



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**İNERSTİSYEL SİSTİT ETİYOLOJİSİNDE
MİKROBİYOLOJİK ARAŞTIRMANIN YERİ**

Dr. Tahsin Batuhan AYDOĞAN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA-2017



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**İNERSTİSYEL SİSTİT ETİYOLOJİSİNDE
MİKROBİYOLOJİK ARAŞTIRMANIN YERİ**

Dr. Tahsin Batuhan AYDOĞAN

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali ERGEN

ANKARA-2017

TEŞEKKÜR

5 yıllık uzmanlık eğitimim süresince tüm bilgi ve tecrübelerini hiç esirgmeden akademik, bilime ve kanıta dayalı düzeyde bana sunmuş ve meslek hayatımda her zaman örnek almaktan gurur duyacağım tüm saygıdeğer Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı hocalarıma teşekkürlerimi saygılarımla sunarım.

Tez çalışmam boyunca benden desteğini, akademik bilgisini ve katkılarını eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. Ali ERGEN'e hoşgörü ve sabrı için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince desteklerini esirgmeden sunmuş olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr.Özgen ESER, Prof. Dr.Burçin ŞENER, ve Doç. Dr. Alpaslan ALP hocalarıma ve Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur GÜRPINAR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmış olduğum tüm Üroloji Anabilim Dalı ailesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde çalışmakta olan araştırma görevlisi meslektaşlarım, mesai arkadaşlarıma ve tüm sağlık çalışanlarına sonsuz teşekkürler.

Hayatıma hep yön vermiş, hep örnek almış olduğum en değerli varlıklarım başta beni var eden annem Uzm.Dr.Bilge AYDOĞAN ve ablam Op.Dr.Begüm AYDOĞAN MATHYK ile tüm aileme, bana mezuniyet öncesi ve sonrası eğitim hayatım boyunca varlıklarıyla desteklerinden ötürü sonsuz sevgiler ve teşekkürler...

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Dr.Tahsin Batuhan AYDOĞAN

ÖZET

Tahsin Batuhan AYDOĞAN, İnterstisyel Sistit Hastalığında Mikrobiyolojik Araştırmanın Yeri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2017.

İnterstisyel sistit / Mesane Ağrı Sendromu (İS/MAS), etiyojisinde birçok faktörün suçlandığı ancak enfeksiyöz ajanların yerlerinin halen net olarak gösterilemediği bir tablodur. Kadınlarda erkeklere göre 4-5 kat daha sık görülen genellikle 6 haftadan uzun süreli üretral/pelvik ağrı ile irritatif işeme semptomlarının (ani işeme hissi, işeme sıklığında artış, noktüri, dizüri) ve rutin idrar kültürlerinde alta yatan herhangi bir üriner sistem enfeksiyonunun gösterilemediği bu tablo ile her yıl milyonlarca hasta kliniğe başvurmakta, tedavisi zor olan bu süreçte farklı tedavi modaliteleri denenmekte ve ciddi tedavi harcamaları yapılmaktadır. Rutin kültür dışı mikrobiyolojik çalışmaların geliştirilmesiyle etiyojide olası mikroorganizmaların gösterilebilmesi tedavi maliyetlerini azaltarak etkin antimikrobiyal tedaviler ile hastaların psikososyal yaşantıları üzerinde ciddi düzelme sağlayacaktır.

Etik kurul onayından sonra Nisan 2017-Eylül 2017 tarihleri arasında kontrollü prospektif olarak yürütülen çalışmaya 25'i kadın 1'i erkek 26 İS/MAS hastası ve 20 kadın kontrol grubu dahil edildi. Hastalardan ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alındı. Hasta grubunun ortalama yaşı 45,5 kontrol grubunun ortalama yaşı 36,5 olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0.5$). İS/MAS semptomlarına yönelik önceden almış oldukları oral veya intrakaviter tedavilerden bağımsız halen semptomatik olan bireyler çalışmaya dahil edilirken hastaların son 30 gün içerisindeki noktüri, ani sıkışma, sıklık ve ağrı şikayetlerini değerlendirmek amacıyla "*O'Leary Sant Symptom and Problem Index*" skorlaması doldurulmuştur. İS/MAS tanısı olan 26 hastadan ilk muayenelerinde rutin idrar aerob kültür, idrar mantar kültürü ve idrar tüberküloz kültürü için orta akım idrar örnekleri alınarak uygun şekilde gönderildi. Orta akım idrar kültürlerinde üreme görülmeyen hasta grubundan ikinci muayenelerinde steril şartlarda üretral kateter ile yeterli miktarda idrar örneği alınmasını takiben semptomatik hastalara rutinde hastalığın takibinde yer alan sistoskopi işlemi lokal veya genel anestezi altında yapıldı. L-form bakteri varlığı araştırılması ve Rt-PCR ile cinsel yolla bulaşan hastalık ajanlarının araştırılması için idrar ve sistoskopide şüpheli alanlardan mesane biyopsi örnekleri toplandı. 26 hastanın 24'ünden biyopsi örneği alındı. Kontrol grubundaki 20 hastadan steril orta akım idrar örneği alındı. Hasta grubundan alınan idrar ve doku örneklerinin rutin idrar kültüründe yer

alan %5 koyun kanlı agar ve EMB agar da üreme olmaması halinde maya varlığının dışlanması için GYPA ve SDA besiyerlerine ekimleri yapılarak, L-form mikroorganizma varlığının araştırılması için LEM ve PG sıvı besiyerlerine de ekim yapılmıştır.

PG besiyerindeki idrar ve doku klinik örnekleri, 35-37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası 2. günde bulanıklık görülmesi halinde kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Hastalardan alınmış olan PG besiyerindeki tüm idrar ve doku örnekleri 10.gün kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekildi. Üreme görülen örneklerin kanlı agar, GYPA, EMB, LEM besiyerlerine 2. ve 10. gün yapılan ekimlerinde aynı mikroorganizmalara ait üremeler rapor edildi. Bu üremelerin 9'unda(%60) *P.aeruginosa* 10⁵ cfu/ml (1 hastada *C.mucifaciens*, 1 hastada ise *E.faecalis* birlikteliğinde), 1(%7) hastada *P.fluorescens* 10⁵ cfu/ml, 2(%13) hastada *K.pneumonia* 10⁵ cfu/ml, 2(%13) hastada *C.mucifaciens* 10⁵ cfu/ml ve 1(%7) hastada ise *E.faecalis* 10⁵ cfu/ml üremeleri tanımlandı. Doku ve/veya idrar örneklerinde üreme saptanan 13 hastanın 1'inde (*P.aeruginosa* ve *E.faecium* üremesi olan) idrar Rt-PCR incelemesinde *U.parvum* tespit edildi. Hasta ve kontrol grubu idrar Rt-PCR'ında 20 kontrolün 11'inde etken tespit edilirken 9 kişide tespit edilmemiştir. Hasta idrar örneklerinin ise 5'inde etken tespit edilirken 21 örnekte etken saptanmamıştır. Hasta ve kontrol idrar Rt-PCR sonucunda etken tespit edilip edilmemesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.01). 1.-2.-10. gün ekimlerinde üreme görülen örneklerde patojen olarak kabul edilen mikroorganizmaların PG besiyerinde yeniden üretildikten sonra 0,2µm por aralığına sahip minipor filtrelerden geçirilerek L-form tespiti için kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine yeniden yapılan ekimlerinde herhangi üreme tespit edilemedi. Ancak rutin kültürde ürememe olmaması nedenli L-form varlığı halen dışlanamamaktadır. Sistoskopi bulguları ve kültür sonuçları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen kültür sonuçları ile İS/MAS hastalığı etiolojisinde mikrobiyolojik araştırmaların artırılması, daha spesifik kültür yöntemlerinin hastalığa özgün inkübasyon ve ekim süreleriyle standardize edilmesinin önemi gösterilmiştir. Geniş hasta popülasyonu içeren randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: İnterstisyel sistit, ağrılı mesane, L-form, idrar kültürü

Destekleyen Kuruluşlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje No: TTU-2017-13216

ABSTRACT

Tahsin Batuhan AYDOĞAN, The role of microbiological investigation in the etiology of Interstitial Cystitis, Hacettepe University School of Medicine, Thesis in Urology, Ankara,2017.

Interstitial cystitis / Bladder Pain Syndrome (IC/BPS) is a complex clinical condition and its etiology is not well understood yet, considering many etiological factors including lower urinary tract infections. Patients who has irritative lower urinary tract symptoms (urgency, frequency, nocturia, disuria) with urethral/pelvic pain for more than 6 weeks. The prevalence of IC/BPS is 4-5 times more common in women than men. The economic burden of IC/BPS is undeniable and millions of people admit to outpatient clinics for treatment of this condition. The new microbiologic diagnostic tools are promising in the diagnosis of IC/BPS. Special urine cultures with higher sensitivity to detect a pathogen may decrease the treatment costs and increase psychosocial health of the patients.

This prospective clinical study was performed on 26 IS/BPS patients (25 female 1 male) and 20 controls after the approval of ethics committee between April 2017 and September 2017 . Informed consent was obtained from patients and control subjects. The mean age of the IC/BPS patients was 45,5 years and was 36,5 in the control group ($p<0.05$). Regardless of the previous treatments either oral or intravesical, patients who are still symptomatic and complaining of nocturia, urgency, frequency and pain during the last 30 day were evaluated with “*O’Leary Sant Symptom and Problem Index*” scoring. The study group (n:26) were asked to give sterile mid stream urine sample for routine urine culture, urine yeast culture and urine tuberculosis culture. Followed by the results, symptomatic 26 patients were asked to be evaluated with a cystoscopy under local or general anesthesia. Biopsies has been taken from the suspicious mucosal lesions in the bladder. 24 of 26 patients had a suspicious cystoscopy findings which required for biopsy. Urine and biopsy samples were investigated for both L-forms in cultures and for sexually transmitted disease pathogens in Rt-PCR . Meanwhile 20 mid stream sterile urine samples were collected from the control group without any bladder biopsy. The urine and biopsy samples were inoculated into %5 sheep blood agar and EMB agar urine culture mediums. Also samples were inoculated to GYP and SDA for investigational purposes of any yeast colonies existence. LEM and PG liquid mediums were used to investigate L-form microorganisms.

At the end of 24 hour incubation of urine and biopsy samples in the PG medium under 35-37 °C in case of any blurring was seen on the 2th day, inoculation to blood, EMB, LEM and GYPA mediums were performed. All urine and biopsy samples of patients in the PG medium were re-inoculated to blood, EMB, LEM and GYPA at the day 10. The same microorganisms were reported after inoculation to blood, GYPA, EMB and LEM at the day 2 and 10. A total number of 13 patients with positive culture results: 9(60%) of the samples with *P.aeruginosa* 10⁵ cfu/ml (one with *C.mucifaciens*, one another with *E.faecalis* co-existence), 2(13%) of the samples with *K.pneumonia* 10⁵ cfu/ml, 2(13%) of the samples with *C.mucifaciens* 10⁵ cfu/ml and 1(7%) sample with *E.faecalis* 10⁵ cfu/ml were reported. *U.parvum* was detected on the Rt-PCR result of one patient with a positive culture of *P.aeruginosa* ve *E.faecium* co-existence. 11 of 20 controls and 5 of 26 patient urine samples had positive Rt-PCR results. There was a significant difference between the two groups (p:0.01). Considered as a pathogen regarding to 1.-2.-10. day incubation results, those microorganisms re-inoculated and proliferated in the PG liquid medium were passed through a 0.2µm por filter . The filtered samples were inoculated to blood, EMB, LEM and GYPA to demonstrate L-form existence but none of them were alive. In the fact that L-form existence of such microorganism still can not be ruled out because of negative routine urine culture results. There were no significant correlations between the cystoscopy and culture results.

In conclusion more special and pathogen based culture mediums should be used in cases with IC/BPS. The incubation periods and standart intervals can be modified according to underlying rare microorganisms. Randomized controlled trials on large patient populations are mandatory for future IC/BPS studies.

Key Words: Interstitial cystitis, bladder pain, L-form, urine culture

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project ID: TTU-2017-13216

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 İnterstisyel Sistit/ Mesane Ağrı Sendromu.....	3
2.1.1 Tanım.....	3
2.1.2 Epidemiyoloji.....	6
2.1.1. Patofizyoloji.....	7
2.1.3.1 Glioaminoglikan Teorisi.....	7
2.1.3.2 Epitelyal Permeabilite.....	8
2.1.3.3 Mast Hücre Hipotezi.....	10
2.1.3.4 Otoimmünite ve Nöroimmünoloji.....	11
2.1.3.5 Enfeksiyonlar.....	12
2.1.3.6 Diet ve Çevresel Faktörler.....	13
2.1.3.7 Genetik.....	14
2.1.2. Tanı.....	14
2.1.4.1 Hikaye.....	14
2.1.4.2 Fizik Muayene.....	15
2.1.4.3 İdrar Kültürü.....	15
2.1.4.4 Semptom Skorlaması.....	15
2.1.4.5 Sistoskopi ve Hidrodistansiyon.....	16
2.1.4.6 Potasyum Duyarlılık testi (PDT).....	17
2.1.4.7 Diğer Tanısal Testler.....	17
2.2 L-form Bakteriler.....	18
2.3 Besiyerleri.....	22
2.3.1 Kanlı Agar.....	22
2.3.2 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar.....	22
2.3.3 Sabauroud Dekstroz Agar (SDA).....	23
2.3.4 Pepton Glikoz Buyyon (PG).....	23
2.3.5 Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA).....	23
2.3.6 L-form Egg Medium (LEM).....	24
2.3.7 Mueller Hinton Buyyon (MHB).....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1 Mikrobiyolojik Kültür Yöntemleri.....	26

3.1.1 Hasta Grubunda Uygulanan Kültür Yöntemleri	26
3.1.2 Kontrol Grubunda Uygulanan Kültür Yöntemleri	27
3.1.3 evre rneklerinde Mikrobiyolojik Kültür Yöntemleri	27
3.2 Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rt-PCR)	28
3.3 Verilerin Analizi	29
4.BULGULAR	30
5.TARTIŞMA	36
6.SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AMS	: Ağrılı mesane sendromu
ATP	: Adenozin trifosfat
AUA	: American Urological Association
BPIC-SS	: The Bladder Pain/IC Symptom Score
CCL21	: Kemokin ligand 21
Cfu	: Colony-forming unit
CLSI	: Clinical Microbiology Laboratory Standards
CRH	: Kortikotrop serbestleştirici hormon
CT	: Chlamydia trachomatis
CYBH	: Cinsel yolla bulaşan hastalık
CWD	: Cell wall deficient
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECM	: Ekstrasellüler matrix
EMB	: Eosin Methylene Blue
ESSIC	: European Society for Study of Interstitial Cystitis
FGF	: Fibroblast büyüme faktör
GAG	: Glukozaminoglikan
GYPA	: Glucose Yeast Pepton Agar
HP	: Helicobakter pylori
IBD	: İnflamatuar bağırsak hastalığı
ICA	: The Interstitial Cystitis Association
ICSI	: Interstitial Cystitis Symptom Index
ICPI	: The Interstitial Cystitis Problem Index

Ig	: İmmünglobulin
IL	: İnterlökin
İS	: İnterstisyel sistit
KKV	: Küçük koloni varyant
LEM	: L-form egg medium
L-form	: Lister form
MAS	: Mesane ağrı sendromu
MALDI-TOF MS spectrometry	: Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
mEq	: Miliekivalan
MG	: Mycoplasma genitalium
MH	:Mycoplasma hominis
MHB	: Mueller Hinton Buyyon
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
MI	: Mililitre
NE	: Norepinefrin
NG	: Neisseria gonorrhoeae
NGF	: Nerve growth factor
NIDDK Diseases	: The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksiz sentaz
PARs	: Proteaz aktive edici reseptörler
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDT	: Potasyum duyarlılık testi
PG	: Pepton Glikoz Buyyon
PLO	: Pleuropnemonia-like organism
PGE2	: Prostaglandin E2

PP	: Pentozan polifostat
PUF	: The Pain, Urgency, Frequency score
Rpm	: Revolutions per minute
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
Rt-PCR	: Real time polimerase chain reaction
SDA	: Sabauroud Dekstroz Agar
SP	: P maddesi
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
TRPV1	: Transient receptor potential vaniloid receptor subtype 1
TV	: Trichomonas vaginalis
UP	: Ureaplasma parvum
UU	: Ureaplasma urealyticum
UW-IC	: The Wisconsin Interstitial Cystitis scale
VIP	: Vazoaktif intestinal peptid
VR1	: Vanilloid reseptör
ZO	: Zonula okludens
μ	: Mikron
δ	: Delta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Normal ve interstisyel sistit mesane biyopsi örnekleri	9
Şekil 2.2 Hunner Ülseri	16
Şekil 2.3 Glomerulasyon	17
Şekil 2.4 Hücre duvarından yoksun (CWD) bakterinin dört farklı tipi.....	20
Şekil 2.5 Hücre duvarı olan ve L-form olan bakterilerin bölünmesi	21
Şekil 3.1 Rt-PCR’da doğru santrifüj tekniği.....	29
Şekil 4.1 Üreme olan hasta grubundaki kültür sonuçları	32
Şekil 4.2 Kontrol idrarındaki Rt-PCR sonuçlarının dağılımı.....	34
Şekil 4.3 Hasta idrar ve kontrol idrar Rt-PCR sonuçlarının karşılaştırılması	34
Şekil 4.4 Hasta grubu sistoskopi bulgularının dağılımı	35
Şekil 4.5 İdrar ve doku kültür sonuçlarının sistoskopi bulgularına göre dağılımı.....	35

