

ESRA KAYNAK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KRONİK VENÖZ YETERSİZLİKTE KODLAMAYAN RNA
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE HASTALIK
CİDDİYETİNE ETKİSİ**

ESRA KAYNAK

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞE EVRİM BAYRAK**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca, tüm sabrıyla bana yol gösteren, her zaman yanımda olan, emeğini, bilgisini ve tecrübelerini paylaşan, her daim desteğini hissettiğim çok sevgili danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Evrim Bayrak’a,

Proje ana fikrinin oluşturulmasında ve tez hastalarımın toplanmasında emeği geçen Doç. Dr. Cenk Eray Yıldız’a ve yine, tez hastalarımın toplanmasında emeği geçen Op. Dr. Nadir Aygutalp’a,

Tanıştığımız günden beri desteğini her zaman hissettiğim sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Selin Demirer’e ve kızı İdil’e,

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Aybike Sena Özüynük’a, Uzm. Bio. Pınar Köseoğlu’na, Uzm. Bio. Burcu Salman’a, Uzm. Bio. Tuğçe Sudutan’a, Uzm. Bio. Hilal Şentürk’e, Uzm. Bio. Muhammed Abdulvahid Kalkan’a,

Beni her zaman sevgi ve sabırla motive eden, düştüğümde ellerini her zaman uzatan çok sevdiğim arkadaşlarım Uzm. Bio. Tuğçe Torun’a, Uzm. Bio. Cemil Altunay’a ve Deniz Kutas Kuru’ya,

Her anımda ve her kararında beni her zaman destekleyen, ihtiyacım olduğunda maddi ve manevi yardım eden, beni koşulsuzca seven, ailem, hayatımın ışığı canım annem Sevim Kaynak’a ve biricik kardeşim Melike Kaynak’a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-32714

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	X
ABSTRACT.....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik venöz yetersizlik	3
2.1.1. Sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Patogenezi	4
2.1.4. Tedavisi	8
2.2. Kodlamayan RNA'lar	9
2.2.1. Uzun kodlamayan RNA'lar	10
2.2.2. mikroRNA'lar	11
2.3. KVV' de Genetik Araştırmalar	13
2.3.1. Seçilen aday ncRNA'lar.....	15
2.3.1.1. miRNA'lar.....	15
2.3.1.2. lncRNA'lar	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Gereçler.....	18
3.1.1. Araştırma Grupları	18
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	19
3.1.3. Kullanılan kitler	19
3.1.4. Kullanılan cihazlar	19
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	20
3.2. Yöntem.....	20

3.2.1. Periferik kandan ve damarlardan total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin belirlenmesi.....	20
3.2.2. cDNA sentezi	21
3.2.2.1. miRNA'lar için cDNA sentezi	21
3.2.2.2. lncRNA'lar için cDNA sentezi	22
3.2.3. Gerçek Zamanlı (<i>Real-Time</i>) Kantitatif PZR.....	23
3.2.3.1. miRNA'ların ifade düzeyinin belirlenmesi	23
3.2.3.2. lncRNA'ların ifade düzeyinin belirlenmesi	25
3.2.4. Rölatif kantitasyon ile miRNA ve lncRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi....	26
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	40
KAYNAKLAR	46
FORMLAR	56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	62

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Kronik Venöz Yetersizlik CEAP Sınıflandırması.....	3
Tablo 2: Kullanılan kimyasallar	19
Tablo 3: Kullanılan kitler.....	19
Tablo 4: Kullanılan cihazlar	19
Tablo 5: miRNA için cDNA sentez protokolü	21
Tablo 6: lncRNA için cDNA sentez protokolü.....	22
Tablo 7: lncRNA için cDNA sentez koşulları	23
Tablo 8: miRNA için RT-PZR protokolü	23
Tablo 9: miRNA için RT-PZR koşulları.....	24
Tablo 10: lncRNA için RT-PZR protokolü	25
Tablo 11: lncRNA için RT-PZR koşulları.....	25
Tablo 12: Kronik venöz yetmezliği olan hasta grubu ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri.....	31
Tablo 13: Kronik venöz yetmezliği olan semptomatik hastaların cinsiyete göre demografik ve klinik özellikleri.....	33
Tablo 14: KVV Hasta ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri	35
Tablo 15: KVV Hasta ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların venöz dokulardaki ifade düzeyleri	35
Tablo 16: Kadınlarda KVV ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri	36
Tablo 17: Erkeklerde KVV ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lökositlerdeki ifade düzeyleri	36
Tablo 18: Erkeklerde KVV ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların venöz dokulardaki ifade düzeyleri	37
Tablo 19: Çalışma gruplarının lökositlerinde kodlamayan RNA'ların ROC (Receiver operating characteristic) analizi	37
Tablo 20: KVV grubunda lökosit ve doku kodlamayan RNA düzeyleri arasındaki korelasyon.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Venlerin anatomik olarak görüntüsü, A, Vena saphena magna (VSM) B, Vena saphena parva (VSP) (22).....	5
Şekil 2: Varisli damarların görüntüsü, A Telanjiektazi (CEAP C1 Sınıfı), B Variköz Venler (CEAP C2 Sınıfı), C Pigmentasyon (CEAP C4-A Sınıfı), D Aktif Ülser (CEAP C6 Sınıfı) (16).....	6
Şekil 3: Kronik venöz yetersizlikte enflamasyona yol açan hücresel olaylar ve sonuçta deri değişiklikleri ve venöz bacak ülseri (VBÜ) oluşumu. EC, endotelial hücre; ECM, hücre dışı matris; ELAM-1, endotelial lökosit adezyon molekülü-1; GAG, glikozaminoglikan; IL-1, interlekin-1; MCP-1, monosit kemotaktik protein-1; MIP-1B, makrofaj enflamatuvar protein-1b; MP, makrofajlar; TNF- α , tümör nekroz faktörü-alfa. Raffetto JD (2018) makalesinden alındı.	8
Şekil 4: Kodlamayan RNA'ların sınıflandırması (9).....	10
Şekil 5: Uzun kodlamayan RNA grupları [41]	11
Şekil 6: mikroRNA'ların oluşumu.....	13
Şekil 7: Gas5'in çeşitli hücre hatlarında Sitoplazmik-C/Nükleer-N Lokalizasyonu: Rölatif konsantrasyon indeksi (RCI, Relative Concentration Index) ve ekspresyon değerleri, grafik kaynağı: https://lncatlas.crg.eu/	17
Şekil 8: Lökosit ve doku örneklerinde miR-202'nin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ...	26
Şekil 9: Lökosit ve doku örneklerinde miR-222'nin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ...	27
Şekil 10: Lökosit ve doku örneklerinde endojen kontrol olarak RNU6'nın RT-PZR amplifikasyon eğrileri (A) ve erime eğrisi kontrolü (<i>Tm calling</i>) (B).....	27
Şekil 11: Lökosit ve doku örneklerinde lncRNA-GAS5 RT-PZR amplifikasyon eğrileri	28
Şekil 12: Lökosit ve doku örneklerinde AK021444'nin RT-PZR amplifikasyon eğrileri	28
Şekil 13: Lökosit ve doku örneklerinde endojen kontrol olarak <i>GAPDH</i> RT-PZR amplifikasyon eğrileri (A) ve erime eğrisi kontrolü (<i>Tm calling</i>) (B).....	29
Şekil 14: miR-202 ve miR-222 duyarlılık ve özgüllük ROC eğrileri.....	38
Şekil 15: GAS5 ve AK021444 duyarlılık ve özgüllük ROC eğrileri	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KVY: Kronik venöz yetersizlik

VSM: Vena saphena magna

VSP: Vena saphena parva

CEAP: C: klinik görünüm, E; etiyolojik faktörler, A; anatomik dağılım, P; altta yatan patofizyolojik durum

VBÜ: Venöz bacak ülseri

ECM: Hücre dışı matriks

EC: Endotelial hücre

GAG: Glikozaminoglikan

IL-1: İnterlökin-1

MMP: Matris metalloproteinaz

TIMP: Metalloproteinaz doku inhibitör proteini

ICAM-1: Hücreler arası adhezyon molekülü-1

VCAM-1: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1

ELAM-1: Endotelial lökosit adhezyon molekülü-1

MCP-1: Makrofaj kemoatraktan protein-1

MIP-1B: Makrofaj enflamatuvar protein-1b

TGF- β 1: Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

KBF: Kompleks boşaltıcı fizyoterapi

EVLA: Endovenöz lazer ablasyonu

USG: Ultrasonografi

ncRNA: Kodlamayan RNA

miRNA: mikroRNA

lncRNA: Uzun kodlamayan RNA

mRNA: Haberci RNA

DGCR8: Mikroşlemci kompleksi alt birimi-8

TRBP: Transaktivasyon yanıtı RNA-bağlı protein

PKR: RNA ile aktive olan protein kinaz

PACT: PKR protein aktivatörü

miRISC: miRNA kaynaklı susturma kompleksi

COL1A2: α -2 tip I kollajen
HFE: Homeostatik demir düzenleyici protein
HPDG: Hidroksipropa-glandindehidrojenaz-15
KCNH8: Potasyum voltaj kapılı kanal alt ailesi H üyesi 8
COL27A1: α -1 tip 27 kolajen
COL13A1: α -1 tip 13 kolajen
BVS: Büyük safen ven
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
VSMC: Vasküler düz kas hücresi
HSVSMC: İnsan safen ven düz kas hücresi
POSTN: Periostin
lncRNA-GAS5: Büyüme durmasına özgü transkript 5
FOXC2: forkhead box C2
RT-PZR: Gerçek zamanlı (Real-time) kantitatif PZR
BKI: Beden kitle endeksi
AST: Aspartat aminotransferaz
ALT: Alanin amnotransferaz
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
PT: Prothrombin zamanı
INR: Uluslararası Düzeltme Oranı
TG: Tiroglobulin
PTEN: Fosfataz ve tensin homologu
OTSCC: Ağız dil skuamöz hücreli karsinom
HUVECs: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri

ÖZET

Kaynak, E. (2021). Kronik Venöz Yetersizlikte Kodlamayan RNA Düzeylerinin Belirlenmesi ve Hastalık Ciddiyetine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kronik venöz yetersizlik (KVY), patolojik kapak yetersizliği veya venöz tıkanıklık nedeniyle venöz hipertansiyona bağlı gelişen ve telenjektazilerden ağırlı variköz venlere ve hatta cilt ülserleri gibi ciddi komplikasyonlara sebep olan önemli bir sağlık problemidir. Bu çalışmada, KVY tanısı olan hastaların lökositleri ve variköz damarlarındaki kodlamayan RNA'ların ifade düzeylerinin analizi ve hastalık ile ilişkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu amaçla, KVY gelişmiş orta ve ciddi semptomları olan hastalardan pake ekzisyonu uygulaması esnasında alınan variköz ven dokuları ile kan örneklerinde (n= 56) ve kontrol grubundan alınan normal safen ven dokuları (n=8, koroner “by-pass” orerasyonu esnasında) ile kan örneklerinde (n=37) aday kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri kantitatif RT-PZR ile belirlendi ve klinik veriler ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bu çalışmada, KVY hasta grubunda kontrole göre lncRNA-AK021444 ifade düzeyinin, lökositlerde 4,5 kat artarken (p=0.015), venöz dokularda 12,8 kat azaldığı bulundu (p=0.0001). Ayrıca, KVY'li hastaların venöz dokularında miR-222 ifade düzeyinin 7,4 kat arttığı belirlendi (p=0.016). Ek olarak, KVY hasta grubunun lökositlerinde kontrole göre, miR-202 ifade düzeyinin 32 kat (p=0.0001), lncRNA-GAS5'in ise 51 kat azaldığı (p=0.0001) belirlendi. Kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri cinsiyete göre alt gruba ayrıldığında tüm grup ile benzer profilde olduğu belirlendi. Yapılan ROC analizlerinde lökositlerde azalan ifade düzeyleri olan miR-202 ve GAS5 ile artan ifade düzeyi olan AK021444'in KVY'nin tanısı için aday biyobelirteçler olabileceği belirlendi.

Sonuç olarak, ilk defa bu çalışmada araştırılan dört aday kodlamayan RNA'dan üçünün (miR-202, AK021444 ve GAS5) tanıda kullanılabilecek biyobelirteç adayları olabileceği gösterildi. KVY'li venöz damar dokularında değişen ifade düzeyleri nedeniyle miR-222 ve AK021444 kodlamayan RNA'ların hastalık patogenezindeki rolünü belirlemek için daha detaylı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kronik venöz yetersizlik, variköz ven, uzun kodlamayan RNA, mikroRNA, ifade düzeyi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-32714

ABSTRACT

Kaynak, E. (2021). Determination of Non-Coding RNA Levels in Chronic Venous Insufficiency and Its Effects on Disease Severity. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul.

The chronic venous insufficiency (CVI) is a major health problem that develops due to venous hypertension due to pathological valve insufficiency or venous obstruction and causes serious complications such as telangiectasia, painful varicose veins and skin ulcers. In this study, it was aimed to investigate the effect of non-coding RNAs in the blood circulation and varicose veins of patients diagnosed with CVI on severity of the disease. In this study, it was aimed to determine the non-coding RNAs expression levels in the leukocytes and varicose veins of patients with CVI and their associations with CVI..

For this purpose, expression levels of candidate non-coding RNAs in varicose vein tissues and blood samples (n=56) taken from patients with moderate and severe symptoms with CVI, and normal saphenous vein tissues (n=8, during coronary by-pass operation) and blood samples (n=37) taken from the control group, were determined by quantitative RT-PCR and compared statistically with clinical data.

In this study, expression level of lncRNA-AK021444 increased 4.5 times in leukocytes (p=0.015) while decreased 12.8 times in venous tissues (p=0.0001) of CVI patients compared to the control group. Besides, expression level of miR-222 increased 7.4 times in venous tissues of CVI patients (p=0.016). In addition, it was determined that expression levels of miR-202 decreased 32 times (p=0.0001) and lncRNA-GAS5 decreased 51 times (p=0.0001) in leukocytes of CVI patient group. When subdivided according to sex, expression levels of non-coding RNAs were determined to be in same profile as whole study groups. In the ROC analysis, it was determined that miR-202 and GAS5, which have decreased expression levels, and AK021444, which has increased expression level in leukocytes, could be candidate biomarkers for the diagnosis of CVI.

As a result, it was shown for the first time three of the four candidate non-coding RNAs that investigated in this study could be biomarker candidates that could be used in diagnosis. More detailed analyzes are needed to determine the role of miR-222 and AK021444 in the pathogenesis of the disease due to varying expression levels in venous vascular tissues with CVI.

Key Words: Chronic venous insufficiency, varicose vein, long non-coding RNA, microRNA, expression level

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2019-32714

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik venöz yetersizlik veya yetmezlik (KVY), yaşam kalitesini düşüren ve iş gücü kaybına neden olarak sosyoekonomik sorunlar yaratan, yaygın görülen hastalıklardan birisidir. Asemptomatik venöz yetersizlikteki variköz damarlardan ağır seyreden hali olan deri ve deri altındaki doku değişiklikleri ve ülserasyona kadar geniş bir klinik yelpazeden oluşur (1, 2). Alt ekstremitelerde oluşan venöz yetersizlik ve buna bağlı gelişen varisler, toplumda oldukça sık rastlanmakta olup etyolojisinde genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet, obezite, gebelik, intraabdominal maligniteler, trombofilebit, eski bacak yaralanması ve uzun süre ayakta durma sayılmaktadır. Alt ekstremitelerde venöz hipertansiyona, yerçekimi etkisi ile oluşan geri akıma bağlı kapak yetersizlikleri ve perforator venlerdeki kapakların disfonksiyonu sebep olmaktadır (3). Yaygın rastlanan ve çoğu zaman girişimsel tedaviler gerektiren bu ilerleyici ve tekrarlayıcı hastalığın moleküler patogenezi halen net olarak bilinmemektedir.

Kodlamayan RNA grubundan mikroRNA'lar (miRNA), intronlarda veya intergenik bölgelerdeki genlerinden birincil miRNA transkriptleri olarak sentezlenen ve daha sonra endonükleazlar tarafından 18-24 nükleotid uzunluğunda olgun RNA'lar olarak işlenen kısa kodlamayan RNA'lardır ve hedef mRNA'ları degradasyona yönlendirerek ya da hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenlemektedir (4-6). Kodlamayan RNA'lardan 200 ve üstünde nükleotid sayısına sahip olan uzun kodlamayan RNA'larda (lncRNA) gelişim, farklılaşma ve diğer hücresel süreçlerin kontrolünde aktif rollere sahiptir (6-10). Yapılan çalışmalarda, KVY hastalarının venöz dokularında yapılan gen ifade değişiklikleri incelenmiş ve çeşitli miRNA'lar ve regüle ettiği gen transkriptleri belirlenmiştir (11-14). Ancak, literatürde uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA) variköz venlerde ifadelerinin değiştiğine dair sınırlı sayıda araştırma mevcuttur (14, 15). Diğer yandan, literatürde kan dolaşımındaki kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri ile KVY arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Bu tez çalışmasında, öncelikle KVY ile ilgili literatürdeki mevcut araştırmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, KVY ciddiyeti ile ilişkili olabilecek kodlamayan RNA'lardan iki adet miRNA ile iki adet lncRNA adayı belirlendi. Daha sonra, KVY tanısı alan hastaların hem periferik kanındaki lökositlerde hem de variköz damar dokularındaki aday kodlamayan RNA'ların ifade

düzeylerinin belirlenerek gruplar arasında karşılaştırılması ve hastalık ciddiyeti arasındaki ilişkiler ile biyobelirteç niteliklerinin araştırılması planlandı. Çalışmanın amacı, KVV'de hastalık patogeneğinde rol oynayan regülatuar roller üstlenen aday molekülleri belirlenmek ve bunların hastalık ile ilişkilerini ve hastalık tanısı için biyobelirteç özelliklerini ortaya koymaktır.

.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik venöz yetersizlik

Kronik venöz yetersizlik (KVY), alt ekstremitelerde venlerin fonksiyonel ya da yapısal anomalitesi sonucu oluşan hipertansiyondan kaynaklanan semptomları bulunan bir sağlık problemidir (16). Yaygın rastlanan ve çoğu zaman girişimsel tedaviler gerektiren bu ilerleyici ve tekrarlayıcı hastalık, iş gücü kaybına, ileri evrelerinde yaşam kalitesinin düşmesine ve dolayısıyla ciddi sosyoekonomik sonuçlar ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

2.1.1. Sınıflandırılması

KVY gelişiminde birden fazla mekanizma rol oynadığından, tanı ve değerlendirme yapabilmek için CEAP (C: klinik görünüm, E; etiyolojik faktörler, A; anatomik dağılım, P; altta yatan patofizyolojik durum) sınıflandırması kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma biçimi, Amerikan Venöz Forumu tarafından Şubat 1994'te gerçekleştirilen konferans sonucunda oluşturulmuştur. Tablo 1'de sınıflandırmadaki klinik ve patofizyolojik evreler verilmektedir (17).

