İNTERSTİSYEL SİSTİT HASTALIĞINDA X-KROMOZOMU İNAKTİVASYONUNUN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Sımpel PANTIR RETZEP

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERSTİSYEL SİSTİT HASTALIĞINDA X-KROMOZOMU İNAKTİVASYONUNUN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Sımpel PANTIR RETZEP
0009-0008-5968-9881

Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNTERSTİSYEL SİSTİT HASTALIĞINDA X-KROMOZOMU İNAKTİVASYONUNUN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Sımpel PANTIR RETZEP

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM

İnterstisyel Sistit (Ağrılı Mesane Sendromu), tanımlandığı andan itibaren günümüze kadar henüz patofizyolojisi ve etiyolojisi tam olarak belirlenememiştir. Mesane ürotelyumunu kaplayan glikozaminoglikan (GAG) tabakasının deformasyonuyla beraber idrarın dolum aşamasında sinir uçlarını uyarmasıyla karakterize ağrılı bir hastalıktır. Sistoskopik incelemeler sonucunda hekimler tarafından Hunner lezyonlu ve lezyonsuz olarak sınıflandırılmaktadır. Hunner lezyonları ürotelyum yüzeyinde kılcal damar yoğunluğu ve kızarıklıklarla saptanır. Ancak hastalığın bu belirleyici özelliği vakaların yalnızca %20'sinde gözlemlendiğinden tanıyı da zorlaştırmaktadır. Genel olarak erkeklere oranla kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır. Hastalığın moleküler mekanizması bilinmediği gibi kadınlarda bu oranın neden yüksek olduğu da bilinmemektedir. Bunun nedeni olarak hormon farkı, gebelik ve otoimmünite gibi hipotezler ortaya atılmıştır. Değerlendirilmesi gereken bir başka hipotez de X-inaktivasyon mekanizmasıdır. Dişilerde cinsiyeti belirleyen XX kromozom yapısı iken erkekler XY kromozom çiftine sahiptir. X kromozomu bulundurduğu 2000 gen bakımından Y kromozomundan daha büyüktür ve bu dozaj farkının ayarlanması için X kromozlarından biri inaktive olur. Doku bazında anneden ve babadan gelen X kromozomları rastgele bir mekanizmayla %50-%50 oranında inaktivasyona uğrar. Bu oranın saptığı durumlarda çeşitli hastalıkların ortaya çıktığı yapılan araştırmalarda rapor edilmiştir. Bu çalışma için klinik tanı ve tetkiklerinin yapılmasının ardından 70 hasta ve 86 sağlıklı gönüllüden alınan kan örneklerinden HUMARA testi yöntemiyle X kromozomu inaktivasyon paternleri araştırılmıştır. Hem sağlıklı hem de hasta bireylerde inaktivasyondan sapma yalnızca 4 örnekte gözlemlenmiştir. Hastalar için diğer 49 örnekte, kontroller içinse 48 örnekte herhangi anlamlı bir sapma gözlemlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: İnterstisyel sistit, X kromozomu, inaktivasyon, HUMARA testi, otoimmünite.
2024, vii + 56 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ROLE OF X-CHROMOSOME INACTIVATION IN INTERSTITIAL CYSTITIS

Sımpel PANTIR RETZEP

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Elif UZ YILDIRIM

Since its identification, the pathophysiology and etiology of Interstitial Cystitis (Painful Bladder Syndrome) have not been fully determined. It is a painful disease characterized by the stimulation of nerve endings during the filling phase of the bladder due to the deformation of the glycosaminoglycan (GAG) layer covering the bladder urothelium. Through cystoscopic examinations, physicians classify the condition into Hunner lesion-positive and lesion-negative types. Hunner lesions are identified on the urothelium surface by capillary density and redness. However, since this defining feature is observed in only 20% of cases, diagnosis is challenging. Generally, the incidence of the disease is higher in women compared to men. The molecular mechanism of the disease is unknown, as is the reason for the higher prevalence in women. Hypotheses such as hormonal differences, pregnancy, and autoimmunity have been proposed as possible explanations. Another hypothesis to consider is the mechanism of X-inactivation. In females, sex is determined by the XX chromosome structure, while males have XY chromosome pairs. The X chromosome is larger than the Y chromosome in terms of the 2000 genes it contains, and one of the X chromosomes is inactivated to adjust for this dosage difference. In tissues, X chromosomes inherited from the mother and father undergo random inactivation at a 50-50 ratio. Research has reported that deviations from this ratio result in various diseases. For this study, after clinical diagnosis and examinations, blood samples were collected from 70 patients and 86 healthy volunteers. X chromosome inactivation patterns were investigated using the HUMARA test. Deviation from X-inactivation was observed in only 4 samples, both in healthy and patient individuals. No significant deviation was observed in the remaining 49 patient samples and 48 control samples.

Key words: Interstitial cystitis, X chromosome, inactivation, HUMARA assay, autoimmunity.
2024, vii + 56 pages.

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecindeki rehberliği ve destekleri için saygıdeğer Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a içtenlikle teşekkürlerimi sunarım. Değerli katkılarıyla bu tez, benim için sadece bir akademik çalışma olmanın ötesine geçti. Her daim pozitif enerjisi ve yönlendirmeleri olmadan bu başarıya ulaşamazdım.

Bu çalışmaya özveriyle katkı sağlayan değerli hekimlerimiz Sayın Prof. Dr. Burhan COŞKUN, Doç. Dr. Yavuz Onur DANACIOĞLU, Doç. Dr. Tuncay TOPRAK, Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇULHA, Doç. Dr. Muhammet Murat DİNÇER, Doç. Dr. Ahmet KARAKEÇİ ve Op. Dr. Yunus ÇOLAKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim boyunca laboratuvarının imkânlarını sonuna kadar sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Figen ERSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımı yaparken her zaman fikirleriyle çözüme ulaşmamı sağlayan Arş. Gör. Dr. Mehmet KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu proje FYL-2023-1417 koduyla Bursa Uludağ Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. BAP birimine destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Lisanstan bu yana eğitimim için maddi manevi tüm destekleri sağlayan, Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı (YTB)'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca iyi ki tanıdım diyebileceğim nadir dostlardan biri olan, her anımda tüm desteğiyle yanımda olacağından emin olduğum Merve DEMİRBAĞ KARAALİ'ye minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Ayrıca tüm Elif Uz Lab Team grubuna destekleri için teşekkür etmek isterim.

Son olarak beni her zaman destekleyen, elimden tutan sevgili babam Memet PANTIR RETZEP ile annem Nedime KARA ALİ başta olmak üzere kardeşlerim Ayhan, Ömer ve Erhan'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Sımpel PANTIR RETZEP
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET viii
ABSTRACT ix
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Mesane ve Pelvik Ağrı 4
2.2 İnterstisyel Sistit (İS) 5
2.3 Tanı Kriterleri 5
2.4 Sistoskopik Bulgular 7
2.4.1 Klasik enflamatuar Hunner lezyonlu Tip 8
2.4.2 Lezyonsuz Tip 8
2.5 İnterstisyel Sistitin Moleküler Patofizyolojisi 9
2.6 İnterstisyel Sistitin İmmünolojik Etkisi 10
2.7 X-Kromozomunun Otoimmün Hastalıklardaki Potansiyel Rolü 11
3. MATERYAL ve YÖNTEM 15
3.1.MATERYAL 15
3.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler 15
3.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar 16
3.2.YÖNTEM 17
3.2.1 Kandan DNA İzolasyonu 19
3.2.2 HUMARA Testi 20
4. BULGULAR 26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 35
KAYNAKLAR 39
EKLER 47
ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	santigrat derece
CrR	düzenlenmiş değer (Corrected Ratio)
CI	güven aralığı (Confidence Interval)
%	yüzde
bp	baz çifti
dk	dakika
g	gram
M	Molar
mg	mg
ml	mililitre
mM	milimolar
ng	nanogram
nt	nükleotid
sn	saniye
V	Volt
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
U	ünite

Kısaltmalar	Açıklama
AITD	Otoimmün tiroidit
APS	Amonyum persülfat
AR	Androjen reseptör
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
GAG	Glikozaminoglikan
HCl	Hidrojen klorür
HLA	İnsan lökosit antijeni (human leukocyte antigen)
HUMARA	İnsan androjen reseptör testi (human androgene receptor assay)
İS	İnterstisyel sistit
KCl	Potasyum klorür
lncRNA	Uzun kodlamayan RNA (long non-coding RNA)
MAS	Mesane ağrı sendromu
MgCl	Magnezyum klorür
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
NaCl	Sodyum klorür
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAR	Psödootozomal bölge
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PBC	Primer biliyer siroz

Rpm	Dakikada dönüş sayısı (round per minute)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SSc	Sistemik sklerozis
TAE	Tris asetik asit EDTA
TEMED	N, N, N, N-tetrametil-1-2, diaminoetan
XCI	X kromozomu inaktivasyonu
Xi	X-inaktif
XIST	X-inaktif spesifik transkript

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	İnterstisyel Sistit (İS) alt tipleri olan hastalarda sistoskopi bulguları.	9
Şekil 2.2	X-kromozomu inaktivasyonunun immün tolerans üzerindeki etkilerini gösteren model.	14
Şekil 3.1	Restriksiyon enzim kesimi ve PCR amplifikasyon şeması.	21
Şekil 3.2	AR geni Exon-1 nükleotid dizisi.	22
Şekil 4.1	Sağlıklı ve hastalara ait PAGE jel görüntüsü.	32
Şekil 4.2	Sağlıklı grubuna ait PAGE jel görüntüsü.	32
Şekil 4.3	Hasta ve kontrol gruplarına ait X kromozomu inaktivasyon grafiği.	33
Şekil Ek-1-44	Tüm örneklere ait PAGE jel görüntüleri.	47
Şekil Ek-45	DNA Ladder.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1	ESSIC Kriterleri	**7**
Çizelge 3.1	Kullanılan kimyasallar ve laboratuvar malzemeleri listesi	15
Çizelge 3.2	Kullanılan cihazların listesi	16
Çizelge 3.3	Deney çalışması akış şeması	18
Çizelge 3.4	Lizis tamponları	19
Çizelge 3.5	AR geni PCR primer dizileri	24
Çizelge 3.6	PAGE jel hazırlama listesi	25
Çizelge 4.1	DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları	26
Çizelge 4.2	Hasta ve kontrol grubunun sapma yüzdeleri.	34

1. GİRİŞ

İnterstisyel Sistit (İS) veya bilinen diğer adıyla Mesane Ağrı Sendromu (MAS), etiyolojisi tam olarak belirlenemeyen ve kabul edilmiş kesin bir tedavisi olmayan bir hastalıktır. Semptomları arasında idrar sıklığı, idrar aciliyeti, gece idrarına çıkma, idrar kesesinin dolumu veya boşaltımı sırasında aşırı ağrı ve rahatsızlık hissi gibi tanımlamalar bulunmaktadır (Fall vd., 2010; Hanno vd., 2015). Bununla birlikte, sendromun bilinmeyen etiyolojisi, tedavi ve araştırma stratejilerinin gelişimini sınırlayan semptomların çeşitliliği/dereceleri nedeniyle alt tipleri ve fenotipleri henüz kesin bir şekilde oluşturulmamıştır.

İnterstisyel sistit hastalarının tanısında kesinleşmiş tek bir fenotip vardır; Hunner lezyonları olarak bilinen mesane ürotelyumunda ortaya çıkan ülseratif oluşumlardır. Hunner lezyonu, radyal olarak yönlendirilmiş kapillerlere yapışık olan merkezi bir pıhtı benzeri yapı ile sınırlı, hiperemik mukozal bölge olarak tanımlanır. Hunner lezyonlarının dışında glomerülasyonlar olarak tanımlanan diğer oluşumlar ise tıpkı Hunner lezyonlarına benzer fakat mesane distansiyonundan sonra ortaya çıkan peteşiyal mukozal kanamalar olarak tanımlanırlar (Koçak vd., 2020). Hunner lezyonları gibi belirgin kapiller kanama benzeri oluşum görülmez. Glomerülasyonlar, İnterstisyel Sistit hastalığında, Hunner ülserleri varlığında olduğu gibi kesin bir tanıyla sonuçlanmasa da diğer semptomlarla birlikte değerlendirildiğinde tanıya yardımcı olmaktadır (Wennevik vd., 2016).

Günümüzde kesin olan tek fenotip Hunner lezyonları olmakla birlikte hastaların yalnızca %10-20'si bu ülserleri taşır; geri kalan %80-90'lık kısım Hunner lezyonlarına sahip değildirler (Bschleipfer & Karl, 2022). Bundan dolayı hastalığın tanısı oldukça zor ve kompleks bir hale gelmektedir.

Hastalığın etiyopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte kronik inflamasyon, enfeksiyon, ürinel disfonksiyon, otoimmünite, genetik gibi multifaktöriyel sebeplerden kaynaklanabileceği ve hastadan hastaya değişiklik gösterebileceği öne sürülmektedir (Grover vd., 2011). Moleküler seviyede incelendiğinde mesanenin iç yüzeyini kaplayan epitel bariyerde koruyucu bir tabaka oluşturan glikozaminoglikanların (GAGs) azaldığı ve buna bağlı olarak mesane mukozasında hasarlar meydana gelmeye başladığı

bildirilmiştir (Cervigni & Natale, 2014). Üroteliumu (mesane epiteli) oluşturan epitel hücrelerin arasındaki bağlantıların zayıflaması ve idrarda bulunan toksik içeriğin alt tabakalara geçmesiyle birlikte sitokin üretimi de dâhil olmak üzere inflamatuar yanıtları harekete geçirmektedir (Birder & Andersson, 2013). Epidemiyolojik çalışmalar interstisyel sistitin kadınlarda erkeklere oranla 5 kat daha fazla rastlandığını rapor etmiştir (Clemens vd., 2005). Otoimmün ve otoinflamatuar hastalıkların pek çoğunda kadın: erkek hasta oranının çok yüksek olduğu literatürde daha önce de bildirilmiştir (Angum vd., 2020; Fairweather vd., 2008). Bunun sebepleri olarak hormon farkı (Cutolo vd., 2006), gebelik (Mullinax F, 1993) veya X kromozomu İnaktivasyonundaki sapmalar (Kast, 1977; Stewart, 1998) gösterilmektedir.

İki cinsiyet arasında hormon farkı ilk göze çarpan etken gibi görünse de, çocukluk çağı otoimmün hastalıklarında da kız: erkek çocuğu oranı yüksek olan hastalıkların mevcudiyeti hormon etkisinin ikinci plana alınmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda gebelik de oldukça kuvvetli bir hipotez olup gebeliğe bağlı bir takım otoimmün hastalıklar (örn: preeklempsi) da bulunmaktadır (Redman & Sargent, 2010). Ancak gebe kalmamış kadınlarda da otoimmün hastalıkların şiddetli görülmesi sonucu bu faktörün de yüzde yüz etkisinin olamayacağı sonucuna varılmaktadır (Ngo vd., 2014). Üçüncü ve son hipotez ise X kromozomu inaktivasyonunun rolüdür. İki cinsiyet arasındaki farklardan biri de bu kromozomun sayısal olarak dengesizliğidir. Kadınlarda iki X kromozomu bulunurken, erkekler yalnızca bir tane X kromozomu taşırlar. X kromozomu immün yanıtla ilgili önemli genleri barındırdığından ciddi immün yanıt oluşturabilme kapasitesi yüksektir (Schurz vd., 2019).

Kadınlarda X'e bağlı gen dozajını ayarlanması için kromozomlardan bir tanesi inaktif hale gelir. 1949 yılında Amerikalı bilim insanı Barr ve arkadaşları, dişi kedilerin mitotik interfaz çekirdeğinde derin boyanmış bir cisimcik buldular, ancak bu cisimciği erkek kedilerde bulamadılar (Barr & Bertram, 1949). “Barr cismi” adını verdikleri bu yapı daha sonraki çalışmalarda, bu kompakt şeklin X kromozomunun neredeyse tamamen inaktif hale gelmesinin bir sonucu olduğu düşünüldü (Giorgetti vd., 2016). Memelilerde bu durum dişilerin X kromozomu açısından doğal olarak mozaik ifadeye sahip olmasıyla sonuçlanmaktadır (Lyon, 1961). X kromozomunun yalancı otozomal bölgeler (PARs) olarak adlandırılan kısımlarındaki genler olmak üzere genlerin yaklaşık %15-25'inin

inaktivasyon mekanizmasından kaçtığı rapor edilmiştir (Posynick & Brown, 2019). Inaktivasyondan kaçan genler arasında immün yanıtta önemli rolü olanlar da mevcuttur. Bu hipotezin yanı sıra timusda kendi antijenlerinin (self antigen) tanıtılmasındaki bir hata sonucu da otoimmün yanıta sebep olabileceği bilinmektedir (Klein vd., 2000). Bundan dolayı X kromozomu inaktivasyon mekanizmasındaki herhangi bir sapma, X'e bağlı kendi antijenlerin timusda ya da perifer bir dokuda sunulmasını engelleyebileceği ve bu mekanizma sonucu kendine karşı toleransın kaybolarak otoimmün reaksiyon gelişebileceği hipotezi oldukça kabul görmüştür (Kyewski & Derbinski, 2004; Laufer vd., 1996; Selmi vd., 2012). Genel olarak kadınlarda sık rastlanan otoimmün hastalıklarda X kromozomu inaktivasyon durumunun önemli role sahip olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, romatoid artrit (Chabchoub vd., 2009), otoimmün tiroid (Ozcelik vd., 2006), skleroderma (Ozbalkan vd., 2005; Uz vd., 2008), ve SLE (Pyfrom vd., 2021) gibi otoimmünite kökenli hastalıklarda, hastalardaki sapmanın kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı çıktığı rapor edilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, İnterstisyel Sistitin (İS) kadınlarda erkeklere oranla daha sık rastlanması, X kromozomu inaktivasyonunun rolü olduğunu düşündürmüştür. Tanı aşamasındaki zorluk ve kesin tedavisinin bulunamaması da bu çalışmanın yapılmasında etkili olmuştur. Böylece etiyopatogenezinin belirlenmesine katkı sağlayacak, belki de tedavi yönteminde etkili bir araştırma olacaktır.

