ERSOY, Prof. Dr. Abdullah YALÇIN, Prof. Dr. Ferda ARI, Doç. Dr. Dilek PİRİM, Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT ve Doç. Dr. Özgür VATAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Burhan COŞKUN, Arş. Gör. Rıdvan POLAT, Doç. Dr. Yavuz Onur DANACIOĞLU, Doç. Dr. Tuncay TOPRAK ve Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇULHA'ya tez çalışmamda sağladığı hasta örnekleri ve değerli katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma sırasında 1002-Hızlı Destek Programı kapsamında sağladığı finansal destek (Proje No: 223S441) ve doktora eğitimim süresince BIDEB-2211-A kapsamında sunduğu doktora bursu için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince YÖK-100/2000 projesi kapsamında sağladığı burs için Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışması sırasında, mali desteğinden ötürü Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (FGA-2023-1387) teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun ve zorlu süreçte yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili eşime ve hayatımın her anında bana destek olan kıymetli aileme emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve DEMİRBAĞ KARAALİ

14/02/2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. İnsan Üriner Sistem 3
2.2. Mesane Anatomisi ve Fizyolojisi 3
2.3. Mesane Histolojisi 5
2.4. Mesane Patolojisi 6
2.5. Mesane Ağrı Sendromu/İnterstisyel Sistit: Tarihsel Gelişim ve Tanım 7
2.5.1 MAS/İS epidemiyolojisi 10
2.5.2 MAS/İS etiyoloji ve patofizyolojisi 12
2.5.3 Tanı ve tedavi 16
2.5.4 MAS/İS hastalığında kullanılan biyobelirteçler 19
2.6. Kodlamayan RNA'lar 20
2.7. Mikro RNA'lar 21
2.8. Dairesel RNA'lar 24
2.8.1 Dairesel RNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu 25
2.8.2 Dairesel RNA'ların tanımlanması ve karakterizasyonu 31
2.8.3 circRNA'ların insan hastalıklarındaki rolleri ve biyomarker olarak potansiyel kullanımları 32
3. MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.2. Yöntem 37
3.2.1 Hasta örneklerinin toplanması 37
3.2.2 Dairesel RNA'ların seçilmesi 41

3.2.3 Dokudan RNA izolasyonu 42
3.2.4 Kandan RNA izolasyonu 44
3.2.5 cDNA sentezi 45
3.2.6 circRNA primer tasarlama stratejisi 46
3.2.7 Kantitatif gerçek zamanlı PCR 54
3.2.8 Stem-loop qRT-PCR 57
3.3. İstatistiksel Analiz 59
4. BULGULAR 60
4.1. Aday circRNA'ların Küçük Örneklem Grubu ile (5 MAS/İS ve 5 sağlıklı kontrol) İfade Düzeylerinin Belirlenmesi 61
4.2. circPTPN22 ve circMYBL2'nin Tüm MAS/İS Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin Kan Örneklerindeki İfade Düzeyinin Belirlenmesi 64
4.3. Hunner Lezyonlu ve Hunner Lezyonsuz Doku Örneklerinde circPTPN22 ve circMYBL2'nin İfade Düzeyinin Belirlenmesi 70
4.4. circPTPN22 ve circMYBL2'nin Seçilen Olası Hedef miRNA'larının ve Hedef mRNA'larının MAS/İS ve Sağlıklı Kontrollerin Kan Örneklerindeki İfade Düzeylerinin Belirlenmesi 71
4.4.1 hsa-miR-4689 ve hedef mRNA'sı *S1PR1*'in ifade düzeyleri 71
4.4.2 hsa-miR-192 ve hedef mRNA'sı *CXCR5*'in ifade düzeyleri 72
4.4.3 *ALX3*'ün MAS/İS ve kontrol kan örneklerindeki ifade düzeyi 73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 75
KAYNAKLAR 81
ÖZGEÇMİŞ 93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
o Derece	Derece
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ml	Mililitre
ng	Nanogram

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AUA	Amerikan Üroloji Derneği
BSJ	Back Splice Junction
circRNA	Circular RNA
CP	Kronik Prostatit
CPPS	Kronik Pelvik Ağrı Sendromu
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ESSIC	Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışmaları Derneği
GAG	Glikozaminoglikan
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HIF-1-α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1-α
lncRNA	Long non-coding Ribonükleik asit
MAPP	Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain
MAS	Mesane Ağrı Sendromu
miRNA	Mikro Ribonükleik asit
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NHS	National Healty Service
NIDDK	Amerikan Ulusal Diyabet ve Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü
NHIS	Ulusal Sağlık Görüşme Anketi
İS	İnterstisyel Sistit
BPS	Bladder Pain Syndrome
IC	Interstitial Cystitis
HIC	Hunner type interstitial cystitis
NHIC	Non-Hunner interstitial cystitis
HDV	Hepatit Delta Virüsü
ncRNA	Non-coding Ribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RICE	RAND İnterstisyel Sistit Epidemiyoloji
RISC	RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi
piRNA	PIWI Interacting Ribonükleik asit

qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBP	RNA bağlayıcı protein
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
siRNA	Small Interfering Ribonükleik asit
sRNA	Small Ribonükleik asit
tRNA	Transfer Ribonükleik asit
XIST	X-Inactive Specific Transcript
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ZO-1	Zonula Occludens-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Böbrekleri, üreterleri, mesaneyi ve üretrayı gösteren erkek (sol) ve kadın (sağ) üriner sistemin temel anatomisi	3
Şekil 2.2.	Mesane sinirsel uyarımı	5
Şekil 2.3.	Mesane histolojisi	6
Şekil 2.4.	Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz mesanenin sistoskopik görüntüsü	9
Şekil 2.5.	miRNA biyogenezi	23
Şekil 2.6.	Kanonik splicing ve back-splicing işlemi	25
Şekil 2.7.	circRNA biyogenezi	27
Şekil 2.8.	circRNA'ların biyolojik fonksiyonları	29
Şekil 2.9.	CircRNA'ların tanımlanması ve analizi için kullanılan yöntemlerim şematik gösterimi	32
Şekil 3.1.	Dokudan RNA izolasyonu basamakları	43
Şekil 3.2.	circRNA primer tasarlama stratejisi	47
Şekil 3.3.	CircInteractome web aracı kullanılarak primer tasarlama	48
Şekil 3.4.	CircPrimer 2.0 aracı kullanılarak circRNA primerlerinin kontrolü	50
Şekil 3.5.	Aday olarak seçilen circRNA'ların ve internal kontrol olarak kullanılan circHIPK3'ün melting-curve grafikleri	56
Şekil 3.6.	Stem-loop RT-qPCR	58
Şekil 3.7.	RT stem-loop primerlerinin ikincil yapıları	53
Şekil 4.1.	Aday circRNA'ların 5 MAS/İS ve 5 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri üzerindeki ifade düzeyleri	62
Şekil 4.2.	Aday circRNA'lardan hsa_circ_0001021'in hasta (n=5) ve kontrol (n=5) grubundaki ifade düzeyi	63
Şekil 4.3.	circPTPN22 ve circMYBL2 aday circRNA'larının 5 MAS/İS ve 5 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri üzerindeki ifade düzeyleri	63
Şekil 4.4.	MAS/İS hastası ile 5 sağlıklı kontrol arasında kıyaslanarak analiz edilen tüm aday circRNA'ların ifade düzeylerini içeren grafik	64
Şekil 4.5.	circPTPN22 ve circMYBL2'nin tüm hasta ve kontrol örneklerindeki ifade düzeyi	65
Şekil 4.6.	circPTPN22 ve circMYBL2'nin Hunner lezyonlu (n=8) ve Hunner lezyonsuz (n=18)	66
Şekil 4.7.	circPTPN22 ve circMYBL'nin MAS/İS (n=12),	67

MAS/İS+Otoimmün hastalık (n=14)

Şekil 4.8. Ek otoimmün/otoenflamatuar hastalıkları olan MAS/İS hasta gruplarında circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade düzeyler 69

Şekil 4.9. circPTPN22 ve circMYBL2'nin MAS/İS hastalarından alınan lezyonlu/lezyonsuz doku çiftleri arasındaki ifade düzeyi 71

Şekil 4.10. hsa-miR-4689 ve hedef mRNA'sı olan *S1PR1*'in MAS/İS ve kontrol grubu arasındaki ifade düzeyi analizi A) hsa-miR-4689'un ifade düzeyi 72

Şekil 4.11. hsa-miR-192 ve *CXCR5*'in sağlıklı ve MAS/İS kan örnklerindeki ifade düzeyi 73

Şekil 4.12. *ALX3*'ün MAS/İS ve Kontrol Kan Örneklerindeki İfade Düzeyi 74

Şekil 5.1. circPTPN22 ve circMYBL2'nin CircInterectome, CircAtlas, CircBank ve StarBase veri tabanları tarafından tanımlanan miRNA hedeflerinin venn diyagramı 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.1.	MAS/İS terminoloji	10
Çizelge 2.2.	Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz MAS/İS arasındaki histolojik farklar	14
Çizelge 2.3.	MAS/İS tanı ve teşhisi için AUA tarafından oluşturulan kılavuz beyanları	17
Çizelge 3.1.	Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazların listesi	35
Çizelge 3.2.	Tez çalışması kapsamında kullanılan kitler, kimyasal maddeler ve sarf malzemelerin listesi	36
Çizelge 3.3.	Hasta ve kontrol örnek sayıları	37
Çizelge 3.4.	MAS/İS hastalarına ait bilgiler	39
Çizelge 3.5.	Sağlıklı gönüllülere ait bilgiler	41
Çizelge 3.6.	Aday circRNA'ların ilişkili olduğu yolaklar ve hedefleri	42
Çizelge 3.7.	Dokudan izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları	43
Çizelge 3.8.	RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları	44
Çizelge 3.9.	cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları	46
Çizelge 3.10.	Tez çalışması kapsamında kullanılan circRNA primerleri ve dizileri	49
Çizelge 3.11.	qRT-PCR için kullanılan bileşenler	54
Çizelge 3.12.	qRT-PCR için uygulanan inkübasyon adımları	55
Çizelge 3.13.	Tez kapsamında analiz edilen hedef mRNA'ların primer dizileri	55
Çizelge 3.14.	Stem-loop qRT-PCR için kullanılan primerler ve dizileri	58
Çizelge 3.15.	Stem-loop RT cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve inkübasyon adımları	59
Çizelge 4.1.	MAS/İS hastalarının klinik özellikleri	60
Çizelge 5.1.	circMYBL2'nin olası hedef miRNA'larının listesi	78

1. GİRİŞ

Mesane Ağrı Sendromu/İnterstisyel Sistit (MAS/İS), genellikle orta yaşlarda başlayan ve pelvik ağrı, nokturi, aciliyet ve idrar sıklığı gibi semptomlarla karakterize edilen bir hastalıktır. Hastalığın patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, mesane dokusundaki glikozaminoglikan (GAG) tabakasının azalmasını takiben epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantıların (tight junctions) zayıflaması sonucu idrarın üst epitel tabakasından daha derin katmanlara sızarak lamina propria altında enflamatuar bir yanıt oluşturduğu düşünülmektedir. MAS/İS tedavisinde pentozan polisülfat sodyum, non-steroid antiinflamatuar ilaçlar ve cerrahi müdahaleler gibi çeşitli yaklaşımlar uygulanmaktadır. Ancak, mevcut tedaviler hastalarda kalıcı bir iyileşme sağlayamamakta ve hastaların yaşam kaliteleri önemli ölçüde azalmaktadır. Hastalığın moleküler düzeydeki etiyopatogenezi tam olarak aydınlatılamadığı için tedavi yaklaşımları da kısıtlı kalmaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, dairesel RNA'ların (circRNA'ların) hastalık biyolojisinde önemli roller oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Geleneksel lineer RNA'lardan farklı olarak halkasal bir yapıya sahip olan circRNA'lar, yüksek stabiliteleri ve gen regülasyonundaki etkileri nedeniyle potansiyel biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır. Ancak, MAS/İS hastalığında circRNA'ların rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu tez çalışması, MAS/İS hastalarında circRNA'ların ifade profillerini inceleyerek, hastalığın moleküler mekanizmasına dair yeni bilgiler sağlamayı amaçlamaktadır.

Mevcut literatür, circRNA'ların başlıca hedefleri arasında mikro RNA'ların (miRNA'ların) bulunduğunu göstermektedir. miRNA'lar ise mRNA'ları hedefleyerek transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda kritik roller üstlenmektedir. Bu bağlamda, belirli circRNA'ların miRNA-mRNA etkileşimleri aracılığıyla MAS/İS'in patofizyolojisinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

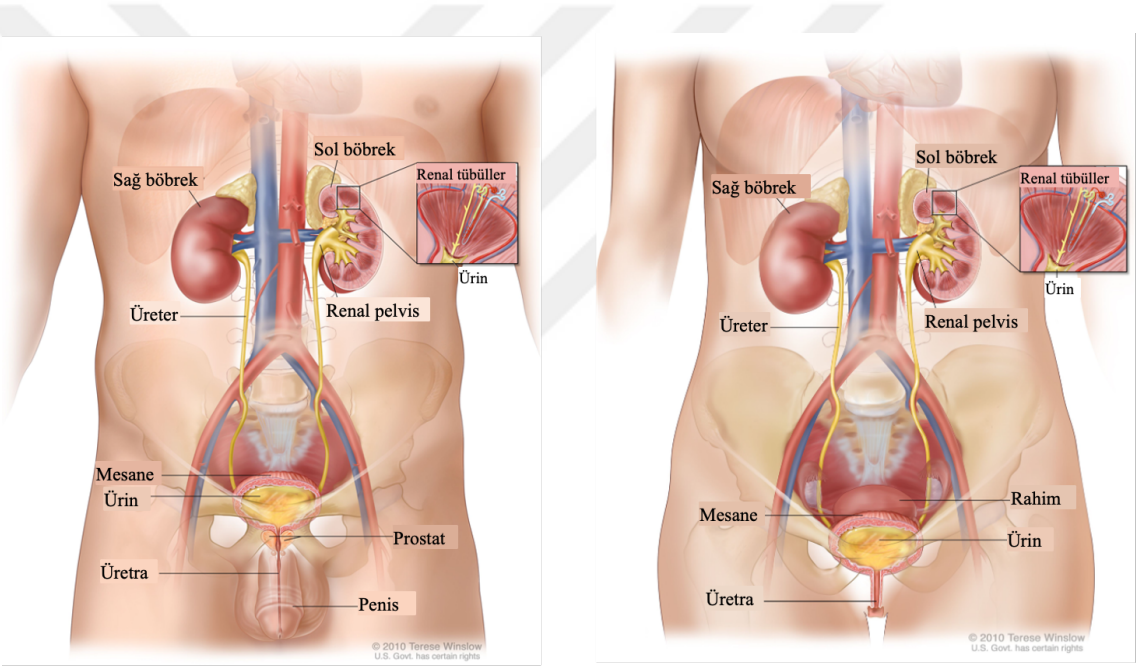
Bu çalışmada, biyoinformatik analizler ve literatür taramaları doğrultusunda hastalık mekanizmalarında rol oynayabilecek circRNA'lar belirlenmiştir. Ardından, MAS/İS

hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda bu circRNA'ların ifade düzeylerindeki farklılıklar incelenmiştir. Belirlenen farklılıklar doğrultusunda, ilgili circRNA'ların hedeflediği miRNA'lar ve ilişkili mRNA'lar, sağlıklı ve hasta bireylerden alınan kan örnekleri ile hasta bireylerden elde edilen lezyonlu ve lezyonsuz doku örneklerinde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Böylece MAS/İS hastalığında circRNA'ların rolü ve bu hastalıkta etkili olabilecek circRNA-miRNA-mRNA hattı boyunca gen regülasyonu detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İnsan Üriner Sistem

Üriner sistem, böbrekler, üreterler, mesane ve üretradan oluşan ve temel olarak idrarın üretilmesi, depolanması ve vücuttan atılmasını sağlayan bir yapıdır (Şekil 2.1). Karın boşluğunun arka tarafında yer alan böbrekler, kanı süzerek idrarı üretirken, üreter adı verilen iki tüp, idrarı böbreklerden karnın alt kısmında bulunan, idrarın depolandığı mesaneye taşımaktadır. Son olarak, idrar, üretra olarak adlandırılan bir kanaldan geçerek vücuttan dışarı atılmaktadır (Drake ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.1. Böbrekleri, üreterleri, mesaneyi ve üretrayı gösteren erkek (sol) ve kadın (sağ) üriner sistemin temel anatomisi (National Cancer Institute (NCI), 2024'ten değiştirilerek alınmıştır)

2.2. Mesane Anatomisi ve Fizyolojisi

Mesane, idrar rezervuarı görevi gören, yüksek derecede genişleyebilen bir organdır. Pelvik boşlukta bulunan mesane, idrarla dolduğunda karın boşluğuna doğru genişlemektedir. Kadınlarda rahim önünde, erkeklerde ise pubis kemiğinin arkasında ve

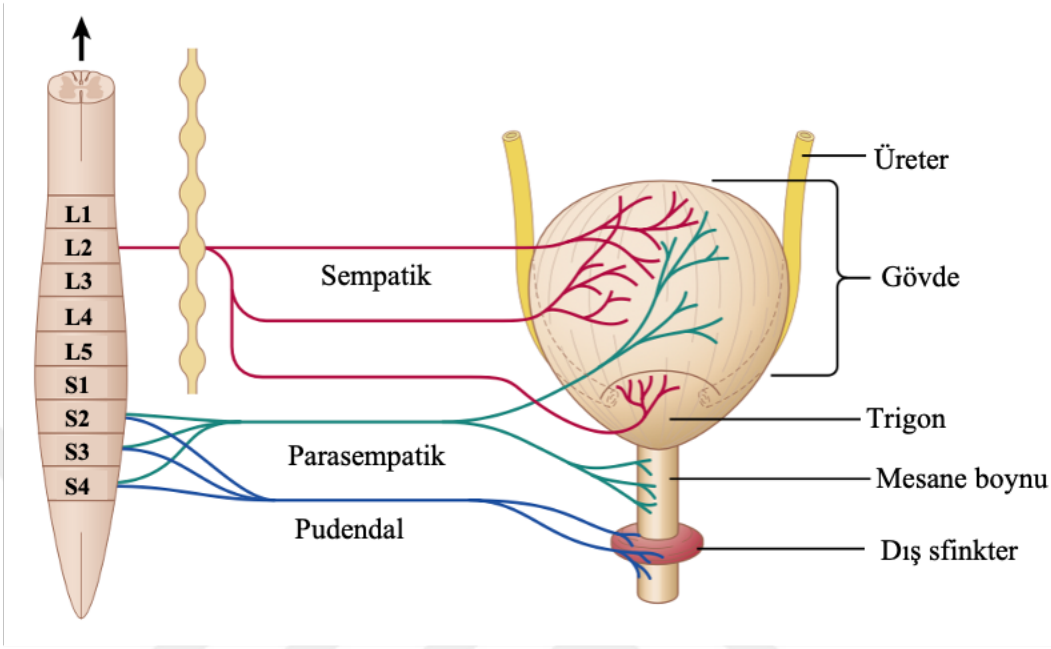
rektumun önünde yer almaktadır. Erkeklerde anatomi benzerdir ancak rahim yoktur ve mesanenin altına prostat eklenmektedir.

Mesane, detrusor kası olarak adlandırılan düzensiz çapraz şeritlerden oluşmaktadır. Detrusor kası, mesanenin orta kısmında bulunan ve ön, arka ve yan duvarlarını kaplayan düz kas tabakasıdır. Kas lifleri her yöne doğru uzanmaktadır ve kasıldığında mesanedeki basıncı 40 ila 60 mmHg'ye kadar artırabilmektedir. Dolayısıyla, detrusor kasının kasılması, mesanenin boşaltılmasında önemli bir adımdır.

Mesane iki ana bölümden oluşmaktadır: (1) mesanenin ana kısmı olan, idrarın toplandığı gövde; (2) gövdenin huni şeklinde bir uzantısı olan ve üretraya bağlanan boyun. Mesanenin tabanı, ters bir üçgen şekline sahiptir ve genellikle posteroinferior yönde bulunmaktadır. Tabanın üst köşelerinden her birine birer üreter girmektedir. Tabanın alt köşesinden ise üretra, mesaneden aşağıya doğru uzanmaktadır. Mesanenin içindeki üreter ve üretra açıklıkları arasındaki pürüzsüz üçgen şekilli alan, trigon olarak bilinmektedir (Drake ve diğerleri, 2023). Üreterler, mesaneye girerken detrusor kası boyunca eğik bir şekilde ilerlemekte ve mesaneye boşalmadan önce mesane mukozasının 1 ila 2 santimetre altından geçmektedir. Mesane boynu, 2-3 santimetre uzunluğunda olup, duvarı yüksek miktarda elastik doku ile örülmüş detrusor kasından oluşmaktadır. İç sfinkter olarak adlandırılan bu kas, mesane basıncı kritik bir eşiğin üzerine çıkana kadar mesanenin boşalmasını önlemektedir. Üretra, dış sfinkter adı verilen bir kas tabakasından oluşan ürogenital diyaframdan geçmektedir. İstemli bir kas olan dış sfinkter, idrarın tutulmasını ve/veya kontrol edilmesini sağlamaktadır (Hall ve Hall, 2021).

Mesanenin sinirsel uyarımı, genel olarak pelvik sinirler aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu sinirler, sakral pleksus üzerinden omuriliğin S2-S3 segmentlerine bağlanmaktadır. Pelvik sinirler hem duyusal hem de motor sinir liflerini taşımaktadır. Parasempatik lifler olan motor sinir lifleri, detrusor kasını uyararak mesanenin boşaltılmasını sağlamaktadır. Pelvik sinirin yanı sıra pudendal sinir ve hipogastrik sinirler de mesanenin işlevinde önemli rol oynamaktadır. Pudendal sinir aracılığıyla taşınan lifler, dış sfinkteri uyararak idrarın kontrol edilmesini sağlamaktadır. Sempatik sinir sisteminin bir parçası olan

hipogastrik sinirler, omuriliğin lomber bölgesindeki L2 segmentine bağlanmaktadır. Bu sinirler, doluluk ve ağrı hissinin algılanmasında etkilidir (Şekil 2.2) (Hall ve Hall, 2021).

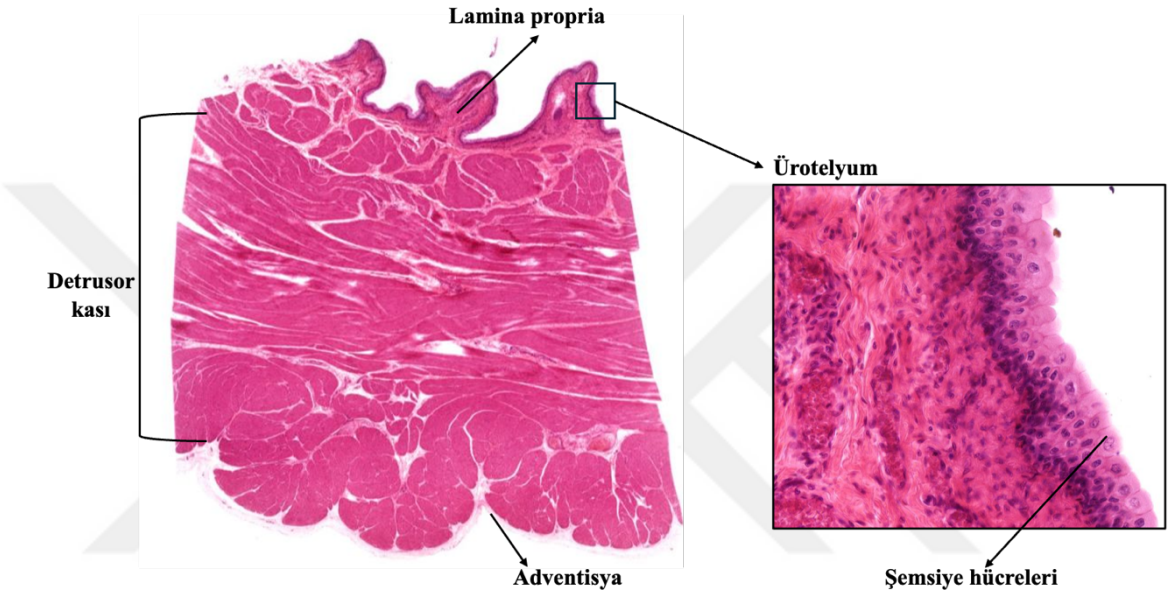


Şekil 2.2. Mesane sinirsel uyarımı (Hall ve Hall, 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

2.3. Mesane Histolojisi

Mesanenin iç yüzeyi epitel hücreleri (ürotelyum) ile kaplıdır. Ürotelyumun kalınlığı, bulunduğu bölgeye ve mesane distansiyon derecesine bağlı olarak 2 ila 7 katman arasında değişmektedir. Ürotelyum, yüzeysel/şemsiye hücreleri, ara hücreler ve bazal hücreler olmak üzere üç tip hücre içermektedir (Jost ve diğerleri, 1989). Şemsiye hücreleri, ürotelyumun en iç yüzeyinde ara hücrelerin üzerinde yatay olarak konumlanmıştır ve idrarla doğrudan temas etmektedir. Boyutları diğer ürotelyal hücrelerden daha büyüktür. Bol miktarda eozinofilik sitoplazma içeren bu hücreler, çift çekirdekli olabilmektedir. Ara hücreler, şemsiye hücrelerinin altında, şemsiye hücrelerine dik bir şekilde yerleşmiş, uzun ve polarize morfolojiye sahiptir. Bazal hücreler, bazal membran üzerinde yer alır ve boyutları ara hücrelerden daha küçüktür. Yoğun kromatin yapıları içeren bu hücreler, daha düşük transkripsiyonel aktivite göstermektedir (Zhou ve diğerleri, 2021). Ürotelyal bazal membranın hemen altında, çok sayıda damar, lenf damarı, elastik lif ve sinirlerin bulunduğu bir bağ dokusu vardır. Buna genellikle "lamina propria" denilmektedir (Şekil

2.3) (Dixon ve Gosling, 1983). Lamina propriadan sonra, kalın bir kas tabakası olan detrusor kası yer almaktadır. Detrusor kası, uzunlamasına ve dairesel kas liflerinden oluşmaktadır ve asetilkolinesteraz açısından zengindir. Bu enzim, nörotransmitter olan asetilkolini parçalayarak sinirsel iletimi düzenlemekte ve böylece kasların kasılması ve gevşemesinde rol oynamaktadır. Son olarak detrusor kası, mesaneyi çevreleyen perivezikal yağ dokusuyla (adventisya) birleşmektedir (Ro ve diğerleri, 1987).



Şekil 2.3. Mesane histolojisi (Robert L. Sorenson ve T. Clark, 2024)

2.4. Mesane Patolojisi

Mesanede oluşan herhangi bir anormallik veya hastalık mesane patolojisi olarak tanımlanmaktadır. Bu anormallikler mesanenin yapısını, işlevini veya her ikisini de etkileyebilmektedir (H. Zhou ve diğerleri, 2021). En yaygın mesane sorunları şunlardır:

Mesane kanseri; mesanedeki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine neden olan bir kanser türüdür Genellikle ürotelyum hücrelerinde başlar.

Sistit; mesanede iltihaplanmaya neden olan bakteriyel bir enfeksiyondur. İdrar yolu enfeksiyonunun en sık görülen türüdür.

İnterstisyel sistit/mesane ağrısı sendromu; mesanede ağrıya ve sık veya ani idrara çıkma isteğine neden olan uzun süreli bir durumdur.

Aşırı aktif mesane; daha sık idrara çıkma veya istemeden idrar kaçırmaya neden olan bir durumdur.

İdrar tutamamak; mesanenin kontrol edilemediği bir durumdur.

Mesane taşları; mesanede oluşan mineral yığınlarıdır. Genellikle mesanelerini tamamen boşaltmada zorluk yaşayan insanları etkilemektedir (National Library of Medicine, 2024).

2.5. Mesane Ağrı Sendromu/İnterstisyel Sistit: Tarihsel Gelişim ve Tanım

Mesane Ağrı Sendromu/İnterstisyel Sistit (MAS/İS), öncelikle idrar torbasını etkileyen ve çeşitli rahatsız edici semptomlara yol açan karmaşık ve kronik bir durumdur. Bu durum, tarih boyunca farklı isimler ve tanımlamalarla anılmış, zamanın tıbbi bilgisine göre değişiklik göstermiştir.

İnterstisyel sistit benzeri bir durum, ilk kez 1808 yılında, Philadelphia'lı cerrah Philip Syng Physick tarafından mesanede ülser kaynaklı bir iltihap olarak tanımlanmış ve "tic douloureux of the bladder" olarak adlandırılmıştır. Günümüzde trigeminal nevralji olarak bilinen "Tic douloureux" terimi, o dönemde, yüzün trigeminal siniri boyunca ani, şiddetli ağrı ataklarıyla karakterize bir durumu tanımlamak için kullanılmaktaydı. Physick'in bu konuda yazılı bir kaydı bulunmamakla birlikte, öğrencilerinin ders notları, bu durumun kronik sıklık, aciliyet ve ağrı ile ilişkilendirildiğini ve o dönemde bu semptomların en yaygın nedeni olan mesane taşları ile mesane ülserini ayırt etmek için Physick'in, sondalama yöntemine yaptığı vurguyu belgelemektedir (Parsons ve Parsons, 2004).

İnterstisyel sistit terimi, yazılı olarak ilk kez 19. yüzyılda, Samuel D. Gross'un kitabında, mesanenin tüm katmanlarını etkileyen bir iltihap türünü tanımlamak için kullanılmıştır (Gross, 1876). Daha sonra Guy Hunner, yaptığı çalışmalarla, kadınlarda görülen bir mesane ülseri (lezyon) türünü tanımlayarak bu duruma "Hunner ülseri" adını vermiştir.

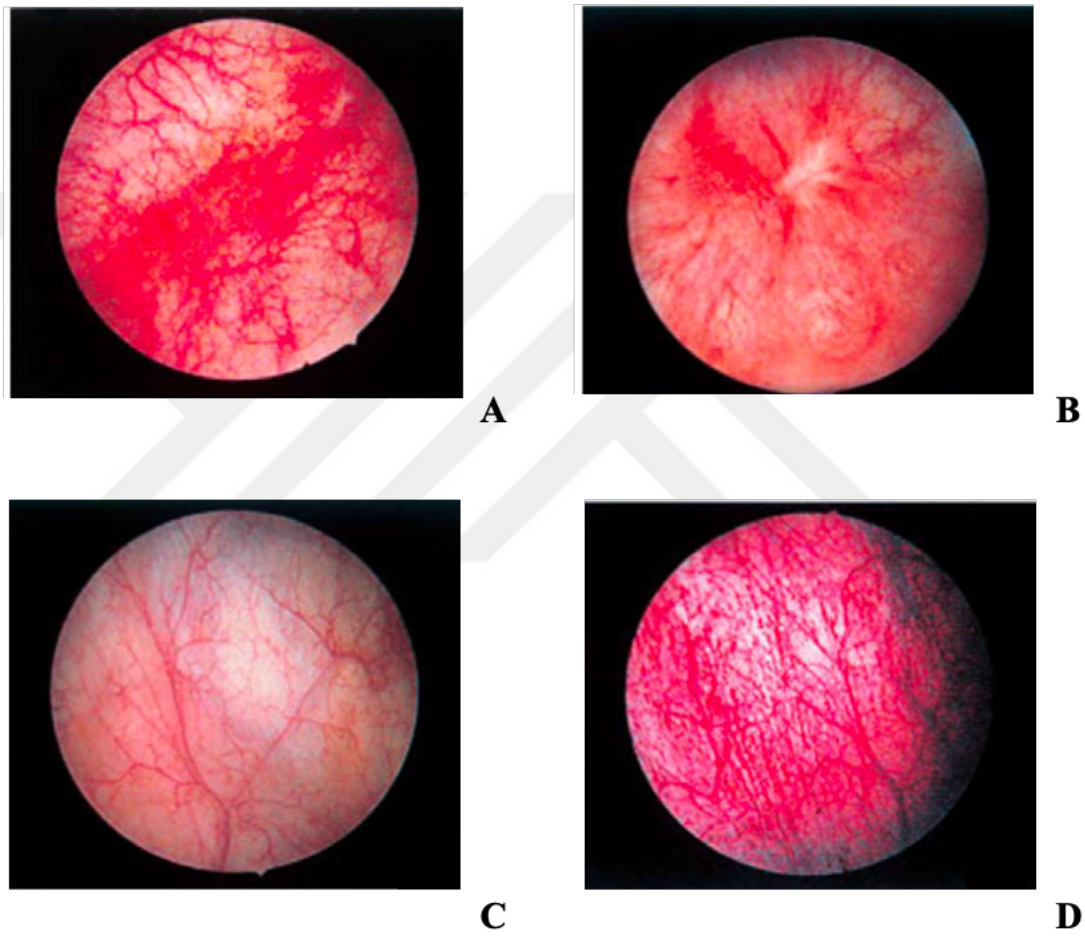
Hunner'ın tarif ettiği lezyonlar intersitisyel sistit için uzun bir süre tanı kriteri olarak kabul edilmiştir. Hunner ayrıca, mesane ülserini tanımlayan birçok çalışmayı incelemiş ve Amerikan Üroloji Derneği (AUA) gibi bir organizasyonun, konuyu her açıdan gözden geçirmek ve mevcut bilgilere hizmet edecek bir terminoloji benimsemek için küçük bir komite ataması konusunda çağrıda bulunmuştur (Hunner, 1915, 1918).