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 Ulusal Diabet, Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü İnterstisyel Sistit Tanı koyma Kriterleri	4
Tablo 2.2 Hidrodistansiyon eşliğinde yapılan sistoskopi ve biyopsi bulgularına göre MAS tiplerinin sınıflandırılması	6
Tablo 2.3 Kanlı Agar	22
Tablo 2.4 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar	22
Tablo 2.5 Sabauroud Dekstroz Agar (SDA)	23
Tablo 2.6 Pepton Glikoz Buyyon (PG)	23
Tablo 2.7 Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA)	23
Tablo 2.8 L-form Egg Medium (LEM)	24
Tablo 2.9 Mueller Hinton Buyyon (MHB)	24
Tablo 3.1 Allplex™ STI Essential Assay CFX96™ Real-time PCR System	28
Tablo 4.1 Hasta ve kontrol grubu demografik özellikler	30
Tablo 4.2 Üreme olan hasta grubu kültür ekimleri ve Rt-PCR sonuçları	31
Tablo 4.3 Hasta ve kontrol grubu Rt-PCR sonuçlarının dağılımı	33

1. GİRİŞ

İnterstisyel sistit/mesane ağrı sendromu (İS/MAS), kliniğe dayalı tanı alan kadınlarda erkeklere göre 4-5 kat daha sık görülen genellikle 6 haftadan uzun süreli üretral/pelvik ağrı ile iritativ işeme semptomlarının (ani işeme hissi, işeme sıklığında artış, noktüri, dizüri) ve steril idrar kültürlerinde altta yatan herhangi bir üriner sistem enfeksiyonunun gösterilemediği durumdur[1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 3.3 milyon kadının İS/MAS tanısıyla kliniğe başvuru yaptığı[2], başka bir çalışmada ise İS/MAS olgularının %50'sinin tam gün çalışmadığı, %70'inin uyku problemleri ve dispareni şikayeti olduğu gösterilmiştir[3]. İnterstisyel sistit etiolojisinde mesane yüzey epiteli oluşturulan üroepitelyum tabakasında bulunan glikozaminoglikan miktarında azalma, artmış epitelyal permeabilite, artmış mast hücre ve inflamatuvar yanıt, otoimmünite, enfeksiyonlar, diet ve çevresel faktörler ile genetik yer almakta olup enfeksiyöz ajanların etkili olabileceği hep gündemde kalmıştır. Ürolojik ve jinekolojik maligniteler, üriner sistem taş hastalığı, radyasyon/kimyasal sistit olguları benzer semptomlar ile kliniğe başvurabileceği için ayırıcı tanıda dikkat edilmelidir. İS hastalarının bir grubunda yapılan sistoskopik incelemede mesane duvarlarında glomerülasyonların olması ya da klasik Hunner ülserlerinin bulunmasına ek olarak mesane dolum/boşaltım fazıyla ilişkili ağrı veya ani işeme hissi varlığı söz konusudur. İritatif işeme semptomlarıyla başvuran her hastada üriner sistem enfeksiyonları, mesane taşı ve mesanenin üroepitelyal tümörleri ön tanıda yer almaktadır.

İS/MAS olgularında rutin idrar aerob, idrar mantar ve idrar tüberküloz kültür yöntemleri ile herhangi bir üriner sistem enfeksiyonunun gösterilememesi ve ayırıcı tanıdaki hastalıkların dışlanması ile tanı konulurken, etiolojide enfeksiyöz ajanlar birçok çalışmada araştırılmış olsalar da bugüne kadar rutin kültür ortamında üretilmeyen özel morfolojik formlardaki mikroorganizmalar yeterli düzeyde araştırılmamıştır. Bu farklı morfolojik formlar arasında bakterinin hücre duvarını kaybetmiş L-formları, biyofilm formları ve küçük koloni varyant (KKV) formları yer almaktadır[4]. Bu morfolojik formların yanı sıra rutin kültür çalışmalarında üreme görülmediği ve İS/MAS tanısı konurken ayırıcı tanıda yer alıp özel kültür yöntemleri ile incelenerek varlıklarının dışlanması gereken başlıca cinsel yolla bulaşan hastalık (CYBH) etiolojisinde rol oynayan *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG),

Mycoplasma hominis (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP) ve *Trichomonas vaginalis* (TV) gibi mikroorganizmalar da semptomatik bireylerin idrar ve doku örneklerinde araştırılmalıdır.

İS/MAS olan bireylerde mikrobiyolojik bir etiyolojinin gösterilebilmesi evrensel anlamda büyük değere sahiptir. Bireylerin psikososyal hayatlarındaki etkilenimleri, yetersiz ve karşılıksız tedavi kaynaklarının tüketilmesinin getirmiş olduğu maliyetler gözönüne alındığında, literatürde birçok kronik rekürren hastalıkta L-form bakteri varlığının araştırıldığı düşünülürse, etiyolojide halen ortaya net konulamamış olası mikrobiyal ajanların varlıklarının araştırılması büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada semptomatik hastalarda mesane üroepitelyal tümör varlığını dışlamak ve interstisyel sistit tanısında yer alan mesane glomerülasyonları veya Hunner ülserlerini göstermek amaçlı yapılan sistoskopilerde şüpheli alanlardan biyopsi alınması halinde rutin patolojik incelemenin yanı sıra hem idrarda hem de alınan doku örneklerinde özel kültür yöntemleri ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) ile varlıkları gösterilebilen *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP) ve *Trichomonas vaginalis* (TV) varlıkları araştırılacak ve üriner sistem enfeksiyonlarında sık görülen *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Staphylococcus* türlerinin L-form varlıkları araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İnterstisyel Sistit/ Mesane Ağrı Sendromu

2.1.1 Tanım

İS/MAS'ye benzer yakınmaların tanımı ilk kez 1808 yılında Philadelphialı ünlü cerrah Philip Syng Physick (1768-1837) tarafınca, mesanenin inflamatuvar ve ülsere lezyonlara sahip olabildiği mesane taşı benzeri semptomlar olarak yapılmıştır. 1836 yılında ise yine Philadelphialı cerrah Joseph Parrish (1779-1840) mesanenin inflamatuvar ve kronik olarak ani sıkışma hissi, sık idrara çıkma ve ağrı ile karakterize olduğu altta yatan etiyojinin gösterilemediği bu durumu mesanenin ağrılı hareketi (*tic douloureux of the bladder*) olarak tanımlamıştır.

Literatürde en eski yazılı İS tanımı 1876'da Samuel D Gross tarafınca yapılmıştır. 1878'de AJC Skene müköz membranın kısmen tutulduğu veya tamamen tutularak kas tabakasına da uzandığı hastalığı İS olarak ve seröz tabakanın tutulduğu hastalığı peri-sistit olarak tanımlamıştır. Mukozadan başlayan ülserasyonların tüm mesane tabakalarını içerdiği ileri düzey olgularda serozaya ulaşabilen ve perforasyonla sonuçlanabilen ciddi sonuçlara yer vermiştir. 1880 yılında Van Buren ve Keyes mesanenin inflamasyonunu anatomik olarak '*cystitis mucosa-catarrh of the bladder, interstitial cystitis, pericystitis/epi-cystitis*' 3 başlık altında gruplamıştır.

1914 yılında Johns Hopkins'de görev yapan jinekoloji ve obstetri uzmanı Guy Leroy Hunner (1868-1957) yapmış olduğu endoskopik değerlendirme sonucunda farklı bir tip mesane ülseri tanımlamış ve literatüre tanısız önem arz ederek '*Hunner Ülseri*' olarak geçmiştir. 1934'de Albert Meads '*Hunner Ülseri*' tanımını da kullanarak İS'i ; suprapubik ağrı, gece ve gündüz sık idrara çıkma, ağrılı ve yetersiz idrar boşaltma ile beraberinde negatif pelvik muayene bulguları ve herhangi üriner enfeksiyon bulgusu bulunmaması olarak tanımlamıştır. Hastaları erken/pre-ülser grup, orta/ülsere grup ve geç/skar-kontrakte grup olarak 3 gruba ayırmıştır. 1949'da ise JR Hand küçük noktasal submukozal kanamaları tanımlayarak bunları evre 1-3 olarak sınıflamıştır. Evre 1'de mesane kapasitesi üzerinde etki görülmemekle beraber küçük, ayrı, submukozal noktasal kanamalar ve bunların oluşturduğu lineer çizgilenmeler görülürken ; Evre 2'de ise mesane kapasitesinde azalma ile daha geniş alanlara yayılmış lezyonlar görülmektedir. Evre 3'de

ise yer yer eski lezyonlara ait skar alanları izlenen yaygın lezyonlarla birlikte kas demetleri ve damar ağın içine alarak zig-zag şeklinde çatlaklar ile bölünerek mesane kapasitesinin <150cc olduğu görülmektedir. 1951’de ise Kanada’lı JP Bourque ‘‘ağrılı mesane hastalığı’’ tanımının İS için eşanlamı olmadığı ve İS’in bir alt başlık olduğunu belirterek diğer ‘‘ağrılı mesane hastalığı’’ sebeplerini ise ; renal tüberküloz nedeniyle nefrektomi sonrası olgular, Hunner sistit/İS, kronik enfeksiyonlara bağlı sistitler, inoperabl mesane kanserleri olarak dört başlıkta ele almıştır.

1978’de Walsh, Hunner ülserlerinin tecrübesiz hekimlerce atlanabileceğini bu sebeple tanıda altın standart olarak kullanılmaması gerektiğini belirterek ayrıca ‘‘glomerulasyon’’ olarak noktasal peteşiyal kanamaları tanımlamış ancak bu kanama alanlarının mesanenin over-distansiyonuyla görülebildiği ve tanıda patognomonik olmadığını belirtmiştir[5].

1984 yılında İnterstiyel Sistit Derneği (ICA=The Interstitial Cystitis Association) kurulmuş ve 1987 yılında IS/MAS konulu Ulusal Diabet, Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü (NIDDK= The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) çalışma toplantısı sonrası ilk tanı kriterleri ortaya konmuştur ve 1 yıl sonra 1988’de bu kriterler revize edilmiştir (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1 Ulusal Diabet, Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü İnterstiyel Sistit Tanı koyma Kriterleri

1.Sistoskopik incelemede glomerulasyonu ya da klasik Hunner ülseri olması ve ayrıca mesane ilişkili ağrısı ya da ani idrara sıkışma hissi olması
2.Glomerulasyonlar diffüz, mesanenin en az 3 kadranda ve her kadranda en az 10 glomerulasyon olmalı ve sistoskobun yolu boyunca olmamalı (enstrümanın temas artefaktını elimine etmek için)
Aşağıdakilerden herhangi birinin olması İnterstiyel Sistitin dışlanmasına neden olur
1. Uyanıkken gaz veya sıvı kullanılarak yapılan sistometride 350 cc’den büyük mesane kapasitesi olması
2. Sistometride 30-100 cc/dk. dolum hızıyla, mesane 100 cc gaz veya 150 cc su ile doldurulduğunda acil işeme hissi olmaması
3. Sistometride belirtilen dolum hızlarıyla fazık istemsiz mesane kontraksiyonları gösterilmesi
4. Semptom süresinin 9 aydan kısa olması
5.Noktüri olmaması

6. Semptomların antimikrobiyal, üriner antiseptik, antikolinergik veya antispazmodikler ile düzelmesi
7. Uyanırken günde 8 kereden az idrara çıkma
8. Son üç ay içinde bakteriyel sistit ya da prostatit tanısı almış olmak
9. Mesane ya da alt üreter taşı
10. Aktif genital herpes
11. Uterin, servikal, vajinal veya üretral kanser
12. Üretral divertikül
13. Siklofosamid/kimyasal sistit
14. Tüberküloz sistiti
15. Radyasyon sistiti
16. Benign/malign mesane tümörleri
17. Vajinit
18. <18 yaş

Hanno et al. [1]'dan alınmıştır.

NIDDK kriterlerinin homojen gruplara kıyasla rutin klinik uygulamalarda kullanımının sınırlı olabileceği öne sürülmüş ve bu kriterlerin kullanımıyla hastaların 60%'dan fazlasına yanlış tanı konulduğu belirtilmiştir[6]. Uluslararası kontinans derneği (ICS) 2002 yılında ‘‘Ağrılı Mesane Sendromu(AMS)’’ tanımını yaparak mesane dolumuyla birlikte suprapubik ağrı, sık idrara çıkma ve altta yatan etiyolojik herhangi bir idrar yolu enfeksiyonu ya da patolojinin olmadığı durumları bir araya toplamıştır[7].

Avrupa İnterstisyel Sistit Çalışma Grubu (ESSIC= European Society for Study of Interstitial Cystitis) ise İS hastalığının tam olarak AMS tanımına uymadığını belirterek; sıkışma hissi (*urgency*) veya sık idrara çıkma (*frequency*) semptomlarından birinin eşlik ettiği, >6 ay süren pelvik ağrının var olduğu Mesane Ağrı Sendromu(MAS) olarak yeniden tanımlamıştır[8].

İS/MAS, 2011 Amerikan Üroloji Birliği (AUA) kılavuzlarında altta yatan herhangi enfeksiyon veya başka sebep olmaksızın 6 haftadan uzun süren alt üriner sistem semptomları ile birlikte suprapubik ağrı, basınç, rahatsızlık olarak tanımlanmıştır[9].

Önceden İS/MAS olgularının tamamının ülseratif lezyonlara sahip olup tanısının Hunner ülseri/glomerulasyon varlığı ile konulabildiği düşünülürken[10], ESSIC sınıflaması ile bu grubun klasik tip/Tip 3C olarak adlandırılmasına karar verilmiştir (**Tablo 2.2**). Patnaik ve ark. 2017’de yaptıkları araştırmada yeni tanı konulan İS/MAS olgularının >90%’in non-ülseratif tip olduğunu belirtmiştir[11].

Tablo 2.2 Hidrodistansiyon eşliğinde yapılan sistoskopi ve biyopsi bulgularına göre MAS tiplerinin sınıflandırılması

	Sistoskopi Eşliğinde Hidrodistansiyon			
	Yapılmadı	Normal	Glomerulasyon ^a	Hunner Lezyonu ^b
Biyopsi				
Yapılmadı	XX	1X	2X	3X
Normal	XA	1A	2A	3A
Yetersiz	XB	1B	2B	3B
Pozitif ^c	XC	1C	2C	3C
^a Sistoskopi: Grade 2-3 Glomerulasyon				
^b Glomerulasyon +/-				
^c Histolojik inflamasyon / detrosur mastositoz / granülasyon / intrafasiküler fibroz				

Van de Merwe, J.P., ve ark. [7]’dan alınmıştır.

2.1.2 Epidemiyoloji

İS/MAS semptomları kompleks ve multifaktöriyel olup özellikle >40 yaş ve düşük sosyoekonomik düzey kadınlarda daha yaygın görülmekle birlikte ırk, medikal özgeçmiş gibi faktörler konusunda henüz literatür net değildir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda İS/MAS kadınlarda 45/100.000, erkeklerde 8/100.000 ve her iki cinsiyette 10.6/100.000 oranında görülmektedir[11]. 2011 yılında ABD’de yapılan bir çalışmada yaklaşık 8 milyon

>18 yaş kadın hastanın İS/MAS semptomlarına sahip olduğu ve bunların yalnızca yaklaşık %10'una tanı konulabildiği belirtilmiştir[2]. Günümüze dek İS/MAS tanı ve tedavi maliyet çalışmaları incelendiğinde ayaktan hasta başvuruları, muayene ve ilaç harcamaları dahil yaklaşık \$230 milyon harcadığı tahmin edilmektedir[11].

İS/MAS'a ait epidemiyolojik verilerdeki varyasyonların eşlik eden komorbidite varlığına bağlı olduğu düşünülmektedir. İS/MAS izole olmamakla birlikte inflamatuar bağırsak hastalığı(İBD), kronik pelvik ağrı, endometriozis, fibromiyalji, kronik yorgunluk sendromu, aşırı aktif mesane ve allerji gibi çeşitli kliniklerle birlikte görülebilmektedir. İS/MAS tanısı alan bireylerde tanı aldıktan sonraki ilk yıl içerisinde depresif bozukluk gelişiminin normal popülasyona oranla anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir[12]. Allerji, inflamatuar bağırsak hastalığı, romatoid artrit gibi sistemik ve otoimmün hastalıkların da prevalanslarının normal popülasyona oranla İS/MAS hastalarında arttığı görülmüştür[13].

İS/MAS tanısı için yine ayırıcı tanıda da yer alan yukarıdaki nörolojik, romatolojik ve mental hastalıkların dışlanması gerekmektedir. İS/MAS tanısı için uygulanan standardize edilmiş bir biyopsi prosedürü tanımlanmamıştır[11].

2.1.1. Patofizyoloji

İS/MAS etiopatogenezinde mesanenin, mesane komşuluğundaki pelvik organların ve mesane fonksiyonunu kontrol eden nöral dokuların disfonksiyonları birçok teori ile öne sürülmekle birlikte henüz literatürde hastalığın kesin nedeni ortaya konulamamıştır.