Bu çalışmada, İnterstisyel Sistit hastası 70 kadın ve sağlıklı (kontrol) 86 kadından alınan periferal kan örneği kullanılmıştır. Allen ve arkadaşlarının 1992'de keşfettiği HUMARA testi protokolüne göre, örneklerin X kromozom inaktivasyon paternleri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Mesane ve Pelvik Ağrı

Normal bir idrar kesesinde boşaltımdan önce veya sonra herhangi bir ağrı ve rahatsızlık hissi oluşmaz. Bazen mesane ve mesaneyi çevreleyen organlarda normalin aksine ağrı, rahatsızlık hissi, tahriş, gün içerisinde ve özellikle geceleri daha yoğun olmak üzere sık sık idrara çıkma gibi semptomlar ortaya çıkabilir. Bu semptomlar ani ve akut veya kademeli olarak gelişen ve kronik bir seyir gösterebilir. Bu durum sıklıkla idrar yolları, bağırsak, genital sistem, sinir sistemi veya kas sistemi ile ilişkili olabilir (Jhang & Kuo, 2016).

Mesane ve çevresindeki bu organlar çeşitli bakteri, mantar veya virüsler tarafından enfekte edilmiş olabileceği gibi taşlar, iyi veya kötü huylu tümörlerin de ortaya çıkmış olması mümkündür (Speer vd., 2016). Aynı zamanda kadınlarda rahmin iç tabakasıyla aynı karaktere sahip dokunun rahim dışında büyümesiyle oluşan bir hastalık olan endometriozis de bu gibi semptomlara neden olabilir (Panel vd., 2016).

Bu semptomlara neden olabilecek diğer bir unsur da ketamin gibi anestetiklerin kronik kullanımıdır. Ketamin ve türevlerinin uzun süreli kullanımının mesane epitel bariyerinde hasara, idrarın boşaltımı sırasında ağrı ve rahatsızlığa, azalan mesane kapasitesi ve artan basınca aynı zamanda da üretra daralmasına neden olduğu bildirilmiştir (Anderson vd., 2022).

Tüm bu etiyolojik nedenlerin yanında göz ardı edilemeyecek ve günümüzde de büyük sorun oluşturan diğer bir etken otoimmün hastalıklardır. Otoimmün hastalıklar, vücudun kendi antijenlerine karşı immün yanıtın artması ve sonucunda da organa spesifik veya sistemik bir şekilde organizmayı etkileyen kronik hastalıklardır (K. H. Lee vd., 2020). Şu ana kadar otoimmün olduğu bilinen veya otoimmünite kaynaklı olduğu düşünülen 40'tan fazla hastalığın neredeyse tümünde, özellikle sınıf I (HLA-A, B, C) ve sınıf II (Ia, HLA-D) MHC (major histokompatibilite kompleksi) molekülleri içinde kodlanan genlerin etkisiyle güçlü bir şekilde genetik yatkınlık söz konusudur. Majör histokompatibilite kompleksi (MHC), immün yanıtta önemli bir rolü olan hücre yüzeyindeki proteinleri kodlayan bir gen grubudur (Sinha vd., 1990). MHC molekülleri, aslında antijen sunucu

hücreler (ASH)'lerin yüzeyinde bulunan zar proteinleridir; bu hücreler tarafından, timusda, immün yanıtta etkili olan T hücrelerine tanıtılır ve bu sayede vücudun kendinden olan ve olmayanın ayırt edilebilmesini sağlar. MHC gen lokusu tüm memelilerde bulunur ve insan MHC proteinleri, insan lökosit antijenleri (HLA) adını alır. Kan yoluyla vücudun hemen hemen her organına ulaşabilen antijen sunucu hücreler, çeşitli epigenetik nedenlerden dolayı MHC moleküllerini eksik veya hatalı tanıtırlarsa otoimmüniteye neden olabilirler (Nepom & Erlich, 1991). Dolayısıyla mesane ve çevresindeki organlarda da kronik ağrı durumu söz konusu olabilir.

Mesane ve pelvis ağrısına neden olan diğer bir hastalık ise İnterstisyel Sistit (İS) ya da diğer adıyla Mesane Ağrı Sendromu (MAS)'dir.

2.2 İnterstisyel Sistit (İS)

İnterstisyel Sistit, mesanede ağrı ile seyreden kronik inflamatuar bir hastalıktır (Cervigni & Natale, 2014). Etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte alt idrar yolunda sürekli ve rahatsızlık verici derecede ağrı ile karakterize bir hastalıktır. Mesane kaynaklı bu ağrı sonucunda idrar sıklığı/aciliyeti, gece idrarına çıkma, rahatsızlık, tahriş, gerginlik, mide bulantısı ve halsizlik gibi çeşitli semptomlar da hastalar arasında farklılık gösterek ortaya çıkmaktadır (Akiyama vd., 2020). Tüm semptomlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde aslında bir bakteriyel enfeksiyon olabileceği akla gelen ilk seçenek olabilir. Fakat yapılan tüm testlerde tanıya yardımcı olabilecek herhangi bir bakteriyel enfeksiyon saptanamamaktadır (Kuo, 2014). Bu sebeple tanı aşamasında hekimleri zorlayan bir dezavantaj söz konusudur.

2.3 Tanı Kriterleri

Tanı kriteri Avrupa İntestisyel Sistit Çalışmaları Topluluğu (ESSIC) tarafından mesanede 6 aydan uzun süren kronik ağrı bulgularına ek olarak en az bir üriner sendromun eşlik etmesi ile tanımlanmıştır (van de Merwe vd., 2008). Bu konuda ESSIC'nun belirlediği kriterlere göre ölçeklendirme yapılmakta olup tanı için önemlidir (Koçak vd., 2019). Bu kriterler **Çizelge 2.1**'de gösterilmiştir. Hastalar genellikle sık sık ve sıkışık şekilde idrara çıkma, mesane boşaltımı/dolumu esnasında ağrı ve yanma ve gece idrarının artması gibi çeşitli şikayetlerle hekime başvurmaktadır. Yapılan ilk testlerde bakteriyel enfeksiyona

dair herhangi bir bulguya rastlanmadığı takdirde detaylı bir inceleme için sistoskopi yöntemine başvurulmaktadır.

Sistoskopi, idrar yolu, mesane, üretra, üretral sfinkter ve prostatın doğrudan görüntülenmesini sağlayan en yaygın ve en önemli tanı araçlarından biridir. Sistoskopi genelde bir tanı prosedürü olmakla birlikte bazı durumlarda tedavi edici olarak da uygulanır. Kısa süreli bir işlem olan sistoskopi ile idrar kaçırma, idrar yapma zorluğu ve travma gibi durumlar değerlendirilir (McCarthy & McDermaid, 1990). Sistoskopi genellikle hidrodistansiyonla birlikte uygulanır. Hidrodistansiyon, sistoskopi esnasında mesanenin 1-10 dakika süreyle sıvıyla doldurularak gerilmesi işlemidir. Bu sayede ürotelyum daha net bir şekilde görüntülenebilir (Jiang vd., 2022; Sarıkaya vd., 2022).

Çizelge 2. 1 ESSIC Kriterleri

Sistoskopi ve Hidrodistansiyon				
	Yapılmamış	Normal	Glomerülasyon	Hunner Lezyonu
Biyopsi				
Yapılmamış	XX	1X	2X	3X
Normal	XA	1A	2A	3A
Yetersiz	XB	1B	2B	3B
Pozitif	XC	1C	2C	3C

Sembol 1: Sistoskopi bulguları
X: Yapılmamış
1: Normal
2: Derece II/III glomerülasyon
3: Hunner lezyonu
(Glomerülasyonlu/glomerülasyonsuz)

Sembol 2: Biyopsi bulguları
X: Yapılmamış
A: Normal
B: Yetersiz
C: inflamatuar sızıntılar, granülasyon dokusu, detrusor mastositozu veya intrafasiküler fibrozis

2.4 Sistoskopik Bulgular

Hastalığın teşhisinde kullanılan en önemli araçlardan biri sistoskopik inceleme yöntemidir (Ahmadi vd., 2021). Sistoskopik inceleme sonucunda Hunner lezyonlarının varlığı veya yokluğu hastalığın karakterizasyonunda ve tedavi sürecinde yol göstericidir. Aynı zamanda bazı hastalarda hidrodistansiyondan sonra glomerülasyonlar da gözlemlenebilir. Bu kapsamda Avrupa İntestisyel Sistit Çalışmaları Topluluğu (ESSIC)'nun kriterlerine göre İnterstisyel Sistit temelde iki tip olarak sınıflandırılır:

-Klasik enflamatuar Hunner Lezyonlu Tip,

- Lezyonsuz tip.

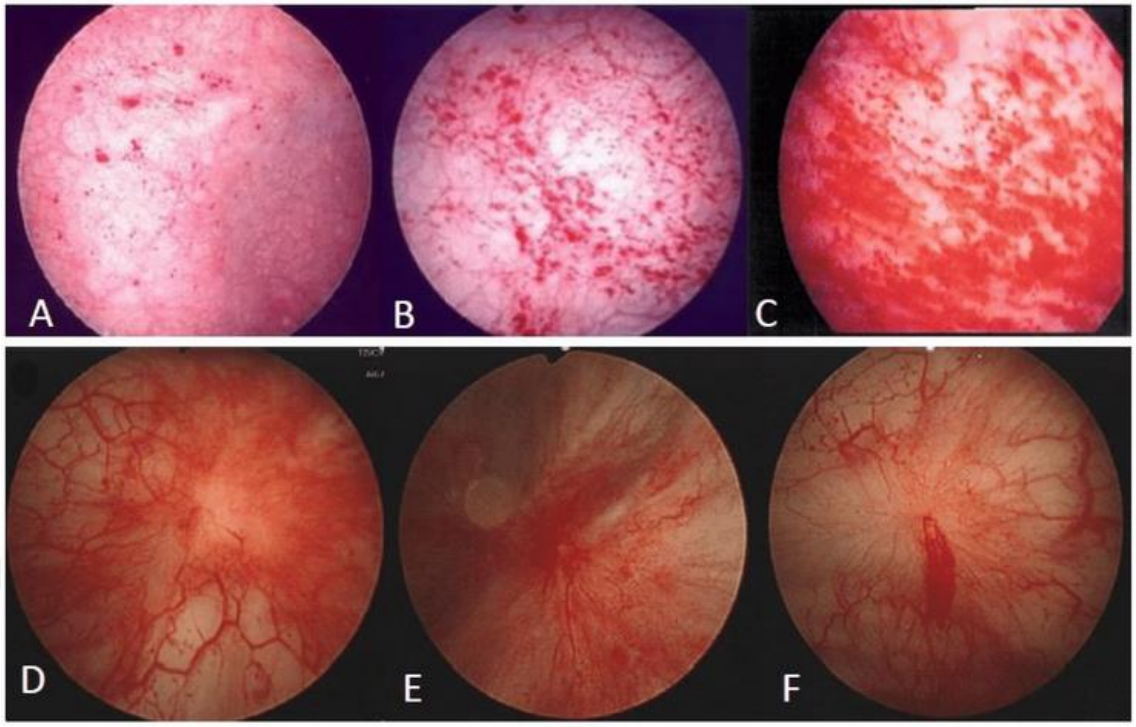
2.4.1 Klasik enflamatuar Hunner lezyonlu Tip

Hunner lezyonları genel olarak mesanede yara izine benzer bir görüntüye sahip kızarmış bir spot ve onun etrafında dağınık şekilde yayılmış kan damarlarından oluşan ülserlere verilen isimdir (Şekil 2.1 D-F) (Jiang vd., 2022). Hunner lezyonları hastaların yalnızca %10-20'sini oluşturur (Bschleipfer & Karl, 2022). Ayrıca Hunner lezyonlarının varlığı daha ağır semptomlar ve düşük mesane kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. (Bade vd., 2003; Malde vd., 2018) Hunner lezyonları histopatolojik olarak incelendiğinde, submukozada inflamasyonla birlikte artmış T ve B hücre ekspresyonu gözlemlenir (Gamper vd., 2013). Bazı hastalarda artmış IgE seviyeleri gözlemlenebilir (J. Lee vd., 2006). Buna rağmen hiçbir etiyopatojenik ölçüt, tüm İS hastalarına uyacak şekilde uyarlanamamaktadır.

Hunner lezyonları dışında hastalarda glomerülasyon olarak adlandırılan Hunner lezyonlarına benzer, fakat mesane distansiyonundan sonra ürotelyumda ortaya çıkan peteşiyal mukozal kanamalara sahip olabilirler (Koçak vd., 2020). Hunner lezyonları gibi belirgin kapiller kanama benzeri oluşum görülmez fakat hastalığın tanısında önemlidir. Hem glomerülasyonlar hem de Hunner lezyonları aynı hastada gözlemlenebilir. Glomerülasyonlar kendi içinde şiddetine göre 0'dan 3'e kadar değer verilerek tanımlanabilir (Şekil 2.1 A-C).

2.4.2 Lezyonsuz Tip

Genel olarak herhangi bir lezyon saptanmaz fakat diğer semptomların en az bir veya birkaçı gözlemlenir (Whitmore vd., 2019). Hunner lezyonları teşhis konulmasında belirleyici olduğu gibi, bu lezyonların bulunmaması da teşhisi zorlaştırır veya geciktirebilir. Dolayısıyla birkaç farklı semptomun aynı anda değerlendirilmesi gerekir.
Tanıyı zorlaştıran diğer bir etken de dolaşım sıvılarından veya mesaneden alınan biyopsi dokularından İS'ye özgü bir biyobelirtecin tespit edilememesidir. Kanser dahil birçok hastalık için tanıya yardımcı olabilecek biyobelirteçler günümüz teknolojisiyle kan örneklerinden dahi saptanabilmektedir (Ge vd., 2017). Ancak İS'nin moleküler temelinin bilinmemesi ve semptomların her hastada aynı karakterde olmaması tanı parametrelerinin doğru bir şekilde belirlenmesine engel olmaktadır.



Şekil 2. 1 İnterstisyel sistit (İS) alt tipleri olan hastalarda sistoskopi bulguları: (A) Derece 0-1 glomerülasyonlu (Hunner lezyonu olmayan); (B) Derece 2 glomerülasyonlu (Hunner lezyonu olmayan); (C) Derece 3 glomerülasyonlu (Hunner lezyonu olmayan); (D–F) Hunner lezyonlu İS (Jiang vd., 2022)

2.5 İnterstisyel Sistitin Moleküler Patofizyolojisi

Ürotelyum (mesane epiteli) idrar yollarını kaplayan, vücutta toksik ajanların, idrarın ve bakterilerin penetrasyonuna karşı koruyucu bariyer görevi üstlenen benzersiz bir tabakadır. Ürotelyumu kaplayan glikozaminoglikanlar (GAG) ise, ürotelyal hücrelerin yüzeyinde glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan kalın mukus tabakasıdır (Costantini vd., 2013). GAG'lar kolajen, elastin, fibronektin ve laminin gibi diğer polisakkaritlerle hücre dışı matrisin temelinin oluşturmaktadır. GAG'ların asıl görevi, enzimlerin ve büyüme faktörlerinin modülasyonu, proteazların inhibisyonu ve inflamatuar sitokinlerin düzenlenmesidir (Esko vd., 2009). Mesane dokusu idrarı depolarken bazı elektrolitlerin ve elektrolit olmayanların seçici değişimine izin verebilir. Mesanede yoğun olarak bulunan GAG molekülleri keratan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, hiyalüronat, heparin ve heparan sülfattır (Hurst vd., 2007). Bu moleküllerin mesanedeki kararlılığının bozulması, birçok toksik ajana maruz kalmayı arttıracaktır. Patolojik olarak incelendiğinde en yaygın rastlananan bulgular ürotelyumun

soyulması ve inflamasyondur (Homma vd., 2016; Keay, 2008). İS'nin bu GAG tabakasının bozunmasından kaynaklı olarak mesane mukozasının yüzeyinin toksik ajanlara, bakterilere ve idrara maruz kalmasıyla ortaya çıktığı hipotezi oldukça kabul görmüştür (Cervigni & Natale, 2014).