Tablo 1: Kronik Venöz Yetersizlik CEAP Sınıflandırması

Klinik, Etiyolojik, Anatomik, Patofizyolojik (CEAP) sınıflandırma				
Klinik (C)	Etiyolojik (E)	Anatomik (A)	Patofizyolojik (P)	
C0-Görünür venöz hastalık belirtisi yok	Ec-Konjenital	As-Yüzeysel	Pr-Reflü	
C1-Telanjektazi ve retiküler damarlar	Ep-Birincil	Ad-Derin	Po-Tıkanma, kronik çözülmemiş tromboz	
C2-Variköz venler	Es-İkincil (örneğin, trombotik sonrası, travma)	Ap-Perforatör	Pr,o-Reflü ve tıkanma	
C3-Ödem	En-Tanımlanan venöz neden yok	An-Tanımlanan venöz lokasyon yok	Pn-Tanımlanan patofizyoloji yok	
C4-Deri ve deri altı dokudaki değişiklikler				
A-Pigmentasyon veya egzama				
B-Lipodermatoskleroz				

C5-İyileşmiş ülser

C6-Aktif ülser

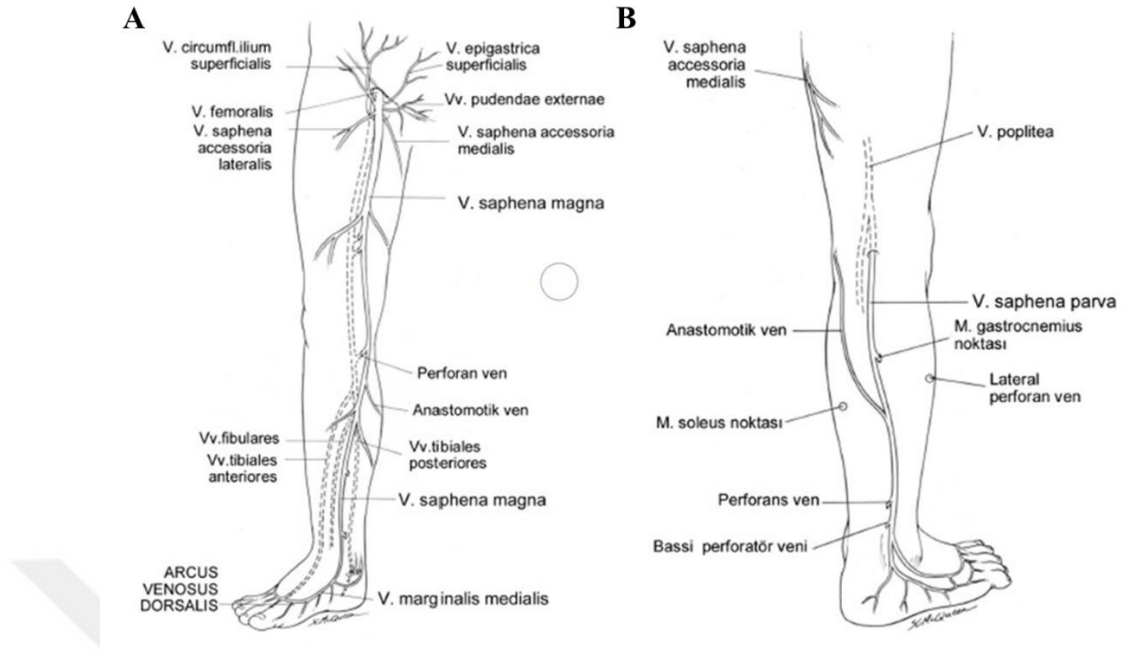
2.1.2. Epidemiyolojisi

Yapılan bir derleme çalışmada toplumlarda görülme sıklığının tahmini oranlarının erkeklerde %2 ila %56, kadınlarda ise %1 ila %73 arasında olduğu tespit edilmiştir. Görülme sıklığı oranları, endüstriyel olarak gelişmiş toplumlarda gelişmemiş toplumlara göre daha yüksek olarak belirtilmektedir (18).

Kronik venöz yetersizlik hastalığında risk faktörleri arasında cinsiyet, yaş, aile öyküsü, obezite, hamilelik, damar iltihabı, uzun süreli ayakta durma ve bacak yaralanmaları bulunmaktadır (3).

2.1.3. Patogenezi

Venler insan vücudunda yüzeysel, derin ve perforan olarak adlandırılan üç konumda yer alırlar. Perforan venler, derin ve yüzeysel venleri birbirine bağlayan venlerdir. Vena saphena magna (VSM) ve vena saphena parva (VSP) vücuttaki ana yüzeysel venlerdir (19, 20). Alt ekstremité venlerinde venöz kan akışı biküspid kapakçılar sayesinde yüzeysel venlerden derin venlere doğrudur ve reflüyü önlemektedir. Ayaklarda ise kan akımı derin venlerden, yüzeysel venlere doğrudur (21). Anatomik olarak alt ekstremité venleri Şekil 1’de gösterilmektedir.



Şekil 1: Venlerin anatomik olarak görüntüsü, A, Vena saphena magna (VSM) B, Vena saphena parva (VSP) (22)

Kronik venöz yetersizlik, konjenital veya edinsel yetersizlik nedeniyle yüzeysel ve/veya perforan venlerde kapakların disfonksiyonu, konjenital yokluk, doğal zayıflık veya trombotik hasar nedeniyle derin venlerdeki kapakların disfonksiyonu, kapak yetersizliği yerine derin venöz çıkış tıkanıklığı, eklemlerin veya kasların, fibrozun veya nöropatilerin enflamasyonu sebebiyle oluşan kas disfonksiyonu ve baldır kas pompası yetmezliği olarak ortaya çıkan patofizyolojik mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Venöz ülserler sadece perforatör veya yüzeysel ven yetmezliği olan hastalarda ortaya çıkabilse de genellikle derin venöz yetersizlik ile ilişkilidir. Venöz ülserlerin %10'undan daha azı sadece derin venöz yetmezliğe bağlıdır (23). Venöz reflü oluşmasında farklı mekanizmaların rolü olmasına rağmen, ana etkenler venöz kapak yetersizliği, damar duvarının iltihabı ve venöz hipertansiyondur (24). Alt ekstremitelerde ilerlemiş venöz hipertansiyon, hipertansiyonu güçlendiren dairesel bir vasküler ve inflamatuvar döngüye sebep olur (16). Yüzeysel venlerde oluşan variközite çaplarının boyutlarına göre pake (>4 mm), telanjiektazi (1-4mm), spider ven (<1 mm) ve safenöz varisler olarak adlandırılabilir (21). Klinik tiplerine göre variköz damar örnekleri Şekil 2'de gösterilmektedir (16).

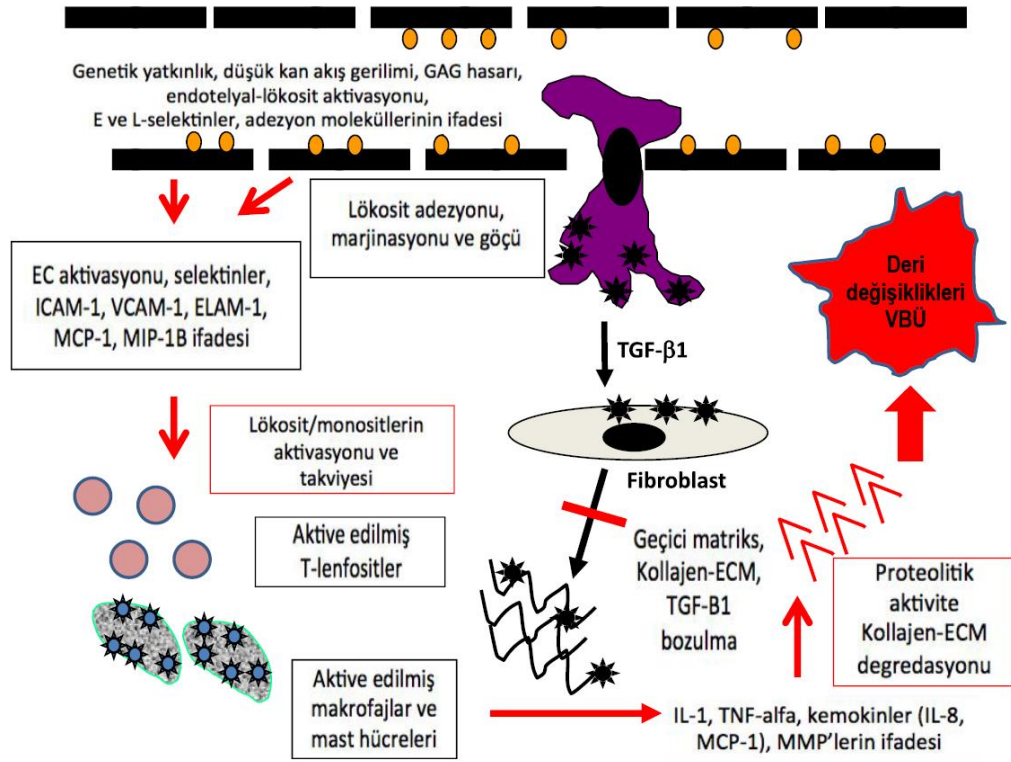


Şekil 2: Varisli damarların görüntüsü, **A** Telanjiyektazi (CEAP C1 Sınıfı), **B** Variköz Venler (CEAP C2 Sınıfı), **C** Pigmentasyon (CEAP C4-A Sınıfı), **D** Aktif Ülser (CEAP C6 Sınıfı) (16)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ven duvarında meydana gelen yapısal ve biyokimyasal bozulmaların, ven duvarı geçirgenliğinde zayıflığa ve venöz tonda değişikliğe sebep olabileceği gösterilmiştir. Variköz venlerde, ven duvarlarının tüm katmanlarında hücresel ve ekstrasellüler matriks bileşenlerde çok sayıda patoloji gözlenmiştir (24). Ekstrasellüler matriks, endotel ve düz kas hücreleri gibi hücresel bileşenlerle etkileşimler yoluyla damarın bütünlüğünü ve homeostazını koruyan dinamik bir yapıdır. Ekstrasellüler matriks, çeşitli hücresel bileşenlerin gömülü olduğu kolajen, proteoglikanlar, elastin, glikoproteinler ve fibronektinden oluşan yapısal bir

çerçeve sağlar. Ekstrasellüler matriksin parçalanması, damarların zayıflamasına ve genişlemesine katkıda bulunur. Varisli damarlardaki toplam elastin içeriği varisli olmayan damarlara göre azalır. Variköz damar yapısındaki genel kolajen içeriğinin variköz olmayan damarlarla karşılaştırıldığı çalışmalarda belirsizlik gözlenmektedir, bazı çalışmalar artış, bazıları değişiklik ve bazıları azalma bildirmektedir (25-27). Varisli damarlardaki kolajen alt tipleri, varisli olmayan damarlardakilerden farklıdır. Varislerde, esnekliğe katkıda bulunan Tip III kolajen aşağı yönde regüle edilirken, gerilme dayanıklılığı sağlayan tip I kolajen yukarı yönlü regüle edilmektedir (28). Elastin ve kollajen içeriği dengesindeki değişikliğin variköz ven duvarı zayıflamasına katkıda bulunmaktadır (29).

KVY oluşumunda yer alan bir diğer patofizyolojik mekanizma olarak kan basıncına bağlı tetiklenen enflamasyon kaskadının olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (16). Enflamatuvar yanıt, lökositleri, özellikle makrofajları, monositleri, T lenfositleri ile mast hücrelerini, inflamatuvar modülatörleri ve kemokinleri, sitokin ekspresyonunu, büyüme faktörlerini, matris metalloproteinaz (MMP) ve metalloproteinaz doku inhibitörlerinin (TIMP) aktivitesini ve enflamasyonu ve ileri seviyede kronik venöz yetersizlik ile ortaya çıkan değişiklikleri tetikleyen birçok düzenleyici yolu içerir (21, 30, 31). Enflamasyon ve cilt değişiklikleri arasındaki bağlantı, Ca/Zn bağımlı metalloproteinazlar ve serin proteinazlar dahil olmak üzere proteolitik enzimler yoluyla olabilir (32). MMP'ler hücre farklılaşması ve gelişiminde rol alan nötral endopeptidaz grubu proteinlerdir (33). Artan venöz hipertansiyon ve/veya düşük kan akışı gerilimi, endotel hücreleri tarafından hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) endotelial lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1) ve selektinler aracılığıyla algılanır. Endotel hücreler ve onların yüzeyindeki glikozaminoglikanlar üzerindeki kan akış gerilimi ve mekanik stresler, makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1), VCAM-1, L-selektin ve E-selektinlerin, ICAM-1, sitokinlerin (dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1) ve MMP'lerin ekspresyonlarını artırır. MMP'ler aktive olduğunda damar duvarı kolajeninin ve elastininin yapısal bileşenlerinde değişiklikler meydana gelir (21, 34, 35). Venlerde meydana gelen enflamatuvar yanıt Şekil 3'te gösterilmektedir (35).



Şekil 3: Kronik venöz yetersizlikte enflamasyona yol açan hücresel olaylar ve sonuçta deri değişiklikleri ve venöz bacak ülseri (VBÜ) oluşumu. EC, endotelial hücre; ECM, hücre dışı matris; ELAM-1, endotelial lökosit adezyon molekülü-1; GAG, glikozaminoglikan; IL-1, interlökin-1; MCP-1, monosit kemotaktik protein-1; MIP-1B, makrofaj enflamatuar protein-1b; MP, makrofajlar; TNF- α , tümör nekroz faktörü-alfa. 35 nolu makaleden alındı.

2.1.4. Tedavisi

Konservatif tedaviler

KVY'de erken konservatif tedaviler venöz hipertansiyonu, reflüyü ve enflamasyonu önleme üzerinedir. Bu tedaviler KVY semptomlarını hafifletmeyi ve ülser riskini azaltmayı amaçlar. Konservatif tedavilerin ilk aşamasında hasta eğitimi ile yaşam tarzındaki bazı değişikliklerle önlem alınması gelmektedir. Bu değişiklikler; sigara kullanıcılarının sigarayı bırakması, basıncı arttırdığı için dar kıyafetlerden uzak durulması, kilo verilmesi ve yeme alışkanlıklarının düzenlenerek aşırı kilo alımından kaçınılması, bacak elevasyonu, uygun ayakkabı seçiminin yapılması ve kadınlarda yüksek topuklu ayakkabı kullanımından kaçınılması, yüksek sıcaklıklardan kaçınılması şeklindedir (16, 36).

Kompresyon çorabı veya bandajı kullanılarak venler distalden proksimale doğru azalan basınç ile desteklenmektedir. Düzenli kullanımda kompresyon çorapları tedavide önemli bir araçtır. Fizyoterapi tedavilerinde venöz egzersiz programları, kompleks

boşaltıcı fizyoterapi (KBF), biyomekanik stimülasyon terapi gibi yöntemler kullanılmaktadır (16, 36).

KVY medikal tedavisinde kullanılan venoaktif ve semptomatik ilaçların etkileri ödem ve semptomları gidermek üzerinedir.

Girişimsel ve cerrahi tedaviler

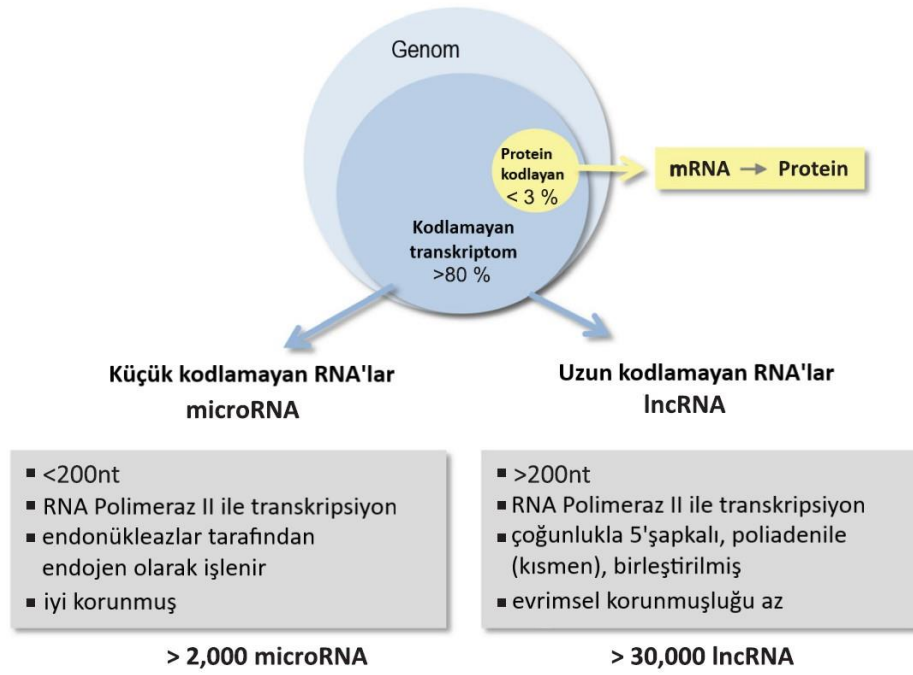
Skleroterapi yönteminde skleron madde uygun konsantrasyonlarda ilgili ven içine verilmektedir. Skleroterapi, telenjektaziler ve 4 mm'den ince varisler için kullanılmaktadır (37).

Ablasyon yöntemi girişimsel tedavilerde en sık tercih edilen tekniktir. Bu teknik lokal anestezi altında ve ultrasonografi (USG) eşliğinde, iğne ponksiyonu ile yapılır. Endovenöz lazer ablasyonunda (EVLA) amaç safenofemoral ya da safenopopliteal ve bunlarla ilgili VSM ve VSP'lerin kesişme noktalarında oluşan reflüleri endotelde hasar oluşturarak önlemektir (19). Radyofrekans ablasyonda ise, özel bir tel, ultrason eşliğinde hasta toplardamara yerleştirilir ve tele özel bir cihaz yardımıyla enerji verilir. Bu yöntemle, genişlemiş varisli damarın tel aracılığıyla verilen yüksek ısıyla büzüşerek kapanması sağlanır (38).

Cerrahi tedavilerin yapılmasındaki amaç, variköz damarların ve venöz hipertansiyon kaynağının çıkarılmasıdır. Cerrahi tedavi ile maksimum boyutta kozmetik sorunun ortadan kaldırılması ve minimum komplikasyon hedeflenmektedir (36).