MAS/İS ile ilgili ilk tanı kriterleri, 1987 ve 1988 yıllarında Amerikan Ulusal Diyabet ve Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü (NIDDK) tarafından oluşturulmuştur. Ancak, bu kriterler yalnızca bilimsel araştırmalara yönelik tasarlandığı için klinik tanıda yetersiz kalmıştır (Gillenwater ve Wein, 1988). 2008 yılında Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışmaları Derneği (ESSIC), yayımladığı konsensüs raporuyla, MAS/İS tanımını, sınıflandırmasını ve tanı kriterlerini yeniden ele almıştır. Bu raporda, hastalık "mesane ağrı sendromu" olarak adlandırılmış ve idrar kesesiyle ilişkili olduğu algılanan kronik pelvik ağrı, basınç veya rahatsızlığa, sürekli idrara çıkma isteği veya sık idrara çıkma gibi en az bir diğer semptomun eşlik etmesi şeklinde tanımlanmıştır. Ayrıca, hastalığın yalnızca Hunner lezyonlarıyla sınırlı olmadığı, lezyonsuz vakaları da kapsayan daha geniş bir tanım geliştirilmiştir. ESSIC, AUA isimlendirme önerileriyle uyumlu olarak MAS/İS terimlerini birlikte kullanmıştır (van de Merwe ve diğerleri, 2008).

MAS/İS, Ürodinami, Kadın Pelvik Tıbbı ve Ürogenital Rekonstrüksiyon Derneği (Society of Urodynamics, Female Pelvic Medicine & Urogenital Reconstruction, SUFU) tarafından "Enfeksiyon veya diğer tanımlanabilir nedenlerin yokluğunda, altı haftadan uzun süren, alt idrar yolu semptomlarıyla birlikte görülen ve idrar torbasıyla ilişkili olduğu düşünülen hoş olmayan bir his (ağrı, baskı, rahatsızlık)" şeklinde tanımlanmıştır. AUA, kılavuzlarında bu tanımı benimsemiştir (Hanno ve diğerleri, 2009, 2011).

MAS/İS, Hunner lezyonlarının varlığına göre iki alt gruba ayrılmaktadır: Hunner tipi İS (HIC) ve MAS. HIC, Hunner lezyonlarının bulunduğu MAS/İS formunu, MAS ise Hunner lezyonlarının olmadığı MAS/İS formunu temsil etmektedir. HIC, belirgin endoskopik bulgulara ve kendine özgü enflamatuar histopatolojiye sahipken, MAS bu özelliklerden yoksundur. Hunner lezyonu, normal kapiller yapının bulunmadığı, çevresinde fibrin pıhtıları veya skar dokusu ile çevrili ve damarların birleşim noktalarında

yer alan kırmızımsı mukoza lezyonlarıdır (Şekil 2.4 A-B). Hunner lezyonu olmayan hastaların mesanesi genellikle normal görünümdedir (Şekil 2.4 C). Bununla birlikte, Hunner lezyonu bulunmayan bazı hastalarda, hidrodistansiyon sonrası mesane lümeninde boşalma fazında birden fazla bölgede kanama gözlemlenebilmektedir. Kanama sonrası mesane mukozasında kırmızı noktalar veya damar ağları şeklinde glomerülasyonlar (kan izleri) görülmektedir (Şekil 2.4 D) (Homma, 2019).



Şekil 2.4. Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz mesanenin sistoskopik görüntüsü **A-B)** Hunner lezyonlu **C)** Hunner lezyonsuz MAS/İS normal mesane görüntüsü **D)** Hunner lezyonsuz MAS/İS hidrodistansiyon sonrası mukozal kanama (glomerülasyon) (Homma, 2019)

MAS ve İS terimleri semptomatik ve biyolojik olarak ayırt edilemediğinden dolayı, bu iki terim MAS/İS şeklinde birlikte kullanılmaktadır. Ancak, son araştırmalar Hunner lezyonlarının varlığına ve yokluğuna göre bu iki durumun biyolojik olarak oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Hunner lezyonlarının bulunduğu form, mesanede belirgin

histolojik enflamatuar değişiklikler ile karakterize bir hastalıkken, lezyonların olmadığı formda mesanede neredeyse hiç enflamasyon görülmemektedir (Akiyama, 2020; Akiyama ve diğerleri, 2019, 2023; Maeda ve diğerleri, 2015). İS genellikle, kronik pelvik ağrı, baskı veya rahatsızlık ile birlikte aciliyet ve sık idrara çıkma gibi hipersensitif mesane (HSB) semptomları ve mesane enflamasyonu ile ilişkili Hunner lezyonlarının bulunduğu bir mesane hastalığı; MAS ise Hunner lezyonlarının ve karışabilir hastalıkların olmadığı HSB semptomları ile karakterize bir durum olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1) (Homma ve diğerleri, 2024).

Çizelge 2.1. MAS/İS terminoloji (Homma ve diğerleri, 2024)

Terim	Tanım
Hipersensitif mesane semptomları	İdrar torbası ile ilişkili olduğu düşünülen kronik pelvik ağrı, baskı veya rahatsızlık, artmış mesane dolum hissi, aciliyet ve sık idrara çıkma gibi diğer idrar semptomlarıyla birlikte görülen durum
İnterstisyel sistit	Hunner lezyonları bulunan mesane hastalığı, genellikle HSB semptomları ve mesane iltihabı ile ilişkilidir
Mesane ağrı sendromu	Hunner lezyonları ve karışabilecek hastalıklar bulunmayan, HSB semptomları ile karakterize durum

2.5.1 MAS/İS epidemiyolojisi

MAS/İS tanısında objektif bir belirtecin bulunmaması, hastalığın prevalansını belirlemeye yönelik çalışmaların yürütülmesini zorlaştırmaktadır. Popülasyon tabanlı prevalans çalışmalarında üç yöntem kullanılmıştır: katılımcılara bu duruma sahip olduklarının bir sağlık uzmanı tarafından teşhis edilip edilmediğini soran öz-rapor çalışmaları; MAS/İS'i düşündüren semptomların varlığını belirlemeye yönelik semptom değerlendirme anketleri ve bir popülasyondaki bireylerin MAS/İS tanısı aldığına dair idari fatura verilerinin analizini içeren klinik teşhis yöntemleri. Farklı yöntemlerin kullanılması, oldukça farklı prevalans tahminleriyle sonuçlanmıştır (Clemens ve diğerleri, 2022).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), MAS/İS prevalansını belirlemeye yönelik öz-rapor yöntemini kullanan iki büyük çalışma gerçekleştirilmiştir. İlk çalışma, 1989 yılında

Ulusal Sağlık Görüşme Anketi (NHIS) kapsamında yapılmış, ikinci çalışma ise 1988-1994 yılları arasında, Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NHANES III) çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışmada da MAS/İS için aynı tanım kullanılmıştır. Bu iki çalışmadan elde edilen prevalans tahminleri birbirine oldukça yakın sonuçlar vermiştir. NHIS tahminlerine göre MAS/İS prevalansı, her 100.000 kişide 500 ve kadınlarda 100.000 kişide 865 olarak belirlenmiştir. NHANES III verilerine göre ise genel prevalans, 100.000 kişide 470, erkeklerde 100.000'de 60, kadınlarda ise 100.000'de 850 olarak hesaplanmıştır (Clemens ve diğerleri, 2007, 2022).

RAND İnterstisyel Sistit Epidemiyoloji (RICE) çalışması, epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmak üzere iki farklı MAS/İS tanımı geliştirmiştir. Bu tanımlardan ilki, MAS/İS vakalarını tespit etmede yüksek duyarlılığa (%81) sahipken, MAS/İS olmayan vakaları dışlamada düşük özgüllük (%54) göstermektedir. İkinci tanım ise MAS/İS olmayan vakaları dışlamada yüksek özgüllük (%83) sunarken, MAS/İS vakalarını tespit etmede düşük duyarlılık (%48) sergilemektedir. ABD'deki yetişkin kadınlarda MAS/İS prevalansını belirlemek amacıyla, RICE çalışması kapsamında bu iki tanımı içeren bir anket uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, %2,7 ile %6,53 (18 yaş ve üzeri yaklaşık 3,3 ila 7,9 milyon kadın) arasında prevalans tahminleri elde edilmiştir. Ancak, bu tanımlara uyan kadınların yalnızca %9,7'si MAS/İS tanısı aldığını ifade etmiştir (Berry ve diğerleri, 2010, 2011). Suskind ve diğerleri (2013), erkekler için vaka tanımını değiştirmiş ve Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH)-Kronik Prostatit Semptom İndeksi'nden türetilen ek bir vaka tanımını kullanarak erkeklerde MAS/İS ile kronik prostatit/kronik pelvik ağrı sendromu (CP/CPPS) arasındaki prevalans ve örtüşmeyi değerlendirmiştir. Bu çalışma sonucunda, erkeklerde MAS/İS prevalansı %2,9 ile %4,2 arasında, CP/CPPS prevalansı ise %1,8 olarak tahmin edilmiştir. İki sendrom arasındaki örtüşme oranı yaklaşık %17 olarak saptanmıştır. Bu bulgular, erkeklerde MAS/İS prevalansının kadınlardaki oranlara yaklaştığını ve bu nedenle erkeklerde büyük ölçüde tanı konulamamış olabileceğini düşündürmektedir.

1994 ve 1995 yıllarında, NHS (National Healty Service)'deki kadınlara, 'interstisyel sistit' teşhisi alıp almadıklarını soran bir anket gönderilmiştir. Olumlu yanıt veren katılımcılarda, tıbbi kayıtlar incelenerek tanılar doğrulanmış ve bu yöntemle MAS/İS

prevalansı, NHS I kohortunda 52/100.000, NHS II kohortunda ise 67/100.000 olarak belirlenmiştir (Curhan ve diğerleri, 1999). Daha sonra, Portland, Oregon'daki Kaiser Permanente Northwest yönetimli bakım nüfusundan alınan idari faturalama verileri kullanılarak yapılan bir çalışmada, MAS/İS tanısı konmuş kadınlarda prevalans 197/100.000, erkeklerde ise 41/100.000 olarak bulunmuştur (Clemens ve diğerleri, 2005).

MAS/İS genellikle 40 yaş üstü bireylerde görülmektedir (Roberts ve diğerleri, 2003). Hastalık başlangıçta değişken bir şekilde aciliyet, sıklık, noktüri veya ağrı gibi tek bir semptomla ortaya çıkmaktadır ve zamanla artarak birden fazla semptom eşlik etmektedir (Driscoll ve Teichman, 2001). Hastalarda, semptomların şiddetlendiği ataklar yaygın olarak görülmektedir. Bu ataklar, pelvik semptomların yanı sıra pelvik olmayan semptomları da (örneğin; ishal) içerebilmektedir. Semptomlar, hafiften şiddetliye kadar değişkenlik gösterirken, süreleri dakikalardan yıllara kadar uzanabilmektedir. Semptom sıklığı ise günlük olabildiği gibi yılda birden daha az da görülebilmektedir (Sutcliffe ve diğerleri, 2015).

2.5.2 MAS/İS etiyoloji ve patofizyolojisi

MAS/İS'in etiyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, farklı mekanizmalar ve patojenik faktörlerin bu hastalığa katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir. Mevcut veriler, enflamasyon, otoimmünite, enfeksiyon, eksojen maddeler, üretelyal defektler ve nörojenik mekanizmaları içeren kompleks bir etiyolojik yapıyı işaret etmektedir (Homma ve diğerleri, 2020).

MAS/İS'in birincil bir mesane bozukluğu mu yoksa mesane semptomlarının başka bir nedene bağlı olarak ortaya çıkan ikincil bir fenomen mi olduğu bilinmemektedir. Ancak, çeşitli araştırmalar, diğer sistemik kronik bozukluklar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. NIH tarafından desteklenen Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Araştırma Ağı verilerine göre, MAS/İS hastalarının %44'ünde en az bir ek kronik ağrı durumu bulunmaktadır (Krieger ve diğerleri, 2015). MAS/İS, sıklıkla fibromiyalji, vulvodini, Sjogren sendromu, kronik yorgunluk sendromu, endometriozis ve irritabl bağırsak sendromu gibi çeşitli kronik ağrı durumları ile birlikte

görülmektedir (Buffington, 2004; McLennan, 2014; Warren ve diğerleri, 2009). Bunun yanı sıra, MAS/İS hastalarında depresyon ve anksiyete gibi ruh sağlığı bozuklukları sıkça gözlenmektedir. Bu psikolojik semptomlar bazı hastalarda reaktif bir yanıt olarak gelişebilse de genetik bağlantı çalışmaları MAS/İS ile panik bozukluğu arasında bir ilişki olduğunu ve bu durumların ortak bir biyolojik mekanizmayla ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Talati ve diğerleri, 2008; Weissman ve diğerleri, 2004).

Hastalar pelvik ağrı, basınç/rahatsızlık hissi ve sık idrara çıkma gibi benzer semptomlar gösterse de MAS/İS, farklı fenotipler sergileyebilen heterojen bir klinik sendromdur. Bu fenotipler mesane odaklı fenotip, pelvik taban fenotipi ya da sistemik veya yaygın belirtilerle karakterize fenotipler olarak üçe ayrılabilir. Bazı hastalarda, Hunner lezyonları, küçük mesane kapasitesi ve mesane içine uygulanan lokal anesteziklerle azalan ağrı gibi mesane odaklı fenotipler gözlenmektedir. Pelvik taban fenotipinde ise pelvik taban kaslarında hassasiyet ağrıya duyarlılık gibi durumlar görülmektedir. Sistemik veya yaygın belirtilerle karakterize fenotiplerde, pelvis dışındaki yaygın ağrı, fibromiyalji ve irritabl bağırsak sendromu gibi kronik ağrı bozukluklarının eşlik ettiği durumlar, depresyon, anksiyete ve travma gibi psikososyal zorluklar bulunmaktadır (Lai ve diğerleri, 2012; Naliboff ve diğerleri, 2015). Farklı fenotiplerin varlığı, MAS/İS'in patofizyolojisinin ve tedavi yaklaşımlarının hasta grubuna özgü olarak ele alınmasını gerektirmektedir (Clemens ve diğerleri, 2022).

Hunner lezyonu, bu hastalığın histopatolojik olarak tanımlanabilen kanıtlanmış tek fenotipi olarak kabul edilmektedir. MAS/İS'in histopatolojisi üzerine yapılan geçmiş çalışmalarda, Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz MAS/İS arasındaki farklar çoğu zaman ayırt edilmemiştir. Ancak, yapılan son çalışmalar, Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz MAS/İS arasındaki histolojik farkların önemli olduğunu göstermektedir (Akiyama ve diğerleri, 2019; Homma ve diğerleri, 2020; Maeda ve diğerleri, 2015).

MAS/İS etiyolojisinde kronik enflamasyon temel bir rol oynamaktadır. Hunner lezyonlu MAS/İS hastalarının mesane mukozasında belirgin immünolojik enflamasyon gözlenirken, Hunner lezyonsuz hastalarda bu durum genellikle minimal düzeydedir. Enflamasyon yalnızca Hunner lezyonlarıyla sınırlı kalmayıp, lezyonsuz alanlarda da

görülmektedir. Histolojik analizler, enflamatuar hücrelerin çoğunlukla lenfositler ve plazma hücrelerinden oluştuğunu ve subepitelyal bölgede yoğunlaştığını ortaya koymaktadır. Hastaların yaklaşık %40'ında lenfoid agregatlar veya foliküller tespit edilmiş olup, bu durum lokalize immün yanıtın önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Öte yandan, az sayıda eozinofil ve nötrofil bulunmasına karşın, enfeksiyöz akut enflamasyona işaret eden yoğun nötrofilik infiltrasyon hiçbir şekilde gözlenmemiştir (Homma ve diğerleri, 2020; Maeda ve diğerleri, 2015).

Hunner lezyonlu MAS/İS hastalarında görülen bir diğer önemli histolojik bulgu epitelyal denudasyondur. Bu durumda, epitel kalınlığında azalma meydana gelmekte ve sıklıkla tabaka tamamen kaybolmaktadır. Denudasyon, lezyonlu ve lezyonsuz alanlarda her ikisinde de görülmekle birlikte, lezyonlu alanlarda daha belirgindir. Epitelyal denudasyonla birlikte artmış mikrovasküller, ödem, fibrozis, kanama ve fibrin eksüda gibi bulgular da gözlemlenmektedir (Maeda ve diğerleri, 2015). Tüm bu değişikliklerin enflamasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Akiyama ve diğerleri, 2019).

Hunner lezyonsuz MAS/İS hastalarının mesanesinde enflamatuar değişiklikler görülmemekte veya çok az görülmektedir. Epitel tabakaları genellikle iyi korunmuş olup mesane biyopsi örnekleri genellikle normal mesaneden ayırt edilememektedir. Ancak bazı hastalarda, subepitelyal stromada orta derecede yoğun fibrozis gözlemlenmiştir (Maeda ve diğerleri, 2015). Çizelge 2.2'de, Hunner lezyonlu ve lezyonsuz MAS/İS arasındaki temel histolojik farklar özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz MAS/İS arasındaki histolojik farklar (Homma ve diğerleri, 2020)

	Hunner Lezyonlu MAS/İS	**Hunner Lezyonsuz MAS/İS**
Subepitelyal kronik enflamasyon	Mevcut	Yok veya minimal
İnfiltre eden enflamatuar hücre tipleri	Lenfositler ve plazma hücreleri baskın	Hafif iltihap olsa bile plazma hücreleri az
Lenfoid foliküller	Sıklıkla mevcut	Son derece nadir
Ürotelyal epitelyum	Çoğunlukla soyulmuş	Tam katman korunmuş

Nörokimyasal transmitterler, nörojenik enflamasyon olarak adlandırılan hafif nöral enflamatuar değişiklikler ile merkezi sinir sisteminde duyarlılığın artmasına neden olmakta ve mast hücreleri, bu süreçte merkezi bir rol oynamaktadır (Anand ve diğerleri, 2012). Hunner lezyonsuz MAS/İS, şiddetli fibrosiz ve artmış mast hücre infiltrasyonu ile karakterize edilmektedir (A. Kim ve diğerleri, 2017). Ancak, MAS/İS'de mast hücre infiltrasyonunun etiyolojik ve klinik önemi tartışmalıdır. Mast hücrelerini belirlemek için kullanılan boyama yöntemleri değişkenlik göstermektedir ve insan gözüyle yapılan mast hücre sayımı gözlemsel hatalara açık olup güvenilirliği sınırlamaktadır. Bazı araştırmacılar detrusor mastositozunun önemini vurgulasa da yeterli detrusor kası içeren biyopsi örnekleri elde etmek zordur. Sonuç olarak, detrusor mast hücre sayımına dayalı tanı kriterlerinin klinik uygulanabilirliği sınırlıdır. Mast hücre sayımı, tek başına tanısal bir araç olmaktan ziyade, histolojik analizlerde tamamlayıcı bir ölçüt olarak değerlendirilmektedir (Akiyama ve diğerleri, 2018; Homma ve diğerleri, 2024).

MAS/İS, sıklıkla otoimmün hastalıklarla birlikte görülmektedir (Peeker ve diğerleri, 2003; Wen ve diğerleri, 2019; Yueh ve diğerleri, 2021). Bu durum, hastalığın otoimmün bir temeli olabileceğini düşündürmektedir. MAS/İS hastalarının kan ve idrarında otoantikorların varlığına işaret eden çalışmalar da bu görüşü desteklemektedir (Keay ve diğerleri, 1997; Ochs ve diğerleri, 1994). Hasar ile ilişkili moleküler paternler (damage-associated molecular patterns, DAMP) gibi hücresel bileşenlerden kaynaklanan endojen patojenler enflamatuar yanıta neden olabilmektedir (Yu ve diğerleri, 2010). Japon popülasyonunda, Hunner lezyonlu MAS/İS hastaları üzerinde yapılan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), MHC bölgesinde yer alan ve MHC sınıf II moleküllerinde amino asit değişikliklerine neden olan risk varyantlarının hastalık riskini artırdığını göstermiştir (Akiyama ve diğerleri, 2023).

Hunner lezyonlu MAS/İS mesanelerinde, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) 1-α'nın aşırı ifadesi rapor edilmiştir (Akiyama ve diğerleri, 2019; Akiyama ve diğerleri, 2021). HIF1-α ifadesinin, Hunner lezyonlarının olduğu alanlarda, Hunner lezyonu olmayan alana kıyasla artmıştır daha yüksek seviyelerde bulunduğu gösterilmiştir (Akiyama ve diğerleri, 2019). Hunner lezyonlu

MAS/İS'in enflamatuar doğası göz önüne alındığında, artan anjiyogenezin kronik enflamasyonun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (Homma ve diğerleri, 2024).

İdrarda bulunan bazı maddeler mesaneye zarar verebilmekte veya tahriş edici etki gösterebilmektedir. Bazı çalışmalar, belirli diyetlerin MAS/İS semptomlarını kötüleştirebileceğini göstermektedir (Sutcliffe ve diğerleri, 2015; Ueda ve diğerleri, 2014). Ek olarak, idrar alkalizasyonun, idrar asiditesini azaltarak HSB semptomlarını hafiflettiği gözlenmiştir (Ueda ve diğerleri, 2014).

Ürotelyal bariyerin bozulması, idrar veya idrardaki bileşenlerin mesane duvarına geçmesine neden olarak afferent sinirlerin aşırı aktivitesine yol açmaktadır. Ürotelyal geçirgenlikteki artış ve/veya fonksiyonel bozukluklar, ürotelyumu kaplayan glikozaminoglikan (GAG) tabakasındaki anormalliklerden kaynaklanabilmektedir (Klingler, 2016). Ayrıca, MAS/İS hastalarının mesanesinde E-kadherin ve zonula occludens-1 (ZO-1) gibi sıkı bağlantı proteinlerinin (tight junction proteins) aşağı regülasyonu bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2012).

2.5.3 Tanı ve tedavi

MAS/İS tanısı oldukça zordur. Hastalar, geniş bir semptom yelpazesi, fiziksel muayene bulguları ve klinik test yanıtlarıyla başvurmaktadır. Bu durum, yanlış tanı, yetersiz tanı ve gecikmiş tanıya yol açmaktadır. Klinik uygulamalarda MAS/İS tanısı için yeterli literatür bulunmamaktadır. MAS/İS tanısı ve tedavisi için klinik bir çerçeve sunmak amacıyla (Clemens ve diğerleri, 2022) tarafından bir kılavuz yayımlanmıştır. MAS/İS tanısı için oluşturulan kılavuzlar, klinik ilkeler ve uzman görüşlerine dayanmaktadır ve görüş farklılıkları durumunda modifiye Delphi tekniği ile konsensüs sağlanmıştır. Kılavuz beyanları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. MAS/İS tanı ve teşhisi için AUA tarafından oluşturulan kılavuz beyanları (Clemens ve diğerleri, 2022)

Kılavuz Beyanları			**Açıklama**
Tanı		1	Temel değerlendirme, MAS/İS'i karakterize eden semptomları ve belirtileri belgelemek ve hastanın semptomlarına neden olabilecek diğer bozuklukları dışlamak için dikkatli bir öykü, fizik muayene ve laboratuvar incelemesini içermelidir. *Klinik Prensip*
		2	Sonraki tedavi etkilerini ölçmek için temel boşaltma semptomları ve ağrı düzeyleri kaydedilmelidir. *Klinik İlke*
		3	Tanı şüpheli olduğunda sistoskopi ve/veya ürodinamik inceleme düşünülmelidir; bu testler karmaşık olmayan sunumlarda tanı koymak için gerekli değildir. *Uzman Görüşü*
		4	Hunner lezyonlarından şüphelenilen hastalarda sistoskopi yapılmalıdır. *Uzman Görüşü*
Yönetim Yaklaşımı		5	Tedavi kararları genellikle hastaya riskler, potansiyel faydalar ve alternatifler hakkında bilgi verilerek paylaşılan karar alma sürecinden sonra verilmelidir. Hunner lezyonları olan hastalar hariç, ilk tedavi cerrahi dışı olmalıdır. *Uzman Görüşü*
		6	Tedavinin etkinliği periyodik olarak yeniden değerlendirilmeli ve etkisiz tedaviler durdurulmalıdır. *Klinik Prensip*
		7	Multimodal ağrı yönetimi yaklaşımları (örneğin, farmakolojik, stres yönetimi, varsa manuel fizik tedavi) başlatılmalıdır. Ağrı yönetimi, yaşam kalitesi açısından önemi nedeniyle etkinliği açısından sürekli olarak değerlendirilmelidir. Ağrı yönetimi yetersizse, multidisipliner bir yaklaşım düşünülmeli ve hasta uygun şekilde sevk edilmelidir. *Klinik İlke*
		8	Birden fazla tedavi yaklaşımından sonra iyileşme olmazsa MAS/İS tanısı yeniden değerlendirilmelidir. *Klinik Prensip*
MAS/İS için tedavi kategorileri	Davranışsal/ilaç dışı tedaviler	9	Hastalar, normal mesane fonksiyonu, MAS/İS hakkında bilinen ve bilinmeyenler, mevcut tedavi alternatiflerinin yararları ile riskleri/yükleri, hastaların çoğunluğu için etkili tek bir tedavinin bulunmadığı ve kabul edilebilir semptom kontrolünün elde edilmeden önce birden fazla terapötik seçeneğin (kombinasyon tedavisi dahil) denenmesini gerektirebileceği konusunda eğitilmelidir. *Klinik İlke*
		10	Semptomları iyileştirebilecek öz bakım uygulamaları ve davranış değişiklikleri tartışılmalı ve mümkün olduğunca uygulanmalıdır. *Klinik İlke*
		11	Hastalar, başa çıkma tekniklerini iyileştirmek ve stres kaynaklı semptom alevlenmelerini yönetmek için stres yönetimi uygulamalarını uygulamaya teşvik edilmelidir. *Klinik İlke*
		12	Uygun manuel fizik tedavi teknikleri (örneğin, pelvik, abdominal ve/veya kalça kas tetik noktalarını çözen, kas kontraktürlerini uzatan ve ağrılı yara izlerini ve diğer bağ dokusu kısıtlamalarını serbest bırakan manevralar), uygun şekilde eğitilmiş klinisyenler mevcutsa, pelvik taban hassasiyeti olan hastalara önerilmelidir. Pelvik taban güçlendirme egzersizlerinden (örneğin, Kegel egzersizleri) kaçınılmalıdır.

Çizelge 2.3. MAS/İS tanı ve teşhisi için AUA tarafından oluşturulan kılavuz beyanları (Devamı)

MAS/İS için tedavi katagorileri	Ağızdan alınan ilaçlar	13	Klinikçiler hastalara riskler ve faydalar konusunda danışmanlık yaptıktan sonra farmakolojik ağrı yönetimi ajanları (örneğin, idrar analjezikleri, asetaminofen, NSAID'ler, opioid/opioid olmayan ilaçlar) reçete edebilir. MAS/İS için farmakolojik ağrı yönetimi prensipleri, diğer kronik ağrı durumlarının yönetimine benzer olmalıdır. *Klinik Prensip*
		14	Amitriptilin, simetidin, hidroksizin veya pentosan polisülfat oral ilaçlar olarak uygulanabilir (sıralamada herhangi bir hiyerarşi ima edilmemiştir).
		15	Klinikçiler, pentosan polisülfat kullanmayı düşünen hastalara makula hasarı ve görmeyle ilgili yaralanmalar için potansiyel risk konusunda danışmanlık yapmalıdır. *Klinik İlke*
		16	Oral siklosporin A, özellikle fulgurasyona ve/veya triamsinolona dirençli Hunner lezyonları olan hastalara önerilebilir.
	Mesane içi damlatmalar	17	DMSO, heparin ve/veya lidokain intravezikal tedaviler olarak uygulanabilir (sıralamada herhangi bir hiyerarşi ima edilmemiştir).
	Prosedürler	18	Anestezi altında kısa süreli, düşük basınçlı hidrodistansiyonla sistoskopi bir tedavi seçeneği olarak yapılabilir.
		19	Hunner lezyonları mevcutsa, fulgurasyon (lazer veya elektrokoter ile) ve/veya triamsinolon enjeksiyonu yapılmalıdır.
		20	Diğer tedaviler semptomlarda ve yaşam kalitesinde yeterli iyileşme sağlamadıysa intradetrusor onabotulinumtoxin A uygulanabilir. Hastalar tedavi sonrası aralıklı kendi kendine kateterizasyonun gerekli olabileceği olasılığını kabul etmeye istekli olmalıdır.
		21	Diğer tedaviler yeterli semptom kontrolü ve yaşam kalitesi iyileştirmesi sağlamadıysa nöromodülasyon denemesi yapılabilir. Sinir uyarımı denemesi başarılı olursa kalıcı bir nörostimülasyon cihazı implante edilebilir.
	Büyük ameliyat	22	Majör cerrahi (örneğin, ikame sistoplasti, sistektomi ile veya sistektomi olmadan üriner diversiyon) mesane merkezli semptomları olan dikkatlice seçilmiş hastalarda veya nadir durumlarda, son evre küçük fibrotik mesane olduğunda ve diğer tüm tedavilerin yeterli semptom kontrolü ve yaşam kalitesi iyileştirmesi sağlamada başarısız olduğu hastalarda yapılabilir.
Sunulmaması gereken tedaviler		23	Uzun süreli oral antibiyotik uygulaması önerilmemelidir.
		24	Bacillus Calmette-Guerin'in intravezikal instilasyonu araştırma çalışması ortamları dışında önerilmemelidir.
		25	Yüksek basınçlı, uzun süreli hidrodistansiyon önerilmemelidir.
		26	Sistemik (oral) uzun süreli glukokortikoid uygulaması önerilmemelidir.

MAS/İS belirtileri diğer idrar yolu rahatsızlıklarıyla örtüşebilmekte ve belirli bir testle teşhis edilememektedir. Tanı süreci genellikle hastanın öyküsü ve semptomlarının dikkatlice değerlendirilmesi ile başlamaktadır. Ağrının süresi, şiddeti, yeri ve ne zaman başladığı gibi detaylar sorgulanmaktadır. İdrar sıklığı, acil idrara çıkma ihtiyacı ve gece idrara kalkma gibi belirtiler dikkate alınmakta ve ardından, fizik muayene yapılarak pelvik taban kaslarında hassasiyet olup olmadığı değerlendirilmektedir. İdrar yolu enfeksiyonlarını ve diğer idrar patolojilerini ekarte etmek için idrar tahlili ve idrar kültürü yapılmaktadır. Bu testler, idrarda kan, beyaz kan hücreleri veya bakterilerin varlığını kontrol etmektedir. Sistoskopi, mesanenin içini incelemek için kullanılmakta ve mesane duvarındaki Hunner lezyonları veya diğer anormal yapılar değerlendirilmektedir. Potasyum hassasiyet testi de kullanılabilir; mesane içine potasyum çözeltisi verilerek ağrı ve rahatsızlık olup olmadığı değerlendirilebilir. MAS/İS'li hastalar bu çözeltiye karşı daha hassas olabilirler. Urodinamik testler, mesanenin ve idrar yolunun işlevini değerlendirmekte, mesane kapasitesi, mesane basıncı ve idrar akış hızlarını ölçmektedir. Diğer pelvik hastalıkları ekarte etmek için transvajinal ultrason veya pelvik MRI (Magnetic Resonance Imaging) gibi görüntüleme yöntemleri de kullanılabilmektedir. MAS/İS tanısı koymak için diğer olası hastalıkların ekarte edilmesi oldukça önem taşımaktadır çünkü MAS/İS, idrar yolu enfeksiyonları, mesane kanseri, böbrek taşları veya vulvodini gibi durumlarla karışabilmektedir. Bu nedenle, kapsamlı bir değerlendirme yapılması ve diğer olası nedenlerin dışlanması gerekmektedir. MAS/İS tanısı konduğunda, tedavi, semptomları hafifletmeye yönelik olarak planlanmaktadır (Clemens ve diğerleri, 2022).