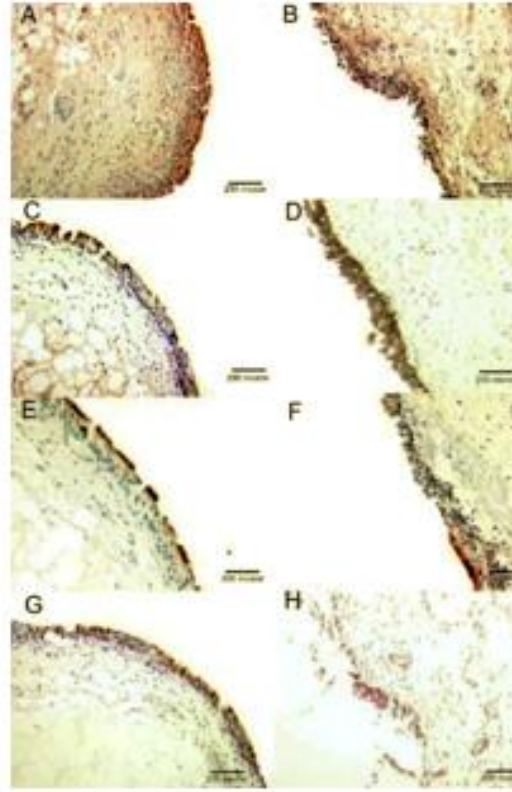
2.1.3.1 Gliozaminoglikan Teorisi

Glikozaminoglikanlar (GAG) yapı taşlarında N-asetilglukozamin / N-asetilgalaktozamin gibi amino şeker içeren lineer yapı polimerlerdir. Proteoglikanlar, bir ya da birden çok GAG zincire bağlı protein çekirdekli yapılardır. Tüm memeli canlıların hücrelerinde proteoglikanlar ya plazma membran yapısına katılarak ya da sekretuar granüllerde saklanarak ekstrasellüler matriks (ECM)'e sarılırlar. ECM yapısı kolajen, elastin gibi fibröz proteinler ile fibronektin, laminin ve tenaskin gibi adeziv glikoproteinler ile bir araya gelen glikoproteinler ile esneklik içeren, destek sağlayan ve dıştan gelebilecek basınç gücüne dayanıklı hidrate jel yapıdadır[14]. Mesanenin yüzeyi

örten başlıca GAG molekülleri olarak heparan sülfat, kondrotin sülfat ve dermatan sülfat görülmektedir[15]. Mesane dokusu içten dışa ürotelyal mukoza, lamina propria, muskularis mukoza ve seroza tabakalarıyla beraber vasküler dokuları, sinir lifleri ve immün hücreleri barındırmaktadır. Mesane dokusu idrar depolama fonksiyonunun yanı sıra selektif olarak çeşitli elektrolitlerin de yüzeyden geçişlerine izin vermektedir. Enfeksiyon, inflamasyon, mesane yüzeyindeki herhangi hasar veya yaralanma durumunda GAG tabakasındaki bozulmayla birlikte idrar depolamada bozulma, mesane kapasitesinde azalma, sık ve ani idrara çıkma, pelvik ağrı gibi İS/MAS semptomları ortaya çıkabilmektedir[11].

2.1.3.2 Epiteyal Permeabilite

Mesane yüzey epitelini oluşturan ürotelyum; bazal hücre tabakası, ara tabaka ve hegzagonal şekilde 25–250 µm boyutlu şemsiye hücrelerinden oluşan yüzeyel tabaka olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır[16]. Şemsiye hücrelerinin luminal yüzeylerinde çeşitli özelleşmiş lipidler ve üroplakin adında protein plak yapılar bulunmaktadır. Bu bariyer transepiteliyal rezistans oluşturarak su, üre ve iyonlara yüksek oranda geçirgen değildir. Ürotelyumun yüzeyi örten şemsiye hücreleri arasındaki zonula okludens-1(ZO), kludin-4, okludin gibi sıkı bağlantılar ile idrar ve subürotelyal katmanlar arasında bariyer oluşturulmaktadır[17]. Apikal ürotelyal hücrelerin bariyer fonksiyonunda herhangi fiziksel/termal/kimyasal hasar veya inflamasyon sonucunda bozulma gerçekleştiğinde idrardaki toksik maddeler subürotelyal dokulara ulaşarak ani sıkışma, sık ve ağrılı idrara çıkma gibi şikayetlere yol açacaktır (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1 Normal (sol) ve interstisyel sistit (sağ) mesane biyopsi örnekleri. (A ve B) Kondrotin sülfat ; (C ve D) E-cadherin; (E ve F) üroplakin; ve (G ve H) ZO-1 (zonula okludens). Hurst et. al.[18]'dan alınmıştır.

Ürotelyum bariyer görevinin yanı sıra fizyolojik ve kimyasal uyarılara yanıt olarak çeşitli mediatörleri salımından da sorumludur. Mesane yüzeyinde meydana gelebilecek uyarıları duyuşal nöronlardaki nosiseptör/mekanoreseptör gibi algılayarak sinyal mekanizmalarıyla afferent nöronlara taşırlar. Bu aşamada bradikinin reseptörleri, nörotropinler (trkA ve p75), pürinler (P2X ve P2Y), norepinefrin (α/β), asetilkolin (nikotinim ve muskarinik), proteaz aktive edici reseptörler (PARs), amilorid/mekanosensitif sodyum kanalları ve transient reseptör potansiyel vanilloid kanalları (TRPV1-2-4 ve TRPM8) yer almaktadır. Ürotelyal hücreler adenosin trifosfat(ATP), asetilkolin(ACh), prostaglandinler , prostaglandin E2(PGE2) ve nitrik oksit (NO) gibi mediatörlerin salınımını yaparak komşu ürotelyal hücrelerin, sinir hücrelerinin ve mesane duvarında yer alan immün hücrelerin uyarılmasını sağlarlar[19]. İnflamatuar süreçte salınan ATP, ağrılı uyarıyı algılayan ve detrusor kasılmasında da rol alan purinerjik (P2X₃) reseptörler aracılığıyla spinal korda ve beyine ağrı duyusunu ulaştırır[20]. Vanilloid reseptör (VR1) (*Capsaicin Receptor*) duyuşal nöronlara spesifik olarak ağrı duyusunun tanınmasında görev alır. VR1 reseptöre sahip hücrelerde ATP, protein kinaz C aracılığıyla P2Y₁ reseptörlerini de aktive ederek normalde ağrı duyusu

oluşturmayan bir uyarının hasarlı dokudan salınan yüksek miktarda ATP aracılığıyla VR1 uyarımının sağlandığı gösterilmiştir[21]. İnflamasyon, spinal kord hasarı gibi durumlarda da artmış NO düzeyleri ile birlikte apikal yüzeyde meydana gelebilecek değişiklikler ile su/üre geçirgenliğinde artış meydana gelebilmektedir. Bununla beraber ürotelyal epitel hücrelerinin bütünlüğün bozukluğunda İS/MAS gibi hastalıklarda salınan antiproliferatif faktörlerinde etkisi olduğu söylenebilir[19]. GAG / ürotelyal tabakada bozulma ile İS/MAS semptomları veya aşırı aktif mesane sendromu belirtileri görülebilir.

2.1.3.3 Mast Hücre Hipotezi

Mast hücreleri, doku hemostazında herhangi bozulma durumunda hücreler arası kimyasal uyarı yollarıyla çoğunlukla kemik iliğinden salınan immün sistem hücreleridir. MH otoimmün, nörojenik immün yanıtta ve doğal immünitede görev almaktadır. Anafilaksi, antijenler, bradikinin, sitokinler, hormonlar, IgE, nörotransmitterler, nöropeptitler, bakteriyal toksinler, virüsler, ilaçlar ve stres mast hücre aktivasyonuna yol açabilmektedir. Mast hücre aktivasyonu ile histamin, serotonin, heparin, proteazlar, fosfolipazlar, sitokinler, kininler, çeşitli kemotaktik faktörler ve/veya vazoaaktif intestinal peptid(VIP) mast hücre tarafından salınırken İnterlökin-6(IL-6), lökotrienler, platelet aktive edici faktör, prostaglandinler, tromboksanlar, NO, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) de novo sentezlenmektedir.

İS/MAS'de üroepitelyumda meydana gelen hasar sonucunda mast hücre aktivasyonu ile beraber inflamasyon, ağrı, vazodilatasyon, fibrozis, detrusor kasılması meydana gelir. İS/MAS etiopatogenezini araştıran insan ve hayvan çalışmalarında idrar örneklerinde artmış histamin ve metabolitleri saptanmıştır[11]. İS/MAS tanısında mesane kas dokusunda >20 hücre/mm² mast hücresi varlığı 95% duyarlılığa, 88% özgüllüğe sahiptir[22].

İS/MAS hastalarında mesane dokusunda histamin ve idrarda özellikle prostaglandin e₂(PGE₂) düzeyleri yüksek bulunmuştur[23]. İS/MAS hastalarında subürotelyal ve detrusor tabakada bulunan sinir lif ve mast hücre sayısı birbiriyle ilişkili olup sinir sistemi ve inflamasyon arasındaki ilişkiye dayandırılmıştır[24]. Ülseratif form İS/MAS hastalarında daha yüksek mast hücre, histamin ve NO sentaz (NOS) salınımı görülürken non-ülseratif İS/MAS hastalarda ise detrusor ve mukozada mast hücre salınımında farklılık görülmemiştir[11].

2.1.3.4 Otoimmünite ve Nöroimmünoloji

Başlangıçta İS/MAS hastalığının otoimmün kökenli olabileceğini savunan görüşler olmuştur da yapılan çalışmalarda serum ve mesane dokusundaki lenfosit sayıları (CD4, CD8, CD4/CD8 oranı) değerlendirildiğinde lamina propria da CD4 baskınlığı, bakteriyel veya mekanik sistit olgularında ürotelyumda CD4 baskınlığı gösterilmiş iken İS olgularından alınan biyopsi örneklerinde ürotelyumda CD8 baskınlığı gösterilmiştir. Ancak serumda bulunan lenfosit değerlerinin normal ölçülmesi hastalığın etiolojisinde otoimmüniteyi uzaklaştırmaktadır[25]. Ürotelyum ve submukozal doku örneklerinde lenfosit oranlarında yükseklikle beraber İmmünglobulin A(IgA) , İmmünglobulin G (IgG) ve İmmünglobulin M (IgM) düzeylerinde de yükseklik görülmüştür[26]. Jhang ve ark. ketamine bağlı sistit olgularında artmış serum İmmünglobulin E (Ig E) düzeylerini göstermiş olup takip eden araştırmalarında 16 ketamine bağlı sistit, 10 ülseratif ve 20 ülseratif olmayan İS olgularında immüno Floresan yöntem ile mesane dokusunda İmmünglobulin E (Ig E) düzeylerini değerlendirilmiş, ketamine bağlı sistit ve ülseratif İS olgularında Ig E aracılı inflamasyonun yer aldığını göstermişlerdir[27, 28]. Hastalığın inflamatuvar sürecinde NOS, interlökin 6 (IL6), interlökin 8 (IL8), interlökin 10 (IL10), interlökin 17-A (IL17A), nerve growth factor (NGF) ve TNF α gibi inflamatuvar faktörler yükselen düzeylerde izlenmektedir[29]. Fibroblast büyüme faktör 7 (FGF7) ve kemokin(C-C) ligand21 (CCL21) düzeyleri de hastalığın seyri ile değişiklik göstermektedir. CCL21 güçlü bir inflamatuvar kemokin olup İS/MAS hastalarında düzeyi yükselerek mesanenin artmış kasılmasında ve ağrı duyusunda yer almaktadır[11].

Sempatik sinir sistemi ve hipotalamo-hipofizer-adrenal yolak inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev alır[30]. Hipotalamus ve beyin sapındaki kortikotrop serbestleştirici hormon(CRH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) ağrı iletimini kontrol ederken arkuat nukleusta bulunan pro-opiomelanokortin nöronlardaki ağrı eşikini arttırmaları. Stres durumu gibi CRH salınımına sebep olan durumlarda mesane dahil birçok dokuda MH aktivasyonunu stimüle ederek proinflamatuvar yanıt oluştururken ACTH salınımındaki değişim ve artmış norepinefrin (NE) düzeyleri İS/MAS hastalarında görülebilir[11]. Yapılan başka bir çalışmada ise İS/MAS hastalarının idrarlarında NGF düzeylerinin, hücre membranında bulunan *transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1* (TRPV1) sayısının ve ATP salınımının artmış olduğu gösterilmiştir[31]. TRPV1 kronik inflamasyonun yer aldığı dokularda artmakla beraber Liu ve ark. İS/MAS

hastalarında ağrı, ani sıkışma, sık idrara çıkma gibi şikayetleri açıklayan subürotelyal artmış TRPV1 sinir liflerinin bulunduğunu göstermişlerdir[32].

İS/MAS hastalığı visseral nöropatik ağrı olarak değerlendirilirse pelvis, omurilik ve beyin dokularında yer alan sinir liflerindeki nöronlarının reseptör sayılarındaki artış ile ilişkilendirilebilir (up-regülasyon). İnflamatuar süreçte mast hücre tarafından ortama salınan P Maddesi (SP) ve NGF ile sinir liflerinin sayıları artarken perivaskuler duyuşal sinir uçlarının SP sensitivitelinde artış görölmektedir. Mesanenin pelvik ve lomber splanknik pleksus innervasyonlarında yer alan mekanosensitif A δ ve C lifleri daha düşük eşik değerlerdeki uyarıları algılar ve mesaneden çıkan afferent sinirler ile omurilik arka boynuzda iletirler. Bu aşamada salınan glutamat, SP ve kalsitonin gen ilişkili peptid ile santral sensitizasyon sağlanır. Sonuç olarak mesane ve komşu pelvik organların hiperaljzisi ile allodini oluşur[29].

2.1.3.5 Enfeksiyonlar

Üriner sistem enfeksiyonlarında mesane yüzeyini örten GAG tabakası bütünlüğü bozulmuş, yüzey geçirgenliğinde artış sonucunda immün yanıt ile birlikte inflamasyon meydana gelmektedir. Üriner sistem enfeksiyonlarında hastalar İS/MAS ile benzer olarak ani sıkışma, idrar yaparken yanma, sık idrara çıkma gibi şikayetler ile başvurmuşlardır. Nitekim bu hastalar birçok hekime başvurmakla beraber çok sayıda antibiyotik tedavi almış ancak genellikle semptomatik düzelme sağlanamamıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda İS/MAS etiyopatogenezinde birçok bakteriyel, viral, fungal ajanlar araştırılmış olup herhangi bir sonuca varılamamıştır[33]. Wilkins ve ark. İS/MAS kriterlerini karşılayan 20 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada mesane doku kültürleri, kateter ve orta akım idrar kültürleri incelenmiş olup alınan mesane doku örneklerinin histolojik incelemeleri İS ile uyumlu görölmüştür. 12 hastanın ise kateter/mesane biyopsi kültürlerinde bakteri izole edildiği öne sürölmüş olup bunların sekiz tanesinde nazlı üreyen (*Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus*) bakteriler gösterilmiştir. Histopatolojik ve mikrobiyolojik bulgular enfektif bir etiyolojiye ışık tutmakla beraber İS ve üretral sendrom tanımlarının bir arada görölebileceği de vurgulanmıştır[34]. Rutin idrar kültürlerinin yanı sıra özel kültür yöntemleriyle mesane üroepitelyal örneklerinin de ayrıca incelenmesi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR), elektron mikroskopisi gibi özel çalışmalar ile enfeksiyöz ajanların araştırılması düşünölmüştür[35]. Domingue ve ark. yapmış olduğu çalışmada ise 14 İS

tanılı hasta ve 15 sağlıklı birey kontrol grubu olarak değerlendirilmiş, İS olguların mesane doku biyopsilerinin %29'unda gram-negatif bakteriyel 16S ribozomal RNA (rRNA) varlığı gösterilmiştir. Ayrıca İS hasta grubunun hepsinde ve bir kontrol hastasının mesane doku kültürlerinde 0.22 mikron filtre edilebilen, nükleik asit içeren, muhtemelen hücre duvar yapısını kaybetmiş yapılar henüz tanımlanmamış olası bir mikrobiyal ajanın varlığını desteklemektedir[36]. Bir başka çalışmada ise İS/MAS kliniğinin kronik seyri, mesane biyopsilerinde görülen inflamasyonun kronik gastrit ile benzerlik göstermesi ve kronik gastritin etiopatogenezinde *Helikobakter pylori* (HP) tanımlanmadan önce gösterilmiş mikrobiyal bir ajanın olmaması nedeniyle bazı araştırmacılar tarafınca HP gastritine benzer şekilde ele alınmış ve idrar ve doku örneklerinde HP araştırılmıştır. Mesane üroepitelyal doku örneklerinde PCR yöntemi ile yapılan çalışmada HP, İS/MAS etiopatogenezinde ajan olarak gösterilememiştir[37]. Nanobakteriler yakın dönemde tanımlanmış olan 100-500 nm büyüklükte 16S rRNA gen diziliminde ve standart kültür yöntemlerinde nazlı ve zor üreyen mikroorganizmalardır[38]. Nanobakterilerin literatürde enfeksiyöz böbrek taşı ve prostatit olguları dahil birçok ürolojik klinikte varlığı gösterilmiştir[39, 40]. Zhang ve ark. yapmış olduğu çalışmada, 27 İS/MAS tanılı kadın hastanın sistoskopik incelemelerinde alınan örnekler incelenmiş olup 11 hastanın mesane biyopsilerinde nanobakteri ile uyumlu 16S ribozomal RNA geni tespit edilmiş olup tetrasiklin türevi antibiyotik tedavisi ile semptomatik düzelme görülmüştür. Gutman ve ark. kronik üriner sistem enfeksiyonu olan 57 hastanın idrar örneklerini hücre duvarına sahip mikroorganizmaları ayırmak amacıyla 0.45µm filtrelerden süzerek incelemiş olup 11 hastada *L-form Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Enterococcus faecalis* izole etmiştir[41]. Bu nedenle halen literatürde eksik olan ve bir grup hastada çeşitli antibiyotik tedaviler ile semptomatik düzelme sağlanan ancak dökümente edilememiş atipik enfektif ajanların ve özel kültür yöntemlerinin incelenmesi gerekmektedir.

2.1.3.6 Diet ve Çevresel Faktörler

Literatürde İS/MAS semptomları ele alındığında birçok araştırma yapılmış olup seçilmiş diet ürünleri tüketimi, stres, alkol ve tütün ürünleri kullanımının semptomların artışıyla ilişkilendirildiği görülmektedir. NIDDK kriterlerine uygun tanı alan 104 hastadan oluşan bir anket çalışmasında çay, kahve, asitli içecekler, meyve suları, baharatlar ile suni tatlandırıcıların hastaların %90.2'sinde semptomları arttırdığı öne sürülmüştür[42].