2.6 İnterstisyel Sistitin İmmünolojik Etkisi

İS'nin otoimmün bir hastalık olabileceği fikri ilk akla gelen hipotez olabilir. Bunun nedeni kadınlarda erkeklere oranla 5 kat daha fazla rastlanmasıdır (van de Merwe, 2007). Şu ana kadar birçok çalışmada otoimmün ve otoinflamatuar hastalıkların kadınlarda daha sık rastlandığı rapor edilmiştir. Dünya nüfusunun yaklaşık %8'i otoimmün hastalıklardan etkilenirken bunların yaklaşık %78'i kadınlardır. Buna neyin sebep olduğu tam olarak bilinmezken kadınlar enfeksiyon, aşılama ve travmaya artan antikor üretimi ve daha baskın bağışıklık tepkisi ile yanıt vermektedir (Fairweather vd., 2008). Güçlü bağışıklık tepkisinin sebepleri olarak hormon farkı (Cutolo vd., 2006), gebelik (Mullinax F, 1993) veya X kromozomu inaktivasyonundaki sapmalar (Kast, 1977; Stewart, 1998) gösterilmektedir.

Hormon farkı ilk göze çarpan etken gibi gözükmekte, ancak çocukluk çağı otoimmün hastalıklarında da kız:erkek çocuğu oranı yüksek olan hastalıkların mevcudiyeti hormonların etkisinin ikinci plana alınmasına sebep olmaktadır. Gebelik de oldukça kuvvetli bir hipotez olmakla birlikte, gebeliğe bağlı bir takım otoimmün hastalıklar (örn: preeklempsi) da bulunmaktadır (Redman & Sargent, 2010). Anne hücrelerinin fetüsün kanında kalması ve fetüs hücrelerinin annenin dolaşım sisteminde kalmasına mikrokimerizm denir. Doğumdan yıllar sonra dahi anne kanında fetal hücreler tespit edilmiştir. Dolayısıyla fetal hücrelerin anne kanından etkili bir şekilde temizlenmediği açıkça görülmektedir. Ancak, mikrokimerizmin tek başına otoimmün hastalıklarda kadınların daha fazla etkilenmesini açıklayamaz; doğum yapmamış birçok hasta bulunmaktadır (Bianchi vd., 1996). Üçüncü ve son hipotez ise iki cinsiyet arasındaki en önemli fark olan X kromozomu inaktivasyonunun rolünü düşündürmektedir. Çünkü iki cinsiyet arasındaki belirleyici farklardan birini de bu kromozomun sayısı oluşturmaktadır (Schurz vd., 2019). X kromozomu inaktivasyonu, sadece kadınlarda gözlenen biyolojik

bir düzenleme olmakla birlikte, otoimmün hastalıklarda kadınların daha fazla etkilenmesini açıklayabilir.

Otoimmün hastalıklarda görülen yüksek kadın/erkek oranına dair ilk kez bir açıklama sunan Kast, 1977 yılında yaptığı yayında, kadınlarda daha fazla görülen otoimmün hastalıkların çevresel, hormonal ve mikrokimerizm etkilerinin yanı sıra, klasik kalıtım desenlerinden farklı yeni bir mekanizmanın da belirli otoimmün hastalıklara kadınların yatkınlığında rol oynayabileceğini rapor etti. Bu mekanizmalardan biri, X kromozomu inaktivasyon sürecindeki bozulmadır. Kast, X kromozomu inaktivasyonundaki herhangi bir bozulmanın, kadınlarda yüksek oranda görülen otoimmün hastalıkların oluşumunu etkileyebileceğini öne sürdü (Kast, 1977). Ardından 1998'de Stewart bu hipotezi baz alarak, sistemik lupus eritematozus (SLE) üzerine benzer bir durum söz konusu olduğunu öne sürdü. XCI mozaikleşmesinden kaynaklanan öz-antijen sunum profillerindeki farklılıkların, hastalığın kadınlarda daha fazla görülmesinin ardındaki faktörlerden biri olabileceğini savundu (Stewart, 1998).

2.7 X-Kromozomunun Otoimmün Hastalıklardaki Potansiyel Rolü

Yaşamın ilk anlarından itibaren çoğu organizmanın en karakteristik özelliklerinden biri cinsiyetin belirlenmesidir. Cinsiyetin belirlenmesi temelde özel cinsiyet kromozomlarının mekanizmasına dayanır. Günümüzde, bu mekanizma bilimin de katkılarıyla aydınlatılmıştır. İnsanlarda, Y kromozomunun varlığı XY taşıyan bireylerde erkek cinsiyetini belirlerken, yokluğu ise XX kromozomu taşıyan bireylerde dişi gelişimini indükler. Çoğu organizmada da bu mekanizma Y kromozomunun varlığı veya yokluğuna göre şekil alır. X kromozomu Y kromozomuna göre nispeten daha büyüktür ve cinsiyet belirlenmesiyle ilişkili değildir. Y kromozomu ise daha küçük olup taşıdığı az sayıda gen de spermatogenezis ile alakalıdır. Dolayısıyla X kromozomu sayısı ve gen sayısı (yaklaşık 2000 gen) açısından dişiler iki kat fazla gen ifade ediyor gibi düşünülebilir (Ross vd., 2005). Ancak doğada böyle bir dozaj farkı kabul edilemez ve gelişimsel olarak büyük sorunlar yaratabilir.

Dişilerde bu dozaj farkını düzenleyen çok özel bir mekanizma bulunmaktadır. Gelişimin erken safhalarında X kromozomlarından biri somatik hücrelerde transkripsiyonel olarak inaktive olmaktadır. X kromozomu inaktivasyonu (XCI) doku bazında rastgele

gerçekleşir ve inaktive olan X kromozomu tüm hücre bölünmeleri sırasında klonal olarak hep inaktif kalır. Aslında tüm dişiler X'e bağlı bir gen için her zaman mozaiktirler (Lyon, 1961).

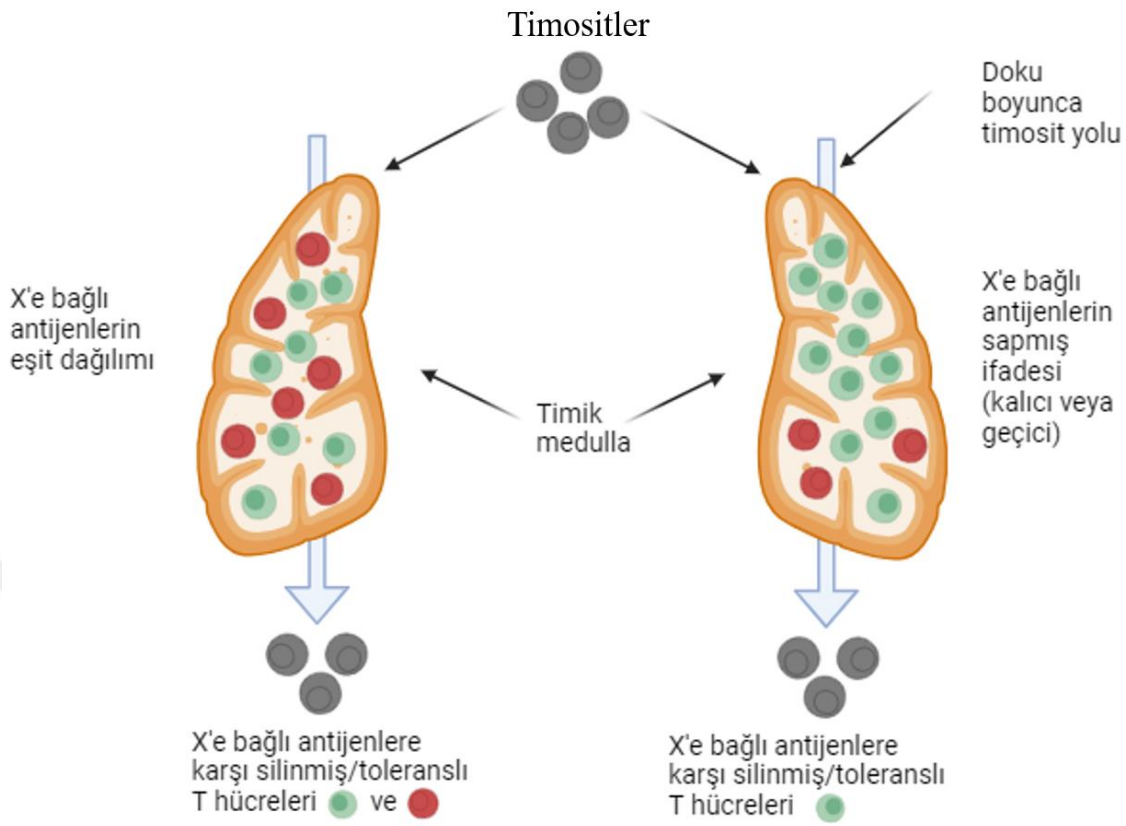
Embriyoda X inaktivasyonunu (Xi) stimüle etmek için uzun kodlamayan bir RNA (lncRNA) olan Xist (X-inaktif spesifik transkript) , rastgele maternal (anneden kalıtılan) veya paternal (babadan kalıtılan) kaynaklı X kromozomlarından birinde ifade edilmektedir. Xist'in ifade edilmemesi, inaktivasyonun başlamaması, örneğin farelerde yapılan çalışmalarda erken dönemde ölüm ile sonuçlanmaktadır (Jacobson vd., 2022). Xist bir defa ifade edilmeye başladığı zaman kromozom çapındaki yapısal değişiklikler, Xist RNA tarafından kaplanan yoğunlaştırılmış Barr gövdesine yol açar ve buradaki genlerin metilasyonunu indükleyerek inaktivasyonunu başlatır. Metilasyon, CpG adacıkları olarak isimlendirilen polimorfik CAG tekrar dizilerinin bulunduğu bölgelerde gerçekleşir (Chapman vd., 2014). DNA metilasyonu uzun zamandır XCI için önemli bir faktör olarak kabul edilir. İnsanlarda Xi üzerindeki genlerin çoğu susturulsa da, %15-25'i bazı epigenetik nedenlerden dolayı kısmen ifade edilir ve inaktivasyondan kaçan genler olarak tanımlanır (Wainer Katsir & Linial, 2019).

XCI doku bazında incelendiğinde, %50 anneden gelen X'in %50 babadan gelen X'in rastgele inaktivasyona uğradığı rapor edilmiştir. Ancak bu simetriden sapmalar başladığı zaman çeşitli problemler ortaya çıkabilir. X kromozomu inaktivasyonunun sapması temel olarak X'lerden birinin daha az aktif olma durumu göstermesidir. Buna neyin neden olduğu bilinmese de yaşla birlikte doku bazında sapmalar gözlemlenebilir (Brooks, 2010).

Otoimmün hastalıkların ortak bir özelliği, kendi antijenlerine karşı bağışıklık toleransının kaybıdır; hastalıkların çoğunda T-hücresi toleransının bozulduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. T-hücresi toleransının en önemli şekli, timus seçilimi sırasında potansiyel olarak kendine reaktif T hücrelerinin yok edilmesini içerir. Dolayısıyla, bir öz antijenin timusta tanıtılmaması, otoimmünite riskini artırabilecek otoimmün T hücrelerinin varlığına yol açabilir (Shirafkan vd., 2024). Kadınlarda X-kromozomunun inaktivasyonu, X'e bağlı kendi antijenlerinin timusta veya toleransın sağlanmasında rol oynayan diğer periferal bölgelerde sunumdan kaçabileceği potansiyel bir mekanizma sunar.

Timus hücreleri (timositler) timus parankimasında seçime tabi tutulur ve negatif seçim durumunda, seçici elemanlar ağırlıklı olarak kemik iliğinden türeyen timik dendritik hücrelerden oluşur (Hengartner vd., 1988). Dendritik hücre aracılı negatif seleksiyon güçlüdür; düşük titrelerde bile negatif seleksiyonu in vitro olarak etkin bir şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Salguero vd., 2014). Eğer timik dendritik hücre popülasyonu rastgele X inaktivasyonu sergiliyorsa, farklılaşan timositlerin öz antijenlerini, her iki X kromozomunda da ifade eden dendritik hücrelerle temas etmesi yüksek olasılıkla gerçekleşir. Ancak, timik dendritik hücre popülasyonunda aşırı sapmış X inaktivasyonu varsa, belirli bir timositin iki X kromozomundan birini ifade eden dendritik hücrelerle temas etmemesi olasıdır. Dolayısıyla, T hücrelerinin baskın olarak inaktif X kromozomunda ifade edilen antijenler için negatif seçime tabi tutulmadan timik olgunlaşma sürecini tamamlayabileceği bir duruma yol açar. Bu mekanizma **Şekil 2.2**'de özetlenmiştir (Chitnis vd., 2000).

Bu durumun gerçekleşme olasılığı, timus seçimi sırasında genellikle herhangi bir timositin temas ettiği dendritik hücrelerin sayısına bağlı olacaktır. Bu konuda sınırlı bilgi bulunmasına rağmen, bu sayının 15 kadar düşük olabileceğini teorize edilmiştir (Stewart, 1998). Eğer durum böyleyse, ilgili bir X'e bağlı antijen için heterozigot olan kadınlarda, hematopoetik hücreler genel olarak aşırı sapma göstermese bile, timusta silinmeden kaçış yine de gerçekleşebilir.



Şekil 2. 2 X-kromozomu inaktivasyonunun immün tolerans üzerindeki etkilerini gösteren model. Timositler timusa girer ve öncelikle timik medulladaki dendritik hücreler olmak üzere, timusta bulunan silici elemanlara maruz kalacakları bir yol izlerler. Bu dendritik hücreler, her bir hücrede hangi ebeveyn X kromozomunun baskın olduğuna bağlı olarak yeşil veya kırmızı renkle gösterilmiştir. Şeklin sol tarafında, geçen timositler her iki ebeveynin X kromozomunu da ifade eden dendritik hücrelere maruz kalacak ve bu nedenle her iki ebeveynden gelen X'e bağlı antijenlere karşı tolerans geliştireceklerdir (yani silineceklerdir). Şeklin sağ tarafında ise, geçen timositler muhtemelen yalnızca "yeşil" dendritik hücrelere maruz kalacak, bu hücreler ise sadece iki ebeveynden birinin X kromozomunu ifade etmektedir. Bu nedenle, timustan çıkan T hücreleri, diğer ebeveynden gelen X'e bağlı antijenlere karşı tolerans geliştirmemiş olacaktır ("kırmızı" dendritik hücreler).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1 Deney Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Tüm kimyasalların güvenlik protokolleri deney öncesinde incelenmiş ve sağlığa zararlı olanların talimatları dikkate alınarak hazırlıklar yapılmıştır. Deney aşamasına göre tüm materyaller **Çizelge 3.1**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1 Kullanılan kimyasallar ve laboratuvar malzemeleri listesi

Kandan DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler	**Üretici**
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich
Magnezyum Klorür ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich
EDTA	Bioshop
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
İzopropanol	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Nükleaz içermeyen su	Thermo Fisher

Restriksiyon Enzim Kesiminde Kullanılan Malzemeler	**Üretici**
Hpa II	NEB
Rsa I	NEB
rCutSmart™ Buffer	NEB

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Kullanılan Malzemeler	**Üretici**
Taq PCR Kit	NEB
Primerler	Bioligo

Çizelge 3. 1 Kullanılan kimyasallar ve laboratuvar malzemeleri listesi (devamı)

Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) İçin Kullanılan Malzemeler	**Üretici**
Amonyum Persülfat (APS)	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Amresco
Bis-akrilamid (N,N-Methylene-bis-acrylamide)	Merck
Tris	Bioshop
Borik Asit	Bioshop
EDTA	Bioshop
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
DNA yükleme boyası	Biomatik
DNA Ladder (50 bp, 100 bp)	NEB

3.1.2 Deney Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

Tüm deney basamaklarında kullanılan cihazlar **Çizelge 3.2**'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2 Kullanılan cihazların listesi.

Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	**Üretici**
Mikropipet Seti	D-LAB
10 µL pipet ucu	Isolab
100 µL pipet ucu	Isolab
1000 µL pipet ucu	Isolab
1,5 ml Nuclease-free mikrofüj tüpleri	Axygen
Distile su cihazı	Millipak 20 MILLIPORE
Nanodrop	ThermoFisher NANODROP 2000
Santrifüj	NÜVE- NF-800R
Termal döngüleyici PCR Cihazı	MJ Research PTC-100

Çizelge 3. 2 Kullanılan cihazların listesi (devamı).

Vortex	Scientific Industries
Isı bloğu	Biosan
Hassas terazi	Radwag
pH-metre	Adwa
İnkübatör	N-Biotek
0,2 ml PCR tüpleri	Thermo Fisher
Falkon Tüpleri	Isolab
Ultraviyole (UV) görüntüleme cihazı	Major Science UVDI
Dikey jel yürütme sistemi	Thermo Fisher Scientific
Erlenmayer	Isolab
Beher	Isolab
Parafilm	PARAFILM
Buz Makinesi	Biobase

3.2. YÖNTEM

Çalışmayı yürüttüğümüz hastanelerin Üroloji ABD'na başvuran ve hekimlerimiz tarafından gerçekleştirilen anamnez, fizik muayene, idrar tetkiki veya sistoskopinin ardından ESSIC kriterlerine uygun olarak interstisyel sistit tanısı almış hastalar (n=70) çalışmaya davet edilmiştir. Hastaların seçiminde bazı dışlama kriterleri belirlenmiştir.

Dışlama Kriterleri:

- Otoimmün hastalığı bulunmayan,
- Kronik ilaç kullanmayan,
- Ürolojik malignitesi bulunmayan,
- Kanser geçmişi veya radyoterapi öyküsü olmayan,
- Enfeksiyon benzeri semptomlar göstermeyen hastalar çalışmaya uygun bulunarak dahil edilmiştir.