2.5.4 MAS/İS hastalığında kullanılan biyobelirteçler

MAS/İS tanısında çeşitli biyobelirteçler araştırılmaktadır. Bunlar arasında idrar ve serumda bulunan sinir büyüme faktörü (NGF) ile proinflamatuar sitokinler ve kemokinler yer almaktadır (Furuta ve diğerleri, 2018; Jiang ve diğerleri, 2014; Kim ve diğerleri, 2014; Niimi ve diğerleri, 2018). Ayrıca, pro-nosiseptif inflamatuar yanıtlarla ilişkili kemokin ve reseptör seviyelerinin dokuda arttığı bildirilmiştir. İdrar metabolomik analizleri, MAS/İS hastalarında sülfokonjuge edilmiş 5-beta indirgenmiş bir testosteron izomerinin yüksek seviyelerde olduğunu göstermiştir (Parker ve diğerleri, 2016). Ancak, hastalığın

tanısında yaygın olarak kabul gören ve klinik kullanımı standardize edilmiş güvenilir bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır (Magalhaes ve diğerleri, 2019).

2.6. Kodlamayan RNA'lar

1958 yılında Francis Crick tarafından ortaya atılan merkezi dogma (central dogma), genetik bilginin DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine aktarıldığını öne sürerek moleküler biyolojinin temelini oluşturmuştur (Crick, 1958). Ancak, İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla birlikte, insan genomunun yalnızca %2'sinin protein kodladığı ortaya çıkmıştır (Birney ve diğerleri, 2007). Geri kalan %98'lik kısım "çöp/junk" DNA olarak değerlendirilmiştir. Fakat son 20 yıldır yapılan araştırmalar, genomun büyük bir kısmının kodlamayan RNA (non-coding RNA, ncRNA)'lara dönüştürüldüğünü ve bu RNA'ların gen regülasyonunda önemli roller oynadığını ortaya koymaktadır (Mattick ve Makunin, 2006). Ayrıca, kodlamayan DNA miktarı ve buna bağlı olarak kodlamayan RNA'ların transkripsiyonu ile organizmaların bilişsel ve gelişimsel karmaşıklık düzeyi arasında güçlü bir ilişki olduğu vurgulanmıştır (Taft ve Mattick, 2003). Büyük intronlar içeren genlerin kanser hücrelerinde daha düşük transkripsiyonel aktiviteye sahip olduğu, ancak sinir hücrelerinde daha yüksek transkripsiyonel aktivite sergilediği gösterilmiştir. Bu durum, kodlamayan genomun düzenleyici potansiyelini ve dokuya özgü gen ekspresyonu desenleriyle olan bağlantısını ortaya koymaktadır (Ferreira ve Esteller, 2018; Taft ve diğerleri, 2007).

Genetik bilginin proteine çevrilmesinde aracı rol oynayan ribozomal RNA'lar (rRNA) ve transfer RNA'lar (tRNA) ncRNA grubuna ait iki temel transkripttir. Hücredeki çeşitli biyolojik süreçleri kontrol eden ve genetik bilginin ifadesini yönlendiren, farklı işlevsel ncRNA molekülleri de vardır. Bu moleküller, boyutlarına göre küçük kodlamayan RNA'lar (small RNA, sRNA) ve uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA, lncRNA) olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. sRNA'lar 200 nükleotidden daha kısa RNA moleküllerini, lncRNA'lar ise 200 nükleotidden daha uzun RNA moleküllerini kapsamaktadır (Ferreira ve Esteller, 2018; Kapranov ve diğerleri, 2007). Bunlar arasında mikroRNA'lar (microRNA, miRNA), small interfering RNA'lar (siRNA) ve PIWI interacting RNA'lar (piRNA) yer almaktadır. Bu küçük RNA molekülleri, Argonaute

ailesi proteinleri aracılığıyla, gen ifadesini transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde düzenlemektedir (Mattick ve diğerleri, 2023). Bunun yanı sıra, memelilerde H19 ve XIST (X-inactive specific transcript) gibi düzenleyici lncRNA'lar da tanımlanmıştır (Bartolomei, Zemel ve Tilghman, 1991; Brown ve diğerleri, 1992).

Son yıllarda dikkat çeken ve normal ve patolojik durumlardaki biyolojik süreçlerde önemli düzenleyici roller oynayan endojen bir ncRNA sınıfı olan dairesel RNA'lar (circular RNA, circRNA), kendine özgü döngüsel yapıları sayesinde yüksek stabiliteye sahip, kararlı ve korunmuş moleküllerdir. Doku, hücre tipi ve gelişim evresine özgü bir şekilde ifade edilen circRNA'lar, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde gen ifadesini düzenlemektedir. Özellikle miRNA süngerleme başta olmak üzere çeşitli mekanizmalarla biyolojik süreçlerde kritik roller üstlenmektedir (Hansen ve diğerleri, 2013; Memczak ve diğerleri, 2013; Salzman ve diğerleri, 2012).

ncRNA'lar, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve genom organizasyonunda kritik roller oynayan işlevsel moleküllerdir. Bu moleküllerin düzensiz ekspresyonları birçok insan hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Özellikle miRNA'lar, lncRNA'lar ve circRNA'ların, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları gibi çeşitli patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller oynadığı gösterilmiştir. Son yıllarda yüksek verimli dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, ncRNA'ların biyolojik çeşitliliği ve fonksiyonel rolleri daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılmaya başlanmıştır (Nemeth ve diğerleri, 2024). Bu gelişmeler, ncRNA'ların hastalık biyobelirteçleri ve terapötik hedefler olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

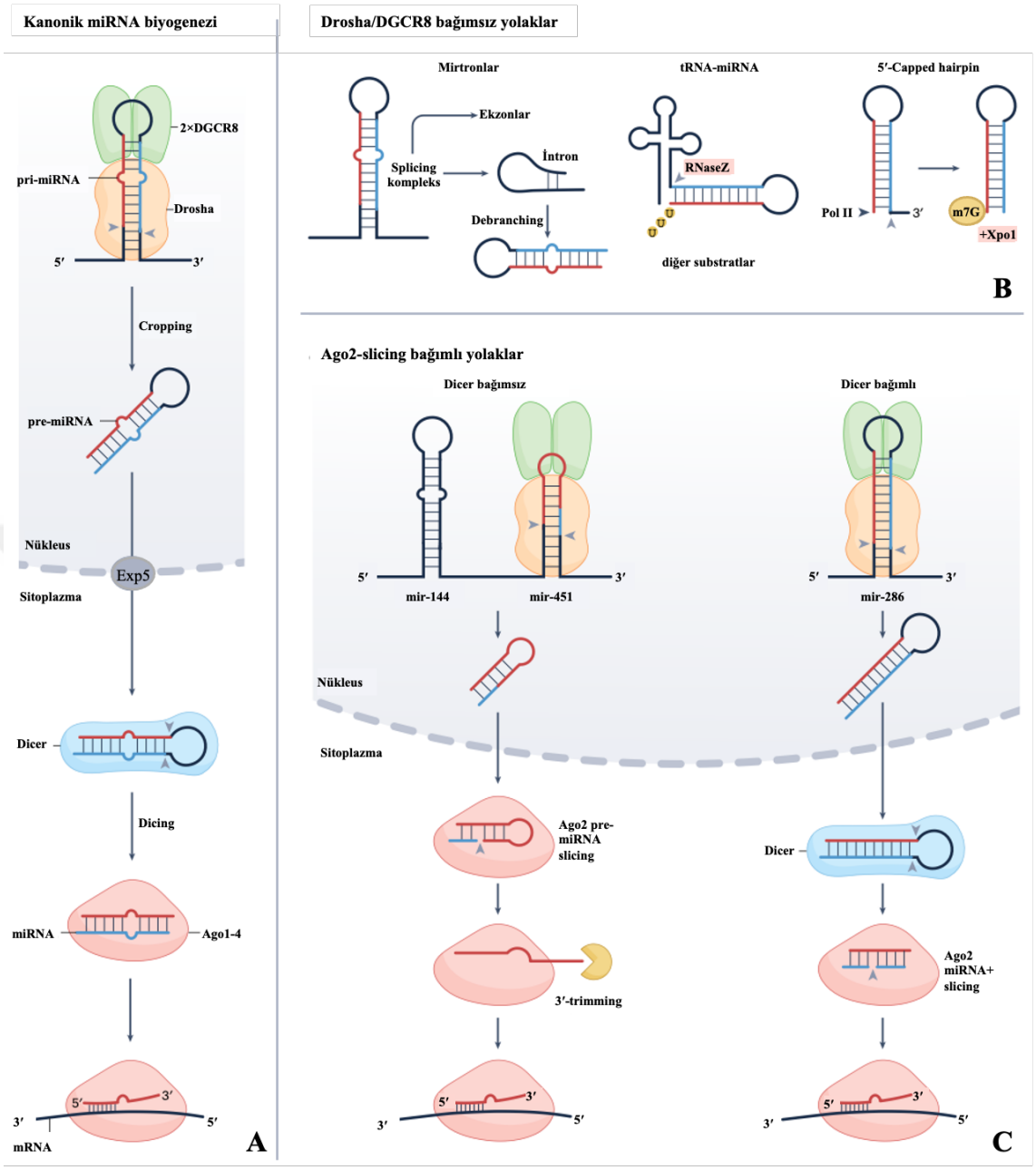
2.7. Mikro RNA'lar

miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli, düzenleyici ncRNA molekülleridir. İlk olarak, *Caenorhabditis elegans* larvalarında kısa bir ncRNA molekülü olan lin-4'ün, lin-14 proteininin ifadesini baskılayarak larva gelişimini düzenlemesiyle keşfedilmiştir (Lee ve diğerleri, 1993). Ardından *C. elegans'ta* diğer bir kısa ncRNA

olan let-7'nin keşfi ve ncRNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolünün anlaşılmasıyla birlikte miRNA'ların önemi açığa çıkmıştır (Reinhart ve diğerleri, 2000).

miRNA genleri, DNA'dan mRNA'ya kopyalanan pri-miRNA transkriptleri üretmek için RNA polimeraz II veya nadiren polimeraz III tarafından transkribe edilmektedir. Pri-miRNA'lar daha sonra Drosha ve DGCR8'i içeren bir nükleaz kompleksi tarafından kesilerek ~70 nükleotid uzunluğunda stem-loop yapıya sahip pre-miRNA'lara işlenmektedir. Oluşan pre-miRNA'lar, exportin-5 tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınarak Dicer adlı bir nükleaz kompleksi tarafından kesilmekte ve böylece olgun miRNA'lar oluşmaktadır. Çoğu miRNA intragenik bölgelerden üretilmektedir, bu da genellikle intronlardan veya protein kodlayan genlerin ekzonlarından türetildikleri anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların bir kısmı intergenik, yani protein kodlamayan DNA bölgelerinden kaynaklanmaktadır.

miRNA'lar, benzer tohum bölgelerine sahip olan ve genellikle aynı mRNA hedeflerine etki eden miRNA'lar grubu oluşturabilmektedir; bu gruptaki miRNA'lar bir aile olarak kabul edilmektedir. Olgun miRNA, pri-miRNA'nın iki aşamalı kesilmesiyle oluşmaktadır ve bu süreçte miRNA, RNA-indüklenen susturma kompleksi (RISC) ile etkileşime girerek mRNA'nın ifadesini negatif yönde düzenlemektedir (Şekil 2.5). Çoğu durumda, miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' UTR'siyle etkileşerek gen ekspresyonunu baskılamaktadır.



Şekil 2.5. miRNA biyogenezi (Shang ve diğerleri, 2023'ten değiştirilerek alınmıştır)

miRNA'lar, normal gelişim süreçlerinde, apoptozis, hücre çoğalması, fibrozis ve otofaji gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Selcuklu ve diğerleri, 2012; Su ve diğerleri 2015; Vettori, 2012; Xu ve diğerleri, 2012). miRNA'ların, anormal seviyedeki ifadeleri MAS/İS dahil çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, miRNA'lar sadece hücre içinde değil, aynı zamanda hücre dışına da salınabilmektedir. Hücre dışı sıvılarda bulunan miRNA'lar, belirli hastalıkların tespiti için biyomarker potansiyeli taşımaktadır. Ek olarak, hücre dışı miRNA'lar, hücreler arasında iletişimi düzenleyen sinyal

molekülleri olarak da görev yapabilmektedir (Gheinani ve diğerleri, 2021; O'Brien ve diğerleri, 2018).

2.8. Dairesel RNA'lar

Dairesel RNA'lar (circular RNA, circRNA), geri ekleme (back-splicing) sonucu oluşan, kovalent olarak kapalı, tek sarmallı ncRNA çeşididir. İlk olarak 1976 yılında, respirovirüsünde (Sendai virüsü) ve viroidler olarak adlandırılan bitki patojenik virüslerinde keşfedilmiştir (Koiakofsky, 1976; Sanger ve diğerleri, 1976). RNA'nın dairesel bir formunun varlığına dair ilk fiziksel kanıt ise 1979 yılında, ökaryotik hücrelerin sitoplazmik fraksiyonunun elektron mikroskobu analiziyle ve daha sonra 1986'da hepatit delta virüsü (HDV) içinde tanımlanmasıyla elde edilmiştir (Hsu ve Coca-Prados, 1979; Kos ve diğerleri, 1986). Bununla birlikte daha sonraki yıllarda yapılan birkaç çalışma ile de circRNA'ların varlığı kanıtlanmıştır. İnsanda ilk circRNA örneği, 1991 yılında, doğal olarak oluşan, *DCC* adı verilen bir genden türetilen circRNA moleküllerinin keşfiyle ortaya çıkmıştır (Nigro ve diğerleri, 1991). Buna paralel olarak, embriyogenez sırasında cinsiyet belirlemesinden sorumlu önemli bir molekülü kodlayan fare Sry geninin, yetişkin fare testislerinde yalnızca 1,23 kb dairesel RNA olarak ifade edildiği bulunmuştur (Cape ve diğerleri, 1993).

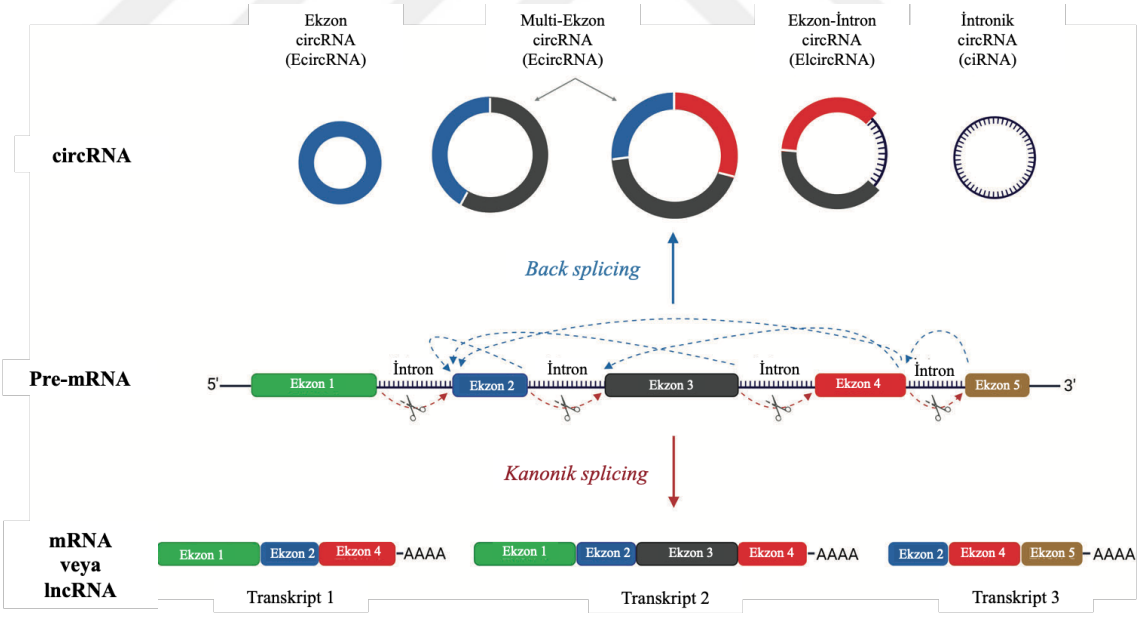
1990'ların sonu ve 2000'lerin başlarında yapılan çalışmalar, sineklerden memelilere kadar ökaryotik hücrelerde circRNA üreten genlerin yaygın olduğunu göstermiştir (Cocquerelle ve diğerleri, 1992; Hansen ve diğerleri, 2011; Houseley ve diğerleri, 2006; Li ve Lytton, 1999; Memczak ve diğerleri, 2013; Surono, 1999; Zaphiropoulos, 1996; Zaphiropoulos, 1997). Bununla birlikte, circRNA'ların polipeptitlere çevrildiğine dair kanıtlardaki eksiklik, bu RNA'ların işlevsel önemi konusunda araştırmacıların şüphe ile yaklaşmasına ve birkaç on yıl boyunca circRNA'ların genellikle yanlış ekleme veya pre-mRNA işlemenin yan ürünleri olarak göz ardı edilmesine neden olmuştur (Cocquerelle ve diğerleri, 1993).

RNA dizileme (RNA sequencing, RNA-seq) teknolojisi ve biyoinformatik alanındaki gelişmeler ile birlikte, çok sayıda circRNA olduğu ortaya çıkmıştır. 2012 yılında Salzman

ve diğerleri tarafından, insan geninin beklenmedik sayıda circRNA izoformlarıyla sonuçlanan "karışık ekzonlar/scrambled exons" ifade ettiği rapor edilmiştir (Salzman ve diğerleri, 2012). Keşfedildikleri tarihten itibaren, binlerce circRNA'nın birden fazla organizmada mevcut olduğu ve ifadelerinin gelişim aşamaları, fizyolojik koşullar ve çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Verduci ve diğerleri, 2021).

2.8.1 Dairesel RNA'ların biyogenezi ve fonksiyonu

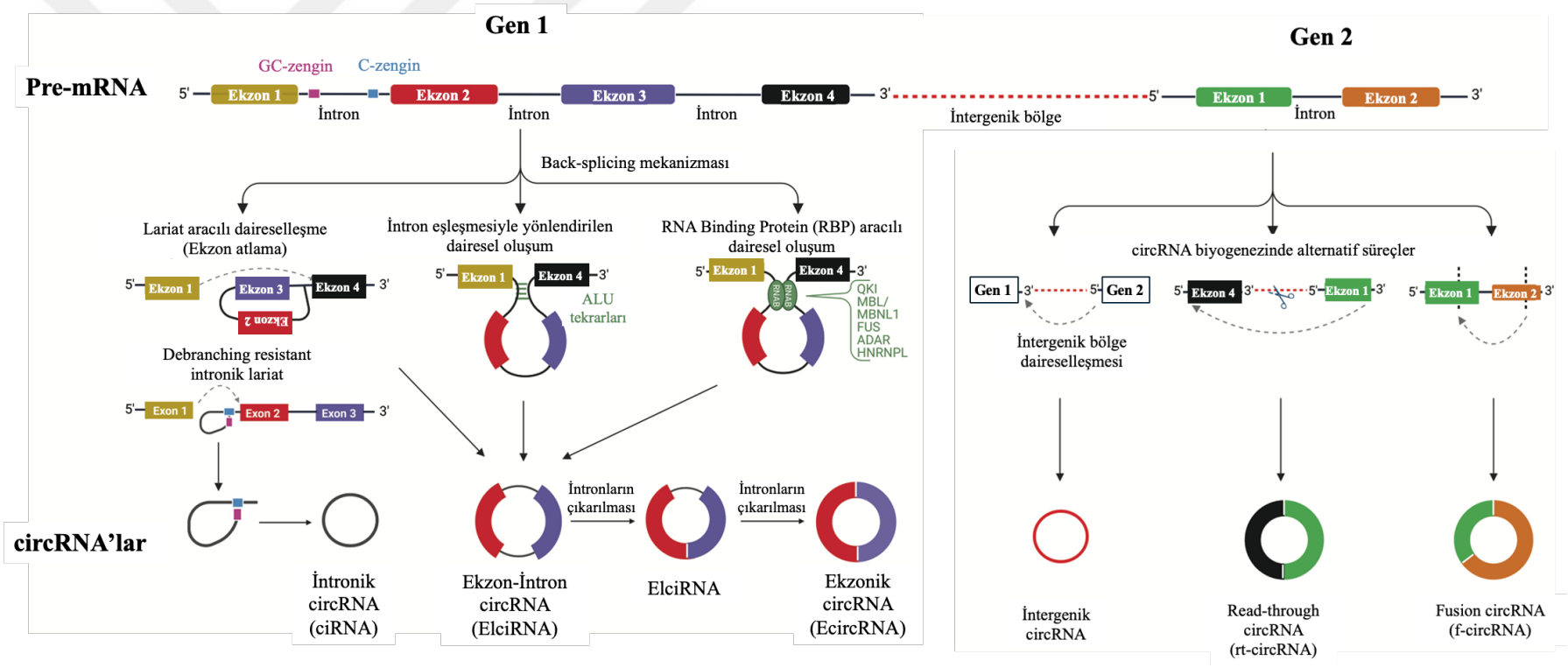
Spliceosom tarafından gerçekleştirilen pre-mRNA splicing işlemi, transkripsiyon ile yakından ilişkili bir mekanizmadır. Bu işlem sırasında, intronlar pre-mRNA'lar'dan çıkarılarak ekzonlar, mRNA molekülleri oluşturmak üzere birleştirilmektedir (Bentley, 2014). Buna karşılık, circRNA molekülleri back-splicing adı verilen geri ekleme mekanizması sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.6). 5' ve 3' uçlardan yoksun olan circRNA'lar ekzonükleazlar için daha az erişilebilirdir ve sonuç olarak doğrusal RNA'lardan daha kararlı bir yapıya sahiptir (Zhang ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.6. Kanonik splicing ve back-splicing işlemi (Pisignano ve diğerleri, 2023'ten değiştirilerek alınmıştır)

Çeşitli circRNA'lar tek bir protein kodlayan veya kodlamayan genomik lokustan üretilebilmektedir. CircRNA'lar, yalnızca ekzonların değil, aynı zamanda intronların,

kodlamayan antisens dizilerinin, 3′ UTR, 5′ UTR ve transkripte edilmiş intergenik bölgelerin de daireselleşmeye yatkın olması nedeniyle uzunluk açısından önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Ayrıca, birden fazla ekzon ve intronik kısımları içeren bir kombinasyon halinde de üretilebilmektedir (Memczak ve diğerleri, 2013; Y. Zhang ve diğerleri, 2013). circRNA'ların biyogenezinde genellikle, lariat tarafından yönlendirilen birleşme (ekzon atlama), intron eşleşmesi tarafından yönlendirilen birleşme ve RNA bağlayıcı proteinler (RBP) tarafından yönlendirilen birleşme olmak üzere üç mekanizma rol oynamaktadır (Şekil 2.7) (Ashwal-Fluss ve diğerleri, 2014; Jeck ve diğerleri, 2013; Zhang ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.7. circRNA biyogenezi (Pisignano ve diğerleri, 2023'ten değiştirilerek alınmıştır)

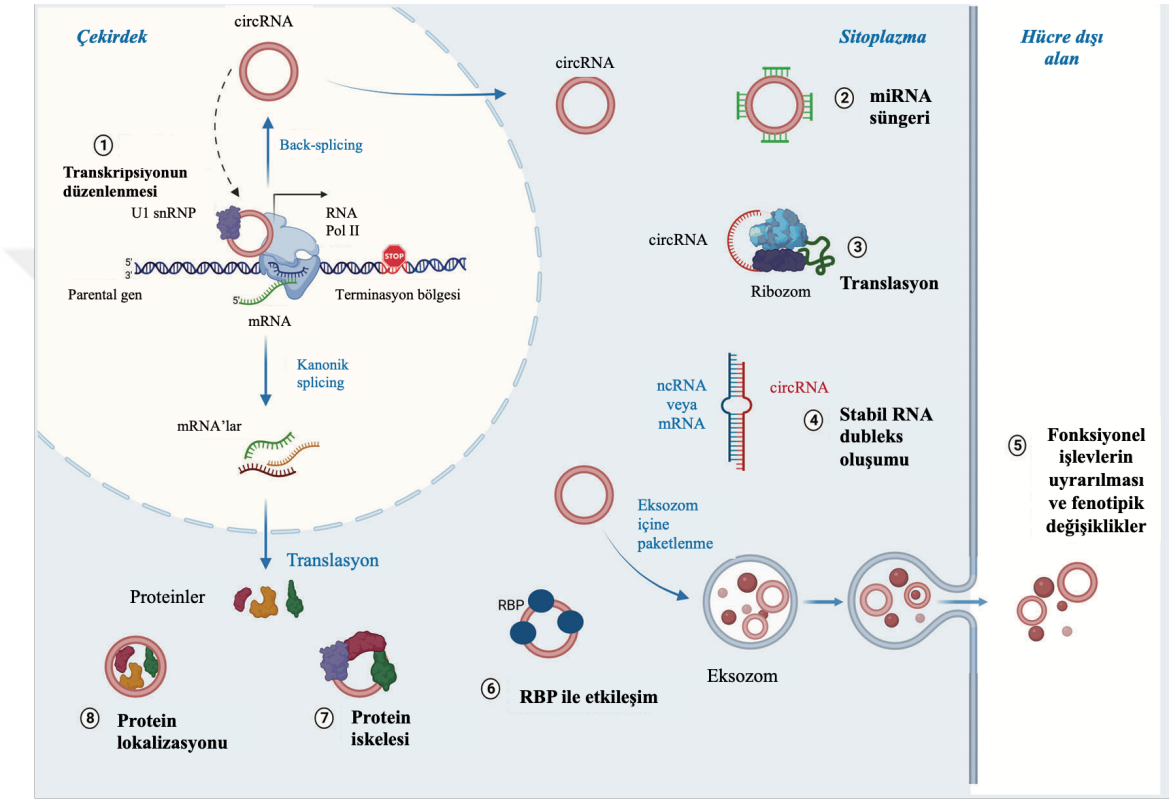
Ekzon atlama mekanizmasında, pre-mRNA işlenerek iki RNA molekülüne ayrılmaktadır: bunlardan biri ekzon kaybına uğramış mRNA, diğeri ise çıkarılan ekzonları içeren ve daireselleşmeye yatkın lariat yapısıdır. CircRNA'ların büyük çoğunluğu (%80'den fazlası) ekzon kökenli circRNA'lar (ecircRNA'lar) olup, genellikle bir ila beş pre-mRNA ekzonundan türetilmektedir ve sitoplazmaya lokalizedir (Memczak ve diğerleri, 2013; Salzman ve diğerleri, 2012). Ekzonik daireselleşme, genellikle 300 nükleotidden uzun ekzonlar ve benzer uzunlukta intronik bölgeler tarafından çevrelenmiş, ters tekrarlayan dizileri (örneğin ALU elementleri) barındıran bölgelerde daha sık gözlemlenmektedir (Jeck ve diğerleri, 2013).

İntron eşleşmesi mekanizmasında, yeni oluşan circRNA'nın iki tarafındaki intronların tamamlayıcı olması gerekmektedir (Westholm ve diğerleri, 2014). Bu intronlar, splicing bölgelerini yakınlaştırarak geri eklemeyi kolaylaştıran bir ikincil yapı oluşturur. Ancak, intronlardaki tekrar dizilerinin varlığı her zaman ekzon daireselleşmesiyle sonuçlanmaz ve bazen aşırı stabil baz eşleşmesi, circRNA oluşumunu engelleyebilir (Liang ve Wilusz, 2014; X.-O. Zhang ve diğerleri, 2014).

RNA bağlayıcı proteinler (RBP'ler), circRNA biyogenezine doğrudan katkıda bulunur. QKI, MBL/MBNL1 ve FUS gibi proteinler, circRNA öncülü intronlar içinde spesifik motiflere bağlanarak splice donör ve akseptör bölgelerini birbirine yaklaştırır ve kapalı bir intronik eşleşmiş RNA yapısı oluşturur (Conn ve diğerleri, 2015).

CircRNA oluşum süreci oldukça karmaşıktır ve intronların kesilme düzenine bağlı olarak farklı circRNA türleri sentezlenebilir. Eğer intronlar uygun şekilde çıkarılmaz ve circRNA yapısına dahil edilirse, ekzon-intron circRNA'lar (EIciRNA'lar) oluşur. Öte yandan, intron lariatları 2′–5′ bağlantı noktasında daireselleşir ve 3′ uçları korunursa, stabil intronik circRNA'lar (ciRNA'lar) meydana gelir. Bu tür circRNA'lar genellikle çekirdekte lokalize olup, komşu genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir ve RNA polimeraz II ile doğrudan etkileşime girebilir (Z. Li ve diğerleri, 2015; Qian ve diğerleri, 1992; Y. Zhang ve diğerleri, 2013). Ayrıca, genomun intergenik kısımlarından kaynaklanan ve bir tür ekzonik olmayan intergenik circRNA'lar da bulunmaktadır (Gao ve diğerleri, 2015).

circRNA'lar, genlerin transkripsiyonunun regülasyonu, miRNA süngeri veya çevrilmiş kısa peptitler/proteinler olarak çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Ek olarak, circRNA'lar diğer RNA moleküllerinin stabilitesini etkileyebilmekte, ekzosomların içinde birikebilmekte ve hücresel yanıta aracılık edebilmektedir. Ayrıca, RBP'lerle etkileşime girebilir ve veya iskele molekülleri olarak hareket edebilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. circRNA'ların biyolojik fonksiyonları (Pisignano ve diğerleri, 2023'ten değiştirilerek alınmıştır)

miRNA süngeri (sponge): circRNA'lar, benzersiz yapıları ve diğer özelliklerinden dolayı çeşitli biyolojik süreçlere katılmaktadır. En belirgin özelliği miRNA süngeri gibi davranmasıdır. miRNA bağlanma bölgelerine sahip circRNA'lar, miRNA aktivitesini inhibe etmek ve böylece hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için doğrudan ilgili miRNA'ya bağlanmaktadır. İlk tanımlanan circRNA'lardan biri olan ciRS-7, miR-7 için 50'den fazla bağlanma bölgesine sahiptir. Benzer şekilde, fareye Sry circRNA'sı, miR-138 için 16 bağlanma bölgesi içermektedir. ciRS-7 ve Sry, bu miRNA'lara bağlanarak ilgili miRNA'ların hedef mRNA'larıyla etkileşimini azaltmaktadır. circRNA'ların, miRNA süngerleme yoluyla, hücre büyümesi, proliferasyon ve farklılaşma gibi biyolojik süreçleri düzenlediği gösterilmiştir (Hansen ve diğerleri, 2013; Pandey ve diğerleri, 2020).

Translasyonel regülasyon ve splicing: circRNA'ların RNA aracılı etkileşim yoluyla alternatif splicing işlemini etkilediği ve böylece gen ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur. circRNA'lar atasal genlerin transkripsiyonunu RNA-RNA etkileşim yoluyla düzenleyebilmektedir (Ashwal-Fluss ve diğerleri, 2014; X. Xu ve diğerleri, 2020).

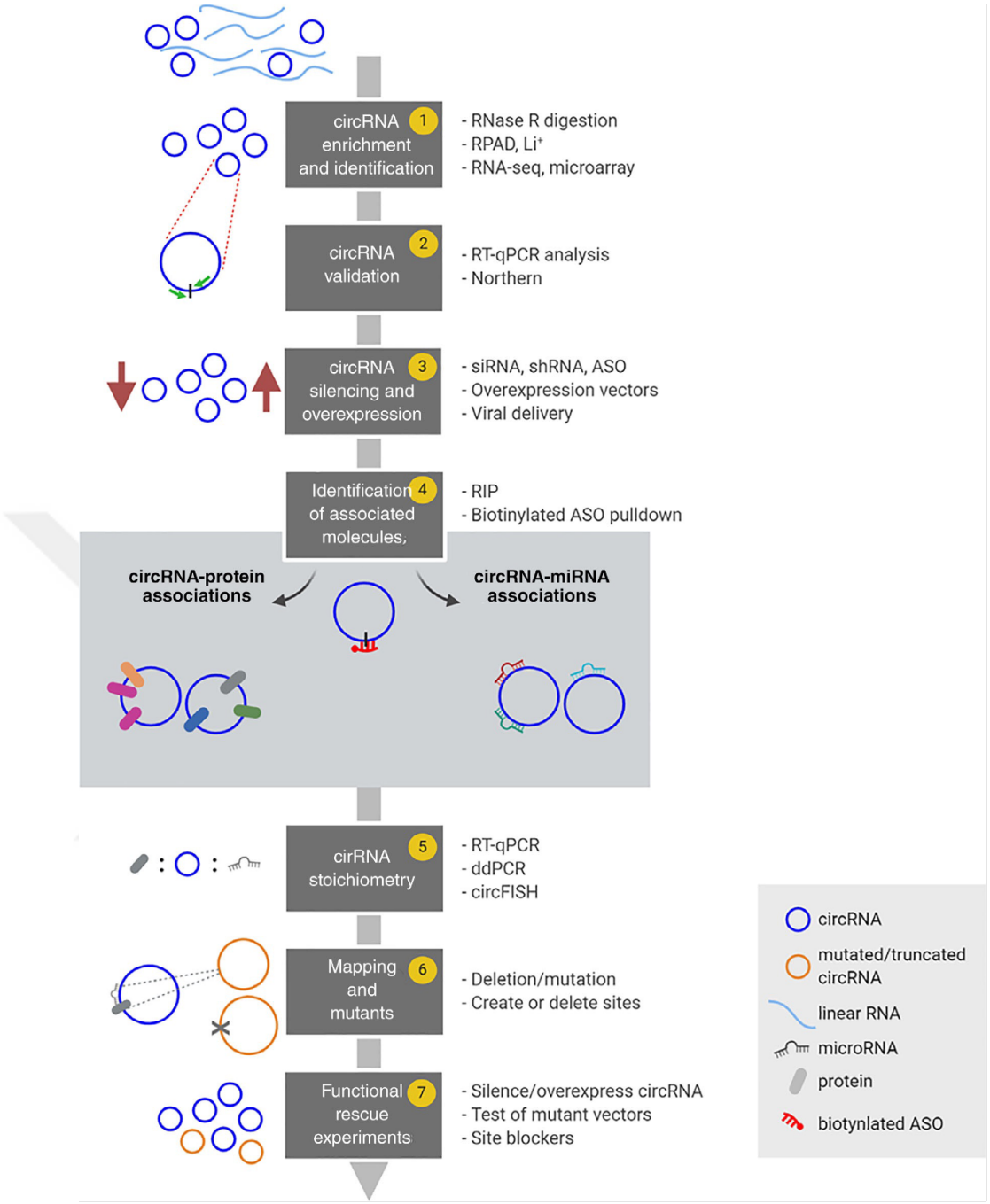
RBP ile etkileşim: circRNA'lar, protein iskeleleri veya antagonistler olarak RBP ile etkileşime girebilmektedir (Hentze ve Preiss, 2013). circMbl'nin, MBL proteinini süngerleyerek alternatif splicing mekanizmasını modüle ettiği gösterilmiştir (Ashwal-Fluss ve diğerleri, 2014). Yapılan bir çalışmada, HuR proteininin circPABPN1'e bağlanarak, PABPN1 mRNA'sına bağlanmasını engellediği ve bunun sonucunda PABPN1 üretiminin azalmasına ve hücre proliferasyonunun düşmesine neden olduğu rapor edilmiştir (Abdelmohsen ve diğerleri, 2017). Bu bulgular, circRNA'ların protein homeostazını düzenleyebileceğini desteklemektedir.