2.2. Kodlamayan RNA'lar

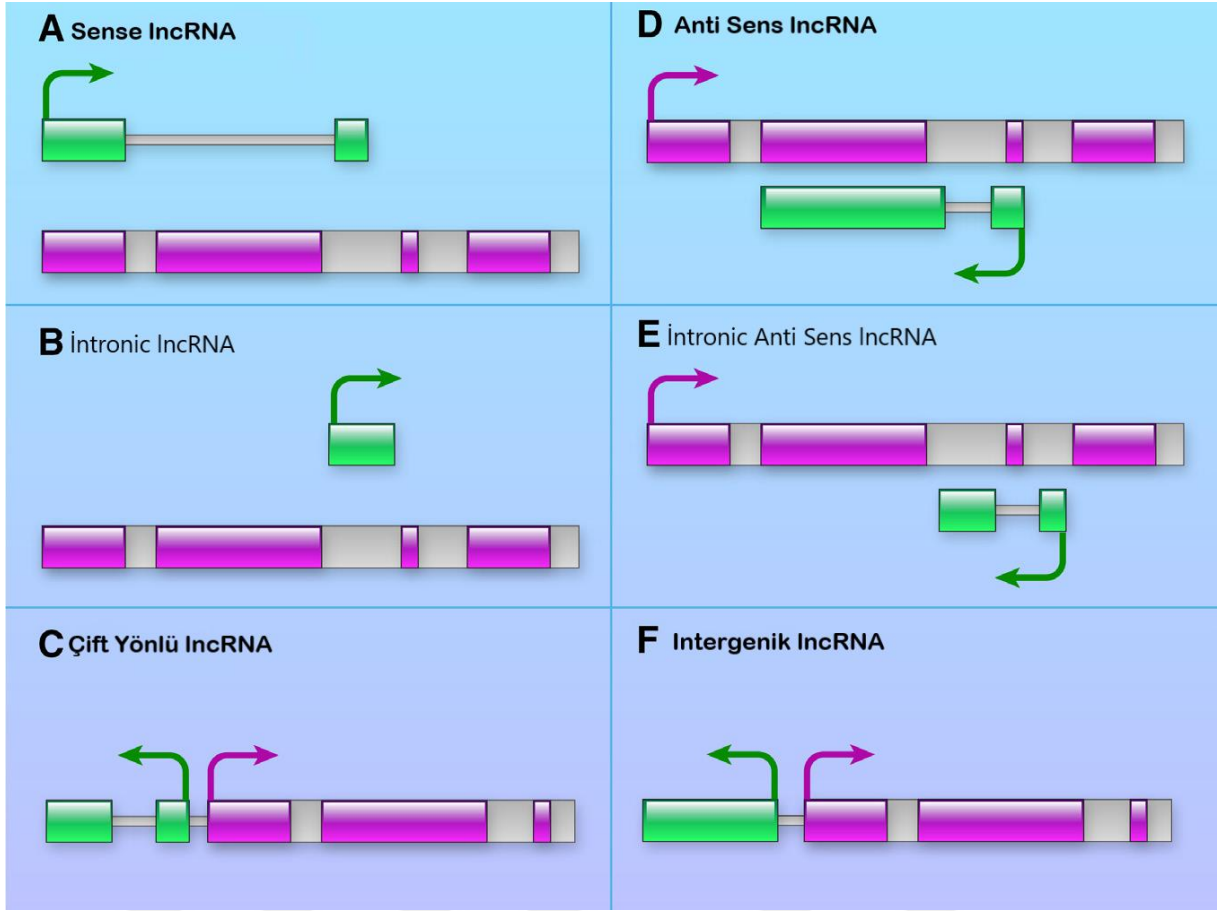
Kodlamayan RNA'lar (ncRNA) proteine translasyonu yapılmadan işlev gören RNA molekülleridir. ncRNA'lar, proteine çevrimi olan mRNA'lar yerine, yapısal işlevleri olan katalitik ya da düzenleyici görevler üstlenen RNA'lar olarak transkribe edilirler. Büyüklüklerine göre gruplandırıldığında 200 ve üstünde nükleotid sayısına sahip olan kodlamayan RNA'lara uzun kodlamayan RNA (lncRNA) denilmektedir. Bu ncRNA tipleri arasında kısa (18-24 nükleotid) düzenleyici moleküller olan mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılan küçük RNA molekülleri de yer alır. Bazı ncRNA'ların ifadesi dokulara veya biyolojik safhalara özeldir. ncRNA'ların genel sınıflandırması ve özellikleri Şekil 4'te gösterilmiştir (9).



Şekil 4: Kodlamayan RNA'ların sınıflandırması (9)

2.2.1. Uzun kodlamayan RNA'lar

Pek çok uzun kodlamayan RNA (lncRNA) protein kodlamamasına rağmen, bazıları translasyon mekanizması tarafından tanınabilen ve fonksiyonel, 100 aminoasitten küçük peptitleri kodlayabilen küçük açık okuma çerçeveleri (sORF) içerebilir (10). lncRNA'lar, epigenetik kromatin işaretleri, RNA polimeraz II ile transkripsiyon, 5'-şapka ve 3'-poliadenilasyon eklemesi özellikleriyle haberci RNA'lara (mRNA) benzer şekilde üretilir ve işlenir. Fakat yapılan transkriptom çalışmaları, lncRNA'ların genel olarak mRNA'lardan hücre tipi, doku tipi, gelişim evresi veya hastalık durumuna özgü şekilde daha spesifik ekspresyon profilleri sergilediğini göstermektedir (39). lncRNA'lar hedef kodlama bölgelerine olan genomik yakınlıklarına bağlı olarak beş ana gruba ayrılır; intronik lncRNA'lar, intergenik lncRNA'lar, sens lncRNA'lar, antisens lncRNA'lar, çift yönlü lncRNA'lar. İntronik lncRNA'lar, tamamen protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinden transkripsiyon olurlar. İntergenik lncRNA'lar, sens veya antisens DNA ipliklerinden protein kodlayan genler arasında bağımsız olarak kopyalanırlar. Sens lncRNA'lar, mRNA'ların ekzonları veya intronları ile örtüşürler. Antisens lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin zıt sarmalından kopyalanırlar. Protein kodlayan genlerle promotör bölgeleri paylaşmalarına rağmen çift yönlü lncRNA'lar, ters yönde transkribe edilirler (40). Uzun kodlamayan RNA grupları Şekil 5'te gösterilmiştir (41).



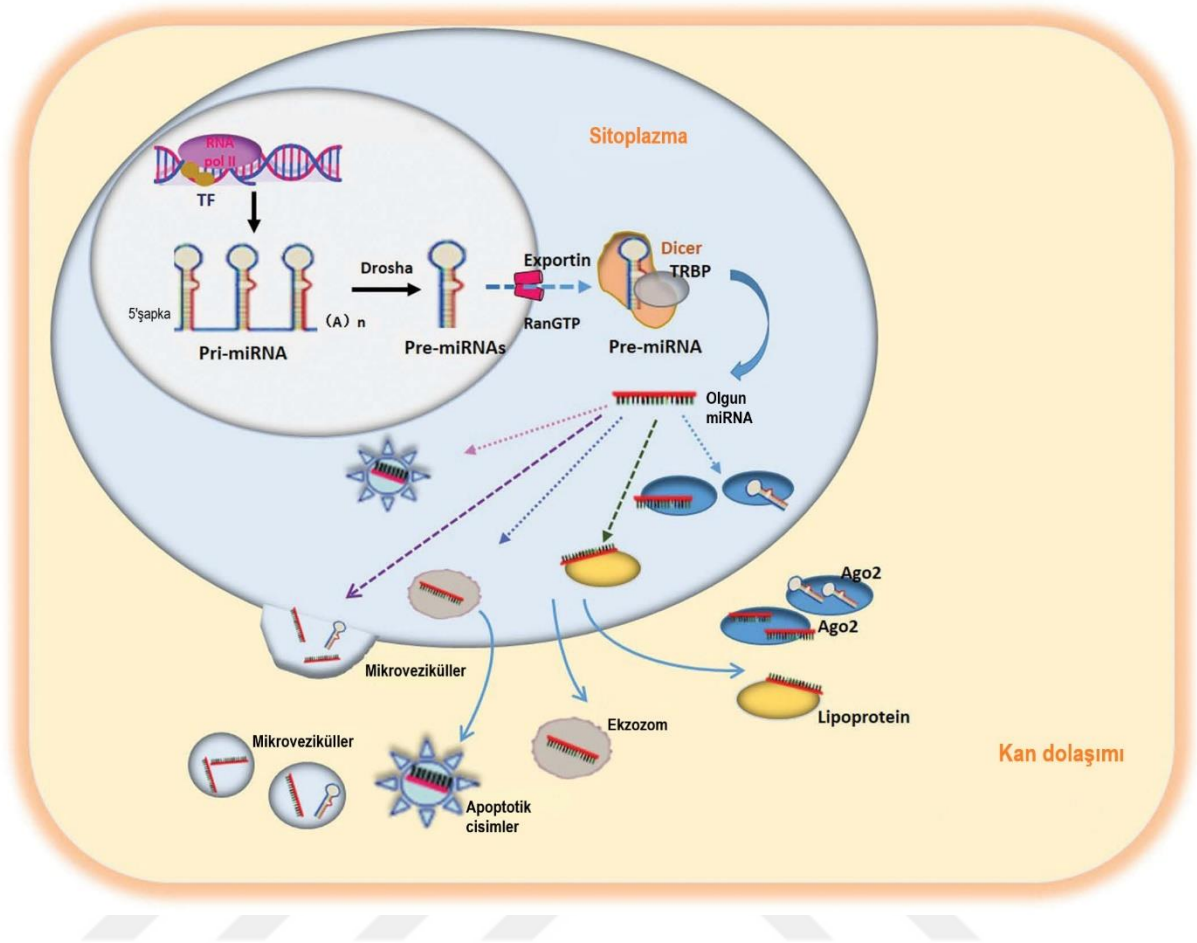
Şekil 5: Uzun kodlamayan RNA grupları (41)

LncRNA'lar gelişim, farklılaşma ve diğer hücresel süreçlerde gen ifadesinin kontrolünü sağlarlar (6-10). LncRNA'lar ayrıca DNA'nın epigenetik modifikasyonu, mRNA stabilitesi, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen düzenlemeleri, regüle etmektedir (6, 42-44). LncRNA'ların hücre içi işlevsel lokalizasyonu nükleus (yaklaşık %15'i) veya sitoplazma olabilmektedir. Hatta bazı lncRNA'lar hem sitoplazma hem de nükleusta işlev gördüğü belirlenmiştir (43-45).

2.2.2. mikroRNA'lar

miRNA'lar, intronlardan veya intergenik bölgelerden birincil miRNA transkriptleri olarak sentezlenen ve daha sonra endonükleazlar tarafından 18-24 nükleotid uzunluğunda olgun RNA'lar olarak işlenen kısa kodlamayan RNA'lardır. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA'ları degradasyona yönlendirerek ya da hedef mRNA'ların translasyonun inhibe ederek transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenlerler. Çoğu miRNA, RNA polimeraz II aracılığıyla, genellikle bir poli-A kuyruğuna sahip olan bir saç tokası yapısı ile birincil miRNA'ya (pri-miRNA) transkript

edilir. Bunu takiben, çekirdekte, DGCR8 (veya PASHA) ve bir ribonükleaz olan DROSHA ile etkileşime girerek, prekürsör miRNA olarak bilinen saç tokası şeklini koruyan yapıya dönüşürler. Pre-miRNA'lar, RanGTP'ye bağımlı Exportin tarafından sitoplazmaya taşınır. Bir endonükleaz olan DICER, TRBP (transactivating response RNA-binding protein) veya PACT (protein activator of PKR) proteinlerinden birisi ile etkileşime geçerek taşınmış pre-miRNA'ları keser ve miRNA dupleksleri oluşturur. Tek zincirli olgun miRNA'ya çevrilirken diğeri degrade edilir veya eksport mekanizmaları yoluyla hücreden uzaklaştırılır. Argonat proteinine yüklenen olgun miRNA, mRNA ile etkileşime girecek olan miRNA kaynaklı susturma kompleksinin (miRISC) bir parçası olur (4, 5). miRNA'lar fonksiyonlarını tamamlayıcı baz çiftleri ile mRNA dizilerine bağlanarak gerçekleştirirler. miRNA'ların çoğu, hedef mRNA'ların çevrilmemiş 3' bölgesine bağlanır; ancak, promotör ve 5' bölge gibi diğer bölgelerle de etkileşimler olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (46). miRNA'lar, genellikle birden fazla mekanizma aracılığıyla mRNA düzenlenmesini gerçekleştirmektedir. Bunlar ribozomal süreçlere etki ederek translasyonel inhibasyon, RNAinterferans (RNAi) olarak bilinen bölge-spesifik mRNA kesilmesi, deadenilasyon yoluyla mRNA'nın degradasyonun artırılarak destabilize edilmesi şeklinde belirlenmiştir (47). mikroRNA'ların oluşumu Şekil 6'da gösterilmiştir (5).



Şekil 6: mikroRNA'ların oluşumu

2.3. KVY'de Genetik Araştırmalar

KVY ile ilgili yapılan genetik araştırmaların bir grubu, genetik yatkınlığa sebep olan varyantların belirlmesine yöneliktir. Genetik yatkınlık ile ilgili bir derlemede, yapılmış bazı araştırmalarda variköz damarlar ve venöz ülserasyon gibi sonuçları olan kronik venöz yetmezliğinde damar duvarlarının yeniden biçimlenmesi ile ilişkili gen varyantlarının risk faktörü olarak gözlemlendiği belirtilmiştir (48). Bazı çalışmalarda da, lenfatik ve vasküler gelişimde yer alan transkripsiyon faktörünü kodlayan *FOXC2* gen varyantının venöz varis oluşumunda, kapak yetmezliğinde ve hemoroidde etkisi olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada *HFE* gen varyantının venöz ülser oluşum riskini 7 kat arttırdığı belirlenmiştir (48). Matriks metalloproteinazların (MMP), kesin mekanizmaları henüz bilinmese de KVY patogenezinde venöz yeniden modellenmesini, dilatasyonu ve kapak disfonksiyonunu etkileyerek rol almaktadır. Ellinghaus ve arkadaşlarının Alman toplumu üzerinde yaptığı genom çapında ilişkilendirme çalışmasında ise, *EFEMP1*, *KCNH8* ve *SKAP2* gen varyantlarıyla KVY yatkınlığı arasında ilişki olduğu belirtilmiştir.

EFEMP1 gen varyantının, hücrel ve hücre dışı matris bileşenlerinde rol alan MMP-2 ve MMP-3 proteinlerinin ve TIMP-1 ve TIMP-3 proteinlerinin ekspresyonunu etkileyebileceği böylece damar esnekliğinin değişmesine neden olabileceği belirtilmiştir. *KCNH8*, K⁺ voltaj kapılı kanal gen ailesinin bir alt üyesidir. *KCNH8* gen varyantı (rs727139) ise, venöz dilatasyonu sağlayan K⁺ kanallarının aktivasyonu ile ilişkili olabileceği böylece venöz hiperilazsyonda bozukluk meydana gelebileceği belirtilmiştir (49). Venöz ülser oluşumuyla alakalı olan *TNF α* genindeki -308G/A polimorfizminin A alelini taşıyan bireylerin, G allel taşıyıcılarına göre yaklaşık 2 kat daha yüksek ülserasyon riskine sahip oldukları gösterilmiştir (50). Sonuçta, popülasyona özgü KVY için genetik yatkınlık yaratan gen varyantlarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Ancak, toplumumuza özgü bu konuda yapılmış kapsamlı bir çalışma halen mevcut değildir.

KVY ile ilişkili gen varyantlarının, gen ifade düzeylerine etki ettiğine dair yapılan bir çalışmada, *COL1A2* (α -2 tip I kollajen) geninde 7 baz çifti insertion/deletion polimorfizminin (rs3917), *COL1A2* ekspresyonunu yukarı düzenlediğini ve KVY riskinde 1,6 kat artışa sebep olduğu gösterilmiştir (51). Diğer yandan, KVY ile ilgili yapılan genetik araştırmaların bir diğer grubunu, gen ekspresyon array çalışmalarını içermektedir. KVY hastalarından alınan variköz damar örneklerinde yapılan mikroarray ekspresyon analizinde, %50 ya da daha fazla gen ifade değişikliğine sahip 34 mRNA bulunmuştur. Bu çalışmada kardiyovasküler sistemin gelişmesinden enflamasyon homeostazı ve prostaglandinlerin sentez yolağına kadar önemli metabolik yollarda düzenleyici rolü olan hydroxyprosta-glandindehydrogenase-15 (*HPDG*) geninin ifade seviyesinde artış olduğu ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca kollajen biyosentezinde yer alan *COL27A1* ve *COL13A1* gen gruplarının azalan regülasyonu olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada KVY olan hastalarda araşinodik asit metabolizması, prostanoid metabolizması ve prostaglandin biyosentezi de dahil olmak üzere birçok enflamatuvar yolağı düzenleyen genlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ifade seviyelerinin meydana geldiği belirlenmiştir (11).

Büyük safen venlerde (BVS) yapılan bir çalışmada, 123 tane önemli derecede farklı eksprese edilen mRNA'nın büyük safen ven varislerin patogeneğinde rol aldığı saptanmıştır. 46 mRNA'nın 7 farklı yolakta yer aldığı bu yollardan 6 tanesinin metabolik yolak olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada 6 aday uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'nın (AK021444, AF119885, uc.345-, NR_027927, G36810,

NR_027830), birincil BSV varisi patogenezinde rol oynuyor olabileceği belirtilmiştir. 6 aday lncRNA'lerden 4 tanesinin (AF119885, uc.345-, NR_027927, G36810), 11 tane önemli derecede farklı eksprese edilen mRNA ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu mRNA'lar farklı biyolojik süreçlerde (hücre döngüsü, DNA onarımı, RNA metabolizması, nörolojik fonksiyonlar ve hücre içi sinyalleri) yer alan genlerle ilişkilidir (14). miRNA ifade profillerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, farklı ifade düzeyi gösteren endotelial hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilen miR-155'in damar tekrar düzenlenmesinde kronik venöz yetersizlikte önemli olduğu düşünülmektedir. miR-202 ve miR-196a miRNA'larının KVV olan BSV doku örneklerinde ifade düzeyinin yukarı doğru arttığı belirlenmiştir. Bu iki miRNA'nın kollajen ile ilgili genleri (*COL1A2* ve *COL3A1*) hedef aldıkları belirlenmiştir. Bu miRNA'lardaki ifade seviyesinin artışı BSV duvarındaki kollajen metabolizmasını etkileyerek kronik venöz yetmezliğe neden olabileceği belirtilmiştir. miR-202 ve miR-146b-5p miRNA'larının MMP regülasyonunu etkileyerek KVV oluşumunda rol oynayabileceği değerlendirilmiştir (13). KVV patogenezinde etkin yeni moleküler mekanizmaların araştırıldığı çalışmalarda, variköz damarlarda gen regülasyonlarında rol oynayan çeşitli aday kodlamayan uzun RNA molekülleri ile küçük RNA'lar (miRNA) belirlenmiştir (12-14). Literatürde kan dolaşımındaki miRNA'ların ifade düzeyleri ile KVV arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadı.