Ayrıca bu kapsamda aynı polikliniğe başvuran kontrol gönüllü grubu (n=86) için de çeşitli dışlama kriterleri belirlenerek çalışmaya dahil edilmiştir.

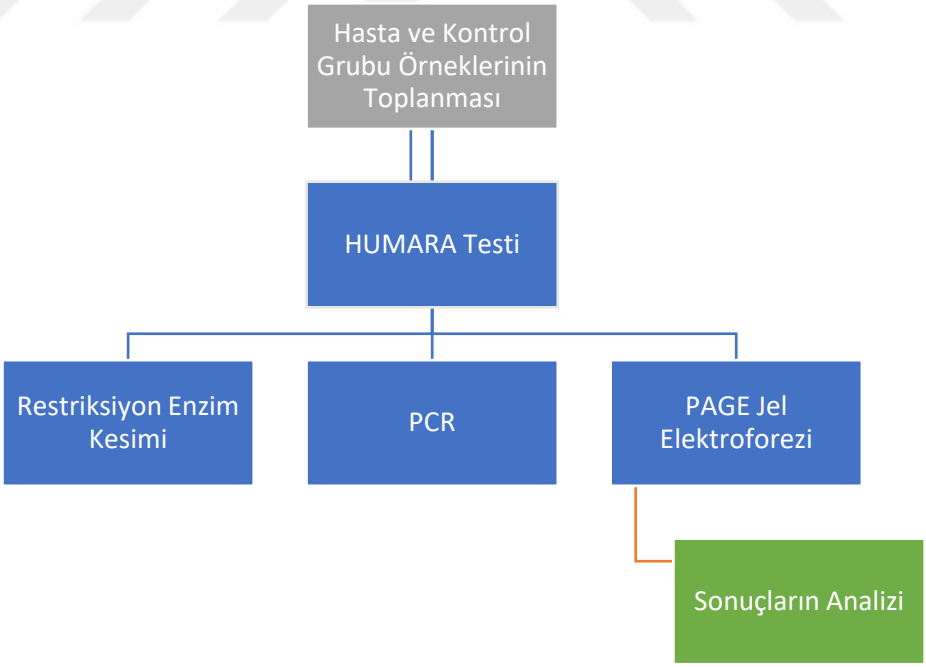
Dışlama Kriterleri:

- İnterstisyel sistit semptomları göstermeyen,
- Ürolojik malignitesi bulunmayan,
- Kanser geçmişi ve radyoterapi öyküsü olmayan,
- Tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu bulunmayan,
- Nörojenik mesane bulgusuna rastlanmayan,
- Herhangi bir otoimmün hastalığı olmayan ve yaş olarak hasta örneklerine denk olan sağlıklı bireyler seçilmiştir.

Çalışmanın akış şeması **Çizelge 3.3'te** özetlenmiştir.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2011-KAEK-26/47 sayılı kararla desteklenmiştir. Tüm gönüllülerden onam formu alınmıştır.

Çizelge 3. 3 Deney çalışması akış şeması.



3.2.1 Kandan DNA İzolasyonu

Hasta ve sağlıklı bireylerden EDTA içeren antikoagulantlı (mor kapaklı) tüplere alınan periferik kan örnekleri buz üzerinde laboratuvarımıza getirildi. Hem hasta hemde kontrol gönüllülerine ait kan örneklerinden DNA izolasyonu manuel protokole göre gerçekleştirildi (Suguna Sajja vd., 2014).

Deneye başlamadan önce hazırlanması gereken lizis tampon çözeltileri **Çizelge 3.4**'te verilmiştir. RBC I (Red Blood Cells I) kırmızı kan hücrelerini, WBC II (White Blood Cells II) ise beyaz kan hücrelerini parçalamak için kullanıldı. Ayrıca %10 SDS ve 6 M NaCl çözeltileri WBC II ile birlikte kullanıldı.

Çizelge 3. 4 Lizis tamponları.

RBC I Tampon (RBC lizis) (pH=7,6)	**WBC II Tampon (WBC lizis)** pH=7,6	**%10 SDS**	**6 M NaCl**
0,605 g TrisHCl	0.121 g TrisHCl	10 g SDS	35,1 g/mol NaCl
0,372 g KCl	0.074 g KCl	100 ml distile su	100 ml distile su
1,016 g $MgCl_2$	1.203 g $MgCl_2$		
0,372 g EDTA	0.074 g EDTA		
500 ml distile su	0.467 g NaCl		
	100ml distile su		

a. RBC Lizis

Otoklavlanmış olan 1.5 ml eppendorf'a 300 µl kan aktarıldı ve üzerine 900 µl RBC I (RBC lizis) eklenip iyice vortekslendi. RBC'leri lize etmek için 37ºC'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Tüpler 8000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatan atıldı. Bu adım 3 kez tekrarlandı ve RBC lizisi sonucunda beyaz bir WBC pelleti elde edildi. Pellet, çekirdekli hücrelerden oluşmaktadır. Bunlar da DNA içeren çeşitli beyaz kan hücreleridir. Sonraki adım beyaz kan hücrelerini parçalayıp DNA içeriğini ortaya çıkarmaktır.

b. WBC Lizis

Hücre pelletine 300 µl WBC II (WBC lizis) eklendi ve iyice vortekslendi. Ardından 40 µl %10 SDS ve 14 µl Proteinaz K ilave edildi ve tüpler alt üst edildi. 37ºC'de 15 dakika inkübe edildikten sonra proteinleri çökeltmek için 100 µl 6M NaCl eklenip vortekslendi. Tüpler 8000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi.

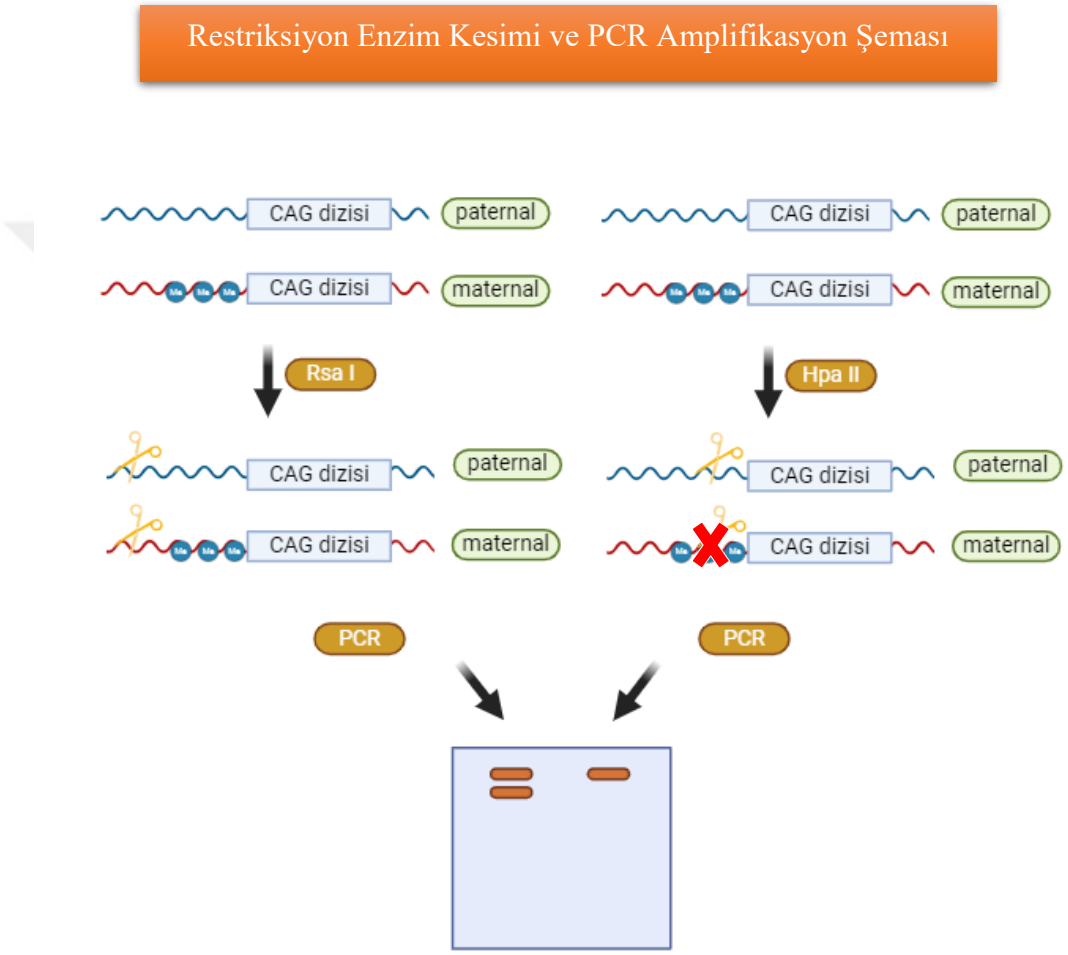
a. DNA'nın Çökelmesi

Süpernatan, 300 µl izopropanol içeren yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. DNA, ependorf tüpü yavaşça ters çevrilerek çöktürüldü. Ayrıca ependorflar, DNA'yı pellet haline getirmek için 8000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatan atıldı, üzerine 1mL %70 etanol eklendi ve fazla tuzları uzaklaştırmak için yavaşça karıştırıldı. Son olarak tüpler, DNA'yı pellet haline getirmek için 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatan atıldıktan sonra tüplerin kapağı açık bir şekilde DNA kurumaya bırakıldı. İyice kurutulduktan sonra, DNA'yı çözmek için 50 µl TE tamponu ilave edildi. Son olarak DNA'nın çözünmesi için bir gece boyunca 37ºC'de inkübe edildi. İzolasyonu yapılan DNA örneklerinin Nanodrop ile ölçümü yapıldı ve nitel/nicel olarak değerlendirildi.

3.2.2 HUMARA Testi

X-İnaktivasyonu çalışmalarında kullanılan en yaygın yöntemlerden biri HUMARA testidir. İlk olarak Allen ve ark. tarafından 1992 yılında yayınlanan bu yöntem X kromozomu üzerinde bulunan Androjen Reseptor (AR) geninin Exon-1'deki polimorfik CAG tekrar dizilerinin metilasyon profiline dayanmaktadır. AR geni X kromozomu üzerinde olup inaktivasyona uğradığı deneysel olarak kanıtlanmıştır (Meyer vd., 1975). Esas olarak yüksek polimorfik kısa ardışık tekrar dizileri (CAG) ve bu tekrarların üst akımında bulunan *Hpa* II enziminin tanıma bölgesini içermektedir. Tekrar dizisi ve enzim tanıma bölgesini içine alacak şekilde dizayn edilen PCR primerleri ile çoğaltma yapıldığında üçlü tekrar dizilerinin farklılığına göre yaklaşık 280 baz çifti civarında ürün jelde gözlenmektedir. *Hpa* II enziminin metilasyona duyarlı olmasından dolayı aktif X kromozomunda PCR öncesi *Hpa* II ile kesim yapıldığında çoğaltılmak istenen bölge kesildiği için PCR gerçekleşmemekte ve ürün gözlenmemektedir. Tam tersi olan inaktif X kromozomunda ise *Hpa* II enzim kesimi gerçekleşemediğinden PCR ürünü

gözlenebilmektedir. Bu hipoteze göre restriksiyon enzim kesiminin çalışma şeması **Şekil 3.1**'de verilmiştir. Memelilerde dişilerin X kromozomu ifadesinin normal halinin mozaik olduğu bilindiğinden, örneklerdeki X- inaktivasyonundan sapma olmadığı durumda bilgi veren alellerin her ikisi de jelde eşit miktarda gözlenecek olup, sapma olduğu durumda ise alellerden birinin yoğunluğu diğerine göre çok daha fazla gözlenir.



Şekil 3. 1 Restriksiyon enzim kesimi ve PCR amplifikasyon şeması.

Bu hipoteze göre HUMARA Testi 3 aşamadan oluşur:

a. Restriksiyon enzim kesimi,
b. PCR,
c. PCR ürünlerinin poliakrilamid jelde (PAGE) yürütülüp görüntülenmesi.

a. Restriksiyon Enzim Kesimi

Her bir hasta/kontrol örneği için iki farklı tüpte kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. İlk tüpte DNA, *Rsa* I ile kesilirken (sham digestion)(Uncut = U) ikinci tüpte DNA, hem *Rsa* I hem de *Hpa* II ile kesilir (Cut = C). Böylece U tüpünde *Rsa* I enzimi üçlü tekrar dizileri ve PCR primerleri dışındaki bölgeden kesim yaparak DNA'yı küçük parçalara ayırır ve enzimlerin bağlanma yüzeyini arttırır. C tüpünde ise CAG tekrar bölgeleri metilli ise *Hpa* II enzimi kesim yapamadığı için primerler bu bölgeyi çoğaltabilirken, metilsiz olduğu durumda enzim kesim yapabileceği için PCR gerçekleştirilemez. Çoğaltılacak PCR ürünü yaklaşık 280-300 nt civarındadır. AR genine ait Exon-1'i içeren nükleotid dizisi **Şekil 3.2**'de verilmiştir.

AGCGCCCCCTCCGAGATCCCGGGGAGCCAGCTTGCTGGGAGAGCGGGACGGTCCGGAGCAAGCCCAGAGG

CAGAGGAGGCGACAGAGGGAAAAAGGGCCGAGCTAGCCGCTCCAGTGCTGTAGAGGAGCCGAAGGGACGC

ACCACGCCAGCCCCAGCCCGGCTCCAGCGACAGCCAACGCCTCTTGCAGCGCGGCGGCTTCGAAGCCGCC

GCCCGGAGCTGCCCTTTCCTCTTCGGTGAAGTTTTTAAAAGCTGCTAAAGACTCGGAGGAAGCAAGGAAA

GTGCCTGGTAGGACTGACGGCTGCCTTTGTCCTCCTCCTCTCCACCCCGCCTCCCCCCACCCTGCCTTCC

CCCCCTCCCCCGTCTTCTCTCCCGCAGCTGCCTCAGTCGGCTACTCTCAGCCAACCCCCCTCACCACCCT

TCTCCCCACCCGCCCCCCCGCCCCCGTCGGCCCAGCGCTGCCAGCCCGAGTTTGCAGAGAGGTAACTCCC

TTTGGCTGCGAGCGGGCGAGCTAGCTGCACATTGCAAAGAAGGCTCTTAGGAGCCAGGCGACTGGGGAGC

GGCTTCAGCACTGCAGCCACGACCCGCCTGGTTAGGCTGCACGCGGAGAGAACCCTCTGTTTTCCCCCAC

TCTCTCTCCACCTCCTCCTGCCTTCCCCACCCCGAGTGCGGAGCCAGAGATCAAAAGATGAAAAGGCAGT

CAGGTCTTCAGTAGCCAAAAAACAAAACAAACAAAAACAAAAAAGCCGAAATAAAAGAAAAAGATAATAA

CTCAGTTCTTATTTGCACCTACTTCAGTGGACACTGAATTTGGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTTCTTT

TAAGATCTGGGCATCTTTTGAATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGCAGGGCAGA

TCTTGTCCACCGTGTGTCTTCTTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGCGCTTTTTGCGTGGTTGCTC

CCGCAAGTTTCCTTCTCTGGAGCTTCCCGCAGGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAG

CCTGTTGAACTCTTCTGAGCAAGAGAAGGGGAGGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATTCAGCCAAGC

TCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCCTCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAG

CTTTCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGC

GAGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG

CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGG

GTGAGGATGGTTCTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCCTGGATGAGGAACAGCA

ACCTTCACAGCCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCCACCCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTGGAGCCGCC

GTGGCCGCCAGCAAGGGGCTGCCGCAGCAGCTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCAT

CCACGTTGTCCCTGCTGGGCCCCACTTTCCCCGGCTTAAGCAGCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCT

GAGCGAGGCCAGCACCATGCAACTCCTTCAGCAACAGCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCAGCAGCAGC

GGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCCTCCAAGGACAATTACTTAGGGGGCACTTCGACCA

TTTCTGACAACGCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAGTGTCGGTGTCCATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGA

GCATCTGAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATCTACGCCCCACTTTTGGGAGTTCCACCCGCT

GTGCGTCCCACTCCTTGTGCCCCATTGGCCGAATGCAAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGA

GCACTGAAGATACTGCTGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGAGCCT

AGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAACTGCCGTCTACCCTGTCTCTCTAC

AAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGCTGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACTTTCCACTGGCTCTGG

CCGGACCGCCGCCCCCTCCGCCGCCTCCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAGAACCCGCTGGACTA

CGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCGCTATGGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGT

GCAGCGGGACCCGGTTCTGGGTCACCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACAGCCG

AAGAAGGCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGGTGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG

CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCCCTCAG

GGGCTGGCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCCTGGCGGCATGGTGAGCAGAG

TGCCCTATCCCAGTCCCACTTGTGTCAAAAGCGAAATGGGCCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTA

CGGGGACATGCG

Şekil 3.2 AR geni Exon-1 nükleotid dizisi: Turuncu: 5'UTR, Mavi: Proteine kodlanan exon dizisi, Sarı: PCR primer dizisi Gri: CAG tekrar dizisi Pembe: *Rsa* I tanıma ve kesim bölgesi, Yeşil: *Hpa* II tanıma ve kesim bölgesi.