2.1.3.7 Genetik

İS/MAS tanısı olan kadın hastaların birinci derece yakınlarında hastalığın prevalansının normal popülasyona oranla 17 kat artmış olduğu kabul görmektedir. Ancak monozigot ikizlerdeki dağılımın dizigot ikizlere oranla daha yüksek olduğu öne sürülmekle beraber henüz kanıtlanmamıştır[43, 44].

2.1.2. Tanı

İS/MAS hastaları genellikle uzun dönem süre gelen, hayat kalitelerinde ciddi bozulmaya sebep olan pelvik ağrı, idrar yapma güçlüğü, sık ve ağrılı idrara çıkma gibi şikayetlerden yakınmaktadırlar. İS/MAS hastalığında görülen yakınmaların üriner sistem enfeksiyonları, kimyasal sistit, radyasyon sistiti, jinekolojik patolojiler, mesanenin nöropatik bozuklukları, mesane kanseri veya mesane taşları gibi birçok farklı durumda da görülmesi nedeniyle yanlış tanı konulması ve yetersiz tedavi süreci sık görülmektedir. Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki hastalar semptomatik olup birinci basamak sağlık merkezine başvurduktan ortalama 3 yıl sonra uzman bir hekim tarafından değerlendirilerek İS/MAS tanısı alabilmektedir[45].

2.1.4.1 Hikaye

İS/MAS hastalarında her ne kadar semptom ve yakınmalar ayırıcı tanıda yer alan farklı hastalıkları düşündürse de detaylı tıbbi hikaye alınması yol gösterici ve önemlidir. Hastalar klasik olarak ağrılı idrar yapma, pelvik ağrı, sık ve ani idrara çıkma gibi şikayetler tariflese de suprapubik bölgede özellikle mesane dolumuyla belirginleşen yanma, batma, bası şeklinde semptomlar ön planda olup İS/MAS düşündürmektedir. Genellikle suprapubik bölgede tariflenen bu şikayetler pelvik bölgede üretra, vajen, labium, inguinal veya alt abdominal alanlarda görülebilir. Mesane boşaltımı sırasında tariflenen ağrı idrarın vulvaya temasıyla görülebilecek vulvar bir patolojisi düşündürürken, menstruel kanamadan birkaç gün önce şiddetlenen semptomlar ise endometriozis gibi menstruel kanama süresince tariflenen şikayetlerden çok İS/MAS'ı ön planda düşündürmektedir. Hastaların semptom ve yakınmaları stres, beslenme ve menstruasyon gibi faktörlerden etkilenerek periodik veya artarak görülebilir. Hastaların tümünde geçirilmiş pelvik cerrahi, radyoterapi, siklofosfamid veya ketamin gibi sistite yol açan ilaç, depresyon, otoimmün

hastalık öyküsü ve jinekolojik kontrolleri ile cinsel yaşamları sorgulanmalıdır[46].

2.1.4.2 Fizik Muayene

İS/MAS tanısı düşünülen hastalarda tüm abdomen, pelvik, jinekolojik ve perineal değerlendirilme yapılmalıdır. Hastalığa özgün bir muayene bulgusu olmamakla beraber suprapubik hassasiyet varlığı değerlendirilmelidir. İS/MAS hastalarının 87%'sinde pelvik muayene ile pelvik taban kaslarında hassasiyet ve ağrı tariflenmiştir[47].

2.1.4.3 İdrar Kültürü

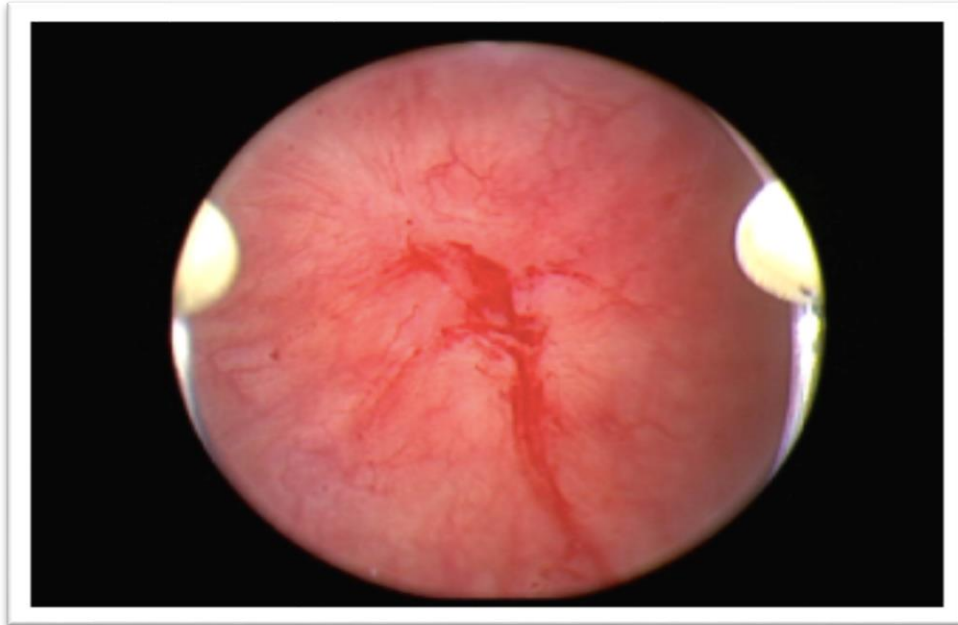
Üriner sistem enfeksiyonları ile benzer yakınmalar görülen İS/MAS hastalarında ilk basamakta rutin idrar tahlili bakılmalıdır. İdrarda lökosit varlığı olmasa bile İS/MAS tanısı dışlanmamalıdır. Steril piyuri varlığında ise *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium*, *Candida* ve *Mycoplasma tuberculosis* de dahil olacak şekilde uygun kültürler alınmalıdır[46].

2.1.4.4 Semptom Skorlaması

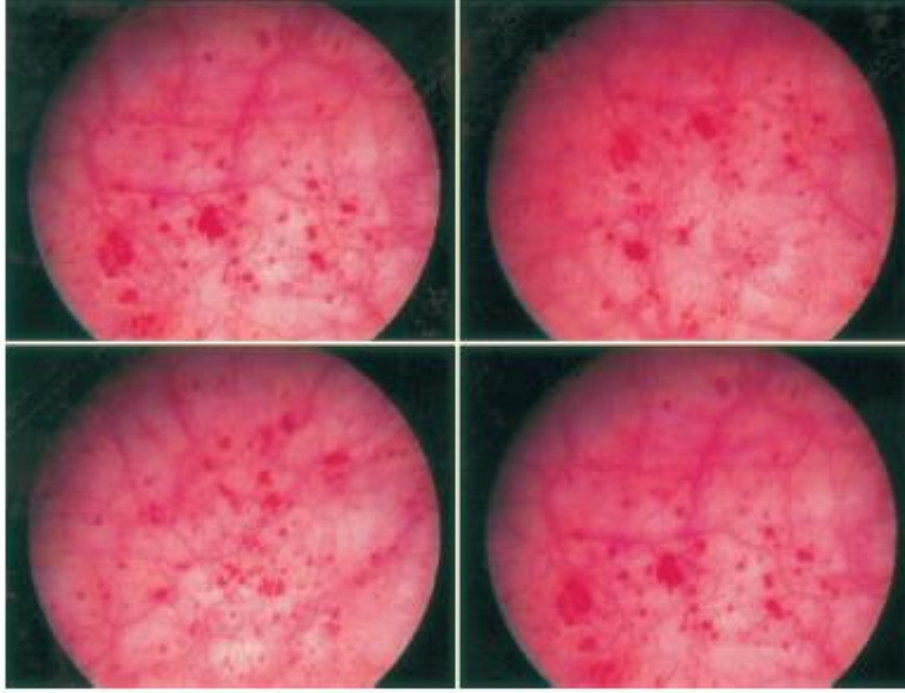
Literatürde “*Interstitial Cystitis Symptom Index (ICSI); The Interstitial Cystitis Problem Index (ICPI); The Wisconsin Interstitial Cystitis scale (UW-IC scale); The Pain, Urgency, Frequency score (PUF score); The Bladder Pain/IC Symptom Score (BPIC-SS)*” semptom skorlamaları tanımlanmış olup İS/MAS hastalarının tedavi öncesi semptom düzeylerini ve tedaviye yanıtın takibinde kullanımı uygundur. UW-IC içeriği kapsamlı olmasına karşın günlük klinik pratikte kullanımı sınırlıdır. ICSI ve ICPI kombinasyonu ile “*O’Leary Sant Symptom and Problem Index*” oluşturulmuş olup hastaların son ay içerisinde noktüri, ani sıkışma, sıklık ve ağrı şikayetlerini değerlendirmektedir[46]. PUF skorlaması ise pelvik ağrı ve dispareni ile detaylandırılmıştır[48]. BPIC-SS yüksek duyarlılık ve özgüllük içeriği ile klinik araştırmalara işleme kriteri olarak kullanımı önerilmiştir[49]. Semptom skorlamalarının hiçbiri İS/MAS hastalığı tanısı için yeterli özgüllüğe sahip olmayıp yardımcı tanı aracı olarak kullanılabilirler.

2.1.4.5 Sistoskopi ve Hidrodistsiyon

Rutin sistoskopide mesane mukozasında üroepitelyal tümörler başta olmak üzere karsinoma in situ, mesane taşı, yabancı cisim, mesane kapasitesi ve üreter orifisleri değerlendirilmelidir. Hidrodistsiyon sağlanmamış iken lokal anestezi altında yapılacak sistoskopik değerlendirmede mesane kapasitesi hakkında fikir elde edilebilirken hastanın mesane dolumuyla birlikte ağrı ve rahatsızlık hissi de değerlendirilebilir. İS/MAS hastalığı ülseratif ve ülseratif olmayan olmak üzere 2 formda görülebilir. Hunner ülseri aslında gerçek ülserler olmayıp ortasında santral skar olan etrafa dairesel damarlanma gösteren distansiyon ile kanamaya başlayan mukozal inflame görünümlü kızarıklıklardır (**Şekil 2.2**)[50]. Hunner ülseri anestezi altında mesanenin hidrodistsiyonundan bağımsız olarak %16 oranında görülebilir. Hunner ülseri görülen hastaların mesane kapasitesinin azalmış ve daha semptomatik olduğu gösterilmiştir[51]. Mesane mukozasında görülebilecek Hunner ülserleri ve glomerulasyon (**Şekil 2.3**) adı verilen hidrodistsiyonla ortaya çıkan peteşiyal kanamalar hastalığa patognomonik olmayıp görülmeyen olgularda İS/MAS tanısı dışlanmamalıdır[5].



Şekil 2.2 Hunner Ülseri. Fall, M., Y. Logadottir, and R. Peeker, Interstitial cystitis is bladder pain syndrome with Hunner's lesion. Int J Urol, 2014. 21 Suppl 1: p. 79-82. [50]'den alınmıştır.



Şekil 2.3 Glomerulasyon. CAMPBELL-WALSH Urology. In: Wein AJ, editor. 10th edition ed. United States of America: Elsevier Inc.; 2012. p. 357-401. [52]'dan alınmıştır.

2.1.4.6 Potasyum Duyarlılık testi (PDT)

Mesane yüzey GAG tabakası bütünlüğündeki bozulma esasına dayandırılarak intravezikal 40 mEq./100 ml potasyumun, serum fizyolojik ile karşılaştırılmalı olarak mesane içerisine instilasyonunu takiben subürotelyal dokulara ulaşarak kas ve sinir depolarizasyonu sonucunda ağrı ve sıkışma semptomlarının ortaya çıkarıldığı bir çalışmayla öne sürülmüştür. Ancak detrusor unstabilitesi veya akut üriner sistem enfeksiyonu gibi potasyuma sensitivitenin yükseldiği olgularda kullanımı sınırlıdır[53].

Klinik bulgular doğrultusunda normal popülasyonda İS/MAS tanısı %56 oranla konulabilirken, PDT pozitif olan bireylerde ise İS/MAS tanı olasılığı %66'dır. Yapılan çalışma sonucunda PDT duyarlılığı %69.5 iken özgüllüğü %50 olup test sonucu negatif olan bireylerin yaklaşık yarısında tanı atlanabilir[54]. Ağrılı ve maliyetli bir test olması ve sistoskopi bulgularına tanısal olarak üstünlüğü kanıtlanamadığı için kullanımı sınırlıdır.

2.1.4.7 Diğer Tanısal Testler

İS/MAS tanısında mesane içerisine anestetik olarak 10-20 cc alkalize lidokain instilasyonu takiben 10-20 dk sonra mesane kateterize edilerek boşaltılır. Hastaların ağrı

düzeylerindeki değişim ve semptomatik düzelme değerlendirilmekle birlikte tanısal bir testtir. 22 kadın hastaya intravezikal 20cc %2 lidokain verilmiş olup hastaları %68'inde semptomatik düzelme tariflemiştir. Ağrının mesane veya mesane dışı kaynaklı ayrımının yapılmasında yol göstericidir[55].

Pelvik ultrasonografi veya ileri görüntüleme yöntemlerinin İS/MAS hastalarında rutin kullanımda yeri olmamakla beraber hematuri varlığında pelvik görüntüleme önerilir. Mesane depolama-boşaltım fonksiyonlarının değerlendirilmesi ve poliuri ayrımı için işeme günlükleri ve 'post voiding' rezidü ölçümü önerilebilir. Klinik olarak İS/MAS tanısı alan bireylerin sistoskopik incelemelerinde alınan biyopsilerde %40 oranla normal histolojik bulgular izlenmiştir. Karsinoma in situ şüphesi dışında mesane biyopsisinin rutin kullanımda yeri yoktur.

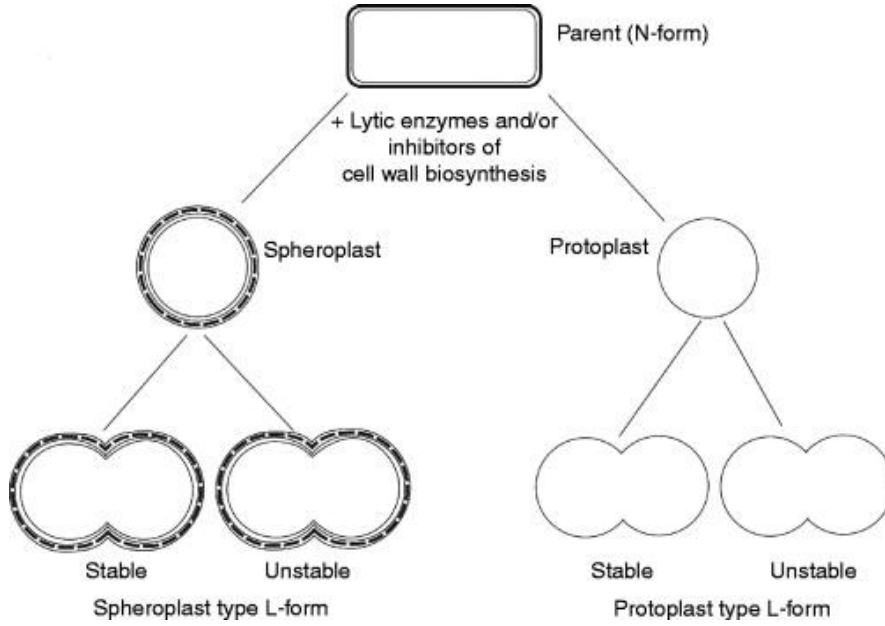
Ürodinamik çalışmaların geçmişte İS/MAS tanısında kullanımı önerilmiş olsa da hastaların %15'i eşlik eden detrusor aşırı aktivitesi nedeniyle antikolinergik tedavilere maruz kalmışlardır. Ürodinamik çalışmalar noktüri, ani sıkışma ve sık idrara çıkma semptomlarına ışık tutmakla beraber, İS/MAS'a ait sistoskopik bulguları ve total ağrıyı yansıtmakta yetersizdir. İşeme günlükleri ile invaziv olmadan hastaların mesane kapasiteleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Lokal anestezi altında yapılacak sistoskopi ile hastaların mesane kapasitesi ve ağrı düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirilebilir[46].

2.2 L-form Bakteriler

Jeolojik kayıtlar ve tahminlere dayanarak bakterilerin 3 milyar yılı aşkın süredir var oldukları düşünölmektedir. Bakterileri diğer prokaryot ve ökaryot canlılardan ayıran bazı özellikler vardır. Peptidoglikan hücre duvarı bakteri hücrelerine şekil veren, bakteri hücre bütönlüğünü ozmotik basınç gibi dış etmenlerden koruyan, hücre bölünmesinde aktif rol alan, β -laktam ve glikopeptid yapılı antibiyotiklerin etkinliğini gösterdiği bir yapıdır. Genel olarak bakteri hücresi 2 gruba ayrılmaktadır. PG hücre duvarı dışında membran tabakaya sahip olanlar gram-negatif bakteriler olarak adlandırılırken, daha kalın PG hücre duvarına sahip ancak dış membranı olmayanlar gram-pozitif bakteriler olarak tanımlanmıştır. Hücre büyümesi ve bölünmesi *MreB* ve *FtsZ* hücre iskeleti proteinlerince düzenlenir. PG hücre duvarı sentezinde yer alan enzimleri kodlayan >10 gen tanımlanmıştır. *Tenericutes* ailesi olarak bilinen *Mycoplasma* ve *Phytoplasma* ise PG hücre duvarına sahip olmamakla birlikte bakteriyal evrim sürecinde hücre duvarlarını

kaybettikleri öne sürülmektedir[56]. PG hücre duvarının ana yapısı uzun iplikli glikan zincirlerin kısa proteinler ile oluşturduğu ağ örgüsüdür. Lipid II , disakkarid pentapeptid yapıda olup bakteri hücre sitoplazmasında birçok enzimatik reaksiyon sonucunda üretilen PG sentezi öncüsüdür. Lipid II hücre membranının dış yüzeyine atılarak burada PG ağ örgü yapısına katılarak hücre duvarı yüzeyinin genişlemesinde rol oynar. Glikozil transferaz ve transpeptidasyon reaksiyonları ile lipid II hücre membranı dış yüzeyinde bulunan penisilin bağlayıcı proteinler aracılığıyla glikan zincirlere bağlanır.