2.3.1. Seçilen aday ncRNA'lar

2.3.1.1. miRNA'lar

miR-202

Cui ve arkadaşlarının yaptığı mikroyarray çalışmasında, miR-202 ifade seviyesinin KVV hastalarından alınan büyük safen ven örneklerinde arttığı gösterilmiştir (13). KVV hastalarıyla yapılan bir çalışmada miR-202 ifade düzeyinin variköz venlerde artmasıyla vasküler düz kas hücrelerinin düzenlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (52). Mevcut literatür bulgularına dayanarak, tez çalışması kapsamında hem lökositlerde hem de venöz dokularda araştırılmak üzere seçildi.

miR-222

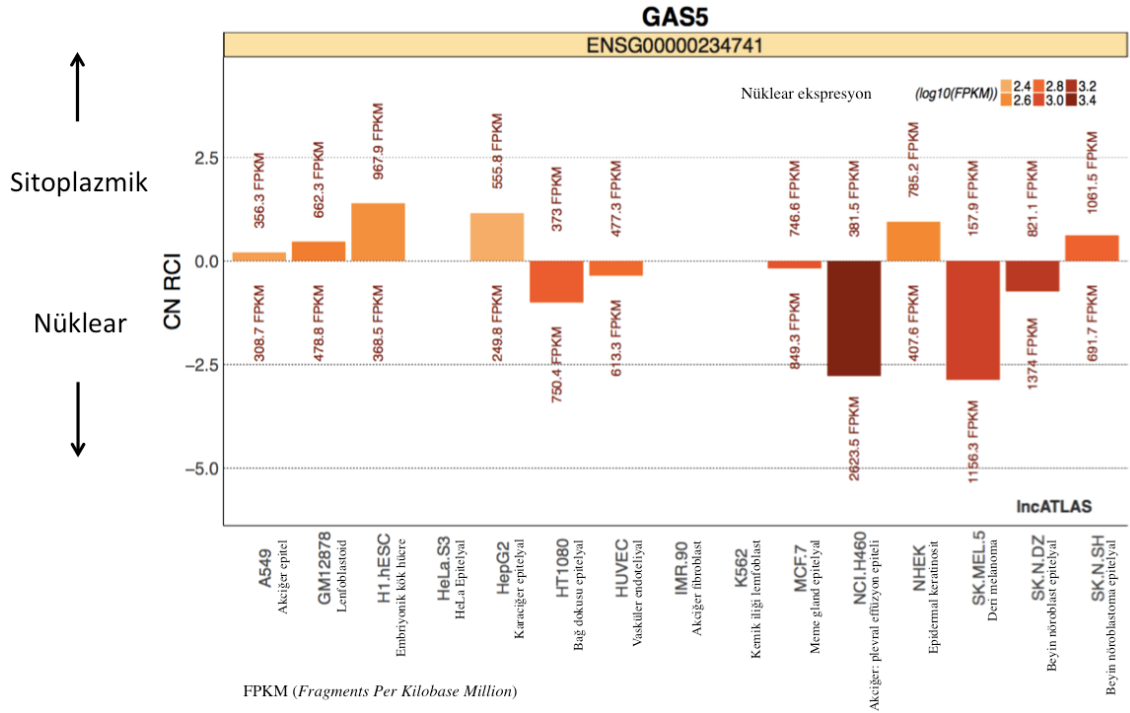
miR-222, Felli ve arkadaşları tarafından hematopoietik progenitör hücrelerinde yapılan mikroyarray analiz çalışmasında tespit edilmiş ve ifade düzeyinin azaldığı

belirtilmiştir (53). Çeşitli çalışmalarda, miR-222 ekspresyon seviyesinin, tiroid kanseri, meme kanseri, hepatoselüler karsinoma gibi çeşitli kanser türlerinde arttığı gösterilmiştir (54-56). Liu ve arkadaşlarının yaptığı sıçanlara karotid arter anjiyoplastisi uygulanan çalışmasında, arter duvarında miR-222 ifade düzeyindeki artışın, PDGF (*Trombosit kaynaklı büyüme faktörü*) ile uyarılarak kültüre edilmiş VSMC'lerdeki (Vasküler düz kas hücresi) artıştan daha fazla olduğu belirlenmiştir (57). Bu çalışmada, miR-222'nin VSCM proliferasyonu ve neointimal hiperplazi için regülatuar önemleri gösterilmiştir (57). Ayrıca, miR-222'nin endotelial hücre kültüründe endotelial hücre migrasyonu, damar oluşumu ve yara iyileşmesi üzerinde anti-anjiyogenik bir miRNA olarak önemli inhibitör etkileri olduğu belirtilmiştir (58, 59). Damar fizyolojindeki belirlenmiş rolleri sebebi ile tez çalışması kapsamında hem lökositlerde hem de venöz dokularda araştırılmak üzere bu miRNA aday olarak seçildi.

2.3.1.2. lncRNA'lar

lncRNA-GAS5

Gen lokalizasyonu 1q25 olan lncRNA-GAS5 (*growth arrest-specific transcript 5*), lenfositlerdeki apoptozu ve hücre döngülerini düzenlediği belirtilen bir transkripttir (60). Mourtada-Maarabouni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanserinde, GAS5 ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (61). Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, multipl skleroz ve sarkoidoz gibi immün sistem hastalıklarında lncRNA-Gas5 ifade düzeylerinin hastaların lökositlerinde değiştiği belirlenmiştir. lncRNA-Gas5'in, glukokortikoid reseptörünün transkripsiyonel aktivitesini modüle ederek bağışıklık fonksiyonlarının ve otoimmün, enflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı saptanmıştır (62). Biranvand ve arkadaşlarının variköz veni olan hastalarla yaptığı çalışmada, lncRNA-GAS5 ekspresyon seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (63). lncRNA-GAS5'in azalmış ekspresyonunun, insan safenöz ven düz kas hücrelerinin (HSVSMC) çoğalmasını ve Ca^{2+} bağımlı RNA bağlayıcı protein olan Annexin A2'ye doğrudan bağlanarak hücre göçünü ve dolayısıyla varisli büyük safenöz venlerin (BSV) varisite patogenezi kolaylaştırdığı belirlenmiştir (15). Bu tez çalışmasında lncRNA-GAS5, KVV hastalığının klinik durumlar ile ilişkisini ve gruplar arasında lökosit ifade seviyelerinin değişimlerini belirlemek için aday olarak seçildi. Şekil 7'de çeşitli hücre hatlarında GAS5'in hücresel kompartımanlara göre sitoplazmik ve nüklear ekspresyon profilleri gösterilmektedir.



Şekil 7: Gas5'in çeşitli hücre hatlarında Sitoplazmik-C/Nüklear-N Lokalizasyonu: Rölatif konsantrasyon indeksi (RCI, Relative Concentration Index) ve ekspresyon değerleri, grafik kaynağı: <https://incatlas.crg.eu/>

AK021444

AK021444, 13. kromozomda *POSTN* (periostin) gen lokalizasyonunda bulunmaktadır. Belirli bir lncRNA geni tanımlı olmayıp, lncRNA array setlerine dahil edilen bu transkriptin çeşitli çalışmalarda ifade düzeyleri araştırılmıştır. Han ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kolorektal kanser hastalarından alınan metastatik lenf düğümü dokularında ifade düzeyinin arttığı belirtilmiştir (64). Büyük safen venlerde (BVS) yapılan bir çalışmada, AK021444 ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir (14). Bu çalışmadaki gibi tez kapsamında oluşturulan araştırma gruplarındaki variköz damar dokusu ve lökositlerdeki ifade düzeylerini değerlendirmek üzere AK021444 lncRNA adayı olarak seçildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Araştırma Grupları

Bu çalışmada hasta grubu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Kardiyoloji Enstitüsü, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı ve İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi ekipleri tarafından variköz ven pake ekzizyonu uygulanmış KVY hastasından (n=56) hem variköz damar dokusu hem de periferik kan örnekleri temin edilerek çalışıldı. Araştırmaya dahil edilen vakalar, CEAP sınıflandırmasına göre C2-6 klinik sınıflamaya (variköz venlerden aktif ülser kadar) dahil olan primer (Ep: trombotik ve travmatik nedenlerin dışındaki sebebi belirlenemeyen), süperfisyal venler (As), derin venleri (Ad) ve perforan venleri (Ap) tutan, reflü ve obstriksiyona bağlı gelişen KVY tanısı alan orta ve ciddi semptomları olan hastalardır. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul tarafından 2018/1327 dosya numarası ile onaylandı ve katılımcılardan bilgilendirilmiş onamları alındı. Diğer yandan aynı ekibin cerrahi koroner *by-pass* orerasyonu esnasında erkek koroner kalp hastalığı olan hastalardan kontrol doku olarak alınan sağlıklı safen venlerden (n=8) kalan en az 100 mg'lık doku parçaları ve periferik kanları (EDTA'lı tüpte 10 ml) alındı. Ayrıca, detaylı fizik muayenede KVY hastalık riski olmadığı belirlenen, rutin biyokimyasal verileri normal sınırlarda olan, damar yetersizlikleri ve risk oluşturan durumlar için aile hikayesi bulunmayan ve çalışmaya katılan gönüllü bireylerden (n=37) periferik kan örnekleri alındı.

Hastaların fizik muayenesinde, tromboflebit, kadın ise gebelikleri ve menapoz durumu, uzun süre ayakta durma, Klippel-Trenaunay sendrom, May-Thurner sendrom, hipertansiyon, posttrombotik sendrom, introabdominal malinite, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, inme ve emboli hikayesi, derin ven trombozu, diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıkları, sigara ve alkol kullanımları, fizik aktivite durumu (pek az: masa başı çalışanı, <1 km yürüyen, Az: Tamirci, ev işi, günde 1-2 km yürüyen, Orta: günde 4 km yürüyen, Çok: Beden işçisi, düzenli spor) bilgileri sorgulandı. Rutin biyokimyasal verileri ve antropometrik ölçümleri kaydedildi.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Tablo 2: Kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Markası
Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	Merck
Potasyum bikarbonat (KHCO ₃)	Merck
PBS (Phosphate buffered saline)	Biomatik
DEPC (Dietil pirokarbonat)	Sigma
Trizol	Qiagen
İsopropanhol	Sigma
Etanol	Sigma
RNaz ZAP	Sigma

3.1.3. Kullanılan kitler

Tablo 3: Kullanılan kitler

Kitler	Markası
miScript SYBR Green PZR Kiti	Qiagen
HiFi cDNA Sentez Kiti	Roche

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Tablo 4: Kullanılan cihazlar

Cihazlar	Markası
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific™
Masaüstü santrifüj	Thermo Scientific™
Buzdolabı	+4°C Sanyo, -80°C Thermo, -20°C Uğur
Çeker ocak	Kermanlar
Hassas terazi	Shimadzu
Nanodrop	Thermo Scientific™

PZR Cihazı	Techne TC-412 Thermal Cycler, Techne TC-512 Thermal Cycler
Buz makinesi	Cornelius

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Gey's Solüsyonu

10X konsantrasyonda 8,291 gr NH_4Cl ve 1,001 gr KHCO_3 1000 ml DEPC'li dH_2O içerisinde çözündü ve otoklavlandı. 1X konsantrasyona DEPC'li dH_2O ile 1L olarak seyreltilip kullanıldı.

1X PBS Solüsyonu

1 adet PBS tablet 100 ml otoklavlanmış dH_2O içerisine atıldı ve iyice karıştırılarak çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Periferik kandan ve damarlardan total RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin belirlenmesi

Hastaların antekübital venlerinden 10 ml EDTA'lı tüpe alınan kanlar en geç 4 saat içerisinde soğuk taşımayla laboratuvara getirildi ve lökosit ayırımı yapıldı. 10 ml EDTA'lı tüpteki kan 50 ml falkonlara aktarıldı. Aktarılan kanın üzerine kan miktarının iki katı olacak şekilde Gey's Solüsyonu eklendi. İyice karıştırılan tüpler $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve dipte çöken pellet dağıtıldı. Pelletin üzerine kanın baştaki miktarı kadar 1X Gey's solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırılıp pellet dağıtıldıktan sonra 1 ml 1X PBS eklendi. Oda sıcaklığında 1500 g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Çeker ocak içerisinde buz üzerinde pellet 800 μl trizol solüsyonu ile homojenize edildikten sonra örnek -80°C 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

Variköz ven pake ekzisyonu ile hastalardan alınmış doku örnekleri ile kontrol grubu *by-pass* orerasyonundan kalan venöz doku örnekleri 100 mg olacak şekilde tartılıp kesildikten sonra hızlıca buz üzerinde 1 ml trizol içinde alındı. Trizol solüsyonu içerisindeki dokular bıçaklı homojenizatör yardımı ile buz üzerinde parçalandı. Farklı hasta dokusuna geçilirken homojenizatör her seferinde sırasıyla DEPC'li dH_2O , 4M Guanidin isotiyosiyanat (GTC), 0.1M NaOH ve tekrar DEPC'li dH_2O içerisinde her

solüsyon değişiminde uçları peçete ile kurutularak temizlendi. Homojenize edilen dokular -80°C 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

-80°C 'de trizol solüsyonu içerisinde homojenat halinde bekletilen kan ve dokudan elde edilmiş örnekler buz üzerinde çözölmeye bırakıldı. Çözölen örneklerin üzerine $200\mu\text{l}$ $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş kloroform eklendi. 15 saniye boyunca vorteksledikten sonra buz üzerinde 2 dk bekletildi. 12000 g 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dk boyunca santrifüj edildi. Oluşan aköz faz dikkatlice yeni $1,5\text{ ml}$ 'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. Üzerine alınan aköz faz miktarı kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de soğutulmuş %100 isopropanol eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Gece boyunca -20°C 'de bekletildi. Devamında örnekler 12000 g 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. DEPC'li dH_2O ile hazırlanmış soğutulmuş 1 ml %75'lik etanol ile alt üst edilerek yıkama yapıldıktan sonra 9000 g 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pelletler çeker ocak içerisinde kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletler $40\mu\text{l}$ RNaz-DNazsız su ile çözöldü. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırıldı.

Kan ve doku örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonunun, protein ve kimyasal kontaminasyonu olup olmadığının belirlenmesinde NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, ABD) cihazı kullanıldı. $1\mu\text{l}$ örnek alınarak ölçülen $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ oranının 1,8-2,0 aralığında olduğu RNA konsantrasyon ölçümleri kaliteli sayıldı.

3.2.2. cDNA sentezi

3.2.2.1. miRNA'lar için cDNA sentezi

Periferik kandan ve dokudan elde edilen ve -80°C 'de bulunan RNA'lar çözölmeleri için buz üzerine alındı. Konsantrasyonları, $200\text{ ng}/\mu\text{l}$ olacak şekilde RNazsız dH_2O kullanılarak ayarlandı. Qiagen miScript II RT sentez kiti kullanılarak konsantrasyonu ayarlanmış RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. İşlem aşağıdaki tablodaki protokol kullanılarak yapıldı.

Tablo 5: miRNA için cDNA sentez protokolü

İçerik	Miktar
RNA ($200\text{ ng}/\mu\text{l}$)	$5\mu\text{l}$
5x miScript Hiflex Solüsyon	$2\mu\text{l}$

10x miScript Nucleic Miks	1 µl
miScript RT Miks	1 µl
RNazsız dH ₂ O	1 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan karışım ile reaksiyon Techne TC-512 Thermal Cycler cihazında aşağıdaki program ayarlanarak gerçekleştirildi.

60 dakika 37°C

5 dakika 95°C

Sentezlenen cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.2.2. lncRNA'lar için cDNA sentezi

Periferik kandan ve dokudan elde edilen ve -80°C'de bulunan RNA'lar çözülmeleri için buz üzerine alındı. Konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde RNazsız dH₂O kullanılarak ayarlandı. Roche HiFi cDNA sentez kiti kullanılarak konsantrasyonu ayarlanmış RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. İşlem için gereken karışımlar her bir örnek için çoğaltılarak aşağıdaki tablodaki protokol kullanılarak yapıldı.

Tablo 6: lncRNA için cDNA sentez protokolü

İçerik	Miktar
İnkübasyon karışımı	
Hekzamer Primer	1 µl
RNA (100 ng/µl)	10 µl
Ara Toplam	11 µl
Reaksiyon karışımı	
Ters Transkriptaz Reaksiyon Solüsyonu	4 µl
RNaz Inhibitör	0,5 µl
dNTP Miks	2 µl
DTT	1 µl
Ters Transkriptaz	1,5 µl

Toplam	20 µl
---------------	--------------

Her bir örnek için 11 µl olan karışım, Techne TC-412 cihazı kullanılarak, 65°C’de 10 dk inkübasyona alındı. 10 dk’dan sonra program durdurulurak örnekler buza aktarıldı ve önceden hazırlanmış reaksiyon karışımı eklendi. Toplamda her bir örnek için 20 µl karışım elde edildi. Karışımlar tekrar cihaza götürüldü ve aşağıdaki tablodaki program devam ettirildi.

Tablo 7: lncRNA için cDNA sentez koşulları

Aşamalar	Sıcaklık	Süre
İnkübasyon	29°C	10 dk
Ters Transkripsiyon	48°C	30 dk
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	85°C	5 dk
Soğutma	4°C	∞

Sentezlenen cDNA’lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.3. Gerçek Zamanlı (*Real-Time*) Kantitatif PZR

3.2.3.1. miRNA’ların ifade düzeyinin belirlenmesi

Elde edilmiş ve depolanmış olan 1000 ng/µl’lik cDNA’lardan, her stok 500 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde, ara stoklar hazırlandı. Her bir ara stok 20 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edildi. Her örnek çift olarak çalışılacak şekilde aşağıdaki tabloya uyarak reaksiyon karışımı hazırlandı. miRNA’ların ifade düzeyleri için kullanılan primer assayler (Qiagen): hsa-miR-202-3p (katalog numarası: MS00009037), hsa-miR-222-3p (katalog numarası: MS00007609), Hs_RNU6-2_11 (katalog numarası: MS00033740).

Tablo 8: miRNA için RT-PZR protokolü

İçerik	Miktar
---------------	---------------

2xPZR Master Miks	5 µl
10xUniversal Primer	1 µl
10x Primer Assay	1 µl
RNazsız dH ₂ O	2 µl
cDNA	1 µl
Toplam	10 µl

Hazırlanan karışımlar ve cDNA'lar 96'lık plakalarda pipetleme yapılarak dağıtıldı. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) reaksiyonu LightCycler 480 cihazında aşağıdaki tabloda belirtilen koşullar ayarlanarak gerçekleştirildi.

Tablo 9: miRNA için RT-PZR koşulları

Program 1: Ön denatürasyon, Döngü sayısı: 1

Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
95°C	95°C	95°C

Program 2: Amplifikasyon, Döngü Sayısı: 45

Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
94°C	94°C	94°C
55°C	55°C	55°C
70°C	70°C	70°C

Program 3: Erime Eğrisi, Döngü Sayısı: 1

Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
60°C	60°C	60°C
95°C	95°C	95°C

Program 4: Soğuma, Döngü Sayısı: 1

Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
40°C	40°C	40°C

3.2.3.2. lncRNA'ların ifade düzeyinin belirlenmesi

Elde edilen ve -20°C 'de depolanmış 1000 ng/ μl 'lik cDNA'lar, her bir stok 500 ng/ μl konsantrasyonda olacak şekilde seyreltildi. Her örnek çift olarak çalışılacak şekilde reaksiyon karışımı aşağıdaki tablodaki değerlere uyacak şekilde BioRad iTaq Supermix kiti kullanılarak hazırlandı. Kullanılan primerler AK021444 ve lncRNA-GAS5 için sırasıyla: ileri primer 5'- CGAGAAGAACGAATCATTACAGG-3' ve geri primer 5'- AACAAATTTCTTCAGAGTTTCTTCTGT-3' ile ileri primer 5'-TGGTTCTGCTCCTGGTAACG-3' ve geri primer 5'- AGGATAACAGGTCTGCCTGC-3' (15, 65).

Tablo 10: lncRNA için RT-PZR protokolü

İçerik	Miktar
Supermiks (2X)	5 μl
İleri Primer (2 μM)	1 μl
Geri Primer (2 μM)	1 μl
RNasız dH ₂ O	1 μl
cDNA (500 ng/ μl)	1 μl
Toplam	10 μl

Hazırlanan karışımlar ve cDNA'lar 96'lık plakalarda pipetleme yapılarak dağıtıldı. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) reaksiyonu LightCycler 480 cihazında aşağıdaki tabloda belirtilen koşullar ayarlanarak gerçekleştirildi.