Bu hipoteze göre deney protokolü aşağıdaki gibidir:

Her bir reaksiyon için iki tüp hazırlandı. U ve C olarak etiketlendi. Her iki tüpe de yaklaşık 150-250 ng DNA eklendikten sonra üreticinin talimatlarına göre 1X reaksiyon tamponu + *Rsa* I eklendi. C tüpüne ek olarak yine üreticinin talimatlarına göre *Hpa* II eklendi ve her iki tüpteki hacim toplam 20 µL olacak şekilde ddH2O ile tamamlandı.

Restriksiyon kesim reaksiyonu için hazırlanan tüpler 37°C'de 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Son olarak enzim inaktivasyonu için 80°C'de 20 dakika bekletildi. Enzim kesimi tamamlandıktan sonra örnekler bir sonraki adıma geçene kadar -20°C'de saklandı.

b. PCR

Restriksiyon enzim kesiminde olduğu gibi her bir örnek için iki tüp hazırlanarak U ve C olarak etiketlendi. Restriksiyon enzim kesimindeki reaksiyon ürünleri PCR için kalıp olacak şekilde aynı kodlamayla devam ettirildi. PCR toplam 25 µL hacimde olacak şekilde her tüpe 2'şer µL kesim ürünü, 10'ar pmol primerler, 0.12 mM dNTP, 1X tampon, 1.0 mM MgCl2 ve 1 Unite *Taq* DNA polimeraz eklendi. Kullanılan primerlerin dizileri **Çizelge 3.5**'te verilmiştir. PCR koşulları 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonun ardından 30 döngülük 94°C'de 30 saniye, 59°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye çoğaltma reaksiyonunun ardından 72°C'de 5 dakika final uzama adımı ile sonlandırıldı.

Çizelge 3. 5 AR Geni PCR primer dizileri.

AR Geni Exon-1 PCR Primer Dizileri	
AR- İleri primer	GTCCAAGACCTACCGAGGAG
AR- Geri Primer	CAGGACCAGGTAGCCTGTG

c. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

PCR ürünleri %7'lik denatüre olmayan PAGE'de yürütülmüştür. PAGE içeriği **Çizelge 3.6**'te verilmiştir.

Jel için gerekli tüm malzemeler karıştırılarak iki cam arasına döküldükten sonra polimerleşmesi için 40-45 dakika bekletildi. Yüklemeye başlamadan önce stok çözeltiden (10X TBE) 1X TBE tamponu hazırlanıp yürütme tankına dolduruldu. Ardından 5 µL PCR ürünü 1 µL 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Uygun DNA markörü de yüklenerek yaklaşık 1 saat 20 dakika süreyle 120 V sabit güçte yürütüldü. Yürütmenin ardından jel camlardan ayrılarak 50 ml 1X TBE içeren tampon çözeltisine 10 µL EtBr eklenerek 1-2 dakika çalkalandı. Son olarak yalnızca 30 ml 1X TBE içeren kaba alınan jelin yıkaması yapıldı.

Yıkaması yapılan jel UV görüntüleme cihazına konulup bantların fotoğrafı çekildi. Bantların densitometrik ölçümleri Image J programı kullanılarak yapıldı.

Çizelge 3. 6 PAGE jel hazırlama listesi.

%7'lik poliakrilamid jel içeriği (Hacim= 40 ml)
29,2 mL ddH2O
4 mL 10X TBE
6,66 mL akrilamid:bisakrilamid solüsyonu (38:2)
333,2 µL %10 APS
20 µL TEMED

Görüntülenen örneklerin bant yoğunluğu Image J programı ile ölçülmesinin ardından tek bant (homozigot) olan bireyler non-informative (bilgilendirici değil) olarak adlandırılarak ve analiz dışı bırakıldı. Çift bant (heterozigot) bireylerde corrected ratio (CrR) (düzenlenmiş değer) hesaplaması daha büyük AR alelinin (daha yüksek moleküler ağırlık, 1. bant) daha küçük AR aleline (düşük moleküler ağırlık, 2. bant) göreceli yoğunluğu hesaplanarak R oranı (1. bant alanı/ 2.bant) olarak ifade edildi. Restriksiyon enzimiyle kesilmemiş (RM) ve HpaII ile sindirilmiş (RH) örneklerdeki oranlar ayrı ayrı hesaplandı. Her birey için, iki AR allelinin amplifikasyon verimindeki küçük değişiklikleri düzeltmek için normalize edilmiş bir oran (RN = RH/RM) hesaplandı. Bu normalize edilmiş oran, daha büyük AR alelini taşıyan X kromozomunun inaktivasyon yüzdesini belirlemek için kullanıldı: inaktivasyon yüzdesi = [RN/(RN + 1)] × 100. Densitometrik normalizasyon ve inaktivasyon yüzdesi hesaplandıktan sonra allellerden birinin %80 ve fazlası ifadesi sonucu bu örnek sapmış (skewed) X inaktivasyonuna sahiptir denildi (Chitnis vd., 2000).

d. İstatistiksel Analiz

Bütün hasta ve kontrol grubu bireyler için sonuçların belli olmasının ardından ilişkilendirme çalışması için her iki grup öğeleri Yate's correction kullanılarak $\chi 2$ testi ile analiz edilmesinin ardından Fisher Exact test kullanılarak odds ratio (olasılık oranı) oranları %95 CI aralığında hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, İnterstisyel Sistit (Ağrılı Mesane Sendromu) hastaları ve kontrol grubu gönüllü örneklerinin X-Kromozomu inaktivasyon paternleri HUMARA testi kullanılarak araştırılmıştır.

Periferal kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra niteleyici/niceleyici olarak ölçülmüştür. Örneklerin konsantrasyon değerleri **Çizelge 4.1**'deki gibidir.

Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları.

KOD	HASTA	KONTROL	DNA MİKTARI ng/µl	A260/280	A260/230
230213	X		20,3 ng/µl	1,92	2,67
230214	X		113,5 ng/µl	1,81	1,71
230215	X		70,2 ng/µl	1,82	1,6
230216	X		19,8 ng/µl	1,88	1,56
230217	X		106,9 ng/µl	1,79	1,7
230218	X		25,1 ng/µl	1,9	2,55
230219	X		179,9 ng/µl	1,83	2,11
230220	X		190,2 ng/µl	1,84	2,16
230221	X		167,8 ng/µl	1,84	2,11
230222	X		172,8 ng/µl	1,83	2,08
230223	X		161,9 ng/µl	1,8	1,77
230224	X		161,4 ng/µl	1,84	2,18
230225	X		126,1 ng/µl	1,77	1,56
230226	X		20,1 ng/µl	1,88	1,17
230227	X		25,6 ng/µl	1,9	2,48
230228	X		81,4 ng/µl	1,83	2,2
230229	X		172,6 ng/µl	1,81	2,25
230230	X		119,2 ng/µl	1,84	2,3
230231	X		103,3 ng/µl	1,83	2,27
230232	X		64,9 ng/µl	1,81	2,1
230233	X		194,2 ng/µl	1,83	2,29

Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)

230234	X		98,3 ng/µl	1,68	1,89
230235	X		38,1 ng/µl	1,8	1,72
230236	X		34,9 ng/µl	1,82	1,88
230237	X		51,5 ng/µl	1,87	2,27
230238		X	136,4 ng/µl	1,81	2,22
230239		X	158,2 ng/µl	1,82	2,21
230240	X		138,7 ng/µl	1,81	2,29
230241		X	249,8 ng/µl	1,84	2,27
230242		X	210,5 ng/µl	1,81	2,14
230243		X	298,7 ng/µl	1,83	2,28
230244		X	69,3 ng/µl	1,83	2,28
230245	X		43,7 ng/µl	1,91	2,14
230246	X		32 ng/µl	1,85	1,89
230247	X		53,3 ng/µl	1,84	1,94
230248	X		51,3 ng/µl	1,82	1,75
230249	X		47,9 ng/µl	1,87	2,19
230250	X		60,1 ng/µl	1,81	2,12
230255		X	173 ng/µl	1,81	2,2
230256		X	228,2 ng/µl	1,83	2,27
230257		X	193,8 ng/µl	1,83	2,14
230258		X	205,2 ng/µl	1,84	2,19
230259		X	181 ng/µl	1,83	2,17
230260		X	250,4 ng/µl	1,84	2,14
230261	X		135 ng/µl	1,86	1,65
230262		X	281,8 ng/µl	1,86	2,24
230263		X	82,9 ng/µl	1,86	1,67
230264		X	122,3 ng/µl	1,86	2,1
230265		X	77 ng/µl	1,87	1,62
230266	X		217,1 ng/µl	1,79	2,21
230267	X		110,9 ng/µl	1,8	2,17

Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)

230268		X	100,3 ng/µl	1,81	2,16
230269		X	194,2 ng/µl	1,81	2,23
230270		X	237 ng/µl	1,79	2,25
230271		X	35,3 ng/µl	1,88	1,85
230272		X	471,3 ng/µl	1,86	2,25
230273	X		113,4 ng/µl	1,79	2,09
230274	X		143,2 ng/µl	1,8	2,13
230275	X		79,8 ng/µl	1,79	1,96
230276		X	81,1 ng/µl	1,82	2,09
230278		X	153,6 ng/µl	1,81	1,95
230279		X	28,5 ng/µl	1,98	1,76
230280		X	46,3 ng/µl	1,92	2
230281		X	50,2 ng/µl	1,83	1,77
230282		X	268,6 ng/µl	1,84	2,35
230283		X	537,7 ng/µl	1,86	2,29
230284		X	255,7 ng/µl	1,84	2,19
230285		X	239,2 ng/µl	1,83	2,21
230290		X	140,7 ng/µl	1,83	2,56
230291		X	127,4 ng/µl	1,82	2,51
230292		X	183,7 ng/µl	1,76	1,9
230293		X	246,5 ng/µl	1,82	2,3
230294		X	36,5 ng/µl	1,92	2,21
230295		X	443,1 ng/µl	1,83	1,85
230296		X	196,7 ng/µl	1,83	2,35
230297		X	115,6 ng/µl	1,84	3,48
230298		X	152,9 ng/µl	1,84	3,01
230299		X	262,3 ng/µl	1,85	2,73
230300		X	82,2 ng/µl	1,83	2,29
230301		X	225,5 ng/µl	1,84	2,19
230302		X	170,3 ng/µl	1,82	2,53

Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)

230303	X		92,3 ng/µl	1,83	2,9
230304		X	78 ng/µl	1,84	2,56
230305		X	80 ng/µl	1,81	2,23
230306		X	152,4 ng/µl	1,83	2,63
230307			150,1 ng/µl	1,89	3,74
230310	X		105,6 ng/µl	1,87	2,7
230311	X		234,7 ng/µl	1,83	2,34
230312		X	114,4 ng/µl	1,85	2,53
230313		X	329,4 ng/µl	1,89	2,37
230314		X	206,1 ng/µl	1,87	2,45
230315		X	88,2 ng/µl	1,83	2,86
230316		X	381,7 ng/µl	1,87	2,45
230317		X	127,5 ng/µl	1,83	2,65
230318		X	104,7 ng/µl	1,82	2,72
230319		X	211,5 ng/µl	1,85	2,53
230320		X	214,3 ng/µl	1,79	2,13
230321		X	93 ng/µl	1,82	2,68
230322		X	176 ng/µl	1,83	2,49
230354	X		86,1 ng/µl	1,84	2,54
230355		X	98,8 ng/µl	1,84	2,54
230356		X	146,1 ng/µl	1,8	2,41
230357		X	126,6 ng/µl	1,8	2,14
230358		X	179,1 ng/µl	1,85	2,52
230359		X	119,2 ng/µl	1,9	2,93
230360		X	248,1 ng/µl	1,82	2,49
230361		X	200,8 ng/µl	1,75	2,39
230362		X	255,1 ng/µl	1,83	2,34
230363		X	200,8 ng/µl	1,82	2,55
230364		X	181,8 ng/µl	1,83	2,6
230365		X	136,6 ng/µl	1,84	2,62

Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)

230366		X	119,6 ng/µl	1,82	2,34
230367		X	146,2 ng/µl	1,83	2,25
230368		X	217,3 ng/µl	1,83	2,26
230369	X		46,9 ng/µl	1,85	2,59
230370	X		57,8 ng/µl	1,83	2,35
230371	X		55,3 ng/µl	1,83	2,18
230372	X		82,6 ng/µl	1,84	2,36
230373	X		85 ng/µl	1,81	2,2
230374	X		60,1 ng/µl	1,82	2,28
230375	X		62,2 ng/µl	1,83	2,39
230376	X		118,6 ng/µl	1,83	2,36
230403	X		45,2 ng/µl	1,9	2,59
230404	X		168,9 ng/µl	1,82	2,27
230405		X	141,4 ng/µl	1,84	2,93
230406	X		94,2 ng/µl	1,84	2,85
230407	X		52,5 ng/µl	1,89	4,03
230408		X	85,7 ng/µl	1,82	2,77
230409		X	59,8 ng/µl	1,83	3,13
230410		X	76,8 ng/µl	1,82	2,96
230411		X	109,0 ng/µl	1,82	2,76
230412		X	62,6 ng/µl	1,83	3,32
230413		X	95,5 ng/µl	1,82	2,72
230414		X	23,1 ng/µl	1,76	2,33
230415		X	41,2 ng/µl	1,9	1,9
230416	X		26,6 ng/µl	1,91	1,96
230417	X		49,2 ng/µl	1,87	1,95
230418	X		72,7 ng/µl	1,83	1,85
230419		X	163,7 ng/µl	1,83	2,18
230420	X		104,1 ng/µl	1,83	2,08
230426	X		152,7 ng/µl	1,85	2,48

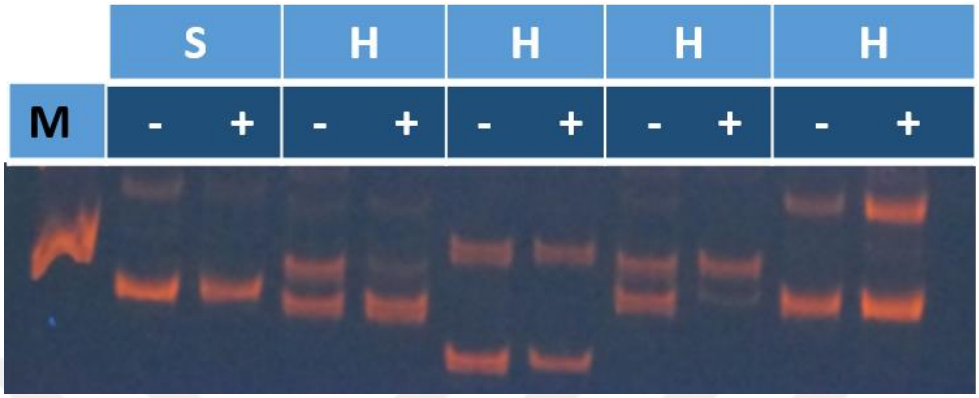
Çizelge 4. 1 DNA izolasyonu yapılan örneklerin Nanodrop ölçüm sonuçları (devamı)

230427	X		51,3 ng/µl	1,85	1,78
240001	X		114,9 ng/µl	1,82	2,33
240002	X		276,3 ng/µl	1,85	2,41
240003	X		84,1 ng/µl	1,87	2,69
240004	X		278,8 ng/µl	1,83	2,31
240005	X		326,3 ng/µl	1,84	2,32
240006	X		300,7 ng/µl	1,83	2,22
240007	X		96,5 ng/µl	1,86	2,46
240022	X		98,7 ng/µl	1,84	2,4
240024		X	134,9 ng/µl	1,85	2,24
240025		X	220,9 ng/µl	1,84	2,34
240064	X		117,5 ng/µl	1,85	2,45
240065	X		107,6 ng/µl	1,85	2,39
240069		X	174,0 ng/µl	1,84	2,38
240071		X	234,8 ng/µl	1,84	2,32

Her bir örneğin DNA konsantrasyonu Nanodrop cihazıyla spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra HUMARA testinin ilk adımı olan enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesimini takiben AR genine spesifik primerlerle PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. X-kromozomu inaktivasyonunun sapma oranlarını belirlemek üzere PAGE jel elektroforezi gerçekleştirildi ve UV cihazıyla görüntülendi.