İlk kez 1935 yılında Kleineberger, birçok bakterinin uygun koşullarda hücre duvar yapısını kaybederek L-form (hücre duvarı olmayan) yapıya geçebildiğini tanımlamıştır. Kleineberger, ratların kanlarından günümüzde *Mycoplasma* olarak tanımlanan hücre duvarından yoksun *Pleuropneumonia-like organism (PLO)* ile gram-negatif *Streptobacillus moniliformis* izole etmekle birlikte, pleomorfik yapıda simbiyotik *PLO* varlığını da göstermiştir. 1939 yılında takip eden çalışmalarında *Dienes* ise, pleomorfik varyantların *Streptobacillus moniliformis* tarafından morfolojik form değişikliği ile oluşturulduğunu göstermiştir. Kleineberger bu varyant formları buldukları dönem çalışmalarını Londra Lister Enstitüsü'nde sürdürmüş olduğu için L-form olarak tanımlamıştır[57]. 1986 yılında ise Madoff, bakterinin hücre duvar oluşumunu baskılayarak özelleşmiş bir büyüme paterni göstermesi olarak yeniden tanımlamıştır. Literatürde L-faz, L-varyant, L-organizmalar veya hücre duvarından yoksun (CWD)-formlar olarak birçok tanım yer almıştır. Madoff, L-faz veya L-varyant tanımlarının tüm bakterilerin çevresel değişikliklere adaptasyon sürecinde geliştirebilecekleri doğal durum olarak kabul ederek yanıtıcı olabileceğini öne sürmüştür. CWD formlar hücre duvar yapısından tamamen yoksun olan protoplastlar ve kısmen yoksun olan sferoblastlar olarak iki grubu içermektedir. Ancak bunlardan sadece büyüme ve bölünme yeteneği olanlar L-form olarak tanımlanabilir. L-form ve CWD-form ayrımı bölünme yeteneği göz önünde bulundurularak dikkatle yapılmalıdır. Bakteriler genetik mutasyonlar sonucu irreversibl hücre duvarlarından yoksun hale geldiklerinde stabil L-form olarak, bakterilerin reversibl hücre duvarı oluşturabilen fenotipik varyantları ise stabil olmayan L-form olarak tanımlanmıştır. Litik enzimler veya hücre duvar sentezine etki eden antibiyotikler ile sferoblast veya protoplast bakteri hücreleri oluşabilir. Bu nedenle L-form bakteriler stabil ve stabil olmayan sferoblast veya stabil ve stabil olmayan protoplast olarak dört grupta incelenebilir (**Şekil 2.4**)[58].

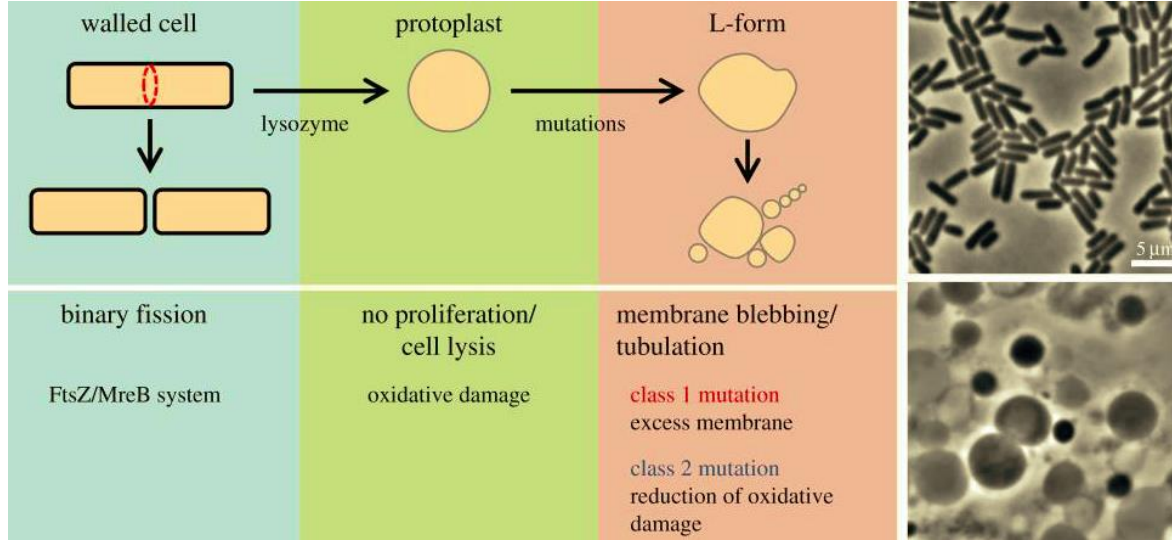


Şekil 2.4 Hücre duvarından yoksun (CWD) bakterinin dört farklı tipte L-form oluşturmasını gösteren şemadır. Allan, E.J., C. Hoischen, and J. Gumpert, Bacterial L-forms. Adv Appl Microbiol, 2009. 68: p. 1-39. [58]'dan alınmıştır.

Richard d'Ari ve ark. *E.coli*'lerin hücre duvar sentezinde öncü olan D-glutamat ve diaminopimelik asit sentezinde bozulmaya yol açabilecek herhangi genetik bozuklukta L-form yayılımının etkilenebileceğini, hücre duvar sentezine etki eden penisilin türevi antibiyotik induksiyonuyla elde edilen L-form *E.coli*'lerin neredeyse %7'sinde az miktarda da olsa peptidoglikan yapı görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu nedenle, hücre duvarı yapamayacak düzeyde az miktarda peptidoglikanın L-form bölünmesinde rol alabildiği düşünülmüştür[59].

L-form bakterilerde meydana gelen mutasyonlar sonucu hücre membran sentezinde görevli yağ asidi sentezinden sorumlu "*AccDa acetyl-CoA carboxylase*" enzimi aktivitesinde artış, Peptidoglikan hücre duvar sentezinde görevli *murE* operon/*murC* genlerinde ve L-form bakterilerin oksidatif strese hassas olması nedeniyle solunum zincir aktivitesinde rol alan *ispA*, *ndh*, *qoxB/ctaB* genlerinde baskılanma görülürken oksidatif stres yanıtta görevli olan *MhqR* transkripsiyon geni baskısı ortadan kalkar. Böylece L-form bakteriler hem yağ asidi sentezi arttırılarak hücre membran yüzey alanı genişletilirken hem de oksidatif strese hassas olan L-form hücrenin oksidatif solunum zincir aktivitesi baskılanarak büyümesi ve kabarcıklanma/tubülasyon ile bölünmesi sağlanır(Şekil 2.5). L-form bakteri izolasyonu ve kültürde üretimi zorlayıcı olsa da hücre duvar sentezini bozan antibiyotikler, litik enzimler, seçilmiş amino asitlerin yardımı ile sukroz veya sodyum

klorür ile de ozmotik denge sağlanarak izolasyon ve koloni üretimi sağlanabilir. Literatürde genitoüriner sistem de dahil olmak üzere birçok sistemik kronik tekrarlayıcı enfeksiyon olgularında etiyojenizde L-form bakterilerin yeri araştırılmıştır. Üriner sistem enfeksiyonlarında idrar osmolaritesinin sağlıklı bireylere göre yüksek olması da bu olasılığı desteklemektedir[57].



Şekil 2.5 Peptidoglikan hücre duvarı olan bakteri hücresinin "binary fission" bölünmesi ile PG hücre duvar yapısını kaybeden protoplast bakteri hücresinin uygun şartlar ve genetik mutasyonlar sonucu L-form yapı oluşturarak kabarcıklanma/tübülasyon ile bölünmesi. Errington et. al. [57]'dan alınmıştır.

Stabil L-form izolasyonu ve kültürü hücre duvar sentezini inhibe edici maddeler eşliğinde indüksiyon, oluşan kolonilerin hücre duvar sentez inhibitörleri içeren ve içermeyen taze besiyerlere alınması, hücre duvar sentez inhibitörleri içermeyen besiyerlerde üreyen L-form kolonilerin seçilmesi ve seçilen kolonilerin farklı besiyerlerde uygun şartlarda üretilmesi olarak dört basamakta yapılabilir. Hücre duvar yapısını kaybeden hücreleri ozmotik basınç etkisinden korumak için sukroz veya sodyum klorür desteği gerekmektedir. Hayvansal kaynaklı serumların özellikle at serumlarının da besiyerlerde büyüme kalitesini arttırmak amacıyla kullanılabildiği bildirilmiştir. Direkt indüksiyon hücre duvar sentezini inhibe edici ve ozmotik basınçtan koruyucu maddeleri içeren besiyerlere yapılan ekimlerde sağlanmaktayken, indirekt indüksiyon yüksek sayıda protoplast veya sferoblast hücrenin ekimiyle sağlanabilir. İndüksiyonda hücre duvarına sahip N-form canlılar ile yavaş büyüyen L-form canlıların ayırımının katı besiyerlerde daha kolay yapılabildiği belirtilse de bazı canlıların sıvı besiyerlerde daha kolay indüklenebildiği belirtilmiştir.

Gram boyama, diamino-2-phenylindole, dienes ile boyanan veya boyanmayan L-form canlıların izolasyonlarında sık ve dikkatli mikroskopik inceleme değerlidir. Stabil hücre sayısı arttıkça ortamdaki indükleyici ajanların miktarı azaltılır. İndüklendikten sonra elde edilen L-form hücrelerin transfer sayısı türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. *Bacillus subtilis* için 10-30 transfer belirtilirken *E.coli* için >100 transfer gerekebilmektedir. *Pseudomonas* cinslerinde ise >100 transfer sonucunda bile stabil L-form canlıların izole edilemediği görülmüştür[58]. *L-form* bakterilerin varlığı biyoteknoloji ve tıp alanında özellikle kronik tekrarlayıcı ve tedaviye dirençli hastalıkların etiolojisinde önem arz etmektedir.

2.3 Besiyerleri

Rutin idrar örneği ekimlerinde kullanılan %5 koyun kanlı agar ve EMB besiyerleri haricinde ayrıca maya varlığı araştırılmasında GYP, SDA kullanılırken[60] L-form bakteri varlığı araştırılmasında EMB Agar, yüksek ozmotik olmayan PG, yüksek ozmotik olan LEM[4] ve agar difüzyon testi ile klinik olarak önemli patojenlerin antibiyotiklere karşı duyarlılığını belirlemek için MHB besiyerleri kullanılmaktadır[61].

2.3.1 Kanlı Agar

Tablo 2.3 Kanlı Agar (110886-MERCK)

20.0 g/L kalp ekstraktı veya peptonlar	15.0 g/L agar
5.0 g/L NaCl	

Kanlı Agar besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.3**). Besiyerinin hazırlanışında 25°C'de pH 6.8(+/- 0.2) 40.0 g toz haldeki besiyeri 1 litre distile su içerisinde ısıtılarak eritildi ve 15 dakika süreyle 121°C'de otoklavda steril edildi.

2.3.2 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

Tablo 2.4 Eosin Methylene Blue (EMB) Agar (70186 SIGMA-ALDRICH)

10.0 g/L pepton	0.065 g/L metilen mavisi
10.0 g/L laktoz	0.4 g/L eozin Y
2.0 g/L dipotasyum monohidrojen fosfat	15.0 g/L agar

EMB Agar besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.4**). Hazırlanışında 25°C'de pH 7.1(+/- 0.2) 37.5 gr toz haldeki besiyeri 1 litre distile su katıldı ve ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi. Son olarak 60 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra çalkalanarak metilen mavisinin oksidasyonu sağlanırken oluşan çökelti askıya alındı.

2.3.3 Sabauroud Dekstroz Agar (SDA)

Tablo 2.5 Sabauroud Dekstroz Agar (SDA) (107315-MERCK)

10 g/L pepton	17.0 g/L agar
20.0 g/L glikoz	

SDA besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.5**). Hazırlanışında 25°C'de pH 5.6(+/- 0.2) 47.0 g toz haldeki besiyeri 1 litre distile su içerisinde ısıtılarak eritildi ve 15 dakika süreyle 121°C'de otoklavda steril edildi.

2.3.4 Pepton Glikoz Buyyon (PG)

Tablo 2.6 Pepton Glikoz Buyyon (PG)

10.0 g/L pepton içeren yüksek ozmotik olmayan besiyeri	5.0 g/L NaCl
5.0 g/L maya özütü	1.0 L distile su
5.0 g/L glikoz	

PG besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.6**). Besiyerinin hazırlanması sırasında tüm malzemeler 1 litre distile su içine katıldı ve tamamen çözülene kadar ısıtıldı. Ardından 15 dakika süreyle 121°C'de otoklavda steril edildi.

2.3.5 Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA)

Tablo 2.7 Glucose Yeast Pepton Agar (GYPA) (M757-HIMEDIA)

10.0 g/L peptik sindirilmiş hayvansal doku	5.0 g/L maya
20.0 g/L dekstroz	15.0 g/L agar

GYPA besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.7**). Hazırlanışında 25°C'de pH 7.0(+/- 0.2) 50.0 gr toz haldeki besiyeri 1 litre distile suya katıldı ve tamamen

çözülene kadar ısıtıldı. Ardından 15 dakika süreyle 121⁰C’de otoklavda steril edildi.

2.3.6 L-form Egg Medium (LEM)

Tablo 2.8 L-form Egg Medium (LEM)

10.0 g pepton içeren yüksek ozmotik besiyeri	8.0 g agar
5.0 g maya özütü	20 mL (50% yumurta sarısı tuzlu çözeltisi)
5.0 g glikoz	50 mL yumurta akı
50.0 g NaCl	1.0 L distile su

LEM besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.8**). Hazırlanması sırasında tüm malzemeler 1 litre distile su içine katıldı ve tamamen çözülene kadar ısıtıldı. Ardından 15 dakika süreyle 121⁰C’de otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığına getirilen besiyeri steril koşullarda hazırlanan 50.0 ml yumurta akı ile homojenize edildikten sonra petri kaplarına döküldü.

2.3.7 Mueller Hinton Buyyon (MHB)

Tablo 2.9 Mueller Hinton Buyyon (MHB) (105437-MERCK)

2.0 g/L et infüzyonu	1.5 g/L nişasta
17.5 g/L kazein hidrolizat	13.0 g/L agar

MHB besiyerinin içeriği tabloda gösterilmiştir (**Tablo 2.9**). Hazırlanışında 25⁰C’de pH 7.4(+/- 0.2) 21.0 g toz haldeki besiyer 1 litre distile su içerisinde ısıtılarak eritildi ve besiyeri kaplarına alınarak 15 dakika süreyle 121⁰C’de otoklavda steril edildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma öncesi Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurulu'ndan 06.12.2016 tarih GO 16/713 kayıt numarası ile onay alındı. Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafınca desteklenmiş olup Üroloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalları ile ortak yürütüldü.

Hasta Grubu

Nisan 2017-Eylül 2017 tarihleri arasında kontrollü prospektif olarak yürütülen çalışmaya 18 yaş üzeri AUA 2011 kriterlerine[9] göre İS/MAS tanısı ile takibe alınmış 25 kadın 1 erkek hasta dahil edildi. İS/MAS semptomlarına yönelik önceden almış oldukları oral veya intrakaviter tedavilerden bağımsız halen semptomatik olan bireyler çalışmaya dahil edilirken hastaların son 30 gün içerisindeki noktüri, ani sıkışma, sıklık ve ağrı şikayetlerini değerlendirmek amacıyla "*O'Leary Sant Symptom and Problem Index*" skorlaması doldurulmuştur[46]. L-form dönüşümüne etkili olabileceği öngörülerek çalışma öncesi rutin aerob idrar kültüründe üreme olan hastalar etki mekanizması hücre duvar sentezi üzerine olmayan kinolon grubu antibiyotiklerle tedavi edildi. Bu hastalardan yalnız birinde kinolon grubu antibiyotik alerjisi nedeniyle sefuroksim aksetil ile görülen patojenin eradikasyonu sağlandıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Ancak etki mekanizması hücre duvar sentezi üzerine herhangi antibiyotik tedavi öyküsü bulunan hastalarda L-form dönüşümü üzerinde etki görülebildiği unutulmamalıdır. Çalışmaya katılan tüm hastalar bu yönden sorgulanmış ve bir hasta kontrollü olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

İS/MAS tanısı olan 26 hastadan ilk muayenelerinde rutin idrar aerob kültür, idrar mantar kültürü ve idrar tüberküloz kültürü için orta akım idrar örnekleri alınarak uygun şekilde gönderildi. Orta akım idrar kültürlerinde üreme görülmeyen hasta grubundan ikinci muayenelerinde steril şartlarda üretral kateter ile yeterli miktarda idrar örneği alınmasını takiben semptomatik hastalara rutinde hastalığın takibinde yer alan sistoskopi işlemi lokal veya genel anestezi altında yapıldı. 24 kadın ve 1 erkek hastaya %5 lidokainli steril jel ile lokal anestezi sağlanarak *Karl-Storz* 11272c1 model analog tip fleksibl video sistoskopi yapılırken, 1 kadın hastaya tüm gerekli onamları ve anestezi hazırlığı yapılarak genel anestezi altında *Karl-Storz* 300 optik eşliğinde 22 F rijit sistoskopi yapıldı. Önceden patoloji tanısı olmayan hastalarda, mesanede görülen şüpheli alanlardan *punch* biyopsi

alınarak biyopsi örneği hem patolojik inceleme hem de mikrobiyolojik inceleme için bekletilmeden uygun şartlarda laboratuvara gönderildi.