Tablo 11: lncRNA için RT-PZR koşulları

Program 1: Ön denatürasyon, Döngü sayısı: 1

Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
98°C	98°C	98°C

Program 2: Amplifikasyon, Döngü Sayısı: 45

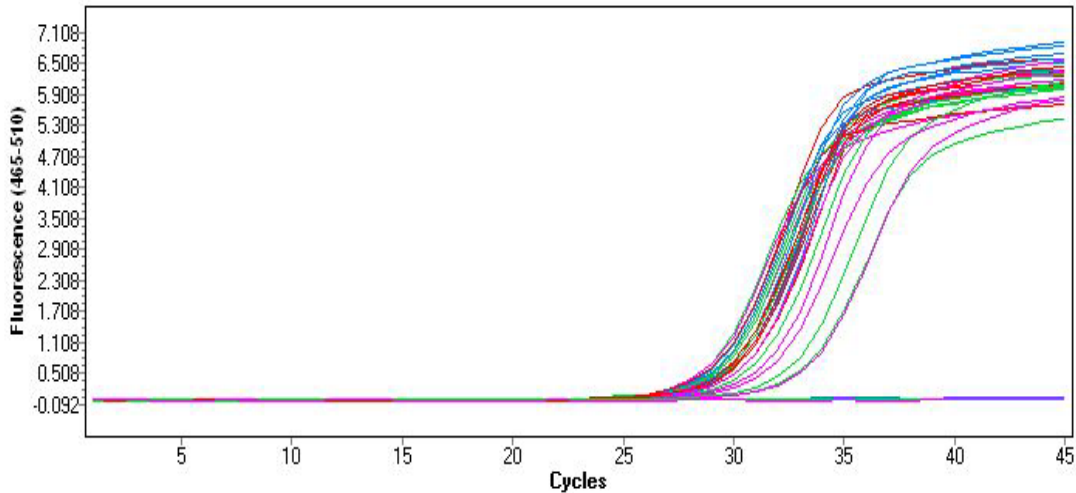
Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
95°C	95°C	95°C
58°C	58°C	58°C
60°C	60°C	60°C

Program 3: Erime Eğrisi, Döngü Sayısı: 1

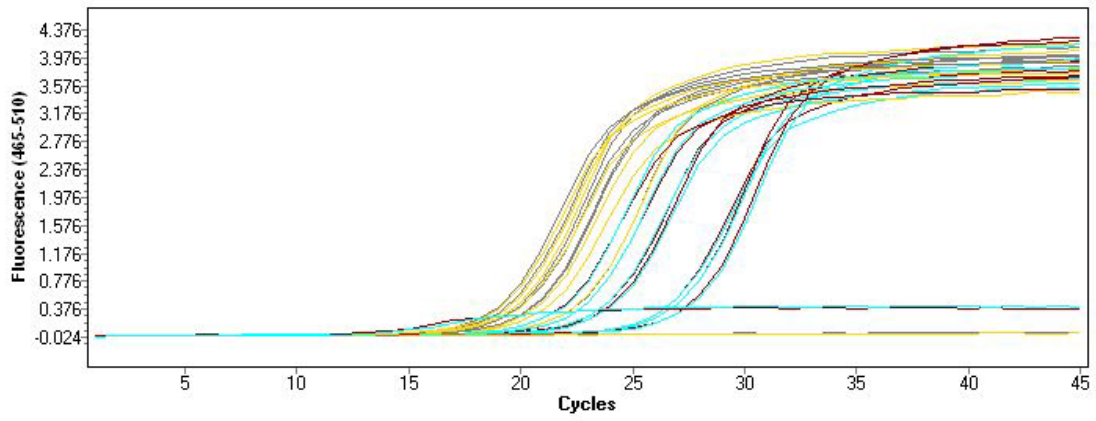
Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
95°C	95°C	95°C
60°C	60°C	60°C
95°C	95°C	95°C
Program 4: Soğuma, Döngü Sayısı: 1		
Sıcaklık	Sıcaklık	Sıcaklık
40°C	40°C	40°C

3.2.4. Rölatif kantitasyon ile miRNA ve lncRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi

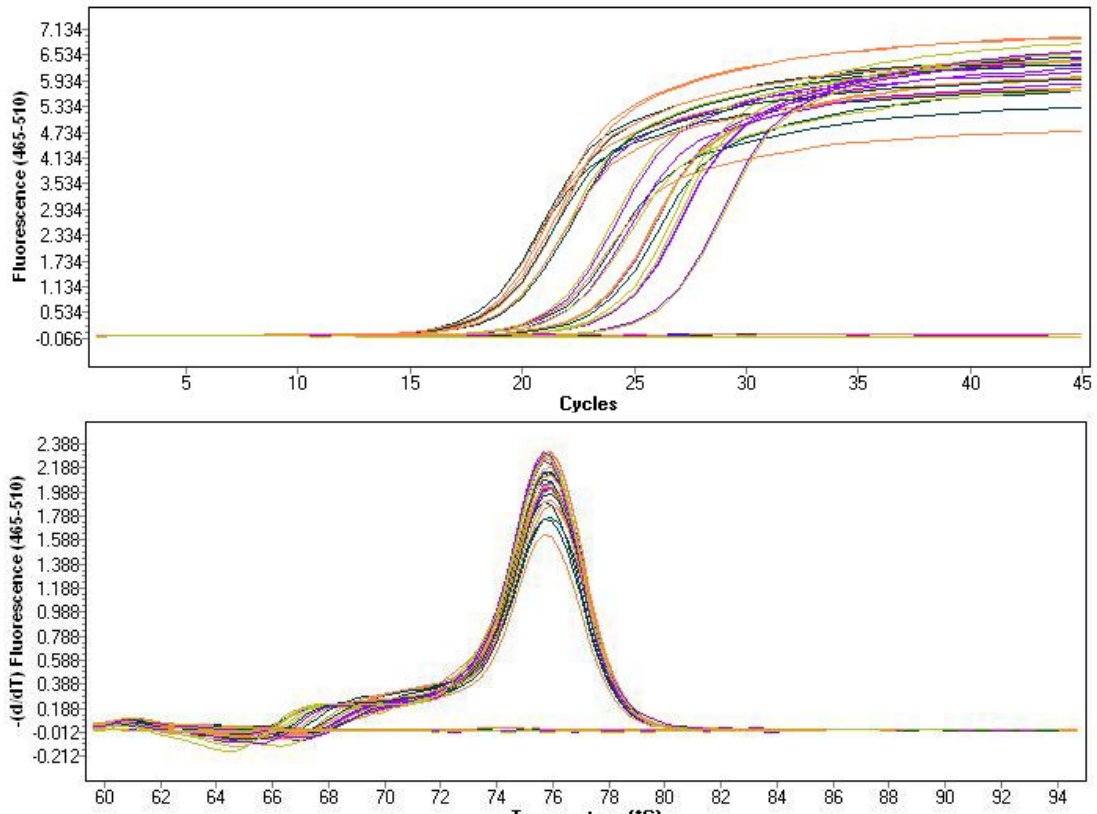
LightCycler 480 cihazıyla, çift çalışılan örnekler ile yapılan RT-PZR sonucunda elde edilen Ct değerleri kontrol edildi ve Excel dosyalarına aktarıldı. ΔCt değeri elde etmek için her bir örneğin Ct değeri endojen kontrol genlerin Ct değerlerinden çıkarıldı. Kontrol grubunun bu yöntemle elde edilmiş ΔCt değerlerinin ortalaması, kalibratör olarak kullanılmak üzere alındı. $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin hesaplanması için, elde edilmiş olan ΔCt değerlerinden, kalibratör olarak seçilmiş kontrol grubu ΔCt değerleri çıkarıldı. Bu hesaplamayla elde edilen, çift olarak çalışılmış örneklerin $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin ortalaması alındı. Rölatif kantitasyon değerinin bulunması için, $2^{-(\text{ortalama } \Delta\Delta Ct \text{ değeri})}$ formülasyonu kullanılarak hesaplama yapıldı. Şekil 8-13’de araştırılan örneklerdeki kodlamayan RNA’ların RT-PZR amplifikasyon eğrileri verilmektedir.

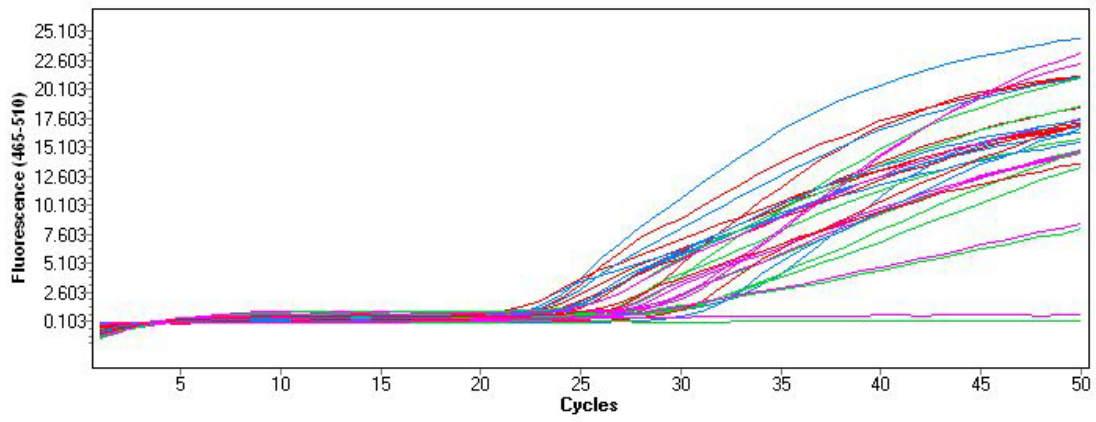


Şekil 8: Lökosit ve doku örneklerinde miR-202’nin RT-PZR amplifikasyon eğrileri

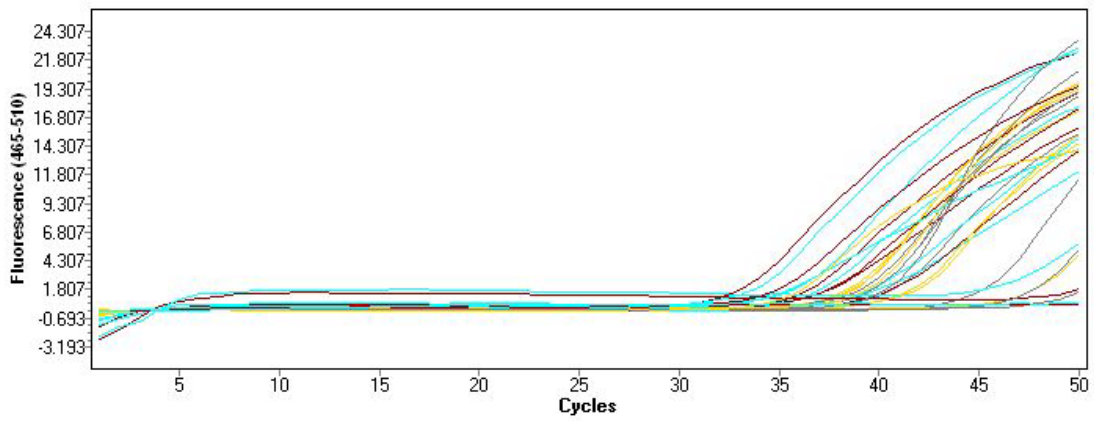


Şekil 9: Lökosit ve doku örneklerinde miR-222'nin RT-PZR amplifikasyon eğrileri

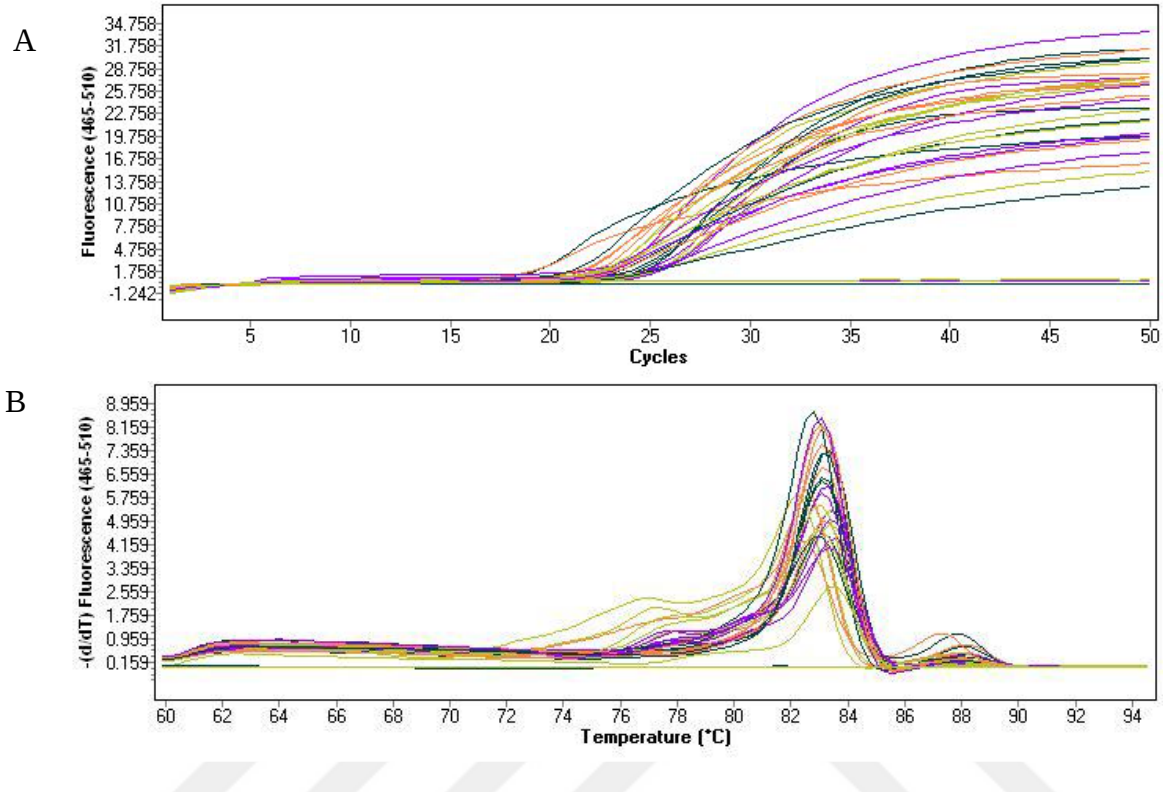




Şekil 11: Lökosit ve doku örneklerinde IncRNA-GAS5 RT-PZR amplifikasyon eğrileri



Şekil 12: Lökosit ve doku örneklerinde AK021444'nın RT-PZR amplifikasyon eğrileri



Şekil 13: Lökosit ve doku örneklerinde endojen kontrol olarak *GAPDH* RT-PZR amplifikasyon eğrileri (A) ve erime eğrisi kontrolü (*Tm* calling) (B)

3.2.5. İstatistiksel Analizler

miRNA ve lncRNA'ların hasta ve kontrol gruplarındaki ifade düzeyleri (rölatif kantitasyon değerleri) istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Araştırma gruplarında miRNA ve lncRNA'ların ifade düzeylerinin normalliği, "Shapiro-Wilk" testi ile analiz edildi ve %95 güvenle veriler normal dağılıma uymadığı için ifade düzeyleri, gruplar arasında Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Klinik datadaki sürekli değişkenler student-t testi ile kategorik değişkenler X^2 testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Kodlamayan RNA ifade düzeylerinin klinik datadaki sürekli değişken veriler ile korelasyonunda Sperman's testi kullanıldı. Bu verilen ilişkileri, korelasyon katsayısı (r), 0.00-0.25 (çok zayıf), 0.26-0.49 (zayıf), 0.50-0.69 (orta), 0.70-0.89 (yüksek), 0.90-1.00 (çok yüksek) olarak değerlendirildi. Kodlamayan RNA'ların lökositlerdeki ifade düzeylerinin tanısal önemini belirlemek için ROC eğrileri kullanılarak duyarlılık ve özgüllükleri incelendi. İstatistik

analizlerde SPSS yazılımı (20.0 versiyonu, Chicago, IL) kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamıza kronik venöz yetmezliği (KVY) olan 56 hasta ile kontrol grubuna dahil edilen 37 gönüllü birey katıldı. Çalışma gruplarının klinik ve demografik özellikleri Tablo 12’de verilmektedir. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş, cinsiyet, diyabet, hipertansiyon, obezite ($BKI > 30 \text{ kg/m}^2$) varlığı ile tromboz zamanları açısından fark yoktu. KVY grubunda alkol kullanım oranı (%28,6), beyaz kan hücresi sayısı (8.05 ± 1.85), HDL-kolesterol (48.69 ± 4.16) ve LDL-kolesterol (163.12 ± 18.25) kontrol grubuna (%9.7, 3.50 ± 4.75 , 38.90 ± 11.92 ve 125.50 ± 40.38 , sırasıyla) göre fazlaydı ($p=0.041$, $p=0.0001$, $p=0.003$ ve $p=0.001$, sırasıyla). Hasta kan elektrolit değerleri de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklıydı (Tablo 12’de Sodyum, Kalsiyum ve Potasyum değerleri).

Tablo 12: Kronik venöz yetmezliği olan hasta grubu ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri

	KVY (n=56)	Kontrol (n=37)	p değeri
Yaş, yıl	48.61± 10.02	52.73± 10.93	0.053
BKI, kg/m²	28.53± 4.87	26.56± 6.93	0.118
Sistolik kan basıncı, mmHg	78.73± 6.84	76.24± 6.29	0.007
Diastolik kan basıncı, mmHg	125.59± 14.09	117.94± 9.32	0.094
Bel çevresi, cm	106.87±10.91	95.89±9.19	0.001
Cinsiyet, Kadın (%)	44.6	44.4	0.984
Diabetes mellitus, var (%)	5.7	0	0.113
Obezite, var (%)	17.3	18.6	0.870
Hipertansiyon, var (%)	24.5	20.5	0.633
Sigara kullanımı, aktif içen (%)	40.7	43.2	0.807
Alkol kullanımı, var (%)	28.6	9.7	0.041
Beyaz kan hücresi sayısı, x103/ µl	8.05 ± 1.85	3.50 ± 4.75	0.0001
Aspartat transaminaz (AST), IU/L	21.90 ± 7.31	39.10± 43.86	0.007
Alanin aminotransferaz (ALT), IU/L	23.26± 13.69	30.73± 23.86	0.079
Açlık Glukoz, mg/dl	105.02± 18.12	118.10± 42.23	0.051

Hemoglobin A1c (%)	5.16±0.39	6.93± 1.74	0.0001
Protrombin Zamanı (PT), sn	12.35± 3.79	12.58± 4.15	0.803
PT-INR (International Normalized Ratio)	0.94± 0.29	1.07± 0.32	0.066
Trigliserid, mg/dL	162.81±18.25	182.03±95.90	0.434
HDL Kolesterol, mg/dL	48.69±4.16	38.90±11.92	0.003
LDL Kolesterol, mg/dL	163.12±18.25	125.50±40.38	0.001
Total Kolesterol, mg/dL	198.44±26.25	197.89±50.77	0.969
Sodyum, mEq/L	141.36±3.19	139.85±2.77	0.020
Kalsiyum, mg/dL	8.90±0.27	9.09±0.33	0.054
Potasyum, mEq/L	4.46±0.29	4.09±0.57	0.0001
Tiroid Stimülen Hormon (TSH), uIU/mL	2.53±0.24	3.89±7.63	0.465
* p≤0.05 anlamlılık değeri			

KVY hastalarının demografik ve klinik özellikleri Tablo 13'te verilmektedir. Kadın ve erkeklerin KVY klinik bulguları ve diğer komorbiditeleri ile biyokimyasal verileri bu tabloda karşılaştırıldı. Hastaların hiçbirinde Klippel-Trenaunay sendromu, May-Thurner sendromu, posttombotik sendrom, introabdominal malinite, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, inme ve emboli hikayesi yoktu. Derin ven trombozu sadece bir erkek hastada mevcuttu. CEAP klinik sınıflandırmada kadınlarda C3, ödem bulgusu ve C2, variköz ven bulguları erkeklerden daha fazlaydı, C4, deri ve deri altı dokudaki değişiklikler erkeklerde daha fazlaydı ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.103). CEAP etiyolojik sınıflandırmada ise birincil nedenler erkeklerde yüksek iken ikincil nedenler kadınlarda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti (p=0.049). Kadın ve erkekler arasında uygulanan operasyon tipi olarak endovenöz radyofrekans veya açık cerrahi yüzdeleri farklı idi. Erkeklerle (%89.3) açık operasyon uygulaması kadınlardan (%52.2) daha fazla idi (p=0.003). KVY olan venöz damar tipleri (VSM veya VSP), kadın ve erkekler arasında fark yoktu. Cinsiyet grupları arasında, sigara ve alkol kullanımları ile fiziksel aktivite durumları istatistiksel olarak farklı idi (p<0.002). Hastalarda biyokimyasal verilerden sadece AST ve ALT erkeklerde kadınlardan daha fazlaydı (p=0.007 ve p=0.006, sırasıyla) (Tablo 13).