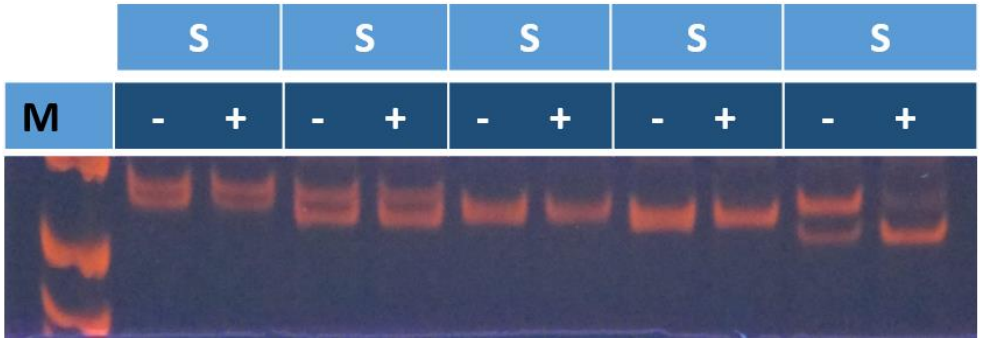
Gönüllü kontrol grubu arasında örneklerin (n=86) 34 tanesi non-informatif (bilgilendirici değil) iken, 52 tanesi informatif (bilgi veren) olarak değerlendirilmiştir. İnterstisyel sistit hastalarından alınan örneklerin (n=70) 17 tanesi non-informatif (bilgilendirici değil) olup, 53 tane örnek ise informatif (bilgi veren) olarak değerlendirilmiştir. **Şekil 4.1**'de görüldüğü üzere, ilk bant markör, sonraki her iki bant tek bi örneğe ait ve - simgesi yalnızca *Rsa* I enzimi ile kesilmiş (U) anlamına gelirken, + simgesi *Rsa* I ve *Hpa* II ile kesilmiş (C) demektir. İlk örnek kontrol grubuna ait olup tek bant (non-informatif) ile sonuçlanarak çalışma dışı bırakıldı. İki, üç, dört ve beşinci örnekler hasta grubuna ait örneklerdir. İkinci ve dördüncü örneklerin + bandından da anlaşılacağı üzere –'ye oranla

sapma gözlemlendi. İki numaralı örneğin sapma oranı %76 iken dört numaralı örnek %80 oranında sapma göstermiştir. Üçüncü ve beşinci örnekler değerlendirildiğinde + bandında sapma gözlemlenmedi.



Şekil 4. 1 Sağlıklı ve hastalara ait PAGE jel görüntüsü.

Sağlıklı kontrol grubuna ait örneklerin jel görüntüsü de **Şekil 4.2'**de verilmiştir. İlk iki örnekte herhangi bir sapma gözlenmemekle birlikte beşinci örnek değerlendirildiğinde %88 oranında sapma gözlenmiştir. Üçüncü ve dördüncü örnekler ise istatistiksel olarak non-infirmatif olarak değerlendirilmiştir.

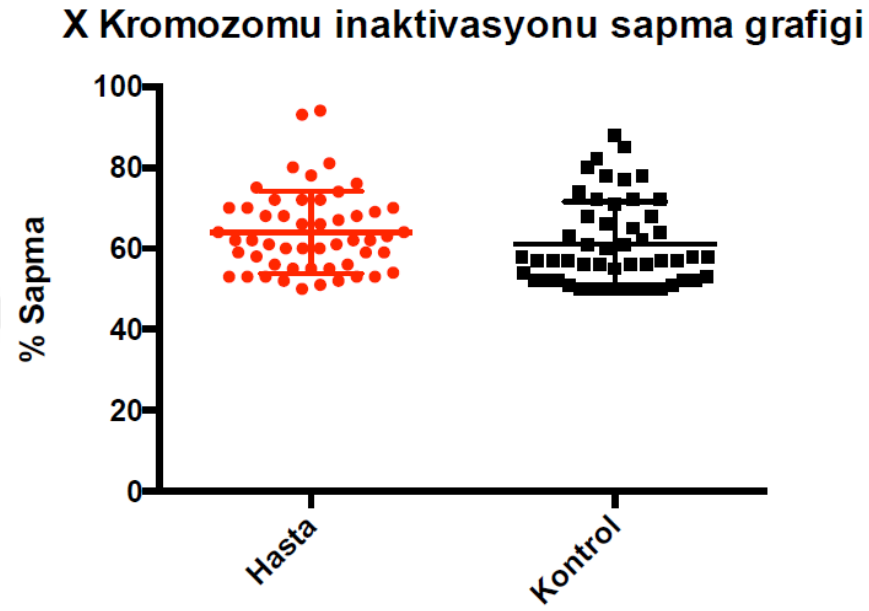


Şekil 4. 2 Sağlıklı grubuna ait PAGE jel görüntüleri.

Tüm örnekler PAGE jelde yürütülüp görüntülendikten sonra Image J programıyla bant yoğunlukları hesaplandı. Tüm örneklere ait jel görüntüleri EKLER **(Şekil Ek-1-44)** bölümündedir. Kullanılan markörler **Şekil Ek-45'te** gösterilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu arasındaki X kromozomu inaktivasyonundan sapma grafiği oluşturuldu. Grafik, **Şekil 4.3**'te gösterilmiştir. Grafiğe göre hasta grubunun inaktivasyon

oranı %55 ve %75 arasında geniş bir dağılım göstermiştir. Ayrıca çeşitli hastalarda da %75-%94 arasında X kromozomu inaktivasyonundan sapma gözlemlenmiştir. Grafiğe göre sağlıklı gönüllülerin inaktivasyon oranı %50-60 arasında yoğunlaşırken, %70-88 arasında da sapma gösteren örnekler bulunmaktadır.



Şekil 4. 3 Hasta ve kontrol gruplarına ait X kromozomu inaktivasyon grafiği.

İnterstisyel sistit hastaları ve kontrol grubu örneklerine ait X kromozomu inaktivasyon paternleri **Çizelge 4.2**'de özetlenmiştir. Her iki grupta da %80 ve üzeri sapma gözlemlenen 4 örnek tespit edilmiştir. Hasta grubunda %70-79 oranında sapması olan 11 örnek bulunurken kontrol grubu için bu sayı 8 örnektir. Hasta grubunda %60-69 ve %50-59 değerinde 19 örnek bulunmaktadır. Son olarak kontrol grubunda %60-69 ve %50-59 değerinde sırasıyla 8 ve 10 adet örnek bulunmaktadır. Bütün hasta ve kontrol grubu bireyler için ilişkilendirme çalışması için her iki grup öğeleri Yate's correction kullanılarak $\chi 2$ testi ile analiz edilmesinin ardından Fisher Exact test kullanılarak odds ratio (olasılık oranı) oranları %95 CI aralığında hesaplanmıştır. P= 0.97, odds ratio: 0.98, %95 CI: 0.23 - 4.14 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda İS grubu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında herhangi anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.2 Hasta ve kontrol grubunun sapma yüzdeleri.

Sapma derecesi (%)	Hasta Grubu (n=53) Değer (%)	Kontrol Grubu (n=52) Değer (%)
90+	2 (3.7)	0 (0)
80-89	2 (3.7)	4 (7.6)
70-79	11 (20.7)	8 (15.3)
60-69	19 (35.8)	10 (19.2)
50-59	19 (35.8)	30 (57.6)

Bu çalışmada, X inaktivasyon sapmasının otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynayıp oynamadığını araştırmak amacıyla hasta ve kontrol grupları arasında X inaktivasyon paternleri karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda, hasta grubunda X inaktivasyon sapmasının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur. Bu bulgu, otoimmün hastalıkların gelişiminde X inaktivasyon sapmasının belirleyici bir faktör olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçları, X kromozomu inaktivasyonunun otoimmün hastalıkların etiyolojisindeki rolünün daha karmaşık olduğunu ve bu alanda daha ileri araştırmaların yapılması gerektiğini göstermektedir. Özellikle daha geniş örneklem grupları ve farklı metodolojilerle yapılacak çalışmalar, bu konudaki belirsizlikleri gidermeye yardımcı olabilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnterstisyel Sistit (Ağrılı Mesane Sendromu) mesanede ağrı ile seyreden kronik inflamatuar bir hastalıktır (Cervigni & Natale, 2014). Tanı kriteri Avrupa İntestisyel Sistit Çalışmaları Topluluğu tarafından mesanede 6 aydan uzun süren kronik ağrı bulgularına ek olarak en az bir üriner sendrom eşlik etmesi ile tanımlanmıştır (van de Merwe vd., 2008). Hastalığın ortaya çıkış yaşı ortalama olarak 40'lı yaşlarda olmakla birlikte daha genç yaşlardaki vakalar da rapor edilmiştir (Fall vd., 2010; Koziol, 1994). Hastalar genellikle sık sık ve sıkışık şekilde idrara çıkma, gece idrarının artması şikâyetleri ile başvurmakta ve tanımlanan herhangi bir bakteriyel enfeksiyona rastlanmamaktadır (Kuo, 2014). Hastalığın teşhisinde kullanılan sistoskopik yöntemlerde Hunner lezyonuna rastlanan hastaların oranı %10- 20'sini oluştururken geri kalanlar bu lezyona sahip değildirler (Bschleipfer & Karl, 2022).

Hastalığın etiyopatogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte kronik inflamasyon, enfeksiyon, ürinel disfonksiyon, otoimmünite, genetik gibi multifaktöriyel sebeplerden kaynaklanabileceği ve hastadan hastaya değişiklik gösterebileceği öne sürülmektedir (Grover vd., 2011). Moleküler seviyede incelendiğinde mesanenin iç yüzeyini kaplayan epitel bariyerde glikozaminoglikanların (GAGs) azaldığı ve buna bağlı olarak mesane mukozasında hasarlar meydana gelmeye başladığı bildirilmiştir (Cervigni & Natale, 2014). Üroteliumu (mesane epiteli) oluşturan epitel hücrelerin aralarındaki bağlantıların zayıflaması ile idrardaki toksik içerik alt tabakalara geçmekte ve sitokin üretimi de dahil olmak üzere inflamatuar yanıtları harekete geçirmektedir (Birder & Andersson, 2013). Epidemiyolojik çalışmalar interstisyel sistitin kadınlarda erkeklere göre 5 kat fazla rastlandığını rapor etmiştir (Clemens vd., 2005).

Otoimmün ve otoinflamatuar hastalıkların pek çoğunda kadın:erkek hasta oranının çok yüksek olduğu literatürde daha önce de bildirilmiştir (Angum vd., 2020; Fairweather vd., 2008). Bunun sebepleri olarak hormon farkı (Cutolo vd., 2006), gebelik (Mullinax F, 1993) veya X kromozomu İnaktivasyonundaki sapmalar (Kast, 1977; Stewart, 1998) gösterilmektedir. Bunların arasında hormon farkı ilk göze çarpan etken gibi gözükmekte, ancak çocukluk çağı otoimmün hastalıklarında da kız:erkek çocuğu oranı yüksek olan hastalıkların mevcudiyeti hormonların etkisini ikinci plana almamıza sebep olmaktadır

(Migliore vd., 2021). Gebelik de oldukça kuvvetli bir hipotez olup gebeliğe bağlı bir takım otoimmün hastalıklar (örn: preeklempsi) da bulunmaktadır (Redman & Sargent, 2010). Buna rağmen gebe kalmamış kadınlarda da otoimmün hastalıkların şiddetli görülmesi sonucu bu faktörün de yüzde yüz etkisinin olamayacağı su götürmez bir gerçektir. Üçüncü ve son hipotez ise X kromozomu inaktivasyonunun rolünü düşündürmekte, çünkü iki cinsiyet arasındaki farklardan birini de bu kromozomun sayısı oluşturmaktadır. Kadınlarda bulunan iki X kromozomu immün yanıtla ilgili önemli genlerin ifade edilmesinden sorumludur (Ngo vd., 2014). Bu genler herhangi bir nedenle baskılanır veya aşırı ifade edilirse organizmayı tehdit edecek ciddi sonuçlar doğurabilir (Schurz vd., 2019).

Kadınlardaki X'e bağlı gen dozajını ayarlamak için kromozomlardan bir tanesi inaktif hale gelerek X kromozomu açısından doğal olarak mozaik ifadeye sahip olmasını sağlamaktadır (Lyon, 1961). Her ne kadar X kromozomlarından biri fonksiyonel olarak susturulsa da, yalancı otosomal bölgeler (PARs) olarak adlandırılan kısımlarındaki genler olmak üzere genlerin yaklaşık %15'inin inaktivasyon mekanizmasından kaçtığı bildirilmiştir (Posynick & Brown, 2019). Inaktivasyondan kaçan genler içinde immün cevap oluşturan fonksiyona sahip olanlar da mevcuttur. Bu hipotezin yanı sıra timusda kendi antijenlerinin (self antigen) tanıtılmasındaki bir hata sonucu da otoimmün yanıta sebep olabileceği bilinmektedir (Klein vd., 2000).

X kromozomu inaktivasyon mekanizmasındaki herhangi bir sapma, X'e bağlı kendi antijenlerin timusda ya da perifer bir dokuda sunulmasını engelleyebileceği ve bu mekanizma sonucu kendine karşı toleransın kaybolarak otoimmün reaksiyon gelişebileceği hipotezi oldukça kabul görmüştür (Kyewski & Derbinski, 2004; Laufer vd., 1996).

Çoğu otoimmün hastalıkta kadınların daha fazla etkilenme nedenleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. Mevcut çalışma, X inaktivasyonuna bağlı hormonal olmayan bir mekanizmanın rol oynayabileceği hipotezini ele almaktadır. Hipotez, X inaktivasyonundaki sapmanın otoimmün hastalıklara sahip kadınlarda, sağlıklı kadın kontrol bireylerine göre daha yaygın olacağını öngörmekteydi. Ancak bu durum gözlemlenmedi.

Otoimmün hastalıklarda kadın popülasyonunun erkeklere oranla çok daha yüksek olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak çeşitli hastalıklarda X kromozomu inaktivasyonunun rolünün olduğu gösterilmiştir. Buna örnek olarak kronik otoimmün bir hastalık olan Sistemik sklerozis (SSc) verilebilir. Nitekim yapılan çalışmalarda SSc hastalarında X kromozomu inaktivasyonundan sapma rapor edilmiştir (Ozbalkan vd., 2005) . Aynı zamanda Otoimmün tiroidit (AITD) hastalarıyla yapılan diğer bir çalışmada da kontrollere kıyasla hastalarda yüksek oranda sapma gözlemlenmiştir (Brix vd., 2005).

Otoimmünite ve X kromozomu inaktivasyonu arasında bağlantı olduğunu düşündürebilecek bu kadar çalışma varken kadınlarda rastlanan bazı otoimmün hastalıklarda ise bu durum sağlıklı bireyle hastalar arasında bir fark oluşturmamaktadır. Örneğin Sjögren sendromlu hastalarda herhangi bir sapma gözlemlenmemiştir (Ozcelik, 2008). Aynı şekilde Primer biliyer siroz (PBC) (Miozzo vd., 2007) ve Tip-1 diyabet ile ilgili de herhangi sapma rapor edilmemiştir (Chitnis vd., 2000). Dolayısıyla X kromozomu taşıdığı genler bakımından otoimmünite ile ilişkilendirilse de inaktivasyon paternlerindeki sapma her zaman belirleyici olmaz.

Bu çalışma kapsamında, klinik tanı ve tetkiklerin ardından 70 hasta ve 86 sağlıklı gönüllüden alınan kan örnekleri üzerinde HUMARA testi ile X kromozomu inaktivasyon paternleri incelenmiştir. Hem sağlıklı hem de hasta bireylerin yaşları dengeli olacak şekilde seçilmiştir. Deney sonuçları, iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

Sonuç olarak, interstisyel sistit ve X kromozomu inaktivasyonu arasındaki ilişkinin daha karmaşık ve çok yönlü bir yapıya sahip olduğu, bu çalışmanın bulguları ışığında bir kez daha ortaya konmuştur. Elde edilen veriler, X kromozomu inaktivasyonunun otoimmün hastalıkların gelişiminde tek başına belirleyici bir faktör olmadığını, ancak hastalığın etiyopatogenezi içinde rol oynayan çeşitli mekanizmalarla etkileşim içinde olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, interstisyel sistit gibi karmaşık hastalıkların patogenezinde X kromozomu inaktivasyonunu daha geniş bir bağlamda ele almak ve diğer genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerle birlikte değerlendirmek, hastalığın daha iyi anlaşılmasına ve potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu etkileşimlerin daha detaylı incelenmesine odaklanarak, hastalığın daha etkin tedavi yöntemlerine ulaşılmasına olanak tanıyabilir.

Bitirmeden önce, etkili olacağını düşündüğüm bir öneride bulunmak isterim. Türkçe dilinin zenginliği, bilimsel kavramları ifade ederken yaratıcı ve anlamlı terimler geliştirme imkânı sunmaktadır. Bu bağlamda, genetik literatürün geniş kitleler tarafından daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamak adına, X-kromozomu inaktivasyonunu (XCI) daha anlaşılır ve Türkçe'ye uygun bir şekilde ifade edebilmek için "inaktif X" terimi yerine "suskun X" teriminin kullanılmasını önermekteyim.

"Suskun X" terimi, X-kromozomunun inaktivasyon sürecini ve bu sürecin sonucunda ortaya çıkan fonksiyonel değişiklikleri daha somut ve kavramsal olarak zengin bir şekilde yansıtmaktadır. Dilin gücü, bilimsel kavramları halk tarafından daha kolay benimsenebilir kılmakta saklıdır ve bu tür terimler, karmaşık biyolojik süreçlerin sadeleştirilmesinde önemli bir rol oynar. Özellikle genetik mekanizmaların Türkçeleştirilmesi sürecinde, kullanılan terimlerin hem bilimsel doğruluğunu koruması hem de günlük dilde anlaşılabilir olmasını sağlamak büyük önem taşır. "Suskun X" terimi, XCI'nin biyolojik süreçteki rolünü, X-kromozomunun hangi koşullar altında işlevselliğini kaybettiğini ve bu sürecin otoimmün hastalıklar gibi durumlarda nasıl kritik bir faktör olabileceğini daha etkili bir şekilde ifade edebilir. Bu terim, sadece bilimsel topluluklar için değil, aynı zamanda genetik bilgilere ihtiyaç duyan tüm bireyler için daha erişilebilir ve anlaşılır bir terminoloji yaratma amacını taşımaktadır. "Suskun X", Türkçe'nin bilim diline katkıda bulunarak, bu önemli genetik sürecin daha geniş kitleler tarafından kavranmasına yardımcı olabilir ve böylelikle bilimsel bilgiyi daha kapsayıcı hale getirebilir.