Kontrol Grubu

Kontrol grubu olarak 18 yaş üstü sağlıklı, önceden sık sistit öyküsü ve halen herhangi bir üriner sistem enfeksiyonu yakınması olmayan 25 kadın dahil edildi. Sağlıklı ve üriner sistem enfeksiyon yakınması olmayan 25 erişkin kadın bireyden uygun şartlarda orta akım steril idrar örnekleri alınarak araştırmada gerçekleştirilen mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile L-form bakteri varlığı ve PCR çalışıldı.

3.1 Mikrobiyolojik Kültür Yöntemleri

Çalışmada rutin idrar örneği ekimlerinde kullanılan %5 koyun kanlı agar ve EMB besiyerleri haricinde ayrıca SDA, PG, GYPA, LEM ve MHB kullanılmıştır.

3.1.1 Hasta Grubunda Uygulanan Kültür Yöntemleri

Hastalara ait tüm idrar örnekleri steril şartlarda Pepton Glikoz Buyyon transport besiyeri ve steril idrar kabına, ayrıca doku örneği Pepton Glikoz Buyyon içine alınarak laboratuvara işlem sonrası 30 dakika içinde ulaştırıldı. Tüm idrar ve doku örnekleri kanlı agar, EMB agar, SDA besiyerlerine rutin mikrobiyolojik inceleme yapmak amacıyla ekildi.

L-form bakterilerin incelenmesi

Tüm idrar ve doku klinik örneklerinde *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Staphylococcus* cins ve türlerine ait L-form bakteri varlığı araştırıldı[58].

Sistoskopi öncesi 10%'luk povidin iodin ile perine temizliğinin ardından tek kullanımlık 14 F üretral kateter ile üretra yolu ile mesaneden alınan idrar örneklerinden uygun şartlarda önceden mikrobiyoloji laboratuvarında hazırlanmış olan Pepton-Glikoz (PG) sıvı besiyerleri içeren taşıma tüplerinin her birine 10 µl örnek steril pipet ucu ile ekildi.

Doku örnekleri, fleksibl ve rijit sistoskoplardan içerisinden geçebilen *punch* biyopsi aletleri ile mesane mukozasından alınarak PG sıvı besiyerlerine ekildi.

Klinik örneğin laboratuvara ulaştığı ilk gün, hastanın hem idrar hem doku örneğinden kanlı agar, EMB Agar, SDA, LEM ve GYPA besiyerlerine ekim yapıldı.

PG besiyerindeki idrar ve doku klinik örnekleri, 35-37 °C'de 24 saat inkübasyon

sonrası 2. günde bulanıklık görülmesi halinde kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Hastalardan alınmış olan PG besiyerindeki tüm idrar ve doku örnekleri 10.gün kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekildi.

İzlemde üreme görülen klinik örneklerde patojen olabileceği düşünülen mikroorganizmalar PG besiyerinde yeniden üretildikten sonra 0,2 µm por aralığına sahip minipor filtrelerden geçirilerek L-form tespiti için kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine yeniden ekimleri yapıldı. Bu ekimler sırasında üreme görülen tüm besiyerlerindeki koloniler sayılarak kantitatif değer belirlendi ve koloniler Gram boyama yapıldıktan sonra ‘‘MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, Biomerieux Biosciences, ABD)’’ ile tür düzeyinde tanımlanma yapıldı.

3.1.2 Kontrol Grubunda Uygulanan Kültür Yöntemleri

Kontrol grubundan yalnız orta akım idrar örnekleri PG sıvı besiyerleri içine alındı. Kontrol grubunda herhangi bir doku örneği alınmadı. Orta akım idrar örnekleri PG sıvı besiyerlerine 10 µl ekilerek mikrobiyoloji laboratuvarına transfer edildi. Klinik örneğin laboratuvara ulaştığı ilk gün, hastanın idrar örneğinden kanlı agar, EMB agar, SDA, LEM ve GYPA besiyerlerine ekim yapıldı. PG besiyerindeki idrar örnekleri, 35-37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası 2. günde bulanıklık görülmesi halinde kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Hastalardan alınmış olan PG besiyerindeki tüm idrar örnekleri 10.gün kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine ekildi.

Bu ekimler sonrasında üreme görülen tüm besiyerlerindeki koloniler kantitatif olarak sayılarak cfu/ml cinsinden koloni sayısı belirlendi. 100.000 cfu/ml üzerinde üreme olan koloniler Gram boyama yapıldıktan sonra ‘‘MALDI-TOF MS (Biomerieux Biosciences, ABD)’’ ile tür düzeyinde tanımlandı.

3.1.3 Çevre Örneklerinde Mikrobiyolojik Kültür Yöntemleri

İnvaziv girişim sırasında hastalara uygulanan sistoskop, forseps ve bunların konulduğu dezenfektan çözültiden *Stuart* transport besiyeri ve PG besiyerine kontrol örnekleri alındı. Hem *Stuart* besiyerine hem PG besiyerine alınan tüm çevre örnekleri kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine pasajlandı. PG besiyeri içinde inkübe edilen örnekler 2. gün ve 10. gün bulanıklık görülmesi halinde aynı besiyerlerine pasajlandı.

3.2 Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rt-PCR)

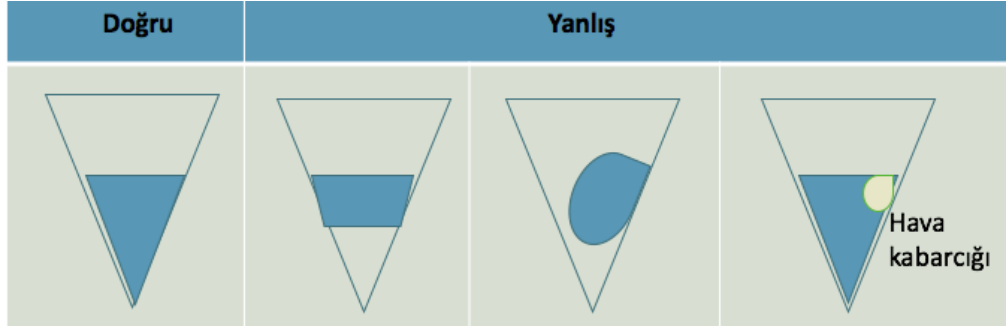
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) için 2ml t-tampon steril Tris EDTA içeren falkon tüplerine alınan hasta grubuna ait idrar ve doku örneklerinde *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP) ve *Trichomonas vaginalis* (TV) gibi bakterilerin varlığı “Allplex™ STI Essential Assay CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD)” ile çalışıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Allplex™ STI Essential Assay CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD)

Allplex™ STI Essential Assay			
Sembol	İçerik	Hacim	Açıklama
PRIMER	4x STI-EA MOM	250 µl	MuDT Oligo Mix(MOM): Amplifikasyon ve reaktifin bulunması
PREMIX	EM1	250 µl	-DNA polimeraz -Urasil-DNA glikozilaz -dNTP içeren tampon
CONTROL +	STI-EA PC	25 µl	Patojen klon karışımı
WATER	RNase-free Water	1000 µl	Ultra saf kalite,PCR
CONTROL IC	ASTI IC	500 µl	İnternal kontrol

İnvaziv girişim sırasında alınan ve -80 °C’de saklanan tüm idrar ve doku örnekleri 19-25 °C oda ısısına getirildi. Fragmente edilen doku örnekleri ve idrar örneklerinden 1 mL alınarak 15 dakika 15,000 xg (13,000 rpm) santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan süpernatant kısım atılarak tüplerin dibinde bulunan çökelti (pellet) 200µl serum fizyolojik içinde süspanse edildi. “NucliSENS easyMAG (Biomerieux Biosciences, ABD)” otomatik nükleik asit ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen nükleik asitlerin amplifikasyonu “Allplex™ STI Essential Assay CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad, ABD)” ile analiz edildi. Örneklerde iç kontrol sağlanması için kit içerisinde hazır bulunan ASTI IC her örneğe 10 µl “Allplex™ STI Essential Assay” nükleik asit

ekstraksiyonu öncesi eklendi. Çapraz kontaminasyona dikkat edilerek hasta ve kontrol örnek sayısı göz önüne alınarak her örnek için 5 µl 4X STI-EA MOM, 5 µl EM1 ve 5 µl RNase içermeyen saf su kullanarak 15 µl PCR karışımı hazırlandı. Beş kat hızda ters çevrilerek santrifüj edilen PCR karışımı PCR tüplerine dağıtılarak üzerlerine her örneğe ait 5 µl nükleik asit eklendi. 20 µl hacimdeki test tüpleri santrifüj edilerek en altta kalan hava kabarcığı uzaklaştırıldı(Şekil 3.1). Daha sonra örnekler “CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad, ABD)” ile çalışıldı.



Şekil 3.1 Doğru santrifüj tekniği

3.3 Verilerin Analizi

Hasta ve kontrol grubu açısından idrar PCR dağılımları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırılma yapılırken yüzde ve frekanstan yararlanıldı. Niteliksel ölçümler için ise sayı ve yüzdeler verilmiştir. Hasta grubunda üreme olanlarla olmayanların sistoskopi bulguları karşılaştırılırken Fisher exact test kullanıldı. Verilerin analizinde bilgisayar-tabanlı bir istatistik paketi olarak SPSS 22.0 kullanılmıştır.

4.BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 26 İS/MAS hastasının 25'i kadın 1'i erkek iken kontrol grubundaki 20 bireyin hepsi kadındı. Çalışma grubundaki 26 hastanın 24'ünden sistoskopi eşliğinde mesane biyopsisi ile doku örneği alınırken kontrol grubundaki hiçbir bireyden biyopsi ile doku örneği alınmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 25 kadın hastanın 4'ünün çalışma öncesi rutin idrar kültürü taramalarında üreme saptanmıştır (**Tablo 4.1**). Bu üremeler %5'lik koyun kanlı agar ve EMB agar ile yapılan ekimlerde 3 hastada *E.coli* 10⁵ cfu/ml ve 1 hastada *K.pneumonia* 7x10⁴ cfu/ml olarak rapor edilmiştir. Kültür sonuçlarındaki antibiyotik duyarlılıklarına göre değerlendirildiğinde bakteriyal hücre duvar sentezine etkinliği olan antibiyotiklerin L-form dönüşümü üzerinde etkili olabilmesi nedeniyle bakteriyal topoizomerazlara etkisi ile DNA sentezinde inhibisyona yol açan kinolon grubu antibiyotik tedavisi oral yoldan uygulanmıştır[59]. Yalnızca *K.pneumoniae* üremesi olan hastanın kinolon grubu antibiyotiklere alerjik durumu nedeniyle mevcut antibiyogramı doğrultusunda hücre duvar sentezi üzerine etkisi olan sefuroksim aksetil ile oral yolla tedavi edilmiştir. Söz konusu 4 hasta uygun antibiyotik tedavisi tamamlandıktan sonra %5'li koyun kanlı agar ve EMB agar ile ekimleri yapılan steril idrar örneklerinde üremeleri olmaması üzerine çalışmaya dahil edilmişler.

Tablo 4.1 Hasta ve kontrol grubu demografik özellikler

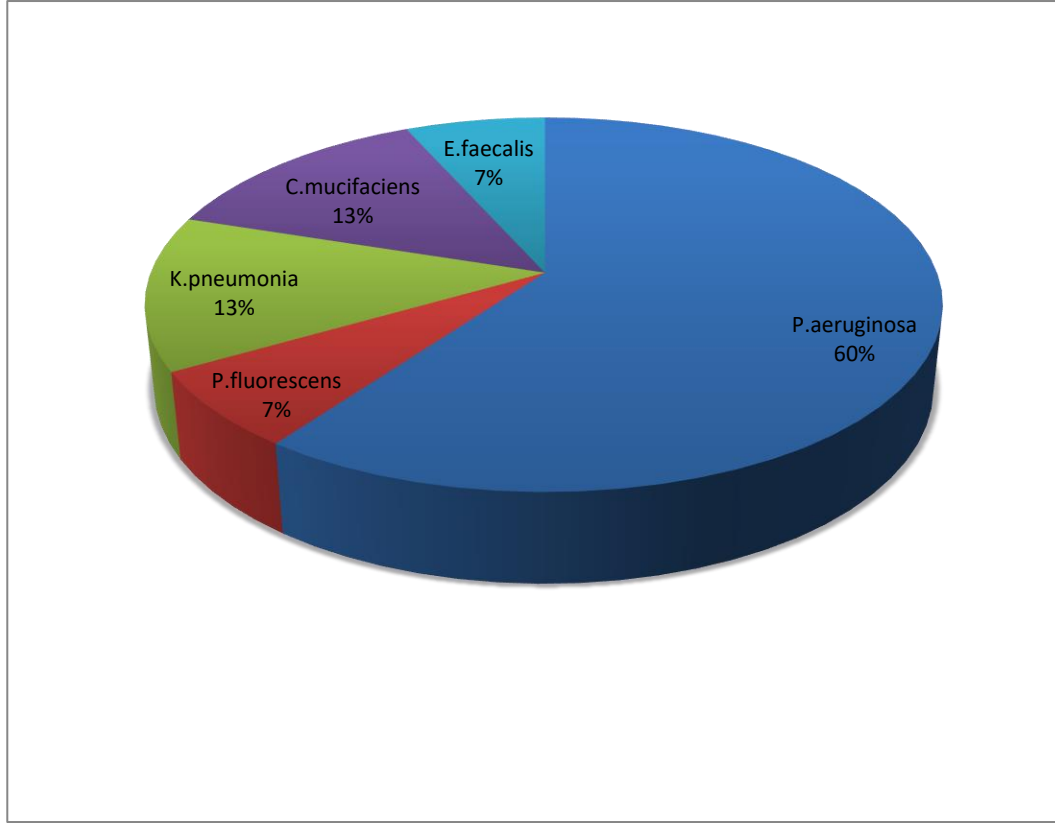
	Hasta	Kontrol
Sayı (n)	26	25
Cinsiyet		
K	25	25
E	1	-
Yaş Aralığı	26-70	23-51
Ortalama	45,5±10.5	36,55±8.4
Şikayet süre(ay)	6-180	-
Ortalama	90,53±50.4	-
İlk başvuru kültür		
Üreme yok	22	20
<i>E.coli</i>	3	1
<i>K.pneumonia</i>	1	-
Kontaminasyon	-	4

Kontrol grubunda yer alan 18 yaş üstü herhangi üriner sistem enfeksiyon bulgusu olmayan sağlıklı 25 kadın bireyden alınan orta akım idrar örnekleri çalışma grubundaki hastalarla aynı ekim protokollerine tabi tutularak değerlendirilmiştir. Beş kontrol örneğinin 4'ünde %5'lik kanlı agar ve EMB agar ekimlerinde ≥ 3 cins üreme görülerek kontaminasyon olarak kabul edilmiş iken 1 kontrol örneğinde *E.coli* 10^5 cfu/ml üremesi saptanmıştır. Söz konusu 5 örnek çalışma dışı bırakılmış olup, %5'lik kanlı agar ve EMB agar ekimlerinde üreme saptanmamış olan kontrol grubundaki sağlıklı 20 bireye ait -80 °C'de saklanan numuneler ile RtPCR çalışılmıştır.

26 hastanın 24'ünden hem doku hem idrar örneği, 2 hastadan yalnızca idrar örneği ve 20 kontrol grubundan alınan idrar örnekleri ekim sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubunda patojen üreme olmadığı saptanmıştır. Hasta grubundaki bireylerden alınan doku ve/veya idrar örneklerinin kanlı agar, GYPA, EMB, LEM, PG besiyerlerine gerçekleştirilen 1.-2.-10. gün pasajlarında 13 hastada üreme görüldü (**Tablo 4.2**). PG sıvı besiyerinde üreme görülen örneklerin kanlı agar, GYPA, EMB, LEM besiyerlerine 2. ve 10. gün yapılan ekimlerinde aynı mikroorganizmalara ait üremeler rapor edildi. Bu üremelerin 9'unda(%60) *P.aeruginosa* 10^5 cfu/ml(1 hastada *C.mucifaciens*, 1 hastada ise *E.faecalis* birlikteliğinde), 1(%7) hastada *P.fluorescens* 10^5 cfu/ml, 2(%13) hastada *K.pneumoniae* 10^5 cfu/ml, 2(%13) hastada *C.mucifaciens* 10^5 cfu/ml ve 1(%7) hastada ise *E.faecalis* 10^5 cfu/ml üremeleri tanımlandı(**Şekil 4.1**). Doku ve/veya idrar örneklerinde üreme saptanan 13 hastanın 1'inde (*P.aeruginosa* ve *E.faecium* üremesi olan) idrar Rt-PCR incelemesinde *U.parvum* tespit edildi. (**Tablo 4.2**).