Translasyon: Bazı circRNA'lar internal ribozom entry site (IRES) güdümlü mekanizmalar yoluyla translasyona uğramaktadır (Fan ve diğerleri, 2022).

2.8.2 Dairesel RNA’ların tanımlanması ve karakterizasyonu

Genel olarak, belirli bir circRNA'yı çalışmak için özel bir neden olmadıkça, farklı fizyolojik veya patolojik süreçlerde yer alan circRNA’ları araştırmak amacıyla geniş ve heterojen bir sınıf oluşturulması önerilmektedir. Bu doğrultuda, circRNA’ları zenginleştirmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle toplam hücresel RNA’nın RNase R sindirimi ile işlenmesini içermekte ve böylece çoğu doğrusal transkript elimine edilerek circRNA konsantrasyonu artırılmaktadır. circRNA havuzu zenginleştirildikten sonra, RNA-seq verilerinin ileri biyoinformatik analizi ve circRNA’ların detaylı karakterizasyonu gerekmektedir.

Bir circRNA veya circRNA grubu seçildikten sonra, dizileri, varlıkları ve relatif bolluklarının doğrulanması gerekmektedir. circRNA düzeyleri farklı yöntemlerle ölçülebilmekle birlikte, en yaygın kullanılan yöntemlerden biri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizidir. Bu analizde, toplam RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilirken random hekzamerler kullanılmakta ve divergant primerler ile amplifikasyon sağlanmaktadır. Elde edilen PCR ürünleri doğrudan dizilenebileceği gibi klonlama sonrası dizileme de gerçekleştirilebilmektedir. (Pandey ve diğerleri, 2019; Tsitsipatis ve Gorospe, 2021). circRNA’ların tanımlanması, karakterizasyonu ve analizi Şekil 2.9’da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.9. circRNA'ların tanımlanması ve analizi için kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi (Tsitsipatis ve Gorospe, 2021)

2.8.3 circRNA'ların insan hastalıklarındaki rolleri ve biyomarker olarak potansiyel kullanımları

İnsan hücrelerinde ~100.000 circRNA üretilmektedir (Xu ve Zhang, 2021). Bu sayı, protein kodlayan genlerin sayısından (~20.000) oldukça fazladır. Yaygınlıklarına

rağmen, circRNA'ların çoğu işlevsel olarak karakterize edilmemiştir ve birçoğunun biyolojik rolü belirsizliğini korumaktadır. Giderek artan kanıtlar, circRNA'ların, belirli hastalık durumlarında birikmelerinin çeşitli hastalıkların oluşumu ve gelişimiyle ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Memczak ve diğerleri, 2013).

Son çalışmalar, circRNA'ların anormal ekspresyonunun kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Vücut sıvılarında stabilite, korunma ve yüksek bolluk gibi özellikleri ile circRNA'lar, çeşitli hastalıkların teşhisi, izlenmesi ve prognozu için biyobelirteçler olarak büyük potansiyel sunmaktadır (Han ve diğerleri, 2018; Santer ve diğerleri, 2019; Zhang ve diğerleri, 2018). Su ve diğerleri, (2020) yaptıkları bir çalışmada circRIP2'nin, miR-1305/Tgf-β2/smad3 yolu aracılığıyla mesane kanseri ilerlemesini hızlandırdığına dair kanıtlar bulmuş ve circRIP2'nin mesane kanseri hastaları için potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olabileceğini öne sürmüştür. Başka bir çalışmada, circPRMT5'nin mesane ürotelyal karsinom hücrelerinin epitel mezenkimal geçişini (EMT) indükleyerek metastazı desteklediği ve ürotelyal karsinom için prognostik bir biyobelirteç olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir (X. Chen ve diğerleri, 2018). MAS/İS'ın ilerlemesinde circTHBS1'in rolünü ve potansiyel moleküler mekanizmasını ortaya çıkaran bir çalışmada, circTHBS1'in miR-139-5p/MFN2 eksenini düzenleyerek MAS/İS hücrelerinin proliferasyonunu, metastazını, EMT sürecini ve enflamasyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiş ve circTHBS1'in MAS/İS tedavisi için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2022).

circRNA'ların hastalıklarda belirgin bir ekspresyon profili göstermesi, onların tanı koyma ve hastalığın seyrini izleme açısından biyobelirteç olarak potansiyel taşımasını sağlamaktadır. Özellikle kan, idrar ve tükürük gibi erişilebilir vücut sıvılarında stabil olarak bulunmaları, geleneksel biyobelirteç adaylarına göre avantaj sağlamaktadır. Mevcut araştırmalar, spesifik circRNA profillerinin belirli hastalıklar için biyomarker olarak kullanılabilmesi için umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda MAS/İS'ın tespiti için dolaşımdaki circRNA biyobelirteçleri ile ilgili araştırma yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, MAS/İS hastalığında circRNA'ların biyobelirteç potansiyelini araştırdık. Çalışmamız,

MAS/İS hastalarında belirli circRNA'ların ekspresyon düzeylerini analiz ederek bu moleküllerin hastalığın tanı, prognoz veya tedavi sürecinde kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de, kitler, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
+4 ˚C Buzdolabı	BOSCH	Kitleri ve kimyasal malzemeleri saklanmak için kullanıldı.
-20 ˚C Buzdolabı	BOSCH	Kitleri ve kimyasal malzemeleri saklanmak için kullanıldı.
-80 ˚C Buzdolabı	Harris	RNA örneklerini, serum örneklerini ve kimyasal malzemeleri saklamak için kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf	RNA izolasyonu çalışmalarında kullanıldı.
Spin Santrifüj	Bioneer	cDNA sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR çalışmalarında kullanıldı.
Vorteks	Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™	RNA izolasyonu çalışmalarında kullanıldı.
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Scientific™	RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflığının ölçümünde kullanıldı.
Termal Döngüleyici	MJ Research	cDNA sentezinde kullanıldı.
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR çalışmalarında kullanıldı.

Çizelge 3.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan kitler, kimyasal maddeler ve sarf malzemelerin listesi

Malzeme	**Marka**	**Kullanım Amacı**
TRIzol Plus RNA Purification Kit	Invitrogen™	Kandan RNA izolasyonunda kullanıldı.
TRIzol Reagent	Invitrogen™	Dokudan RNA izolasyonunda hücrelerin parçalanması aşamasında kullanıldı.
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen	Kandan miRNA izolasyonunda kullanıldı.
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™	RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanıldı.
BlasTaq 2X qPCR MasterMix	abm®	Kantitatif gerçek zamanlı PCR için kullanıldı.
Primer	Bioligo	Kantitatif gerçek zamanlı PCR için kullanıldı.
Etil Alkol	Sigma-Aldrich®	RNA izolasyonunda yıkama aşamasında kullanıldı. Deney ortamının sterilizasyonunda kullanıldı.
İzopropanol	Sigma-Aldrich®	RNA izolasyonunda presipitasyon aşamasında kullanıldı.
EDTA'lı Kan Alma Tüpü	Ayset® Tube	Çalışma kapsamında, RNA izolasyonu için hastalardan alınan kan örneklerinin güvenli bir şekilde toplanması ve uygun koşullarda taşınması amacıyla kullanıldı.
Pıhtılaştırıcı Aktivatör (Clot Activator) İçeren Kan Alma Tüpü	Ayset® Tube	Çalışma kapsamında, serum elde edilmesi amacıyla hastalardan alınan kan örneklerinin güvenli bir şekilde toplanması ve uygun koşullarda taşınması amacıyla kullanıldı.
Falkon Tüp	NEST®	Sıvı çözeltilerin hazırlanması, saklanması ve santrifüj işlemlerinde kullanıldı.
Eppendorf Tüp (0,2 ml ve 1,5 ml)	Axygen®	Sıvı örneklerin saklanmasında ve sıvıların karıştırılması ve santrifüjlenmesinde kullanıldı.
96-well PCR Plate	Labselect®	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR için kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1 Hasta örneklerinin toplanması

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar için Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni alınmıştır (Karar No: 2022-20/12 ve 2023-1/44). Tüm işlemler etik kurallara ve Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma, 2023-2024 yılları arasında, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi Üroloji Bölümü, Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği ve Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Bölümü'ne başvuran MAS/İS tanısı almış 28 kadın hastayı içermektedir. Kontrol grubu ise herhangi bir otoimmün hastalığı bulunmayan ve hasta grubu ile yaş ve cinsiyet açısından eşlenik olan 18 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Hasta ve sağlıklı bireyler, çalışmaya dahil edilmeden önce bilgilendirildi ve tüm bireylerden yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. 26 hasta ve 18 sağlıklı gönüllünün her birinden, bir adet EDTA'lı tüp (mor kapaklı) ve bir adet antikoagülan içermeyen tüp (kırmızı kapaklı) olmak üzere ikişer tüp kan alındı. Ayrıca, hekimin önerisi doğrultusunda, tanı veya tedavi amacıyla sistoskopi uygulanan 5 hastadan lezyonlu ve lezyonsuz bölgelerden eşlenik dokular alındı. Doku örneği alınan iki hastadan, hastaya bağlı nedenlerle kan örneği alınamadı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hasta ve kontrol örnek sayıları

Örnekler	Kan	Lezyonlu/Lezyonsuz Eşlenik Doku Çifti
Hasta	26	5
Kontrol	18	-

Kan örneklerini içeren tüpler, 4500g'de 5 dakika santrifüj edildi ve EDTA'lı tüplerden, buffy coat ve plazma örnekleri, kırmızı kapaklı tüplerden ise serum örnekleri toplandı. Serum ve plazma örnekleri, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C buzdolabına

kaldırıldı. Buffy coat örnekleri ise bekletilmeden en kısa sürede RNA izolasyon işlemine alındı. Tüm doku örnekleri sıvı nitrojen içerisinde dondurularak kullanılıncaya kadar -80°C buzdolabında saklandı. Hasta ve sağlıklı bireyler ile ilgili bilgiler sırasıyla Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. MAS/İS hastalarına ait bilgiler

	Hasta Kodu	Cinsiyet	Yaş	Tanı süresi	Semptom sıklığı	Lezyon Durumu	Glomerilasyon Durumu	Ek Hastalıklar	Kullanılan Tedaviler
H1	230217	Kadın	65	7 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	Hipotiroidi, Diyabet	Hidrodistansiyon, Botoks, Fulgurasyon
H2	230303	Kadın	60	10 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	-	Mesane içi hyaluronik asit uygulaması
H3	230417	Kadın	49	4 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Var	-	Mesane içi hyaluronik asit uygulaması
H4	230420	Kadın	59	6 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	Hipotiroidi	Elmiron
H5	230426	Kadın	71	2 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	Sedef	Hidrodistansiyon, Elmiron
H6	230427	Kadın	74	10 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	-	Üretra Dilatasyonu, Fulgurasyon
H7	240001	Kadın	59	5 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	-	Fulgurasyon, Hidrodistansiyon, Medikal tedavi
H8	240002	Kadın	39	2 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	HBV	Hidrodistansiyon
H9	240003	Kadın	51	1 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	-	Hidrodistansiyon, Medikal tedavi
H10	240007	Kadın	45	6 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Var	-	Hidrodistansiyon, Medikal tedavi
H11	240022	Kadın	50	3 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Var	FMF, Sjögren	Hidrodistansiyon
H12	240023	Kadın	44	2 Yıl	Aralıklı	Lezyonlu	Var	FMF, Hipotiroidi	Hidrodistansiyon, Medikal tedavi
H13	240021	Kadın	58	3 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	MS	Hidrodistansiyon, Medikal tedavi
H14	240064	Kadın	66	6 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	Endometrium kanser öyküsü	Elmiron, Hyacst
H15	240065	Kadın	38	2 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	-	Elmiron
H16	230267	Kadın	44	2 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	-	Pentosan polisülfat
H17	230228	Kadın	65	4 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	Diyabet	Pentosan polisülfat

Çizelge 3.4. MAS/İS hastalarına ait bilgiler (Devamı)

	Hasta Kodu	Cinsiyet	Yaş	Tanı süresi	Semptom sıklığı	Lezyon Durumu	Glomerilasyon Durumu	Ek Hastalıklar	Kullanılan Tedaviler
H18	230215	Kadın	62	3 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	Hipotiroidi	Hidrodistansiyon, Botoks, Fulgurasyon
H19	230218	Kadın	62	5 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	Behçet	Hidrodistansiyon, Fulgurasyon, Elmiron
H20	230221	Kadın	51	3 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	Diyabet	Hidrodistansiyon
H21	230220	Kadın	49	14 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	Hipotiroidi	Hidrodistansiyon
H22	240102	Kadın	45	3Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	Behçet, Haşimato, FMF	Elmiron
H23	240103	Kadın	51	2 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	-	Elmiron
H24	240104	Kadın	48	5 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	-	Cranberry
H25	240105	Kadın	59	4 Yıl	Sürekli	Lezyonlu	Yok	Hipotiroidi	Hyalüronik asit
H26	240106	Kadın	33	2 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	-	Elmiron Amitriptilin
H27	240107	Kadın	42	1 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Yok	-	Cranberry Quercetin
H28	240108	Kadın	67	10 Yıl	Sürekli	Lezyonsuz	Var	Hipotiroidi	İntravezikal Hyalüronik asit, Fulgurasyon

Çizelge 3.5. Sağlıklı gönüllülere ait bilgiler

	Örnek Kodu	Cinsiyet	Yaş
K1	230241	Kadın	48
K2	230242	Kadın	45
K3	230243	Kadın	52
K4	230244	Kadın	38
K5	230302	Kadın	36
K6	230419	Kadın	63
K7	240024	Kadın	43
K8	240025	Kadın	32
K9	240066	Kadın	46
K10	240067	Kadın	44
K11	240068	Kadın	-
K12	240069	Kadın	41
K13	240070	Kadın	43
K14	240071	Kadın	42
K15	240085	Kadın	56
K16	240086	Kadın	54
K17	240087	Kadın	74
K18	240088	Kadın	50

3.2.2 Dairesel RNA'ların seçilmesi

Tez çalışması kapsamında, MAS/İS hastalığında biyobelirteç olma potansiyeline sahip circRNA'ların belirlenmesi amacıyla aşağıdaki strateji izlendi:

- Pubmed ve Web of Science gibi bilimsel veri tabanları kullanılarak MAS/İS hastalığında diferansiyel olarak farklı ifade edilen miRNA'lar belirlendi.

Ardından, CircInteractome ve CircAtlas gibi veritabanları kullanılarak bu miRNA'lara bağlanabilecek hedef circRNA'lar belirlendi. Bu veri tabanları, miRNA-circRNA etkileşimlerini yüksek doğrulukla tahmin eden kapsamlı veri setleri sunmaktadır.

- Literatür taraması yapılarak, EMT, GAG, enflamasyon gibi MAS/İS patofizyolojisinde etkili olabilecek biyolojik süreçler ile ilişkili olan circRNA'lar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilen circRNA'lar belirlendi.

Aday olarak belirlenen circRNA'lar, aday circRNA'ların ilişkili olduğu yolaklar, hedef miRNA'ları ve etkileşimde bulundukları mRNA'lar Çizelge 3.6'da özetlenmiştir.

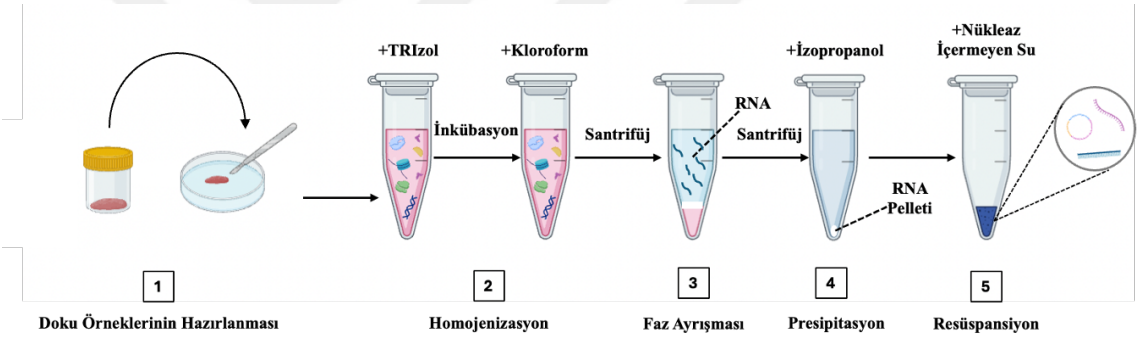
Çizelge 3.6. Aday circRNA'ların ilişkili olduğu yolaklar ve hedefleri

circRNA	**İlişkili Yolak**	**Hedef miRNA**	**miRNA'nın hedeflediği gen**	**Referans**
hsa_circ_0001429	Anjiogenez ve enflamasyon	hsa-miR-205-5p	*VEGFA*	(Liu ve diğerleri, 2021)
hsa_circ_0003028 (circFUT8)	Enflamatuar yanıt	Hsa-miR-570-3p	*HDAC1*	(Li ve diğerleri, 2022)
hsa_circ_0002408 (circBIRC6)	EMT	miR-495-3p	*XBP1*	(Zhou ve diğerleri, 2021)
hsa_circ_0000544	Enflamasyon	hsa-miR-769-5p	*SMAD2*	(Bao ve diğerleri, 2016)
hsa_circ_0000038	Enflamasyon	hsa-miR-940	*VEGFA*	(Bae ve diğerleri, 2023)
hsa_circ_0000260	Ürotelyal geçirgenlik	miR-4720-3p	*TJP1*	(Xia ve diğerleri, 2020)
hsa_circ_0000377	Ürotelyal geçirgenlik	hsa-miR-495-3p	*TJP1*	(Dudekula ve diğerleri, 2016)
hsa_circ_0001649 (circSHPRH)	EMT	miR-224-5p	*QKI*	(Zhou ve diğerleri, 2021)
hsa_circ_0001021	Ürotelyal geçirgenlik	miR-224-5p	*ZO-1*	(Li ve diğerleri, 2021)
hsa_circ_0000110 (circPTPN22)	Otoimmünite	hsa-miR-4689	*S1PR1*	(Jiang ve diğerleri, 2023)
hsa_circ_0060450 (circMYBL2)	Ürotelyal geçirgenlik/EMT	miR-192-5p	*CXCR5, ALX3*	(L. Yang ve diğerleri, 2020)

3.2.3 Dokudan RNA izolasyonu

-80°C'de saklanan doku örnekleri, bistüri yardımıyla parçalandı ve ardından 500 µl TRIzol solüsyonu eklenerek pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Homojenize dokular, dokuların daha iyi parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin tamamen uzaklaştırılması amacıyla, oda sıcaklığında, 10 dakika boyunca TRIzol solüsyonu içerisinde bekletildi. Bekleme süresinin sonunda, örneklerin üzerine 100 µl

kloroform eklendi ve tüpler 5-6 kez ters düz edilerek oda sıcaklığında 2-3 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler, 4°C'de 12000g'de 15 dakika boyunca santrifüj uygulandı. Santrifüj sonrası oluşan faz ayrışmasının ardından RNA içeren organik üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. RNA'nın çökeltilmesi için örneklerin üzerine eşit hacimde izopropanol ve 1 µl glikojen eklendi. Örnekler, 30 dk süre ile -20°C'de inkübasyona bırakıldı ve ardından 4°C'de 12000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak tüpün dibinde beyaz çökelti halinde görülen RNA'lar iki defa, %70'lik etil alkol ile yıkandı ve 4°C'de 12000g'de 5 dk santrifüjlenerek kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruyan RNA'lar nükleaz içermeyen su içerisinde çözüldü (Şekil 3.1). RNA'ların konsantrasyon ve saflığı Thermo Scientfic NanoDrop 2000 ile belirlendi (Çizelge 3.7). RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Dokudan RNA izolasyonu basamakları

Çizelge 3.7. Dokudan izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları

	Örnek Kodu	Doku Türü	RNA (ng/µl)	$A_{260/280}$
H1	230217	Lezyonlu Doku	41,1	1,77
		Lezyonsuz Doku	59,9	1,77
H5	230426	Lezyonlu Doku	117,8	1,99
		Lezyonsuz Doku	44,0	1,88
H7	240001	Lezyonlu Doku	28,5	2,07
		Lezyonsuz Doku	53,7	1,97
H10	240007	Lezyonlu Doku	14,01	2,0
		Lezyonsuz Doku	32,3	1,96
H12	240023	Lezyonlu Doku	21,3	1,70
		Lezyonsuz Doku	28,0	1,78

3.2.4 Kandan RNA izolasyonu

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri 4500g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek buffy coat tabakası, RNA ve miRNA izolasyonu işlemleri için temiz eppendorf tüplere aktarıldı. RNA izolasyonu TRIzol Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) kullanılarak; miRNA izolasyonu ise miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmaların direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C buzdolabında muhafaza edildi. RNA'ların konsantrasyon ve saflığı Thermo Scientfic NanoDrop 2000 ile belirlendi. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları

	Örnek Kodu	**RNA (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**miRNA (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**
H1	230217	120,7	1,86	133,7	1,86
H2	230303	89,4	2,01	286,3	1,92
H3	230417	131,9	1,92	238,6	1,91
H4	230420	68,0	2,01	159,6	1,87
H5	230426	149,6	1,98	314,9	1,96
H6	230427	88,0	1,95	319,4	1,86
H7	240001	116,1	2,04	288,2	1,94
H8	240002	49,3	1,94	385,0	1,91
H9	240003	71,8	2,06	393,2	1,99
H10	240007	94,4	1,87	891,7	1,76
H11	240022	93,0	1,84	600,0	1,84
H12	240023	Kan örneği yok			
H13	240021	Kan örneği yok			
H14	240064	138,2	1,99	275,2	1,92
H15	240065	149,1	2,02	260,3	1,92
H16	230267	91,3	2,02	140,5	1,92
H17	230228	217,0	2,01	385,6	1,88
H18	230215	78,0	1,90	380,0	1,97
H19	230218	178,7	1,96	429,5	2,01
H20	230221	73,9	1,93	258,5	1,93
H21	230220	118,3	1,75	166,6	1,89
H22	240102	338,2	1,90	183,3	1,86

Çizelge. 3.8. RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları (Devamı)

H23	240103	231,1	1,81	236,0	1,87
H24	240104	183,4	1,73	233,8	1,83
H25	240105	213,1	1,45	435,0	1,91
H26	240106	282,2	1,82	217,9	1,83
H27	240107	195,0	1,67	148,5	1,92
H28	240108	160,0	1,80	130,7	1,13
K1	230241	70,8	1,96	-	-
K2	230242	574	1,86	-	-
K3	230243	138,8	1,98	-	-
K4	230244	193,9	1,90	-	-
K5	230302	176,2	2,01	344,6	1,97
K6	230419	55,6	1,93	156,3	1,89
K7	240024	111,8	1,95	515,1	2,01
K8	240025	60,2	1,93	185,7	1,93
K9	240066	30,0	1,86	76,0	1,78
K10	240067	318,2	2,19	482,1	1,87
K11	240068	118,8	1,94	455,9	1,94
K12	240069	99,2	1,97	100,0	1,81
K13	240070	14,8	1,86	413,7	1,97
K14	240071	232,1	1,197	357,6	1,89
K15	240085	61,9	1,91	69,6	1,94
K16	240086	26,9	1,88	141,0	1,82
K17	240087	97,0	1,95	133,1	1,89
K18	240088	81,5	1,85	132,3	1,89

3.2.5 cDNA sentezi

Seçilen circRNA'ların qRT-PCR ile doğrulanması amacıyla, kan ve dokudan izole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. Bu işlem, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. cDNA sentezi için gerekli bileşenlerin karıştırılması işlemi, buz üzerinde yapıldı. cDNA sentez reaksiyonu için kullanılan bileşenler Çizelge 3.9'da belirtilen şekilde hazırlandı.

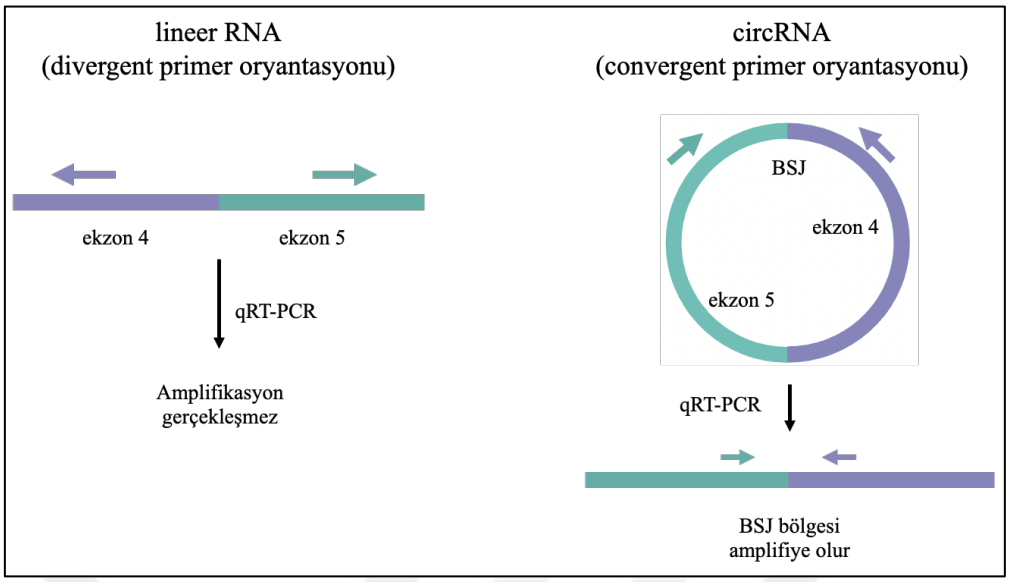
Çizelge 3.9. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyon
10X Reverse Transcriptase Buffer	2,0 µl	2X
25X Deoxynucleotide Triphosphates Mix	0,8 µl	2X
10X Reverse Transcriptase Random Primers	2,0 µl	2X
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl	50U
Nuclease-free H_2O	4,2 µl	
Her bir örnek için toplam	10,0 µl	

cDNA sentez reaksiyonu için hazırlanan karışım (2X RT master mix), her bir örnek için ayrı steril PCR tüplerine 10 µl olacak şekilde pipetlendi. Her bir tüpe, toplam hacmi 10 µl ve 500 ng konsantrasyonda olacak şekilde RNA örnekleri eklenerek iyice karışması için 2-3 kez pipetleme işlemi yapıldı. Son durumda, toplam reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanmış oldu. Tüpler, kısa bir süre santrifüjlenerek tüm içeriğin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve ardından, termal döngüleyiciye yerleştirildi. Örnekler, kitin talimatları doğrultusunda, sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi.

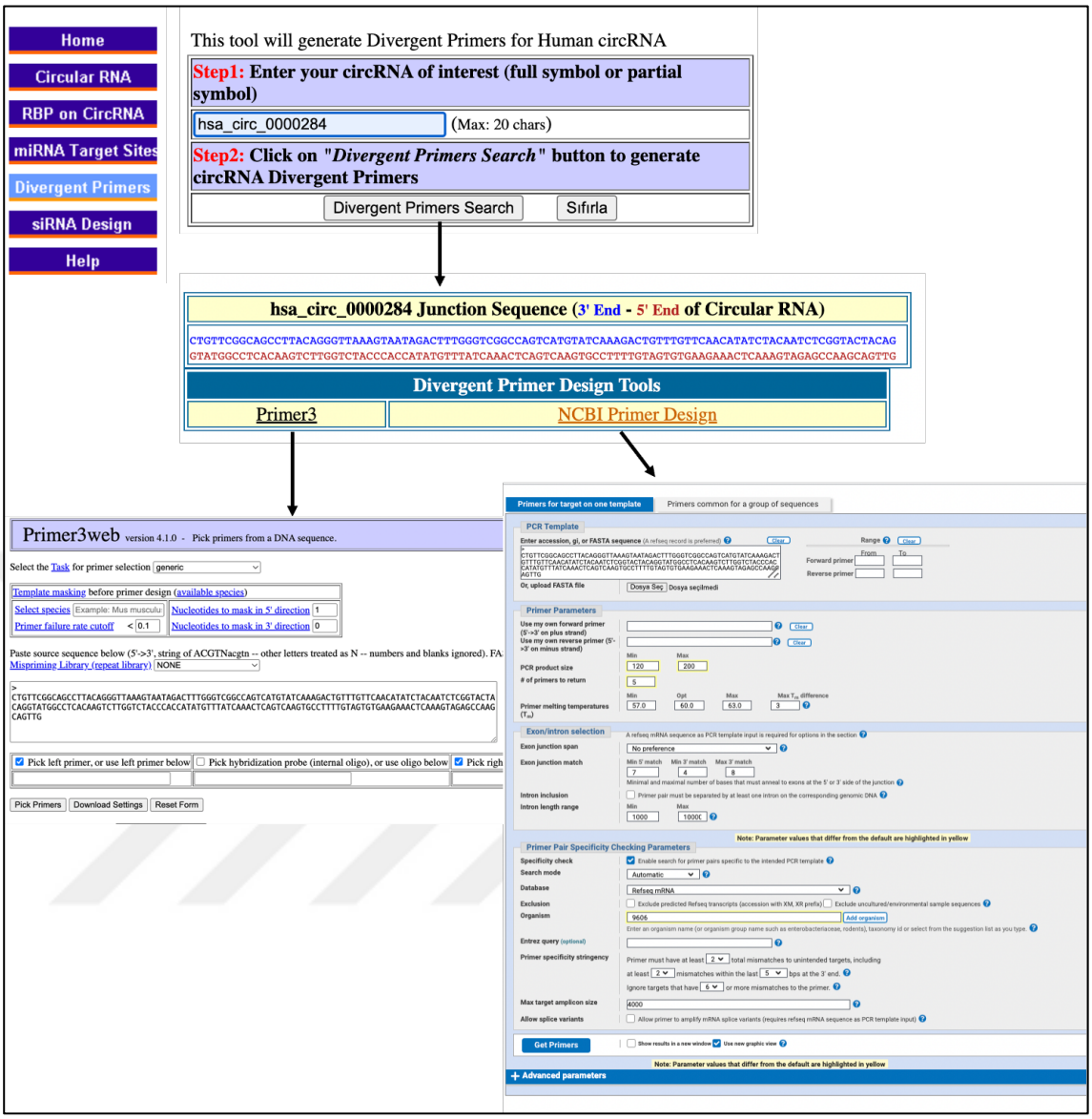
3.2.6 circRNA primer tasarlama stratejisi

circRNA'ların tespiti ve kantifikasyonu, karakteristik BSJ bölgelerinin varlığına dayanmaktadır. Bu nedenle, primerleri tasarlamak için, BSJ bölgesi ile örtüşen ve lineer şablon üzerinde birbirinden uzaklaşan "divergent" primer stratejisi kullanıldı. BSJ bölgesini çevreleyen primerler, dairesel RNA şablonu üzerinde convergent primer oryantasyonu sergilemekte ve böylece, circRNA'ları özgül bir şekilde çoğaltmaktadır. Bununla birlikte, aynı primerler lineer şablon üzerinde divergent primer oryantasyonu gösterdiğinden dolayı amplifikasyon gerçekleşmemektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. circRNA primer tasarlama stratejisi (Vromman ve diğerleri, 2022'den değiştirilerek alınmıştır)

CircRNA'ları hedef alan divergent primerler CircInterectome web aracı kullanılarak tasarlandı (Şekil 3.3). Bu araç, primer tasarımı için Primer3 ve NCBI Primer Design Tool araçlarını entegre ederek circRNA'nın BSJ bölgelerini çevreleyen dizileri şablon olarak kullanmaktadır (Dudekula ve diğerleri, 2016). Tez çalışması kapsamında kullanılan primer dizileri Çizelge 3.10'daki gibidir.