Tablo 13: Kronik venöz yetmezliği olan semptomatik hastaların cinsiyete göre demografik ve klinik özellikleri

	Erkek (n=31)	Kadın (n=25)	p değeri*
Yaş	47.39± 9.86	50.12± 10.19	0.315
BKI, kg/m²	27.81± 4.37	29.41± 5.38	0.226
Sistolik kan basıncı, mmHg	79.076± 5.19	78.33± 8.43	0.704
Diastolik kan basıncı, mmHg	122.78± 7.76	128.75± 18.55	0.132
Bel çevresi, cm	112.00±16.53	104.30±6.44	0.209
Ekstremiteler			0.859
Sağ, (%)	55.2	47.8	
Sol, (%)	27.6	30.4	
Bilateral, (%)	17.2	21.7	
CEAP Klinik Sınıflandırma			0.103
C2; variköz venler, (%)	3.2	8.3	
C3; ödem, (%)	9.7	29.2	
C4; Deri ve deri altı dokudaki değişiklikler, (%)	87.1	62.5	
CEAP Etiyolojik Sınıflandırma			0.049
Birincil, (%)	73.7	42.1	
İkincil, (%)	26.3	57.9	
Patofizyolojik durum			0.047
Reflü, var (%)	100.0	88.0	
Operasyon tipi			0.003
Radyofrekans, (%)	10.7	47.8	
Açık, (%)	89.3	52.2	
KVY Lokalizasyon			0.999
VSM, (%)	73.3	73.9	
VSP, (%)	13.3	13.0	
VSM ve VSP, (%)	13.3	13.0	
Endovenöz Radyofrekans, var (%)	45.5	84.6	0.043
Flebektomi, var (%)	100	95.7	0.257
Aile öyküsü, var (%)	71.0	76.0	0.672
Diabetes mellitus, var (%)	3.4	8.3	0.444
Obezite, var (%)	17.2	17.4%	0.989
Hipertansiyon, var (%)	20.0	30.4	0.382
Tromboflebit, var (%)	17.2	15.0	0.835
Sigara kullanımı, aktif içen (%)	65.5	12.0	0.0001
Alkol kullanımı, var (%)	45.2	8.0	0.002
Fiziksel Aktivite			0.0001

Pek az, (%)	3.2	4.0	
Az, (%)	12.9	76.0	
Orta, (%)	61.3	20.0	
Çok, (%)	22.6	0.0	
Ayakta Durma, var (%)	90.0	70.8	0.072
Ortalama doğum sayısı, 3 ve üzeri (%)		54.0	
Gebelik durumu (%)		76.0	
Menapoz, var (%)		28.0	
Beyaz kan hücresi sayısı, x103/μl	8.52 $\pm$ 1.98	7.46 $\pm$ 1.49	0.031
Aspartat transamilaz (AST), IU/L	24.54 $\pm$ 8.08	19.16 $\pm$ 5.28	0.007
Alanin aminotransferaz (ALT), IU/L	28.48 $\pm$ 16.32	18.04 $\pm$ 7.74	0.006
Açlık Glukoz, mg/dl	107.69 $\pm$ 21.16	101.92 $\pm$ 13.54	0.247
Hemoglobin A1c (%)	5.18 $\pm$ 0.29	5.15 $\pm$ 0.43	0.933
Protrombin Zamanı (PT), sn	12.3 $\pm$ 4.14	12.42 $\pm$ 3.44	0.909
PT-INR (International Normalized Ratio)	0.97 $\pm$ 0.39	0.91 $\pm$ 0.08	0.501
Trigliserid, mg/dL	156.00 $\pm$ 15.16	165.90 $\pm$ 19.34	0.331
HDL Kolesterol, mg/dL	50.20 $\pm$ 0.44	48.00 $\pm$ 4.91	0.344
LDL Kolesterol, mg/dL	158.00 $\pm$ 17.88	165.45 $\pm$ 18.76	0.468
Total Kolesterol, mg/dL	184.00 $\pm$ 23.02	205.00 $\pm$ 25.88	0.143
* $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri			

Çalışmada, KVY hasta ve kontrol gruplarında aday kodlamayan RNA ifade düzeyleri hem damar dokularında hem de lökositlerde belirlendi. KVY hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylerden alınan periferik kandan izole edilen lökositlerdeki kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldı (Tablo 14). Bu iki grupta, AK021444 ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.015$). AK021444 ifade düzeyi hasta grubunda, kontrol grubuna göre 4,5 kat artmaktadır. Bunun yanında, bu iki grup arasında, miR-202 ve GAS5 ifade düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.0002$). miR-202 ifade düzeyi 32 kat azalırken, GAS5 ifade düzeyinin ise 51 kat azaldığı belirlendi.

Tablo 14: KVY Hasta ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lökositlerindeki ifade düzeyleri

Kodlamayan RNA	RK değeri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		p değeri*
	KVY (n=56)	Kontrol (n=37)	
miRNA'lar			
miR-202	0.03 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 3.44	0.0001
miR-222	0.83 $\pm$ 0.75	1.03 $\pm$ 0.95	0.663
lncRNA'lar			
AK021444	2.48 $\pm$ 16.69	0.55 $\pm$ 2.10	0.015
GAS5	0.59 $\pm$ 0.77	30.28 $\pm$ 60.72	0.0001

RK: Rölatif kantitasyon, *Mann-Whitney U test sonucu, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

KVY hasta grubunda yer alan bireylerden variköz ven pake ekzizyonu sırasında alınan venöz doku örneklerindeki ve kontrol grubunda yer alan bireylerin *by-pass* operasyonundan kalan venöz doku örneklerindeki kodlamayan RNA ifade düzeyleri karşılaştırıldı (Tablo 15). KVY hasta ve kontrol grupları arasında, miR-222 ifade düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi ($p=0.016$). Ayrıca, AK021444 ifade düzeyinde, istatistiksel olarak anlamlı azalma belirlendi ($p<0.0002$). miR-222 ifade düzeyi 7,4 kat artarken, AK021444 ifade düzeyi 12,8 kat azalmaktadır.

Tablo 15: KVY Hasta ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların venöz dokulardaki ifade düzeyleri

Kodlamayan RNA	RK değeri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		p değeri*
	KVY (n=56)	Kontrol (n=8)	
miRNA'lar			
miR-202	13.32 $\pm$ 46.76	1.96 $\pm$ 2.40	0.542
miR-222	8.55 $\pm$ 14.82	1.15 $\pm$ 0.69	0.016
lncRNA'lar			
AK021444	0.13 $\pm$ 0.39	1.66 $\pm$ 2.03	0.0001
GAS5	1.71 $\pm$ 2.99	1.05 $\pm$ 0.13	0.377

RK: Rölatif kantitasyon, *Mann-Whitney U test sonucu, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

Seçilen kodlamayan RNA'ların lokositlerdeki ifade düzeyleri, hasta ve kontrol grupları arasında, cinsiyete göre karşılaştırıldı (Tablo 16-17). Kadınlarda lokositlerdeki miR-202 ifade düzeyinde 63 kat azalma gözlenirken, GAS5 ifade düzeyinde 58 kat azalma gözlendi ($p < 0.0002$). Erkeklerde ise lokositlerde, miR-202, AK021444 ve GAS5 ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0.0002$, $p = 0.046$ ve $p < 0.0002$). miR-202 ifade düzeyi 30 kat, AK021444 ifade düzeyi 3 kat ve GAS5 ifade düzeyi 53 kat azalmaktadır.

Tablo 16: Kadınlarda KVV ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lokositlerindeki ifade düzeyleri

Kodlamayan RNA	RK değeri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		p değeri*
	KVV (n=25)	Kontrol (n=20)	
miRNA'lar			
miR-202	0.02 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 4.61	0.0001
miR-222	0.99 $\pm$ 0.96	0.99 $\pm$ 0.82	0.882
lncRNA'lar			
AK021444	5.14 $\pm$ 25.04	0.12 $\pm$ 0.34	0.080
GAS5	0.36 $\pm$ 0.33	20.89 $\pm$ 22.19	0.0001

RK: Rölatif kantitasyon, *Mann-Whitney U test sonucu, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

Tablo 17: Erkeklerde KVV ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların lokositlerindeki ifade düzeyleri

Kodlamayan RNA	RK değeri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		p değeri*
	KVV (n=31)	Kontrol (n=17)	
miRNA'lar			
miR-202	0.02 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 1.05	0.0001
miR-222	0.70 $\pm$ 0.52	1.07 $\pm$ 1.11	0.682
lncRNA'lar			
AK021444	0.35 $\pm$ 1.20	1.05 $\pm$ 3.05	0.046
GAS5	0.78 $\pm$ 0.96	41.32 $\pm$ 86.44	0.0001

RK: Rölatif kantitasyon, *Mann-Whitney U test sonucu, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

Erkeklerde, venöz dokulardaki kodlamayan RNA ifade düzeyleri, kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırıldı (Tablo 18). Bu iki grup arasında, miR-222 ifade düzeyinin

istatistiksel olarak 8,3 kat arttığı gözlenirken ($p=0.025$), AK021444 ifade düzeyinin anlamlı olarak 12.8 kat azaldığı bulundu ($p<0.0002$).

Tablo 18: Erkeklerde KVY ve kontrol grupları arasındaki kodlamayan RNA'ların venöz dokulardaki ifade düzeyleri

Kodlamayan RNA	RK değeri (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)		p değeri*
	KVY (n=31)	Kontrol (n=8)	
miRNA'lar			
miR-202	8.08 $\pm$ 16.11	1.96 $\pm$ 2.40	0.720
miR-222	9.56 $\pm$ 17.97	1.15 $\pm$ 0.68	0.025
lncRNA'lar			
AK021444	0.13 $\pm$ 0.48	1.66 $\pm$ 2.03	0.0001
GAS5	1.47 $\pm$ 2.32	1.05 $\pm$ 0.13	0.279

RK: Rölatif kantitasyon, *Mann-Whitney U test sonucu, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

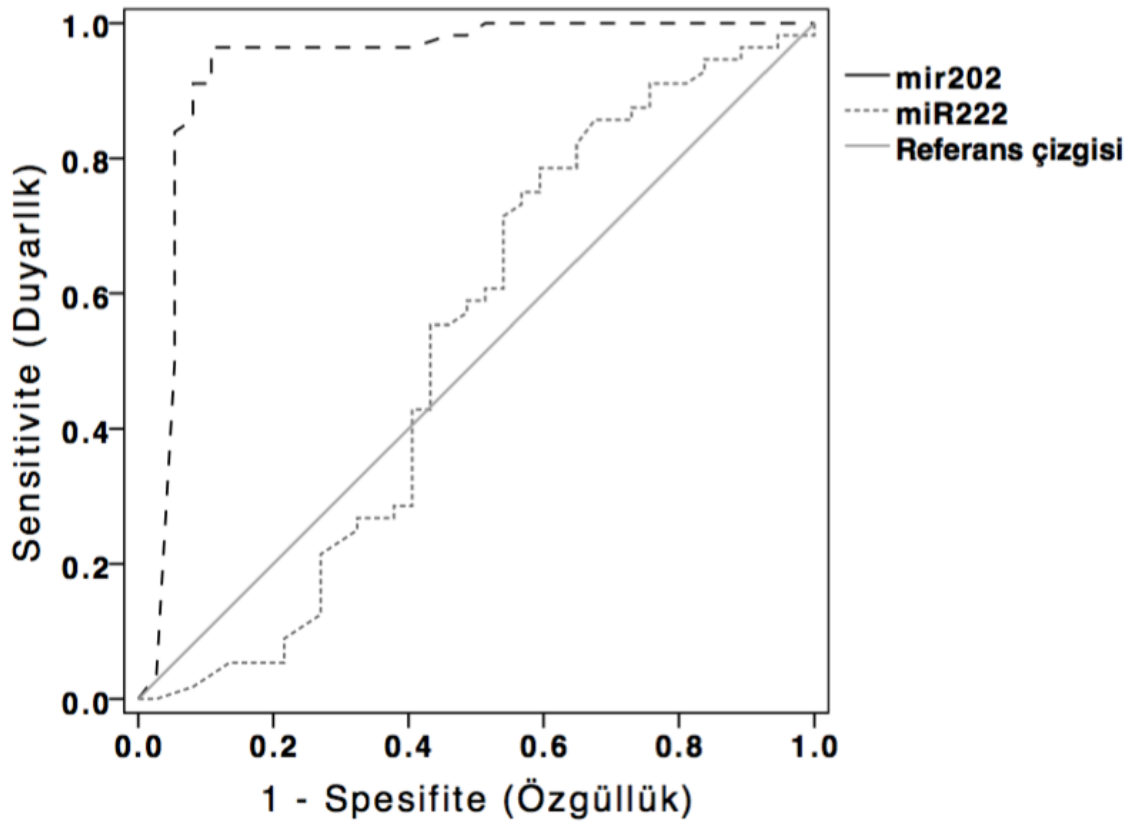
Cinsiyet gruplarında kodlamayan RNA profillerinin, kadın ve erkek olarak ayrıldığı takdirde de benzer olduğu belirlendi.

Tez çalışmasında, tüm grubun lökosit örneklerinde KVY ile istatistiksel olarak miR-202, AK021444 ve GAS5 kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri ilişkili bulundu. Araştırılan dört kodlamayan RNA'nın KVY'deki tanısal değerinin belirlenebilmesi için ROC analizi yapıldı (Tablo 19). miRNA'ların ROC analizi eğrisi, Şekil 14'de, lncRNA'ların ROC analizi eğrisi Şekil 15'de verilmektedir. Bu analize göre, KVY tanısı için kodlamayan RNA ifade düzeyi "cut-off" değerlerinin miR-202 ve GAS5 için altına inmesi, AK021444 için üstüne çıkması Tablo 19'da belirtilen duyarlık ve özgüllük ile belirlenebileceği bulundu.

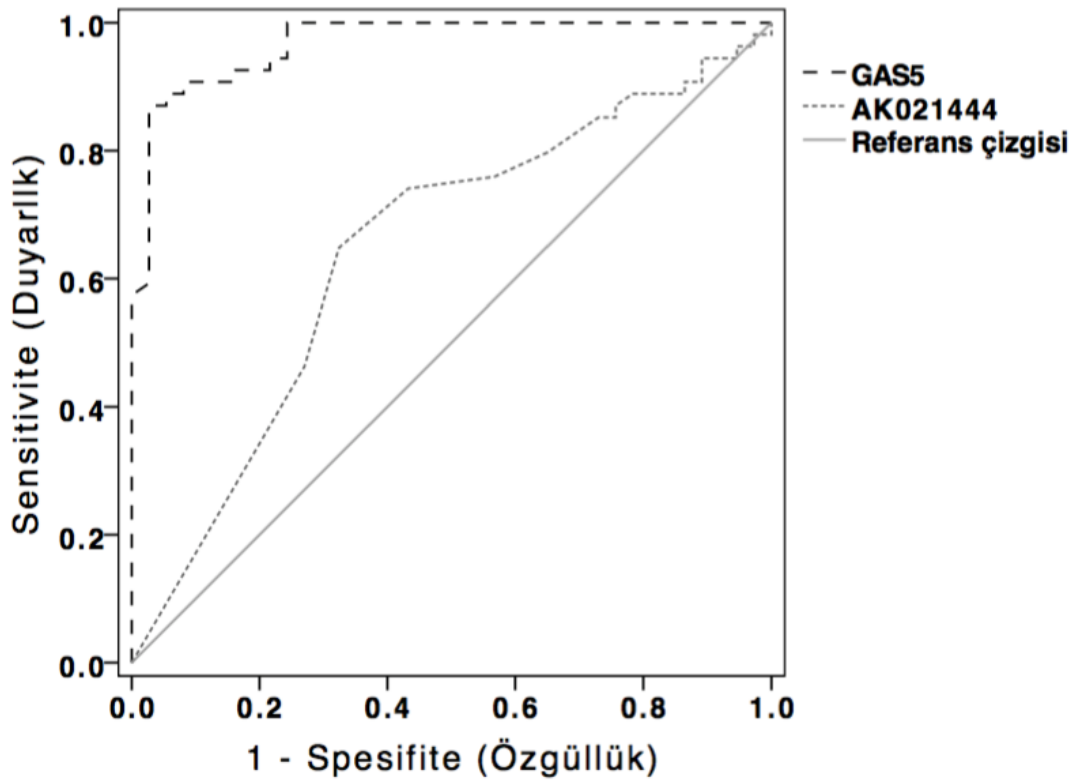
Tablo 19: Çalışma gruplarının lökositlerinde kodlamayan RNA'ların ROC (Receiver operating characteristic) analizi

miRNAs	Durum	AUC	95% CI	p değeri	"Cut-off"	Sensitivite (Duyarlık), %	Spesifite (Özgüllük), %
miR-202	KVY	0.93	0.87-1.00	0.0001	0.075	96.4	89.2
miR-222	KVY	0.53	0.40-0.66	0.663	1.00	75.0	43.2
AK021444	KVY	0.97	0.94-0.99	0.0001	0.815	87.0	97.3
GAS5	KVY	0.65	0.53-0.76	0.019	0.025	74.0	56.8

Not. AUC, ROC eğrisinin altındaki alan; CI, güven aralığı; 0.5 AUC ile karşılaştırıldığındaki p değeri



Şekil 14: miR-202 ve miR-222 duyarlılık ve özgüllük ROC eğrileri



Şekil 15: GAS5 ve AK021444 duyarlılık ve özgüllük ROC eğrileri

KVY olan hastaların korelasyon analizinde, miR-222 ifade düzeyinin lökosit ve variköz doku arasında zayıf ($r=-0.355$, $p=0.007$) ancak anlamlı bir negatif korelasyon bulundu. Doku ve lökosit örnekleri arasındaki kodlamayan RNA'ların diğer ilişkiler Tablo 20'de verilmektedir, tabloda istatistiksel olarak ilişkili olanlar koyu olarak belirtildi.