Tablo 4.2 Üreme olan hasta grubu kültür ekimleri ve Rt-PCR sonuçları

Hasta No	1.Gün kültür sonuçları		2.Gün kültür sonuçları		10.Gün kültür sonuçları		Rt-PCR sonuçları	
	İdrar	Doku	İdrar	Doku	İdrar	Doku	İdrar	Doku
1	N	N	N	<i>P.fluorescens</i>	N	N	N	N
2	N	N	N	N	<i>C.mucifaciens</i>	<i>C.mucifaciens</i>	N	N
3	N	<i>P.aeruginosa</i>	N	<i>P.aeruginosa</i> <i>E.faecalis</i>	N	N	<i>U.parvum</i>	N
4	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	N	N
5	N	N	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	N	N
6	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	N	N	N	N
7	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	N	N	N	N	N
8	<i>C.mucifaciens</i>	<i>C.mucifaciens</i>	N	<i>P.aeruginosa</i>	N	N	N	N
9	N	N	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i>	N	N	N
10	N	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	N	N	N	N
11	N	N	N	N	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	N	N
12	N	N	N	<i>K.pneumoniae</i>	N	<i>K.pneumoniae</i>	N	N
13	<i>P.aeruginosa</i>	-	<i>P.aeruginosa</i>	-	N	-	N	N



Şekil 4.1 Üreme olan hasta grubundaki kültür sonuçları

Çalışma öncesi %5'lik kanlı agar ve EMB agarda üreme görülen ve uygun antibiyotik tedavisini takiben yapılan kültürlerde üreme görülmeyerek çalışmaya dahil edilen hastalardan ikisinde yapılan ekimlerde tekrar üreme görülmüştür. Bu hastalardan birinde çalışma öncesinde *E.coli* 10^5 cfu/ml oral kinolon grubu antibiyotik ile tedavi edilmiş olup takiben çalışma öncesi kontrol kültürde üreme olmaması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiş ve 10.gün idrar ve doku ekimlerinde *P.aeruginosa* 10^5 cfu/ml saptanmıştır. Diğer hasta ise çalışma öncesi *K.pneumoniae* 7×10^4 cfu/ml üremesi nedeniyle oral sefuroksim aksetil ile tedavi edilmiş olup takiben çalışma öncesi kontrol kültüründe üremesi olmaması ancak semptomatik olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmiştir. 2.gün idrar ve doku ekimleri ile 10.gün idrar ekimlerinde *K.pneumoniae* 10^5 cfu/ml saptanmıştır.

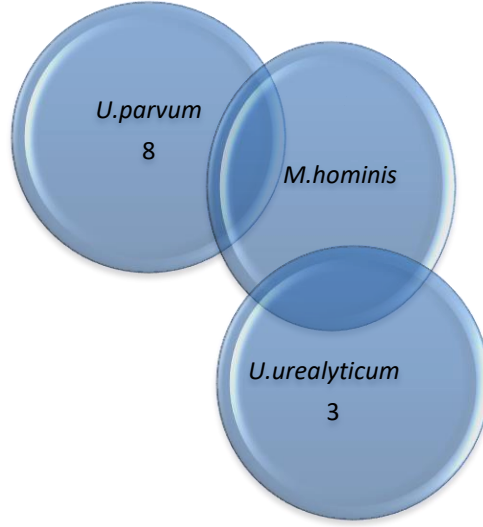
1.-2.-10. gün ekimlerinde üreme görülen örneklerde patojen olabileceği düşünülen mikroorganizmalar PG besiyerinde yeniden üretildikten sonra 0,2µm por aralığına sahip minipor filtrelerden geçirilerek L-form tespiti için kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine yeniden ekimleri yapıldı. Ancak herhangi üreme tespit edilemedi.

İnvaziv girişim sırasında hastalara uygulanan sistoskop, forseps ve bunların konulduğu dezenfektan çözeltilerden *Stuart* transport besiyeri ve PG besiyerine alınmış olan kontrol örnekleri kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine pasajlandı. PG besiyeri içinde inkübe edilen örnekler 2. gün ve 10. gün bulanıklık görülmesi halinde aynı besiyerlerine pasajlandı. Alınan örneklerde hastalarda üretilen suşlara rastlanmadı ve patojen olduğu düşünülen bir üremeye rastlanmadı.

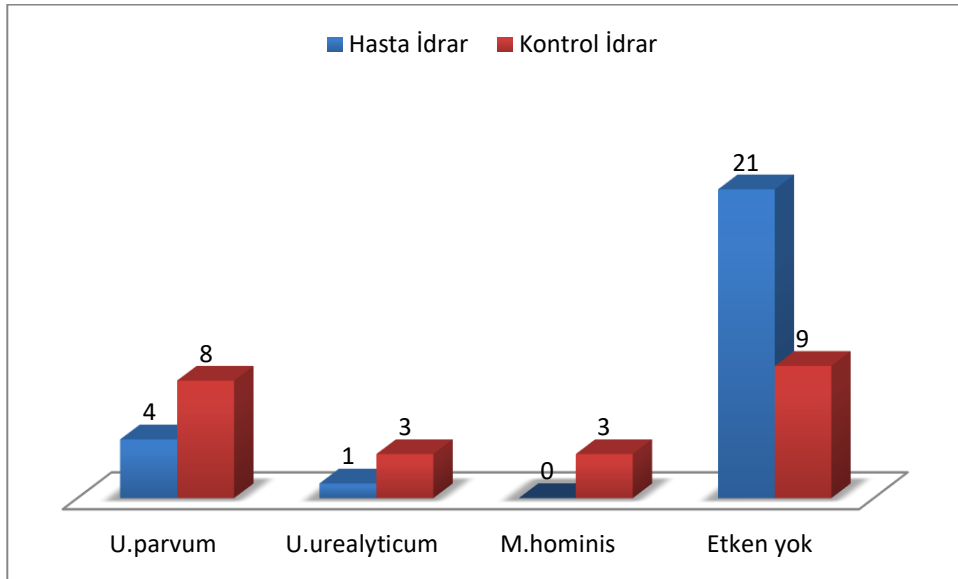
Hasta grubundan alınan idrar ve doku örnekleri ile kontrol grubundan alınan idrar örnekleri Rt-PCR sonuçları tabloda gösterilmiştir (**Tablo 4.3**). Kontrol grubu ve hasta grubun idrar Rt-PCR'ında 20 kontrolün 11'inde etken tespit edilirken 9 kişide tespit edilmemiştir. Hasta idrar örneklerinin ise 5'inde etken tespit edilirken 21 örnekte etken saptanmamıştır. Hasta ve kontrol idrar Rt-PCR sonucunda etken tespit edilip edilmemesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.01). Etken olarak ise hasta grubu idrar örneklerinin 4'ünde (%15) *U.parvum* 1'inde (%4) *U.urealyticum* saptanmıştır. Hasta doku örneklerinde herhangi bir pozitif sonuç elde edilememiştir. Kontrol grubundan alınan 20 idrar örneğinin 11'inde Rt-PCR sonuçları pozitif saptanmıştır. 11 kişinin 8'inde(%72) *U.parvum* saptanmış olup 1 tanesinde *U.parvum* beraberinde *M.hominis* varlığı tespit edilmiştir. 3 örnekte ise *U.urealyticum* tespit edilmiş olup bunların 2'sinde beraberinde *M.hominis* de tespit edilmiştir. Sonuç olarak *M.hominis* 3 örnekte diğer etkenlerle birlikte tespit edilmiştir (**Şekil 4.2**). Hasta idrar ve kontrol idrar Rt-PCR sonuçlarının karşılaştırılması **Şekil 4.3**'te vermiştir. İdrarında *U.parvum* tespit edilen hastalar ve kontrol karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (p:0.09).

Tablo 4.3 Hasta ve kontrol grubu Rt-PCR sonuçlarının dağılımı

	Hasta idrar	Hasta doku	Kontrol idrar
Toplam(n)	26	24	20
U.parvum	4	-	8
U.urealyticum	1	-	3
M.hominis	-	-	3



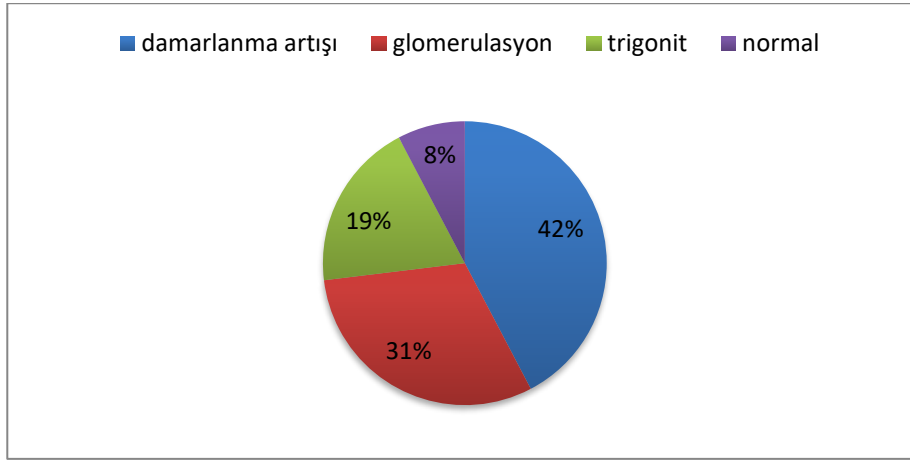
Şekil 4.2 Kontrol İdrarındaki Rt-PCR sonuçlarının dağılımı



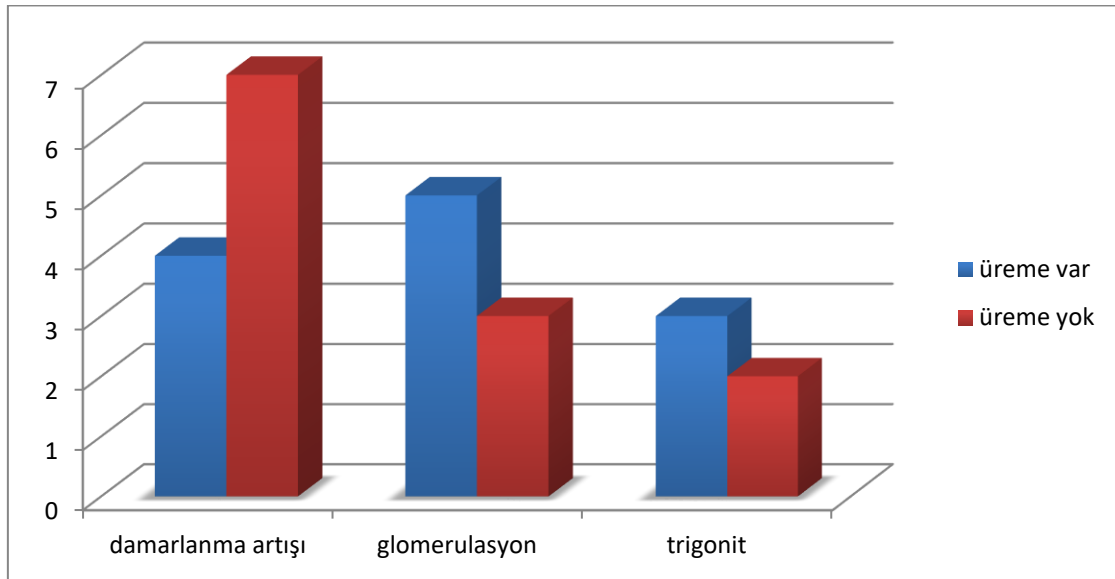
Şekil 4.3 Hasta idrar ve kontrol idrar Rt-PCR sonuçlarının karşılaştırılması

Hasta grubunun tümüne yapılmış olan sistoskopi bulguları normal, damarlanma artışı, glomerulasyon ve trigonit olarak gruplandırıldı (Şekil 4.4). 26 hastanın 2'sinde sistoskopide normal bulgulara rastlanması nedeniyle biyopsi örneği alınmadı. Sistoskopi

bulgusu normal olan hastaların 1'inden alınan idrar örneğinin kültür ekimlerinde *P.aeruginosa* üretilmiştir. İdrar ve/veya doku kültür sonuçları (üreme var/yok) sistoskopi bulgularıyla karşılaştırılarak değerlendirildi (**Şekil 4.5**). Damarlanma artışı gözlenen 11 olgunun 4'ünde (%36) üreme var iken 7 (%64) olguda üreme tespit edilmemiştir. Glomerulasyon izlenen 8 olgunun 5'inde (%62) üreme var iken 3 (%38) olguda üreme tespit edilmemiştir. Trigonit izlenen 5 olgunun ise 3'ünde (%60) üreme var iken 2 (%40) olguda üreme bulunmamıştır. Fisher exact test ile gruplar daki üreme olup olmaması karşılaştırıldı. Damarlanma artışıdaki üreme olup olmaması ile glomerulasyondaki üreme olup olmaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir (p:0.36). Damarlanma artışıdaki üreme olup olmaması ile trigonit grubunda üreme olup olmaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir (p:0.59).



Şekil 4.4 Hasta grubunun sistoskopi bulgularının dağılımı



Şekil 4.5 İdrar ve/veya doku kültür sonuçlarının (üreme var/yok) sistoskopi bulgularına göre dağılımı.

5.TARTIŞMA

İS/MAS, etyopatogenezi halen karışık ve literatürde net olarak ortaya konulamamakla birlikte semptomatik hastaların sosyal yaşantılarını ileri düzeyde bozan ve ciddi tedavi harcamalarına yol açan bir tablodur. Literatürde etioloji ve tedavi ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte enfeksiyonların etiolojideki yeri günümüzde halen net olarak belirli değildir[33]. Üriner sistem enfeksiyonlarının klinik araştırılmasında alınan steril idrar örnekleri rutinde 35-37 °C'de 24 saat inkübasyonda tutulmaktadır ve bu örneklerde $<10^4$ sayıda üropatojen görülmesi halinde 48 saate kadar inkübasyona devam edilmektedir[62]. Mikrobiyolojik araştırmada rutin idrar kültürleri olarak %5 koyun kanlı agar ve gram negatif mikroorganizmaların varlığı açısından MacConkey veya EMB besiyeri kullanılmaktadır[63]. Literatürde genitoüriner sistem de dahil olmak üzere birçok sistemik kronik tekrarlayıcı enfeksiyon olgularında etiyogenezde L-form bakterilerin yeri araştırılmıştır. Üriner sistem enfeksiyonlarında idrar osmolaritesinin sağlıklı bireylere göre yüksek olması da bu olasılığı desteklemektedir. L-form bakteri izolasyonu ve kültürde üretimi zorlayıcı olsa da hücre duvar sentezini bozan antibiyotikler, litik enzimler, seçilmiş amino asitlerin yardımı ile sukroz veya sodyum klorür ile de ozmotik denge sağlanarak izolasyon ve koloni üretimi sağlanabilir. Bu nedenle hücre duvar yapısını kaybetmiş L-form bakteri varlığının araştırılmasında farklı kültürlerde çalışma gerekmektedir.

SDA ve GYP A besiyerleri klinik örneklerde maya varlığı araştırılmasında kullanılmaktadır[60]. Wang. ve ark.'nın kolesistektomi materyallerinde L-form *H.pylori* varlığını araştırdıkları çalışmada *H.pylori* izolasyonu için kanlı agar, kandida suşlarının izolasyonu için SDA, L-form *H.pylori* izolasyonu için yüksek ozmotik olan LEM ve yüksek ozmotik olmayan PG sıvı besiyeri kullanmış olup LEM ve PG sıvı besiyerine ekilecek olan örnekler 0.22 µm filtrelerden geçirildikten sonra yapılan ekimlerde PG sıvı besiyerinde stabil L-form *H.pylori* varlığını göstermişlerdir. Hilt ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada standardize olarak 0.001 ml idrarın %5 koyun kanlı agar ve MacConkey agar kullanılarak yapılan ekimlerinin 35°C'de 24 saat inkübasyon sonuçları ile 0.1ml idrarın %5 koyun kanlı agar, çikolata agar, Enterokok ve Laktobasil duyarlılığı yüksek olan kolistin-nalidiksik agar kullanılarak yapılan ekimlerin %5 CO₂ altında 35°C'de 48 saat inkübasyon sonuçları karşılaştırılmıştır. Ayrıca %5 koyun kanlı agar kullanılarak 0.1ml idrar ekimi 35°C ve 30°C ısıda 48 saat inkübe edilmiş olup bir başka 0.1 ml idrar örneği ise anaerob %5 koyun kanlı agar kullanılarak ekilmiş olup %5 O₂, %10

CO₂, %85 N altında 35⁰C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Yapılan ekimlerin sonucunda 35 farklı cins ve 85 farklı tür izole edilmiştir. Rutin kültür yöntemleriyle izole edilememiş birçok bakterinin izolasyonunda CO₂ veya anaerob koşullara ve uzamış inkübasyona ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. En sık olarak *Lactobascillus* (%15), *Corynebacterium* (%14.2), *Streptococcus* (%11.9), *Actinomyces* (%6.9) ve *Staphylococcus* (%6.9) izole edilmiştir[64].

P.aeruginosa ve *K.pneumonia*, üriner sistem enfeksiyonlarında sıkça rastlanan patojenlerdir. Mulyukin ve ark. *P.aeruginosa* tedavisinde siprofloksasin kullanımını sonucu uyku halinde *dormant* kist benzeri hücre yapısı ve kültür yapılamayan hücre yapılarının oluşabildiğini belirtmişlerdir. Tip 1 ve tip 2 *persister* hücrelerin antibiyotik tedavisi altında yaşayabildiği ve *dormant* formda kalabildiği görülmüştür. Bir aylık inkübasyon sonunda tip 2 *persister* hücrelerin kültürde katlanarak çoğaldığı, immatur kist benzeri hücre ve L-form yapıda görüldükleri belirtilmiştir. Bu nedenle *P.aeruginosa dormant* formları hem siprofloksasin hassas hem de siprofloksasin dirençli olsalar dahi antibiyotik altında mikrokoloniler veya düşük boyutlu regüler koloniler oluşturarak latent enfeksiyonlara yol açabilmektedir[65].

Corynebacterium urealyticum yavaş üreyen fırsatçı bir patojen olup özellikle yaşlı, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi almakta olan ve hospitalize olan bireylerin %30'una varan oranda cilt florasında kolonize olmakla beraber akut sistit, pyelonefrit ve renal transplantasyon sonrası immünsuprese bireylerde görülebilen enkruste sistit olgularında izole edilebilmektedir[66]. Çalışmamızda yer alan hasta grubundaki iki hastanın hem idrar hem doku örneklerinden izole edilen *C.mucifaciens*'in literatürde üriner sistem enfeksiyonu etiyojisinde herhangi bir yer almadığı görülmektedir. Ancak *Corynebacterium* türlerinin yavaş üreyen, rutin kültürlerde bakteriyal yüklerinin az olduğu durumlarda izole edilemeyebildiği ve atlanabildiği unutulmamalıdır. Bu nedenle İS/MAS olgularında kültür çalışmaları daha dikkatli yapılarak etiyojide *Corynebacterium* türlerinin yeri araştırılmalıdır.