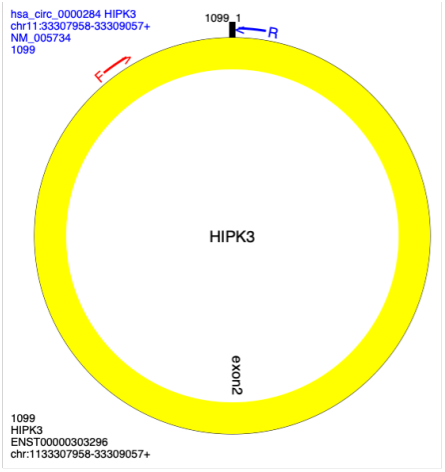


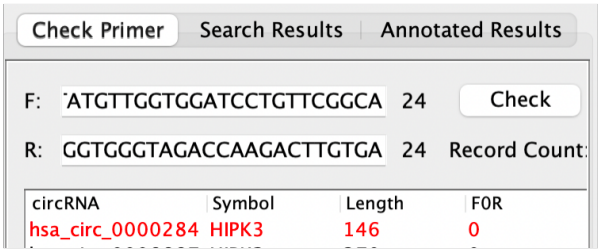
Şekil 3.3. CircInteractome web aracı kullanılarak circRNA'ya özgü divergent primerlerin tasarlanması (Dudekula ve diğerleri, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır)

Çizelge 3.10. Tez çalışması kapsamında kullanılan circRNA primerleri ve dizileri

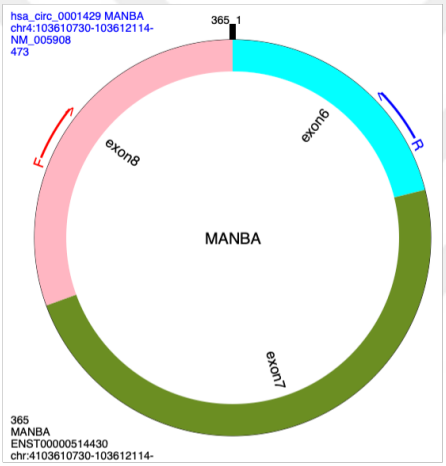
circRNA	**Dizi**
hsa_circ_0000284 (circ-HIPK3) (F)	5′-TATGTTGGTGGATCCTGTTCGGCA-3′
hsa_circ_0000284 (circ-HIPK3) (R)	5'-TGGTGGGTAGACCAAGACTTGTGA-3'
hsa_circ_0001429 (F)	5′-GCCTCATGGACATGGAAACC G-3′
hsa_circ_0001429 (R)	5′-AACCCAGTATGTGCTCCACAA -3′
hsa_circ_0003028 (circFUT8) (F)	5'-GCCGAATCTCTCCGCATGTA-3'
hsa_circ_0003028 (circFUT8) (R)	5'-GGTAGTCCTGCAGTGAATCTT-3'
hsa_circ_0002408 (circBIRC6) (F)	5’-TCCTCAGTTCAGTTGCTGGA-3’
hsa_circ_0002408 (circBIRC6) (R)	5’-CTGGGGTTCGTTCACAATCT-3’
hsa_circ_0000544 (F)	5′-GTGACTGGTACATTGGTTTGGT-3′
hsa_circ_0000544 (R)	5′-CACTGAGTGGAGCCCTTGTA-3′
hsa_circ_0000038 (F)	5′- ACAGTGTCTACGGGAGGAAGA-3′
hsa_circ_0000038 (R)	5′-GTAAGGGTGGGGACGGTTTT-3′
hsa_circ_0000260 (F)	5'-CAGATCGAGACCCAGCAAA-3'
hsa_circ_0000260 (R)	5'-GCAGGTTTTCATTGAGCTTT-3'
hsa_circ_0000377 (F)	5′-GTGTCAGTTCTGAGACATACAGT-3′
hsa_circ_0000377 (R)	5′-CTCGCCACACAATCTCCTCA-3′
hsa_circ_0001649 (circ-SHPRH) (F)	5'-AGGCAATGCTGAAAACTGCT-3'
hsa_circ_0001649 (circ-SHPRH) (R)	5'-TTGCCACGTTGAGAAAACGA-3'
hsa_circ_0001021 (F)	5'-AGCAACTTCCAAAGGACAG-3'
hsa_circ_0001021 (R)	5'-GTCTAATGGTGGTGGGGATG-3'
hsa_circ_0000110 (circPTPN22) (F)	5'-GACACTGAAGACTCCTGGAA-3'
hsa_circ_0000110 (circPTPN22) (R)	5'-CATTCCAGTGATGTTCCAA-3'
hsa_circ_0060450 (circMYBL2) (F)	5'-AGGGAGCGAGGATCTGGA-3'
hsa_circ_0060450 (circMYBL2) (R)	5'-CGGTTAGGGAAGTGGCTGG-3'

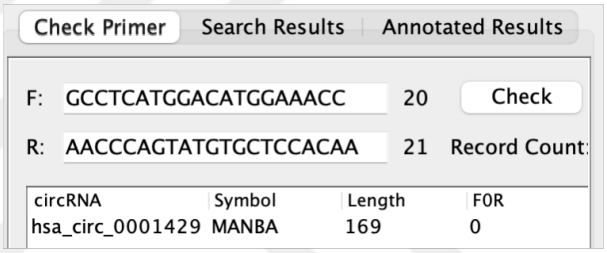
circRNA primerlerinin özgüllüğü, hedef dışı bağlanmaları en aza indirmek amacıyla circPrimer 2.0 aracı kullanılarak doğrulandı (Şekil 3.4). CircPrimer 2.0, aynı BSJ bölgesine sahip tüm circRNA izoformlarını analiz ederek primerlerin özgüllüğünü değerlendirmeyi mümkün kılmaktadır (Zhong ve Feng, 2022).



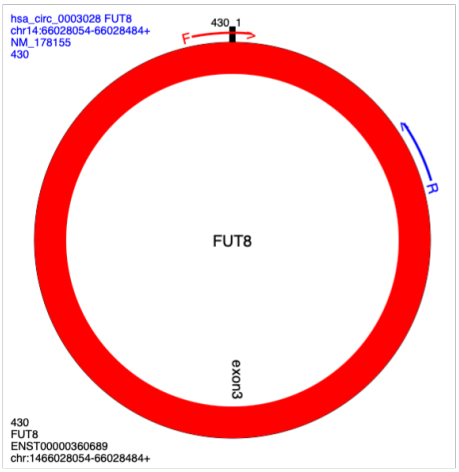


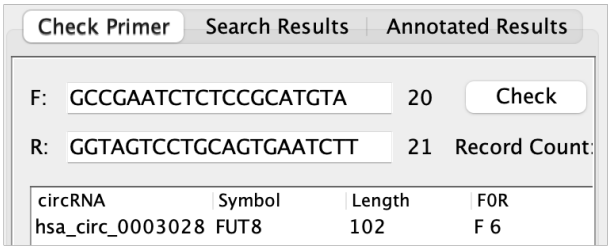
A





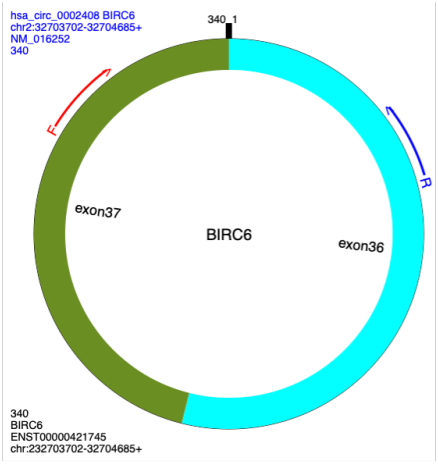
B

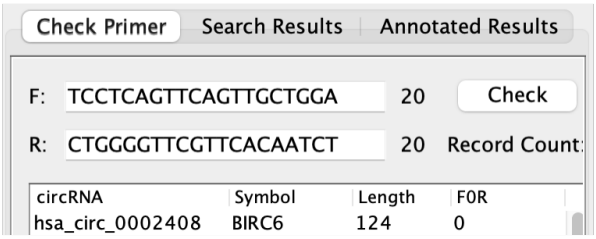




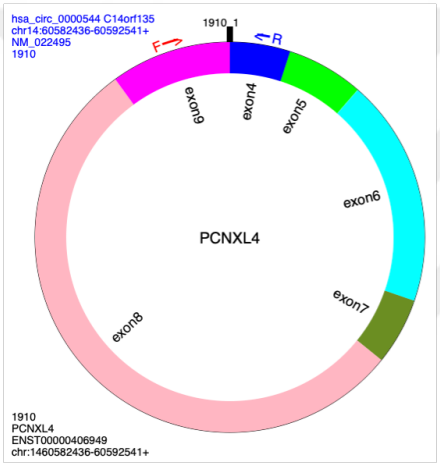
C

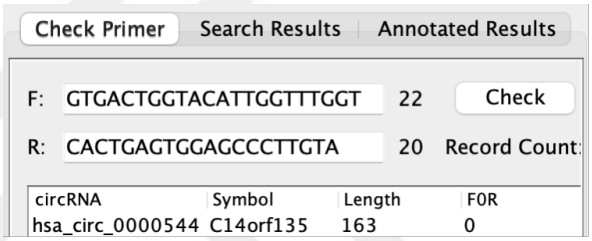
Şekil 3.4. CircPrimer 2.0 aracı kullanılarak circRNA primerlerinin kontrolü **A)** circHIPK3, **B)** hsa_circ_001429, **C)** circFUT8



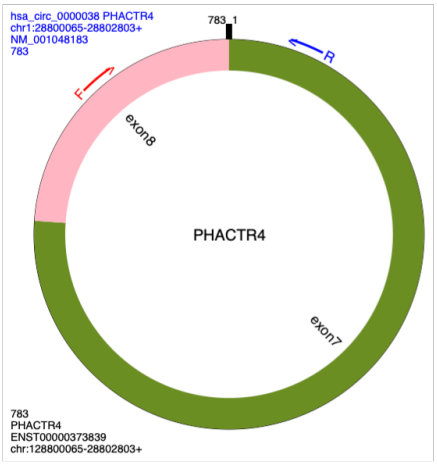


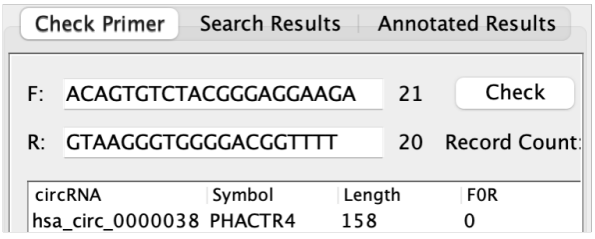
D





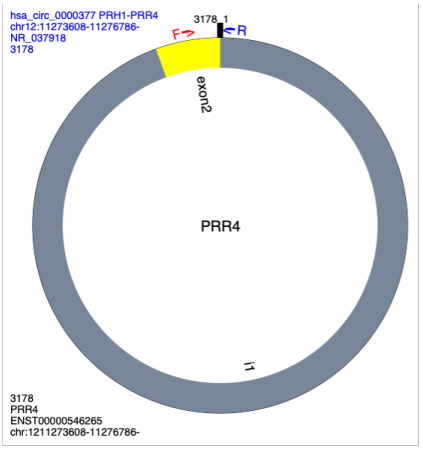
E

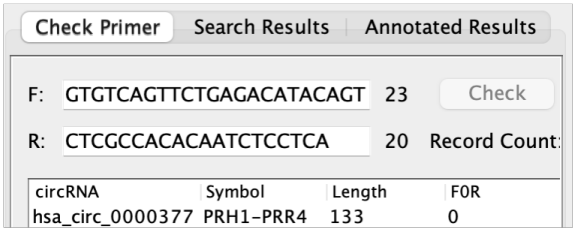




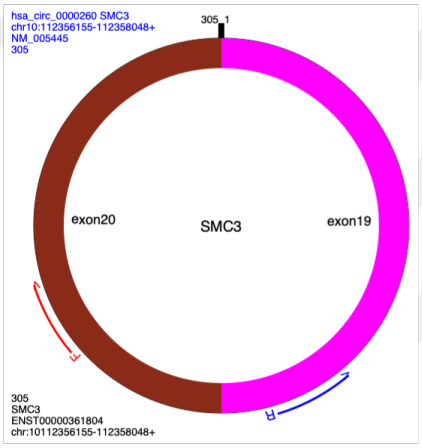
F

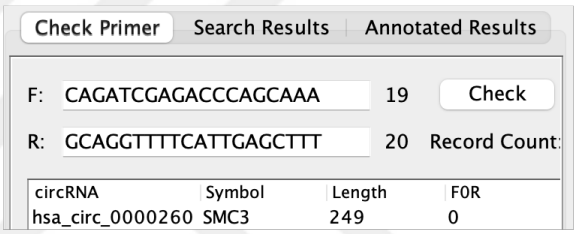
Şekil 3.4. CircPrimer 2.0 aracı kullanılarak circRNA primerlerinin kontrolü (Devamı) **D)** hsa_circ_0002408, **E)** hsa_circ_0000544, **F)** hsa_circ_0000038



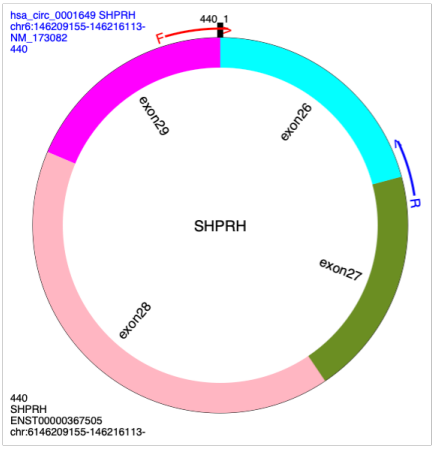


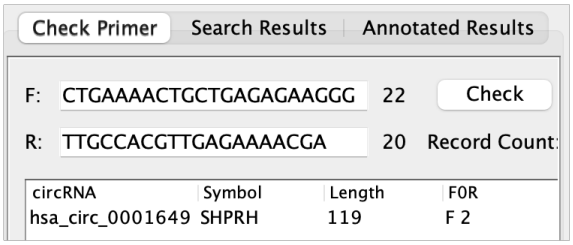
G





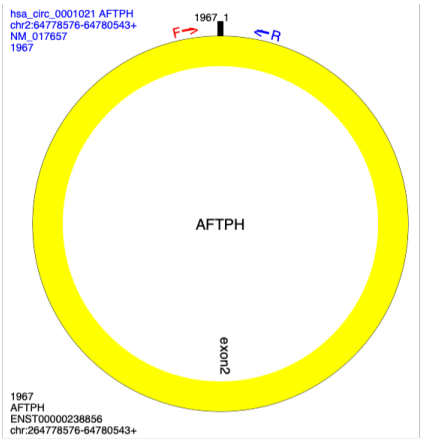
H

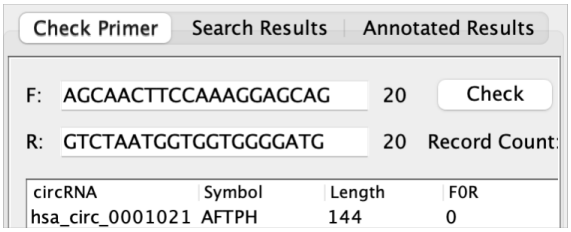




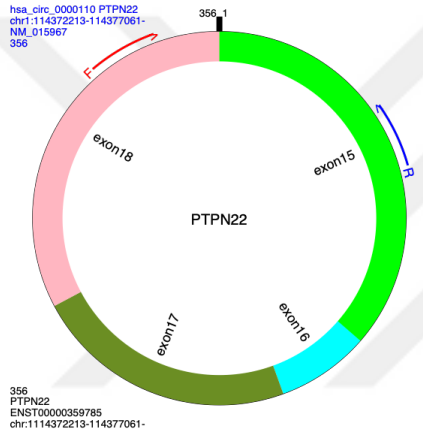
I

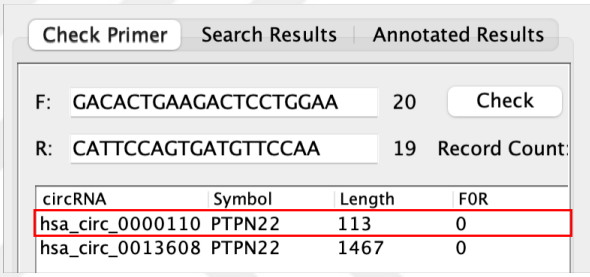
Şekil 3.4. CircPrimer 2.0 aracı kullanılarak circRNA primerlerinin kontrolü (Devamı) **G)** circBIRC6, **H)** hsa_circ_0000260, **I)** circSHPRH



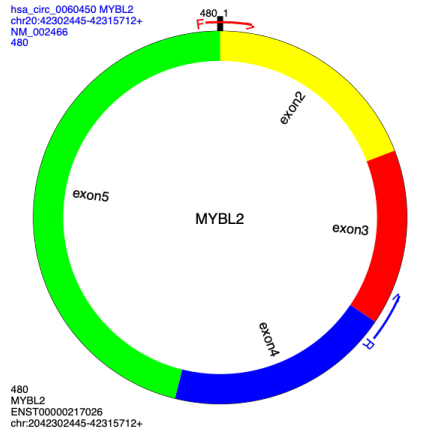


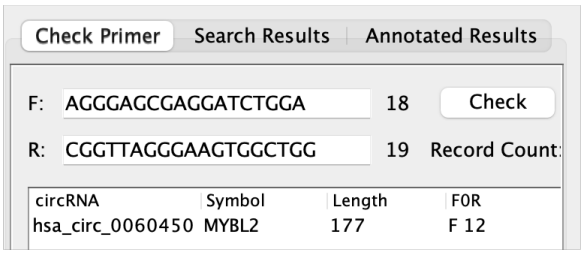
J





K





L

Şekil 3.4. CircPrimer 2.0 aracı kullanılarak circRNA primerlerinin kontrolü (Devamı) **J)** hsa_circ_0001021, **K)** circPTPN22, **L)** circMYBL2

3.2.7 Kantitatif gerçek zamanlı PCR

circRNA'ların hunner lezyonlu ve lezyonsuz doku örneklerindeki ve hasta ve sağlıklı bireylerin periferik kanlarındaki ifadesi BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek (Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12), StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen hasta bireylerin hunner lezyonlu ve lezyonsuz doku örneklerinde ve hasta ve sağlıklı bireylerin kan örneklerinde dairesel RNA'ların ifadeleri kat değişimi değerlendirildi. Ayrıca bu circRNA'ların bağlandığı ve aday olarak seçilen hedef miRNA ve etkilenen mRNA'ların ifade düzeyleri hasta ve kontrollerin kan örnekleri arasında kıyaslanarak analiz edildi. Seçilen mRNA'ların primer dizileri Çizelge 3.13'deki gibidir. miRNA'ların ifade düzeyleri stem-loop qRT-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Primerlerin özgüllüğü, erime eğrisi (melting-curve) analizi ile doğrulandı. Aday circRNA'lara ve internal kontrol olarak kullanılan circHIPK3'e ait melting-curve grafikleri Şekil 3.5'teki gibidir. Gen ifadelerinin normalizasyonu için internal kontrol olarak, dokularda çok miktarda bulunan GAPDH kullanıldı. Deneyler 3 tekrar olacak şekilde yapıldı ve log2 kat değişimi analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Pfaffl, 2001).

Çizelge 3.11. qRT-PCR için kullanılan bileşenler

Bileşen	**Hacim**
BlasTaqTM 2X qPCR MM*	10 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA	2 µl
Nuclease-free H_2O	20 µl'ye tamamlanır

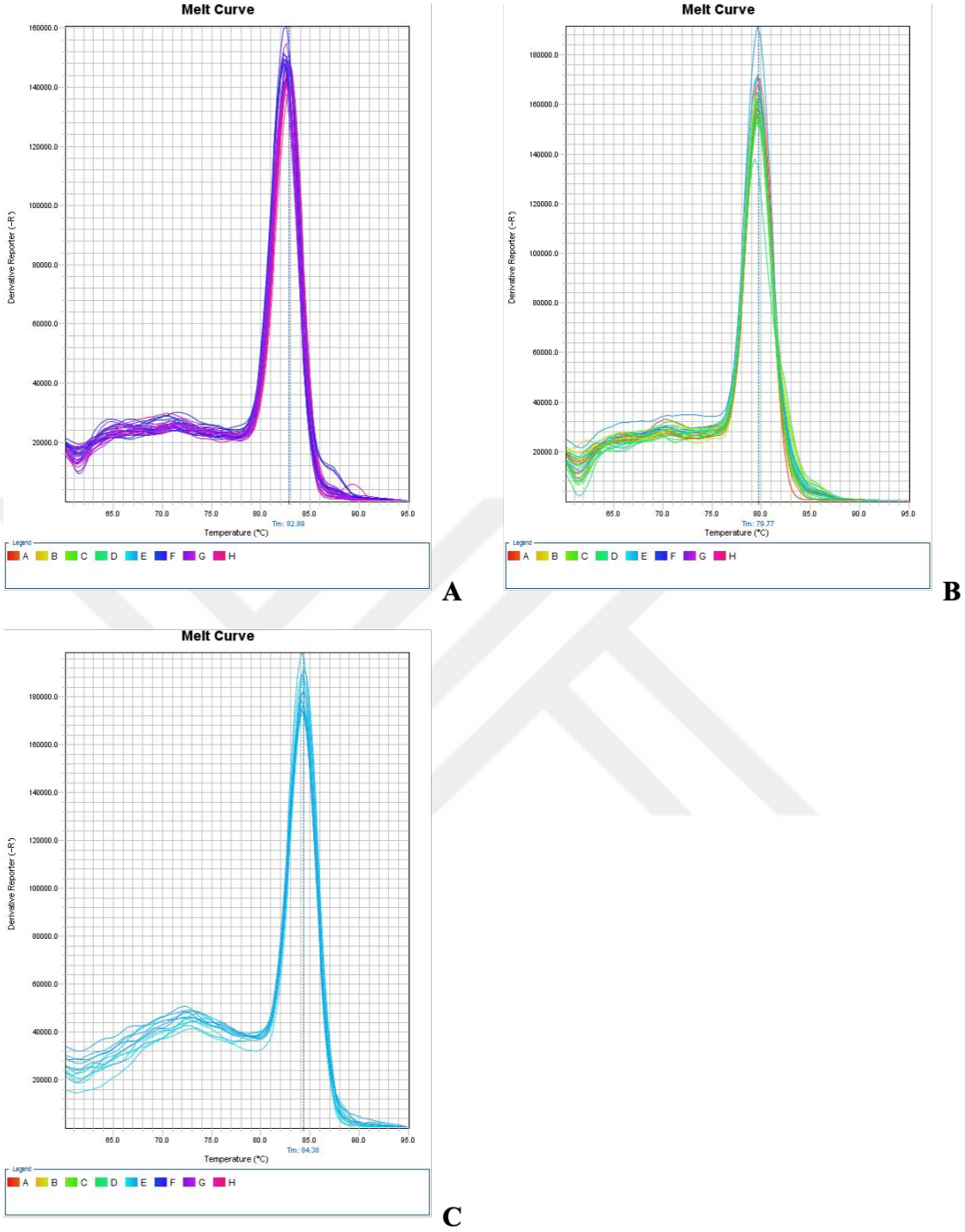
*Yüksek ROX gerektiren ekipmanlar için 1,25 ml MasterMix için 11,5 µl ROX veya 25 ml MasterMix için 225 µl ROX eklenir.

Çizelge 3.12. qRT-PCR için uygulanan inkübasyon adımları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü (cycle)
Enzim aktivasyonu	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	15 sn	40
Annealing/Extension	60°C	1 dk	

Çizelge 3.13. Tez kapsamında analiz edilen hedef mRNA'ların primer dizileri

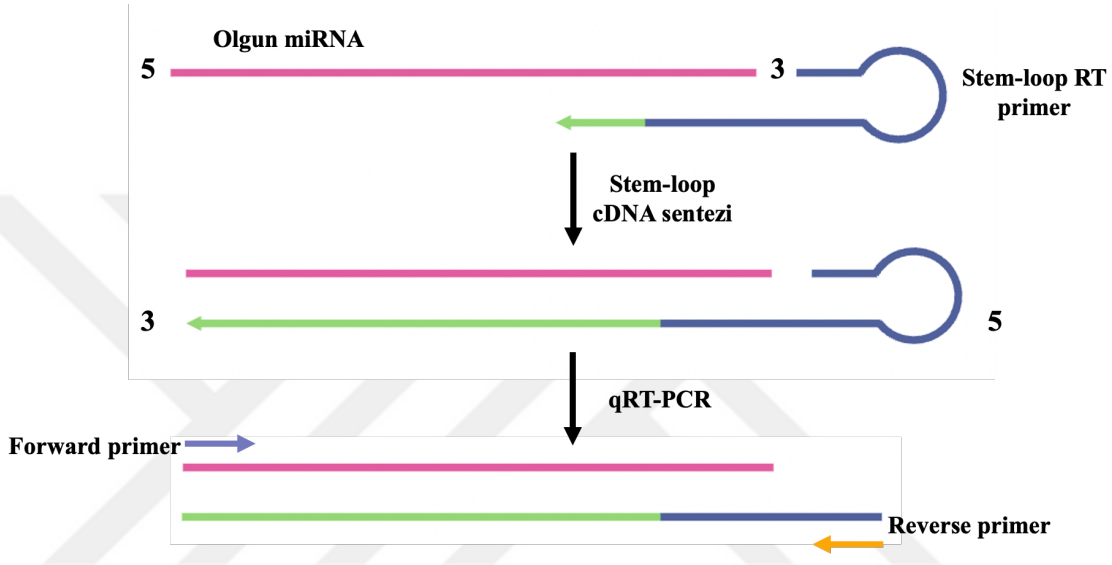
mRNA	Dizi
GAPDH (F)	5′-GCAAATTCCATGGCACCGT-3′
GAPDH (R)	5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG-3'
S1PR1 (F)	5′-GCCTCTTCCTGCTAATCAGCG-3′
S1PR1 (R)	5′-GCAGTACAGAATGACGATGGAG-3′
CXCR5 (F)	5'-CCATGCTCTACACTTTCGCC-3'
CXCR5 (R)	5'-AGAACGTGGTGAGAGAGGTG-3'
ALX3 (F)	5’-ATCCTGATGTGTATGCCCGG-3’
ALX3 (R)	5’-AGGGAGTTCTGCAGCTGAG-3’



Şekil 3.5. Aday olarak seçilen circRNA'ların ve internal kontrol olarak kullanılan circHIPK3'ün melting-curve grafikleri **A)** circHIPK3 **B)** circPTPN22 **C)** circMYBL2

3.2.8 Stem-loop qRT-PCR

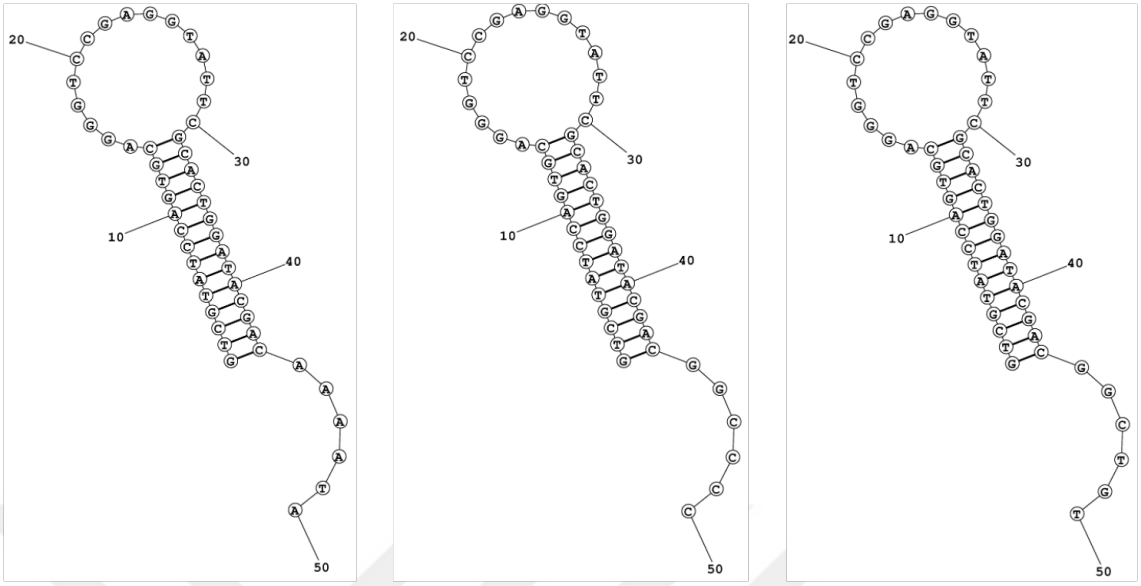
Stem-loop qRT-PCR, miRNA gibi küçük kodlamayan RNA'ların kantifikasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde RNA'lar, stem-loop primerleri kullanılarak cDNA'ya dönüştürülür. Daha sonra, elde edilen cDNA'lar qRT-PCR ile çoğaltılarak miRNA'ların miktarı belirlenir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Stem-loop RT-qPCR

Hedef miRNA'ların miktar tayini için kandan izole edilen miRNA örnekleri kullanılarak, stem-loop qRT-PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak miRNA örneklerinden, stem-loop RT primerleri kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Stem-loop RT primerleri Chen, (2005) referans alınarak tasarlandı. Kısaca, 44 nükleotid uzunluğundaki stem-loop dizisi, kendi içinde katlanarak bir saç tokası yapısı oluşturmaktadır. Bu dizinin sonuna, olgun miRNA'nın 3` ucuna bağlanacak şekilde miRNA'ya spesifik 6 nükleotidlik bir dizi eklendi. Bu şekilde, primerlerin sadece ilgili miRNA'lara bağlanması amaçlandı. RT primerlerinin ikincil yapıları ve potansiyel katlanma şekilleri DNA fold aracı (https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html) kullanılarak incelendi (Şekil 3.7) (Reuter ve Mathews, 2010).

RT-U6 RT-miR-4689 RT-miR-192



Şekil 3.7. RT stem-loop primerlerinin ikincil yapıları

Stem-loop qRT-PCR için kullanılan primerler ve miRNA dizileri Çizelge 3.14'deki gibidir. RT primerlerinde kırmızı renkli kısım olgun miRNA'ya spesifik nükleotidlerdir. miRNA dizileri, mirBase web sitesinden (http://www.mirbase.org/) alındı (Kozomara ve diğerleri, 2019).