Tablo 20: KVY grubunda lökosit ve doku kodlamayan RNA düzeyleri arasındaki korelasyon

	Lökosit miRNA'lar		Lökosit lncRNA'lar	
Doku kodlamayan RNA'lar	miR-202 Korelasyon katsayısı (r), p	miR-222 Korelasyon katsayısı (r), p	AK021444 Korelasyon katsayısı (r), p	GAS5 Korelasyon katsayısı (r), p
miR-202	(0.023) 0.865	(-0.364) 0.006	(0.152) 0.272	(-0.130) 0.340
miR-222	(-0.015) 0.910	(-0.355) 0.007	(0.025) 0.859	(-0.128) 0.345
AK021444	(0.350) 0.011	(0.092) 0.515	(-0.124) 0.392	(-0.142) 0.314
GAS5	(-0.026) 0.847	(-0.103) 0.451	(-0.04) 0.775	(0.001) 0.996

Sonuç olarak ilk defa bu çalışmada, KVY'de aday kodlamayan RNA'ların hem lökosit hem de venöz damar dokularındaki ifade düzeyleri belirlenerek klinik parametreler ile ilişkileri ve biyobelirteç olarak önemleri gösterildi.

5. TARTIŞMA

Kronik venöz yetersizlik, alt ekstremitelerde görülen yaygın bir vasküler hastalıktır (16, 66). Semptomatik KVV görülme sıklığı, toplumlarda endüstriyel olarak gelişmişlik seviyesine göre değişmekle beraber, dünya çapındaki prevalans tahminleri %60'a kadar çıkmaktadır (18, 67, 3). Genel olarak toplumumuzdaki prevalansı bilinmese de Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yapılmış bir çalışmada (n=850, 60 yaş ve üstü) variköz ven prevalansı %36.7 olarak belirlenmiştir (68). Bu çalışmada, variköz veni olan bireyler için aile hikayesi varlığı %49.5 bulunmuşken (68) çalışmamıza katılan KVV hastalarının pozitif aile hikayesi oranı yaklaşık %73 idi. Toplumumuzda KVV'nin özelliklerini belirlemeye yönelik yapılan bir başka araştırma olan VEYT-I çalışmasında (n=2123 KVV hastası, yaş 40.5+14.5 yıl, %51.04 erkek) KVV hastalarının en sık şikayetlerinin yorgunluk (%56.3), ayakta ağrı (%48.7) ve ağrı (%40.9) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, yaklaşık %90'ının herhangi bir tedavi almamış risk skoru yüksek olan KVV hastalarının (%51.5) semptomsuz KVV hastalar ile kıyaslandığında çoğunlukla tam gün ofis çalışanı ve daha yüksek yaşa sahip oldukları belirlenmiştir (69). Çalışmamızda ise, tedavi için kliniğe başvuran vakaların ayakta durma oranları %80 olup, cinsiyete göre fizik aktivite durumlarının farklı olduğu, kadınların erkeklerden daha az fizik aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi.

KVV, alt ekstremitte damarlarındaki hemodinamik bozukluklardan kaynaklanır, venöz tıkanıklık, venöz kapak yetersizliği ve baldır kası pompası disfonksiyonu ile ortaya çıkar ve bu da venöz hipertansiyon ve reflü ile sonuçlanır (66, 70). KVV, hastalık ciddiyetine göre, konservatif yöntemler ya da girişimsel ve cerrahi yöntemlerle tedavi edilir (38, 71). Bununla birlikte, bu tedaviler KVV nüksetmesini engellemediği için varis patofizyolojisini anlamak önem taşımaktadır. Bu çalışmaya katılan cerrahi tedavi uygulanan KVV hastaların etyolojik faktörleri arasında birincil nedenler erkeklerde kadınlardan daha fazla idi. Ek olarak, CEAP sınıflamasına göre klinik görünümünde deri ve deri altı dokudaki değişiklikleri (C4) her iki cinsiyette de yüksek oranda (yaklaşık %80), patolojik sınıflamaya göre ise reflü varlığı %94.6 idi. Çalışmanın variköz ven pake ekzisyonu uygulanmış KVV hastalarının ciddi klinik bulguları mevcuttu ve hastaların hem variköz damar dokuları hem de periferik kanlarından ayrılan lökositlerinde aday kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri belirlenerek hastalık patofizyolojindeki önemleri araştırıldı.

1993'teki keşiflerinden bu yana, gen düzenleyici rollerinin tespit edildiği biyolojik süreçlerle ilgili kodlamayan RNA'lerden miRNA'nın profillemeye çalışmaları yapılmıştır (72, 73). Bazı kardiyovasküler hastalıklarda dolaşımdaki miRNA seviyelerinin değiştiği gösterilmiş ve dolaşımdaki miRNA'ların yüksek stabiliteye sahip olması ve kolayca tespit edilebilmesi nedeniyle, bunun bir prognostik araç olarak kullanılmasıyla ilgi uyandırmıştır. miRNA'lar, kan plazmasındaki tespiti ile kalp yetmezliği (HF), atriyal fibrilasyon, akut miyokard enfarktüsü (AMI) ve aterosklerozun biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (47, 74, 75). Çalışmamızda hastaların plazma örnekleri de ileride yapılacak hücre-dışı miRNA seviyelerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar için saklandı. Periferik kan örneği, invaziv bir girişim ile temin ediliyor olsa da kolay erişilebilir bir numunedir ve plazma, kanda lökositlerin ayrılması işlemi gerektirmedikinden daha kolay elde edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında, lökositlerde kodlamayan RNA'ların ifade düzeyleri hem hastalığın enflamasyonla ilişkisi olabileceği için gruplar arasında karşılaştırıldı hem de KVV tanısı için biyobelirteç nitelikleri ROC analizleri ile değerlendirildi.

Diğer yandan uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), 200 nükleotidden daha uzun, transkripsiyonel, epigenetik veya translasyonel yanıtları kontrol etmek için RNA, DNA veya protein ile etkileşime girebilen, protein kodlamayan RNA'lardır (6, 39). Yapılan çeşitli çalışmalarda, kardiyovasküler hastalıklarda, lncRNA'ların hastalığın gelişmesi, ilerlemesi ve rejenerasyonunda önemli olan biyolojik süreçlerde gen düzenleyici olarak rol aldığı belirtilmiştir (9, 76). lncRNA'ların çeşitli çalışmalar sonucunda dolaşımdaki ve diğer vücut sıvılarındaki tespiti ve stabil oluşu nedeniyle hastalık tanı ve tedavilerinde terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (47). Bu çalışmada, her iki aday lncRNA'nın hastalık ile ilişkili oldukları bulundu, dolayısıyla hastalık patogenezindeki rolleri ve terapötik önemleri ile ilgili araştırmalar için hedef moleküller olarak değerlendirilebilir.

Literatürde, KVV'de kodlamayan RNA ifade düzeyleri ile ilgili sonuçlar incelendiğinde, Cui ve arkadaşlarının yaptığı miRNA profillemeye çalışmasında KVV tanılı erkek hastalardan alınan (n=5) BSV örneklerinde miR-202 ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir (13). Huang ve arkadaşları, miR-202'nin hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkisini incelemek için KVV tanılı hastaların variköz venlerinde ve *in vitro* PDGF (*Trombosit kaynaklı büyüme faktörü*) ile indüklenmiş HUVSMCs (*İnsan venöz düz kas hücreleri*)'de bir çalışma yapmıştır (52). Bu çalışma sonucunda, variköz venlerde miR-202 ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Devamında, miR-202 ile

ilişkili variköz venlerin patolojik değişimini doğrulamak için SM-22 α , matriks metalloproteinaz-1 (MMP1), TIMP-1, kollajen I ve kollajen III'ün mRNA ekspresyonu analiz edilmiş ve MMP1 ile kollajen III ifade seviyelerinde azalma gözlenirken kollajen I ifade seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir (52). Çalışmamızda diğer çalışmalardaki gibi, miR-202 ifade düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da venöz dokularında arttığı aynı zamanda özellikle lökositlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Lökositlerde azalmış miR-202 ifade düzeyi, enflamasyon ile ilişkili olarak KVV gelişimine katkı sağlıyor olabilir. KVV'nin patofizyolojik mekanizmalarından biri olarak kan basıncına bağlı tetiklenen enflamasyonda [16], endotel hücrelerin mekanik stresi ile artan makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1), VCAM-1, L-selektin ve E-selektinlerin, ICAM-1, sitokinlerin (dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1) ve MMP ekspresyonları sebebi ile damar duvarı kolajeninin ve elastininin yapısal bileşenlerinde değişiklikler meydana geldiği belirlenmiştir [21, 34, 35]. Dolayısıyla bu çalışmada, ilk defa KVV'de lökositlerdeki azalan miR-202 ifade düzeyinin KVV ile ilişkili olduğu belirlendi.

miR-222'nin ifade seviyesindeki değişimleri incelemek için yapılan çalışmalarda, endotelial hücre kültüründe bu miRNA'nın anti-angiyojenik etki gösterdiği gözlenmiştir (58, 59, 77, 78). Kardiyovasküler risk faktörleri olan hastalarda azalmış sayıda endotelial progenitor hücrelerin (EPC), kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Dolaşımdaki EPC'lerin, çeşitli kardiyovasküler risk faktörlerine yanıt olarak endotelial bütünlüğün korunmasında ve apoptotik veya hasarlı endotel hücrelerinin değiştirilmesinde anahtar bir role sahip olduğu belirtilmektedir (79). Liu ve arkadaşlarının çalışmasında, miR-222'nin ifade düzeyi artışının VSMC proliferasyonuna ve neointimal hiperplaziye neden olabileceği belirtilmiştir (57). Garofalo ve arkadaşları tarafından, agresif küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve hepatokarsinoma hücrelerinde miR-222 ekspresyon seviyesinin artışının *PTEN* geninin ifade düzeyini aşağı doğru düzenlediğini gösteren bir çalışma yapılmıştır (80). Green ve arkadaşlarının, insan pulmoner arter düz kas hücrelerinde (HPASMC) yaptığı çalışmada, *PTEN* geninin aşağı doğru düzenlenmesinin VSMC proliferasyonunu etkilediğini göstermiştir (81). Liu ve arkadaşlarının ağız dil skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde (OTSCC) yaptığı çalışmada ise miR-222'nin matriks metalloproteinaz-1 (*MMP1*) ifade seviyesini düzenlediği gösterilmiştir (82). Bu çalışmada ise, KVV hastaların venöz dokularında,

miR-222 ifade düzeyi, sağlıklı bireylerin venöz dokularına göre 7,43 kat artışı belirlendi. Bu artışın, variköz damarlardaki etkisini belirlemek için daha önceki çalışmalardaki veriler doğrultusunda hedef genlerinin belirlenmesi ve *PTEN* ya da *MMP1* gen regülasyonunun araştırılması hastalık patogenezindeki rolünü ve anti-anjiyogenik etkisini belirlemek için önem taşıyabilir.

Bu tez çalışmasında, miRNA'lar yanısıra lncRNA'lardan iki aday, literatür sonuçlarına göre belirlenerek çalışıldı. Uzun kodlamayan RNA adaylarından biri olan lncRNA-GAS5, Biranvand ve arkadaşlarının variköz veni olan hastalarla yaptığı çalışmada, periferik kandaki makrofajlardaki ifade seviyesinin azaldığını ve bununla ilişkili olarak MMP9 ifade seviyesinin arttığını bulmuşlardır (63). MMP-9 ifade seviyesinin insan variköz venlerinde arttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (83-85). MMP-9 venlerin yapısında önemli bir bileşen olan elastinin düzenlenmesinde görevli olan enzimlerden birisidir (86). Diğer yandan, Lu ve arkadaşlarının, atriyal fibrilasyon hastalarından alınan sağ atriyal apendaj dokuları ve AC16 (insan kardiyomiyosit) hücre hattında yaptığı çalışmada, lncRNA-GAS5 ifade düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (87). Wang ve arkadaşlarının GAS5'in vasküler yeniden düzenlemedeki rolünü incelemek için yaptığı çalışmada, doğal hipertansif sıçan modeli ve insan umbilikal damar endotel hücre hattı (HUVECs) kullanılmış ve GAS5'in, kaudal arterler, karotis arterler, renal arterler ve torasik arterler dahil olmak üzere arterlerin yeniden şekillenmesinde rol aldığı belirtilmiştir. Ayrıca, GAS5 ifade düzeyinin, hipertansiyonlu farelerde, endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir (88). Bu çalışmada, literatürle uyumlu olarak, lökositlerde, KVY tanıli hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla, GAS5 ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Bununla birlikte, hastaların variköz dokularında, GAS5 ifade düzeyinin normal venöz dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artışı tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında araştırılan AK021444 olarak adlandırılan lncRNA'nın Rui ve arkadaşlarının kolorektal kanserle ilişkili yaptıkları mikroarray çalışmasında, ifade düzeyinin metastatik lenf nodunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu lncRNA'nın, 13. kromozomda aynı gen lokalizasyonunda bulunduğu *POSTN* (Periostin) geni ile cis-regüle olduğu belirtilmiştir (89). Osteoblast-spesifik faktör 2 olarak da adlandırılan periostin, salgılanan bir hücre dışı matris adhezyon proteindir ve miyokard enfarktüsünü takiben yara iyileşmesi ve ventriküler yeniden şekillenme dahil olmak üzere doku

gelişimi ve yenilenmesinde, ayrıca kolon, pankreas, yumurtalık, meme, baş ve boyun, tiroid ve mide kanseri gibi çok çeşitli kanserlerde tümör gelişiminde rol aldığı belirtilmektedir (90-92). Li ve arkadaşlarının büyük safen venlerde yaptığı bir mikroarray çalışmasında, AK021444 ifade düzeyinin, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığı belirtilmiş olsa da (14) çalışmamızda variköz ven dokularında 12,8 kat azaldığı, lökositlerde ise anlamlı olarak 4,5 kat artığı belirlenmiştir. Li ve arkadaşlarının çalışmasında 32 Çinli hastanın temel KVVY klinik durumları çalışmamızdaki grup ile benzer görünse de farklı yönde ifade düzeylerinin belirlenmiş olması popülasyonlara özgü olabilecek diğer faktörlere bağlı epigenetik etkilerden kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuçların, farklı araştırma gruplarında daha fazla vaka örneği ile doğrulanması önemli olacaktır.

Bu çalışmada, KVVY'in ciddiyeti ile ilişkili olarak seçilen aday kodlamayan RNA'ların etkileri ilgili ön bilgiler elde edilmesinin yanısıra lökositlerde miR-222 hariç diğer kodlamayan RNA'ların KVVY tanısının ayırımında yüksek duyarlılık ve özgüllükle biyobelirteç olarak değerlendirildi. Bu konuda, KVVY ile ilgili başka bir çalışma mevcut olmayıp sonuçların daha fazla vaka ve başka çalışmalar ile doğrulanması, araştırma vakalarının takiplerinde tekrar periferik kan örneği toplanarak tez kapsamında seçilen aday kodlamayan RNA'ların ifade düzeylerinin tekrar belirlenmesi klinik pratikteki kullanımı açısından değer taşıyabilir.

Tez çalışmasında, literatür bilgilerine göre sınırlı sayıda kodlamayan RNA aday olarak seçilerek ifade düzeylerinin çalışılması ve hedef gen ifade düzeylerinin belirlenememesi, KVVY patogenezindeki rolleri hakkında bilgi elde edilememesine sebep olmuştur. Çalışmanın bu kısıtlılığı göz önüne alındığında, ileride hem hedef gen ifadelerinin belirlenmesi hem de çalışma gruplarının plazma örneklerinde aday ncRNA'ların ifade düzeyleri belirlenerek, tanısal olarak kullanımlarının değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bu moleküllerin klinik takipteki önemleri, aile hikayesi olan ve KVVY için riskli grupta yer alan bireylerin semptomsuz durumdan itibaren bu aday kodlamayan RNA'ların ifade düzeylerinin belirlenmesi ile ortaya konulabilir.

Sonuç olarak;

- 1- KVY hastalarının variköz venlerinde, miR-222 ifadesinin arttığı, AK021444 ifadesinin azaldığı belirlendi. Bu kodlamayan RNA'lar, variköz venlerde meydana gelen patolojik değişikliklerde rol oynayan matriks proteinlerinin regülasyonunda rol oynuyor olabilir.
- 2- KVY hastalarının lökositlerinde miR-202 ifadesinin azaldığı, AK021444 ifadesinin arttığı ve GAS5 ifadesinin azaldığı belirlendi. Bu ifade değişiklikleri, KVY'de meydana gelen enflamatuvar yanıt ile ilişkili olabilir.
- 3- Çalışma grubunun lökosit örneklerinde, KVY hastalık ayırımında miR-202 (AUC:0.93)'nin %96.4 duyarlılık ve %89.2 özgüllükle, AK021444 (AUC: 0.97)'ün %87 duyarlılık ve %97.3 özgüllükle ve GAS5 (AUC: 0.65)'in %74 duyarlılık ve %56.8 özgüllükle biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

KAYNAKLAR

1. Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. *Br J Surg.* 1994 Feb;81(2):167-73. doi: 10.1002/bjs.1800810204.
2. Robertson L, Evans C, Fowkes FG. Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology.* 2008;23(3):103-11. doi: 10.1258/phleb.2007.007061.
3. Lohr JM, Bush RL. Venous disease in women: epidemiology, manifestations, and treatment. *J Vasc Surg.* 2013 Apr;57(4 Suppl):37S-45S. doi: 10.1016/j.jvs.2012.10.121.
4. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):516-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.003.
5. Zhang L, Zhang Y, Zhao Y, Wang Y, Ding H, Xue S, Li P. Circulating miRNAs as biomarkers for early diagnosis of coronary artery disease. *Expert Opin Ther Pat.* 2018 Aug;28(8):591-601. doi: 10.1080/13543776.2018.1503650.
6. Kataoka M, Wang DZ. Non-Coding RNAs Including miRNAs and lncRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Cells.* 2014 Aug 22;3(3):883-98. doi: 10.3390/cells3030883.
7. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhäuser ML, Ding H, Butty VL, Torrey L, Haas S, Abo R, Tabebordbar M, Lee RT, Burge CB, Boyer LA. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell.* 2013 Jan 31;152(3):570-83. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.003.
8. Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(14):6391-400. doi: 10.1093/nar/gks296.
9. Uchida S, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2015 Feb 13;116(4):737-50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.302521.
10. Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, Kasaragod P, Shelton JM, Liou J, Bassel-Duby R, Olson EN. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell.* 2015 Feb 12;160(4):595-606. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.009.