KAYNAKLAR

Ahmadi, H., Duddalwar, V., & Daneshmand, S. (2021). Diagnosis and Staging of Bladder Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *35*(3), 531-541. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.02.004

Akiyama, Y., Luo, Y., Hanno, P. M., Maeda, D., & Homma, Y. (2020). Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: The evolving landscape, animal models and future perspectives. *International Journal of Urology*, *27*(6), 491-503. https://doi.org/10.1111/iju.14229

Anderson, D. J., Zhou, J., Cao, D., McDonald, M., Guenther, M., Hasoon, J., Viswanath, O., Kaye, A. D., & Urits, I. (2022). Ketamine-Induced Cystitis: A Comprehensive Review of the Urologic Effects of This Psychoactive Drug. *Health Psychology Research*, *10*(3). https://doi.org/10.52965/001c.38247

Angum, F., Khan, T., Kaler, J., Siddiqui, L., & Hussain, A. (2020). The Prevalence of Autoimmune Disorders in Women: A Narrative Review. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.8094

Bade, J., Ishizuka, O., & Yoshida, M. (2003). Future research needs for the definition/diagnosis of interstitial cystitis. *International Journal of Urology*, *10*(s1). https://doi.org/10.1046/j.1442-2042.10.s1.9.x

Barr, M. L., & Bertram, E. G. (1949). A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. *Nature*, *163*(4148), 676-677. https://doi.org/10.1038/163676a0

Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., & DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(2), 705-708. https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.705

Birder, L., & Andersson, K.-E. (2013). Urothelial Signaling. *Physiological Reviews*, *93*(2), 653-680. https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2012

Brix, T. H., Knudsen, G. P. S., Kristiansen, M., Kyvik, K. O., Orstavik, K. H., & Hegedüs, L. (2005). High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to

thyroid autoimmunity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *90*(11), 5949-5953. https://doi.org/10.1210/jc.2005-1366

Brooks, W. H. (2010). X Chromosome Inactivation and Autoimmunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *39*(1), 20-29. https://doi.org/10.1007/s12016-009-8167-5

Bschleipfer, T., & Karl, I. (2022). Bladder Microbiome in the Context of Urological Disorders—Is There a Biomarker Potential for Interstitial Cystitis? *Diagnostics*, *12*(2), 281. https://doi.org/10.3390/diagnostics12020281

Cervigni, M., & Natale, F. (2014). Gynecological disorders in bladder pain syndrome/interstitial cystitis patients. *International Journal of Urology*, *21*(S1), 85-88. https://doi.org/10.1111/iju.12379

Chabchoub, G., Uz, E., Maalej, A., Mustafa, C. A., Rebai, A., Mnif, M., Bahloul, Z., Farid, N. R., Ozcelik, T., & Ayadi, H. (2009). Analysis of skewed X-chromosome inactivation in females with rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. *Arthritis research & therapy*, *11*(4), R106. https://doi.org/10.1186/ar2759

Chapman, A. G., Cotton, A. M., Kelsey, A. D., & Brown, C. J. (2014). Differentially methylated CpG island within human XIST mediates alternative P2 transcription and YY1 binding. *BMC Genetics*, *15*(1), 89. https://doi.org/10.1186/s12863-014-0089-4

Chitnis, S., Monteiro, J., Glass, D., Apatoff, B., Salmon, J., Concannon, P., & Gregersen, P. K. (2000). The role of X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Arthritis Research & Therapy*, *2*(5), 399. https://doi.org/10.1186/ar118

Clemens, J. Q., Meenan, R. T., Rosetti, M. C. O., Brown, S. O., Gao, S. Y., & Calhoun, E. A. (2005). PREVALENCE OF INTERSTITIAL CYSTITIS SYMPTOMS IN A MANAGED CARE POPULATION. *Journal of Urology*, *174*(2), 576-580. https://doi.org/10.1097/01.ju.0000165170.43617.be

Costantini, E., Lazzeri, M., & Porena, M. (2013). GAGs and GAGs Diseases: When Pathophysiology Supports the Clinic. *Urologia Journal*, *80*(3), 173-178. https://doi.org/10.5301/RU.2013.11500

Cutolo, M., Capellino, S., Sulli, A., Serioli, B., Secchi, M. E., Villaggio, B., & Straub, R. H. (2006). Estrogens and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1089*(1), 538-547. https://doi.org/10.1196/annals.1386.043

Esko, J. D., Kimata, K., & Lindahl, U. (2009). *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*.

Fairweather, D., Frisancho-Kiss, S., & Rose, N. R. (2008). Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology*, *173*(3), 600-609. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071008

Fall, M., Baranowski, A. P., Elneil, S., Engeler, D., Hughes, J., Messelink, E. J., Oberpenning, F., & de C. Williams, A. C. (2010). EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain. *European Urology*, *57*(1), 35-48. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.08.020

Gamper, M., Viereck, V., Eberhard, J., Binder, J., Moll, C., Welter, J., & Moser, R. (2013). Local immune response in bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C. *International Urogynecology Journal*, *24*(12), 2049-2057. https://doi.org/10.1007/s00192-013-2112-0

Ge, L., Pan, B., Song, F., Ma, J., Zeraatkar, D., Zhou, J., & Tian, J. (2017). Comparing the diagnostic accuracy of five common tumour biomarkers and CA19-9 for pancreatic cancer: a protocol for a network meta-analysis of diagnostic test accuracy. *BMJ Open*, *7*(12), e018175. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018175

Giorgetti, L., Lajoie, B. R., Carter, A. C., Attia, M., Zhan, Y., Xu, J., Chen, C. J., Kaplan, N., Chang, H. Y., Heard, E., & Dekker, J. (2016). Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature*, *535*(7613), 575-579. https://doi.org/10.1038/nature18589

Grover, S., Srivastava, A., Lee, R., Tewari, A. K., & Te, A. E. (2011). Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Therapeutic Advances in Urology*, *3*(1), 19-33. https://doi.org/10.1177/1756287211398255

Hanno, P. M., Erickson, D., Moldwin, R., & Faraday, M. M. (2015). Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: AUA Guideline Amendment. *Journal of Urology*, *193*(5), 1545-1553. https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.01.086

Hengartner, H., Odermat, B., Schneider, R., Schreyer, M., Wälle, G., MacDonald, H. R., & Zinkernagel, R. M. (1988). Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature*, *336*(6197), 388-390. https://doi.org/10.1038/336388a0

Homma, Y., Ueda, T., Tomoe, H., Lin, A. T., Kuo, H., Lee, M., Oh, S., Kim, J. C., & Lee, K. (2016). Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015. *International Journal of Urology*, *23*(7), 542-549. https://doi.org/10.1111/iju.13118

Hurst, R. E., Moldwin, R. M., & Mulholland, S. G. (2007). Bladder Defense Molecules, Urothelial Differentiation, Urinary Biomarkers, and Interstitial Cystitis. *Urology*, *69*(4), S17-S23. https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.03.083

Jacobson, E. C., Pandya-Jones, A., & Plath, K. (2022). A lifelong duty: how Xist maintains the inactive X chromosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, *75*, 101927. https://doi.org/10.1016/j.gde.2022.101927

Jhang, J.-F., & Kuo, H.-C. (2016). Pathomechanism of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome and Mapping the Heterogeneity of Disease. *International Neurourology Journal*, *20*(Suppl 2), S95-104. https://doi.org/10.5213/inj.1632712.356

Jiang, Y.-H., Jhang, J.-F., & Kuo, H.-C. (2022). Can We Use Urinary Cytokine/Chemokine Analysis in Discriminating Ulcer-Type Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome? *Diagnostics*, *12*(5), 1093. https://doi.org/10.3390/diagnostics12051093

Kast, R. E. (1977). Predominance of autoimmune and rheumatic diseases in females. *The Journal of rheumatology*, *4*(3), 288-292.

Keay, S. (2008). Cell signaling in interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Cellular Signalling*, *20*(12), 2174-2179. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.004

Klein, L., Klugmann, M., Nave, K.-A., Tuohy, V. K., & Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nature Medicine*, *6*(1), 56-61. https://doi.org/10.1038/71540

Koçak, T., Acar, Ö., Tarhan, F., Tefik, T., Oktar, T. M., & Tarcan, T. (2020). Bladder Pain Syndrome (Interstitial Cystitis) Consensus 2019: The Report of the Turkish Continence Society Bladder Pain Syndrome/ Interstitial Cystitis Working Group. *Journal of Urological Surgery*, *7*(4), 251-262. https://doi.org/10.4274/jus.galenos.2020.0006

Koziol, J. A. (1994). Epidemiology of interstitial cystitis. *The Urologic clinics of North America*, *21*(1), 7-20.

Kuo, H. (2014). Potential urine and serum biomarkers for patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *International Journal of Urology*, *21*(S1), 34-41. https://doi.org/10.1111/iju.12311

Kyewski, B., & Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature Reviews Immunology*, *4*(9), 688-698. https://doi.org/10.1038/nri1436

Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., & Glimcher, L. H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*, *383*(6595), 81-85. https://doi.org/10.1038/383081a0

Lee, J., Doggweiler-Wiygul, R., Kim, S., Hill, B. D., & Yoo, T. J. (2006). Is interstitial cystitis an allergic disorder?: A case of interstitial cystitis treated successfully with anti-IgE. *International Journal of Urology*, *13*(5), 631-634. https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2006.01373.x

Lee, K. H., Ahn, B. S., Cha, D., Jang, W. W., Choi, E., Park, S., Park, J. H., Oh, J., Jung, D. E., Park, H., Park, J. H., Suh, Y., Jin, D., Lee, S., Jang, Y.-H., Yoon, T., Park, M.-K., Seong, Y., Pyo, J., … Kronbichler, A. (2020). Understanding the immunopathogenesis of autoimmune diseases by animal studies using gene modulation: A comprehensive review. *Autoimmunity reviews*, *19*(3), 102469. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102469

Lyon, M. F. (1961). Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (Mus musculus L.). *Nature*, *190*(4773), 372-373. https://doi.org/10.1038/190372a0

Malde, S., Palmisani, S., Al-Kaisy, A., & Sahai, A. (2018). Guideline of guidelines: bladder pain syndrome. *BJU International*, *122*(5), 729-743. https://doi.org/10.1111/bju.14399

McCarthy, T. C., & McDermaid, S. L. (1990). Cystoscopy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *20*(5), 1315-1339. https://doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50307-1

Meyer, W. J., Migeon, B. R., & Migeon, C. J. (1975). Locus on human X chromosome for dihydrotestosterone receptor and androgen insensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(4), 1469-1472. https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1469

Migliore, L., Nicolì, V., & Stoccoro, A. (2021). Gender Specific Differences in Disease Susceptibility: The Role of Epigenetics. *Biomedicines*, *9*(6), 652. https://doi.org/10.3390/biomedicines9060652

Miozzo, M., Selmi, C., Gentilin, B., Grati, F. R., Sirchia, S., Oertelt, S., Zuin, M., Gershwin, M. E., Podda, M., & Invernizzi, P. (2007). Preferential X chromosome loss but random inactivation characterize primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *46*(2), 456-462. https://doi.org/10.1002/hep.21696

Mullinax F. (1993). Chimerism and autoimmunity. Içinde Feng PH, Boey ML, Chang HH, Fong KY, Howe HS, & Leong KH (Ed.), *4th ASEAN Congress of Rheumatology* (ss. 39-40). 4th ASEAN Congress of Rheumatology.

Nepom, G. T., & Erlich, H. (1991). MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annual review of immunology*, *9*, 493-525. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.09.040191.002425

Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, *35*(3), 347-369. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004

Ozbalkan, Z., Bagişlar, S., Kiraz, S., Akyerli, C. B., Ozer, H. T. E., Yavuz, S., Birlik, A. M., Calgüneri, M., & Ozçelik, T. (2005). Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma. *Arthritis and rheumatism*, *52*(5), 1564-1570. https://doi.org/10.1002/art.21026

Ozcelik, T. (2008). X chromosome inactivation and female predisposition to autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*, *34*(3), 348-351. https://doi.org/10.1007/s12016-007-8051-0

Ozcelik, T., Uz, E., Akyerli, C. B., Bagislar, S., Mustafa, C. A., Gursoy, A., Akarsu, N., Toruner, G., Kamel, N., & Gullu, S. (2006). Evidence from autoimmune thyroiditis of skewed X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *European Journal of Human Genetics*, *14*(6), 791-797. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201614

Panel, P., Huchon, C., Estrade-Huchon, S., Le Tohic, A., Fritel, X., & Fauconnier, A. (2016). Bladder symptoms and urodynamic observations of patients with endometriosis confirmed by laparoscopy. *International Urogynecology Journal*, *27*(3), 445-451. https://doi.org/10.1007/s00192-015-2848-9

Posynick, B. J., & Brown, C. J. (2019). Escape From X-Chromosome Inactivation: An Evolutionary Perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00241

Pyfrom, S., Paneru, B., Knox, J. J., Cancro, M. P., Posso, S., Buckner, J. H., & Anguera, M. C. (2021). The dynamic epigenetic regulation of the inactive X chromosome in healthy human B cells is dysregulated in lupus patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(24). https://doi.org/10.1073/pnas.2024624118

Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2010). Immunology of pre-eclampsia. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *63*(6), 534-543. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x

Ross, M. T., Grafham, D. V, Coffey, A. J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G. R., Burrows, C., Bird, C. P., Frankish, A., Lovell, F. L., Howe, K. L., Ashurst, J. L., Fulton, R. S., Sudbrak, R., Wen, G., Jones, M. C., Hurles, M. E., … Bentley, D. R. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, *434*(7031), 325-337. https://doi.org/10.1038/nature03440

Salguero, G., Daenthanasanmak, A., Münz, C., Raykova, A., Guzmán, C. A., Riese, P., Figueiredo, C., Länger, F., Schneider, A., Macke, L., Sundarasetty, B. S., Witte, T., Ganser, A., & Stripecke, R. (2014). Dendritic Cell–Mediated Immune Humanization of Mice: Implications for Allogeneic and Xenogeneic Stem Cell Transplantation. *The Journal of Immunology*, *192*(10), 4636-4647. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302887

Sarıkaya, K., Şenocak, Ç., İbiş, M. A., Sadioğlu, F. E., Çiftçi, M., & Bozkurt, Ö. F. (2022). Effectiveness of hydrodistention procedure under local anesthesia in the treatment of bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Journal of Health Sciences and Medicine*, *5*(2), 357-362. https://doi.org/10.32322/jhsm.1032338

Schurz, H., Salie, M., Tromp, G., Hoal, E. G., Kinnear, C. J., & Möller, M. (2019). The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. *Human Genomics*, *13*(1), 2. https://doi.org/10.1186/s40246-018-0185-z

Selmi, C., Brunetta, E., Raimondo, M. G., & Meroni, P. L. (2012). The X chromosome and the sex ratio of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, *11*(6-7), A531-A537. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.024

Shirafkan, F., Hensel, L., & Rattay, K. (2024). Immune tolerance and the prevention of autoimmune diseases essentially depend on thymic tissue homeostasis. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1339714

Sinha, A. A., Lopez, M. T., & McDevitt, H. O. (1990). Autoimmune Diseases: The Failure of Self Tolerance. *Science*, *248*(4961), 1380-1388. https://doi.org/10.1126/science.1972595

Speer, L. M., Mushkbar, S., & Erbele, T. (2016). Chronic Pelvic Pain in Women. *American family physician*, *93*(5), 380-387.

Stewart, J. J. (1998). The female X-inactivation mosaic in systemic lupus erythematosus. *Immunology Today*, *19*(8), 352-357. https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01298-5

Suguna Sajja, Nandal D H, Kamble Suresh, Bharatha Ambadasu, & Kunkulol Rahul. (2014). GENOMIC DNA ISOLATION FROM HUMAN WHOLE BLOOD SAMPLES BY NON ENZYMATIC SALTING OUT METHOD. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(6).