Çizelge 3.14. Stem-loop qRT-PCR için kullanılan primerler ve dizileri

Primer	**Dizi**
RT-U6	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATA-3'
U6 Forward	5'- CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
RT-miR-4689	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCCCC-3'
miR-4689 Forward	5'-ATATTGAGGAGACATGGTGG-3'
RT-miR-192	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCTGT-3'
miR-192 Forward	5'-GCCCTGACCTATGAATTGAC-3'
Universal Reverse	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

cDNA sentez işlemi, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiş

olup, kitin protokolünde yer alan Random primer yerine stem-loop RT primerleri kullanıldı. cDNA sentezi için 50 ng konsantrasyonda RNA örnekleri kullanıldı. İlk olarak, RNA ve stem-loop RT primerler bir tüpe alınarak 65°'de 5 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından hemen buz üzerine alındı. Böylece, ikincil yapıların denatüre edilerek primerlerin RNA moleküllerine daha iyi bağlanması amaçlandı (Çizelge 3.15). Daha sonra, elde edilen RT ürünü qRT-PCR için şablon olarak kullanıldı. qRT-PCR, BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Applied Biological Materials) ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda ve StepOnePlus™ Real-Time PCR System cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3.15. Stem-loop RT cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve inkübasyon adımları

İnkübasyon Adımları	**Bileşen**	**Hacim**	**Final Konsantrasyon**
65°C-5 dk	Stem-loop RT Primer (2 µM)	1,0 µl	0,1 µM
	RNA (10ng)	5 µl	50 ng
– 25°C-10 dk – 37°C-120 dk – 85°C-5 dk	10X Reverse Transcriptase Buffer	2,0 µl	2X
	25X Deoxynucleotide Triphosphates Mix	0,8 µl	2X
	MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl	50U
	Nuclease-free H_2O	10,2 µl	

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 10'un deneme sürümü kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunuldu. Hasta ve kontrol grupları arasındaki circRNA ifade düzeylerinin karşılaştırılmasında, verilerin normal dağılım göstermemesi ve örneklem sayısının az olması nedeniyle, non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Birden fazla değişkenin olduğu analizlerde ise Kruskal Wallis testi uygulandı. 0,05'ten küçük p değeri ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Bilimler, Üroloji Anabilim Dalı, Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi, Üroloji Bölümü, İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği ve Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Bölümü'ne başvuran 28 kadın hasta ve herhangi bir otoimmün/otoenflamatuar hastalığı bulunmayan 18 sağlıklı kadın çalışmaya dahil edildi. 28 MAS/İS kadın hastaya ait klinik bilgiler Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar kadın ve hastaların yaş ortalaması 53,78 ± 10,44'tür. Sağlıklı bireyler yaş ve cinsiyet açısından hasta bireyler ile eşleniktir. 10 hastada Hunner lezyonu gözlenirken 13 hastada glomerülasyon mevcuttur. Ayrıca, 11 hastada ek otoimmün, 4 hastada ise ek otoenflamatuar hastalıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.1. MAS/İS hastalarının klinik özellikleri

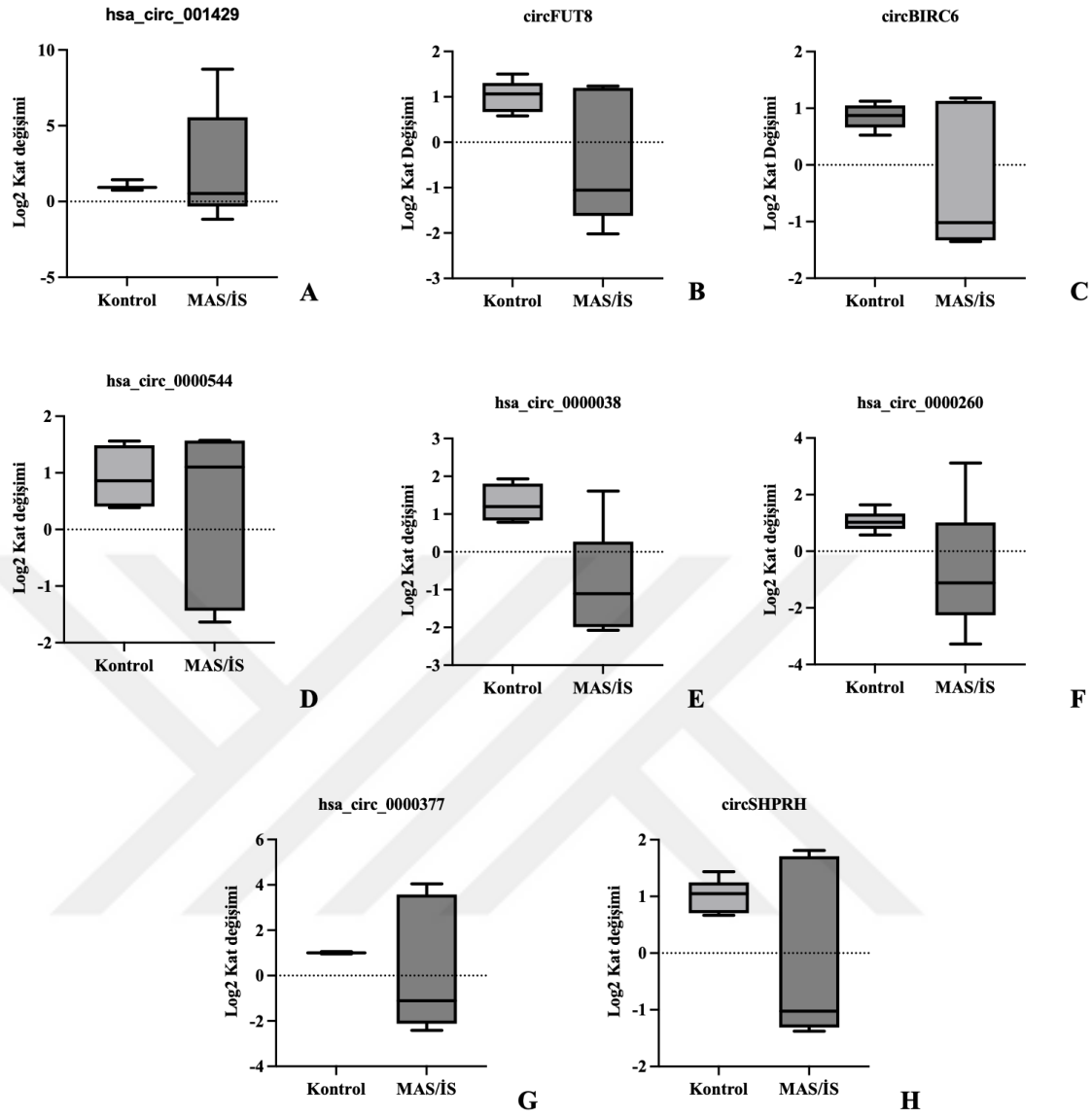
Klinik Özellikler	**Hasta Sayısı (%)**
Yaş	
≤40	3 (10,7)
>40	25 (89,3)
Hunner Lezyonu	
Var	10 (35,7)
Yok	18 (64,3)
Glomerülasyon	
Var	13 (46,4)
Yok	15 (53,6)
Tıbbi Geçmişi	
Otoimmün Hastalıklar	11 (39,3)
Diyabet	3
Hipotiroidi	8
Sedef	1
Multipl Skleroz (MS)	1
Sjögren	1
Otoenflamatuar Hastalıklar	4 (14,3)
Familial Mediterranean Fever (FMF)	3
Behçet	2

MAS/İS tanısı alan 28 hastanın 26'sından ve 18 sağlıklı bireyden kan örnekleri alındı. Ayrıca sistoskopi uygulanan 5 hastadan lezyonlu ve lezyonsuz olmak üzere eşlenik doku örnekleri alındı. Kan örneği alınan hastalardan 10'unda Hunner lezyonu mevcuttur ancak Hunner lezyonu olan hastaların hepsinden doku örneği alınmadı. Tüm örnekler, aday circRNA'ların ifade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi için işleme alındı.

4.1. Aday circRNA'ların Küçük Örneklem Grubu ile (5 MAS/İS ve 5 sağlıklı kontrol) İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

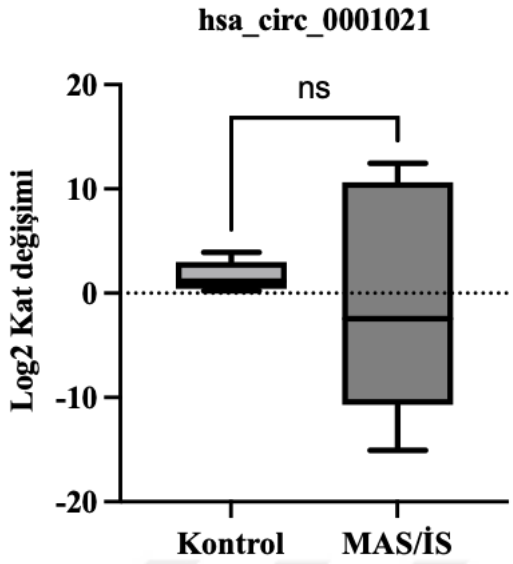
Aday olarak belirlenen circRNA'ların ifade düzeylerinin MAS/İS hastaları ile sağlıklı kontrol arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla, ilk aşamada rastgele seçilen 5 MAS/İS hastası ve 5 sağlıklı bireyin kan örneklerinde qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. circRNA'ların ifadelerinin normalizasyonu için internal kontrol olarak circHIPK3 (hsa_circ_000284) kullanıldı (Zhong ve diğerleri, 2019) ve kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile belirlendi.

hsa_circ_0001429, circFUT8 (hsa_circ_0003028) ve hsa_circ_0000544'in ifade düzeylerinde, MAS/İS grubunda kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık 1,106, 1,019 ve 1,104 katlık bir artış gözlenirken; circBIRC6 (hsa_circ_0002408), hsa_circ_0000038, hsa_circ_000260, hsa_circ_0000377 ve circSHPRH (hsa_circ_001649)'nin ifade düzeylerinde kontrole kıyasla hasta grubunda sırasıyla 1,062, 1,105, 1,118, 1,107 ve 1,105 katlık bir azalma gözlendi. Bu kat değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.1 A-H).



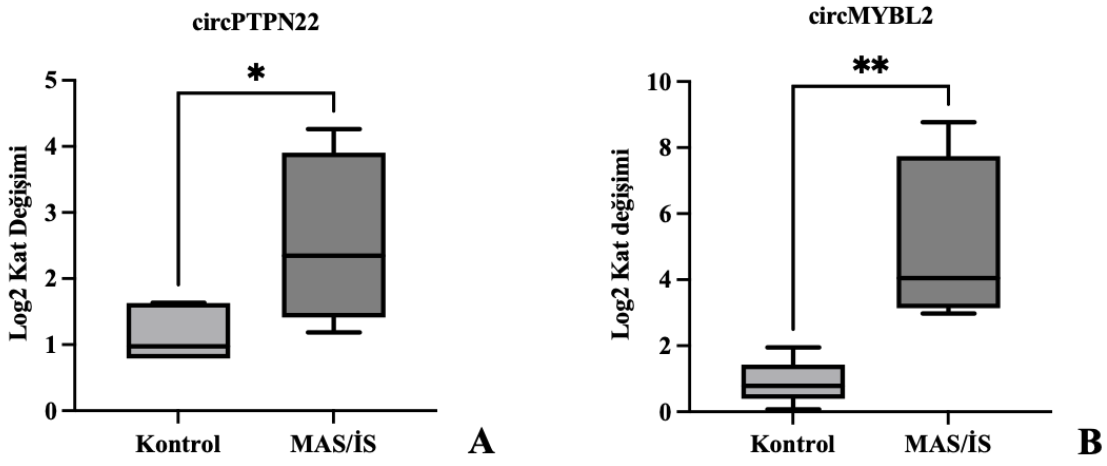
Şekil 4.1. Aday circRNA'ların 5 MAS/İS ve 5 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri üzerindeki ifade düzeyleri **(A)** hsa_circ_1429, **(B)** circFUT8, **(C)** circBIRC6, **(D)** hsa_circ_0000544, **(E)** hsa_circ_0000038, **(F)** hsa_circ_000260, **(G)** hsa_circ_0000377 ve **(H)** circSHPRH ifade düzeyi (Sonuçlar mean±SD olarak gösterilmiştir).

hsa_circ_0001021'in ifade düzeyi, MAS/İS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla yaklaşık 2,43 kat düşük bulunmuş olup, istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da bir azalma eğilimi göstermektedir ($p>0,05$) (Şekil 4.2). Hasta örnekleri arasındaki yüksek varyasyon nedeniyle kesin bir sonuç çıkarılamamış ve bu circRNA biyobelirteç adayı olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.2. Aday circRNA'lardan hsa_circ_0001021'in hasta (n=5) ve kontrol (n=5) grubundaki ifade düzeyi (mean±SD, ns; non-significant, p=0,1893).

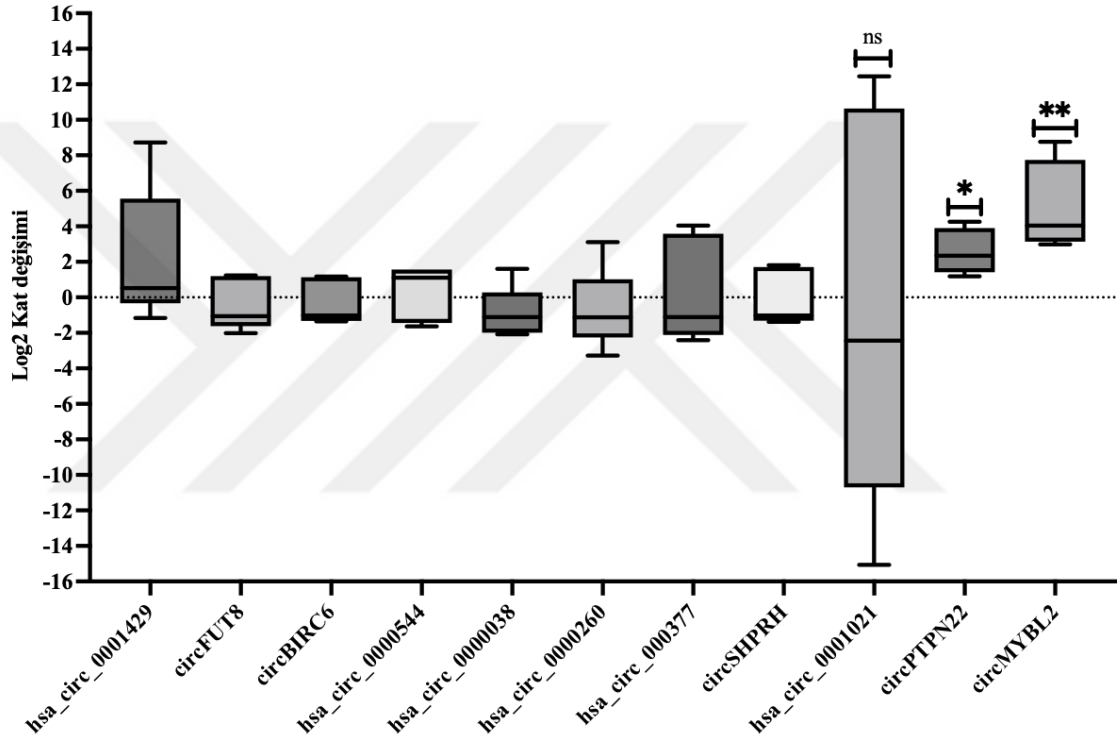
circPTPN22 (hsa_circ_0000110) ve circMYBL2 (hsa_circ_0060450)'nin ifade düzeylerinde, sağlıklı kontrole kıyasla hasta grubunda sırasıyla yaklaşık 2,34 (p= 0,0317) ve 4,04 (p= 0,0079) katlık bir artış gözlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. circPTPN22 ve circMYBL2 aday circRNA'larının 5 MAS/İS ve 5 sağlıklı bireyden alınan kan örnekleri üzerindeki ifade düzeyleri **A)** circPTPN22 ve **B)** circMYBL''nin MAS/İS (n=5) ve kontrol (n=5) grubundaki ifade düzeyi (mean±SD, *p<0,05, **p<0,01)

Tüm aday circRNA'ların ifade düzeylerini içeren grafik Şekil 4.4'te gösterildi. Yapılan ön analiz sonucunda, yalnızca circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade düzeylerinde

istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi ve bu iki circRNA'nın ifade düzeylerinin MAS/İS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla arttığı gözlendi. Bu bulguların doğrulanabilmesi amacıyla, hasta ve kontrol gruplarındaki örneklem sayıları artırılarak bir sonraki bölümde bu circRNA'ların ifade düzeyleri tüm hasta ve sağlıklı grupları üzerinde yeniden analiz edildi.

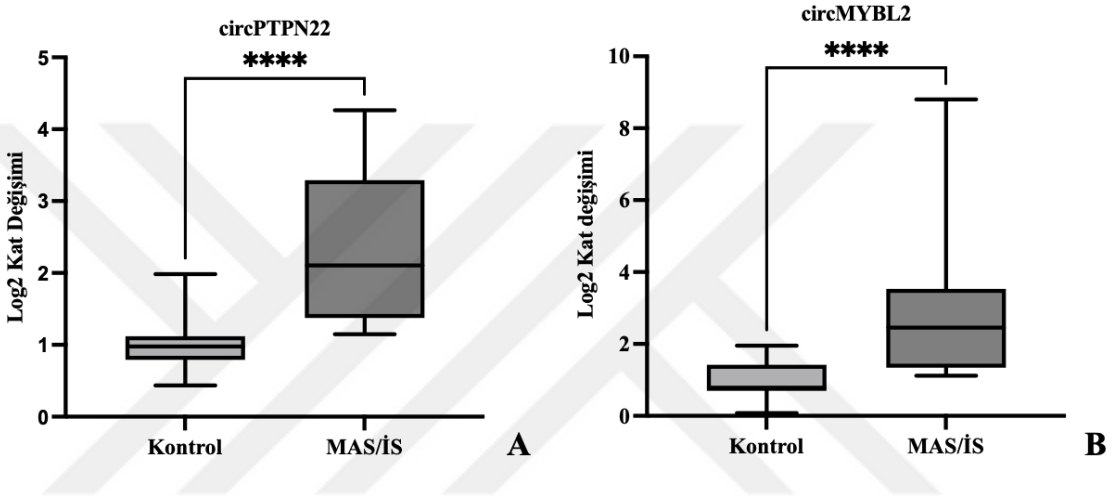


Şekil 4.4. 5 MAS/İS hastası ile 5 sağlıklı kontrol arasında kıyaslanarak analiz edilen tüm aday circRNA'ların ifade düzeylerini içeren grafik (mean±SD, ns; non-significant, *p<0,05, **p<0,01)

4.2. circPTPN22 ve circMYBL2'nin Tüm MAS/İS Hastaları ve Sağlıklı Bireylerin Kan Örneklerindeki İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Önceki analizlerde aday circRNA'lar arasından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade düzeylerinin doğrulanması amacıyla örnek sayısı artırıldı. Bu amaçla, toplam 26 MAS/İS ve 18 sağlıklı kontrolden alınan kan örneklerinde bu iki circRNA'nın ifade düzeyleri qRT-PCR analizi ile karşılaştırıldı.

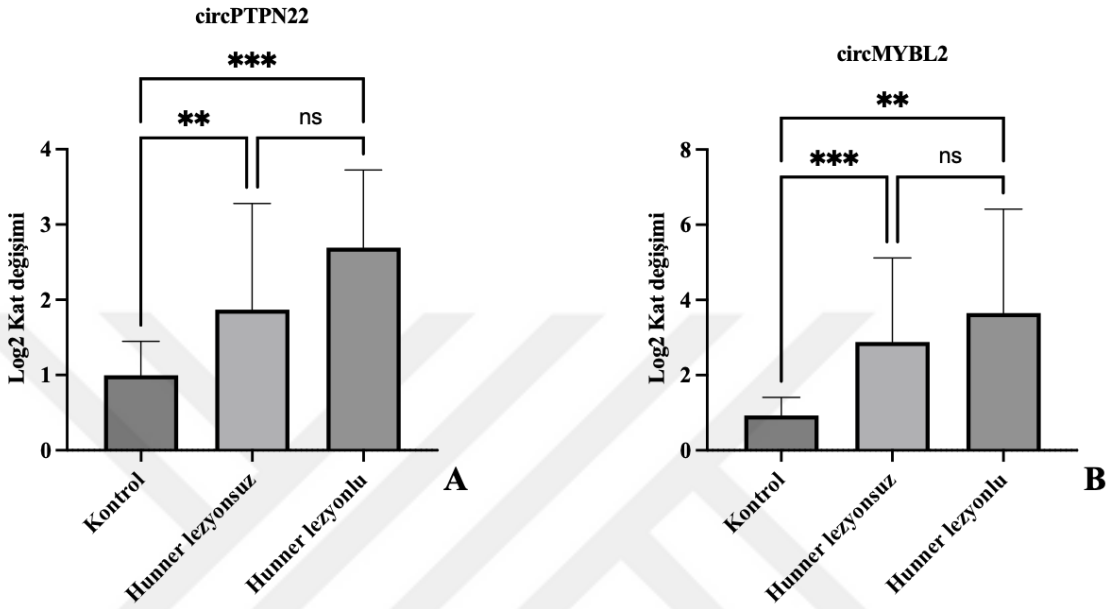
Örnek sayısı artırıldığında sağlıklı kontrole kıyasla MAS/İS hastalarında circPTPN22'nin ifade düzeyinde 2,106 katlık bir artış gözlendi (p <0.0001). circMYBL2'nin ifade düzeyinde ise MAS/İS hastalarında sağlıklı kontrol ile kıyaslandığında, yaklaşık 2,44 katlık bir artış gözlendi (p <0.0001) (Şekil 4.5). Bu bulgular, örneklem büyüklüğünün artırılmasının istatistiksel gücü önemli ölçüde artırdığını ve circPTPN22 ile circMYBL2'nin MAS/İS hastalarında belirgin şekilde yukarı regüle olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. circPTPN22 ve circMYBL2'nin tüm hasta ve kontrol örneklerindeki ifade düzeyi **A)** circPTPN22 ve **B)** circMYBL2'nin MAS/İS (n=26) ve kontrol grubu (n=18) arasındaki ifade farklılıkları (mean ± SD, ****P<0.0001)

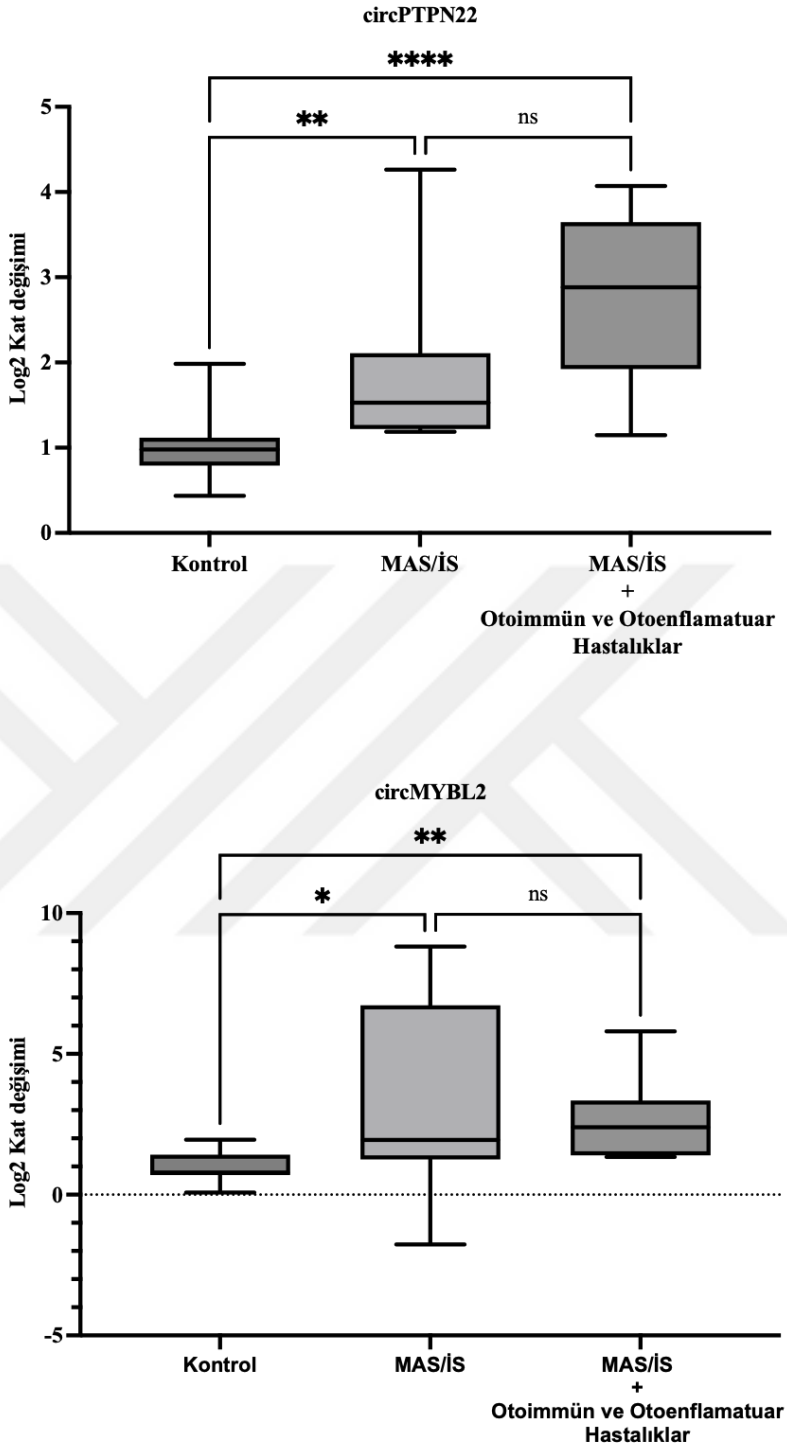
MAS/İS, Hunner lezyonunun varlığına göre Hunner lezyonlu MAS/İS ve Hunner lezyonsuz MAS/İS olmak üzere iki fenotipe ayrılmaktadır. Bu iki fenotip arasında klinik semptomlar, histopatolojik özellikler ve enflamasyon durumu açısından farklılıklar gözlenmektedir. Bu iki fenotip arasındaki farklılıklar ile circPTPN22 ve circMYBL2 ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla hasta örneklerinden elde edilen qRT-PCR verileri Huner lezyonlu MAS/İS ve Hunner lezyonsuz MAS/İS olarak gruplandırılarak analiz edildi. Hastalar, Hunner lezyonlu ve lezyonsuz olarak gruplandırıldığında, circPTPN22'nin ifade düzeyinde, Hunner lezyonlu hastalarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1,8 katlık bir artış gözlenirken; Hunner lezyonsuz hastalarda kontrole kıyasla yaklaşık 2,69 katlık bir artış gözlendi. Aynı şekilde kıyaslandığında, circMYBL2'nin ifade düzeyinde, Hunner lezyonlu hasta grubunda kontrole kıyasla yaklaşık 3,64 katlık bir artış gözlenirken; Hunner lezyonsuz hasta

grubunda kontrole kıyasla yaklaşık 2,88 katlık bir artış gözlendi. Her iki circRNA'nın ifade düzeylerinde, Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz grup arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.6).



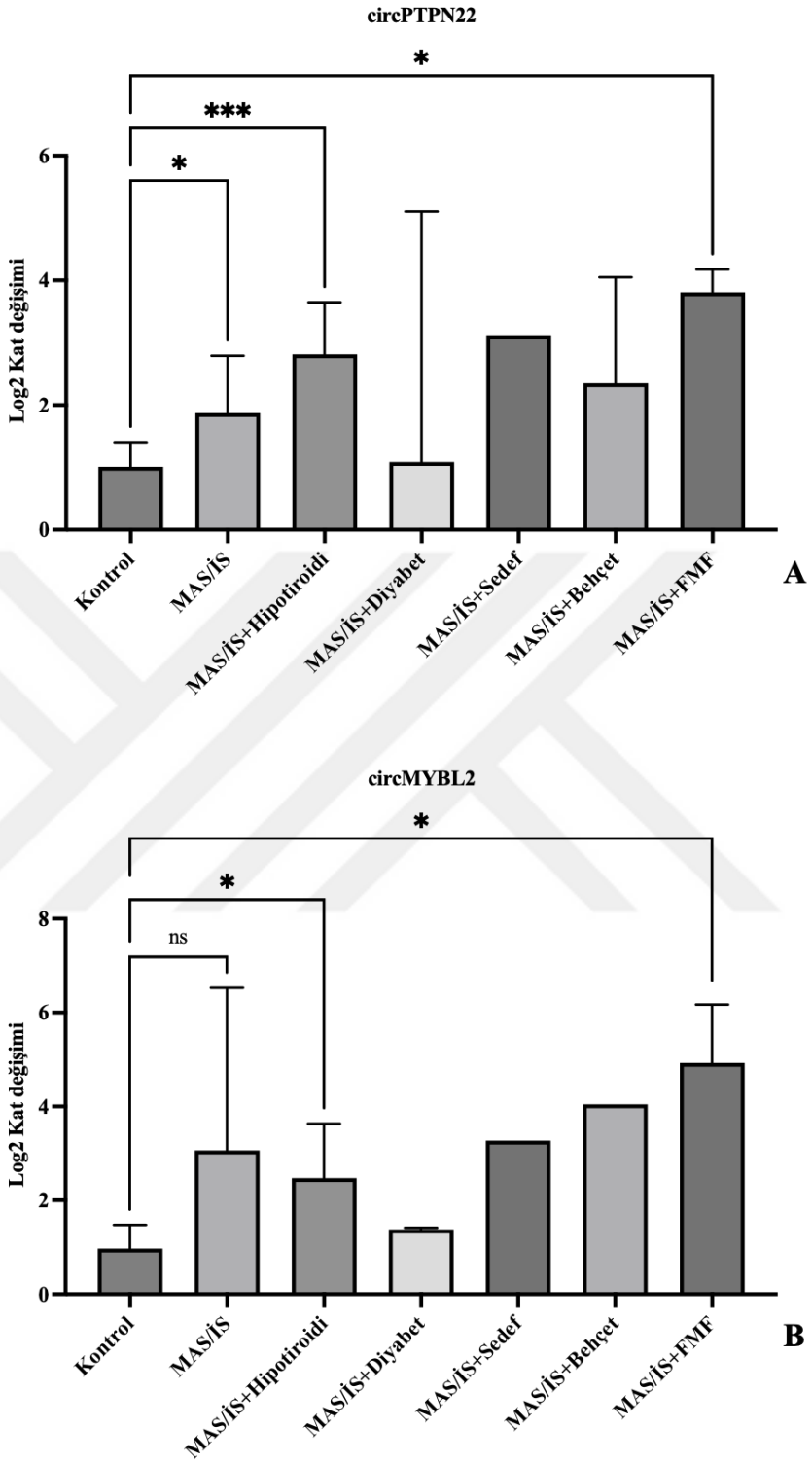
Şekil 4.6. circPTPN22 ve hsa_circ_0060450'nin Hunner lezyonlu (n=8) ve Hunner lezyonsuz (n=18) hasta grupları ve kontrol grubu (n=18) arasındaki ifade farklılıkları (mean ± SD, ns; non-significant, **p<0,01, ***p<0,001,)

26 MAS/İS hastasından 14'ünde ek otoimmün ve otoenflamatuar hastalıklar mevcuttur. circPTPN22 ve circMYBL2'nin eşlik eden otoimmün ve otoenflamatuar hastalıklar ile ilişkisini değerlendirmek amacıyla hasta örneklerinden elde edilen kat değişimi verileri, kontrol, MAS/İS ve MAS/İS+otoimmün/otoenflamatuar hastalıklar şeklinde gruplandırılarak değerlendirildi. CircPTPN22'nin ifade düzeyi, ek otoimmün veya otoenflamatuar hastalığa sahip MAS/İS hastalarında kontrole kıyasla yaklaşık 2,8 kat artış gösterdi. Ancak, ek hastalığı bulunmayan MAS/İS hastaları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.7A). Benzer şekilde, circMYBL2'nin ifade düzeyi de ek otoimmün veya otoenflamatuar hastalığa sahip MAS/İS hastaları ile ek hastalığı bulunmayan MAS/İS hastaları arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Bununla birlikte, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2,4 katlık bir artış tespit edildi (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7. circPTPN22 ve hsa_circ_0060450'nin MAS/İS (n=12), MAS/İS+Otoimmün hastalık (n=14= ve Kontrol grubu (n=18) arasındaki ifade farklılıkları (mean ± SD, ns; non-significant, *p<0,05, **p<0,01, ****P<0.0001)

MAS/İS hastalarında eşlik eden otoimmün ve otoenflamatuar hastalıkların circPTPN22 ve circMYBL2 ifadeleri üzerindeki etkisini daha ayrıntılı değerlendirmek amacıyla, her bir ek hastalık ayrı ayrı kontrol ve ek hastalığı bulunmayan MAS/İS grubu ile kıyaslandı. circPTPN22'nin ifade düzeyinde, kontrole kıyasla ek hipotiroidi ve FMF hastalığı olanlarda sırasıyla yaklaşık olarak 3 ve 4 katlık bir artış gözlendi. Benzer şekilde circMYBL2 ifade düzeyi de ek hipotiroidi ve FMF hastalığı olan MAS/İS gruplarında sırasıyla yaklaşık 2 ve 5 katlık bir artış gösterdi. Diğer hasta gruplarında ise her iki circRNA için de ifade düzeyi açısından anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.8).