11. Markovic JN, Shortell CK. Genomics of varicose veins and chronic venous insufficiency. *Semin Vasc Surg.* 2013 Mar;26(1):2-13. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2013.04.003.
12. Ballantyne MD, Pinel K, Dakin R, Vesey AT, Diver L, Mackenzie R, Garcia R, Welsh P, Sattar N, Hamilton G, Joshi N, Dweck MR, Miano JM, McBride MW, Newby DE, McDonald RA, Baker AH. Smooth Muscle Enriched Long Noncoding RNA (SMILR) Regulates Cell Proliferation. *Circulation.* 2016 May 24;133(21):2050-65. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.021019.
13. Cui C, Liu G, Huang Y, Lu X, Lu M, Huang X, Li W, Jiang M. MicroRNA profiling in great saphenous vein tissues of patients with chronic venous insufficiency. *Tohoku J Exp Med.* 2012 Dec;228(4):341-50. doi: 10.1620/tjem.228.341.
14. Li X, Jiang XY, Ge J, Wang J, Chen GJ, Xu L, Xie DY, Yuan TY, Zhang DS, Zhang H, Chen YH. Aberrantly expressed lncRNAs in primary varicose great saphenous veins. *PLoS One.* 2014 Jan 31;9(1):e86156. doi: 10.1371/journal.pone.0086156.
15. Li L, Li X, The E, Wang LJ, Yuan TY, Wang SY, Feng J, Wang J, Liu Y, Wu YH, Ma XE, Ge J, Cui YY, Jiang XY. Low expression of lncRNA-GAS5 is implicated in human primary varicose great saphenous veins. *PLoS One.* 2015 Mar 25;10(3):e0120550. doi: 10.1371/journal.pone.0120550.
16. Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Smith PD, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic venous disease. *N Engl J Med.* 2006 Aug 3;355(5):488-98. doi: 10.1056/NEJMra055289.
17. Rabe E, Pannier F. Clinical, aetiological, anatomical and pathological classification (CEAP): gold standard and limits. *Phlebology.* 2012 Mar;27 Suppl 1:114-8. doi: 10.1258/phleb.2012.012s19.
18. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol.* 2005 Mar;15(3):175-84. doi: 10.1016/j.annepidem.2004.05.015.
19. Çınar-Özdemir Ö, Altındağ E, Avcı F, Uysal MF. Kronik Venöz Yetmezlik. *Türkiye Klinikleri J Health Sci* 2016;1(2):125-38.
20. Yıldırım M. VI. Kronik Venöz Yetmezlik Kursu. Sempozyum Dizisi No: 56. 2007. p.9-17.

21. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. *Circulation*. 2014 Jul 22;130(4):333-46. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006898.
22. Kadir S. *Atlas of Normal and Variant Angiographic Anatomy*, W B Saunders Company, Philadelphia 1991, p. 203-225.
23. Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, Eaglstein WH. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Mar;44(3):401-21; quiz 422-4. doi: 10.1067/mjd.2001.111633.
24. Santler B, Goerge T. Chronic venous insufficiency - a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017 May;15(5):538-556. doi: 10.1111/ddg.13242.
25. Andreotti L, Cammelli D. Connective tissue in varicose veins. *Angiology*. 1979 Dec;30(12):798-805. doi: 10.1177/000331977903001202.
26. Venturi M, Bonavina L, Annoni F, Colombo L, Butera C, Peracchia A, Mussini E. Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res*. 1996 Jan;60(1):245-8. doi: 10.1006/jsre.1996.0038.
27. Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, Halpern VJ, Mulcare RJ, Tilson MD. Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg*. 1993 Nov;18(5):814-20.
28. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Fabiani JN, Verbeuren TJ. Chronic venous insufficiency: dysregulation of collagen synthesis. *Angiology*. 2003 Jul-Aug;54 Suppl 1:S13-8. doi: 10.1177/0003319703054001S03.
29. Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, Al-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2007 Apr;6(2):219-24. doi: 10.1510/icvts.2006.136937.
30. Raffetto JD, Mannello F. Pathophysiology of chronic venous disease. *Int Angiol*. 2014 Jun;33(3):212-21.
31. Schmid-Schönbein G.W, 2006, *Molecular Basis of Venous Insufficiency*, The Vein Book, Chapter 7: 67-78.
32. Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*. 2009 Nov;96(11):1231-42. doi: 10.1002/bjs.6798.
33. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4. doi: 10.1074/jbc.274.31.21491.

34. Mansilha A, Sousa J. Pathophysiological Mechanisms of Chronic Venous Disease and Implications for Venoactive Drug Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 5;19(6):1669. doi: 10.3390/ijms19061669.
35. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *Surg Clin North Am.* 2018 Apr;98(2):337-347. doi: 10.1016/j.suc.2017.11.002.
36. Kabalcı M, Kültür T. Kronik venöz yetmezlik ve güncel tedavi seçenekleri. *Ortadoğu Medical Journal.* 2017 9 (4): 191-197.
37. Köksal C, Alsalehi S, Kocamaz Ö, Sunar H. Kronik Venöz Yetmezlik Tedavisi. *Koşuyolu Kalp Dergisi* 2010;13(2):28-33.
38. Chwała M, Szczeklik W, Szczeklik M, Aleksiejew-Kleszczyński T, Jagielska-Chwała M. Varicose veins of lower extremities, hemodynamics and treatment methods. *Adv Clin Exp Med.* 2015 Jan-Feb;24(1):5-14. doi: 10.17219/acem/31880.
39. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):47-62. doi: 10.1038/nrg.2015.10.
40. Bektik E, Cowan DB, Wang DZ. Long Non-Coding RNAs in Atrial Fibrillation: Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model System. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 30;21(15):5424. doi: 10.3390/ijms21155424.
41. Thum T, Condorelli G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circ Res.* 2015 Feb 13;116(4):751-62. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303549.
42. Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Mar;20(3):300-7. doi: 10.1038/nsmb.2480.
43. Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science.* 2012 Dec 14;338(6113):1435-9. doi: 10.1126/science.1231776.
44. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet.* 2014 Jan;15(1):7-21. doi: 10.1038/nrg3606.
45. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps reveal new RNA classes and a possible

- function for pervasive transcription. *Science*. 2007 Jun 8;316(5830):1484-8. doi: 10.1126/science.1138341.
46. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
 47. Collins L, Binder P, Chen H, Wang X. Regulation of Long Non-coding RNAs and MicroRNAs in Heart Disease: Insight Into Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Physiol*. 2020 Jul 10;11:798. doi: 10.3389/fphys.2020.00798.
 48. Bharath V, Kahn SR, Lazo-Langner A. Genetic polymorphisms of vein wall remodeling in chronic venous disease: a narrative and systematic review. *Blood*. 2014 Aug 21;124(8):1242-50. doi: 10.1182/blood-2014-03-558478.
 49. Ellinghaus E, Ellinghaus D, Krusche P, Greiner A, Schreiber C, Nikolaus S, Gieger C, Strauch K, Lieb W, Rosenstiel P, Frings N, Fiebig A, Schreiber S, Franke A. Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies EFEMP1 and KCNH8 as susceptibility loci. *Sci Rep*. 2017 Apr 4;7:45652. doi: 10.1038/srep45652.
 50. Grzela T, Bialoszewska A. Genetic risk factors of chronic venous leg ulceration: Can molecular screening aid in the prevention of chronic venous insufficiency complications? *Mol Med Rep*. 2010 Mar-Apr;3(2):205-11. doi: 10.3892/mmr_00000241.
 51. Jin Y, Xu G, Huang J, Zhou D, Huang X, Shen L. Analysis of the association between an insertion/deletion polymorphism within the 3' untranslated region of COL1A2 and chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg*. 2013 Oct;27(7):959-63. doi: 10.1016/j.avsg.2013.04.001.
 52. Huang X, Liu Z, Shen L, Jin Y, Xu G, Zhang Z, Fang C, Guan W, Liu C. Augmentation of miR-202 in varicose veins modulates phenotypic transition of vascular smooth muscle cells by targeting proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α . *J Cell Biochem*. 2019 Jun;120(6):10031-10042. doi: 10.1002/jcb.28287.
 53. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and

- erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18081-6. doi: 10.1073/pnas.0506216102.
54. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 May;93(5):1600-8. doi: 10.1210/jc.2007-2696.
 55. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, Majumder S. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31;283(44):29897-903. doi: 10.1074/jbc.M804612200.
 56. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 1;16(3):867-75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1840.
 57. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2009 Feb 27;104(4):476-87. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185363.
 58. Zhang C. MicroRNAs in vascular biology and vascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010 Jun;3(3):235-40. doi: 10.1007/s12265-010-9164-z.
 59. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3068-71. doi: 10.1182/blood-2006-01-012369.
 60. Williams GT, Mourtada-Maarabouni M, Farzaneh F. A critical role for non-coding RNA GAS5 in growth arrest and rapamycin inhibition in human T-lymphocytes. *Biochem Soc Trans*. 2011 Apr;39(2):482-6. doi: 10.1042/BST0390482.
 61. Mourtada-Maarabouni M, Pickard MR, Hedge VL, Farzaneh F, Williams GT. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. *Oncogene*. 2009 Jan 15;28(2):195-208. doi: 10.1038/onc.2008.373.

62. Mayama T, Marr AK, Kino T. Differential Expression of Glucocorticoid Receptor Noncoding RNA Repressor Gas5 in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Horm Metab Res.* 2016 Aug;48(8):550-7. doi: 10.1055/s-0042-106898.
63. Biranvand AS, Khosravi M, Esfandiari G, Poursaleh A, Hosseini-Fard SR, Amirfarhangi A, Najafi M. Associations between miR-661, miR-1202, lncRNA-HOTAIR, lncRNA-GAS5 and MMP9 in differentiated M2-macrophages of patients with varicose veins. *Int Angiol.* 2018 Dec;37(6):451-456. doi: 10.23736/S0392-9590.18.04022-1.
64. Han J, Rong LF, Shi CB, Dong XG, Wang J, Wang BL, Wen H, He ZY. Screening of lymph nodes metastasis associated lncRNAs in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2014 Jul 7;20(25):8139-50. doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8139.
65. Li J, Yang C, Li Y, Chen A, Li L, You Z. LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer by inducing inflammasome formation. *Biosci Rep.* 2018 Apr 27;38(2):BSR20171150. doi: 10.1042/BSR20171150.
66. Jacobs BN, Andraska EA, Obi AT, Wakefield TW. Pathophysiology of varicose veins. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2017 May;5(3):460-467. doi: 10.1016/j.jvsv.2016.12.014.
67. Vuylsteke ME, Thomis S, Guillaume G, Modliszewski ML, Weides N, Staelens I. Epidemiological study on chronic venous disease in Belgium and Luxembourg: prevalence, risk factors, and symptomatology. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015 Apr;49(4):432-9. doi: 10.1016/j.ejvs.2014.12.031.
68. Komsuoglu B, Goldeli O, ve ark. Prevalence and risk factors of varicose veins in an elderly population. *Gerontology.* 1994; 40:25-31.
69. Akbulut B, Uçar HI, Oç M, İkizler M, Yorgancıoğlu C, Dernek S, Böke E. Characteristics of venous insufficiency in western Turkey: VEYT-I study. *Phlebology.* 2012 Oct;27(7):374-7. doi: 10.1258/phleb.2011.011100.
70. Davies AH. The Seriousness of Chronic Venous Disease: A Review of Real-World Evidence. *Adv Ther.* 2019 Mar;36(Suppl 1):5-12. doi: 10.1007/s12325-019-0881-7.
71. Lurie F. Advanced Stages of Chronic Venous Disease: Evolution of Surgical Techniques and Advantages of Associated Medical Treatment. *Adv Ther.* 2020 Feb;37(Suppl 1):6-12. doi: 10.1007/s12325-019-01216-w.

72. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
73. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31. doi: 10.1038/nrg1379. Erratum in: *Nat Rev Genet*. 2004 Aug;5(8):631.
74. Silva DCPD, Carneiro FD, Almeida KC, Fernandes-Santos C. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol*. 2018 Nov;111(5):738-746. doi: 10.5935/abc.20180215.
75. Zalewski DP, Ruszel KP, Stępniewski A, Gałkowski D, Bogucki J, Komsta Ł, Kołodziej P, Chmiel P, Zubilewicz T, Feldo M, Kocki J, Bogucka-Kocka A. Dysregulations of MicroRNA and Gene Expression in Chronic Venous Disease. *J Clin Med*. 2020 Apr 25;9(5):1251. doi: 10.3390/jcm9051251.
76. Haemmig S, Simion V, Yang D, Deng Y, Feinberg MW. Long noncoding RNAs in cardiovascular disease, diagnosis, and therapy. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Nov;32(6):776-783. doi: 10.1097/HCO.0000000000000454.
77. Tuccoli A, Poliseno L, Rainaldi G. miRNAs regulate miRNAs: coordinated transcriptional and post-transcriptional regulation. *Cell Cycle*. 2006 Nov 1;5(21):2473-6. doi: 10.4161/cc.5.21.3422.
78. Zhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, Guo Z, Liu J, Wang Y, Yuan W, Qin Y. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 2011 Apr;215(2):286-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.024.
79. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005 Sep 8;353(10):999-1007. doi: 10.1056/NEJMoa043814.
80. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Nganheu A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*. 2009 Dec 8;16(6):498-509. doi: 10.1016/j.ccr.2009.10.014.
81. Green DE, Murphy TC, Kang BY, Searles CD, Hart CM. PPAR γ Ligands Attenuate Hypoxia-Induced Proliferation in Human Pulmonary Artery Smooth

- Muscle Cells through Modulation of MicroRNA-21. *PLoS One*. 2015 Jul 24;10(7):e0133391. doi: 10.1371/journal.pone.0133391.
82. Liu X, Yu J, Jiang L, Wang A, Shi F, Ye H, Zhou X. MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009 May-Jun;6(3):131-9.
 83. Hu X, Hu F, Xu Y, Tang J, Chu H, Zhong Y. Disequilibrium in MMPs and the tissue inhibitor of metalloproteinases in different segments of the varicose great saphenous vein wall. *Int Angiol*. 2019 Jun;38(3):185-193. doi: 10.23736/S0392-9590.19.04144-0.
 84. Görmüş U, Timirci-Kahraman O, Ergen A, Kunt AT, Isbir S, Dalan AB, Isbir T. Expression levels of elastin and related genes in human varicose veins. *Folia Biol (Praha)*. 2014;60(2):68-73.
 85. Woodside KJ, Hu M, Burke A, Murakami M, Pounds LL, Killewich LA, Daller JA, Hunter GC. Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*. 2003 Jul;38(1):162-9. doi: 10.1016/s0741-5214(03)00134-4.
 86. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(5):267-74. doi: 10.5551/jat.10.267.
 87. Lu J, Xu FQ, Guo JJ, Lin PL, Meng Z, Hu LG, Li J, Li D, Lu XH, An Y. Long noncoding RNA GAS5 attenuates cardiac fibroblast proliferation in atrial fibrillation via repressing ALK5. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Sep;23(17):7605-7610. doi: 10.26355/eurrev_201909_18883.
 88. Wang YN, Shan K, Yao MD, Yao J, Wang JJ, Li X, Liu B, Zhang YY, Ji Y, Jiang Q, Yan B. Long Noncoding RNA-GAS5: A Novel Regulator of Hypertension-Induced Vascular Remodeling. *Hypertension*. 2016 Sep;68(3):736-48. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07259.
 89. Rui Q, Xu Z, Yang P, He Z. Long noncoding RNA expression patterns in lymph node metastasis in colorectal cancer by microarray. *Biomed Pharmacother*. 2015 Oct;75:12-8. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.003.
 90. Wang M, Luo J, Wan L, Hu T, Li S, Zhan C. Screening genes associated with myocardial infarction and transverse aortic constriction using a combined analysis

- of miRNA and mRNA microarray. *Gene*. 2015 Oct 25;571(2):245-8. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.070.
91. Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, Molkentin JD, Markwald RR, Tkatchenko AV. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease. *Physiol Genomics*. 2009 Nov 6;39(3):160-8. doi: 10.1152/physiolgenomics.00078.2009.
92. Jeong JY, Jeong W, Kim HJ. Promotion of Chondrosarcoma Cell Survival, Migration and Lymphangiogenesis by Periostin. *Anticancer Res*. 2020 Oct;40(10):5463-5469. doi: 10.21873/anticancer.14557.



FORMLAR

GENETİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: Kronik Venöz Yetersizlikte Kodlamayan RNA Düzeylerinin Belirlenmesi ve Hastalık Ciddiyetine Etkisi

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Kronik Venöz Yetersizlik, toplar damarlardaki kapaklardaki yetersizlik veya tıkanıklık sebebiyle toplar damarlarda meydana gelen hipertansiyona bağlı gelişen farklı komplikasyonlarla ortaya çıkan önemli bir sağlık problemidir. Kronik venöz yetersizliğe sebep olan aynı zamanda ciddiyeti ile ilişkili olabilecek genetik biyobelirteçleri bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Kronik Venöz Yetersizlikte Kodlamayan RNA Düzeylerinin Belirlenmesi ve Hastalık Ciddiyetine Etkisi”dir ve yaklaşık 1 yıl sürecektir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, Kronik Venöz Yetersizlik ile ilişkili şikayetinizin bulunmasından dolayıdır. İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı bu hastalığın nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirecektir. Kendinizde bir şikayet olmasa bile katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı yaklaşık 100’dir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Doç. Dr. Cenk Eray Yıldız tarafından araştırma yapılacak ve bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmayı yapabilmek için operasyon öncesi kolunuzdan ve yetersizlik oluşmuş damarınızdan 10 (2 tüp) ml. kadar kan almamız gerekmektedir. Ayrıca, hastalığa sebep olan damar dokusundan yaklaşık 1 gr almamız gerekmektedir. Bu doku ve kanlardan genetik materyal (DNA ve RNA) ile protein elde edilecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Doku alınması sırasında oluşabilecek riskler: Variköz ven Pake uygulaması esnasında çıkarılan variköz venlerin çalışma için alınması, hastaya operatif risklerin haricinde ilave bir risk oluşturmamaktadır. Ancak, operasyon sonrası oluşabilecek olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ancak hemen belirtmemiz gerekir ki; yaptığımız testler sizin veya ailenizin bir ferdinin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Sizin anormal bir gen taşıdığınızı saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmenizi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

Yapılacak genetik testin getireceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili hastalığın genetik nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili hastalığın temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Örneklerin Saklanması

Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Veya

Bu bilimsel araştırma sırasında alınan kan örneklerinin tamamı kullanılmayıp bir bölümü benzeri araştırmalarda kullanılmak üzere saklanabilir. Lütfen aşağıdaki 2 cümleyi okuyarak uygun olanını işaretleyiniz:

() Doku ve kan örneklerinin sadece bu çalışmayla ilgili olarak kullanılmasını istiyorum. Çalışma bitiminde kalan örneklerin uygun şekilde yok edilmesini istiyorum.

() Doku ve kan örnekleri bu çalışmada kullanıldığı gibi gelecekteki hastalığımla ilgili diğer bilimsel çalışmalarda kullanılabilir. Ancak kalan örneklerimin hastalığım dışındaki başka bir araştırmada kullanılmasını uygun bulmuyorum.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Sayın Doç. Dr. Cenk Eray Yıldız ve ekibi tarafından (İrtibat Tel: 0212-4142200-33314) tarafından İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı’nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı”

olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

6. GÖNÜLLÜNÜN		7. İMZASI
ADI SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		8. İMZASI
ADI SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		9. İMZASI
ADI SOYADI		
TARİH		

RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		10. İMZASI
ADI SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KRONİK VENÖZ YETERSİZLİKTE KODLAMAYAN RNA DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ VE HASTALIK CİDDİYETİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	www.tibbigenetik2018.org İnternet Kaynağı	<% 1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<% 1

lokman.cu.edu.tr