Taner Koçak, Ömer Acar, Fatih Tarhan, Tzevat Tefik, Tayfun Oktar, & Tufan Tarcan. (2019, Ekim). Mesane Ağrısı Sendromu (İnterstisyel Sistit) Uzlaşı Metni. *Kontinans Derneği*, 19-19. https://kontinansdernegi.org/wp-content/uploads/2021/12/IC-MAS.pdf

Uz, E., Loubiere, L. S., Gadi, V. K., Ozbalkan, Z., Stewart, J., Nelson, J. L., & Ozcelik, T. (2008). Skewed X-Chromosome Inactivation in Scleroderma. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *34*(3), 352-355. https://doi.org/10.1007/s12016-007-8044-z

van de Merwe, J. P. (2007). Interstitial cystitis and systemic autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice Urology*, *4*(9), 484-491. https://doi.org/10.1038/ncpuro0874

van de Merwe, J. P., Nordling, J., Bouchelouche, P., Bouchelouche, K., Cervigni, M., Daha, L. K., Elneil, S., Fall, M., Hohlbrugger, G., Irwin, P., Mortensen, S., van Ophoven, A., Osborne, J. L., Peeker, R., Richter, B., Riedl, C., Sairanen, J., Tinzl, M., & Wyndaele, J.-J. (2008). Diagnostic Criteria, Classification, and Nomenclature for Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis: An ESSIC Proposal. *European Urology*, *53*(1), 60-67. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.09.019

Wainer Katsir, K., & Linial, M. (2019). Human genes escaping X-inactivation revealed by single cell expression data. *BMC Genomics*, *20*(1), 201. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5507-6

Wennevik, G. E., Meijlink, J. M., Hanno, P., & Nordling, J. (2016). The Role of Glomerulations in Bladder Pain Syndrome: A Review. *Journal of Urology*, *195*(1), 19-25. https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.112

Whitmore, K. E., Fall, M., Sengiku, A., Tomoe, H., Logadottir, Y., & Kim, Y. H. (2019). Hunner lesion versus non-Hunner lesion interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *International Journal of Urology*, *26*(S1), 26-34. https://doi.org/10.1111/iju.13971

EKLER

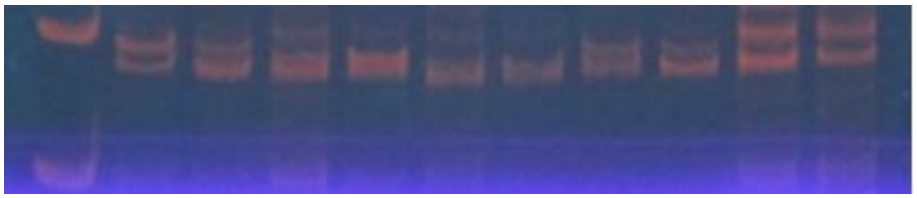
Hem hasta hem de sağlıklı kontrol örneklerine ait tüm PAGE jel görüntüleme sonuçları **Şekil Ek-1** ile **Şekil Ek-44** arasında aşağıdaki gibidir. Her örnekten önce 100 bp veya 50 bp aralığındaki markörlerden biri yüklenmiştir. Ardından her örnek için sırasıyla önce Uncut (U) ardından Cut (C) PCR ürünü yüklenmiştir. Örnekler ‘’**MATERYAL VE YÖNTEM**’’ başlığı altında belirtildiği üzere Image J programıyla bant yoğunlukları ölçülüp yine başlık altında belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.



Şekil Ek- 1. Örnekler 230220, 230230,230261.



Şekil Ek- 2. Örnekler 230220, 230233, 230238, 230239, 230243.



Şekil Ek- 3. Örnekler 230259, 230260, 230266, 230270, 230294.



Şekil Ek- 4. Örnekler 230220, 230233, 230238, 230243, 230260.



Şekil Ek- 5. Örnekler 230266, 230284, 230293, 230295, 230247.



Şekil Ek- 6. Örnekler 230250, 230276, 230280, 230281, 230214.



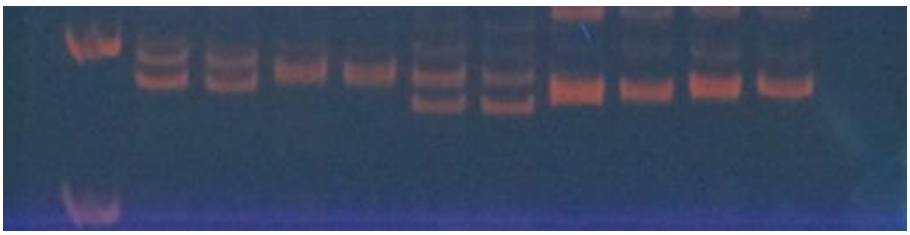
Şekil Ek- 7. Örnekler 230217, 230268, 230300, 230225, 230291.



Şekil Ek- 8. Örnekler 230228, 230232, 230237, 230244.



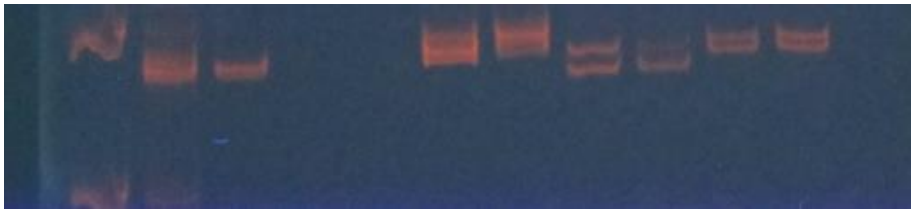
Şekil Ek- 9. Örnekler 230231, 230249, 230265, 230275, 230213.



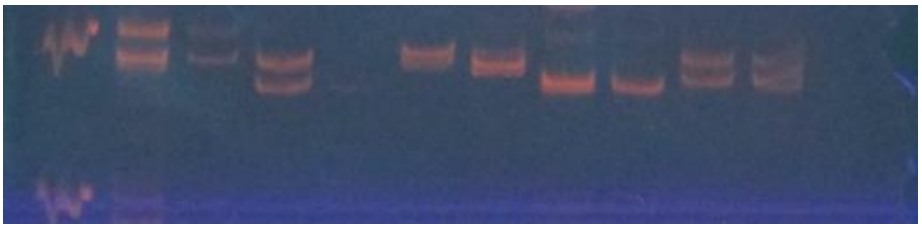
Şekil Ek- 10. Örnekler 230413, 230411, 230408, 230366, 230359.



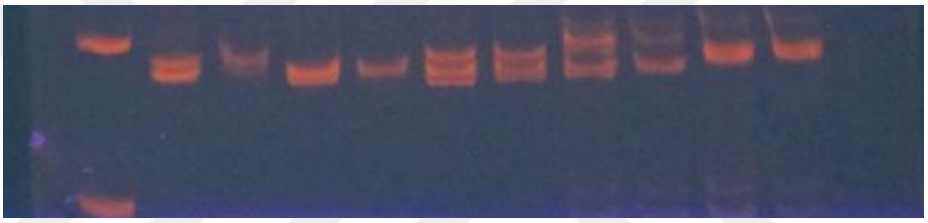
Şekil Ek- 11. Örnekler 230406, 230376, 230373, 230372, 230354.



Şekil Ek- 12. Örnekler 230228, 230215, 230232, 230237, 230244.



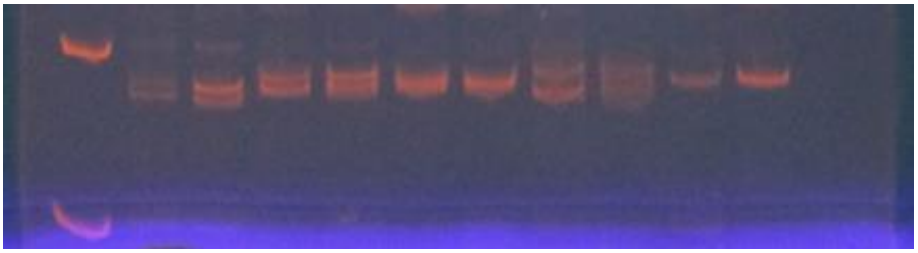
Şekil Ek- 13. Örnekler 230231, 230249, 230275, 230213, 230226.



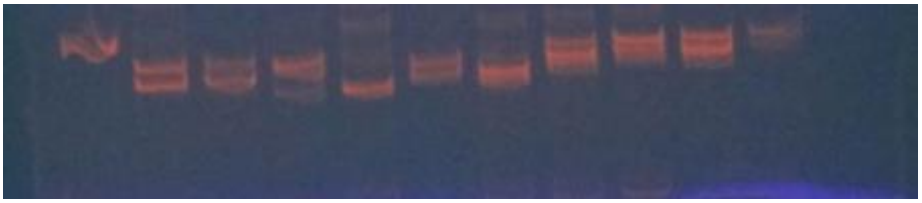
Şekil Ek- 14. Örnekler 230373, 230372, 230354, 230250, 230276.



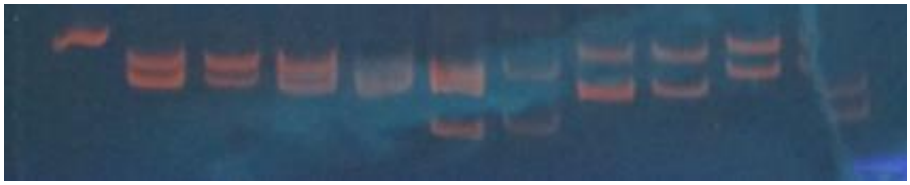
Şekil Ek- 15. Örnekler 230280, 230281, 230291, 230217, 230268.



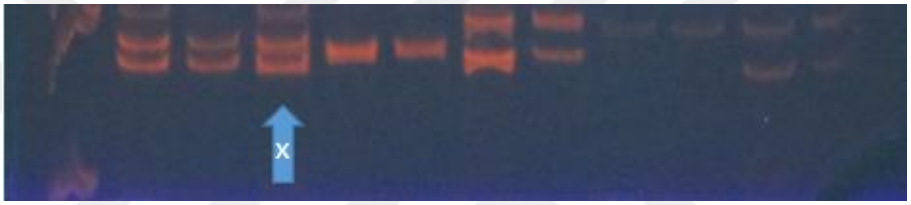
Şekil Ek- 16. Örnekler 230266, 230293, 230295, 230233, 230238.



Şekil Ek- 17. Örnekler 230239, 230243, 230217, 230280, 230373.



Şekil Ek- 18. Örnekler 230221, 230222, 230223, 230224, 230229.



Şekil Ek- 19. Örnekler 230257, 230269, 230278, 230292, 230298.



Şekil Ek- 20. Örnekler 230214, 230215, 230248, 230249, 230261.



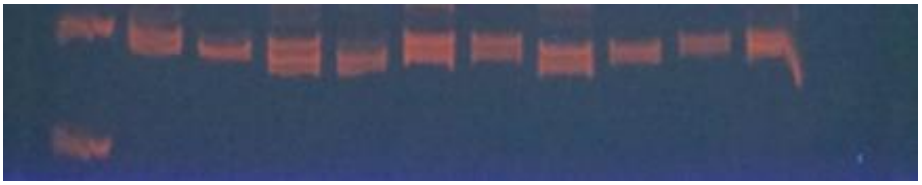
Şekil Ek- 21. Örnekler 230370, 230371, 230415, 230417, 230427.



Şekil Ek- 22. Örnekler markörden sonra 3,4. Kuyucuk 230292, 7,8. Kuyucuk 230298.



Şekil Ek- 23. Örnekler 230301, 230311, 230314, 230319, 230320.



Şekil Ek- 24. Örnekler 230360, 230361, 230362, 230363, 230368.



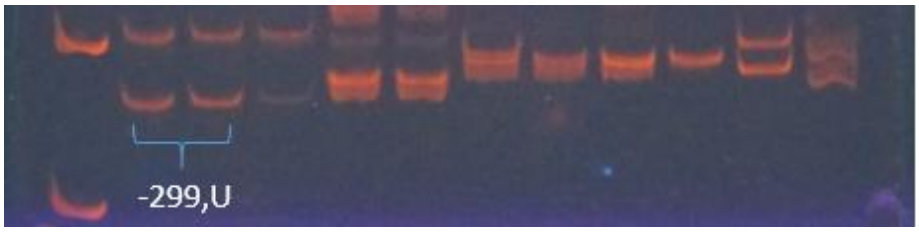
Şekil Ek- 25. Örnekler 230297, 230303, 230310, 230312, 230317.



Şekil Ek- 26. 230318, 230321, 230355, 230357, 230420.



Şekil Ek- 27. Örnekler 230219, 230241, 230272, 230282, 230283.



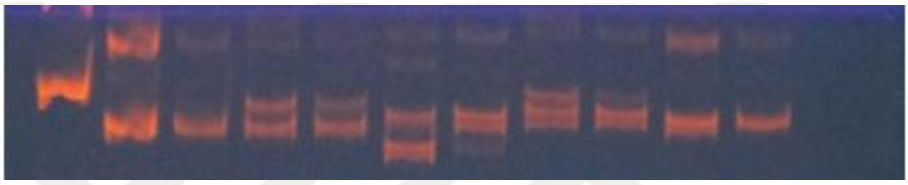
Şekil Ek- 28. Örnekler 230299, 230313, 230316, 230358, 230364.



Şekil Ek- 29. Örnekler 230263, 230264, 230267, 230273, 230274.



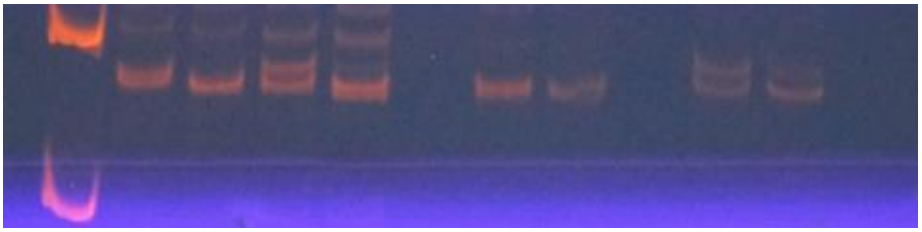
Şekil Ek- 30. Örnekler 230305, 230315, 230365, 230367, 230405.



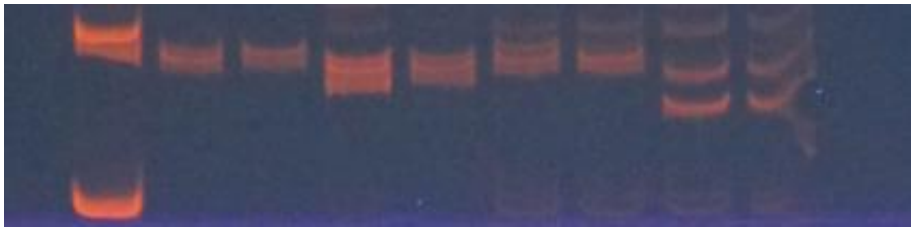
Şekil Ek- 31. Örnekler 230407, 230409, 230410, 230412, 230418.



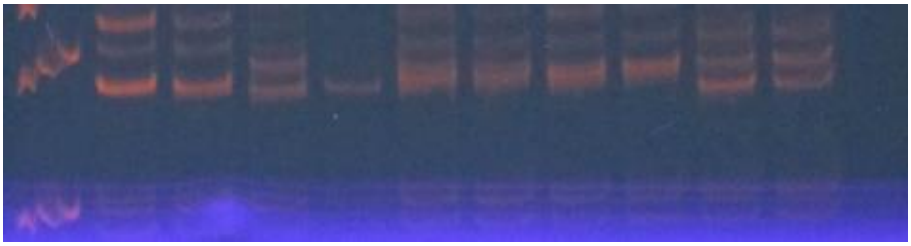
Şekil Ek- 32. Örnekler 230302, 230307, 230322, 230356, 230358.



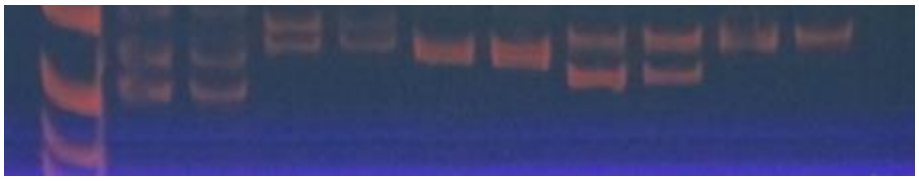
Şekil Ek- 33. Örnekler 230404, 230419, 230414, 230416.



Şekil Ek- 34. Örnekler 230303, 230311, 230426, 240001.



Şekil Ek- 35. Örnekler 240002, 240003, 240004, 240005, 240006.



Şekil Ek- 36. Örnekler 240001 230416, 230214, 230224, 230303.



Şekil Ek- 37. Örnekler 230403, 230228, 230249, 230226, 230417.



Şekil Ek- 38. Örnekler 240022, 240024, 240025, 240064, 240065.



Şekil Ek- 39. Örnekler 230242, 230256, 230296, 230285, 230262.



Şekil Ek- 40. Örnekler 230258, 230290, 230279, 230271, 230414.



Şekil Ek- 41. Örnekler 230216, 230218, 230225, 230227, 230229.



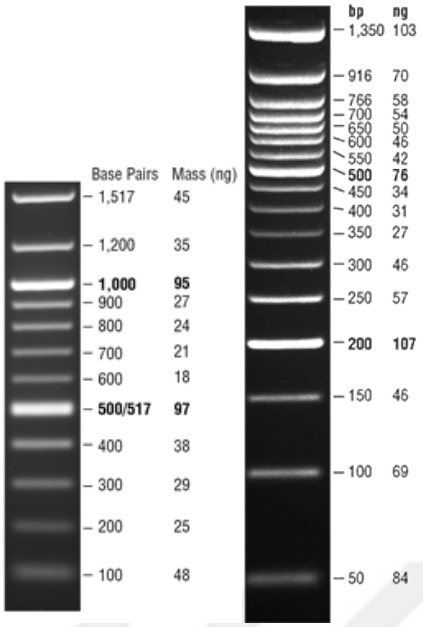
Şekil Ek- 42. Örnekler 230234, 230235, 230236, 230240, 230245.



Şekil Ek- 43. Örnekler 230248, 230427, 240007, 230266, 230300.



Şekil Ek- 44. Örnekler 230306, 230255, 230246, 230247, 230403.



Şekil Ek- 45. DNA Ladder. Referans olarak kullanılan sırasıyla 100 bp ve 50 bp aralıklarındaki DNA markörleri.