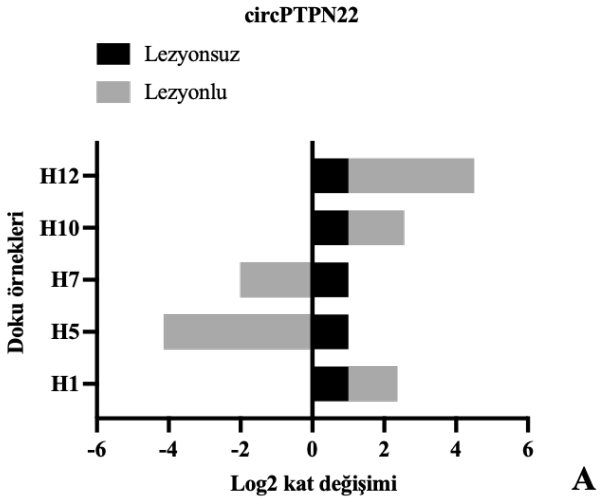


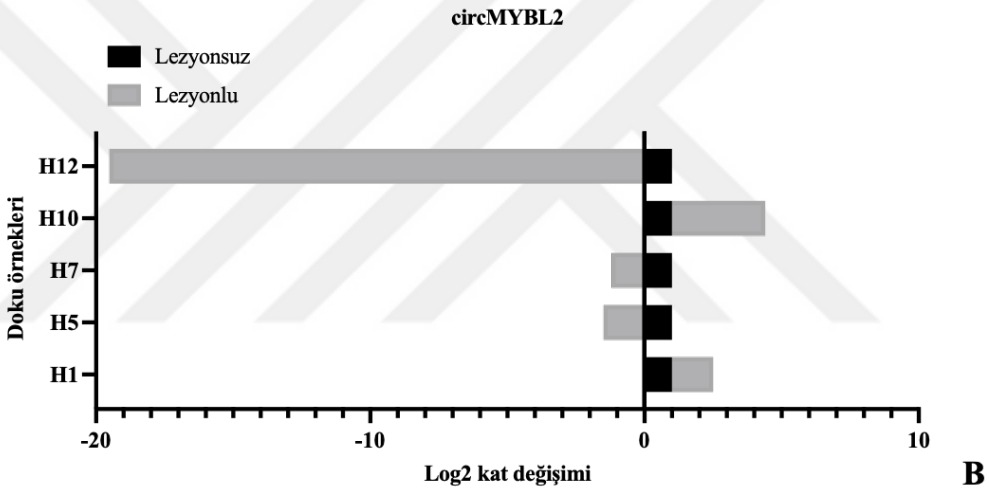
Şekil 4.8. Ek otoimmün/otoenflamatuar hastalıkları olan MAS/İS hasta gruplarında circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade düzeyleri (mean ± SD, ns; non-significant, *p<0,05, ***P<0.001)

4.3. Hunner Lezyonlu ve Hunner Lezyonsuz Doku Örneklerinde circPTPN22 ve circMYBL2'nin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

MAS/İS hastalarından alınan 5 adet lezyonlu ve lezyonsuz doku çifti olmak üzere 10 doku örneğinde circPTPN22 ve hsa_circ_0060450'nın ifade düzeyleri qRT-PCR ile analiz edildi. Hunner lezyonlu hastalardan alınan lezyonlu/lezyonsuz doku çiftleri kendi aralarında kıyaslandı.

Lezyonlu doku örnekleri lezyonsuz doku örnekleri ile kıyaslandığında, circPTPN22 ifade düzeyi açısından örnekler arasında oldukça farklı sonuçlar elde edildi. H1, H10 ve H12 numaralı hastalardan alınan lezyonlu dokularda circPTPN22 ifadesi lezyonsuz dokulara kıyasla sırasıyla, 1,37, 1,55 ve 3,5 katlık artış gösterirken; H5 ve H7 numaralı hastalardan alınan doku örneklerinde sırasıyla 4,14 ve 2,01 katlık azalma gösterdi (Şekil 4.9A). circMYBL2 ifade düzeyi ise H1 ve H10 numaralı hastalardan alınan lezyonlu dokularda sırasıyla 1,5 ve 3,4 katlık bir artış gösterirken; H5, H7 ve H12 numaralı hastalardan alınan lezyonlu doku örneklerinde sırasıyla 19,5, 1,2 ve 1,4 katlık bir azalma gösterdi (Şekil 4.9B).





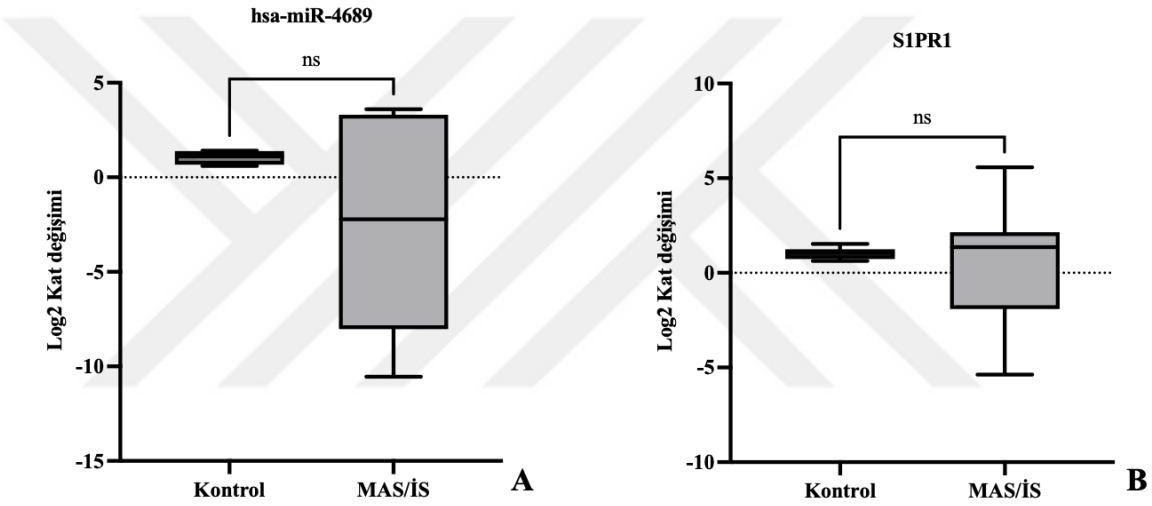
Şekil 4.9. circPTPN22 ve circMYBL2'nin MAS/İS hastalarından alınan lezyonlu/lezyonsuz doku çiftleri arasındaki ifade düzeyi

4.4. circPTPN22 ve circMYBL2'nin Seçilen Olası Hedef miRNA'larının ve Hedef mRNA'larının MAS/İS ve Sağlıklı Kontrollerin Kan Örneklerindeki İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

4.4.1 hsa-miR-4689 ve hedef mRNA'sı *S1PR1*'in ifade düzeyleri

circPTPN22'nin potansiyel miRNA hedeflerini belirlemek amacıyla literatürde yapılan çalışmalar incelendi ve daha önce yapılan bir çalışmada, circPTPN22'nin, sistemik lupus eritematozuslu hastalarda *S1PR1* ekspresyonunu düzenlemek için miR-4689'u

süngerleştirerek T hücresi aktivasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2023). Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında circPTPN22'nin miR-4689 ile olan potansiyel ilişkisini değerlendirmek amacıyla MAS/İS hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında miR-4689'un ifade düzeyleri karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Ayrıca, *S1PR1* ekspresyonu da analiz edilerek, circPTPN22'nin bu hedef üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, miR-4689 ifade düzeyinde MAS/İS hastalarında yaklaşık 2 katlık bir azalma göstermekle birlikte bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (Şekil 10A). *S1PR1* ifade düzeyi ise hasta ve sağlıklı kontrol arasında herhangi bir farklılık göstermedi (Şekil 4.10B).

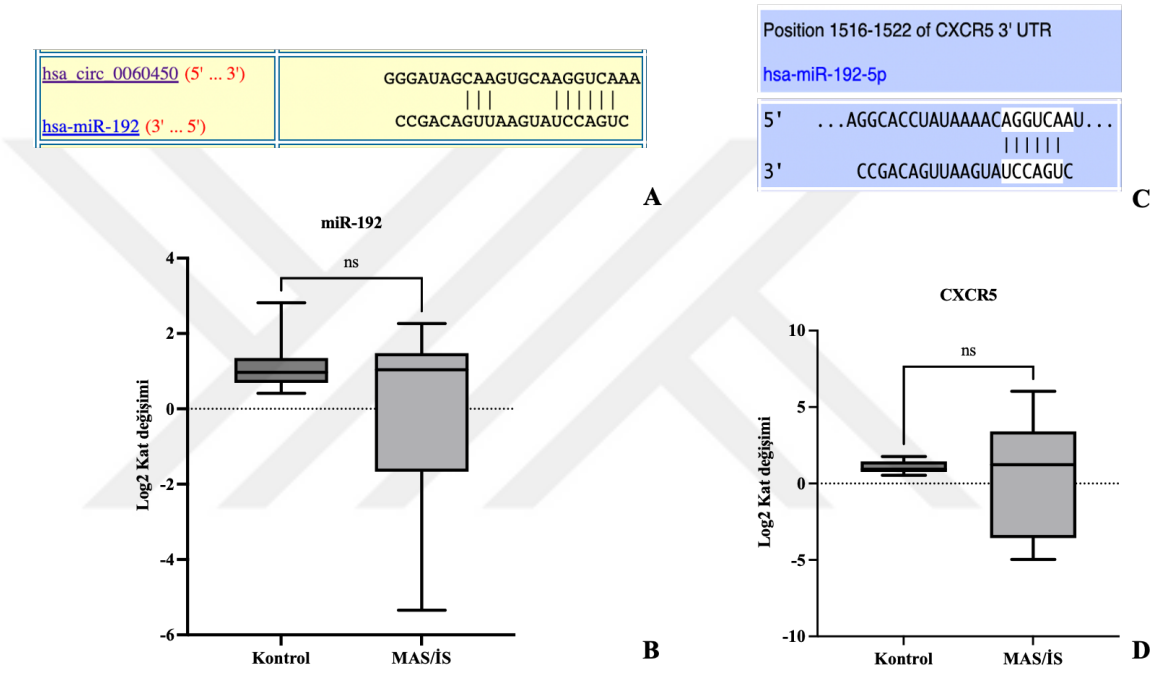


Şekil 4.10. hsa-miR-4689 ve hedef mRNA'sı olan *S1PR1*'in MAS/İS ve kontrol grubu arasındaki ifade düzeyi analizi **A)** hsa-miR-4689'un ifade düzeyi **B)** *S1PR1*'in ifade düzeyi (mean ± SD, ns; non-significant)

4.4.2 hsa-miR-192 ve hedef mRNA'sı *CXCR5*'in ifade düzeyleri

hsa-miR-192'nin çeşitli otoimmün ve enflamatuar hastalıklarda aşağı regülasyonunu göstermiştir (Cui ve diğerleri, 2016; Duraikkannu ve diğerleri, 2023; Guo ve diğerleri, 2015; Lu ve diğerleri, 2020). CircInterectome veri tabanına bakıldığında hsa-miR-192'nin, circMYBL2'nin potansiyel hedefi olduğu görülmektedir (Şekil 4.11A). Bu nedenle, circMYBL2'nin miR-192 ile olan potansiyel ilişkisini değerlendirmek amacıyla MAS/İS hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında miR-192'nin ifade düzeyleri karşılaştırılarak analiz edildi. hsa-miR-192'nin hedef mRNA'larını belirlemek için

miRDB ve TargetScan veri tabanları kullanıldı (Şekil 4.11B). Tarama sonucunda, otoimmün hastalıklar ve enflamasyonla ilişkili olabileceği düşünülen *CXCR5* potansiyel hedef olarak belirlendi (Pan ve diğerleri, 2022; Wang ve diğerleri, 2022). *CXCR5* geninin MAS/İS üzerindeki potansiyel etkilerini daha iyi anlamak amacıyla ifade düzeyleri analiz edildi. MAS/İS ile potansiyel etkilerini araştırmak için ifade düzeyleri belirlendi. Analiz sonucunda, hasta ve sağlıklı arasında miR-192 ve *CXCR5*'in ifade düzeylerinde herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.11C ve Şekil 4.11D).

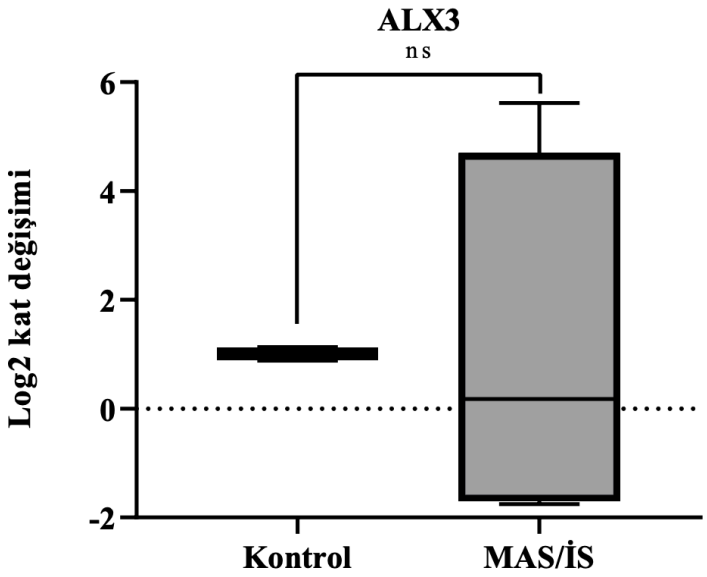


Şekil 4.11. hsa-miR-192 ve *CXCR5*'in sağlıklı ve MAS/İS kan örnklerindeki ifade düzeyi **A)** circMYBL2-miR192 eşleşmesi **B)** miR-192 ifade düzeyi **C)** miR192-*CXCR5* eşleşmesi **D)** *CXCR5* ifade düzeyi (mean ± SD, ns; non-significant)

4.4.3 *ALX3*'ün MAS/İS ve kontrol kan örneklerindeki ifade düzeyi

ALX3 geni, gelişimsel süreçlerde önemli roller üstlenen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, *ALX3*'ün embriyonik gelişim sırasında hücre bölünmesi ve göçü ile ilişkili olduğunu göstermiştir (ten Berge ve diğerleri, 1998). Son yıllarda ALX ailesine ait genlerin çeşitli kanser türlerinde proliferasyon, invazyon ve EMT ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shi ve diğerleri, 2017). Bu bağlamda, MAS/İS hastalığında, *ALX3* geninin EMT sürecindeki potansiyel rolünü değerlendirmek amacıyla MAS/İS ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri üzerindeki ifade düzeyleri analiz edildi.

Yapılan analiz sonucunda hasta ve kontrol grubu arasında *ALX3* ifade düzeyi açısından anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *ALX3*'ün MAS/İS ve Kontrol Kan Örneklerindeki İfade Düzeyi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MAS/İS, hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen, bakteriyel enfeksiyon veya tanımlanabilir bir patolojik neden olmaksızın idrar sıklığı, aciliyet, noktüri ve pelvik ağrı ile karakterize kronik bir hastalıktır (Clemens ve diğerleri, 2022). MAS/İS'in etiyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte ürotelyum yüzeyini kaplayan glikozaminoglikanların (GAG) eksikliği, immünolojik etiyoloji, aktive edilmiş mast hücreleri, nöral değişiklikler, otoimmünite ve enflamasyonu içeren çeşitli teoriler öne sürülmüştür (Rourke ve diğerleri, 2014). Hastalığın karmaşık bir yapıya sahip olması ve semptomlarının çoğunun eşlik eden diğer hastalıklarla örtüşmesi tanı ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, hastalığın altında yatan mekanizmaları anlamaya yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Hastalığın tanısında altın standartlar yoktur ve klinisyenler tedaviye başlamak için eşlik eden hastalıklardan ortak olan birkaç semptomu ekarte etmek durumundadır. Erken tanıdaki komplikasyonlar tedaviyi zorlaştırmakta ve hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Dolayısıyla hastalığın altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve etkili tedavi stratejilerinin belirlenebilmesi için tanısal belirteçlere ihtiyaç vardır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, ncRNA'ların birçok hastalığın patogenezinde kritik roller oynayabileceğini göstermektedir (Nemeth ve diğerleri, 2024). circRNA'lar, stabiliteleri, hücresel süreçlerdeki düzenleyici rolleri ve hastalıklara özgü ifade paternleri sayesinde çeşitli hastalıkların tanı, teşhis ve patogenezinin aydınlatılmasında önemli biyobelirteç adayları olarak öne çıkmaktadır (Verduci ve diğerleri, 2021).

CircRNA'lar birçok farklı hastalıkta kapsamlı şekilde araştırılmış olmasına rağmen, MAS/İS ile ilişkili çalışmalar oldukça sınırlıdır ve şimdiye kadar yalnızca iki çalışma bulunmaktadır. Yang ve diğerleri (2023), MAS/İS tanısı ve terapötik hedeflerini belirlemeye yönelik biyobelirteç keşfi odaklı çalışmada, bir circRNA-miRNA-mRNA ağı kurarak *IFIT3* ve *RSAD2* genlerini hub genleri olarak tanımlamış ve circ.5863'ün aşırı ekspresyonunun enflamasyon hasarını hafiflettiğini rapor etmiştir. MAS/İS'in ilerlemesinde circTHBS1'in rolünü ve potansiyel moleküler mekanizmasını ortaya çıkaran diğer bir çalışmada, circTHBS1'in miR-139-5p/*MFN2* eksenini düzenleyerek MAS/İS hücrelerinin proliferasyonunu, metastazını, EMT sürecini ve enflamasyonunu

kolaylaştırdığı gösterilmiş ve circTHBS1'in MAS/İS tedavisi için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2022). Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda MAS/İS'ın tespiti için dolaşımdaki circRNA biyobelirteçleri ile ilgili araştırma yok denecek kadar azdır.

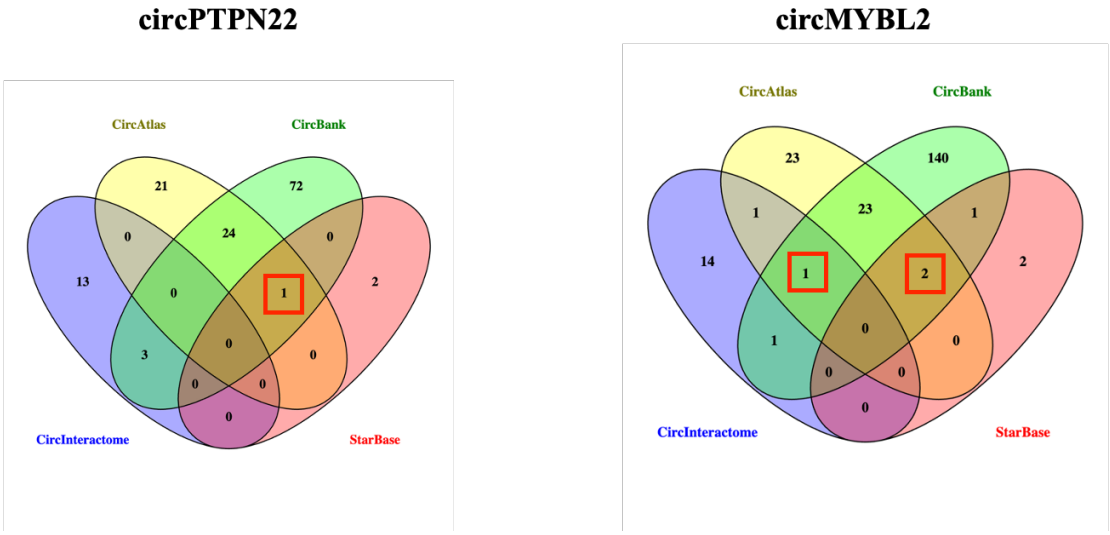
Mevcut tez çalışmasında, MAS/İS hastalarında circRNA'ların biyobelirteç olarak potansiyelini değerlendirmek amacıyla, hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri üzerinde, belirlenen 11 aday circRNA'nın ifade düzeyleri incelenmiştir. Bu amaç kapsamında öncelikle, MAS/İS etiyolojisinde rol oynayabilecek süreçler ile ilişkilendirilen circRNA'lar belirlenerek 5 MAS/İS ve 5 sağlıklı kontrol olmak üzere küçük örneklem grubunda, circRNA'ların ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak analiz edildi. qRT-PCR analizleri sonucunda, circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade seviyelerinin MAS/İS ve sağlıklı kontrol ile kıyaslandığında önemli derecede artmış olduğu belirlendi. Hunner lezyonlu hem de Hunner lezyonsuz MAS/İS hastalarında anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Hunner lezyonlu hastalarda circPTPN22'nin kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat, Hunner lezyonsuz hastalarda ise 2,69 kat arttığı tespit edilmiştir. CircMYBL2 için ise bu oranlar sırasıyla 3,44 ve 4,64 kat olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, Hunner lezyonlu ve Hunner lezyonsuz hastalar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Elde edilen sonuçlar, MAS/İS'in patogenezinde otoimmün mekanizmaların ve enflamasyonun önemli rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. CircPTPN22, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan *PTPN22* geninden türetilmiştir ve birçok otoimmün hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *PTPN22*, T hücre reseptör sinyallemesini düzenleyen bir fosfataz olup, bağışıklık sisteminde negatif geri bildirim sağlayarak otoimmün yanıtları baskılayıcı etki gösterebilmektedir (Stanford ve Bottini, 2014). CircPTPN22'nin artmış ifadesi, MAS/İS hastalarında bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonu ve enflamatuar yanıtın güçlenmesi ile ilişkili olabilir.

Benzer şekilde, circMYBL2, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve doku yenilenmesi süreçlerinde kritik rol oynayan *MYBL2* geninden türetilmiştir. *MYBL2*, hücresel proliferasyon ve DNA hasar yanıtında önemli bir transkripsiyon faktörü olup (Musa ve

diğerleri, 2017), mesane dokusunda artmış ifadesi enflamasyon ve hücresel stresin bir göstergesi olabilir. MAS/İS hastalarında circMYBL2'nin yüksek düzeyde olması, mesane epitel hücrelerindeki rejenerasyon ve enflamatuar yanıt süreçlerine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmamız kapsamında ifade seviyesi farklılık gösteren iki aday dairesel RNA olan circPTPN22 ve circMYBL2'nin olası miRNA hedefleri literatürdeki deneysel veriler (Z. Jiang ve diğerleri, 2023; Duraikkannu ve diğerleri, 2023) taban alınarak belirlenmiş ve olası miRNA hedef çalışmasında sırasıyla hsa-mir-4689 ve hsa-mir-192 olarak belirlenmiştir. Ancak çalışmamız sonucu her iki miRNA molekülündeki ve devamında bu miRNA moleküllerinin hedef mRNA'larındaki (*S1PR1* ve *CXCR5*) ifade değişiklikleri anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu bulgular ışığında tez çalışmasının devamı niteliğinde olacak şekilde yeni projeler, gelecek perspektiflerimiz arasında bulunmaktadır. Bu perspektiflerden biri de ifade farklılığı bulduğumuz iki dairesel RNA molekülünün süngerlediği olası miRNA ve hedef mRNA'larını keşfetmek olacaktır. Bu amaca hizmet etmek üzere ilk aşamada CircInterectome, CircAtlas, CircBank ve StarBase veri tabanları kullanılarak olası miRNA adayları belirlenerek listelenmiştir (Dudekula ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2014; Liu ve diğerleri, 2019; Wu ve diğerleri, 2020). Bu listeleme yapılırken en az üç veri tabanı tarafından ortak tanımlanan miRNA hedefleri öncelikli olarak seçilmiştir (Şekil 5.1), (Çizelge 5.1). Bu miRNA'ların hedef mRNA'ları miRDB kullanılarak belirlenebilir (Y. Chen ve Wang, 2020). Ancak hedef mRNA belirleme aşamasında sayıları yüzlerle ifade edilebilecek gen ürünleri ortaya çıktığından ilk aşamada hedef miRNA'ların ifade seviyeleri hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılacak, daha sonrasında çıkan sonuçlara göre hedef mRNA'ların belirlenmesi daha kolay olacaktır. Bu aşamada da ifadesi değişkenlik göstermiş olan miRNA bulunması durumunda hedef mRNA olarak yüzlerce aday arasından ilk olarak otoimmün/otoenflamatuar yolaklarda rol alabilecek genlerin tercih edilmesi daha faydalı olacaktır.



Şekil 5.1. circPTPN22 ve circMYBL'nin CircInterectome, CircAtlas, CircBank ve StarBase veri tabanları tarafından tanımlanan miRNA hedeflerinin venn diyagramı

Çizelge 5.1. circMYBL2'nin olası hedef miRNA'larının listesi

circRNA	**Veri Tabanı Kesişimi**	**Ortak miRNA'lar**
circMYBL2	CircAtlas-CircBank	hsa-miR-1229-3p, hsa-miR-1237-3p, hsa-miR-1910-5p, hsa-miR-2276-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-3190-5p, hsa-miR-3200-3p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-3692-5p, hsa-miR-4267, hsa-miR-4435, hsa-miR-4512, hsa-miR-4638-5p, hsa-miR-4669, hsa-miR-4676-3p, hsa-miR-4691-3p, hsa-miR-4778-3p, hsa-miR-4799-3p, hsa-miR-5193, hsa-miR-5588-5p, hsa-miR-6075, hsa-miR-6131, hsa-miR-642a-5p
	CircAtlas-CircBank-StarBase	hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-486-5p
	CircBank-StarBase	hsa-miR-548o-3p
	CircInterectome-CircAtlas-StarBase	hsa-miR-1256
	CircInterectome-CircBank	hsa-miR-626
	CircInteractome-CircAtlas	hsa-miR-636
	CircInteractome-CircAtlas-CircBank	hsa-miR-1256
	CircAtlas-CircBank-StarBase	hsa-miR-1301-3p, hsa-miR-486-5p
circPTPN22	CircInteractome- CircBank	hsa-miR-1253,hsa-miR-665, hsa-miR-924
	CircAtlas-CircBank	hsa-miR-1275, hsa-miR-2861, hsa-miR-30c-1-3p, hsa-miR-3175, hsa-miR-4294, hsa-miR-450a-1-3p, hsa-miR-4724-3p, hsa-miR-5004-3p, hsa-miR-5698, hsa-miR-601, hsa-miR-6134, hsa-miR-659-3p, hsa-miR-6731-5p, hsa-miR-6733-3p, hsa-miR-6788-5p, hsa-miR-6809-5p, hsa-miR-6825-5p, hsa-miR-6870-5p, hsa-miR-7106-5p, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-7111-5p, hsa-miR-7160-5p, hsa-miR-8085, hsa-miR-8089
	CircAtlas-CircBank-StarBase	hsa-miR-3679-5p

Çalışmanın bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Öncelikle, çalışma grubu nispeten küçük bir örneklemden oluşmaktadır. Daha büyük hasta ve kontrol grupları ile yapılacak çalışmalar, elde edilen sonuçların daha güvenilir ve genellenebilir olmasını sağlayacaktır. İkinci olarak, yalnızca belirli circRNA'ların ifade analizleri gerçekleştirilmiş olup, bu moleküllerin fonksiyonel etkileri detaylı olarak araştırılmamıştır. CircRNA'ların hedef miRNA'lar ve mRNA'lar ile etkileşimleri, ileri biyoinformatik analizler ve deneysel validasyonlarla desteklenmelidir. Bu bağlamda, circPTPN22 ve circMYBL2'nin hedeflediği spesifik miRNA ve mRNA'ların belirlenmesi, hastalığın moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Çalışmanın sonuçları, MAS/İS'de circPTPN22 ve circMYBL2'nin potansiyel biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini ve hastalığın patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ancak, daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için ileri çalışmalar gerekmektedir. İstatistiksel güvenilirliği artırmak amacıyla, büyük ölçekli hasta ve kontrol gruplarıyla doğrulama çalışmaları yapılmalıdır. CircRNA'ların hedef miRNA ve mRNA'lar ile etkileşimleri detaylı olarak incelenmelidir. Bioinformatik analizler ve hücresel deneyler ile bu moleküler ağların nasıl çalıştığı ortaya konulmalıdır. *In vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak fonksiyonel analizler yapılmalıdır. Hücre kültürü deneyleri ve hayvan modelleri, bu moleküllerin MAS/İS gelişimindeki rolünü daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir. Biyobelirteç olarak klinik uygulanabilirlikleri değerlendirilmeli ve tanısal testlerin geliştirilmesi üzerine çalışılmalıdır. Kan ve idrar gibi vücut sıvılarında bu moleküllerin kolayca tespit edilebilmesi, MAS/İS teşhisinde yenilikçi yaklaşımlar sunabilir.

Bu çalışma, MAS/İS hastalarında circPTPN22 ve circMYBL2'nin ifade düzeylerinde anlamlı artışlar olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, MAS/İS'in patogenezinde otoimmünite ve enflamasyonun önemli rol oynadığını ve belirli circRNA'ların hastalık mekanizmasında yer alabileceğini desteklemektedir. Ancak, MAS/İS gibi kompleks hastalıklarda tek bir biyobelirteç ile doğru teşhis koymak zor olabilir. Bu nedenle, çoklu circRNA'lardan oluşan bir panel geliştirilmesi, hastalığın daha güvenilir ve etkili bir şekilde tanınmasına katkı sağlayabilir. CircRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımı, MAS/İS teşhisi ve prognozu açısından umut vadeden bir alan olmakla birlikte, daha

kapsamlı ve fonksiyonel çalışmalar gerekmektedir. Gelecekte yapılacak araştırmalar, bu moleküllerin klinik uygulamalara kazandırılmasına yönelik yeni yaklaşımlar sunabilir.

KAYNAKLAR

Abdelmohsen, K., Panda, A. C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D. B., De, S., … Gorospe, M. (2017). Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by *CircPABPN1*. *RNA Biology*, *14*(3), 361-369. doi:10.1080/15476286.2017.1279788

Akiyama, Y. (2020). Update on the Pathophysiology of Interstitial Cystitis /Bladder Pain Syndrome. *Current Bladder Dysfunction Reports*, *15*(1), 1-8. doi:10.1007/s11884-019-00569-w

Akiyama, Y., Homma, Y. ve Maeda, D. (2019). Pathology and terminology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: A review. *Histology and histopathology*, *34*(1), 25-32. doi:10.14670/HH-18-028

Akiyama, Y., Maeda, D., Katoh, H., Morikawa, T., Niimi, A., Nomiya, A., … Homma, Y. (2019). Molecular Taxonomy of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Based on Whole Transcriptome Profiling by Next-Generation RNA Sequencing of Bladder Mucosal Biopsies. *Journal of Urology*, *202*(2), 290-300. doi:10.1097/JU.0000000000000234

Akiyama, Y., Maeda, D., Morikawa, T., Niimi, A., Nomiya, A., Yamada, Y., … Homma, Y. (2018). Digital quantitative analysis of mast cell infiltration in interstitial cystitis. *Neurourology and Urodynamics*, *37*(2), 650-657. doi:10.1002/nau.23365

Akiyama, Y., Sonehara, K., Maeda, D., Katoh, H., Naito, T., Yamamoto, K., … Okada, Y. (2023). Genome-wide association study identifies risk loci within the major histocompatibility complex region for Hunner-type interstitial cystitis. *Cell Reports Medicine*, *4*(7), 101114. doi:10.1016/j.xcrm.2023.101114

Akiyama, Y., Yao, J.-R., Kreder, K. J., O'Donnell, M. A., Lutgendorf, S. K., Lyu, D., … Luo, Y. (2021). Autoimmunity to urothelial antigen causes bladder inflammation, pelvic pain, and voiding dysfunction: a novel animal model for Hunner-type interstitial cystitis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *320*(2), F174-F182. doi:10.1152/ajprenal.00290.2020

Anand, P., Singh, B., Jaggi, A. S. ve Singh, N. (2012). Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *385*(7), 657-670. doi:10.1007/s00210-012-0757-8

Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., … Kadener, S. (2014). circRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *56*(1), 55-66. doi:10.1016/j.molcel.2014.08.019

Bae, S.-H., Hwang, T. ve Han, M.-R. (2023). Unraveling the hypoxia modulating potential of VEGF family genes in pan-cancer. *Genomics & Informatics*, *21*(4), e44. doi:10.5808/gi.23061

Bao, Y., Deng, L., Su, D., Xiao, J., Ge, D., Geng, Y. ve Jing, H. (2016). Identification of crucial microRNAs and genes in hypoxia-induced human lung adenocarcinoma cells. *OncoTargets and Therapy*, *Volume 9*, 4605-4616. doi:10.2147/OTT.S103430

Bartolomei, M. S., Zemel, S. ve Tilghman, S. M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*, *351*(6322), 153-155. doi:10.1038/351153a0

Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, *15*(3), 163-175. doi:10.1038/nrg3662

Berry, S. H., Bogart, L. M., Pham, C., Liu, K., Nyberg, L., Stoto, M., … Clemens, J. Q. (2010). Development, Validation and Testing of an Epidemiological Case Definition

of Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Journal of Urology*, *183*(5), 1848-1852. doi:10.1016/j.juro.2009.12.103

Berry, S. H., Elliott, M. N., Suttorp, M., Bogart, L. M., Stoto, M. A., Eggers, P., … Clemens, J. Q. (2011). Prevalence of Symptoms of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis Among Adult Females in the United States. *Journal of Urology*, *186*(2), 540-544. doi:10.1016/j.juro.2011.03.132

Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., … De Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature 2007 447:7146*, *447*(7146), 799-816. doi:10.1038/nature05874

Brown, C. J., Hendrich, B. D., Rupert, J. L., Lafrenière, R. G., Xing, Y., Lawrence, J. ve Willard, H. F. (1992). The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, *71*(3), 527-542. doi:10.1016/0092-8674(92)90520-M

Buffington, C. A. (2004). Comorbidity of Interstitial Cystitis With Other Unexplained Clinical Conditions. *Journal of Urology*, *172*(4 Part 1), 1242-1248. doi:10.1097/01.ju.0000137953.49304.6c

Cape, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman,', P., … Lovell-Badge', R. (1993). *Circular Transcripts of the Testis-Determining Gene Sry in Adult Mouse Testis*. *Cell* (C. 73).