Hasta grubundan alınan idrar ve doku örneklerinin rutin idrar kültüründe yer alan %5 koyun kanlı agar ve EMB agar da üreme olmaması halinde maya varlığının dışlanması için GYPA ve SDA besiyerlerine ekimleri yapılarak, L-form mikroorganizma varlığının araştırılması için LEM ve PG sıvı besiyerlerine de ekim yapılmıştır. L-form bakterilerin protoblast formları tamamıyla hücre duvarından yoksun iken sferoblast formları kısmi

hücre duvarına sahiptirler. Besiyerin ozmotik yükünün var olan bakterinin L-form'da üretilebilmesi açısından önemi büyüktür. Bu nedenle yüksek ozmotik yüklü LEM besiyeri ve yüksek ozmotik yüklü olmayan PG sıvı besiyerleri kullanılmıştır. 2. Gün PG sıvı besiyerlerinde bulanıklık görülmesiyle birlikte kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine tekrar ekim yapıldı. İdrar ve/veya doku örneklerinde üreme gözlenen 13 hastanın 3'ünde 1.gün ekimlerinde üreme izole edilmeye başlanmıştır. 1.-2.-10. gün ekimlerinde üreme görülen örneklerde patojen olabileceği düşünülen mikroorganizmalar PG besiyerinde yeniden üretildikten sonra 0,2µm por aralığına sahip minipor filtrelerden geçirilerek L-form tespiti için kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine yeniden yapılan ekimlerinde herhangi üreme tespit edilemedi. Ancak Gutman ve ark. kronik üriner sistem enfeksiyonu olan 57 hastanın idrar örneklerini hücre duvarına sahip mikroorganizmaları ayırmak amacıyla 0.45µm filtrelerden süzerek incelemiş olup 11 hastada *L-form Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Enterococcus faecalis* izole etmiştir[41]. Rutin kültürde üretilemeyen mikroorganizmaların üretilmiş olması L-form bakteri varlığını dışlatamamaktadır. Hasta grubunda olup çalışma öncesi rutin kültürde *K.pneumonia* 10⁵ cfu/ml üreme saptanan hastaya mevcut antibiyogramına uygun olarak hücre duvar sentezine etkili antibiyotik tedavisi uygulanmış olup çalışma öncesi kontrol kültürde söz konusu mikroorganizma eradike olmuştur. Ancak çalışma sırasında LEM ve PG sıvı besiyerlerine yapılan ekimlerde aynı mikroorganizmanın yeniden izole edilmesi hücre duvar yapısını kaybetmiş standart besiyerlerde üretilemeyen L-form bakteri varlığını da desteklemektedir. Errington ve ark.'nın L-form bakteri çalışmasında indüklendikten sonra elde edilen L-form hücrelerin transfer sayısı türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. *Bacillus subtilis* için 10-30 transfer belirtilirken *E.coli* için >100 transfer gerekebilmektedir. *Pseudomonas* cinslerinde ise >100 transfer sonucunda bile stabil *L-form* canlıların izole edilemediği görülmüştür[58]. Bu nedenle çalışmamızın sonucunda izole etmiş olduğumuz *P.aeruginosa* suşlarının rutin kültürlerde üretilemeyip L-form izolasyonunda kullanılan LEM ve PG sıvı besiyerlerinde izole edilmiş olması L-form yapıdaki mikroorganizmaların İS/MAS etiyojenezinde yer alabileceğini desteklemektedir.

Hasta ve kontrol grubunda Rt-PCR ile cinsel yolla bulaşan hastalıklarda patojen olarak kabul edilen ve İS/MAS tanısında eradikasyonları gereken başlıca ajanların varlığı araştırılmıştır. Alınan örneklerde *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP) ve *Trichomonas vaginalis* (TV) varlığı

incelendiğinde kontrol grubunda hasta grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuşlardır.

İnvaziv girişim sırasında hastalara uygulanan sistoskop, forseps ve bunların konulduğu dezenfektan çözeltiden *Stuart* transport besiyeri ve PG besiyerine alınmış olan kontrol örnekleri kanlı, EMB, LEM ve GYPA besiyerlerine pasajlandı. PG besiyeri içinde inkübe edilen örnekler 2. gün ve 10. gün bulanıklık görülmesi halinde aynı besiyerlerine pasajlandı. Alınan örneklerde hastalarda üretilen suşlara rastlanmadı ve patojen olduğu düşünülen bir üremeye rastlanmadı.

Sistoskopi bulguları ve kültür sonuçları arasında anlamlı fark bulunmamakla beraber Patnaik et al.'nın 2017'de yaptıkları araştırmada yeni tanı konulan İS/MAS olgularının >90%'ın non-ülseratif tip olduğu zaten belirtilmiştir[11]. Güncel bilgiler dahilinde Hunner ülseri veya glomerulasyon varlığının bulunmadığı hastalarda İS/MAS tanısı dışlanamamaktadır.

Literatürde başka bir çalışmada, İS olguların mesane doku biyopsilerinin %29'unda gram-negatif bakteriyel 16S rRNA varlığı gösterilmiştir. Ayrıca İS hasta grubunun hepsinde ve bir kontrol hastasının mesane doku kültürlerinde 0.22 mikron filtreden geçebilen, nükleik asit içeren, muhtemelen hücre duvar yapısını kaybetmiş yapılar henüz tanımlanmamış olası bir mikrobiyal ajanın varlığını desteklemektedir[36].

İS/MAS hastalarında, etiyolojide olası enfeksiyöz ajanların araştırılmasında rutinde kullanılan %5 koyun kanlı agar ve EMB agar ile üreme gösterilemeyen olgularda, idrar ve/veya mesanedeki şüpheli alanlardan sistoskopi eşliğinde elde edilecek biyopsi örneklerinde L-form bakteri izolasyonu ve koloni üretimi için hücre duvar sentezini bozan antibiyotikler, litik enzimler, seçilmiş amino asitler, sukroz veya sodyum klorür ile ozmotik denge sağlanarak hazırlanmış besiyerlerinin kullanımı ile patojen saptanabilmektedir.

İS/MAS hastalarında sistoskopinin rutin uygulanması halen soru işaretidir. Çalışmamızın sonuçlarında hastaların sistoskopik biyopsi örneklerinde mikroorganizma saptanması, belki de bu yönden bu hastalarda sistoskopinin rutin olarak yapılması gerekliliğini ortaya koyacaktır.

6.SONUÇ

1. İS/MAS hastalarında rutinde kullanılan kültür vasatları olarak kabul edilen %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerinde üretilmeyen mikroorganizmalar PG ve LEM besiyerlerinde üretilmiştir.
2. Kültürde inkübasyon süresinin uzatılması anlamlı olabilir.
3. İS/MAS etiyojisinde bir enfeksiyöz ajanın ortaya konulması bu hastalarda tedavi yaklaşımını daha rasyonel hale getirebilir.
4. Bu konuda daha fazla hasta sayısı içeren randomize kontrollü çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Hanno, P.M., C.R. Chapple, and L.D. Cardozo, *Bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a sense of urgency*. World J Urol, 2009. **27**(6): p. 717-21.
2. Berry, S.H., et al., *Prevalence of symptoms of bladder pain syndrome/interstitial cystitis among adult females in the United States*. J Urol, 2011. **186**(2): p. 540-4.
3. Koziol, J.A., *Epidemiology of interstitial cystitis*. Urol Clin North Am, 1994. **21**(1): p. 7-20.
4. Wang, D.N., et al., *The Helicobacter pylori L-form: formation and isolation in the human bile cultures in vitro and in the gallbladders of patients with biliary diseases*. Helicobacter, 2015. **20**(2): p. 98-105.
5. Meijlink, J.M., *Interstitial cystitis and the painful bladder: a brief history of nomenclature, definitions and criteria*. Int J Urol, 2014. **21 Suppl 1**: p. 4-12.
6. Hanno, P.M., et al., *The diagnosis of interstitial cystitis revisited: lessons learned from the National Institutes of Health Interstitial Cystitis Database study*. J Urol, 1999. **161**(2): p. 553-7.
7. Schafer, W., et al., *Good urodynamic practices: uroflowmetry, filling cystometry, and pressure-flow studies*. Neurourol Urodyn, 2002. **21**(3): p. 261-74.
8. van de Merwe, J.P., et al., *Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal*. Eur Urol, 2008. **53**(1): p. 60-7.
9. Hanno, P.M., et al., *AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome*. J Urol, 2011. **185**(6): p. 2162-70.
10. Parsons, J.K. and C.L. Parsons, *The historical origins of interstitial cystitis*. J Urol, 2004. **171**(1): p. 20-2.
11. Patnaik, S.S., et al., *Etiology, pathophysiology and biomarkers of interstitial cystitis/painful bladder syndrome*. Arch Gynecol Obstet, 2017.
12. Keller, J.J., S.P. Liu, and H.C. Lin, *Increased risk of depressive disorder following diagnosis with bladder pain syndrome/interstitial cystitis*. Neurourol Urodyn, 2013. **32**(5): p. 467-71.
13. Peeker, R., L. Atanasiu, and Y. Logadottir, *Intercurrent autoimmune conditions in classic and non-ulcer interstitial cystitis*. Scand J Urol Nephrol, 2003. **37**(1): p. 60-3.
14. Esko, J.D., K. Kimata, and U. Lindahl, *Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
15. Hurst, R.E. and R. Zebrowski, *Identification of proteoglycans present at high density on bovine and human bladder luminal surface*. J Urol, 1994. **152**(5 Pt 1): p. 1641-5.
16. Apodaca, G., *The uroepithelium: not just a passive barrier*. Traffic, 2004. **5**(3): p. 117-28.
17. Acharya, P., et al., *Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(2): p. F305-18.
18. Hurst, R.E., R.M. Moldwin, and S.G. Mulholland, *Bladder defense molecules, urothelial differentiation, urinary biomarkers, and interstitial cystitis*. Urology, 2007. **69**(4 Suppl): p. 17-23.
19. Birder, L.A., *More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(3): p. F489-95.
20. Burnstock, G., *Purine-mediated signalling in pain and visceral perception*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 182-8.

21. Tominaga, M., M. Wada, and M. Masu, *Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6951-6.
22. Kastrup, J., et al., *Histamine content and mast cell count of detrusor muscle in patients with interstitial cystitis and other types of chronic cystitis*. Br J Urol, 1983. **55**(5): p. 495-500.
23. Lynes, W.L., et al., *Mast cell involvement in interstitial cystitis*. J Urol, 1987. **138**(4): p. 746-52.
24. Lundeberg, T., et al., *Interstitial cystitis: correlation with nerve fibres, mast cells and histamine*. Br J Urol, 1993. **71**(4): p. 427-9.
25. MacDermott, J.P., et al., *Cellular immunity in interstitial cystitis*. J Urol, 1991. **145**(2): p. 274-8.
26. Christmas, T.J., *Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis*. Br J Urol, 1994. **73**(5): p. 508-15.
27. Jhang, J.F., et al., *Elevated serum IgE may be associated with development of ketamine cystitis*. J Urol, 2014. **192**(4): p. 1249-56.
28. Jhang, J.F., et al., *The Role of Immunoglobulin E in the Pathogenesis of Ketamine Related Cystitis and Ulcerative Interstitial Cystitis: An Immunohistochemical Study*. Pain Physician, 2016. **19**(4): p. E581-7.
29. Grover, S., et al., *Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis*. Ther Adv Urol, 2011. **3**(1): p. 19-33.
30. Webster, J.I., L. Tonelli, and E.M. Sternberg, *Neuroendocrine regulation of immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 125-63.
31. Chen, W., et al., *Elevated level of nerve growth factor in the bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a meta-analysis*. Springerplus, 2016. **5**(1): p. 1072.
32. Liu, B.L., et al., *Increased severity of inflammation correlates with elevated expression of TRPV1 nerve fibers and nerve growth factor on interstitial cystitis/bladder pain syndrome*. Urol Int, 2014. **92**(2): p. 202-8.
33. Keay, S., et al., *A prospective study of microorganisms in urine and bladder biopsies from interstitial cystitis patients and controls*. Urology, 1995. **45**(2): p. 223-9.
34. Wilkins, E.G., et al., *Interstitial cystitis and the urethral syndrome: a possible answer*. Br J Urol, 1989. **64**(1): p. 39-44.
35. Warren, J.W., *Is interstitial cystitis an infectious disease?* Med Hypotheses, 1994. **43**(3): p. 183-6.
36. Domingue, G.J., et al., *Dormant microbes in interstitial cystitis*. J Urol, 1995. **153**(4): p. 1321-6.
37. Atug, F., et al., *Detection of Helicobacter pylori in bladder biopsy specimens of patients with interstitial cystitis by polymerase chain reaction*. Urol Res, 2004. **32**(5): p. 346-9.
38. Zhang, Q.H., et al., *Decreased nanobacteria levels and symptoms of nanobacteria-associated interstitial cystitis/painful bladder syndrome after tetracycline treatment*. Int Urogynecol J, 2010. **21**(1): p. 103-9.
39. Zhou, Z., et al., *Detection of nanobacteria infection in type III prostatitis*. Urology, 2008. **71**(6): p. 1091-5.
40. Ciftcioglu, N., et al., *Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation*. Kidney Int, 1999. **56**(5): p. 1893-8.
41. Gutman, L.T., et al., *Significance of bacterial variants in urine of patients with chronic bacteriuria*. J Clin Invest, 1965. **44**(12): p. 1945-52.
42. Shorter, B., et al., *Effect of comestibles on symptoms of interstitial cystitis*. J Urol, 2007. **178**(1): p. 145-52.
43. Warren, J.W., et al., *Prevalence of interstitial cystitis in first-degree relatives of patients with interstitial cystitis*. Urology, 2004. **63**(1): p. 17-21.

44. Warren, J.W., et al., *Concordance of interstitial cystitis in monozygotic and dizygotic twin pairs*. Urology, 2001. **57**(6 Suppl 1): p. 22-5.
45. Ito, T., et al., *Recent trends in patient characteristics and therapeutic choices for interstitial cystitis: analysis of 282 Japanese patients*. Int J Urol, 2007. **14**(12): p. 1068-70.
46. Cox, A., et al., *CUA guideline: Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome*. Can Urol Assoc J, 2016. **10**(5-6): p. E136-E155.
47. Peters, K.M., et al., *Prevalence of pelvic floor dysfunction in patients with interstitial cystitis*. Urology, 2007. **70**(1): p. 16-8.
48. Parsons, C.L., et al., *Increased prevalence of interstitial cystitis: previously unrecognized urologic and gynecologic cases identified using a new symptom questionnaire and intravesical potassium sensitivity*. Urology, 2002. **60**(4): p. 573-8.
49. Humphrey, L., et al., *The bladder pain/interstitial cystitis symptom score: development, validation, and identification of a cut score*. Eur Urol, 2012. **61**(2): p. 271-9.
50. Fall, M., Y. Logadottir, and R. Peeker, *Interstitial cystitis is bladder pain syndrome with Hunner's lesion*. Int J Urol, 2014. **21 Suppl 1**: p. 79-82.
51. Peters, K.M., et al., *Are ulcerative and nonulcerative interstitial cystitis/painful bladder syndrome 2 distinct diseases? A study of coexisting conditions*. Urology, 2011. **78**(2): p. 301-8.
52. Campbell, M.F., *Campbell-Walsh Urology*. 2012: W.B. Saunders Company.
53. Parsons, C.L., et al., *The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis*. J Urol, 1998. **159**(6): p. 1862-6; discussion 1866-7.
54. Chambers, G.K., et al., *An assessment of the use of intravesical potassium in the diagnosis of interstitial cystitis*. J Urol, 1999. **162**(3 Pt 1): p. 699-701.
55. Varshney, M., et al., *Anesthetic management of a pediatric patient with congenital insensitivity to pain*. Paediatr Anaesth, 2009. **19**(5): p. 552-3.
56. Errington, J., *L-form bacteria, cell walls and the origins of life*. Open Biol, 2013. **3**(1): p. 120143.
57. Errington, J., et al., *L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. **371**(1707).
58. Allan, E.J., C. Hoischen, and J. Gumpert, *Bacterial L-forms*. Adv Appl Microbiol, 2009. **68**: p. 1-39.
59. Joseleau-Petit, D., et al., *Unstable Escherichia coli L forms revisited: growth requires peptidoglycan synthesis*. J Bacteriol, 2007. **189**(18): p. 6512-20.
60. Odds, F.C., *Sabouraud('s) agar*. J Med Vet Mycol, 1991. **29**(6): p. 355-9.
61. Dewees, L.B., J.A. Poupard, and H.E. Morton, *Effect of storage of Mueller-Hinton agar plates on zone sizes for antimicrobial testing*. Appl Microbiol, 1970. **20**(3): p. 293-7.
62. Wilson, M.L. and L. Gaido, *Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(8): p. 1150-8.
63. Fung, J.C., et al., *Primary culture media for routine urine processing*. J Clin Microbiol, 1982. **16**(4): p. 632-6.
64. Hilt, E.E., et al., *Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(3): p. 871-6.
65. Mulyukin, A.L., et al., *[Surviving Forms in Antibiotic-Treated Pseudomonas aeruginosa]*. Mikrobiologija, 2015. **84**(6): p. 645-59.
66. Curry, C.R., et al., *Encrusted Cystitis Secondary to Corynebacterium glucuronolyticum in a 57-Year-Old Man Without Predisposing Factors*. Lab Med, 2015. **46**(2): p. 136-9.