Chen, C. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *33*(20), e179-e179. doi:10.1093/nar/gni178

Chen, X., Chen, R.-X., Wei, W.-S., Li, Y.-H., Feng, Z.-H., Tan, L., … Xie, D. (2018). PRMT5 Circular RNA Promotes Metastasis of Urothelial Carcinoma of the Bladder through Sponging miR-30c to Induce Epithelial–Mesenchymal Transition. *Clinical Cancer Research*, *24*(24), 6319-6330. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1270

Chen, Y. ve Wang, X. (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D127-D131. doi:10.1093/nar/gkz757

Clemens, J. Q., Erickson, D. R., Varela, N. P. ve Lai, H. H. (2022). Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Journal of Urology*, *208*(1), 34-42. doi:10.1097/JU.0000000000002756

Clemens, J. Q., Link, C. L., Eggers, P. W., Kusek, J. W., Nyberg, L. M. ve McKinlay, J. B. (2007). Prevalence of Painful Bladder Symptoms and Effect on Quality of Life in Black, Hispanic and White Men and Women. *Journal of Urology*, *177*(4), 1390-1394. doi:10.1016/j.juro.2006.11.084

Clemens, J. Q., Meenan, R. T., Rosetti, M. C. O., Gao, S. Y. ve Calhoun, E. A. (2005). Prevalence and incidence of interstitial cystitis in a managed care population. *Journal of Urology*, *173*(1), 98-102. doi:10.1097/01.ju.0000146114.53828.82

Cocquerelle, C., Daubersies, P., Majérus, M. A., Kerckaert, J. P. ve Bailleul, B. (1992). Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. *The EMBO Journal*, *11*(3), 1095-1098. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05148.x

Cocquerelle, C., Mascrez, B., Hétuin, D. ve Bailleul, B. (1993). Mis-splicing yields circular RNA molecules. *The FASEB Journal*, *7*(1), 155-160. doi:10.1096/fasebj.7.1.7678559

Conn, S. J., Pillman, K. A., Toubia, J., Conn, V. M., Salmanidis, M., Phillips, C. A., … Goodall, G. J. (2015). The RNA Binding Protein Quaking Regulates Formation of circRNAs. *Cell*, *160*(6), 1125-1134. doi:10.1016/j.cell.2015.02.014

Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *12*, 138-63.

Cui, Y., Chen, W., Chi, J. ve Wang, L. (2016). Comparison of Transcriptome Between Type 2 Diabetes Mellitus and Impaired Fasting Glucose. *Medical Science Monitor*, *22*, 4699-4706. doi:10.12659/MSM.896772

Curhan, C. G., Speizer, F. E., Hunter, D. J., Curhan, S. G. ve Stampfer, M. J. (1999). Epidemiology of interstitial cystitis: a population based study. *The journal of urology*, *161*(2), 549-552.

Dixon, J. S. ve Gosling, J. A. (1983). Histology and fine structure of the muscularis mucosae of the human urinary bladder. *Journal of anatomy*, *136*(Pt 2), 265-71.

Drake, R. L., Vogl, A. W. ve Mitchell, A. W. M. (2023). *Gray's basic anatomy* (3. bs.). Elsevier.

Driscoll, A. ve Teichman, J. M. (2001). How do patients with interstitial cystitis present? *The Journal of urology*, *166*(6), 2118-20.

Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K. ve Gorospe, M. (2016). CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biology*, *13*(1), 34-42. doi:10.1080/15476286.2015.1128065

Duraikkannu, D., Akbar, A. B., Sudharshan, S., Poongulali, S., Kumarasamy, N., Jayavelu, T. ve Chatterjee, N. (2023). Differential Expression of miRNA-192 is a Potential Biomarker for HIV Associated Immune Recovery Uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*, *31*(3), 566-575. doi:10.1080/09273948.2022.2106247

Fan, X., Yang, Y., Chen, C. ve Wang, Z. (2022). Pervasive translation of circular RNAs driven by short IRES-like elements. *Nature Communications*, *13*(1), 3751. doi:10.1038/s41467-022-31327-y

Ferreira, H. J. ve Esteller, M. (2018). Non-coding RNAs, epigenetics, and cancer: tying it all together. *Cancer and Metastasis Reviews*, *37*(1), 55-73. doi:10.1007/s10555-017-9715-8

Furuta, A., Yamamoto, T., Suzuki, Y., Gotoh, M., Egawa, S. ve Yoshimura, N. (2018). Comparison of inflammatory urine markers in patients with interstitial cystitis and overactive bladder. *International Urogynecology Journal*, *29*(7), 961-966. doi:10.1007/s00192-017-3547-5

Gao, Y., Wang, J. ve Zhao, F. (2015). CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome Biology*, *16*(1), 4. doi:10.1186/s13059-014-0571-3

Gheinani, A. H., Akshay, A., Besic, M., Kuhn, A., Keller, I., Bruggmann, R., … Monastyrskaya, K. (2021). Integrated mRNA-miRNA transcriptome analysis of bladder biopsies from patients with bladder pain syndrome identifies signaling alterations contributing to the disease pathogenesis. *BMC Urology*, *21*(1), 172. doi:10.1186/s12894-021-00934-0

Gillenwater, J. Y. ve Wein, A. J. (1988). Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases Workshop on Interstitial Cystitis, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28-29, 1987. *Journal of Urology*, *140*(1), 203-206. doi:10.1016/S0022-5347(17)41529-1

Gross, S. D. (1876). *A Practical Treatise on the Diseases, Injuries, and Malformations of the Urinary Bladder, the Prostate Gland, and the Urethra.* . (S. W. Gross, Ed.) (3. bs.). Henry C. Lea.

Guo, Z., Wu, R., Gong, J., Zhu, W., Li, Y., Wang, Z., … Li, J. (2015). Altered micro <scp>RNA</scp> expression in inflamed and non-inflamed terminal ileal mucosa of adult patients with active <scp>C</scp> rohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *30*(1), 109-116. doi:10.1111/jgh.12644

Hall, J. E. ve Hall, M. E. (2021). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14. bs.). Elsevier.

Han, B., Chao, J. ve Yao, H. (2018). Circular RNA and its mechanisms in disease: From the bench to the clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, *187*, 31-44. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.01.010

Hanno, P. ve Dmochowski, R. (2009). Status of international consensus on interstitial cystitis/bladder pain syndrome/painful bladder syndrome: 2008 snapshot. *Neurourology and Urodynamics*, *28*(4), 274-286. doi:10.1002/nau.20687

Hanno, P. M., Burks, D. A., Clemens, J. Q., Dmochowski, R. R., Erickson, D., FitzGerald, M. P., … Faraday, M. M. (2011). AUA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Journal of Urology*, *185*(6), 2162-2170. doi:10.1016/j.juro.2011.03.064

Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K. ve Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, *495*(7441), 384-388. doi:10.1038/nature11993

Hansen, T. B., Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Villadsen, S. B., Statham, A. L., Clark, S. J. ve Kjems, J. (2011). miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *The EMBO Journal*, *30*(21), 4414-4422. doi:10.1038/emboj.2011.359

Hentze, M. W. ve Preiss, T. (2013). Circular RNAs: splicing's enigma variations. *The EMBO Journal*, *32*(7), 923-925. doi:10.1038/emboj.2013.53

Homma, Y. (2019). Interstitial cystitis, bladder pain syndrome, hypersensitive bladder, and interstitial cystitis/bladder pain syndrome – clarification of definitions and relationships. *International Journal of Urology*, *26*(S1), 20-24. doi:10.1111/iju.13970

Homma, Y., Akiyama, Y., Kim, J. H., Chuang, Y., Jeong, S. J., Meng, E., … Maeda, D. (2024). Definition Change and Update of Clinical Guidelines for Interstitial Cystitis and Bladder Pain Syndrome. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms*, *16*(5). doi:10.1111/luts.12532

Homma, Y., Akiyama, Y., Tomoe, H., Furuta, A., Ueda, T., Maeda, D., … Lee, K. (2020). Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *International Journal of Urology*, *27*(7), 578-589. doi:10.1111/iju.14234

Houseley, J. M., Garcia-Casado, Z., Pascual, M., Paricio, N., O'Dell, K. M. C., Monckton, D. G. ve Artero, R. D. (2006). Noncanonical RNAs From Transcripts of the Drosophila muscleblind Gene. *Journal of Heredity*, *97*(3), 253-260. doi:10.1093/jhered/esj037

Hsu, M. T. ve Coca-Prados, M. (1979). Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature*, *280*(5720), 339-340. doi:10.1038/280339a0

Hunner, G. L. (1915). A Rare Type of Bladder Ulcer in Women; Report of Cases. *The Boston Medical and Surgical Journal*, *172*(18), 660-664. doi:10.1056/NEJM191505061721802

Hunner, G. L. (1918). A Rare Type of Bladder Ulcer. *Journal of the American Medical Association*, *70*(4), 203. doi:10.1001/jama.1918.02600040001001

Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., … Sharpless, N. E. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*, *19*(2), 141-157. doi:10.1261/rna.035667.112

Jiang, C., Xu, M., Zhu, J., Yang, D. ve Xue, B. (2022). CircTHBS1 facilitates the progression of interstitial cystitis depending on the regulation of miR-139-5p/MFN2 axis. *Drug Development Research*, *83*(2), 351-361. doi:10.1002/ddr.21864

Jiang, Y.-H., Liu, H.-T. ve Kuo, H.-C. (2014). Decrease of Urinary Nerve Growth Factor but Not Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Treated with Hyaluronic Acid. *PLoS ONE*, *9*(3), e91609. doi:10.1371/journal.pone.0091609

Jiang, Z., Li, S., Jia, Y., Wu, Q., Chen, X., Zhang, M., … Tang, J. (2023). CircPTPN22 modulates T-cell activation by sponging miR-4689 to regulate S1PR1 expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, *25*(1), 206. doi:10.1186/s13075-023-03150-3

Jost, S. P., Gosling, J. A. ve Dixon, J. S. (1989). The morphology of normal human bladder urothelium. *Journal of anatomy*, *167*, 103-15.

Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., … Gingeras, T. R. (2007). RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science*, *316*(5830), 1484-1488. doi:10.1126/science.1138341

Keay, S., Zhang, C.-O., Trifillis, A. L., Hebel, J. R., Jacobs, S. C. ve Warren, J. W. (1997). Urine Autoantibodies in Interstitial Cystitis. *Journal of Urology*, *157*(3), 1083-1087. doi:10.1016/S0022-5347(01)65146-2

Kim, A., Han, J., Ryu, C., Yu, H. Y., Lee, S., Kim, Y., … Choo, M. (2017). Histopathological characteristics of interstitial cystitis/bladder pain syndrome without Hunner lesion. *Histopathology*, *71*(3), 415-424. doi:10.1111/his.13235

Kim, S. W., Im, Y. J., Choi, H. C., Kang, H. J., Kim, J. Y. ve Kim, J. H. (2014). Urinary nerve growth factor correlates with the severity of urgency and pain. *International Urogynecology Journal*, *25*(11), 1561-1567. doi:10.1007/s00192-014-2424-8

Klingler, C. H. (2016). Glycosaminoglycans: How Much do We Know about their Role in the Bladder? *Urologia Journal*, *83*(1_suppl), 11-14. doi:10.5301/uro.5000184

Koiakofsky, D. (1976). *Isolation and Characterization of Sendai Virus DI-RNAs*. *Cell* (C. 6).

Kos, A., Dijkema, R., Arnberg, A. C., van der Meide, P. H. ve Schellekens, H. (1986). The hepatitis delta (δ) virus possesses a circular RNA. *Nature*, *323*(6088), 558-560. doi:10.1038/323558a0

Kozomara, A., Birgaoanu, M. ve Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141

Krieger, J. N., Stephens, A. J., Landis, J. R., Clemens, J. Q., Kreder, K., Lai, H. H., … Williams, D. A. (2015). Relationship between Chronic Nonurological Associated Somatic Syndromes and Symptom Severity in Urological Chronic Pelvic Pain Syndromes: Baseline Evaluation of the MAPP Study. *Journal of Urology*, *193*(4), 1254-1262. doi:10.1016/j.juro.2014.10.086

Lai, H. H., North, C. S., Andriole, G. L., Sayuk, G. S. ve Hong, B. A. (2012). Polysymptomatic, Polysyndromic Presentation of Patients With Urological Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Journal of Urology*, *187*(6), 2106-2112. doi:10.1016/j.juro.2012.01.081

Lee, R. C., Feinbaum, R. L. ve Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, *75*(5), 843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y

Li, B., Li, Y., Li, L., Yu, Y., Gu, X., Liu, C., … Zuo, X. (2021). Hsa_circ_0001021 Regulates Intestinal Epithelial Barrier Function Via Sponging miR-224-5p in Ulcerative Colitis. *Epigenomics*, *13*(17), 1385-1401. doi:10.2217/epi-2021-0230

Li, J.-H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.-H. ve Yang, J.-H. (2014). starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D92-D97. doi:10.1093/nar/gkt1248

Li, T., Yu, X., Zhu, X., Wen, Y., Zhu, M., Cai, W., … Qiu, L. (2022). Vaccarin alleviates endothelial inflammatory injury in diabetes by mediating miR-570-3p/HDAC1 pathway. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. doi:10.3389/fphar.2022.956247

Li, X.-F. ve Lytton, J. (1999). A Circularized Sodium-Calcium Exchanger Exon 2 Transcript. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(12), 8153-8160. doi:10.1074/jbc.274.12.8153

Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., … Shan, G. (2015). Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(3), 256-264. doi:10.1038/nsmb.2959

Liang, D. ve Wilusz, J. E. (2014). Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes & Development*, *28*(20), 2233-2247. doi:10.1101/gad.251926.114

Liu, H.-T., Shie, J.-H., Chen, S.-H., Wang, Y.-S. ve Kuo, H.-C. (2012). Differences in Mast Cell Infiltration, E-cadherin, and Zonula Occludens-1 Expression Between Patients With Overactive Bladder and Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome. *Urology*, *80*(1), 225.e13-225.e18. doi:10.1016/j.urology.2012.01.047

Liu, J., Wang, J., Fu, W., Wang, X., Chen, H., Wu, X., … Ren, M. (2021). MiR-195-5p and miR-205-5p in extracellular vesicles isolated from diabetic foot ulcer wound fluid decrease angiogenesis by inhibiting VEGFA expression. *Aging*, *13*(15), 19805-19821. doi:10.18632/aging.203393

Liu, M., Wang, Q., Shen, J., Yang, B. B. ve Ding, X. (2019). Circbank: a comprehensive database for circRNA with standard nomenclature. *RNA Biology*, *16*(7), 899-905. doi:10.1080/15476286.2019.1600395

Lu, Y., Li, Y., Li, G. ve Lu, H. (2020). Identification of potential markers for type 2 diabetes mellitus via bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports*, *22*(3), 1868-1882. doi:10.3892/mmr.2020.11281

Maeda, D., Akiyama, Y., Morikawa, T., Kunita, A., Ota, Y., Katoh, H., … Homma, Y. (2015). Hunner-Type (Classic) Interstitial Cystitis: A Distinct Inflammatory Disorder Characterized by Pancystitis, with Frequent Expansion of Clonal B-Cells and Epithelial Denudation. *PLOS ONE*, *10*(11), e0143316. doi:10.1371/journal.pone.0143316

Magalhaes, T. F., Baracat, E. C., Doumouchtsis, S. K. ve Haddad, J. M. (2019). Biomarkers in the diagnosis and symptom assessment of patients with bladder pain syndrome: a systematic review. *International Urogynecology Journal*, *30*(11), 1785-1794. doi:10.1007/s00192-019-04075-9

Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., … Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and

recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *24*(6), 430-447. doi:10.1038/s41580-022-00566-8

Mattick, J. S. ve Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. doi:10.1093/hmg/ddl046

McLennan, M. T. (2014). Interstitial Cystitis: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Presentation. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, *41*(3), 385-395. doi:10.1016/j.ogc.2014.05.004

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., … Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, *495*(7441), 333-338. doi:10.1038/nature11928

Musa, J., Aynaud, M.-M., Mirabeau, O., Delattre, O. ve Grünewald, T. G. (2017). MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death & Disease*, *8*(6), e2895-e2895. doi:10.1038/cddis.2017.244

Naliboff, B. D., Stephens, A. J., Afari, N., Lai, H., Krieger, J. N., Hong, B., … Williams, D. (2015). Widespread Psychosocial Difficulties in Men and Women With Urologic Chronic Pelvic Pain Syndromes: Case-control Findings From the Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain Research Network. *Urology*, *85*(6), 1319-1327. doi:10.1016/j.urology.2015.02.047

National Cancer Institute (NCI). (2024). Bladder cancer. *https://www.cancer.gov/types/bladder*.

National Library of Medicine. (2024). Bladder Diseases. *https://medlineplus.gov/bladderdiseases.html*.

Nemeth, K., Bayraktar, R., Ferracin, M. ve Calin, G. A. (2024). Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, *25*(3), 211-232. doi:10.1038/s41576-023-00662-1

Nigro, J. M., Cho, K. R., Fearon, E. R., Kern, S. E., Ruppert, J. M., Oliner, J. D., … Vogelstein, B. (1991). *Scrambled Exons*. *Cell* (C. 64).

Niimi, A., Igawa, Y., Aizawa, N., Honma, T., Nomiya, A., Akiyama, Y., … Homma, Y. (2018). Diagnostic value of urinary CXCL10 as a biomarker for predicting Hunner type interstitial cystitis. *Neurourology and Urodynamics*, *37*(3), 1113-1119. doi:10.1002/nau.23431

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. ve Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. doi:10.3389/fendo.2018.00402

Ochs, R. L., Stein, T. W., Peebles, C. L., Gittes, R. F. ve Tan, E. M. (1994). Autoantibodies in Interstitial Cystitis. *Journal of Urology*, *151*(3), 587-592. doi:10.1016/S0022-5347(17)35023-1

Pan, Z., Zhu, T., Liu, Y. ve Zhang, N. (2022). Role of the CXCL13/CXCR5 Axis in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *13*. doi:10.3389/fimmu.2022.850998

Pandey, P. R., Munk, R., Kundu, G., De, S., Abdelmohsen, K. ve Gorospe, M. (2020). Methods for analysis of circular RNAs. *WIREs RNA*, *11*(1). doi:10.1002/wrna.1566

Pandey, P. R., Rout, P. K., Das, A., Gorospe, M. ve Panda, A. C. (2019). RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)+ RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA. *Methods*, *155*, 41-48. doi:10.1016/j.ymeth.2018.10.022

Parker, K. S., Crowley, J. R., Stephens-Shields, A. J., van Bokhoven, A., Lucia, M. S., Lai, H. H., … Henderson, J. P. (2016). Urinary Metabolomics Identifies a Molecular

Correlate of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome in a Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain (MAPP) Research Network Cohort. *EBioMedicine*, *7*, 167-174. doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.040

Parsons, J. K. ve Parsons, C. L. (2004). The Historical Origins of Interstitial Cystitis. *Journal of Urology*, *171*(1), 20-22. doi:10.1097/01.ju.0000099890.35040.8d

Peeker, R., Atanasiu, L. ve Logadottir, Y. (2003). Intercurrent Autoimmune Conditions in Classic and Non-ulcer Interstitial Cystitis. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, *37*(1), 60-63. doi:10.1080/00365590310008721

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 45e-445. doi:10.1093/nar/29.9.e45

Pisignano, G., Michael, D. C., Visal, T. H., Pirlog, R., Ladomery, M. ve Calin, G. A. (2023). Going circular: history, present, and future of circRNAs in cancer. *Oncogene*, *42*(38), 2783-2800. doi:10.1038/s41388-023-02780-w

Qian, L., Vu, M. N., Carter, M. ve Wilkinson, M. F. (1992). A spliced intron accumulates as a lariat in the nucleus of T cells. *Nucleic Acids Research*, *20*(20), 5345-5350. doi:10.1093/nar/20.20.5345

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., … Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature*, *403*(6772), 901-906. doi:10.1038/35002607

Reuter, J. S. ve Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, *11*(1), 129. doi:10.1186/1471-2105-11-129

Ro, J. Y., Ayala, A. G. ve El-Naggar, A. (1987). Muscularis Mucosa of Urinary Bladder Importance for Staging and Treatment. *The American Journal of Surgical Pathology*, *11*(9), 668-669. doi:10.1097/00000478-198709000-00002

Robert L. Sorenson ve T. Clark, B. (t.y.). Histology Guide. *https://histologyguide.com/slidebox/16-urinary-system.html#bladder*. 14 Aralık 2024 tarihinde https://histologyguide.com/slidebox/16-urinary-system.html#bladder adresinden erişildi.

Roberts, R. O., Bergstralh, E. J., Bass, S. E., Lightner, D. J., Lieber, M. M. ve Jacobsen, S. J. (2003). Incidence of physician-diagnosed interstitial cystitis in Olmsted County: a community-based study. *BJU International*, *91*(3), 181-185. doi:10.1046/j.1464-410X.2003.04060.x

Rourke, W., Khan, S. A. A., Ahmed, K., Masood, S., Dasgupta, P. ve Khan, M. S. (2014). Painful bladder syndrome/interstitial cystitis: Aetiology, evaluation and management. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, *86*(2), 126. doi:10.4081/aiua.2014.2.126

Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N. ve Brown, P. O. (2012). Circular RNAs Are the Predominant Transcript Isoform from Hundreds of Human Genes in Diverse Cell Types. *PLoS ONE*, *7*(2), e30733. doi:10.1371/journal.pone.0030733

Sanger, H. L., KLOTZt, G., RIESNERt, D., Gross, H. J., KLEINSCHMIDTt, A. K., Pflanzenvirologie, A., … Riesner, D. (1976). *Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures (electron microscopy/endgroup analysis/ultracentrifugation/thermal denaturation)* (C. 73).

Santer, L., Bär, C. ve Thum, T. (2019). Circular RNAs: A Novel Class of Functional RNA Molecules with a Therapeutic Perspective. *Molecular Therapy*, *27*(8), 1350-1363. doi:10.1016/j.ymthe.2019.07.001

Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T. A., Rehmet, K., de Souza Gomes, M., Fort, A., Kovvuru, P., … Spillane, C. (2012). MicroRNA-9 Inhibition of Cell Proliferation and Identification of Novel miR-9 Targets by Transcriptome Profiling in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(35), 29516-29528. doi:10.1074/jbc.M111.335943

Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G. ve Lai, E. C. (2023). microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nature Reviews Genetics*, *24*(12), 816-833. doi:10.1038/s41576-023-00611-y

Shi, Y., Sun, X. ve He, X. (2017). Overexpression of Aristaless-Like Homeobox-4 Inhibits Proliferation, Invasion, and EMT in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, *25*(1), 11-18. doi:10.3727/096504016X14685034103833

Stanford, S. M. ve Bottini, N. (2014). PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nature Reviews Rheumatology*, *10*(10), 602-611. doi:10.1038/nrrheum.2014.109

Su, Y., Feng, W., Shi, J., Chen, L., Huang, J. ve Lin, T. (2020). circRIP2 accelerates bladder cancer progression via miR-1305/Tgf-β2/smad3 pathway. *Molecular Cancer*, *19*(1), 23. doi:10.1186/s12943-019-1129-5

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. ve Yu, Q. (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, *6*(11), 8474-8490. doi:10.18632/oncotarget.3523

Surono, A. (1999). Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Human Molecular Genetics*, *8*(3), 493-500. doi:10.1093/hmg/8.3.493

Suskind, A. M., Berry, S. H., Ewing, B. A., Elliott, M. N., Suttorp, M. J. ve Clemens, J. Q. (2013). The Prevalence and Overlap of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome and Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in Men: Results of the RAND Interstitial Cystitis Epidemiology Male Study. *Journal of Urology*, *189*(1), 141-145. doi:10.1016/j.juro.2012.08.088

Sutcliffe, S., Bradley, C. S., Clemens, J. Q., James, A. S., Konkle, K. S., Kreder, K. J., … Berry, S. H. (2015). Urological chronic pelvic pain syndrome flares and their impact: qualitative analysis in the MAPP network. *International Urogynecology Journal*, *26*(7), 1047-1060. doi:10.1007/s00192-015-2652-6

Taft, R. J. ve Mattick, J. S. (2003). Increasing biological complexity is positively correlated with the relative genome-wide expansion of non-protein-coding DNA sequences. *Genome Biology*, *5*(1), P1. doi:10.1186/gb-2003-5-1-p1

Taft, R. J., Pheasant, M. ve Mattick, J. S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*, *29*(3), 288-299. doi:10.1002/bies.20544

Talati, A., Ponniah, K., Strug, L. J., Hodge, S. E., Fyer, A. J. ve Weissman, M. M. (2008). Panic Disorder, Social Anxiety Disorder, and a Possible Medical Syndrome Previously Linked to Chromosome 13. *Biological Psychiatry*, *63*(6), 594-601. doi:10.1016/j.biopsych.2007.07.021

ten Berge, D., Brouwer, A., El Bahi, S., Guénet, J.-L., Robert, B. ve Meijlink, F. (1998). MouseAlx3:Anaristaless-like Homeobox Gene Expressed during Embryogenesis in

Ectomesenchyme and Lateral Plate Mesoderm. *Developmental Biology*, *199*(1), 11-25. doi:10.1006/dbio.1998.8921

Tsitsipatis, D. ve Gorospe, M. (2021). Practical guide for <scp>circular RNA</scp> analysis: Steps, tips, and resources. *WIREs RNA*, *12*(1). doi:10.1002/wrna.1633

Ueda, T., Yoshida, T., Tanoue, H., Ito, M., Tamaki, M., Ito, Y. ve Yoshimura, N. (2014). Urine alkalization improves the problems of pain and sleep in hypersensitive bladder syndrome. *International Journal of Urology*, *21*(5), 512-517. doi:10.1111/iju.12324

van de Merwe, J. P., Nordling, J., Bouchelouche, P., Bouchelouche, K., Cervigni, M., Daha, L. K., … Wyndaele, J.-J. (2008). Diagnostic Criteria, Classification, and Nomenclature for Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis: An ESSIC Proposal. *European Urology*, *53*(1), 60-67. doi:10.1016/j.eururo.2007.09.019

Verduci, L., Tarcitano, E., Strano, S., Yarden, Y. ve Blandino, G. (2021). CircRNAs: role in human diseases and potential use as biomarkers. *Cell Death & Disease*, *12*(5), 468. doi:10.1038/s41419-021-03743-3

Vettori, S. (2012). Role of MicroRNAs in Fibrosis. *The Open Rheumatology Journal*, *6*(1), 130-139. doi:10.2174/1874312901206010130

Vromman, M., Anckaert, J., Vandesompele, J. ve Volders, P.-J. (2022). CIRCprimerXL: Convenient and High-Throughput PCR Primer Design for Circular RNA Quantification. *Frontiers in Bioinformatics*, *2*. doi:10.3389/fbinf.2022.834655

Wang, B., Wang, M., Ao, D. ve Wei, X. (2022). CXCL13-CXCR5 axis: Regulation in inflammatory diseases and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1877*(5), 188799. doi:10.1016/j.bbcan.2022.188799

Warren, J. W., Howard, F. M., Cross, R. K., Good, J. L., Weissman, M. M., Wesselmann, U., … Clauw, D. J. (2009). Antecedent Nonbladder Syndromes in Case-Control Study of Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Urology*, *73*(1), 52-57. doi:10.1016/j.urology.2008.06.031

Weissman, M. M., Gross, R., Fyer, A., Heiman, G. A., Gameroff, M. J., Hodge, S. E., … Wickramaratne, P. J. (2004). Interstitial Cystitis and Panic Disorder. *Archives of General Psychiatry*, *61*(3), 273. doi:10.1001/archpsyc.61.3.273

Wen, J., Lo, T., Chuang, Y., Ho, C., Long, C., Law, K., … Wu, M. (2019). Risks of interstitial cystitis among patients with systemic lupus erythematosus: A population-based cohort study. *International Journal of Urology*, *26*(9), 897-902. doi:10.1111/iju.14065

Westholm, J. O., Miura, P., Olson, S., Shenker, S., Joseph, B., Sanfilippo, P., … Lai, E. C. (2014). Genome-wide Analysis of Drosophila Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural Accumulation. *Cell Reports*, *9*(5), 1966-1980. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.062

Wu, W., Ji, P. ve Zhao, F. (2020). CircAtlas: an integrated resource of one million highly accurate circular RNAs from 1070 vertebrate transcriptomes. *Genome Biology*, *21*(1), 101. doi:10.1186/s13059-020-02018-y

Xia, T., Pan, Z. ve Zhang, J. (2020). CircSMC3 regulates gastric cancer tumorigenesis by targeting miR-4720-3p/TJP1 axis. *Cancer Medicine*, *9*(12), 4299-4309. doi:10.1002/cam4.3057

Xu, J., Wang, Y., Tan, X. ve Jing, H. (2012). MicroRNAs in autophagy and their emerging roles in crosstalk with apoptosis. *Autophagy*, *8*(6), 873-882. doi:10.4161/auto.19629

Xu, X., Zhang, J., Tian, Y., Gao, Y., Dong, X., Chen, W., … Wei, L. (2020). CircRNA inhibits DNA damage repair by interacting with host gene. *Molecular Cancer*, *19*(1), 128. doi:10.1186/s12943-020-01246-x

Yang, L., Han, X., Zhang, C., Sun, C., Huang, S., Xiao, W., … Zhou, Y. (2020). Hsa_circ_0060450 Negatively Regulates Type I Interferon-Induced Inflammation by Serving as miR-199a-5p Sponge in Type 1 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Immunology*, *11*. doi:10.3389/fimmu.2020.576903

Yang, S.-Q., Peng, L., Lin, L.-D., Chen, Y.-Z., Liu, M.-Z., Zhang, C., … Luo, D.-Y. (2023). Identification of circRNA-miRNA-mRNA network as biomarkers for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Aging*, *15*(21), 12155-12170. doi:10.18632/aging.205170

Yu, L., Wang, L. ve Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(11), 2592-2603. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x

Yueh, H.-Z., Yang, M.-H., Huang, J.-Y. ve Wei, J. C.-C. (2021). Risk of Autoimmune Diseases in Patients With Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: A Nationwide Population-Based Study in Taiwan. *Frontiers in Medicine*, *8*. doi:10.3389/fmed.2021.747098

Zaphiropoulos, P. G. (1996). Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(13), 6536-6541. doi:10.1073/pnas.93.13.6536

Zaphiropoulos, P. G. (1997). Exon Skipping and Circular RNA Formation in Transcripts of the Human Cytochrome P-450 2C18 Gene in Epidermis and of the Rat Androgen Binding Protein Gene in Testis. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(6), 2985-2993. doi:10.1128/MCB.17.6.2985

Zhang, X.-O., Dong, R., Zhang, Y., Zhang, J.-L., Luo, Z., Zhang, J., … Yang, L. (2016). Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Research*, *26*(9), 1277-1287. doi:10.1101/gr.202895.115

Zhang, X.-O., Wang, H.-B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L.-L. ve Yang, L. (2014). Complementary Sequence-Mediated Exon Circularization. *Cell*, *159*(1), 134-147. doi:10.1016/j.cell.2014.09.001

Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H., … Chen, L.-L. (2013). Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell*, *51*(6), 792-806. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.017

Zhang, Z., Yang, T. ve Xiao, J. (2018). Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases. *EBioMedicine*, *34*, 267-274. doi:10.1016/j.ebiom.2018.07.036

Zhong, S. ve Feng, J. (2022). CircPrimer 2.0: a software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. *BMC Bioinformatics*, *23*(1), 215. doi:10.1186/s12859-022-04705-y

Zhong, S., Zhou, S., Yang, S., Yu, X., Xu, H., Wang, J., … Feng, J. (2019). Identification of internal control genes for circular RNAs. *Biotechnology Letters*, *41*(10), 1111-1119. doi:10.1007/s10529-019-02723-0

Zhou, H., Guo, C. C. ve Ro, J. Y. (2021). *Urinary Bladder Pathology*. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-030-71509-0

Zhou, L., Wang, B., Zhang, Y., Yao, K. ve Liu, B. (2021). Silencing circ-BIRC6 inhibits the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells by targeting the miR-495-3p/XBP1 signaling axis. *Molecular Medicine Reports*, *24*(5), 811. doi:10.3892/mmr.2021.12451

Zhou, M., Li, L., Chen, B., Pan, S., Tu, W., Hou, Y., … Zhou, X. (2021). Circ-SHPRH suppresses cadmium-induced transformation of human bronchial epithelial cells by regulating QKI expression via miR-224–5p. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *220*, 112378. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112378